

2. Material und Methode

2.1. Patientenkollektiv

Makulopapulöses Arzneimittelexanthem

In die Untersuchung wurden 20 Patienten eingeschlossen, die sich im Zeitraum von Mai 1998 bis Juli 2001 in der Klinik und Poliklinik für Dermatologie im Universitätsklinikum Benjamin Franklin (UKBF) wegen eines makulopapulösen Arzneimittelexanthems in der stationären bzw. ambulanten Behandlung befanden.

Bei 16 Patienten konnte wegen Monotherapie das pathologische Agens zweifelsfrei festgestellt werden. In 11 Fällen waren es Aminopenicilline (10x Amoxicillin, 1x Ampicillin) und in je einem Fall: Clindamycin, Captopril, Cotrimoxazol, Johanneskraut-Extrakt und Methyldioxyamphetamin. Die restlichen 4 Patienten hatten mehr als ein Arzneimittel bekommen, dabei 2 von ihnen u.a. Aminopenicilline. Eine Virusinfektion mit EBV/CMV wurde serologisch ausgeschlossen.

Der Medikationsgrund bei Antibiotikagabe waren: Erysipel, Harnwegsinfekt, Angina tonsillaris, Otitis media, Bronchitis, Helicobacter-pylori-positive Gastritis und Pyelonephritis.

Das Patientenkollektiv bestand aus 12 Frauen im Alter zwischen 31 und 96 Jahren (Median: 53 Jahre) und 8 Männern im Alter zwischen 25 und 85 Jahren (Median: 51 Jahre).

Atopische Dermatitis

Untersucht wurden Hautproben von 10 Patienten mit atopischer Dermatitis, die sich im Zeitraum von Mai 1998 bis Juli 2001 in der Klinik für Dermatologie im Universitätsklinikum Benjamin Franklin in stationärer Behandlung befanden.

Das Patientenkollektiv bestand aus 4 Männern im Alter von 29 bis 75 Jahren (Median: 48 Jahre) und 6 Frauen im Alter von 18 bis 66 Jahren (Median: 22,5 Jahre).

Akute Kontaktdermatitis

Es wurden Hautproben von 10 Patienten mit akuter Kontaktdermatitis untersucht, die sich im Zeitraum von Mai 1998 bis Juli 2001 in der Klinik und Poliklinik für Dermatologie im Universitätsklinikum Benjamin Franklin in der stationären bzw. ambulanten Behandlung befanden und eine positive 72h-Hautreaktion auf Nickel(II)-sulfat (5% in Vaseline) im Epikutantest aufwiesen.

Das Patientenkollektiv bestand aus 7 Frauen im Alter von 21 bis 86 (Median: 56 Jahre) und 3 Männer im Alter von 46 bis 64 Jahren (Median: 51 Jahre).

2.2. Entnahme der Hautproben

Den Patienten mit Arzneimittelexanthemen wurde die Hautprobe in der Regel innerhalb 72h nach dem Auftreten der Hautläsionen entnommen (Streubreite: 24-168h). Die Entnahmestellen waren je nach Lokalisation der Hautläsionen: Oberarm, Rumpf, Unter- bzw. Oberschenkel.

Bei Patienten mit atopischer Dermatitis erfolgte die Probeexzision in der akuten Exazerbationsphase der Erkrankung, vor einer lokalen und/oder systemischen Kortikosteroid-Therapie, meistens aus der Ellenbeuge bzw. Kniekehle.

Die Hautproben bei Patienten mit akuter Kontaktdermatitis auf Nickel wurden am Rücken entnommen, bei einer positiven 72h-Hautreaktion auf Nickel(II)-sulfat im Epikutantest.

Alle Hautproben wurden mit einer Stanzbiopsie (6 mm) in Lokalanästhesie entnommen. Als Kontrolle wurde gesunde Haut mituntersucht. Sie stammte aus den Randbereichen größerer Exzissionspräparate (z.B. bei Entfernung von Naevuszellnaevi) von Patienten, bei denen die oben beschriebenen Erkrankungen nicht vorlagen.

2.3. Verwendete Antikörper

Spezifität	Cluster	Isotyp	Verdünnung
Marker der Langerhans Zellen T6 (Fa. Dako)	CD 1a	Maus IgG2a	1:100
Marker der alternativ-aktivierten Makrophagen (Th 2) MS1 (UKBF Berlin Dermatol. Labor)		Maus IgG	1:10.000
RM 3/1 25F9 (Fa. BMA-Biomedicals)	CD163	Maus IgG1 Maus IgG1	1:20 1:50
Marker der klassisch-aktivierten Makrophagen (Th 1) Fc γ R I Fc γ R II (Fa. Pharmigen)	CD 64 CD 32	Maus IgG1 Maus IgG2b	1:100 1:400
Fc γ R III (Fa. Beckmann-Caulk)	CD 16	Maus IgG1	1:50
Selektine E-Selectin (Fa. Beckmann-Caulk)	CD 62e	Maus IgG1	1:20
Immunoglobulinsuperfamilie ICAM-1 VCAM-1 (Fa. Beckmann-Caulk)	CD 54 CD 106	Maus IgG1 Maus IgG	1:100 1:100
β1-Integrine VLA-4 (Fa. Beckmann-Caulk)	CDw 49d	Maus IgG1	1:10
β2-Integrine LFA-1 (Leukozytenmarker) (Fa. Beckmann-Caulk)	CD 11a	Maus IgG	1:25
CR4a (Monozyten-, Makrophagen- marker) (Fa. BMA-Biomedicals)	CD11c	Maus IgG1	1:200
Sekundäre Antikörper (Fa. Dianova)		Ziege Anti-Maus IgG	1:100

Tabelle 4

2.4. Peroxidase-Methode

Am Kryostat wurden aus dem Biopsiematerial 5µm dicke Schnitte angefertigt und auf beschichtete Objektträger aufgezogen. Nach 30min Lufttrocknung wurden sie bis zur weiteren Bearbeitung bei einer Temperatur von -20°C aufbewahrt. Die Bearbeitung der Schnitte erfolgte nach der Peroxidase-Sandwich-Methode (Poppema et al. 1981, modifiziert Goerdts et al.1991).

Die Schnitte wurden 60 min. lang aufgetaut. Anschließend wurden sie 10 min. mit Aceton fixiert und 15 min. luftgetrocknet. Es folgte eine 15minütige Inkubation der Schnitte in einer die endogene Peroxidase hemmenden Lösung (1ml H₂O₂, 5ml NaN₃ [1 Molar] und 94ml PBS¹). Sie wurden danach 3 min mit PBS-Lösung gespült und 20 min. in 1% BSA²-PBS Lösung (2,5g BSA in 250ml PBS im 37°C-Wasserbad gelöst) inkubiert, um die unspezifischen Bindungsstellen zu blockieren.

Die Schnitte wurden in eine feuchte Kammer gebracht, wo auf sie je 100µl der spezifischen Antikörper in gewünschter Konzentration pipetiert wurde. Es folgte eine 30minütige Inkubation in zugedeckter Kammer.

Anschließend wurden die Objektträger mit den Proben 2x 3min mit PBS und 1x 3min mit BSA-PBS-Lösung (Zusammensetzung wie oben) gespült.

Die Objektträger wurden dann wieder in die feuchte Kammer gebracht und auf jede Probe wurde je 100µl sekundären Antikörper (Ziege Anti-Maus IgG-Peroxidase) pipetiert (Verdünnung 1:100 mit BSA-PBS-Lösung). Es folgte eine 30minütige Inkubation in einer zugedeckten feuchten Kammer.

¹ PBS (Phosphat-gepufferte Kochsalzlösung) Duplecco Instatnt; Biochrom KG; Cat.No. L182-10

² Bovine Albumin Fraktion V; Carl Roth GmbH + Co; Cat.No. 8076.3

Die Schnitte wurden 3x 3min mit PBS gespült und in eine mit Alufolie eingewickelte Küvette gebracht. Dort wurden sie mit einer Speziallösung 10min in 37°C Wasserbad inkubiert. Die Lösung wird kurz vor dem Gebrauch wie folgt vorbereitet: 200ml 0,1% Acetatpuffer (pH=4,9) und 8ml AEC³-Substrat werden zusammen pipetiert und im Dunklen (Glaszylinder und Trichter in Alufolie eingewickelt) durch ein Filterpapier filtriert. Auf 150ml filtrierten Acetat-AEC-Puffer wurden 75µl H₂O₂ pipetiert.

AEC-Substrat ist eine Lösung aus 2g 3-Amino-9-Ethyl-Carbazol in 500ml Dimethylformid, im Dunklen bei Zimmertemperatur aufbewahrt.

Nach einer Inkubationszeit von 10 Minuten wurden die Schnitte erneut mit PBS gespült und 1,5 min in filtrierter Mayer'scher Lösung gegengefärbt. Schließlich wurden sie 4x mit Leitungswasser gespült und noch feucht mit Aquamount Einschlussmittel eingedeckt.

2.5. Histologische Beurteilung

In der lichtmikroskopischen Auswertung der Präparate erfolgte die Beurteilung der Expression der markierten Strukturen nach Lokalisation und Expressionsstärke. Die Expression entsprechender Marker in gesunder Haut wurde parallel zu den drei untersuchten Kollektiven mitbeurteilt und diente als Kontrolle.

Die positiv markierten Zellen stellten sich leuchtend rot dar. Ihre Lokalisation wurde jeweils einem der drei Kompartimente: Epidermis, obere (oberhalb des oberen dermalen Gefäßplexus) bzw. untere Dermis zugeordnet.

Die Expressionsstärke wurde im Einzelfall jeweils semiquantitativ in einer Skala von 0 bis 4 beurteilt.

	markierter Infiltratanteil	Markierung gewertet als:
0:	0-5%	negativ/gering
1:	>5-25%	mäßig/ deutlich
2:	>25-50%	stark
3:	>50-75%	sehr stark
4:	>75-100%	massiv

³ 3-Amino-9-Ethyl-Carbazol; ICN; Cat.No. 195039

Für die graphische Darstellung wurde aus den Einzelwerten für jedes Hautkompartiment (Epidermis, obere und untere Dermis) getrennt der Median gebildet. Im Säulendiagramm wurde dann die Expressionsstärke des jeweiligen Markers beim Arzneimittelexanthem der Expression derjenigen bei der AKD und AD gegenübergestellt.

Die statistische Auswertung erfolgte mit Hilfe des unpaarigen, zweigeteilten Mann-Whitney-Test. Die Expression einzelner Marker beim Arzneimittelexanthem wurde mit den entsprechenden Werten bei der akuten Kontaktdermatitis und der atopischen Dermatitis verglichen. Als statistisch signifikant wurde $p < 0,05$ bewertet. Für den Vergleich zwischen den Krankheitsbildern wurden bei jedem Patienten die drei für die Epidermis, obere und untere Dermis erhobenen Expressionswerte einzelner Marker addiert, sodass pro Patient ein Expressionswert des entsprechenden Markers für den Mann-Whitney-Test verwendet wurde.