

Badania nad kontaktowymi właściwościami uczulającymi pochodnych tioamidów u świnek morskich

PIOTR WILKOŁEK

Zakład Diagnostyki Klinicznej i Dermatologii Weterynaryjnej AR, ul. Głębocka 30, 20-612 Lublin

Wilkołek P.

Studies of the contact sensitivity properties of thioamides derivatives in guinea pigs

Summary

Thioamides, especially thiobenzanilides and related compounds, are characterized by a wide spectrum of biological activities (antimicrobial, anthelmintic, analgesic, anti-inflammatory) depending on the type of substitution. 2,4-dihydroxythiobenzanilides have been discovered to have interesting in vitro efficiency against dermatophytes, yeasts and moulds. The purpose of this study was to assess adverse reactions of thioamides after skin contact. The study was done on 29 guinea pigs. The guinea pig maximization test (acc. Magnusson Kligman' test) was used to estimate the risk of the skin contact allergic reactions. Skin irritation of the examined substances in different concentrations was assessed after epidermal topical application. Cross-reactions between thioamides and tetramethylthiuram disulfide was also examined. The leukocyte inhibition migration test (in vitro test) was done to confirm results of skin epidermal tests.

Thioamides derivatives have very weak irritant properties and using these compounds in therapeutic concentrations (0.5-3%) has no risk of irritant adverse reaction after coming into contact with skin. Cross-reactivity was noticed among 2,4-dihydroksytiobenzamid and tetramethylthiuram disulfide. 2,4-dihydroksytiobenzamid is characterized by a weak sensitizing capacity (only 20% of animals were sensitized in GPMT) and according to OECD guidelines it may not be classified as a skin sensitizer (R43), but in special circumstances it may cause allergic contact dermatitis.

Keywords: contact dermatitis, thioamides, thiobenzanilides

Każdego roku przemysł chemiczny i farmaceutyczny wprowadza na rynek tysiące nowych substancji chemicznych. Wiele produktów lub ich składników, które wchodzi w bezpośredni kontakt ze skórą ludzi i zwierząt, może wywołać reakcje niepożądane, prowadzące do rozwoju różnego rodzaju dermatoz. Szacuje się, że około 3700 substancji chemicznych po przypadkowym lub celowym (np. leki) kontakcie ze skórą może prowadzić do rozwoju alergii kontaktowej (1). Stąd w krajach Unii Europejskiej obowiązują kryteria klasyfikacyjne ustalone w 1999 roku dla substancji wykazujących właściwości uczulające dla uczuleń kontaktowych skóry. Według OECD (17), substancję klasyfikuje się do grupy związków o wysokim ryzyku powodowania niepożądanych reakcji typu kontaktowego, jeśli w praktyce dana substancja lub preparaty zawierające daną substancję są w stanie wywołać uczulenie u znacznej liczby osób poprzez kontakt ze skórą lub na podstawie dodatnich reakcji w zalecanych badaniach doświadczalnych na zwierzętach. Z oczywistych względów zaklasyfikowanie nowo zsyntetyzowanych związków, jakimi są różne pochodne tioamidów, może odbywać się na podstawie badań doświadczalnych na zwierzętach.

Pochodne tioamidów są związkami wykazującymi silną aktywność biologiczną. Prowadzone z nowo zsyntetyzowanymi związkami badania mikrobiologiczne (oraz przedkliniczne) wskazują na ich działanie przeciugrzybicze, przeciwbakteryjne oraz przeciwwirusowe, co stwarza nowe możliwości wykorzystania ich w leczeniu zarówno ludzi, jak i zwierząt. Większość z nich charakteryzuje się aktywnością fungistatyczną w stosunku do dermatofitów (*Trichophyton menthagrophytes*, *T. rubrum*, *T. interdigitale*, *Microsporum gypseum*, *Epidermophyton floccosum*), pleśni, drożdżaków (*Candida albicans*, *Trichosporon sp.*, *Cryptococcus neoformans*). Wykazują właściwości bakteriostatyczne przeciwko bakteriom G+, np. gronkowcom (7). Benzanilidy, tiobenzanilidy oraz ich pochodne wykazują również właściwości przeciwnowotworowe, przeciwpasożytnicze, przeciwbólowe i przeciwzapalne w zależności od rodzaju podstawnika w cząsteczce (5, 6). Prowadzono również badania nad właściwościami fizykochemicznymi, lipofilnością tych związków chemicznych oraz zależnością pomiędzy lipofilnością a aktywnością przeciugrzybiczą różnych pochodnych 2,4-dihydroksytiobenzanilidów, gdzie zaobserwowano dodatnią

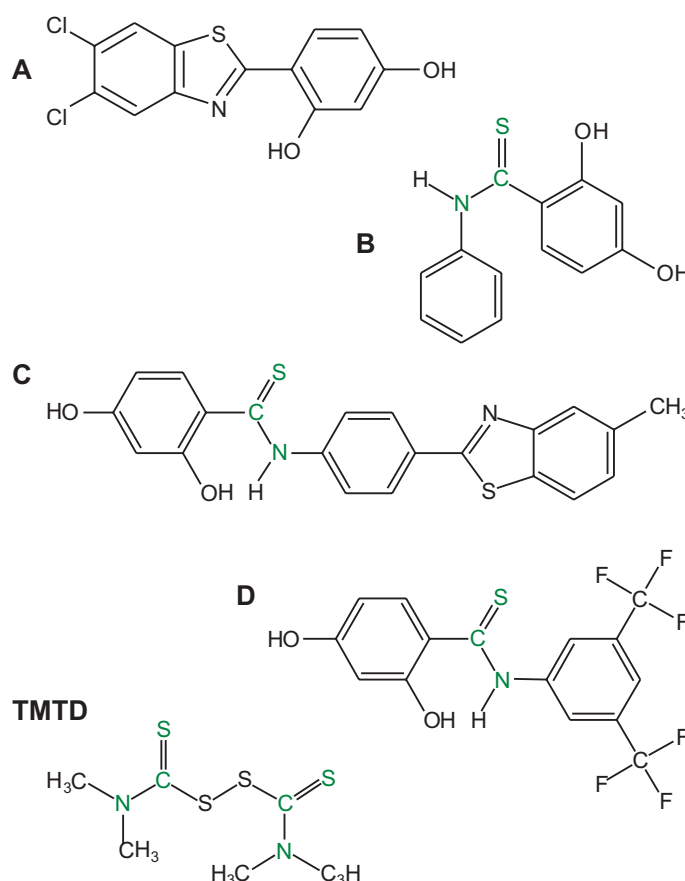
korelację pomiędzy tymi właściwościami (8, 9, 14). Oceniano również ich toksyczność z różnymi podstawnikami w pierścieniu N-aromatycznym i wykazano ich niską toksyczność w porównaniu z powszechnie stosowanymi związkami przeciwgrzybiczymi (5). Jako ewentualne przyszłe leki, związki te wymagają przeprowadzenia wszechstronnej oceny. Jednym z nich jest konieczność oceny ryzyka wywoływania skórnych reakcji kontaktowych typu podrażnieniowego bądź alergicznego, jak też możliwości wywoływania ewentualnych reakcji krzyżowych z innymi substancjami o zbliżonej budowie chemicznej. Pewne podobieństwo w budowie chemicznej do dwusiarczku czterometylotiamuru (związku o znanych silnych właściwościach uczulających) może nasuwać podejrzenie, że tioamidy mogą również charakteryzować się właściwościami uczulającymi. Uzyskanie odpowiedzi na powyższe pytania będzie miało istotne znaczenie, co do dalszego ich losu jako substancji leczniczych, przyczyniając się do sprecyzowania wskazań o ewentualnych reakcjach niepożądanych czy też sformułowania niezbędnych ostrzeżeń. Brak jest jednak danych literaturowych na temat właściwości uczulających związków chemicznych o budowie tiobenzanilidów oraz stosownych badań alergologicznych.

Cel podstawowy badań dotyczył wykazania i przesłedzenia niepożądanego oddziaływania tioamidów w aspekcie przyszłych leków poprzez udowodnienie wywołania przez cztery nowo zsyntetyzowane związki (2- β -rezorcylo-5,6-dichloro-1,3-benzotiazol, N-1-(benz)-2,4-dihydroksytiobenzamid, N-1-[2-(4'-fenylo-6'-metylo-benzotiazolo)]-2,4-dihydroksytiobenzamid oraz N-1-(3',5'-dibenztriflorometylo)-2',4'-dihydroksytiobenzamid) reakcji krzyżowych z dwusiarczkiem czterometylotiamuru u doświadczalnie uczulonych na tiuram świnek morskich. Ponadto postanowiono przeanalizować właściwości drażniące tych związków po naskórnym podaniu, jak też przesłedzić zdolności związków reaktywnych w reakcjach krzyżowych do „samodzielnego” wywołania u świnek morskich uczulenia kontaktowego.

Materiał i metody

Substancje badane to benzotiazol, (A) 2- β -rezorcylo-5,6-dichloro-1,3-benzotiazol oraz tioamidy (B) N-1-(benz)-2,4-dihydroksytiobenzamid (dihydroksybenztioanilid), (C) N-1-[2-(4'-fenylo-6'-metylo-benzotiazolo)]-2,4-dihydroksytiobenzamid, (D) N-1-(3',5'-dibenztriflorometylo)-2,4-dihydroksytiobenzamid, a także dwusiarczek czterometylotiamuru (TMTD), których wzory strukturalne przedstawiono na ryc. 1. Do sporządzenia formuł roztworów i mieszanin (zaróbek) zostały użyte: aceton (Polskie Odczynniki Chemiczne) do iniekcji śródskórnych, adjuwant Freund'a (Sigma) oraz wazelina biała (*Vaselinum Album FP IV*, Aflofarm Farmacja Polska) w próbach naskórnym.

Grupa zwierząt użytych w badaniach liczyła 29 świnek morskich, z czego grupę doświadczalną stanowiło 21 świnek morskich. W chwili rozpoczęcia doświadczenia wiek zwierząt wahał się od 4 do 5 miesięcy, a masa od 300 do 400 g.



Ryc. 1. Wzory strukturalne substancji użytych w doświadczeniu: A – 2- β -rezorcylo-5,6-dichloro-1,3-benzotiazol, B – N-1-(benz)-2,4-dihydroksytiobenzamid (dihydroksybenztioanilid), C – N-1-[2-(4'-fenylo-6'-metylo-benzotiazolo)]-2,4-dihydroksytiobenzamid, D – N-1-(3',5'-dibenztriflorometylo)-2,4-dihydroksytiobenzamid

Świnki morskie przebywały w klatkach o wymiarach 70 × 40 × 35 cm, w ilości od 3 do 5 osobników w jednej klatce, w pomieszczeniu ze średnią wilgotnością 80%, w cyklu dobowym 12 h oświetlenie, 12 h bez oświetlenia. Przed rozpoczęciem doświadczenia zwierzęta przechodziły tygodniową aklimatyzację, gdzie były poddawane ocenie klinicznej stanu zdrowia. Grupę I stanowiło 5 świnek morskich uczulanych na dwusiarczek czterometylotiamuru. Grupa II liczyła 10 świnek morskich uczulanych na N-1-(benz)-2,4-dihydroksytiobenzamid (tiobenzanilid). Ocena właściwości drażniących substancji badanych została wykonana u 6 świnek morskich, u trzech z nich dokonano oceny dwusiarczku tetrametyliotiamuru (TMTD), u trzech pozostałych związków pochodnych tioamidów. Grupę zwierząt kontrolnych stanowiło 8 świnek morskich, u których wykonano test maksymalizacji z TMTD oraz N-1-(benz)-2,4-dihydroksytiobenzamidem jako kontroli ujemnej. Badania na zwierzętach zostały zatwierdzone przez lokalną komisję etyczną do spraw badań na zwierzętach (nr opinii 48/2003, 7.10.2003).

Ocena właściwości drażniących substancji badanych została przeprowadzona na podstawie reakcji skórnych, pojawiających się w wyniku ekspozycji skóry na mieszaniny badanych związków chemicznych, zastosowanych w różnych stężeniach, w teście naskórnym. Poprzez tę metodę wyznaczono najwyższe stężenia niedrażniące dla skóry zdrowej. W przypadku substancji A, B, C, i D testowano je w stężeniach 1%, 10%, 25%. Z uwagi na konieczność wykonywania

doświadczalnych uczuleń oraz wykonywania prób naskórkowych, analogiczne badania wykonano także z TMTD. W przypadku TMTD wykonano test naskórny ze stężeniami 0,1%, 1%, 3%, 5%. U zwierząt stosowano okluzję (plaster opatrunkowy, bandaż) przez okres 24 h w celu zapobiegnięcia usunięcia przez zwierzę substancji badanych. Wykwity skórne oceniono po 1 h i po 24 h. Zwierzęta, u których wykonano ww. testy nigdy wcześniej nie miały kontaktu z substancjami badanymi.

Doświadczalne uczulenie świnek morskich na tiuram zostało przeprowadzone na podstawie standardowej procedury testu maksymalizacji na świnkach morskich wg Magnussona Kligmana zgodnie z wytycznymi OECD (19) w celu wykazania w kolejnym etapie doświadczenia reakcji krzyżowych tiuramu z substancjami badanymi. Podczas fazy indukcji uczulenia 0. dnia podano 6 iniekcji śródskórnych w okolicy obu łopatek: 2 iniekcje po 0,1 cm³ kompletnego adiuwantu Freund'a (FCA) w wodzie destylowanej (FCA/woda 1 : 1 v/v), 2 iniekcje 0,1 ml 5% roztworu TMTD w acetonie oraz 2 iniekcje po 0,1 ml 5% roztworu TMTD w FCA/aceton (1 : 1 v/v). Szóstego dnia w okolicy poprzednich iniekcji wydepilowano sierść na powierzchni 2 × 4 cm i przemyto 5% wodnym roztworem siarczanu laurylosodowego, natomiast 7 dnia naniesiono miejscowo na skórę, 0,2 cm³ 25% mieszaninę TMTD w wazelinie białej. Założono opatrunek na okres 48 h. W fazie wzbudzenia uczulenia (FWU I) dnia 21. wydepilowano sierść na klatce piersiowej po stronie lewej na powierzchni 2 × 4 cm, przemyto 5% wodnym roztworem siarczanu laurylosodowego, następnego dnia miejscowo na skórę naniesiono na obszarze 2 × 4 cm 3% TMTD w wazelinie białej (test naskórkowy). Została zastosowana okluzja opatrunkiem przez okres 24 h. W celu potwierdzenia wyników badania próbę naskórkową (FWU II) powtórzono po 2 tygodniach od pierwszego odczytu testu. Ocenę wykwitów (rumień) i innych zmian skórnych (obrzęk) przeprowadzono po 24 h, 48 h, 72 h i 96 h od momentu aplikacji testu naskórnego, na podstawie czteropunktowej skali Magnussona Kligmana: /0/ – brak jakichkolwiek widocznych zmian, /1/ – słaby rumień bez obrzęku, /2/ – średnio nasilony rumień, rozprzestrzeniający się poza okolice aplikacji substancji badanej bez obrzęku, /3/ – silny rumień i obrzęk. Za pozytywny wynik testu naskórnego uznano reakcje skórne /2/ i /3/. W grupie kontrolnej wykonano test maksymalizacji Magnussona Kligmana, podobnie jak u zwierząt doświadczalnych, lecz bez zastosowania TMTD w fazie indukcji uczulenia.

Do badania reakcji krzyżowych użyto 3 świnek morskich, które zostały uczulone w teście maksymalizacji z TMTD. U tych zwierząt wykonano test naskórny z substancjami A, B, C i D w stężeniu 3%. Oceny reakcji skórnych dokonano analogicznie, jak w przypadku FWU w teście maksymalizacji z użyciem tiuramu.

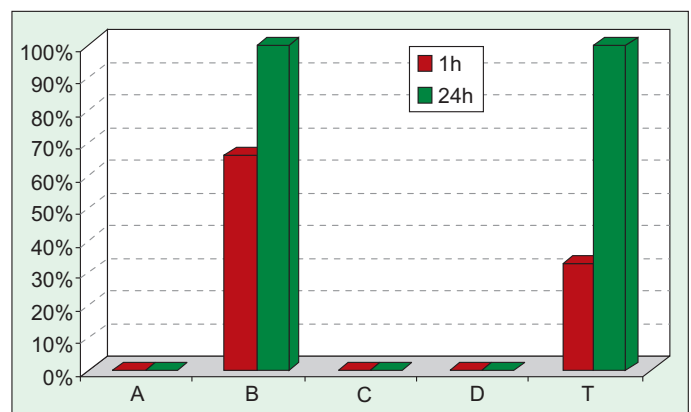
Do dalszych badań, spośród 4 substancji, wybrano N-1-(benz)-2,4-dihydroksytiobenzamid (substancja B), związek, który w reakcjach krzyżowych z TMTD wykazywał odczyn dodatni. Badania przeprowadzono metodą maksymalizacji Magnussona Kligmana wg protokołu standardowego. W fazie indukcji uczulenia do iniekcji śródskórnych użyto 5% roztworu acetonowego substancji badanej, natomiast do aplikacji miejscowej jej 25% mieszaniny w wazelinie białej. Próbę naskórną w FWU I i FWU II przeprowadzono z 3% mieszaniną N-1-(benz)-2,4-dihydroksytiobenzamidu w wazelinie białej. Ocenę reakcji skórnych przeprowadzono wg skali Magnussona Kligmana, analogicznie jak w przypadku doświadczalnego uczulenia świnek morskich na TMTD.

Badania *in vitro* przeprowadzono z zastosowaniem testu zahamowania migracji leukocytów met. kapilarową (TZML) w celu potwierdzenia stanu nadwrażliwości u doświadczalnie uczulonych świnek morskich oraz u zwierząt, u których występowały reakcje krzyżowe. Po pobraniu krwi wstępnie wystandaryzowano alergen, uzyskując nietoksyczne stężenia TMTD oraz N-1-(benz)-2,4-dihydroksytiobenzamidu w stosunku do leukocytów, przeprowadzając TZML w roztworach o różnym stężeniu substancji badanych. Wybrano te stężenia, które nie powodowały nieswoistego (toksycznego) hamowania migracji leukocytów. Za wynik ujemny (brak hamowania migracji leukocytów) przyjęto wskaźnik indeksu $I \geq 0,8$, natomiast za wynik dodatni $I < 0,8$ (hamowanie migracji leukocytów).

Istotność różnic pomiędzy grupami oceniano testem rang U Manna-Whitneya, natomiast korelacje — testem Kolmogorowa. Poziom błąd dla wszystkich obliczeń wynosił $p < 0,05$. Wszystkie obliczenia zostały wykonane przy użyciu programu Statistica 6.0.

Wyniki i omówienie

Przystępując do omówienia wyników badań podkreślić należy ich ukierunkowanie na ocenę potencjalnego ryzyka powodowania określonych działań niepożądanych tioamidów i benzotiazolu (związki A, B, C, i D), jako przyszłych substancji terapeutycznych. Badania te miały na celu ocenę ich tolerancji miejscowej, poprzez określenie właściwości drażniących dla skóry zdrowej, jak i obejmowały ocenę ich zdolności do powodowania reakcji alergicznych. W badaniu tolerancji miejscowej, tj. porównawczej ocenie właściwości drażniących dla zdrowej skóry świnek morskich, wykazano istotne różnice, co do tolerancji miejscowej pomiędzy substancjami A, B, C, D a TMTD. Wyniki badania właściwości drażniących zostały zilustrowane na ryc. 2. Okazuje się, że tiuram już w 5% stężeniu drażnił skórę wszystkich badanych zwierząt. U jednego z nich pierwsze wykwity pojawiły się już po 1 godz. od aplikacji substancji. Natomiast w grupie tioamidów tylko po aplikacji substancji B (N-1-(benz)-2,4-dihydroksytiobenzamidu) w stężeniu pięciokrotnie wyższym, czyli 25%



Ryc. 2. Odsetek świnek morskich w teście podrażnieniowym, u których występowały reakcje podrażnieniowe dla poszczególnych substancji badanych po 1 i 24 godzinach. Reakcje dodatnie dla substancji B występowały przy stężeniu 25%, dla T – 5%

uzyskano reakcję dodatnią w postaci podrażnienia, po 1 h. Pozostałe substancje nawet w stężeniu 25% nie powodowały podrażnienia, co świadczy o ich doskonałej tolerancji miejscowej i wydaje się wiązać z małą toksycznością naskórną związków A, C i D. Wynika z tego, że prawdopodobieństwo występowania podrażnieniowego kontaktowego zapalenia skóry po np. terapeutycznym jej kontakcie z badanymi związkami jest niewielkie. Rokuje to dobrze, co do ewentualnych możliwości miejscowego stosowania tychże środków, w takich postaciach leków, jak np. maści, kremy, żele czy lotiony. Ustosunkowując się do miejscowej reaktywności podrażnieniowej powodowanej przez 25% stężenie substancji B zaznaczyć trzeba, że wynik ten także nie dyskwalifikuje jej w aspekcie miejscowego stosowania. Opierając się bowiem na danych dotyczących wysokiej aktywności przeciwgrzybiczej tiobenzanilidów w wielokrotnie niższych stężeniach (4, 13, 15), założyć można, iż zwyczajowe 0,5 do 3% terapeutyczne stężenia, a nawet i 10% koncentracja – nie przyniosłyby niepożądanego efektu w postaci skórnych reakcji podrażnieniowych. Można przypuszczać, iż fakt doskonałej tolerancji tiobenzanilidów, po jednorazowym naskórnym podaniu, kilkudziesięciokrotnie wyższych od zwykle przyjętych terapeutycznych stężeń, wydaje się także przemawiać korzystnie za ich dobrą tolerancją miejscową w wielokrotnych aplikacjach miejscowych np. w trakcie długotrwałego leczenia zakażeń grzybiczych. Odniesienie wyników badań własnych dotyczących tolerancji miejscowej do danych piśmiennictwa jest z oczywistych względów niemożliwe, jako że dotyczą one nowo zsyntetyzowanych związków i są pierwszymi danymi z tego zakresu. Stosowne dane na temat tolerancji miejscowej tiuramu pokrywają się z danymi piśmiennictwa (11).

W wyniku doświadczalnego uczulania świnek morskich w teście maksymalizacji reakcje skórne w fazie wzbudzenia uczulenia (FWU I), jak i po powtórnym kontakcie z alergenem (FWU II) po 2 tygodniach od pierwszej próby, wystąpiły u 3 spośród 5 zwierząt (60%), które zostały uznane za uczulone. U wszystkich trzech świnek morskich po 48 h pojawiły się reakcje o różnym nasileniu od słabej reakcji rumieniowej – /1/ do intensywnego rumienia z obrzękiem skóry – /3/. Intensyfikacja zmian skórnych w każdym przypadku miała miejsce około 72 h od momentu kontaktu alergenu ze skórą. Oprócz obrzęku i rumienia, reakcji, które były podstawą oceny zmian skórnych, obecne były również wykwit wtórny, tj. strupy oraz nadżerki, które pojawiły się u dwóch osobników. Dwie świnki morskie nie wykazywały żadnych objawów klinicznych zarówno po pierwszej, jak i po drugiej próbie wzbudzenia uczulenia. Zwierzęta te uznano za nieuczulone. Uzyskane wyniki po raz kolejny udowadniają, że dwusiarczek czterometylotiuuramu w teście maksymalizacji wykazywał średni stopień siły uczulania (III st.), co jest zgodne ze stwierdzeniami innych autorów (15) oraz po-

wszechną opinią o częstoci występowania uczuleń na ten związek u ludzi i zwierząt (16, 18).

W badaniu reakcji krzyżowych wśród 3 wcześniej uczulonych świnek morskich na TMTD, w wyniku przeprowadzonych testów naskórných z substancjami A, B, C, D wykazano występowanie skórnej reaktywności krzyżowej jedynie z substancją B, natomiast substancje A, C oraz D pozostawały w testach naskórkowych areaktywne. Reakcja dodatnia obserwowana była u wszystkich 3 zwierząt. W jednym przypadku reakcja rumieniowa widoczna była już po 48 godzinach od jej aplikacji, natomiast po trzech dobach od kontaktu z nią, dodatni wynik można było stwierdzić u trzech świnek morskich. Zmiany skórne utrzymywały się przynajmniej do 96. godziny, która była momentem granicznym obserwacji zwierząt. Nasilenie reakcji było zmienne i przebiegało od średniego stopnia rumienia do silnej reakcji obrzękowej skóry z tworzeniem strupa. Substancje A, C i D nie wykazywały reakcji krzyżowych z TMTD. Jedynie w przypadku związków A i D widoczny był słaby rumień /1/ i nie uwzględniono tego odczynu jako reakcji dodatniej. Z powyższego nasuwa się wniosek, że terapeutyczne zastosowanie substancji B (N-1-(benz)-2,4-dihydroksytiobenzamidu) powinno być wykluczone u osobników uczulonych na tiuram, zaś stosowanie substancji A, C, oraz D nie wymaga powyższego zastrzeżenia. Co więcej, w przypadku, gdyby właściwości biologiczne substancji B predysponowały ją do rejestracji jako określonego leku, to w materiałach informacyjnych, dotyczących działań niepożądanych winno znaleźć się sformułowanie „nie stosować u osób uczulonych na tiuram”.

Fakt występowania reakcji krzyżowych w przypadku substancji B, ukierunkowywał dalszy tok pracy badawczej na sprawdzenie możliwości powodowania przez nią uczulania. Wstępne badania N-1-(benz)-2,4-dihydroksytiobenzamidu (tiobenzanilidu) w teście maksymalizacji wykazały słabe właściwości uczulające i zgodnie z warunkami OECD dla substancji uczulających, nie można jej zaklasyfikować do grupy związków o wysokim ryzyku powodowania uczulenia po kontakcie ze skórą, ze względu na niższy niż 30% odsetek zwierząt uczulonych w teście maksymalizacji. Pomimo tego, u 20% uczulanych świnek morskich, można było stwierdzić pozytywne reakcje w teście maksymalizacji. Świadczy to o tym, że związek ten, w szczególnych warunkach (w tym przypadku w obecności adjuwantu, aplikacji śródskórnej), jest w stanie samoistnie wywołać uczulenie kontaktowe. Z piśmiennictwa wiadomo, że występowanie alergii kontaktowej nie tylko uzależnione jest od siły uczulającej związku, co wykazuje test maksymalizacji, lecz również wiąże się z powszechnością kontaktu z nią ludzi i zwierząt w środowisku (3). W badaniach własnych zarówno w FWU I, jak i FWU II, spośród 10 świnek morskich uczulanych na substancję B, dodatnie reakcje w teście maksymalizacji, świadczące o uczuleniu, stwierdzono u 2 zwierząt (20%). Reakcje dodatnie u obu zwierząt

występowały już po 48 godzinach po aplikacji badanego związku w próbie II, natomiast w próbie I u jednego zwierzęcia. Nasilenie reakcji skórnych u jednego zwierzęcia w obu próbach było podobne, u drugiego zaś po ponownym kontakcie z alergenem nasilenie reakcji alergicznej miało o wiele łagodniejszy przebieg. Z powyższego wynika, że pomimo słabych właściwości uczulających N-1-(benz)-2,4-dihydroksytiobenzamidu, należy brać pod uwagę potencjalne ryzyko pojawienia się uczuleniowych reakcji kontaktowych, szczególnie przy parenteralnym stosowaniu u osobników predysponowanych do rozwoju kontaktowego zapalenia skóry w przypadku powszechnego użycia jej w preparatach leczniczych.

Test zahamowania migracji leukocytów od szeregu lat uznawany jest za jedną z metod wykazywania nadwrażliwości kontaktowej na substancje chemiczne u ludzi i zwierząt (2). W przeprowadzonych badaniach wykazano różnice statystycznie istotne pomiędzy wartościami strefy migracji leukocytów pomiędzy kontrolą nie zawierającą antygenów T i B a wartościami strefy migracji zarówno w obecności tiuramu, jak i N-1-(benz)-2,4-dihydroksytiobenzamidu w grupach zwierząt uczulonych na T i uczulonych na B. Nie wykazano różnic statystycznie istotnych pomiędzy wartościami strefy migracji leukocytów w obecności T a wartościami strefy migracji w obecności B zarówno w grupie zwierząt uczulonych na T, jak i na B. Istotność różnic pomiędzy poszczególnymi grupami została wykazana dla $p < 0,05$. Występowała wysoka korelacja pomiędzy dodatnimi reakcjami w testach naskórkowych u zwierząt uczulonych na tiuram oraz wartościami indeksu migracji leukocytów w TZM zarówno w obecności T ($r = 0,67$), jak i subst. B ($r = 0,76$). Wyniki własne testu dodatkowo potwierdzają zaistnienie stanu nadwrażliwości typu komórkowego u świnek morskich uczulonych na tiuram oraz substancję B, zaś wysoka korelacja pomiędzy testami naskórnymi a testem zahamowania migracji jednoznacznie rozstrzyga o rzeczywistym powstaniu doświadczalnego uczulenia.

Wnioski

1. Związki o budowie tioamidów i benzotiazolu cechuje doskonała skórna tolerancja miejscowa, zatem prawdopodobieństwo powodowania przez nie niepożądanych oddziaływań podrażnieniowych, np. po terapeutycznym naskórnym zastosowaniu, jest znikome.

2. 2,4-dihydroksytiobenzamid cechuje reaktywność krzyżowa z tiuramem, podczas gdy N-1-[2-(4'-fenylo-6'-metylo-benzotiazolo)]-2,4-dihydroksytiobenzamid i N-1-(3',5'-dibenzotriflorometylo)-2,4-dihydroksytiobenzamid oraz benzotiazol nie wykazują powyższej właściwości.

3. 2,4-dihydroksytiobenzamid charakteryzuje się słabymi właściwościami uczulającymi, zatem, zgodnie z klasyfikacją OECD, nie można zaklasyfikować go do grupy związków o wysokim ryzyku powodowania uczuleń kontaktowych.

4. Wydaje się, iż w warunkach szczególnych, np. parenteralnego stosowania 2,4-dihydroksytiobenzamidu u osobników predysponowanych do rozwoju alergii kontaktowej, można liczyć się z potencjalnym ryzykiem powstania uczuleniowych reakcji kontaktowych.

5. Wysoka korelacja pomiędzy testami naskórnymi a testem zahamowania migracji jednoznacznie rozstrzyga o rzeczywistym powstaniu doświadczalnego uczulenia, a zatem o wysokiej przydatności powyższych metod w badaniu uczuleń kontaktowych.

Piśmiennictwo

1. Andersen K. E., Frankild S.: Allergic Contact Dermatitis. Clin. Derm. 1997, 15, 645-654.
2. Hallab N., Jacobs J. J., Jonathan B.: Hypersensitivity to metallic biomaterials: review of leukocyte migration inhibition assays. Biomaterials 2000, 21, 1301-1314.
3. Ikarachi Y., Kaniwa M., Tsuchiya T.: Sensitization potential of gold sodium thiosulfate in mice and guinea pigs. Biomaterials 2002, 23, 4907-4914.
4. Józwiak K., Szumilo H.: Correlation of fungostatic activity with log P and sigma parameters in the group of thiobenzanilides. Acta Pol. Pharm. 2000, 57, 82-84 Supl.
5. Kowalska-Pylka H., Majer-Dziedzic B., Niewiadomy A., Matysiak J.: Evaluation of the toxicity of substituted benzthioanilides by using in vitro tests. ATLA-Alternatives to Laboratory Animals. 2001, 5, 547-556.
6. Kunes J., Balsanek V., Pour M., Waisser K., Kaustowa J.: On relationship between the substitution pattern of thiobenzanilides and their antimycobacterial activity. Farmaco 2002, 9, 777-782.
7. Matysiak J., Niewiadomy A., Krajewska Kulak E., Mącik-Niewiadomy G.: Synthesis of some 1-(2,4-dihydroxythiobenzoyl)imidazoles, -imidazolines and -tetrazoles and their potent activity against Candida species. Farmaco 2003, 58, 455-461.
8. Matysiak J., Niewiadomy A., Mącik-Niewiadomy G., Kornilowicz T.: Dependence of fungistatic activity of 2,4-dihydroxythiobenzanilides on the structure and lipophilic nature of the compounds. Eur. J. Med. Chem. 2000a, 35, 393-404.
9. Matysiak J., Niewiadomy A., Mącik-Niewiadomy G.: In vitro inhibition properties of a new group of thiobenzanilides in relation to yeasts. Eur. J. Pharmacol. 2000 b, 10, 119-123.
10. Modzelewska-Banachiewicz B., Matysiak J., Niewiadomy A.: Synthesis and mycological activity of the compounds obtained in the reaction of N3-substituted amidrazones with sulphinyl-bis-2,4-dihydroxybenzenethiyl Eur. J. Med. Chem. 2001, 36, 75-80.
11. Nielsen N.: Allergic contact sensitization in adult Danish population: two cross-sectional surveys eight years apart (the Copenhagen Allergy study). Acta Derm. Venereol. 2001, 81, 31-34.
12. Niewiadomy A., Matysiak J., Mącik-Niewiadomy G.: In vitro evaluation of 2,4-dihydroxythiobenzanilides against various moulds. Eur. J. Pharmacol. 2001, 13, 243-248.
13. Niewiadomy A., Matysiak J., Żabińska A., Różyło J. K., Senczyna B., Józwiak K.: Reversed-phase high-performance liquid chromatography in quantitative structure-activity relationship studies of new fungicides. J. Chromatogr. 1998, 828, 431-438.
14. Niewiadomy A., Żabińska A., Matysiak J., Różyło J. K.: Influence of modifier and molecular structure of some dihydroxythiobenzanilides on retention in reversed-phase highperformance thin-layer chromatography. J. Chromatogr. 1997, 791, 237-243.
15. Och van F. M. M., Vandebriel R. J., Prinsen M. K., De Jong W. H., Slob W., Loveren van H.: Comparison of dose-responses of contact allergens using the guinea pig maximization test and the local lymph node assay. Toxicology 2001, 167, 207-215.
16. Olivry T., Prelaud P., Heripret P., Atlee B. A.: Contact dermatitis in the dog: principles and diagnosis. Vet. Clin. N. Amer. 1990, 20, 1433-1456.
17. OECD. Organization for Economic Cooperation and Development. Guideline 406: Skin sensitization. 1992.
18. Rudzki E., Rebandel P.: Allergy to tetramethylthiuram disulfide, a component of pesticides and rubber. Ann. Agric. Environ. Med. 1998, 5, 21-23.
19. Schlede E., Eppler R.: Testing for skin sensitization according to the notification procedure for new chemicals: The Magnusson and Kligman test. Contact Dermatitis 1995, 32, 1-4.