

6 ERGEBNISSE

6.1 Cyclophosphamid induziert eine vorzeitige Veränderung des Hautkolorits und eine breitflächige Alopezie

Im Prozess der Modellentwicklung wurde die Wirkung des Zytostatikums CYP (Endoxan, Asta Medica) auf den Haarzyklus in Pilot-Studien getestet. Aufgrund des starken zytotoxischen Effekts dieses Medikaments wurde erwartet, dass bereits niedrige Dosen eine ZIA induzieren werden. **Abb. 13** stellt die dosisabhängige Umstellung der Hautfarbe und die ZIA während dieser Experimente dar. Die Darstellung lässt erkennen, dass eine CYP-Dosis von 10 mg/kg Körpergewicht ohne Auswirkung auf den Haarwuchs bleibt. Die Dosis von 50 mg/kg ist indes kritisch für die Umstellung der Hautfarbe und für die Entstehung einer ZIA. Dagegen reagieren die mit 100 mg/kg und 150 mg/kg CYP behandelten Tiere bereits vier Tage nach der Behandlung mit einer Änderung der Hautfarbe von schwarz über zyanidgrau zu rosa und mit einem diffusen Haarverlust in dosisabhängiger Stärke.

Von der Grafik ist weiter abzulesen, dass der Haarverlust und die katagenähnlichen Veränderungen der Hautfarbe bei der Mehrzahl der mit 100 und 150 mg/kg behandelten Tiere dominieren. Dagegen bleiben der Haarverlust und die Umstellung der Hautfarbe in den Gruppen mit einer Dosis von 50 mg/kg konstant gering und nur auf einzelne Tiere beschränkt. Die mit unterschiedlicher CYP-Dosis behandelten Testgruppen weisen in den Tagen nach der Behandlung signifikante Unterschiede zueinander sowie zu den Kontrollen (Vehikel) auf.

Aufgrund der Ergebnisse können wir zusammenfassen, dass die Dosis von 150 mg/kg Körpergewicht optimal ist, um eine Änderung der Hautfarbe und die gewünschte breitflächige ZIA in sämtlichen Versuchstieren bis zum Tag 14 p.d. zu provozieren. Obwohl diese Dosis relativ hoch ist (LD_{50} für eine Maus: 275 mg/kg), sind keine weitere Zeichen einer systemischen Toxizität wie Reduktion des Körpergewichts, Verhaltensstörungen oder Tod registriert worden.

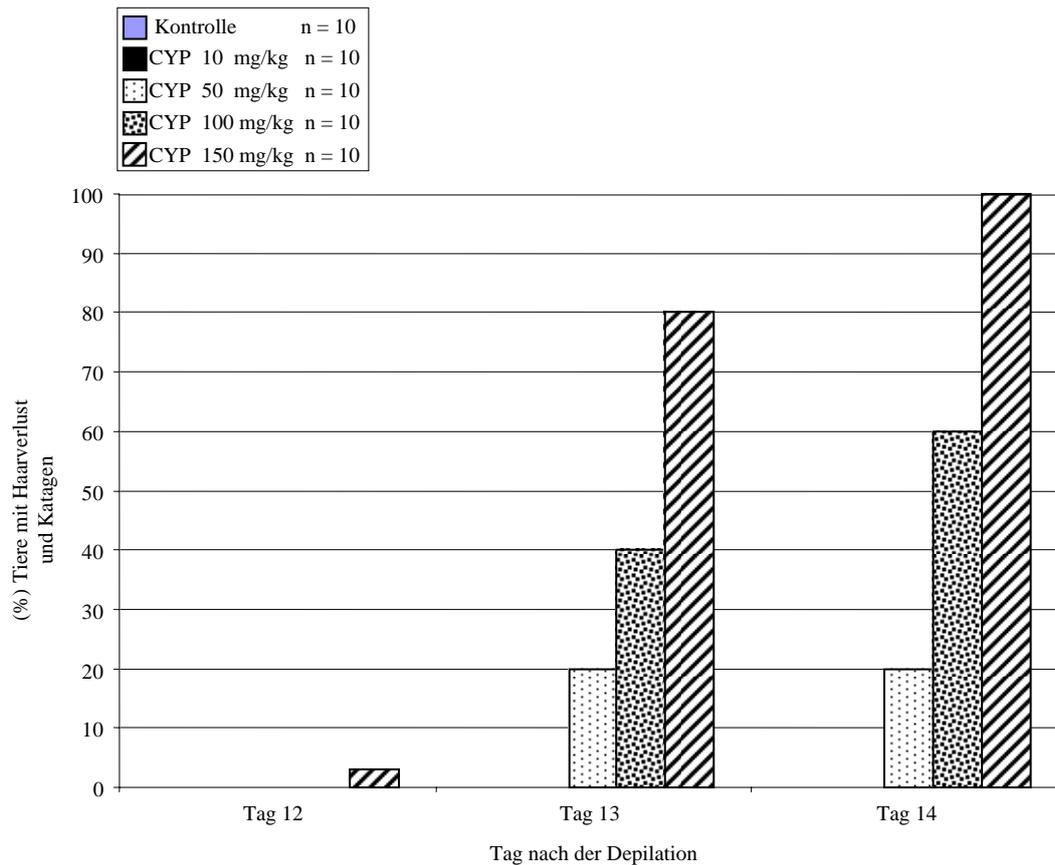


Abb. 13 Makroskopische Befunde im Zeitraum von 12 bis 14 Tagen nach der Depilation. Haarausfall (ZIA) und dosisabhängige Veränderungen der Hautfarbe als Katagenzeichen nach Applikation von unterschiedlichen Dosen CYP. Repräsentative Ergebnisse von zwei separat durchgeführten Pilot-Experimenten ($n =$ Anzahl der Tiere). Aufgrund der kleinen Anzahl von Tieren mit Effluvium und makroskopischen Zeichen von Katagen bzw. einer ZIA während der ersten Tage nach der CYP-Applikation sowie der daraus resultierenden stark erhöhten Standardabweichungen wurde die Standardabweichung nicht angegeben.

Für das Studium der ZIA und die Wiederherstellung des Haarfells wurden insgesamt acht separate Tierversuche mit einer CYP-Dosis von 150 mg/kg durchgeführt. Die tägliche Inspektion der Haut während der ersten Woche nach der Behandlung in **Abb. 14 A** zeigt, dass ein Haarverlust und eine Umstellung des Hautkolorits von schwarz über zyanidgrau zu rosa schon ab Tag 12 p.d. zu erwarten sind. Die Anzahl der Mäuse mit solchen Befunden steigt progressiv an, und um den Tag 14 p.d. zeigen sämtliche mit CYP_{150 mg/kg} behandelten Tiere eine signifikant veränderte Hautfarbe und ZIA. Weil für die Mäuse der Charge C56BL/6 der spontane Übergang ins Katagen erst ab Tag 17/18 p.d zu erwarten ist, kann diese vorzeitige Umstellung der

Hautfarbe mit einer CYP-bedingten, rapiden Unterbrechung der Melanogenese, der Transformation ins Katagen sowie mit Schäden an der HF-Architektur erklärt werden.

Die **Abb. 14 B** spiegelt die Dynamik der Progression und das Ausmaß der ZIA innerhalb der ersten fünf Tage nach der Behandlung wider. Aus der Grafik ist abzulesen, dass der Haarverlust, ein *Anagen-Effluvium*, schon drei Tage nach der CYP-Gabe auftritt. Die ZIA breitet sich bis Tag 14 p.d. rasant auf der Rückenfläche aller Tiere aus. Das anfangs diffusere Effluvium legt mit der Zeit immer breitere Areale frei und erfasst schließlich mehr als die Hälfte der Rückenhaut.

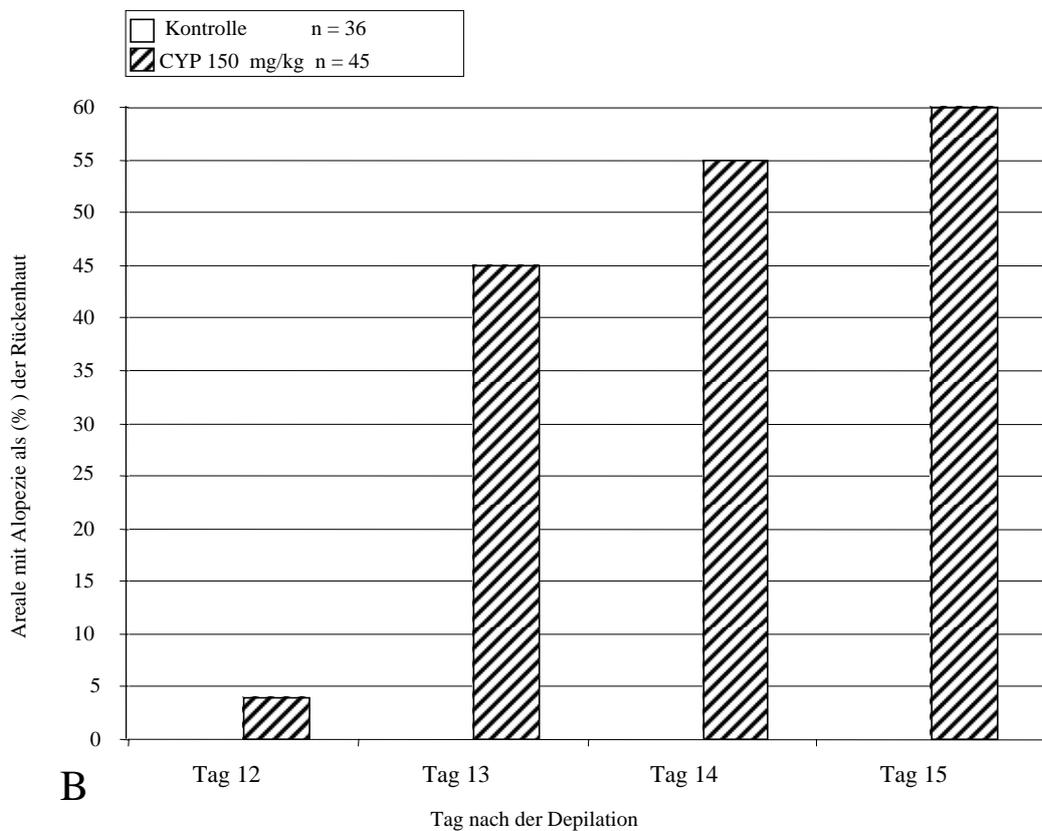
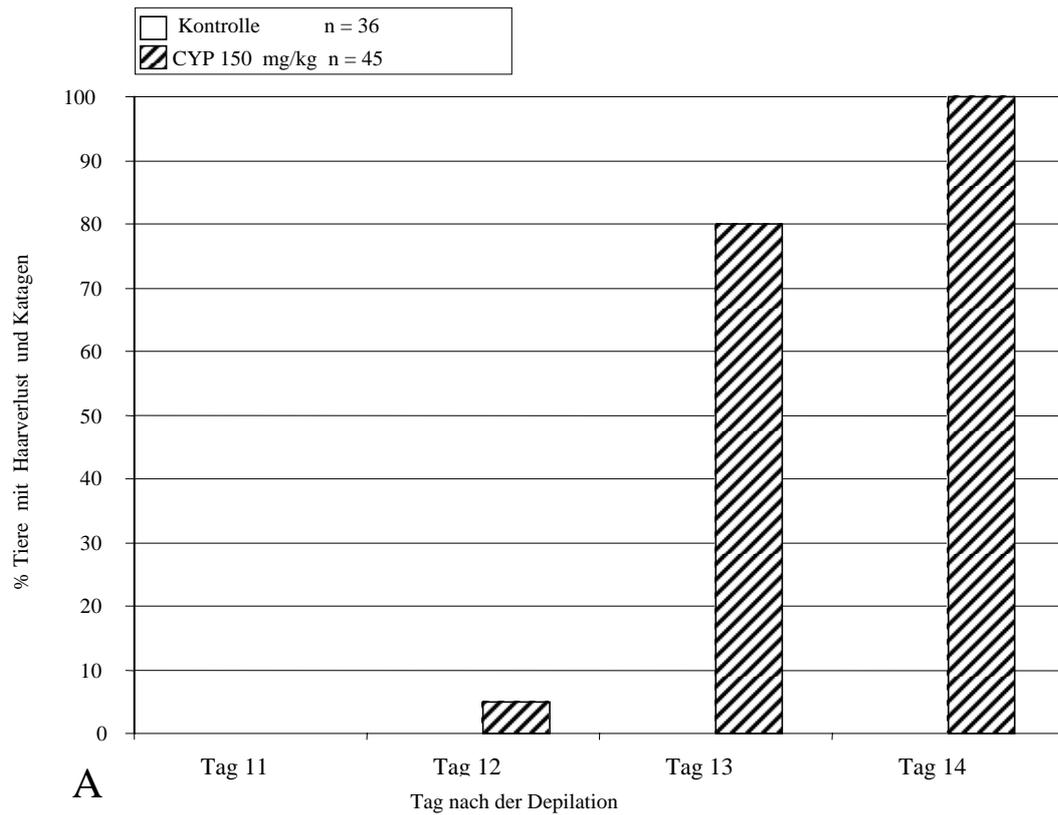


Abb. 14 Auswirkung von 150 mg/kg CYP auf die murine Rückenhaut und das Haarkleid.

Abb. 14 A) zeigt den Anteil der Tiere mit Zeichen von Katagen und Haarverlust (ZIA) während der ersten fünf Tage nach der CYP_{150 mg/kg}-Gabe. Die Befunde schließen eine progressive Änderung des Hautkolorits von schwarz zu rosa und die Anwesenheit von Arealen mit unterschiedlich stark ausgeprägtem Haarausfall während der Zeit von Tag 11 bis 14 nach der Depilation mit ein. **Abb. 14 B)** gibt Auskunft über die Progression der ZIA auf der Rückenhaut. Die Balken geben Aufschluss über die Ausdehnung der ZIA bis Tag 15 nach der Depilation und zeigen das durchschnittliche Ausmaß der Alopezie in Prozent der Rückenhaut. Sie repräsentieren den Mittelwert der zusammengestellten Daten von acht unabhängigen Versuchen mit insgesamt $n_{\text{CYP}} = 45$ und $n_{\text{Kontrolle}} = 36$ Tieren, wobei täglich eine unterschiedliche Anzahl von Mäusen getötet wurde. Wegen der kleinen Anzahl von Tieren mit Effluvium und makroskopischen Zeichen von Katagen bzw. einer ZIA während der ersten Tage nach der CYP-Injektion und der daraus resultierenden, stark erhöhten Standardabweichungen, wurde die Standardabweichung nicht dargestellt. Die hoch signifikanten Unterschiede zwischen den Kontrollen (Vehikel) und CYP sind auch nicht angezeigt.

Die in **Abb. 15** dargestellte Photodokumentation der Ereignisse bestätigt, dass die vorzeitige Anagentermination und die ZIA zunächst als kleine umschriebene Areale im Bereich der Nackenregion zu beobachten sind (**Abb. 15 A**). Die signifikante Veränderung der Hautfarbe und eine breitere ZIA an den Flanken und in den mittleren Rückenpartien folgen 0.5 bis 2 Tage danach. Jedoch verbleibt am Tag 13/14 p.d. (**Abb. 15 B** und **Abb. 15 C**) ein Hautareal mit noch erhaltenen Haarschäften nahe dem Schwanz.

Aus diesen Ergebnissen kann man zusammenfassen, dass die ZIA zunächst in der kranialen Hälfte der Rückenhaut der Versuchstiere eintritt, wo sie auch bis zum Schluss am stärksten ausgeprägt ist. Die ZIA breitet sich grundsätzlich auf die mittleren Rückenpartien und die Flanken aus. Sie wurde niemals im ventralen Bereich oder auf dem Kopf beobachtet. Das ist kein unerwarteter Befund, da die Population der hoch aktiven Anagen VI-HF in der Rückenhaut sehr sensibel gegenüber zytotoxischen Pharmaka ist. Der Befund ist wichtig, weil hier ein Zusammenhang mit der ZIA bei Menschen hergestellt werden könnte.

Abb. 15 zeigt Aufnahmen von repräsentativen Tieren mit ZIA und Katagen innerhalb der ersten Woche nach der Behandlung mit CYP_{50mg/kg}, CYP_{150mg/kg} und CsA+CYP_{150mg/kg}
A) Unveränderte Kontroll- (Vehikel, links im Bild) und Testtiere (CYP_{150mg/kg}, rechts) drei Tage nach der Behandlung mit diffusem Haarverlust und stecknadelkopfgroßen ZIA-Herden.

B) Tiere der Kontrolle (Vehikel, links im Bild), CYP_{50mg/kg}- (Mitte) und CYP_{150mg/kg} (rechts) Gruppe am Tag 14 p.d. Zu vermerken ist die schwächer ausgeprägte ZIA der CYP_{50mg/kg} Gruppe (vorwiegend in der Nackenregion) im Vergleich zur breitflächigen ZIA der mit CYP_{150mg/kg} behandelten Tiere. Die Hautfärbung dieser Tiere (Grau- und Rosabereich) deutet auf die Schäden der Pigmentzellen und auf die Initiation des Katagens hin.

C) Relative Inhibition der ZIA durch Gabe von CsA+CYP_{150mg/kg} an Tag 15 p.d. Im Gegensatz zu den Mäusen der CYP_{150mg/kg}-Gruppe haben einige der mit CsA+CYP_{150mg/kg} behandelten Mäuse noch ein relativ gut erhaltenes Haarkleid.

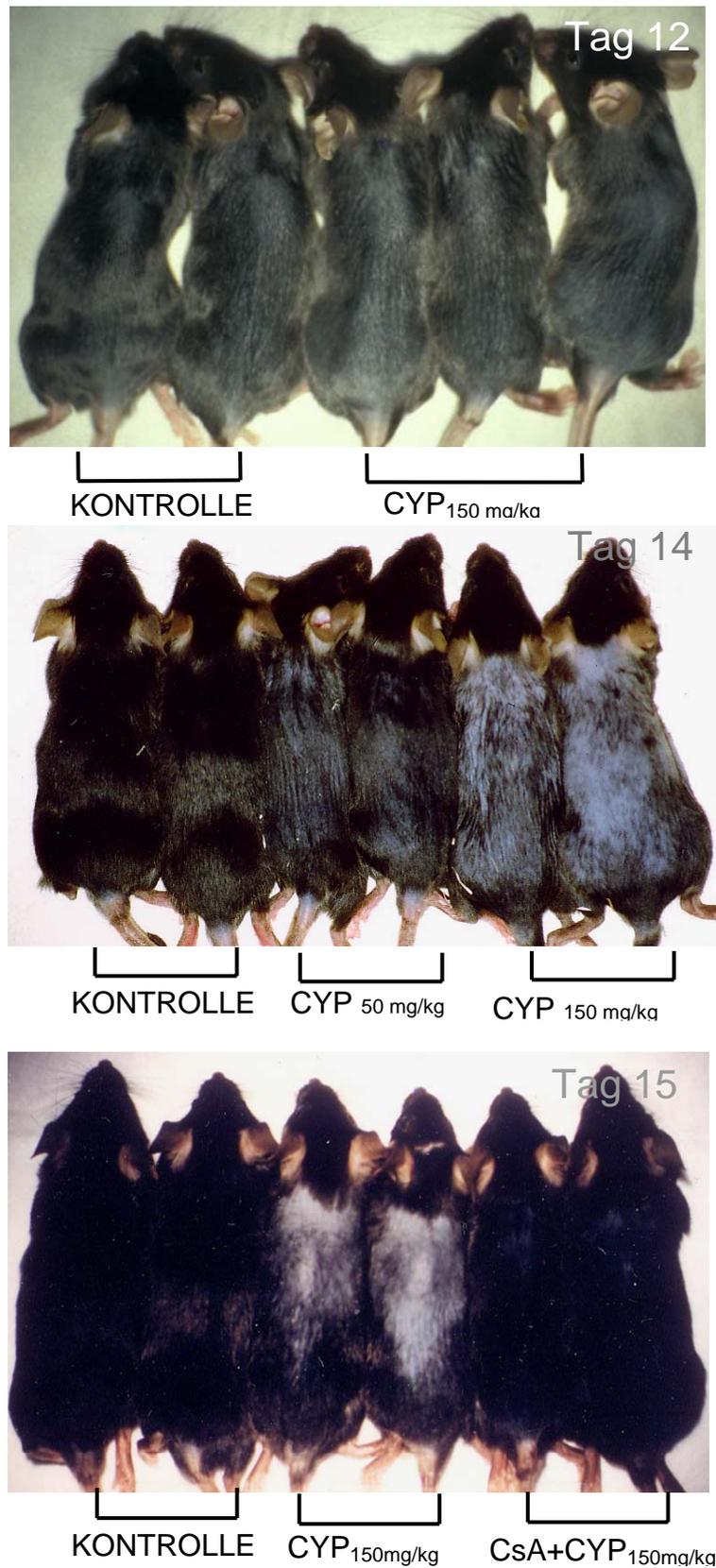


Abb. 15 Repräsentative Aufnahmen von Tieren mit ZIA und Katagen innerhalb der ersten Woche nach der Behandlung mit CYP_{50mg/kg} bzw. CYP_{150mg/kg} und CsA+CYP_{150mg/kg} an Tag 12 p.d. (oben), Tag 14 (Mitte) und Tag 15 p.d. (unten).

6.2 Cyclophosphamid-induzierte Alopezie entsteht infolge von dystrophem Anagen und dystrophem Katagen

Die Rückenhaut aller Tiere mit ZIA wurde lichtmikroskopisch anhand von Giemsa-gefärbten Hautschnitten untersucht und nach bereits beschriebenen Kriterien (**Kapitel 6.5**) dargestellt. Der prozentuale Anteil der einzelnen Populationen für die CYP-Dosis 50 bzw. 150mg/kg bis zum Tag 14 nach der Depilation ist in **Abb. 16** dargestellt.

Um das höhere Potential der CYP-Dosis von 150mg/kg für die Initiation einer ZIA zu begründen, wurden in **Abb. 16 A** die Daten von Tieren nach Behandlung mit 50mg/kg CYP mitgeführt. Im Gegensatz zu den mit 150 mg/kg CYP behandelten Tieren in **Abb. 16 B** sind in dieser Gruppe am Tag 11 p.d. noch sehr viele ungeschädigte Anagen VI-HF zu differenzieren. Die dominierende Population besteht jedoch aus HF mit Charakteristika für das dystrophe Anagen VI. Der Anteil von HF mit Merkmalen für das dystrophe Katagen ist an diesem Tag noch signifikant niedrig. Auch am Tag 14 nach der Depilation sind viele normale, ungeschädigte Anagen VI-HF noch vorhanden. Die meisten befinden sich jedoch im dystrophen Anagen VI. Im Unterschied zu den ersten Tagen nach der Behandlung ist die Population der dystrophen Katagen-HF gestiegen.

Im Gegensatz dazu zeigen die in **Abb. 16 B** dargestellten Ergebnisse, dass nach der Behandlung mit 150 mg/kg CYP grundsätzlich zwei Populationen von HF in der Rückenhaut dominieren: dystrophe Anagen VI- und dystrophe Katagen-HF. Drei Tage nach der CYP_{150 mg/kg}-Gabe sind in der Rückenhaut der Mäuse fast die gleiche Anzahl HF im dystrophen Anagen VI und im dystrophen Katagen vorhanden. Erst fünf Tage nach der Behandlung fällt der Anteil der Katagenpopulation signifikant hoch aus.

Die Zuordnung der histomorphologischen zu den makroskopischen Befunden erlaubt eine Aussage über die Potenz der jeweiligen Dosis. Es lässt sich zusammenfassen, dass der toxische Reiz von 50 mg/kg CYP die HF-Morphologie nicht ausreichend schädigen kann und deshalb nur eine mäßige ZIA verursacht. Dagegen reicht eine Dosis von 150 mg/kg CYP aus, um die HF-Morphologie dystroph umzustellen und eine beträchtliche ZIA zu provozieren.

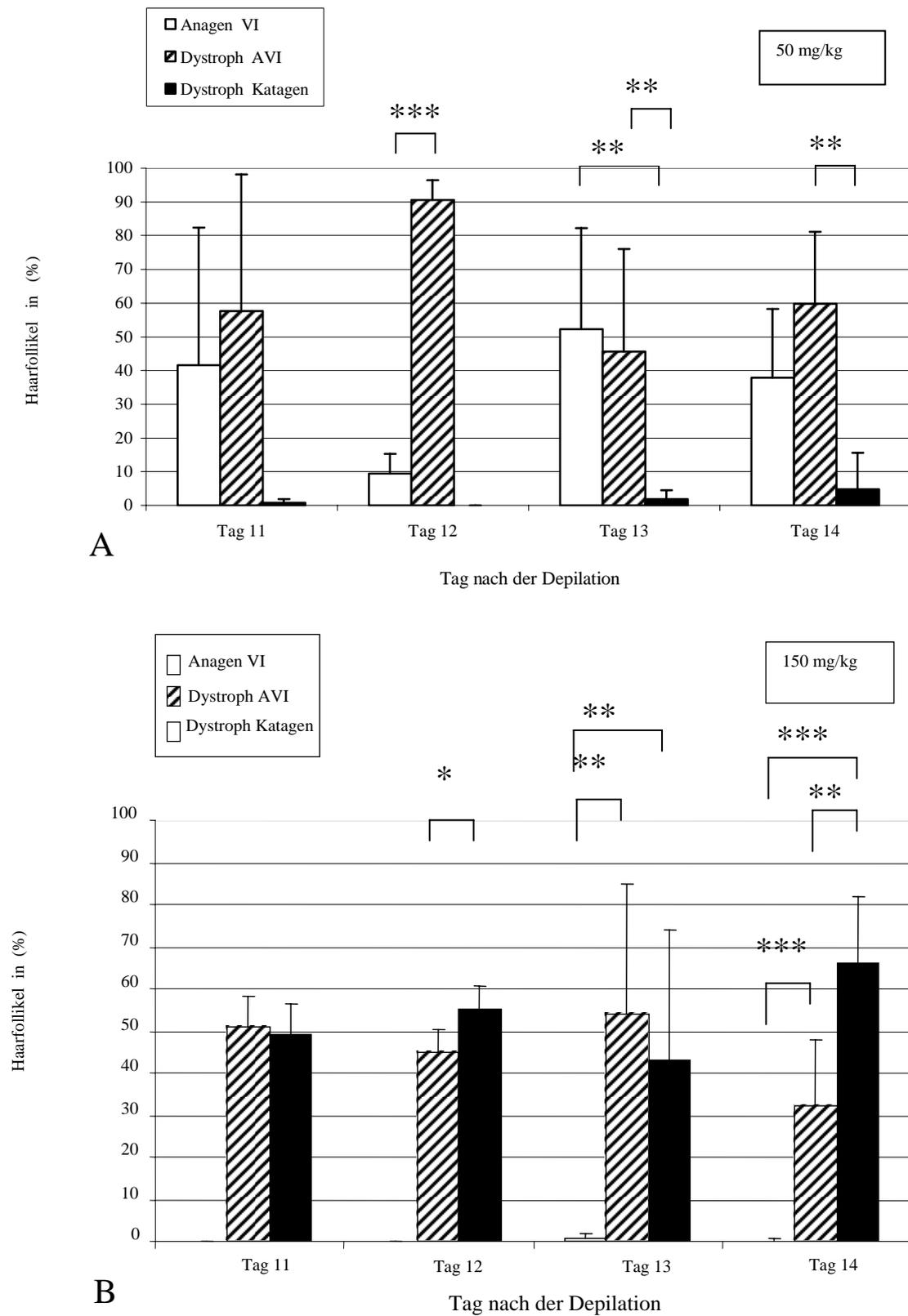


Abb. 16 Verteilung der HF-Populationen innerhalb der Rückenhaut fünf Tage nach der Verabreichung von **A)** 50 mg/kg bzw. **B)** 150 mg/kg CYP.

Die Balken repräsentieren die Mittelwerte der zusammengestellten Daten von mindestens 250 einzeln geprüften HF mit der +/- Standardabweichung. Die Tiere der Kontrollgruppe (Vehikel) sind nicht graphisch dargestellt. Die Signifikanz der Differenzen ist mit (*) für $p < 0.05$, (**) für $p < 0.01$ und (***) für $p < 0.001$ angegeben.

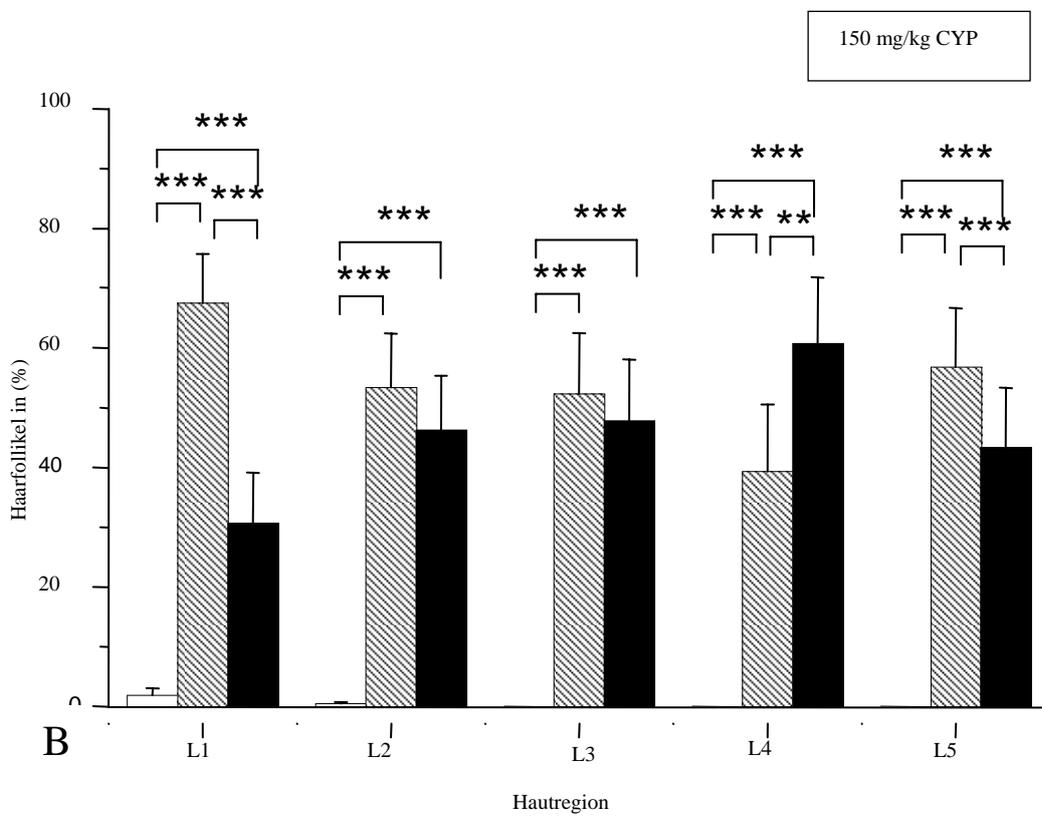
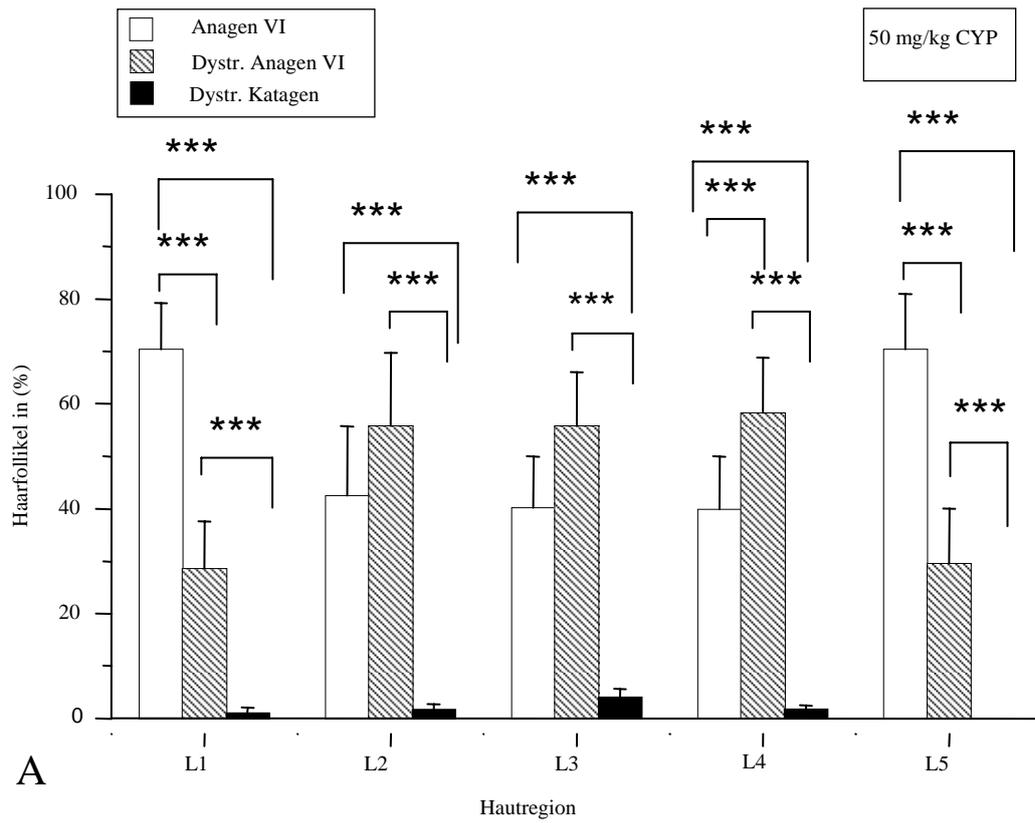


Abb. 17 Histomorphometrie der Rückenhaut von an Tag 13 p.d. mit **A)** 50 mg/kg CYP bzw. **B)** 150 mg/kg CYP behandelten Tieren.

Die Balken spiegeln den Mittelwert der zusammengestellten Daten in Prozent mit +/- Standardabweichung wider. Die X-Achse bildet folgende Hautregionen der Reihe nach ab: Schwanzregion (L1), Rückenmitte (L2/3), Nackenregion (L4), linke/rechte Flanke (L5). Pro Hautregion und Maus sind mindestens 50 HF analysiert worden. Die Anzahl der Tiere je Gruppe sind $n_{\text{CYP50mg/kg}} = 7$ und $n_{\text{CYP150mg/kg}} = 10$. Die Tiere der mit Vehikel behandelten Kontrollgruppe sind nicht dargestellt. Die Signifikanz der Differenzen sind mit (**) für $p < 0.05$ und (***) für $p < 0.001$ angegeben.

Die **Abb. 17** zeigt, dass beide Populationen relativ gleichmäßig innerhalb der einzelnen Rückenpartien der Tiere verteilt sind. Jedoch ist ein signifikanter Unterschied zwischen der Schwanz- und Nackenregion auch am Tag 13 p.d. erkennbar. Aus der **Abb. 17 A** ist weiterhin abzulesen, dass in den mit 50 mg CYP behandelten Gruppen innerhalb der Schwanzregion bis zu 70 % HF mit normaler Anagen VI-Morphologie und nur weniger mit dystropher Anagen VI- (28%) und dystropher Katagen-Morphologie (2%) vorhanden sind. In der Schwanzregion der Mäuse der CYP_{150 mg/kg}-Gruppe in **Abb. 17 B** befinden sich dagegen bis zu 68 % der HF im dystrophen Anagen VI. Signifikant mehr sind hier die dystrophen Katagen-HF (30%).

Dramatischer sind die Unterschiede innerhalb der Nackenregion von Tieren der CYP_{150 mg/kg}-Gruppe, wo sich ca. 39 % der HF im dystrophen Anagen VI befinden. Darüber hinaus sind signifikant mehr in der dystrophen Katagen-Phase (61%). Es gibt keine normale Anagen VI-HF. Diese Signifikanz ist wichtig, da die Relation zwischen dystrophem Anagen VI und dystrophem Katagen die Richtung der HF-Erholung und die Qualität des wiederhergestellten Haarfelds anzeigen kann.

Histomorphologisch zeigen die dystrophen HF innerhalb der ZIA-Flächen Schäden der HF-Architektur, der Melanozyten und der Haarschaftformation. Allgemeine Charakteristika für dystrophe Anagen VI-HF, wie die ektopischen Melaningranula und das Pigmentclumping, sind in **Abb. 18**, **Abb. 20** und **Abb. 26** dokumentiert. Sie sind auch elektronenmikroskopisch in **Abb. 19** bestätigt worden. Auf den Fotos ist zu erkennen, dass die Morphologie der dystrophen Katagen-HF, dargestellt in **Abb. 20 D, E und F** sowie in **Abb. 26 D, E und F**, sich von der Morphologie des Normalkatagens unterscheidet (**Abb. 12**). Charakteristisch für diese HF sind die schwere HF-Distorsion, massives Melaninclumping, der Haarschaftverlust sowie das Fehlen des Kolbenhaares. Infolge der Expulsion des Haarschafts bleibt der Haarkanal leer und ist distal stark erweitert.

Anhand dieser Daten kann behauptet werden, dass die Umstellung der Hautfarbe nicht eine sporadische Störung der Melanogenese ist, sondern die ernsthaften Schäden der HF-Keratinocyten- und der Melanozytenpopulation reflektiert. Daraus kann geschlossen werden, dass diese geschädigten HF der eigentliche Grund für die ausgeprägte ZIA sind, weil normal strukturierte HF ihren Haarschaft auf diese Art nicht verlieren können.

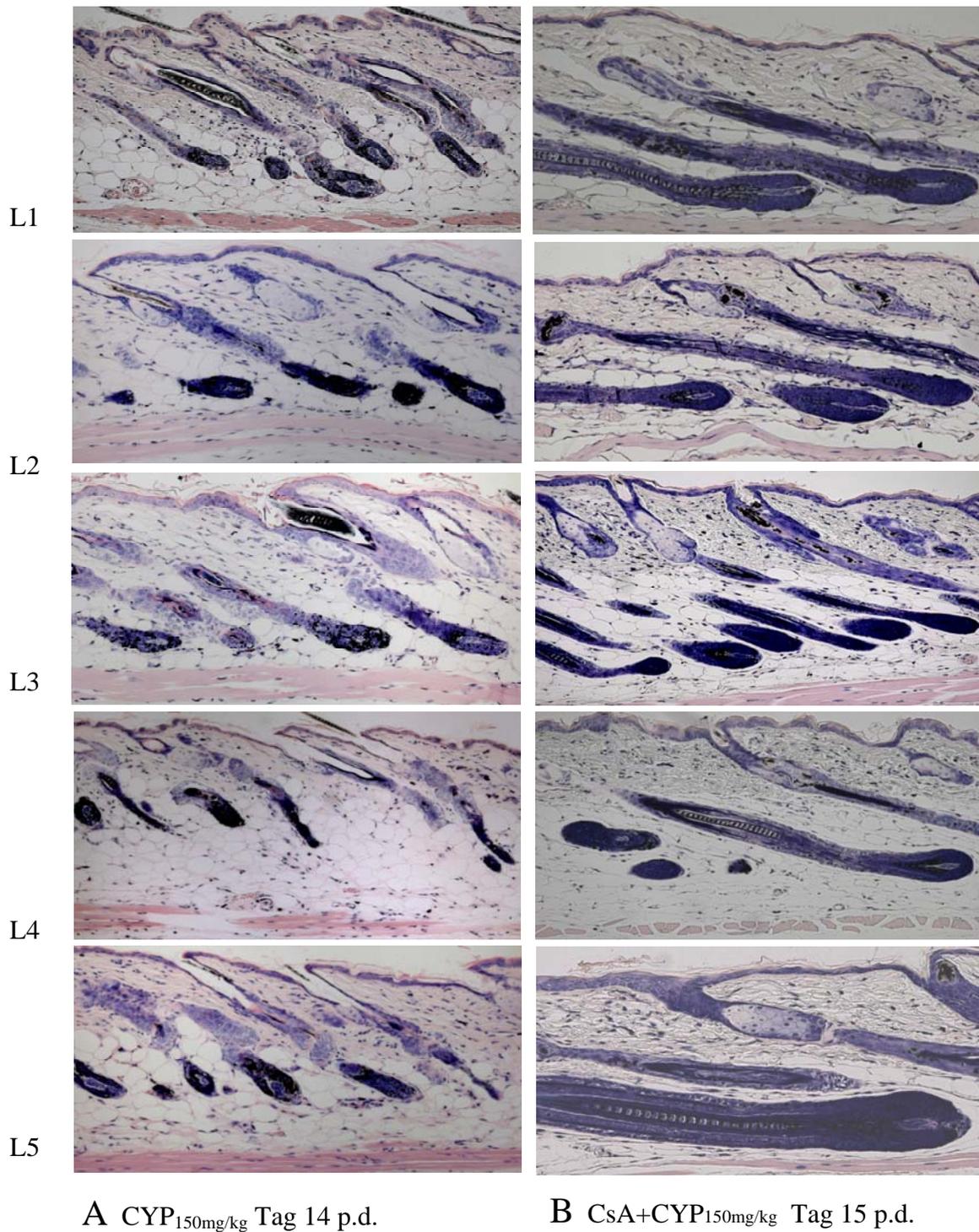
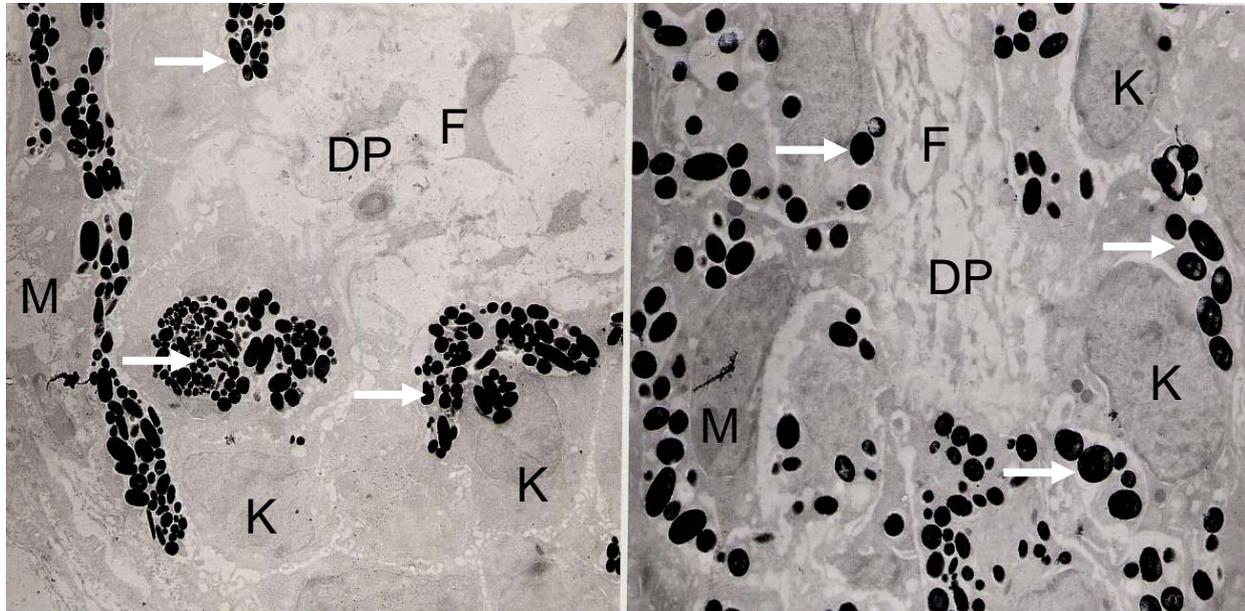


Abb. 18 Histopathologie der Haut. Fotos von Giemsa-gefärbten Hautschnitten mit repräsentativen HF innerhalb der Rückenhaut der **A)** CYP_{150mg/kg}-Gruppe am Tag 14 p.d. und **B)** CsA+CYP_{150mg/kg}-Gruppe am Tag 15 p.d. Rückenhautregionen wie folgt: schwanznah (L1), Rückenmitte (L2/3), Nacken (L4) und Flanken (L5).

Zu vermerken ist die ausgeprägte Dystrophie (HF im dystrophen Anagen VI und Katagen) der HF in der CYP-Gruppe. Die protektive Wirkung von CsA sorgt für Reduktion der Schäden und eine Dominanz normaler und nur schwach geschädigter HF.



A

B

Abb. 19 Elektronenmikroskopische Aufnahme des distalen Bulbus von mit $CYP_{150mg/kg}$ behandelten HF. **A)** Ultrastrukturell ist eine interzelluläre Verteilung von Melaningranula (Melanosomen, weiße Pfeile) zwischen den Bulbuskeratinozyten und eine ausgeprägte Melaninkontinenz in **B)** erkennbar. Die Abkürzungen sind wie folgt: **M** für Melanozyt, **K** für epitheliale HF-Keratinozyten, **DP** für Dermale Papille, **F** für DP-Fibroblast.

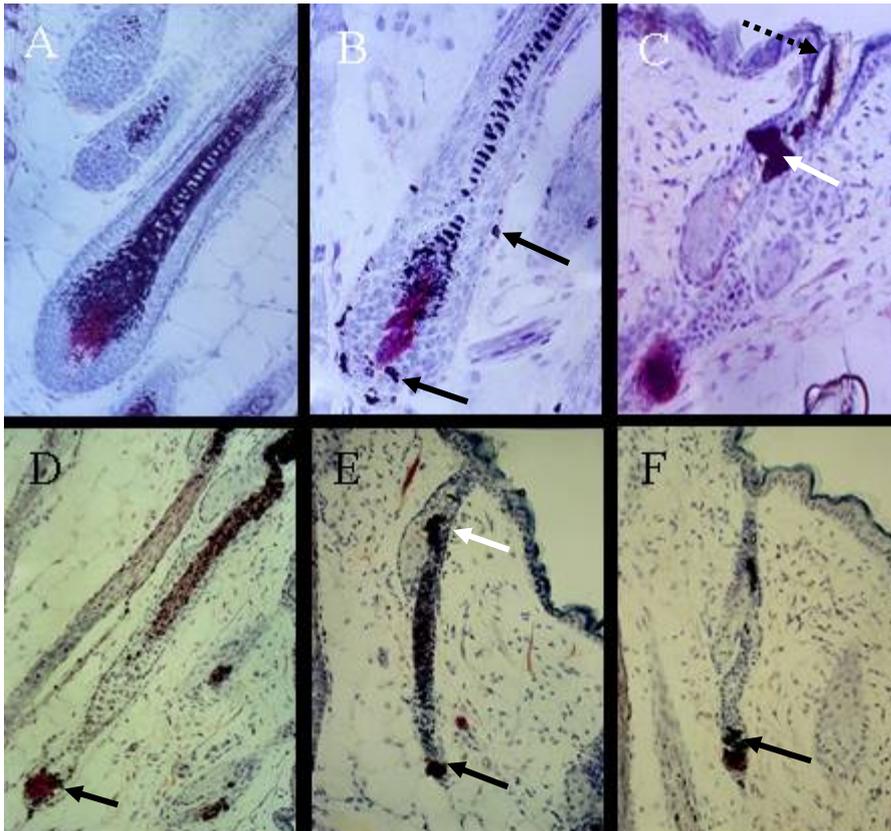


Abb. 20 Repräsentative Aufnahmen von mit $CYP_{150mg/kg}$ behandelten HF. Darstellung des Enzyms Alkalische Phosphatase in der DP von HF mit unterschiedlichen Zeichen der Dystrophie. **A)** Ungeschädigter Anagen VI-HF mit breitem Bulbus, elipsoidförmiger, starker AP, positiver DP, intakter Melanogenese und regelmäßigem Pigmentierungsmuster des Haarschafts. **B)** Mittel-dystropher Anagen VI-HF mit vereinzelt ektopischen Melaningranula, Clumping (schwarze Pfeile) und noch erhaltenem Haarschaft. **C)** Dystropher Telogen-HF mit breitem Haarkanal (punktiertes Pfeil) und Resten der abgebrochenen Haarschäfte (weißer Pfeil). **D), E)** und **F)** Mittel- und spätdystrophe Katagenfollikel mit katagencharakteristischer Verkürzung der HF-Länge, abgestoßenen Haarschäften und massiven Pigmentansammlungen um die DP.

6.3 Cyclosporin A verzögert den ZIA-Eintritt und reduziert die Haarfollikeldystrophie

Die Wirkung des IPL CsA (Sandimmun, Sandoz Pharma, Basel Schweiz) auf die HF und auf die ZIA wurde in diesem Modellsystem durch die dreifache systemische Co-Applikation von 250 mg/kg CsA zu der i.p.-Gabe von 150 mg/kg CYP getestet. Die in **Abb. 21** dargestellten Ergebnisse zeigen, dass die ZIA durch CsA-Gabe nicht komplett verhindert, aber verzögert werden kann. Die makroskopischen Befunde lassen eine Verzögerung des ZIA-Eintritts von zwei Tagen erkennen. Die Alopezie ist in der CsA+CYP_{150 mg/kg}-Gruppe erst ab Tag 14 p.d. nachweisbar. Die haarfreien Areale sind am Tag 14 signifikant kleiner als die auf der Rückenhaut der Kontrolltiere (nur CYP_{150 mg/kg}). Die Haut der Tiere dieser Gruppe ist deutlich dunkler und lässt eine schwächere Schädigung der Pigmentzellen und der HF-Melanogenese vermuten. Auch die quantitative Analyse der ZIA-Flächen am Tag 15 p.d. zeigt, dass die Mäuse der CsA+CYP_{150 mg/kg}-Gruppe mit haarfreien Flächen von durchschnittlich 40 % der Rückenhaut eine deutlich schwächere ZIA ausprägen als die Kontrollen (CYP_{150 mg/kg}), die eine Alopezie mit Befall von über 60 % der Rückenhaut aufzeigen.

Die histomorphometrische Analyse der HF am Tag 15 p.d. (**Abb. 22**) zeigt, dass die Haut der CsA+CYP_{150 mg/kg}-behandelten Mäuse eine signifikant kleinere Anzahl von HF im dystrophen Katagen als die CYP-Kontrolle besitzt ($p < 0,01$). Signifikant unterscheiden sich auch die Populationen von ungeschädigten Anagen VI-HF ($p < 0.001$) und von dystrophen Anagen VI-HF. Die Grafik lässt erkennen, dass sich die meisten HF der CsA+CYP_{150 mg/kg}-Gruppe im dystrophen Anagen VI befinden. Diese HF-Population ist in der mit CsA behandelten Gruppe signifikant größer als in der CYP_{150 mg/kg}-Kontrollgruppe. Damit wird belegt, dass durch die Wirkung des CsA der Weg ins dystrophe Anagen VI bevorzugt und die primäre Erholung der HF-Architektur unterstützt werden.

Die protektive Wirkung des CsA ist weiterhin an den reduzierten Schäden der HF-Morphologie erkennbar (**Abb. 18 B**). Die meisten HF in der mit CsA+CYP_{150 mg/kg} behandelten Gruppe weisen weniger ektopisch platzierte Melaningranula und seltener grobes Melaninclumping auf. Ihre Melanogenese ist intakt. Im Vergleich zu den stark geschädigten HF der CYP_{150 mg/kg}-Kontrollen sind viele Haarschäfte noch gut erhalten.

Diese noch funktionsfähige HF-Architektur bestimmt den Prozess der Wiederherstellung des Haarfells (**Primäre Erholung**) und ist verantwortlich für das schnellere Nachwachsen und die

bessere Pigmentierung der Haarschäfte. Interessanterweise haben wir nach Behandlung mit CsA eine verlängerte Primäre Erholung festgestellt, welche in **Abb. 24** zusammengefasst ist. Sie zeichnet sich durch ein rapides Nachwachsen von Haarschäften aus, welche schon am Tag 19 p.d. über der Epidermis erkennbar und im Gegensatz zu den schlecht pigmentierten Haarschäften der Kontrollen (CYP_{150 mg/kg}) normal pigmentiert sind (**Abb. 25**). Die makroskopischen Befunde weisen auf eine nur mäßige Störung der Melanogenese und der Haarschaftformation hin, was als Folge einer protektiven CsA-Wirkung interpretiert werden könnte.

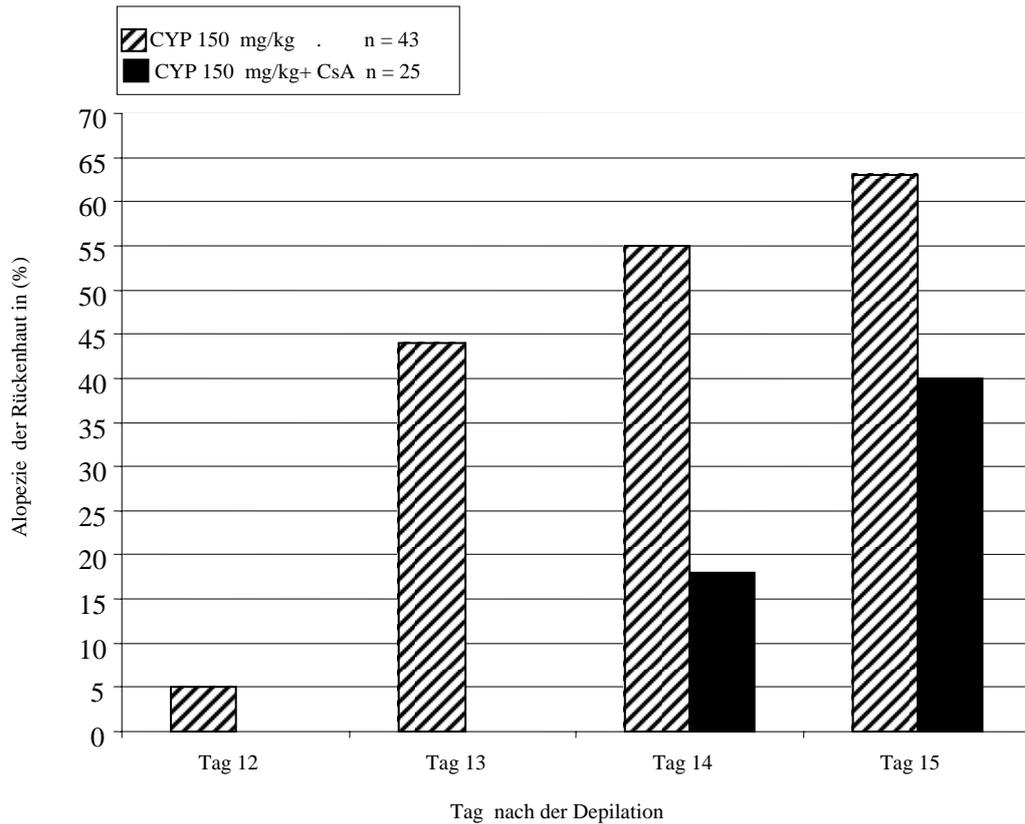


Abb. 21 Die Co-Applikation von CsA verzögert den Eintritt der ZIA und mindert die HF-Dystrophie. Makroskopische Befunde an der Rückenhaul von mit CYP_{150 mg/kg} und mit CSA+CYP_{150 mg/kg} behandelten Tieren innerhalb von sechs Tagen nach der CYP_{150 mg/kg}-Gabe. Die Balken zeigen die durchschnittliche Größe der Areale mit ZIA in Prozent der Rückenhaul. Die dreifache Gabe von 5 mg CsA/Maus verzögert den Eintritt der ZIA und reduziert ihr Ausmaß. Es handelt sich um Daten von zwei separat durchgeführten Versuchen mit insgesamt $n_{\text{CYP150mg/kg}} = 43$ und $n_{\text{CsA+ CYP150 mg/kg}} = 25$. Wegen der kleinen Anzahl von Tieren mit makroskopischen Zeichen einer Alopezie und Katagentransformation während der ersten Tage nach der CYP-Gabe und daraus resultierenden, stark erhöhten Standardabweichungen wurde aus Gründen der Übersichtlichkeit auf die Darstellung der +/- Standardabweichung verzichtet.

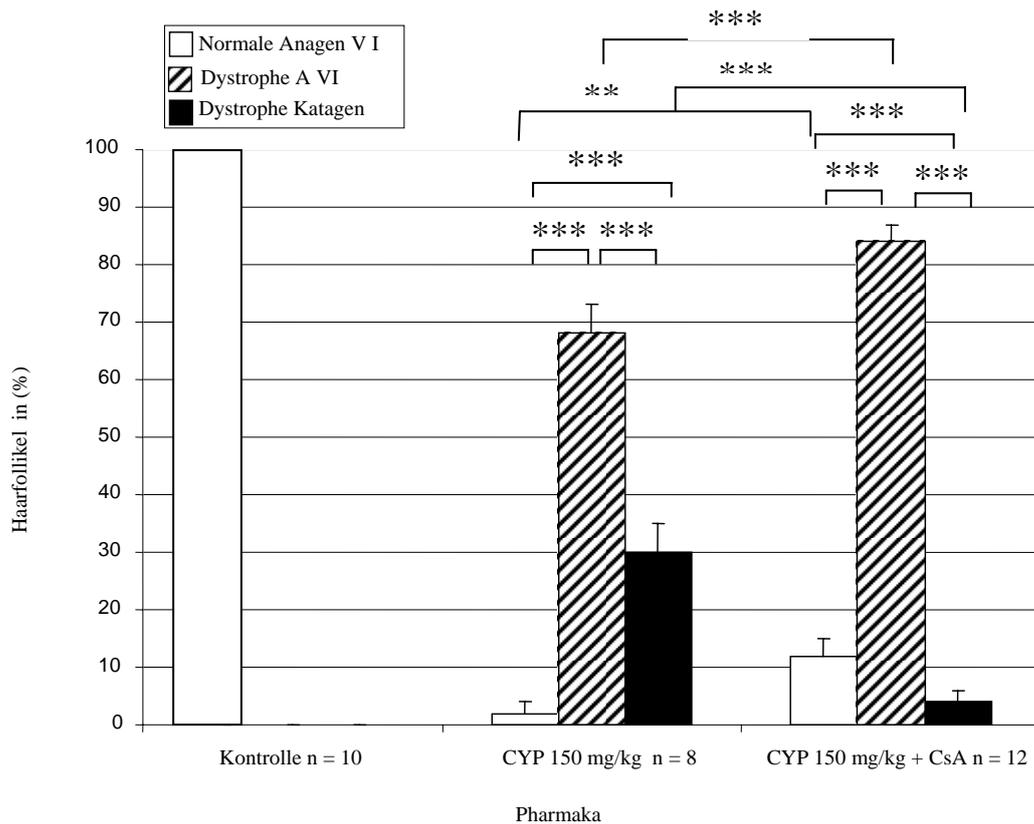


Abb. 22 Histomorphologie der Rückenhaut von mit $CYP_{150\text{ mg/kg}}$ (Kontrollen) und $CsA + CYP_{150\text{ mg/kg}}$ behandelten Tieren am Tag 15 nach der Depilation. Dargestellt sind die Mittelwerte (\pm SE) von zusammengesetzten Daten aller Regionen mit mindestens 250 HF/Maus und $n_{CYP_{150\text{ mg/kg}}} = 8$ und $n_{CsA+CYP_{150\text{ mg/kg}}} = 12$ Tieren pro Gruppe von drei separat durchgeführten Experimenten. Die Anzahl der HF gibt die Verteilung der normalen und der dystrophischen Anagen VI- sowie der dystrophischen Katagen-HF-Populationen sechs Tage nach der $CYP_{150\text{ mg/kg}}$ -Gabe in Prozent an. Die Co-Applikation von $CsA + CYP_{150\text{ mg/kg}}$ erhöht den Prozentanteil der Anagen VI-HF ohne Zeichen einer Dystrophie und reduziert den Anteil der HF im dystrophischen Katagen. Im Vergleich zur CYP-Kontrolle signifikant erhöht ist die Population der HF im dystrophischen Anagen VI, welche die dominierende Population in der Haut der $CsA + CYP_{150\text{ mg/kg}}$ Gruppe ist. Die Rückenhaut der Kontrolltieren (Vehikel, $n = 10$) hat nur Anagen VI HF (nicht gezeigt) (** für $p < 0.01$ und *** für $p < 0.001$).

6.4 Grundmuster der Primären und Sekundären Erholung

Ein vorzeitiger Übergang ins Katagen, massiver Haarausfall und eine breitflächige ZIA sind die Antwort auf den toxischen Reiz des applizierten Zytostatikums, welche um den Tag 15 nach Depilation ihr Maximum erreicht. Parallel dazu versucht der Körper, die Schäden des Haarfells möglichst gering zu halten und sie zu reparieren. Die histomorphometrischen Analysen weisen auf zwei Grundmuster bei der Wiederherstellung der HF-Schäden hin, welche schematisch in **Abb. 28** gezeigt sind. Sie sind vom Haarzyklusstadium, dem dystrophen Anagen VI oder dem dystrophen Katagen, abhängig (detaillierte Darstellung **Abb. 27**).

Die dystrophen Anagen VI-HF erholen sich und produzieren einen kontinuierlichen, aber noch unregelmäßig pigmentierten Haarschaft. Dieser Vorgang wird **Primäre Erholung** genannt. Solche Anagen VI-HF wurden zwischen Tag 17 und Tag 25 nachgewiesen (**Abb. 24**). Sie treten dann um den Tag 25 in eine kurze Telogenphase über und starten gleich eine neue Anagenphase, die sog. **Sekundäre Erholung**. Weil für das Telogen unter physiologischen Umständen eine Zeitspanne von zwei bis drei Wochen charakteristisch ist, erscheint diese Telogenphase deutlich verkürzt und ist damit von entscheidender Bedeutung für die Wiederherstellung des Haarkleides.

Die HF im dystrophen Katagen, dargestellt in **Abb. 23 A**, haben aufgrund der starken Schäden (u.a. fehlendes Kolbenhaar) keine Chance für eine Primäre Erholung. Sie treten in kürzester Zeit in eine pathologische Form des Telogens (dystrophes Telogen, **Abb. 23 B**) über. Die Phase ist zeitlich noch kürzer als jene bei den dystrophen Anagen VI-HF. Für diese HF beginnt die Sekundäre Erholung mit einer neuen Anagenphase um den Tag 25 p.d. (**Abb. 23 C**). Die neue Generation der HF zeichnet sich durch gut pigmentierte Haarschäfte aus, die erst nach dem Tag 30 p.d. aus der Epidermis heraustreten.

Um die entstandenen Schäden schnellstens zu reparieren, wird die Dauer der folgenden Telogenphase drastisch verkürzt. Die Daten belegen, dass die dystrophe Telogenphase in solchen HF nur wenige Tage dauert und die neue HF-Formation als sekundäre Erholung schnellstens gestartet wird, obwohl die HF der dystrophen Anagenpopulation noch eine Primäre Erholung durchlaufen. Wir stellten fest, dass die Sekundäre Erholung der dystrophen Katageneinheiten zeitlich schneller eintritt, als dies bei dystrophen Anagen VI-HF der Fall ist. Damit ist auch das Auftreten von HF in unterschiedlichen Zyklusphasen ab Tag 20 nach der Depilation zu erklären. Bedeutendste Erkenntnis dabei ist, dass die verkürzte Ruhephase und die Sekundäre Erholung

mit normaler Dauer die schnelle Genesung der HF und eine komplette Wiederherstellung des Haarfells ermöglichen.

Diese Reparaturvorgänge konnten makroskopisch schon ab Tag 17 p.d. beobachtet werden (**Abb. 25**). Um den Tag 19 p.d. bekommt die Haut infolge der reaktivierten Melanogenese langsam ihre dunkle Farbe zurück. Auch erhaltene Terminalhaare sind über der Epidermis zu sehen. Jedoch sind die meisten Haarschäfte noch schlecht pigmentiert, primär als Folge der CYP-bedingten Störung der Melanogenese. Das geschädigte Haarfell ist erst nach Tag 30 pd. komplett wiederhergestellt.

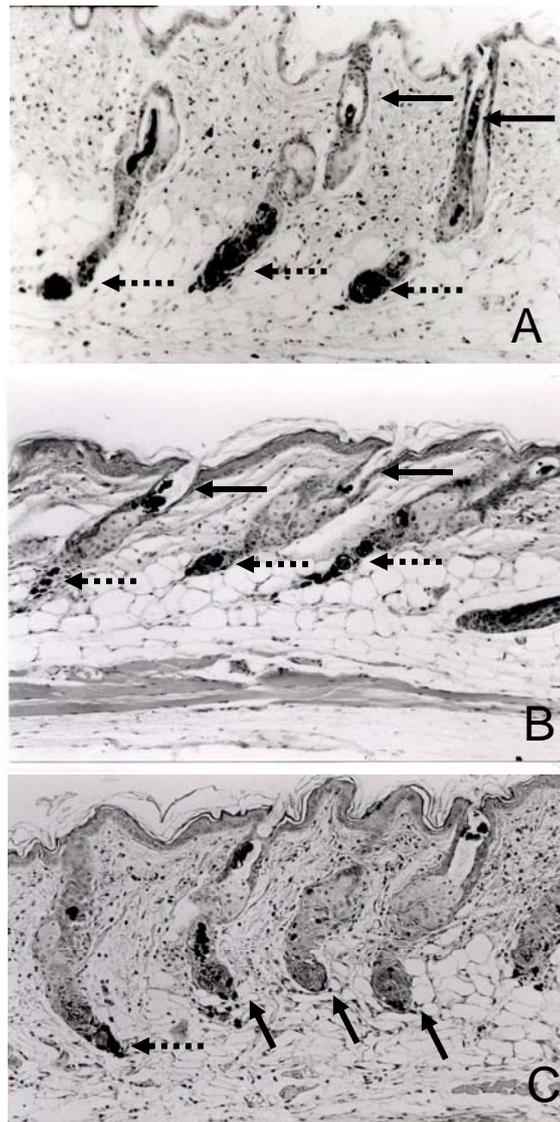


Abb. 23 Repräsentative Aufnahmen aus der Rückenhaut von mit CYP_{150 mg/kg} behandelten Tieren mit HF in **A**) dystrophem Mittelkatagen mit Haarschaftverlust (schwarze Pfeile) und starkem Melaninclumping (punktierte Pfeile) am **Tag 15** p.d., **B**) dystrophem Telogen am **Tag 18** p.d., mit massivem Melaninclumping (punktierte Pfeile) und leerem Haarkanal (schwarze Pfeile) sowie **C**) dystrophem Telogen (links im Bild, punktiertes Pfeil) und mit Initiation der Sekundären Erholung (Anagen II-HF, schwarze Pfeile) um den Tag **25** p.d.

Depilation 			CYP 150 mg/kg 										
Tag nach Depilation	0	1	9	12	13	14	16	18	19	20	25	30	
Kontrolle	T	A I	Anagen VI					K		Telogen			
CYP / Endoxan	T	A I	Anagen VI	DYSTROPHE Katagen			DYSTROPHE S Telogen			A II	A VI		
				DYSTROPHE Anagen VI			Anagen VI			T	A IV		
CYP + CsA (Sandimmun)	T	A I	Anagen VI			früh-dystrophes Anagen VI		Anagen VI			Nicht geprüft		

Abb. 24 Auswirkung von CYP_{150 mg/kg} und CsA+CYP_{150 mg/kg} auf den Haarzyklus. Darstellung der histomorphologischen Befunde. Die Tabelle fasst die Ergebnisse eines Zeitintervalls von 30 Tagen nach Depilation zusammen und gibt die dominierenden HF-Populationen am jeweiligen Tag an. Der Haarwuchs wird in der Telogenhaut mittels Depilation am Tag 0 induziert. Bis Tag 9 p.d. wird die HF-Morphologie *de novo* generiert. An den Tagen 7, 9 und 11 p.d. wird den Tieren CsA (Einzeldosis 5 mg/Maus) und am Tag 9 p.d. CYP_{150 mg/kg} intraperitoneal injiziert. Die dystropen Schäden an der HF-Morphologie korrelieren mit der ZIA und sind bereits ab Tag 12 p.d. histologisch nachweisbar. Zwei Grundpopulationen, dystrophe Anagen- und dystrophe Katagen-HF, sind in der mit CYP_{150 mg/kg} behandelten Haut lichtmikroskopisch nachweisbar. Im Gegensatz dazu bestehen die Populationen in der Haut von mit CsA+CYP_{150 mg/kg} behandelten Tieren bis zum Tag 14 p.d. aus normalen Anagen VI- und dystropen Anagen VI-HF. Die ZIA erreicht ihr Maximum grundsätzlich um Tag 15-16 p.d. Gleich danach startet der Körper mit den Reparaturmechanismen der **Primären** und **Sekundären Erholung** und ist bestrebt, das Haarkleid schnellstens wieder herzustellen. Weiterhin werden (**K**) für Normalkatagen, (**T**) für Normaltelogen und (**A I – A VI**) für Normalanagen verwendet.

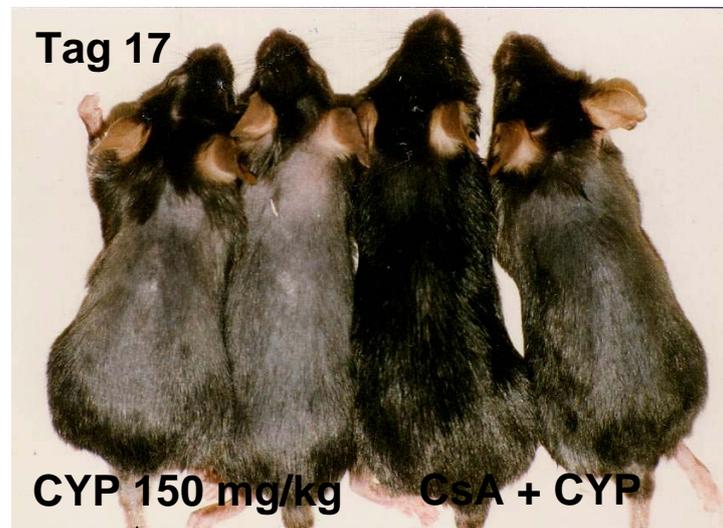
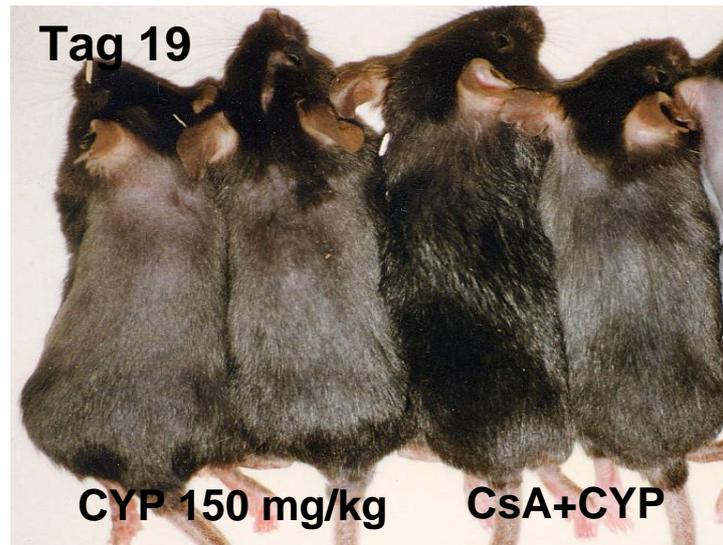


Abb. 25 Repigmentierung der Haut und Wiederherstellung des Haarkleides während der Primären Erholung. Repräsentative Fotos von mit $CYP_{150\text{ mg/kg}}$ und $CsA+CYP_{150\text{ mg/kg}}$ behandelten Mäusen am Tag 17 und 19 p.d. Die Haarschäfte in der mit $CYP_{150\text{ mg/kg}}$ behandelten Gruppe sind schlechter pigmentiert und eher grau gefärbt im Vergleich zu den Haarschäften der mit $CsA+CYP_{150\text{ mg/kg}}$ behandelten Tiere, welche infolge der protektiven Wirkung von CsA nicht oder vergleichsweise weniger geschädigt wurden.

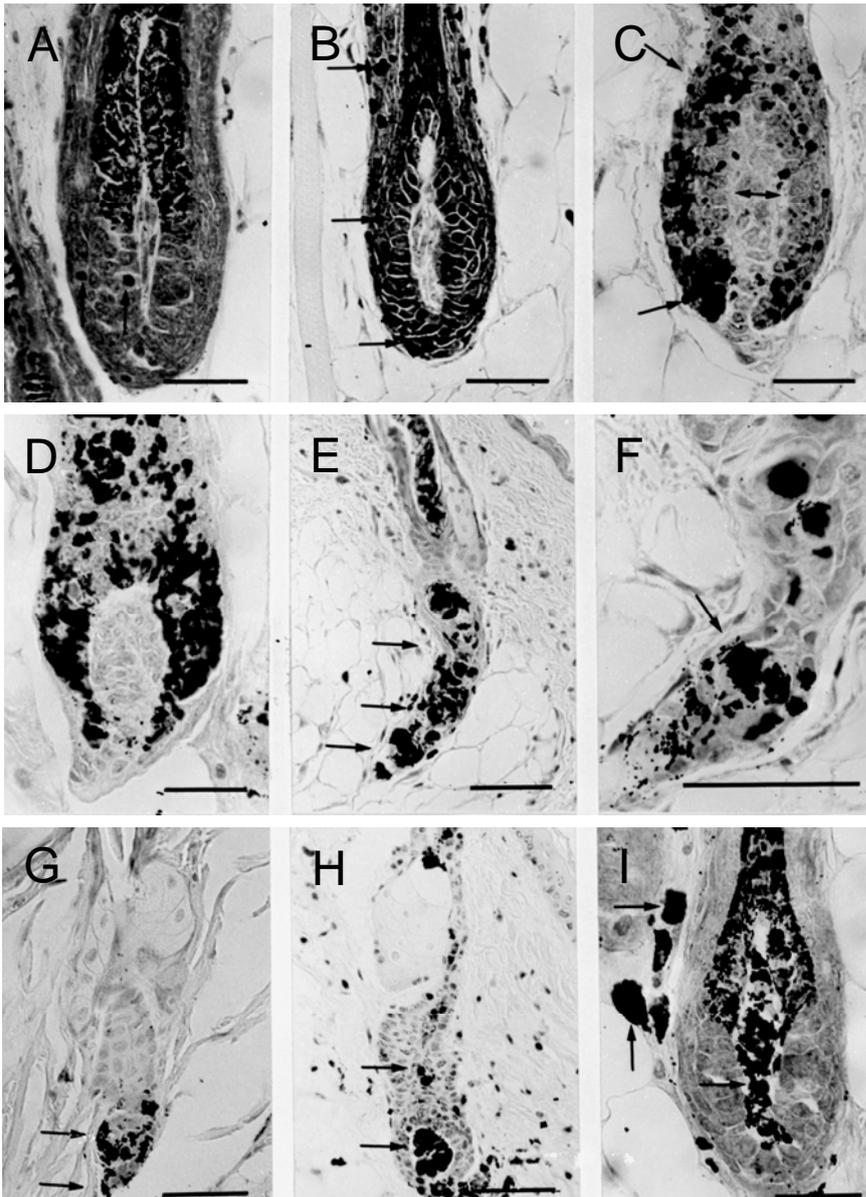


Abb. 26 Histopathologie der mit CYP_{150 mg/kg} behandelten HF. Lichtmikroskopische Aufnahmen von Giemsa-gefärbten HF in **A**) normalem Anagen VI mit noch intakter Melanogenese und ungeschädigter Morphologie, **B**) mittel-dystrophem Anagen VI mit ektopischen Melaninsammlungen (schwarze Pfeile) und noch erhaltener Morphologie, **C**) spät-dystrophem Anagen VI mit Melaninclumping und geschwollener DP, **D**) früh-dystrophem Katagen mit kompakter DP, reduziertem Haarbulbus und starkem Melaninclumping, **E**) und **F**) in spätdystrophem Katagen. HF in Sekundärer Erholung : **G**) Anagen I, **H**) Anagen II und **I**) Anagen IV mit intra- und parafollikulärem Restmelanin aber normaler Pigment- und Haarschaftformation (nach Slominski *et al.* 1996, Handjiski *et al.* 2001).

6.5 Erstellung von Leitlinien zur systematischen Klassifikation der Zytostatika-induzierten Haarfollikeldystrophie

Die hier vorgelegten Daten dieser Studie wurden bereits in den Jahren 1993/94 zusammengefasst und als wissenschaftliche Publikationen veröffentlicht, die den damaligen Stand der Forschung reflektierten (Paus *et al.* 1994, Slominski *et al.* 1996). Der häufige Gebrauch dieses C57BL/6 Mausmodells für das Studium der ZIA-Biologie ermöglichte eine Vielzahl von pharmakologischen Manipulationen der CYP-induzierten Alopezie durch topische Calcitriol-Analoga, PTH/PTHrP-Rezeptorantagonisten, Steroidhormone wie Dexamethason und Estrogene/17-beta Estradiol (Paus *et al.* 1996a, Schilli *et al.* 1998, Peters *et al.* 2001a, Ohnemus *et al.* 2004) sowie unlängst Zink (Plonka *et al.* 2005).

Mit der immer breiteren Anwendung des CYP-Modells kam die Nachfrage nach einer systematischen Zusammenfassung der histopathologischen Kriterien. Aus diesem Grund wurden fast ein Jahrzehnt später die Befunde als Leitfaden für die histomorphologische Untersuchung der ZIA tabellarisch dargestellt. Die anfangs gebrauchten Grundkriterien für die Differenzierung der Dystrophie wurden durch qualitativ neue Aushilfskriterien wie die AP (Handjiski *et al.* 1994), NCAM (Müller-Rover *et al.* 1999) und TUNEL+-apoptotische Zellen (Lindner *et al.* 1997) als Leitlinien zur Erkennung dystroph veränderter HF ergänzt (**Abb. 27**).

Die **Abb. 27** gibt die Grundkriterien für die Erkennung der wichtigsten Stadien der HF Dystrophie einschließlich der einzelnen Komponenten der HF-Morphologie, wie z.B. der Haarbulbus, die Germkapsel, der epitheliale Strang und die DP, an. Diese Kriterien sind systematisch aufgelistet und durch Hilfskriterien vervollständigt. Die dystrophen Anagen VI HF wurden anhand der unterschiedlichen Stufen der Dystrophie mit weiteren Subphasen dargestellt. Die HF im dystrophen Katagen wurden auch in 3 Grundphasen eingeteilt, welche mehrere für das Normalkatagen charakteristische Phasen zusammenfassen. Entscheidender Beitrag dieser Klassifikationschemata sind die zugeordneten graphischen Zeichnungen, die eine Erkennung der Grundstadien auf den ersten Blick ermöglichen.

Abb. 27 Unterschiedliche Phasen der Haarfollikeldystrophie (nach Hendrix *et al.* 2005).

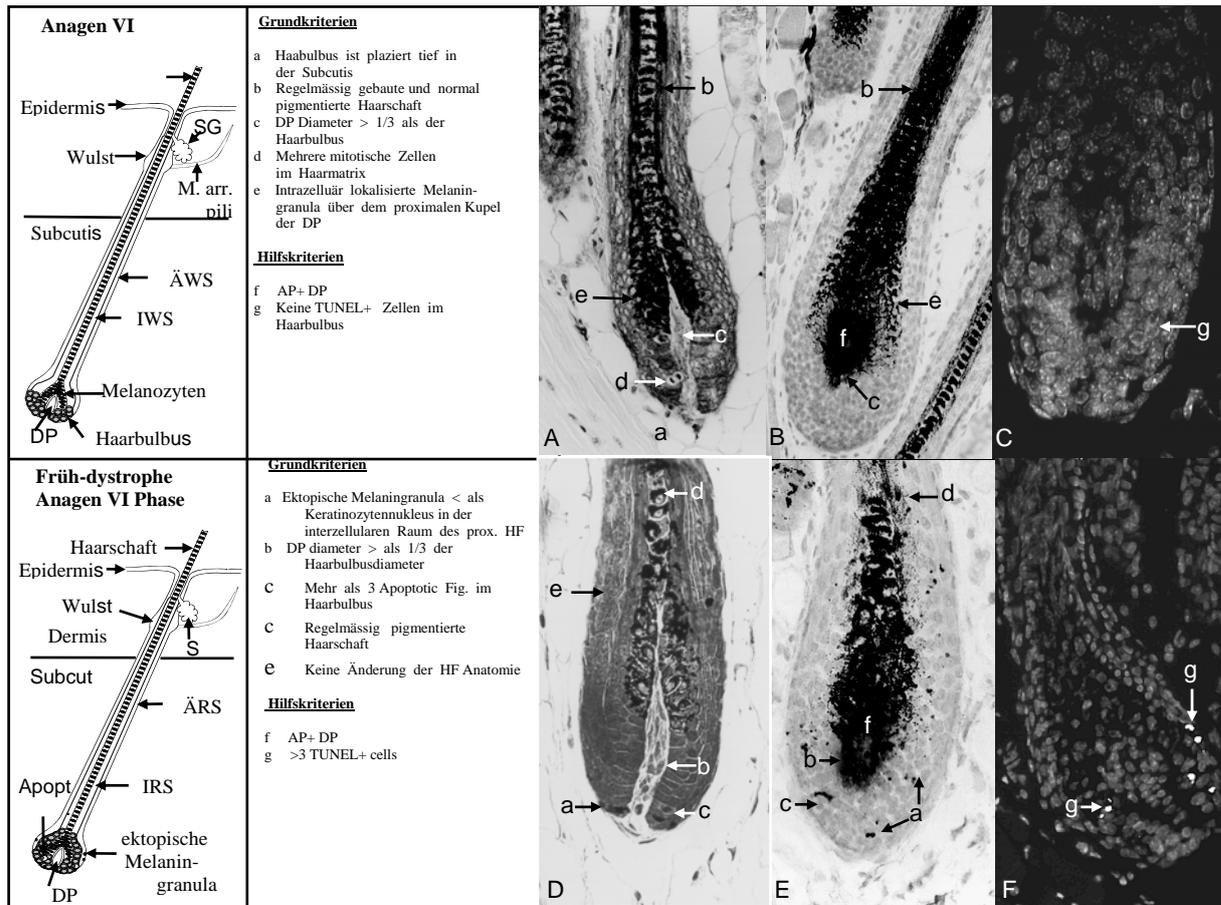


Abb. 27 Anagen VI A) reife Anagen VI HF (Giemsafärbung) mit aktiven Haarmatrix und Haarschaftproduktion B) AVI HF mit AP+DP und C) TUNEL(-) Zellen im Haarbubus. **Früh-dystrophe Anagen VI Phase** D) dystrophe AVI HF mit noch erhaltenen Follikel- und Haarschaftkonfiguration (Giemsafärbung). Charakteristisch sind die ektopische Melanin granula innerhalb des Haarbubus. E) dystrophe HF mit extrazellulären Melanin granula um der AP +DP in der Matrixregion und in den ÄWS/IWS F) mehr als 3 TUNEL+ Zellen im Haarbubus (die Abbildungen von HF mit apoptotischen Zellen (TUNEL+ Färbung) sind mit Genehmigung von **Dr. Gerd Lindner** eingefügt).

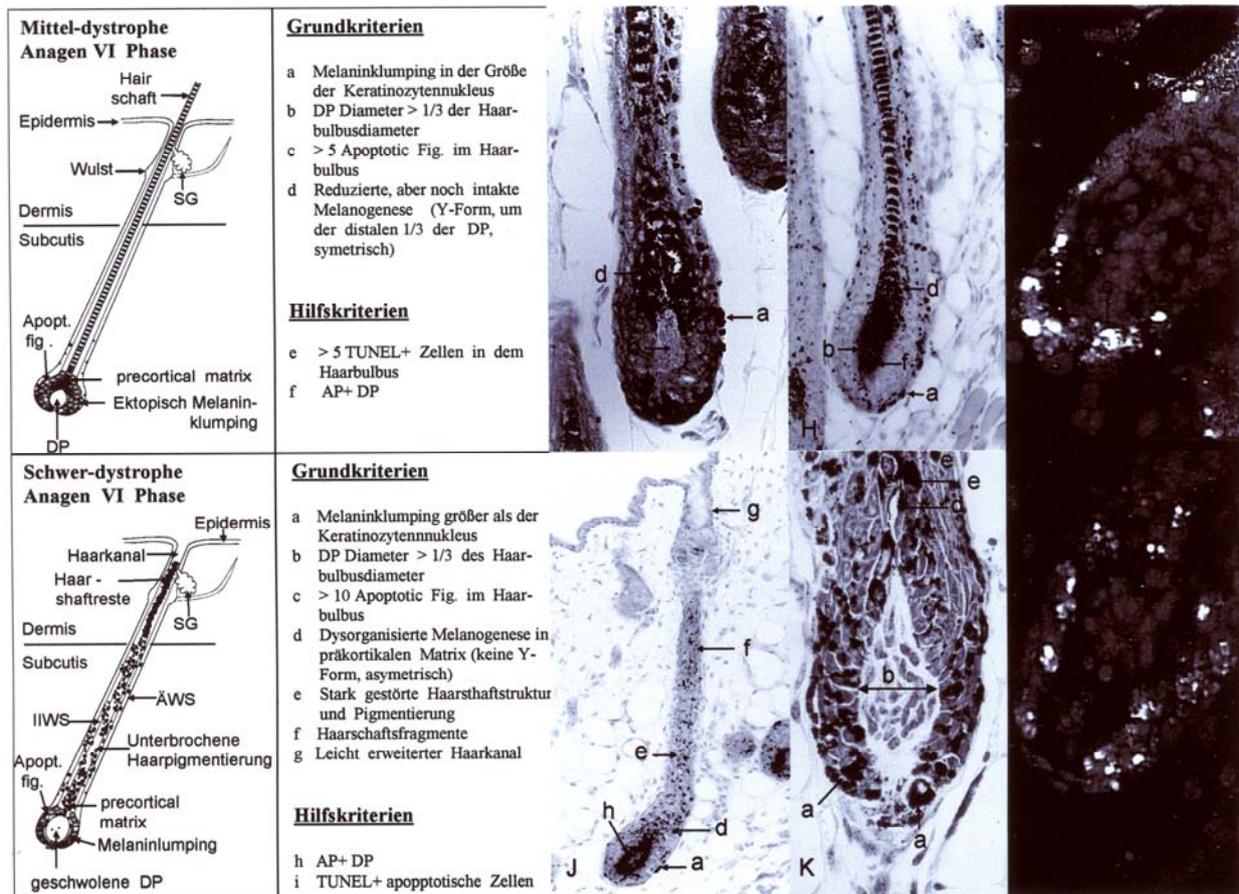


Abb. 27 Mittel-dystrophe Anagen VI Phase G) dystrophe AVI HF mit ektopischen Melanin-granula aber mit noch intakter Melanogenese H) dystrophe AVI HF mit regulärem Haarbulbus und leicht geschädigter Haarschaft (AP+DP) I) HF mit mehr als 5 TUNEL+ Zellen. **Schwer-dystrophe Anagen VI Phase** J) dystrophe AVI HF mit AP+DP, fehlende Haarschaft und multiplen ektopischen Melaningranula und Melaninklumpung in der Matrixregion um AP+DP als auch in den ÄWS und IWS K) Zellverlust-bedingte Reduktion der Haarbulbusgröße und charakteristische Schwellung der DP (Giemsafärbung) L) HF mit mehr als 10 TUNEL+ apoptotischen Zellen.

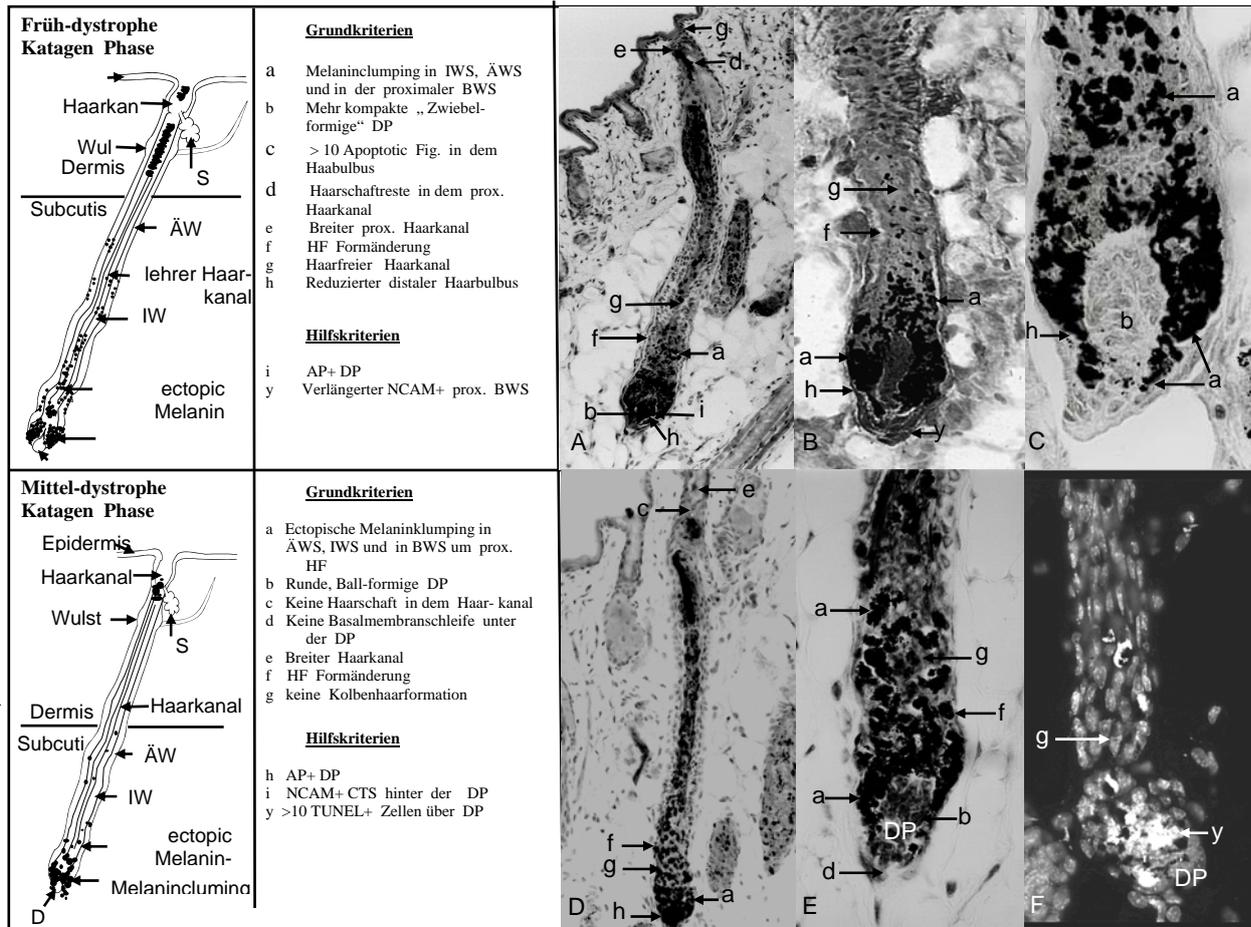


Abb. 27 Frühe-dystrophie Katagen Phase A) verkürzte HF in Frühkatagen mit gestörter räumlichen Konfiguration, ektopischen Melaningranula, Melaninklumping und leerem Haarkanal B) HF mit reduziertem Haabulbus (NCAM+BWS), ausgeprägter Melaninklumping, und fehlender Haarschaft (NCAM Färbung) C) dystrophe Haabulbus mit Melaninklumping und kompakter DP (Giemsafärbung). **Mittel-dystrophe Katagen Phase** D) HF in Mittelkatagen mit dramatischer Reduktion des Haabulbus, abgerundeter AP+DP, leerem Haarkanal und Melaninklumping innerhalb ÄWS/IWS E) dystrophe HF mit kompakter DP und des Haabulbus (Giemsafärbung) F) mehr als 10 TUNEL+ Zellen um der DP (NCAM+ Färbung mit Genehmigung von **Dr. Sven Hendrix (Müller-Rover)**).

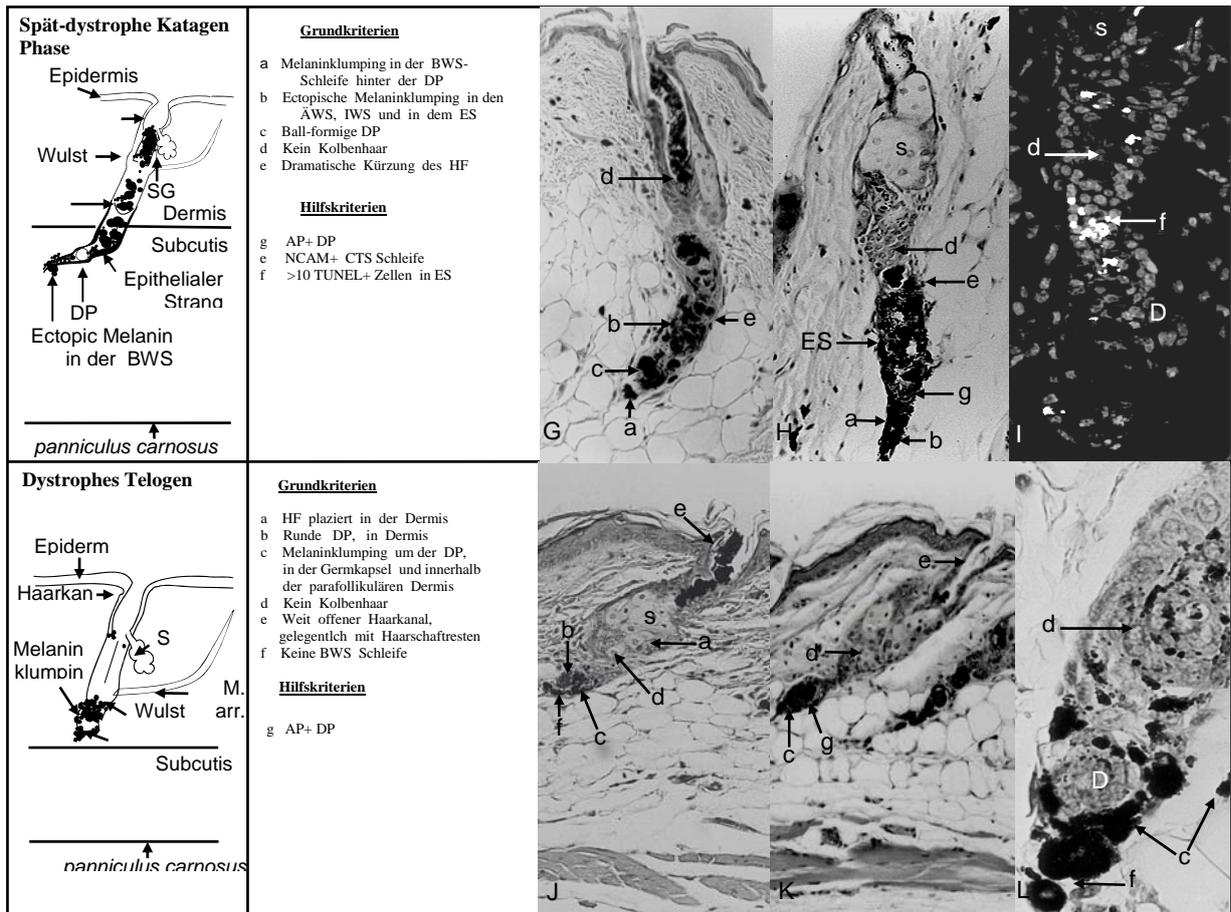


Abb. 27 Spät-dystrophe Katagen Phase G) verkürzte HF in Spätkatagen mit gestörter Konfiguration, Melaninklumpung und Haarschaftreste im Haarkanal. Der Kolbenhaar fehlt (Giemsafärbung). H) dystrophe HF in Spätkatagen mit AP+DP innerhalb des epithelialen Strangs (ES) und BWS Schleife. Die AP+DP wird durch den starken Melaninklumpung in dem ES häufig maskiert. I) mehr als 10 TUNEL+ Zellen im ES. **Dystrophes Telogen** J) dystrophe Telogen HF in der Dermis mit fehlender Kolbenhaar und kompakter DP (Giemsafärbung) K) dystrophe Telogen HF mit leeren Germkapsel und Haarkanal, AP+DP F) distale Telogen HF mit noch vorhandener Melaninklumpung um der DP als auch in der Germkapsel (Giemsafärbung).

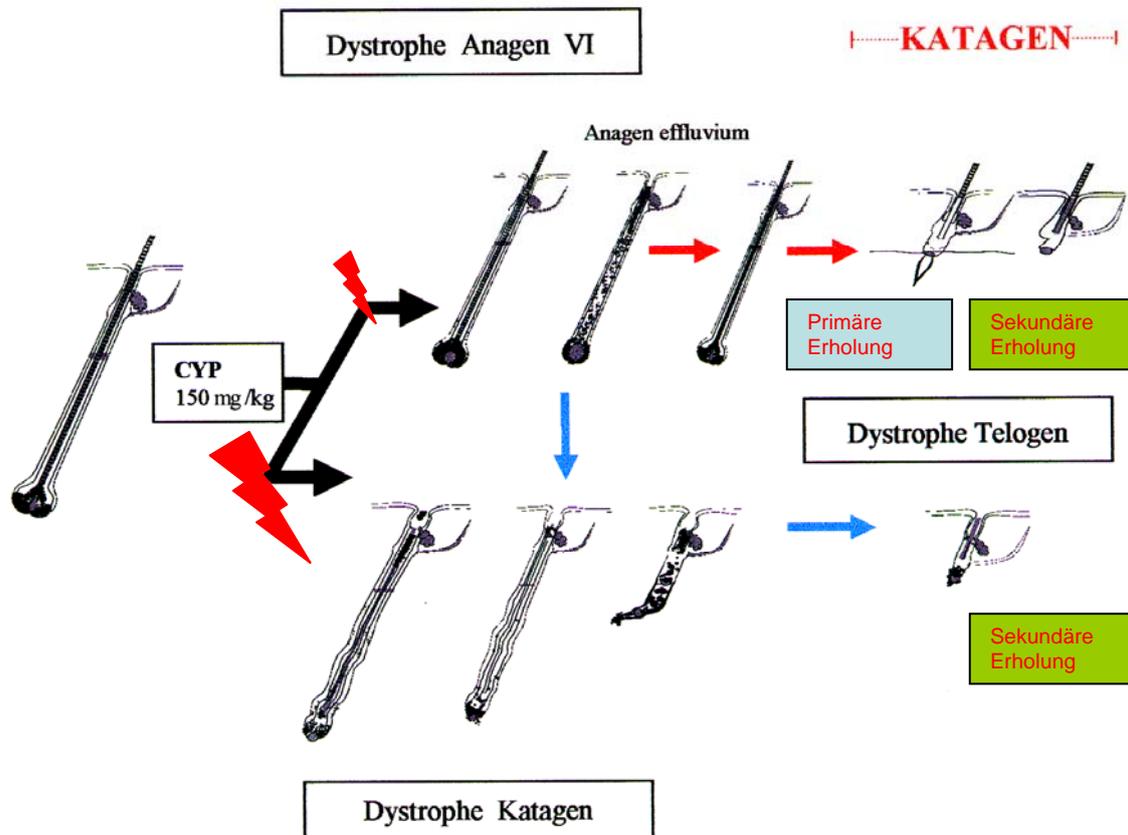


Abb. 28 Schematische Darstellung der dystrophen HF-Populationen. Die CYP-bedingten Schäden der HF-Keratinocyten führen zur Entstehung von zwei Grundpopulationen: dystrophe Anagen VI- und dystrophe Katagen-HF. Unter Umständen können dystrophe Anagen VI-HF eventuell auch zu dystrophen Katagen-HF transformieren. Die Größe des roten Blitzes markiert das Ausmaß der HF-Schäden, welche von Art und Menge der chemischen Substanzen abhängig ist. Während des dystrophen Anagen VI verliert ein Teil der geschädigten HF seine Haarschäfte (Anagen-Effluvium). Der Körper ist bestrebt, den Verlust dieser Haarschäfte mittels Primärer Erholung schnellstens zu ersetzen. Die HF-Architektur wird schon vor dem Eintritt in die Katagenphase repariert. Nach einer Transformation ins Telogen wird das Haarkleid durch Initiation der Sekundären Erholung komplett wiederhergestellt. Die HF im dystrophen Katagen hingegen verfügen über keine Primäre Erholung. Sie reparieren die Schäden ausschließlich durch Sekundäre Erholung.