Aus dem Institut für Klinische Pharmakologie und Toxikologie
der Medizinischen Fakultät Charité – Universitätsmedizin Berlin

DISSERTATION

# Untersuchung des Sensibilisierungspotenzials von ungesättigten Verbindungen im Loose-fit Coculture-based Sensitization Assay (LCSA)

zur Erlangung des akademischen Grades
Doctor medicinae (Dr. med.)

vorgelegt der Medizinischen Fakultät
Charité – Universitätsmedizin Berlin

von

Thomas Armin Frohwein

aus Landstuhl

Datum der Promotion: 22.06.2014

# Inhalt


1 Zusammenfassung / Abstract ..... 4

2 Einleitung ..... 7

2.1 Überblick ..... 7

2.2 Toxikologische Forschung am Beispiel der allergischen Kontaktdermatitis ..... 8

2.3 Allergische Kontaktdermatitis ..... 9

2.3.1 Pathogenese ..... 12

2.4 Methoden der Risikobewertung – die regulatorischen Rahmenbedingungen ..... 14

2.5 Strategien zur Identifikation von Kontaktallergenen ..... 15

2.5.1 *In vivo*-Methoden ..... 15

2.5.2 Alternativmethoden ohne Tierversuche ..... 17

2.5.3 Beispiele für Testmethoden ..... 18

2.6 Der LCSA ..... 19

3 Material und Methoden ..... 22

3.1 Testsubstanzen ..... 22

3.2 Primärzellen ..... 22

3.2.1 Keratinozyten ..... 22

3.2.2 Mononukleäre Zellen ..... 27

3.3 Durchführung des LCSA ..... 28

3.3.1 Tag 1 ..... 28

3.3.2 Tag 3 ..... 30

3.3.3 Tag 5 ..... 31

3.4 Datenanalyse ..... 33

4 Ergebnisse ..... 36

4.1 Grafische Darstellung der Konzentrations-Wirkungs-Kurven ..... 36

4.2 Quantifizierung des sensibilisierenden und irritierenden Potenzials mittels $EC_{50}$ und $EC_{50\%}$ ..... 55

5 Diskussion ..... 57

5.1 Vergleich mit den Ergebnissen im GPMT und LLNA ..... 57

5.2 Diskussion der Substanzen ..... 62

5.3 Korrelation von $EC_{50}$ & $EC_{50\%}$ ..... 66

5.4 Limitationen des LCSA ..... 67

5.5 Kategorisierung von sensibilisierendem Potenzial ..... 68
5.6 Fazit ..... 69
6 Literaturverzeichnis ..... 71
7 Abkürzungsverzeichnis ..... 86
8 Eidesstattliche Versicherung ..... 87
9 Lebenslauf ..... 88
10 Publikationsliste ..... 90
11 Danksagung ..... 91

# 1 Zusammenfassung / Abstract

Für die Identifizierung von potenziellen Kontaktallergenen stellten tierexperimentelle Methoden, wie der an Mäusen durchgeführte Local Lymph Node Assay (LLNA), lange Zeit den Standard dar. Die Abkehr von Tierversuchen für toxikologische Untersuchungen hat zur Entwicklung zahlreicher *in vitro*-Testmethoden geführt. Der „loose-fit coculture-based sensitization assay“ (LCSA) beruht auf einer Kokultur von Keratinozyten und dendritischen Zellen. In dieser Arbeit wurden Substanzen mit ungesättigten Kohlenstoffverbindungen mit dem LCSA untersucht, um mehr Wissen über die Aussagekraft des LCSA zu erhalten. Nach Anlage der Kokultur wurden die Testsubstanzen Bernsteinsäure, Fumarsäure, Maleinsäure, Octinol, Squalen, sowie die ungesättigten Fettsäuren Arachidonsäure, Linolsäure, Linolensäure, Ölsäure und Undecylensäure zugegeben. Mittels Durchflusszytometrie wurden die Ausprägung des Oberflächenmarkers CD86 und die Vitalität der Zellen gemessen. Zum Vergleich des sensibilisierenden Potenzials dient die mittlere effektive Konzentration ($EC_{50}$). Arachidonsäure, Linolsäure, Linolensäure und Ölsäure benötigten die geringsten Konzentrationen zur Induktion von CD86 ($EC_{50}$: 2-10 µmol/L), gefolgt von Undecylensäure ($EC_{50}$: 247 µmol/L). Octinol und Maleinsäure induzierten CD86 erst bei hohen Konzentrationen ($EC_{50}$: 1002 bzw. 1983 µmol/L). Bei Bernsteinsäure und Fumarsäure konnte kein signifikanter und reproduzierbarer Anstieg von CD86 beobachtet werden. Die Untersuchung von Squalen war aufgrund mangelnder Löslichkeit im Medium der Kokultur nicht möglich. Es liegen keine sonstigen Hinweise auf kontaktallergisches Sensibilisierungspotenzial durch Arachidonsäure, Linolsäure, Linolensäure und Ölsäure vor, so dass von falsch-positiven Ergebnissen im LCSA ausgegangen wird. Die immunmodulierende Wirkung von ungesättigten Fettsäuren ist bekannt und basiert vermutlich auf der Umwandlung in Eicosanoide, der Veränderung der Zellmembranen, sowie der Beeinflussung der Genexpression durch Peroxisom-Proliferator-aktivierte Rezeptoren (PPAR). Wenn nur Substanzen mit einem $EC_{50}$ unter 1000 µmol/L als positive Ergebnisse gewertet werden, stimmen die Ergebnisse bis auf die ungesättigten Fettsäuren mit denen im Guinea Pig Maximization Test (GPMT) überein. Die Ergebnisse aus dem LLNA für die ungesättigten Fettsäuren einschließlich

Undecylensäure, sowie Bernsteinsäure und Fumarsäure sind vergleichbar. Während Octinol und Maleinsäure im LLNA eine deutliche Reaktion der Lymphknoten auslösten, konnte im LCSA keine vergleichbare Wirkung gezeigt werden. Da diese Substanzen auch im GPMT negativ waren, handelt es sich hierbei vermutlich um falsch-positive Ergebnisse des LLNA. Insgesamt erweist sich der LCSA als zuverlässige Methode, so dass eine weitere Evaluation der Tauglichkeit als Sensibilisierungstest angestrebt werden sollte.


**Abstract**

Identification of skin sensitizers has traditionally been performed using animal-based methods like the murine local lymph node assay (LLNA). The recent movement away from animal models for toxicological research has led to the development of a multitude of *in vitro* methods. This research project has studied unsaturated compounds using the loose-fit coculture-based sensitization assay (LCSA), an assay based on a combination of keratinocytes and dendritic cells, in order to assess the performance of the test method. After establishing the coculture, the substances fumaric acid, maleic acid, octinol, squalene, succinic acid, as well as the unsaturated fatty acids arachidonic acid, linoleic acid, linolenic acid, oleic acid, and undecylenic acid were added. The expression of the surface marker CD86 and the cell vitality were measured using flow cytometry. The sensitizing potentials were compared using the half maximal effective concentrations ($EC_{50}$). Arachidonic acid, linoleic acid, linolenic acid, and oleic acid induced expression of CD86 at the lowest concentrations ($EC_{50}$: 2-10 µmol/L), followed by undecylenic acid ($EC_{50}$: 247 µmol/L). Octinol and maleic acid stimulated CD86 only at higher concentrations ($EC_{50}$: 1002 and 1983 µmol/L, respectively). Fumaric acid and succinic acid did not induce a significant and reproducible induction of CD86. Squalene was not soluable in the medium. Arachidonic acid, linoleic acid, linolenic acid and oleic acid appear to produce false-positive results, considering that there are no reports of sensitizations. Unsaturated fatty acids have known immunomodulating properties, thought to involve conversion into eicosanoids, modulation of the cellular membranes, as well as effects on the gene expression through peroxisome proliferator-activated receptors (PPAR). The results of the LCSA are compatible with those obtained by the

guinea pig maximization test (GPMT), except for oleic acid, if only substances achieving an $EC_{50}$ below 1000 µmol/L are considered to be positive. The LLNA, on the other hand, demonstrated results similar to those in the LCSA for the unsaturated fatty acids, as well as fumaric acid and succinic acid. Maleic acid and octinol, however, led to high stimulation indices in the LLNA, but no comparable effects in the LCSA. Considering that these two substances were also negative in the GPMT, the results of the LLNA might be false-positives. Overall, the LCSA appears to be a reliable method, warranting further evaluation of its performance as a sensitization assay.

# 2 Einleitung

## 2.1 Überblick

Die Risikobewertung von Chemikalien in der Europäischen Union (EU) ist gegenwärtig durch die Beschränkung von Tierversuchen für Kosmetika von Umwälzungen betroffen (Europäische Union 2003, 2006 und 2009). Während mehrere alternative Methoden ohne Tierversuche zurzeit einem Verfahren zur Anerkennung von Seiten des European Centre for the Validation of Alternative Methods (ECVAM) unterzogen werden (Aeby et al. 2010), existiert gegenwärtig noch keine Referenzmethode ohne Verwendung von Versuchstieren (Pauwels und Rogiers 2010).

Für die Einschätzung des Sensibilisierungspotenzials wird ein integrierter Ansatz aus verschiedenen Methoden von unterschiedlicher Seite befürwortet (Jowsey et al. 2006; Basketter und Kimber 2009; Natsch et al. 2009). Neben der Zuverlässigkeit der Testmethoden ist daher auch die Erforschung ihres jeweiligen geeigneten Anwendungsbereichs von Interesse (Casati et al. 2009). Zum Beispiel ist der Local Lymph Node Assay (LLNA), der bisher als Goldstandard zur Einschätzung von kontaktallergischem Sensibilisierungspotenzial verwendet wurde, nicht bei allen Substanzgruppen gleich zuverlässig (Kreiling et al. 2008; Basketter et al. 2009; Anderson et al. 2011; Ball et al. 2011). So ist die Frage aufgeworfen worden, ob der LLNA bei ungesättigten Verbindungen zu einer erhöhten Rate von falsch-positiven Ergebnissen neigt (Kreiling et al. 2008).

Vor dem Hintergrund der oben genannten EU-Gesetze ist in den letzten Jahren eine Vielzahl von alternativen Methoden ohne Tierversuche entwickelt worden (Vandebriel und Van Loveren 2011). Diese können in drei verschiedene Gruppen unterteilt werden: *in silico*-, *in chemico*- und *in vitro*-Methoden (siehe Abschnitt 2.5.2).

Der an unserem Institut entwickelte „Loose-fit coculture-based sensitization assay“ (LCSA) basiert auf einer *in vitro*-Kokultur von primären humanen Keratinozyten und einer Art von Zellen, die als „dendritic cell-related cells“ (DCrC) bezeichnet werden (Schreiner et al. 2007). Im Folgenden sollen die Hintergründe erläutert werden, vor

denen die Untersuchung von ungesättigten Verbindungen mit dieser Methode stattfindet. Dazu werden zuerst die Grundlagen toxikologischer Forschung und ihre Bedeutung für das vorliegende Thema dargestellt. Darauf folgen eine Zusammenfassung der Bedeutung der allergischen Kontaktdermatitis, ein Überblick über Methoden der Risikobewertung für kontaktallergische Sensibilisierung und schließlich die Hintergründe der vorliegenden Untersuchung.

## 2.2 Toxikologische Forschung am Beispiel der allergischen Kontaktdermatitis

Analog zur medizinischen Praxis spielt das Prinzip des *primum non nocere* auch eine wichtige Rolle in der Toxikologie (Smith 2005). Potenzielle schädliche Wirkungen in Form von kontaktallergischer Sensibilisierung können mit Mitteln der Toxikologie eingeschätzt werden (Basketter 2008). Im Folgenden sollen einige Grundbegriffe eingeführt werden, die für die vorliegende Arbeit von Bedeutung sind.

Eine Exposition ist der physische Kontakt des Organismus mit der betreffenden Substanz. Dabei wird die Wirkung auf den Organismus von einer Reihe von Faktoren beeinflusst. Für das Risiko einer kontaktallergischen Sensibilisierung spielt neben dem Sensibilisierungspotenzial der Substanz insbesondere die Expositionshäufigkeit eine Rolle (Basketter et al. 2006). Jedoch kann nicht jede Substanz eine allergische Kontaktdermatitis hervorrufen. In der Regel handelt es sich bei Kontaktallergenen um niedermolekulare Verbindungen, die mit Molekülen in der Haut sogenannte „Hapten-Protein-Komplexe“ bilden (Simonsson et al. 2011). Damit eine Sensibilisierung zustande kommt, müssen sowohl das angeborene, als auch das adaptive Immunsystem aktiviert werden (Martin et al. 2011). Das Krankheitsbild der allergischen Kontaktdermatitis tritt erst dann klinisch in Erscheinung, wenn das adaptive Immunsystem sensibilisiert worden ist und bei erneutem Antigenkontakt zu einer T-Zell-basierten Entzündungsreaktion führt (Vocanson et al. 2009).

Für die Identifikation und Kategorisierung von Kontaktallergenen werden unter anderem Tierversuchsmethoden wie der LLNA, klinisch-epidemiologische Studien und *in vitro*-Zellkulturmethoden eingesetzt (Thyssen et al. 2012a und 2012b).

Die Erforschung von Sensibilisierungspotenzial an menschlichen Probanden, zum Beispiel in Form des sogenannten „Human repeated insult patch test“, beinhaltet zwangsläufig ein gesundheitliches Risiko. Daher werden diese Untersuchungen nur für bestimmte Fragestellungen eingesetzt (siehe unten, Abschnitt 2.5.1). Im Bereich von klinisch-epidemiologischen Untersuchungen kann auf Fallberichte (Anguita et al. 2002), Screening-Untersuchungen (Geier et al. 2003; Jowsey 2007) oder zurückliegende experimentelle Humanstudien (Kligman 1966) zurückgegriffen werden. *In vitro*- und andere alternative Testverfahren werden im Abschnitt 2.5 weiter unten beschrieben.

Fortschritte in der Toxikologie spielen sich auf der deskriptiven, mechanistischen und regulatorischen Ebene ab (Jonker et al. 2004). Das Zusammenspiel dieser drei Ebenen kann anhand der Auswirkungen der jüngsten Gesetzgebung illustriert werden (Europäische Union 2003, 2006 und 2009): Durch die gesetzlich verankerte Stärkung des Tierschutzes sind Toxikologen aufgefordert, einen Weg zu finden, ohne Tierversuche eine zuverlässige Risikobewertung durchzuführen. Zu diesem Zweck wird die Erforschung der Mechanismen von kontaktallergischer Sensibilisierung vorangetrieben. Fortschritte im Verständnis dieses Prozesses erlauben die Entwicklung von Versuchsmethoden, in denen die Auswirkung von Testsubstanzen auf relevante Schritte der Sensibilisierung beobachtet wird (Pauwels und Rogiers 2010).

## 2.3 Allergische Kontaktdermatitis

Die allergische Kontaktdermatitis ist eine entzündliche Hauterkrankung, welche durch Kontakt mit einer sensibilisierenden Substanz zustande kommen kann. Es existieren mehrere Tausend Kontaktallergene, die in verschiedenen Bereichen des täglichen Lebens vorkommen (Martin 2011). Sowohl im beruflichen als auch privaten Umfeld kann es zu Sensibilisierung und Krankheitsauslösung kommen (Thyssen et al. 2007;

Skudlic et al. 2011). In einigen Fällen führt dies zur Anerkennung einer Berufskrankheit (BGB 2009).

In der Vergangenheit ist es wiederholt zu Epidemien (im weiteren, nicht streng infektiologischen Sinn) gekommen, die zum Teil auch heute noch anhalten, zum Beispiel Nickelallergie. Dem Auftreten der ersten Fälle, die sich meist im Kontext beruflicher Exposition ereignen, geht eine Latenzzeit voraus. Eine frühzeitige Reaktion auf solche Epidemien ist häufig nicht möglich aufgrund des verzögerten Erkennens und Handelns durch die entsprechenden staatlichen Institutionen (Thyssen et al. 2007a).

Die allergische Kontaktdermatitis zählt zu den zellvermittelten Überempfindlichkeitsreaktionen vom Spättyp, auch bekannt als Typ IV nach Coombs und Gell (Rajan 2003). Das klinische Bild kann viele Formen einer entzündlichen Hautreaktion annehmen. Erythem, Papeln, Bläschen, Exsudate und Hauttrockenheit werden beschrieben. Der Verlauf kann grob in eine akute und eine chronische Form eingeteilt werden, die sich in den Symptomen und den histologischen Veränderungen unterscheiden können (Brasch et al. 2007).

Es gibt Hinweise, dass die Anfälligkeit für die Entwicklung einer Kontaktsensibilisierung durch genetische Polymorphismen beeinflusst wird (Schnuch 2011). Eine besondere Variante der Krankheit ist die sogenannte „Polysensibilisierung“. Sie liegt vor, wenn eine Überempfindlichkeit auf mindestens drei verschiedene Allergene besteht. Polymorphismen von Tumornekrosefaktor-α und Interleukin-(IL-)16 liegen dieser erhöhten Bereitschaft zur Ausbildung der Krankheit zu Grunde (Schnuch et al. 2008).

Eine einmal stattgefundene Sensibilisierung besteht für den Rest des Lebens und kann nicht mehr rückgängig gemacht werden. Das ärztliche Vorgehen beschränkt sich daher auf eine symptomatische Behandlung und Vermeidung von Wiederauftreten und Progression der Krankheit. Die zentrale Maßnahme für den Arzt, den Patienten und gegebenenfalls den Arbeitgeber ist die Expositionsprophylaxe. Diese erfolgt bevorzugt durch Entfernen des Auslösers; technisch-organisatorische Maßnahmen oder persönliche Schutzausrüstung kommen erst in zweiter Linie zum Zug. Die Vermeidung des Allergens kann in der Regel die Symptome lindern und einem erneuten Auftreten der Krankheit entgegenwirken (Nicholson et al. 2010).

**Tabelle 2-1.** Häufig vorkommende Kontaktallergien und ihre Prävalenz (Schäfer et al. 2001; Thyssen et al. 2007b).

| | |
|---|---|
| Duftstoff-Mix | 15,9 % |
| Nickel | 8,6-13,1 % |
| Thiomersal | 4,7 % |
| Peru-Balsam | 3,8 % |

Die allergische Kontaktdermatitis ist eine weit verbreitete Krankheit. Zwischen 12 und 40 % der Bevölkerung weisen eine Sensibilisierung auf mindestens ein Allergen auf (Schäfer et al. 2001; Thyssen et al. 2007b). Die häufigsten Auslöser von Kontaktallergien sind Nickel, Thiomersal und Komponenten von Duftstoffen, welche Teil des sogenannten „Duftstoff-Mix“ sind (siehe Tabelle 2-1). Die verbreitetsten Auslöser einer beruflich verursachten allergischen Kontaktdermatitis sind in Tabelle 2-2 aufgeführt. Die Zahl der Chemikalien mit kontaktallergischen Eigenschaften ist auf 2 800 geschätzt worden (Beltrani und Beltrani 1997) und wächst unter anderem aufgrund von Innovationen der chemischen Industrie sowie Veränderungen des Lebensstandards (Lunder und Kansky 2000).

**Tabelle 2-2.** Häufige Auslöser von beruflich bedingten Kontaktallergien (Nicholson et al. 2010).

| | |
|---|---|
| Acrylfarben | Chromate |
| Duftstoffe | Epoxide |
| Epoxidharze | Kobalt |
| Konservierungsstoffe | Kosmetika |
| Nickel | Pflanzen |

Eine Reihe von Faktoren trägt zur Entstehung der allergischen Kontaktdermatitis bei (siehe Tabelle 2-3). Verschiedene Studien beschäftigen sich mit dem Einfluss von Expositionsfaktoren (Basketter et al. 2006), Hauterkrankungen (Niebuhr et al. 2011) und genetischer Disposition (Schnuch 2011; Schnuch et al. 2011b).

**Tabelle 2-3.** Faktoren mit Einfluss auf die Sensibilisierung (Boukhman und Maibach 2001).

| Allergen-spezifisch | Allergen-unabhängig |
|---|---|
| Hydrophilie / Hydrophobie<br>Sensibilisierungspotenzial | Anatomische Lokalisation<br>Dosis<br>Exponierte Oberfläche<br>Expositionshäufigkeit<br>Hautbarriere<br>(Beschaffenheit, Zustand)<br>Konzentration an der Hautoberfläche<br>Okklusion<br>Trägersubstanz |

Zusammenfassend handelt es sich bei der allergischen Kontaktdermatitis um eine weit verbreitete entzündliche Hauterkrankung, die nach Sensibilisierung durch ein Allergen auftritt. Die Krankheit kann akut oder chronisch verlaufen und wird in ihrer Entstehung durch viele verschiedene Faktoren bedingt. Die wichtigste Maßnahme ist die Prävention. Die Grundlage dafür bilden die Identifikation und Kategorisierung der Kontaktallergene.

### 2.3.1 Pathogenese

Bevor die verschiedenen Methoden zur Untersuchung des Sensibilisierungspotenzials von Substanzen vorgestellt werden, soll noch etwas detaillierter auf die Entstehung der allergischen Kontaktdermatitis eingegangen werden.

Die Pathogenese der allergischen Kontaktdermatitis kann grundsätzlich in zwei Phasen unterteilt werden: eine Sensibilisierungs- und eine Auslösungsphase, die auch als afferente und efferente Phase bezeichnet werden (Saint-Mezard et al. 2003). Bei Kontaktallergenen handelt es sich um Substanzen mit niedrigem Molekulargewicht, die als „Haptene“ bezeichnet werden. Sie können alleine keine Immunreaktion bewirken. Erst durch eine Verbindung mit Molekülen der Haut sind sie in der Lage, eine

Sensibilisierung auszulösen (Simonsson et al. 2011). Eine Reihe von Faktoren beeinflusst den Prozess der Sensibilisierung (siehe Tabelle 2-3).

Der Ablauf der Sensibilisierung lässt sich in fünf Schritte unterteilen:

1. Zuerst muss ein Hapten die äußerste Hautschicht, das Stratum corneum überwinden. Der Grad, in dem ihm das gelingt, wird im Englischen als „epidermal disposition“ bezeichnet und hängt unter anderem von Molekulargewicht und Löslichkeit der Substanz in polaren und apolaren Lösungsmitteln ab (Basketter et al. 2007; Davies et al. 2011).

2. Daraufhin erfolgt eine Bindung an körpereigene Proteine; der Hapten-Protein-Komplex entsteht. Der genaue Mechanismus unterscheidet sich nach Art der Kontaktallergene. Im Falle von Nickel, einem der häufigsten Kontaktallergene in Industrienationen (siehe oben), erfolgt die Haptenisierung auf mehreren unterschiedlichen Wegen (Thierse et al. 2005). Die Keratinozyten und das von ihnen gebildete Keratin scheinen eine zentrale Rolle bei der Bildung des Hapten-Protein-Komplexes zu spielen (Simonsson et al. 2011).

3. Die Keratinozyten reagieren auf den Hapten-Protein-Komplex mit der Freisetzung verschiedener Zytokine. Diese beeinflussen die antigen-präsentierenden Zellen des Immunsystems (Lebre et al. 2003).

4. Dermale dendritische und Langerhans-Zellen sind professionelle antigenpräsentierende Zellen der Haut. Bei Kontakt mit einem Allergen verändern sie das Expressionsmuster von Oberflächenmolekülen sowie Zytokinen und migrieren in die lokalen Lymphknoten (Ryan et al. 2007).

5. Im letzten Schritt der Sensibilisierungsphase wird das prozessierte Allergen spezifischen T-Zellen im Lymphknoten präsentiert, die daraufhin proliferieren und zu Effektorzellen heranreifen. Erst vor wenigen Jahren konnte gezeigt werden, dass sogenannte dermale dendritische Zellen und nicht, wie vorher angenommen, Langerhanszellen hierfür verantwortlich sind (Fukunaga et al. 2008). Bei erneutem Allergenkontakt orchestrieren die antigenspezifischen Effektorzellen dann die Immunantwort (Nestle et al. 2009).

Die zentrale Rolle in der Auslösungsphase scheint den CD8-positiven zytotoxischen T-Zellen zuzufallen. Sie können eine allergische Kontaktdermatitis auch ohne die Beteiligung von CD4-positiven T-Helfer-Zellen hervorrufen. Ein wichtiger Bestandteil dieses Mechanismus ist die Fähigkeit der CD8-positiven T-Zellen, die Apoptose der Keratinozyten auszulösen (Kehren et al. 1999).

Des Weiteren existieren Substanzen, die erst durch metabolische oder auto-oxidative Veränderungen zu Haptenen werden (sogenannte „Pro- bzw. Prähaptene“). Erstere benötigen dazu die Metabolisierung durch dermale Cytochrom-P450-Enzyme (Bergström et al. 2007). Im Falle des Prähaptens *p*-Phenylendiamin führt Auto-Oxidation zur Bildung reaktiver Metabolite (Pot et al. 2013).

## 2.4 Methoden der Risikobewertung – die regulatorischen Rahmenbedingungen

Da eine einmal erworbene kontaktallergische Sensibilisierung in der Regel lebenslang anhält und keine Heilung möglich ist, stellt Prävention die wichtigste Maßnahme dar, um die Verbreitung der Krankheit einzudämmen. Dies geschieht durch Beschränkungen des Einsatzes sensibilisierender Substanzen bis hin zu deren Verbot (Thyssen et al. 2007a; Basketter 2008; Lu et al. 2009).

An einem solchen Prozess sind Verbraucher, Hersteller, Gesetzgeber und Wissenschaftler beteiligt. Der Prozess der Gesetzgebung und seine Resultate unterscheiden sich in verschiedenen Ländern bzw. Regionen und verändern sich im Laufe der Zeit, wie an den unterschiedlichen Entwicklungen in den USA und der EU beobachtet werden kann (Löfstedt und Vogel 2001).

Bei diesem Prozess kann es zu Spannungen zwischen den Parteien kommen, wie Probleme bei der Kommunikation von festgestellten Risiken (Ropeik 2011; Wallace 2011) und Schwierigkeiten bei der Umsetzung neuer Gesetzesinitiativen belegen (Pauwels und Rogiers 2010; Schnuch et al. 2011a).

Für die Bewertung von kontaktallergischem Potenzial haben Meerschweinchentests wie der „Bühler-Test“ oder der „Guinea Pig Maximization Test“ (GPMT) viele Jahre die Methoden der Wahl dargestellt (Maurer 2007). Der an Mäusen durchgeführte „Local Lymph Node Assay“ (LLNA) bietet die Möglichkeit der Quantifizierung der kontaktallergischen Potenz und ist weniger belastend für die Versuchstiere. Seit dem Jahr 2002 ist der LLNA Bestandteil der Richtlinien der OECD für die Identifikation von Kontaktallergenen (Angers-Lostau et al. 2011). Seit 2010 unterstützt die OECD den LLNA als eigenständige Methode, einschließlich einer reduzierten Variante, dem sogenannten „rLLNA“ (OECD 2010; Anderson et al. 2011).

Durch die Gesetzgebung der EU wird der Tierschutz weiter ausgedehnt, so dass die Verwendung von Tierversuchen für die Risikobewertung von Inhaltsstoffen von Kosmetika beendet werden soll (Pauwels und Rogiers 2010).

## 2.5 Strategien zur Identifikation von Kontaktallergenen

Eine Vielzahl von Strategien zur Identifikation von Kontaktallergenen ist verfügbar, die sich auf eine stetig wachsende Zahl von Testsystemen stützen können. Eine Reihe von Übersichtsartikeln erläutert die verschiedenen Methoden und ihre Unterschiede im Detail (Basketter 2007; Vandebriel und Van Loveren 2010; Peiser et al. 2012; Thyssen et al. 2012a und 2012b). Die wichtigsten Testsysteme sollen im Folgenden vorgestellt werden.

### 2.5.1 *In vivo*-Methoden

Untersuchungen an freiwilligen menschlichen Probanden haben verschiedene Vorteile. Sie unterliegen weniger Limitierungen als Tier- oder *in vitro*-Verfahren, zum Beispiel hinsichtlich der Löslichkeit von Testsubstanzen oder der Übertragbarkeit der Resultate, und können zur Aufklärung von verbleibenden Unsicherheiten beitragen (Basketter 2009). Beispiele für solche Tests sind der „Human Repeated Insult Patch Test“ und der

„Human Maximization Test“ (Zaghi und Maibach 2009). Ihr Einsatz ist jedoch aus ethischen Gründen eingeschränkt. Das Risiko einer Sensibilisierung mit allen damit verbundenen gesundheitlichen Folgen und Kosten verhindert den routinemäßigen Einsatz. Jedoch kann die Anwendung dieser Methoden dabei helfen, verbleibende Unklarheiten über Sensibilisierungsrisiken zu beseitigen, die nach der Anwendung anderer Verfahren noch bestehen (Basketter 2009).

Die wichtigsten Tiermodelle für die Untersuchung von Chemikalien mit möglichem Sensibilisierungspotenzial sind der „Bühler-Test“, der „Guinea Pig Maximization Test“ (GPMT) und der „Local Lymph Node Assay“ (LLNA). Die ersten beiden werden an Meerschweinchen durchgeführt und bestehen aus einer Sensibilisierungs- und einer Auslösungsbehandlung mit der Testsubstanz. Daraufhin wird die beobachtete Hautreaktion qualitativ erfasst (Maurer 2007). Der LLNA ist eine jüngere Methode zur Identifikation von Kontaktallergenen, die an Mäusen durchgeführt wird (Kimber und Weisenberger 1989). Im Unterschied zu den anderen beiden Testsystemen erfasst der LLNA nur die Sensibilisierungsphase. Als Messwert dient die Proliferation der Zellen im Lymphknoten. Die Vorteile dieser Methode bestehen in der Quantifizierung der Ergebnisse und der geringeren Belastung der Versuchstiere. Die Ergebnisse können anhand der Konzentrationen verglichen werden, die zu einer Proliferation der Lymphknotenzellen auf das Dreifache der Nullkontrolle führen (Gerberick et al. 2007).

Der LLNA wurde ausführlich evaluiert (Kimber et al. 1995; Dean et al. 2001) und in die Richtlinien der OECD für Sensibilisierungstests aufgenommen (OECD 1992a). Er hat den Bühler-Test und den GPMT als Methoden der Wahl weitgehend abgelöst (Cockshott et al. 2006). Er gilt nach wie vor als Goldstandard für die Kategorisierung von Chemikalien mit Sensibilisierungspotenzial. Er wird als Standardtest oder in modifizierter Form angewendet (Angers-Lostau et al. 2011). Jedoch haben die Entwicklungen der letzten Jahre eine Abkehr von Versuchen im Tiermodell eingeleitet (siehe oben). Außerdem wurden mögliche Limitationen des LLNA diskutiert. Verschiedene Substanzen erzielen im LLNA Ergebnisse, die offenbar als „falsch-positiv“ zu bewerten sind (Vohr und Ahr 2005; Basketter und Kimber, 2007; Basketter et al. 1998; Kreiling et al. 2008). Eine Reihe von Ansätzen versucht dieses Problem durch

Modifikation des ursprünglichen Protokolls zu überwinden (Homey et al. 1998; Gerberick et al. 1999; Ehling et al. 2005a und 2005b).

### 2.5.2 Alternativmethoden ohne Tierversuche

#### *2.5.2.1 Zellbasierte in vitro-Methoden*

Es existiert eine Vielzahl von zellbasierten *in vitro*-Methoden, die an verschiedenen Stellen des pathogenetischen Prozesses ansetzen. Die meisten von ihnen verwenden einen einzigen Zelltyp, das heißt Keratinozyten, dendritische Zellen oder T-Zellen. Sowohl Primärzellen, als auch Zelllinien kommen zur Anwendung (Vandebriel et al. 2005; Ryan et al. 2007; Dos Santos et al. 2009).

Verschiedene Endpunkte sind für die *in vitro*-Identifikation und -Kategorisierung von Kontaktallergenen vorgeschlagen worden. Dazu gehört eine Reihe von Zelloberflächenmolekülen, von denen insbesondere CD86 (CD=„cluster of differentiation“) als Aktivierungsmarker von dendritischen Zellen hervorzuheben ist (Ashikaga et al. 2002). Der Kontakt von Hautzellen mit Kontaktallergenen bewirkt des Weiteren eine Änderung ihrer Zytokinsekretion. Diese kann *in vitro* gemessen werden (Corsini et al. 2009). Ein weiterer Ansatz besteht in der Analyse der Genexpression (Johansson et al. 2011).

Des Weiteren sind Methoden vorgeschlagen worden, die die Reaktion von T-Zellen auf Antigene erfassen. Untersuchungen in den 1990er Jahren konnten bereits hochpotente Kontaktallergene als solche identifizieren. Die Erkennung von weniger potenten Allergenen war jedoch problematisch (Krasteva et al. 1996; Rougier et al. 2000). Die Sensitivität kann mittlerweile durch die Entfernung von regulatorischen T-Zellen aus dem Versuchsaufbau verbessert werden. Als Endpunkt wird entweder die Proliferation der T-Zellen oder die Veränderung von Oberflächenmarkern, zum Beispiel CD137 oder CD154, verwendet (Martin et al. 2010).

Eine weitere Modifikation des *in vitro*-Ansatzes besteht in der Verwendung von artifiziellen Hautmodellen des *Stratum corneum*, zum Beispiel in Kombination mit einer

Keratinozytenkultur. Dies erlaubt die Berücksichtigung der Barrierefunktion der Haut im Versuchsaufbau (Dos Santos et al. 2011). Für die Verwendung von *ex vivo*-Hautbiopsaten ist ebenfalls ein Verfahren entwickelt worden (Lehé et al. 2006).

#### *2.5.2.2 In silico-Methoden*

Computergestützte *in silico*-Testsysteme versuchen mittels verschiedener Berechnungsansätze das Sensibilisierungspotenzial einer Substanz auf Grundlage ihrer chemischen Struktur vorherzusagen. Es handelt sich hierbei um die Untersuchung von quantitativen Struktur-Aktivitäts-Beziehungen (englisch: „quantitative structure-activity relationships“ - QSAR). QSAR-Systeme basieren auf verschiedenen chemischen Reaktionsmechanismen, darunter (pro-)Michael-Akzeptoren, Schiffbasen-Bildung oder Acetylierung. (Patlewicz et al. 2007; Demchuk et al. 2011).

#### *2.5.2.3 In chemico-Methoden*

Die sogenannten *in chemico*-Verfahren untersuchen Kontaktallergene auf Basis ihrer Fähigkeit zur Bildung von Hapten-Protein-Komplexen (Roberts und Aptula 2008). Im Gegensatz zu den computergestützten *in silico*-Modellen wird die Bindungsfähigkeit experimentell über die Bindung der Testsubstanzen mit Glutathion, Cystein oder Lysin gemessen. Beim Einsatz des „direct peptide reactivity assay“ bestand ein hoher Grad an Übereinstimmung mit dem LLNA (Gerberick et al. 2004).

### 2.5.3 Beispiele für Testmethoden

Eine Auswahl von *in vitro*- und *in chemico*-Methoden, die bereits ausführlicher untersucht worden sind, soll hier stellvertretend vorgestellt werden (Bauch et al. 2011):

- Der „Myeloid U-937 Skin Sensitization Test“ (MUSST) basiert auf einer humanen monozytischen Leukämie-Zelllinie. An diesen Zellen wird die Stimulation der

Expression von CD86, sowie eventuell IL-1ß und IL-8 durch Fremdstoffe gemessen (Python et al. 2007).

- Der „human Cell Line Activation Test“ (h-CLAT) verwendet eine andere humane monozytische Leukämie-Zelllinie namens THP-1 und untersucht die Auswirkung von Kontaktallergenen auf CD54 und CD86 (Sakaguchi et al. 2010).
- Der „KeratinoSens“-Assay analysiert mittels eines Reportergens in einer Keratinozytenzelllinie, basierend auf der HaCaT-Zelllinie, die zelluläre Reaktion auf oxidativen Stress (Natsch et al. 2011).
- Der „Direct Peptide Reactivity Assay“ (DPRA) quantifiziert den Abbau von Glutathion, Cystein und Lysin durch die Reaktion mit den Testsubstanzen. (Gerberick et al. 2004).

## 2.6 Der LCSA

Der an unserem Institut entwickelte „Loose-fit coculture-based sensitization assay“ (LCSA) ist eine zellbasierte *in vitro*-Methode, die sich durch die Kombination von primären Keratinozyten und einer Art dendritischen Zellen auszeichnet. Dendritische Zellen (genauer: dermale dendritische Zellen bzw. Langerhanszellen; siehe oben) übernehmen eine Schlüsselrolle bei der Sensibilisierung, indem sie das verarbeitete Allergen zum Lymphknoten transportieren und den T-Zellen präsentieren. Für die Erkennung von Kontaktallergenen sind sie jedoch auf die Interaktion mit Keratinozyten angewiesen. Sie sind der zahlreichste Zelltyp der Epidermis und erfüllen wichtige immunologische Funktionen (Nestle et al. 2009). Die Keratinozyten sind an der Aktivierung von Prohaptenen durch ihren Metabolismus beteiligt (Merk et al. 2004) und können Zytokine als sogenannte „danger signals“ sezernieren, die damit die dendritischen Zellen und dadurch letztendlich auch die T-Zell-Antwort beeinflussen (Lebre et al. 2003). Die Kombination dieser beiden Zelltypen erlaubt somit eine Annäherung an die Komplexität der *in vivo*-Situation.

Der LCSA konnte in den bisherigen Versuchen eine kontaktallergische Induktion von CD86 bei steigenden Konzentrationen in nicht-zytotoxischen Bereichen zeigen.

Metallische Kontaktallergene wie Nickel und Cobalt zeigen dabei zwar keine eindeutige Reaktion von CD86, jedoch einen signifikanten Anstieg der alternativen Endpunkte IL-6 und Chemokine (C-C motif) ligand 4 (CCL4, früher auch als „Macrophage Inflammatory Protein 1ß“ bezeichnet). Die im LCSA verwendeten sogenannten „dendritic cell-related cells“ (DCrC), die aus mononukleären Zellen des peripheren Blutes humaner Spender gewonnen werden, ähneln epidermalen Langerhanszellen in Morphologie und Funktion. Jedoch fehlen ihnen im Vergleich CD1a, CD1c und Langerin (Schreiner et al. 2008). Die mittlere effektive Konzentration ($EC_{50}$) für die Induktion von CD86 kann zur Kategorisierung der Sensibilisierungspotenz von Fremdstoffen verwendet werden (Wanner et al. 2010). Neben dem Sensibilisierungsmarker CD86 wird die Vitalität der dendritischen Zellen gemessen, da ein Zusammenhang zwischen sensibilisierender und irritativer Wirkung postuliert worden ist (Grabbe et al. 1996; Hulette et al. 2005). Die Fähigkeit einer Substanz zur Schädigung von Zellen wird als irritatives oder zytotoxisches Potenzial bezeichnet. Im LCSA wird sie mittels Nachweis einer nicht mehr funktionsfähigen Zellmembran durch Aufnahme von 7-Aminoactinomycin D (7-AAD) erfasst.

Ein dem LCSA ähnlicher Versuchsaufbau basiert auf Zellen der THP-1-Zelllinie und Keratinozyten, die in getrennten Kompartimenten kultiviert werden (Cao et al. 2012). Auch hier zeigt sich, wie beim LCSA, dass der Anstieg der Zelloberflächenmarker bei noch nicht toxischen Konzentrationen stattfindet und Prohaptene korrekt erkannt werden.

Der LCSA wurde bisher an einer Auswahl von Substanzen erprobt und reagiert auf das Prähapten *p*-Phenylendiamin (PPD) (Schreiner et al. 2007) und das Prohapten Isoeugenol (Schreiner et al. 2008) mit einem Anstieg von CD86. Des Weiteren kann er Allergene von Irritanzien wie Natriumlaurylsulfat unterscheiden (Wanner et al. 2010). Eine Gruppe von Substanzen, die mutmaßlich zu falsch-positiven Ergebnissen bei Kontaktsensibilisierungstests führen kann, ist die der ungesättigten Verbindungen. Der Vergleich einer Reihe solcher Substanzen im LLNA und GPMT ergibt eine höhere Zahl positiver Testergebnisse im LLNA. Dies ist als mangelnde Spezifität des LLNA in dieser Substanzklasse interpretiert worden (Kreiling et al. 2008). Eine mögliche Erklärung dafür ist die Reaktionsfreudigkeit von ungesättigten Verbindungen. Die nur im LLNA

positiven Substanzen könnten durch mangelhafte Unterscheidung zwischen Sensibilisierung und Irritation erklärt werden (Vohr und Ahr 2005).

Der LCSA konnte bereits das anionische Tensid Natriumlaurylsulfat korrekt als irritierend, aber nicht sensibilisierend klassifizieren, während der LLNA hier zu einem falsch-positiven Ergebnis kommt (Montelius et al. 1994). Im Folgenden soll untersucht werden, welche Resultate die Untersuchung von ungesättigten Verbindungen im LCSA vor dem Hintergrund der Ergebnisse mit anderen Testmethoden ergibt.

# 3 Material und Methoden

## 3.1 Testsubstanzen

Als Testsubstanzen werden nach Möglichkeit die gleichen Präparate wie in der Studie von Kreiling et al. (2008) verwendet. In manchen Fällen müssen die Substanzen mangels Verfügbarkeit von anderen Herstellern bezogen werden. In den Tabellen 3-1 und 3-2 sind die Testsubstanzen zusammen mit chemischer Formel, Hersteller, Reinheitsgrad und ihrer biologischen sowie toxikologischen Relevanz aufgeführt.

## 3.2 Primärzellen

### 3.2.1 Keratinozyten

Die Keratinozyten stammen aus Hautpräparaten von anonymen Spendern, die im Rahmen von Operationen erhalten wurden (Bauchdeckenstraffungen und Brustverkleinerungen). Die Präparate werden unter der Sicherheitswerkbank in einer Petrischale mittels Pinzette und Schere von anhaftendem Fettgewebe so gut wie möglich befreit und in ca. 2 cm x 0,5 cm große Stücke geschnitten. Dann werden sie wie ein Kamm eingeschnitten, so dass die Breite überall 1-2 mm beträgt. Zur Ablösung der Epidermis von der Dermis werden die Präparate in PBS mit Dispase I (Roche Diagnostics Deutschland GmbH, Mannheim) in einer Konzentration von 2 Einheiten pro mL für ca. 16 Stunden im Kühlschrank bei 4°C inkubiert.

Danach wird die Haut in eine große Petrischale gegeben. Die Epidermis, die dünner und stärker pigmentiert ist als die Dermis, wird mit einer Pinzette von den Präparaten abgelöst und in einem 50mL-Zentrifugenröhrchen mit ca. 5 mL PBS gesammelt. Das verbleibende Hautgewebe wird verworfen.

**Tabelle 3-1.** Chemische Charakterisierung der Testsubstanzen.

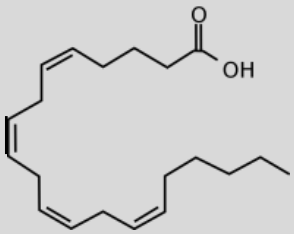
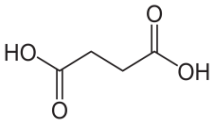
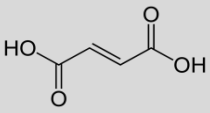
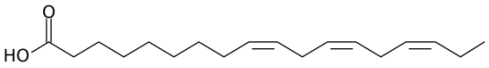
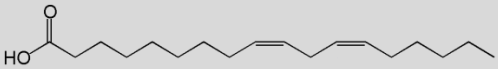
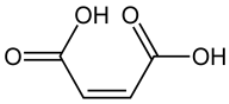
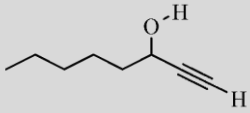
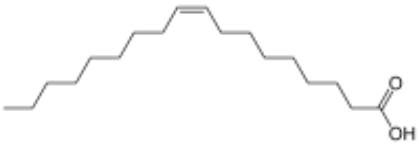
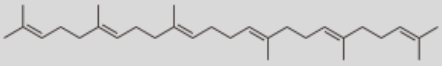
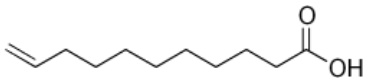
| Testsubstanz | CAS-Nr. | Molekular-gewicht (g/mol) | Sum-menfor-mel | Strukturformel |
|---|---|---|---|---|
| Arachidon-säure | 506-32-1 | 304,5 | $C_{20}H_{32}O_2$ |  |
| Bernstein-säure | 110-15-6 | 118,1 | $C_4H_6O_4$ |  |
| Fumarsäure | 110-17-8 | 116,1 | $C_4H_4O_4$ |  |
| Linolensäure | 463-40-1 | 278,4 | $C_{18}H_{30}O_2$ |  |
| Linolsäure | 60-33-3 | 280,5 | $C_{18}H_{32}O_2$ |  |
| Maleinsäure | 110-16-7 | 116,1 | $C_4H_4O_4$ |  |
| Octinol | 818-72-4 | 126,2 | $C_8H_{14}O$ |  |
| Ölsäure | 112-80-1 | 282,5 | $C_{18}H_{34}O_2$ |  |
| Squalen | 111-02-4 | 410,7 | $C_{30}H_{50}$ |  |
| Undecylen-säure | 112-38-9 | 184,3 | $C_{11}H_{20}O_2$ |  |

**Tabelle 3-2.** Herstellerangaben und Eigenschaften der Testsubstanzen.

| Testsubstanz | Hersteller | Katalog-nummer | Rein-heits-grad | Biologische Relevanz | Bemerkungen |
|---|---|---|---|---|---|
| Arachidon-säure | Sigma-Aldrich | A3555 | ≥ 99 % | Bestandteil von Zellmembranen, Entzündungs-mediator, „second messenger“ | Nahrungs-ergänzungsmittel, keine Risiken bekannt |
| Bernstein-säure | Sigma-Aldrich | S9512 | N/V | Zwischenprodukt von Citrat- und Harnstoffzyklus | Nahrungs-ergänzungsmittel, Arzneistoffträger, hautreizend, schädlich bei Augenkontakt |
| Fumarsäure | Sigma-Aldrich | 240745 | ≥ 99 % | Hautzellen, Citratzyklus, Behandlung von Psoriasis und Multiple Sklerose | Lebensmittel-zusatzstoff (Säureregulator), augenreizend |
| Linolensäure | Cayman Chemical | 90210 | ≥ 98 % | Essenzielle Fettsäure | Möglicherweise reizend für Haut, Augen und Atemwege |
| Linolsäure | Sigma-Aldrich | L1012 | ≥ 99 % | Essenzielle Fettsäure, Vorläufer von Arachidonsäure, Zellmembranen | Reizend |
| Maleinsäure | Fluka | 63180 | ≥ 99 % | Vorläufer von Fumarsäure | Reizend für Haut, Augen und Atemwege |
| Octinol | TCI | O0196 | ≥ 98 % | Unbekannt | Kosmetika, reizend für Haut und Augen |
| Ölsäure | Sigma-Aldrich | O1383 | ≥ 99 % | Fettgewebe | Arzneistoffträger, Emulgator bzw. Lösungsmittel für Inhalationen |
| Squalen | Sigma-Aldrich | S3626 | ≥ 98 % | Synthese von Cholesterol, Steroidhormonen und Vitamin D | Reizend |
| Undecylen-säure | Sigma-Aldrich | 124672 | 98 % | Topisches Antimykotikum | Reizend für Haut, Augen und Atemwege |

Die Epidermis wird je nach Menge auf mehrere 50mL-Zentrifugenröhrchen verteilt. In jedes dieser Röhrchen werden 20 mL TrypLE Express (Invitrogen Corporation, Carlsbad, CA, USA) und 100 µL Stammlösung DNAse mit einer Konzentration von 5 ng/mL (Roche) gegeben. Alle Röhrchen werden mit PBS auf ca. 50 mL aufgefüllt und für eine Stunde im Brutschrank bei 37°C und 5 % $CO_2$ inkubiert.

Vier neue 50mL-Zentrifugenröhrchen werden vorgelegt und passende 40 µm Cell Strainer (BD Becton Dickinson GmbH, Heidelberg) aufgesetzt. Die inkubierten Präparate werden aus dem Brutschrank genommen und der Inhalt der Röhrchen durch die Cell Strainer pipettiert, so dass eine Suspension aus einzelnen Zellen gewonnen wird. Die vier Zentrifugenröhrchen mit den suspendierten Keratinozyten werden nun mit PBS auf das gleiche Volumen aufgefüllt und für 4 Minuten bei 300 x g zentrifugiert. Dann wird der Überstand abgesaugt, die Zellen in je 20 mL PBS resuspendiert und in zwei der Röhrchen zusammengeführt. Zur Neutralisation der verbliebenen Enzyme (TrypLE und DNAse) werden je 5 mL steril filtriertes fetales Kälberserum (englisch: „fetal calf serum“ – FCS, Biochrom AG, Berlin) zugegeben. Dann werden die Röhrchen drei Mal hintereinander bei 300 x g 4 Minuten lang zentrifugiert, der Überstand abgesaugt und die Zellen resuspendiert. Die ersten beiden Male erfolgt die Resuspension in PBS, beim letzten Mal in 10 mL Keratinozyten-Wachstumsmedium („keratinocyte growth medium-2“ - KGM-2) (PromoCell GmbH, Heidelberg).

Zum Zählen wird nun ein Aliquot von 20 µL aus der Suspension entnommen und mit 20 µL Trypanblau 0,025 % (w/v) in PBS (Biochrom) vermischt. Davon werden 20 µL auf eine Neubauer-Zählkammer pipettiert (siehe Abbildung 3-1). Das Volumen in den vier gerasterten Quadranten beträgt zusammen 400 nL. Bei Zellen mit Membrandefekten färbt sich das Zytoplasma blau; diese werden nicht mitgezählt. Von der Anzahl an Zellen in der Zählkammer kann nun auf deren Anzahl in der Zellsuspension geschlossen werden.

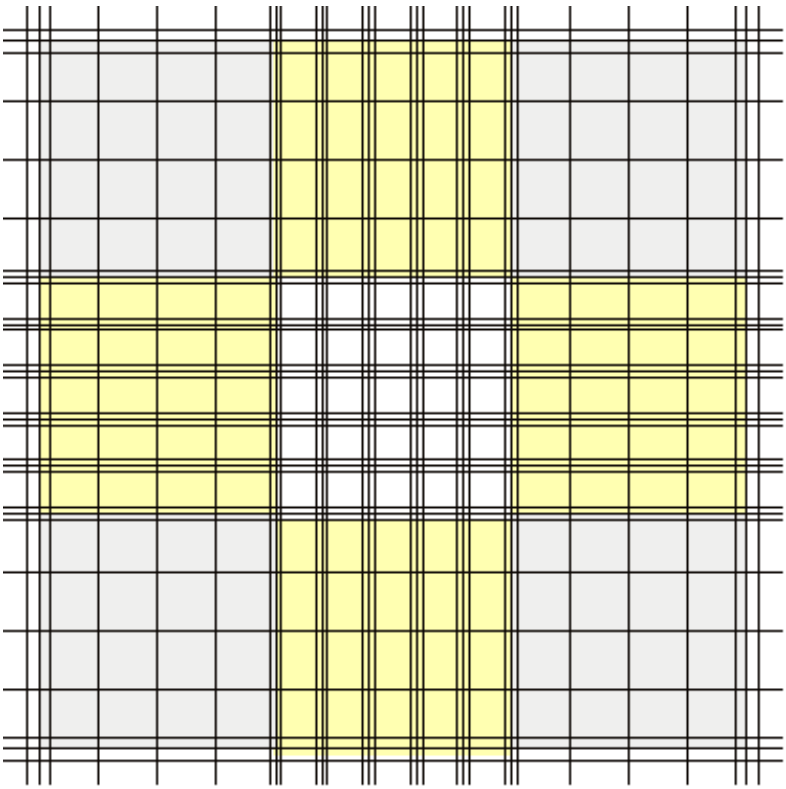


**Abbildung 3-1.** Neubauer Improved Zählkammer. Zum Zählen werden die jeweils 4 x 4 Quadrate in den vier Ecken dieses Schemas verwendet.

Anschließend werden die Zellen in Zellkulturflaschen (Corning Incorporation, Schiphol-Rijk, Niederlande) mit einer kalkulierten Dichte von $2 \times 10^5$ Zellen pro cm² ausgesäht und im Brutschrank bei 37°C und 5 % $CO_2$ bis zum nächsten Tag inkubiert. Das Medium mit eventuell vorhandenen Zellresten wird abgesaugt und durch frisches Medium ersetzt. Die Flaschen werden dann im Brutschrank inkubiert, bis sich eine konfluente Zellschicht auf dem Boden gebildet hat. Dies dauert in der Regel ein bis zwei Wochen. Dabei wird das Medium jeden zweiten Tag erneuert.

Zur Vorbereitung der Kryokonservierung wird in einem ersten Schritt das Medium aus den Flaschen abgesaugt. Der Boden der Gefäße wird mit je 20 mL PBS gespült und anschließend erneut abgesaugt. Anschließend werden die Zellen in 10 mL TrypLE je Flasche für 15 Minuten im Brutschrank bei 37°C und 5 % $CO_2$ inkubiert. Die Ablösung der Zellen wird im Umkehrmikroskop kontrolliert. Wenn ca. 90 % abgelöst sind, werden 5 mL steriles FCS in jede Flasche zugegeben, um die Aktivität von TrypLE zu stoppen. Die Zellsuspension wird in mehrere 50mL-Zentrifugenröhrchen übertragen. Nun werden

alle Röhrchen zentrifugiert, der Überstand abgesaugt und das verbliebene Pellet in PBS resuspendiert. Diese Schritte werden zweimal durchgeführt. Dann werden die Zellen in je 10 mL PBS resuspendiert und die Zellen gezählt (siehe oben). Nach erneutem Zentrifugieren und Absaugen werden die Zellen in einer Mischung von FCS und Dimethylsulfoxid (DMSO Hybrimax, Sigma-Aldrich Biochemie GmbH, Hamburg) im Verhältnis 9:1 resuspendiert. Dabei werden für jedes Kryoröhrchen 1,5 mL Zellsuspension mit $2 \times 10^6$ Zellen verwendet. Die Kryoröhrchen werden mit der Zellsuspension befüllt und in einem Nalgene Cryo 1°C Freezing Container (Nalge Nunc Incorporation, Penfield, New York, USA) mit Isopropanol (Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe) bei -86°C eingefroren. Nach einer Woche werden die Kryoröhrchen dann zur endgültigen Lagerung in einen Container mit Flüssigstickstoff überführt.

### 3.2.2 Mononukleäre Zellen

Die sogenannten „Dendritic cell-related cells“ (DCrC) werden durch mononukleäre Zellen aus Spenderblut gewonnen (englisch: „peripheral blood mononuclear cells“ – PBMC). Die Blutpräparate werden als sogenannte „Buffy-Coats“ vom „DRK-Blutspendedienst Ost, gemeinnützige GmbH“ bezogen und stammen von anonymen Spendern.

Für jeden Buffy-Coat werden vier 50mL-Zentrifugenröhrchen mit je 13 mL BioColl (Biochrom) vorgelegt. Der Buffy-Coat wird in ein geeignetes Gefäß gegeben und mit ca. 20°C warmem PBS auf 150 mL aufgefüllt. Das verdünnte Blut wird dann vorsichtig auf das vorgelegte BioColl pipettiert, so dass beide Phasen sich nicht vermischen. Anschließend werden die Röhrchen für 20 Minuten bei 800 x g ohne Bremse bei Raumtemperatur zentrifugiert. Die weiße Schicht der Leukozyten wird vorsichtig mit der Pipette entnommen und in ein neues Röhrchen überführt. Die isolierten Leukozyten werden in 4°C warmem PBS resuspendiert und dann für 5 Minuten mit 650 x g zentrifugiert. Der Überstand wird anschließend abgesaugt. Dies wird anschließend noch dreimal mit einer Rotationsgeschwindigkeit von 300 x g wiederholt.

Nun werden die gewonnenen Zellen gezählt und mit je $4 \times 10^7$ Zellen pro Röhrchen kryokonserviert (siehe oben).

## 3.3 Durchführung des LCSA

Die Durchführung eines LCSA erstreckt sich über einen Zeitraum von fünf Tagen (siehe Tabelle 3-3). Am ersten Tag wird die Kokultur aus Keratinozyten und dendritischen Zellen angelegt. Die Zugabe der Testsubstanzen erfolgt am dritten Tag. Am letzten der fünf Tage werden die Zellen mittels Durchflusszytometrie analysiert. Dazwischen wird die Kokultur im Brutschrank bei 37°C und 5 % $CO_2$ inkubiert. Im Folgenden soll das Vorgehen im Detail beschrieben werden.

**Tabelle 3-3.** Ablauf des LCSA. Nach Tag 1 und Tag 3 wird die Kokultur für je 48 Stunden inkubiert.

| **Tag 1** | **Tag 3** | **Tag 5** |
|---|---|---|
| - Auftauen der Zellen<br>- Verteilung auf 12-Well-Platten<br>- Zugabe der Zytokine | - Herstellung von Stammlösungen und Verdünnungsreihen<br>- Verteilung auf 12-Well-Platten | - Vorbereitung und Durchführung der Durchflusszytometrie |

### 3.3.1 Tag 1

Das erste Ziel besteht im Auftauen und „Waschen“ der kryokonservierten KC und der Verteilung auf 12-Well-Platten (Corning Incorporation, Corning, New York, USA; siehe Abbildung 3-2).

Ein 50mL-Zentrifugenröhrchen wird mit ca. 10 mL 37°C warmem KGM-2 befüllt. KC und PBMC (je 12-Well-Platte 0,5-1 x $10^6$ KC und ca. 4 x $10^7$ PBMC) werden aus dem Stickstofftank entnommen und die KC im 37°C warmen Wasserbad aufgetaut. Anschließend werden sie in das vorgelegte Medium gegeben. Das Zentrifugenröhrchen

wird mit warmem PBS auf 50 mL aufgefüllt und für vier Minuten bei 300 x g zentrifugiert. Der Überstand wird abgesaugt und das verbliebene Pellet in PBS resuspendiert. Diese Schritte (Zentrifugation, Absaugen und Resuspension) werden zweimal wiederholt. Beim letzten Mal wird jedoch statt in PBS in Medium resuspendiert, und zwar so, dass für jedes geplante Loch auf den 12-Well-Platten 1 mL Medium verwendet wird. Sind beispielsweise drei 12-Well-Platten geplant, die vollständig genutzt werden sollen, so wird das Zentrifugenröhrchen mit 36 mL befüllt.

Die 12-Well-Platten werden in der Sicherheitswerkbank aus der Verpackung entnommen und beschriftet. Die Keratinozytensuspension wird geschüttelt und je 1 mL in die Löcher der 12-Well-Platten gegeben. Das Zentrifugenröhrchen wird anschließend erneut mit KGM-2 aufgefüllt, so dass an der Wand des Röhrchens haftende Zellen abgelöst werden. Wieder wird die gleiche Menge an Medium verwendet und jedes Loch der 12-Well-Platten mit je 1 mL Suspension befüllt. Somit befinden sich nun in jedem Loch 2 mL Keratinozytensuspension. Diese werden anschließend für ca. 60 bis 90 Minuten im Brutschrank bei 37°C und 5 % $CO_2$ inkubiert.

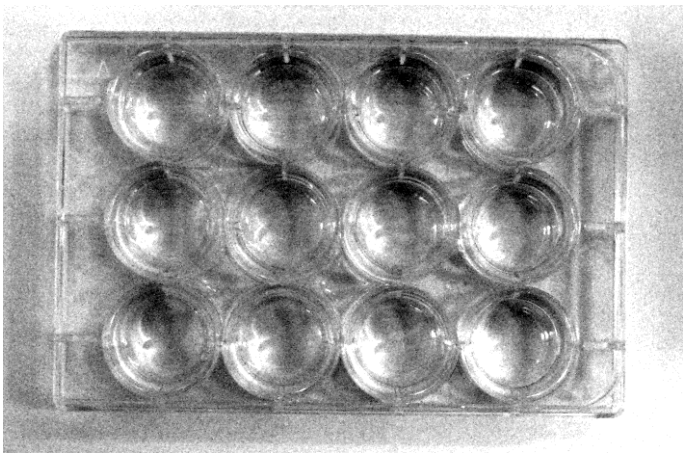


**Abbildung 3-2.** 12-Well-Platte.

Als zweiter Schritt werden die PBMC aufgetaut, gewaschen und zu den KC auf den 12-Well-Platten zugegeben. Das Auftauen und Waschen erfolgt nach den gleichen Schritten wie zuvor bei den KC beschrieben (siehe oben). Auch die PBMC werden nach dreimaligem Zentrifugieren und Waschen in 1 mL Medium je Loch resuspendiert. Die Löcher der 12-Well-Platten werden nun abgesaugt und „gewaschen“, das heißt

nacheinander mit je 2 mL PBS aufgefüllt und erneut abgesaugt. Nun wird in jedes Loch 1 mL PBMC-Suspension gegeben. Dann wird das Zentrifugenröhrchen erneut mit Medium befüllt, so dass an der Wand haftende Zellen gelöst werden. Mit je 1 mL werden die Löcher auf insgesamt 2 mL aufgefüllt.

Als nächster Schritt werden die rekombinant humanen Zytokine (IL-4) und „Granulocyte Macrophage–Colony Stimulating Factor“ (GM-CSF) in einer Konzentration von 100 ng/µL und der „Transformierende Wachstumsfaktor beta“ (englisch: „transforming growth factor beta“ – TGF-ß) zu 10 ng/µL rekonstituiert (alle von R&D Systems Incorporation, Minneapolis, USA, bzw. von ImmunoTools GmbH, Friesoythe). Zwei µL von jeder Zytokinlösung werden in die Löcher der 12-Well-Platten einpipettiert. Anschließend werden die Platten für 48 Stunden im Brutschrank bei 37°C und 5 % $CO_2$ inkubiert.

### 3.3.2 Tag 3

Für alle geplanten Testsubstanzen werden Stammlösungen in der höchsten im Versuch einzusetzenden Konzentration gemischt. Art des Lösungsmittels und Löslichkeitsgrenze werden den Herstellerangaben entnommen. Dies ist bis zu einer Konzentration von 1000 mmol/L mit allen Substanzen außer Squalen problemlos möglich. Bei letzterem wurden mehrere Lösungsmittel und Konzentrationen ausprobiert, ohne dass die Bildung von Mizellen verhindert werden konnte.

Die Substanzen werden abgewogen bzw. im Falle von Flüssigkeiten mit der Pipette aufgenommen, in ein Eppendorf-Reaktionsgefäß überführt und anschließend bis zum kalkulierten Zielvolumen aufgefüllt. Gegebenenfalls werden die Lösungen vor weiterer Verwendung nochmals mit Nalgene 0,2 µM Spritzenfilter (Nalge Nunc) steril filtriert.

Die Verdünnungsreihen werden so geplant, dass in jedes Loch 4 µL Lösung einpipettiert werden. Für Zielkonzentrationen von 4000 und 6000 µmol/L werden 8 bzw. 12 µL einer 1000 mmol/L-Stammlösung verwendet. Eine signifikante Beeinträchtigung der Zellvitalität konnte bei diesen Konzentrationen des Lösungsmittels DMSO nicht

beobachtet werden. Für jede Stammlösung wird eine Reihe von Eppendorf-Reaktionsgefäßen vorgelegt und mit entsprechenden Mengen Lösungsmittel gefüllt.

Als Positivkontrolle dienen drei Löcher mit Trinitrobenzolsulfonsäure (TNBS, Sigma-Aldrich) in einer Konzentration von 100 µmol/L. Als Negativkontrolle wird das Lösungsmittel in den im Versuchsaufbau verwendeten Volumina einpipettiert. Tabelle 3-4 zeigt eine typische Anordnung der Kontrollen. Die Testsubstanzen werden nach Pipettierschema aus den vorbereiteten Lösungen einpipettiert. Die fertigen 12-Well-Platten werden erneut für 48 Stunden im Brutschrank bei 37°C und 5 % $CO_2$ inkubiert.

**Tabelle 3-4.** Anordnung der Kontrollen auf einer 12-Well-Platte (Beispiel). Null- und Positivkontrollen (TNBS) sind durch eine Spalte von leeren Feldern getrennt, um die Übertragung von kleinen Mengen TNBS auf die Nullkontrollen zu vermeiden.

| | | | |
|---|---|---|---|
| Null-kontrolle | Null-kontrolle | (leer) | TNBS |
| Null-kontrolle | Null-kontrolle | (leer) | TNBS |
| Null-kontrolle | Null-kontrolle | (leer) | TNBS |

### 3.3.3 Tag 5

Die Zellsuspension in den 12-Well-Platten wird in beschriftete Zentrifugenröhrchen überführt und daraufhin bei 300 x g für 4 Minuten zentrifugiert. Der Überstand wird vorsichtig über dem Abflussbecken abdekantiert. Alle Röhrchen werden anschließend

mit je 2 mL PBS befüllt und nochmals mit denselben Einstellungen zentrifugiert und der Überstand abdekantiert. Dann werden die Proben erneut mit 2 mL PBS aufgefüllt, zentrifugiert und abdekantiert. Das auf 37°C vorgewärmte FCS wird mit PBS im Verhältnis 1:10 verdünnt. Die Zentrifugenröhrchen werden nun mit je 1 mL dieser zehnprozentigen FCS-Lösung aufgefüllt, zentrifugiert und abdekantiert.

Nun werden 50 µL der zehnprozentigen FCS-Lösung in jedes Röhrchen gegeben. Eine Nullkontrolle wird mit 100 µL statt 50 µL befüllt, die Probe für den Isotyp daraus entnommen und in ein separates Zentrifugenröhrchen überführt. Die Markierung des Oberflächenantigens CD86 erfolgt durch 5 µL des Antikörpers PE Mouse Anti-Human CD86 (BD) je Röhrchen. Der Isotyp wird dabei ausgelassen. Die Proben werden anschließend im Kühlschrank bei 4°C für 30 Minuten inkubiert.

Alle Röhrchen werden mit je 1 mL zehnprozentiger FCS-Lösung aufgefüllt, zentrifugiert und abdekantiert. Diese Schritte werden anschließend noch einmal wiederholt. Dann werden die Zellen in je 500 µL PBS resuspendiert und danach in alle Proben außer dem Isotyp je 10 µL 7-AAD (BD) gegeben. Vor der Messung mit dem Durchflusszytometer werden die Proben für mindestens 10 Minuten inkubiert.

Zur Analyse der Proben wird das Programm CellQuest Pro (BD) verwendet. Anhand des Isotyps werden die Einstellungen überprüft und bei Bedarf angepasst. Alle Proben werden vor der Messung mittels eines Vortex-Mixers vermischt. Proben mit niedriger Zellviabilität oder geringer Zellzahl werden in der Regel nicht bis zum Erreichen der geplanten Anzahl analysiert. Folgende Kriterien werden dabei für einen frühzeitigen Abbruch der Messung herangezogen:

- hoher Wert für 7-AAD und
- das typische Bild im „forward scatter/side scatter“(FSC/SSC)-Dot Plot, bei dem unterschiedliche Zellpopulationen nicht mehr voneinander abgrenzbar sind.

Sind diese beiden Anzeichen zu beobachten, wird die Messung vorzeitig abgebrochen. Die daraus gewonnenen Daten sind in der Regel nicht verwertbar, da keine diskrete Population von DCrC bestimmt werden kann.

## 3.4 Datenanalyse

Die Analyse der Daten aus der Durchflusszytometrie erfolgt mit dem Computerprogramm Flowing Software (Versionen 2.0.1 bis 2.4.0; Turku Centre for Biotechnology, Finnland).

In der ersten Probe wird im FSC/SSC-Dot-Plot die Population der DCrC als Gate ausgewählt (siehe Abbildung 3-3). Von diesem Gate wird ein Dot-Plot mit 7-AAD auf der x- und anti-CD86 auf der y-Achse erstellt. Die Zellpopulationen werden so unterteilt, dass 7-AAD-negative und -positive Zellen in unterschiedlichen Quadranten liegen (siehe Abbildung 3-4). Dann werden von jeder Probe statistische Merkmale in einer Tabelle in Excel 2003 (Microsoft, Redmond, Washington, USA) notiert, darunter die Zahl der DCrC, der Anteil der 7-AAD-negativen Zellen und die Mittelwerte für anti-CD86 der 7-AAD-negativen Zellen. Aus den anti-CD86-Werten der Nullkontrollen wird ein Mittelwert gebildet. Der geometrische Mittelwert jeder Probe wird bestimmt und mit dem durchschnittlichen Wert der Nullkontrollen verglichen. Die Positivkontrollen werden auf einen signifikanten Anstieg von CD86 und ausreichende Vitalität überprüft. Die CD86-Expression und die Vitalität von allen Proben werden dann in Diagrammen visualisiert und mit den anderen Ergebnissen verglichen.

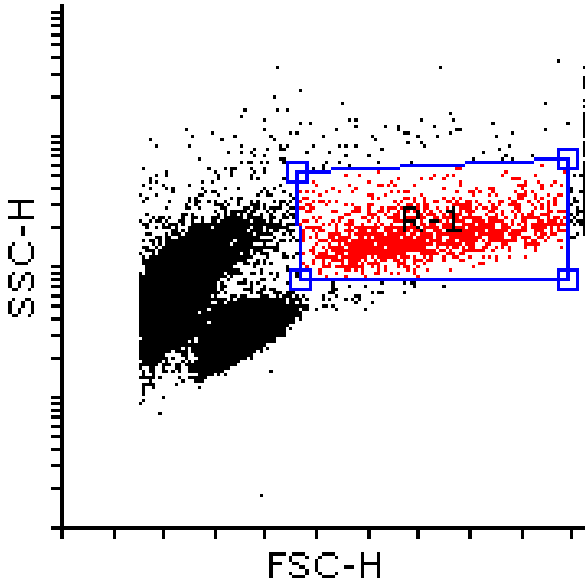



**Abbildung 3-3.** Auswahl der DCrC-Population im „Dot-Plot“. SSC: Side scatter, FSC: Forward scatter.

Für jede Testsubstanz werden die Ergebnisse aller Versuche in einer Excel-Tabelle eingetragen. Der arithmetische Mittelwert für alle relevanten Konzentrationen wird berechnet und anschließend wird daraus je ein Liniendiagramm für die anti-CD86- und 7-AAD-Werte erstellt. Die Anzahl unterschiedlicher PBMC-Spender, die jeder Konzentration zugrunde liegen, ist in den Tabellen 4-2 bis 4-10 aufgelistet. Die Fehlerbalken bilden die einfache Standardabweichung ab. Der Verlauf der CD86-Expression wird als Grad der Abweichung von den Nullkontrollen beurteilt (im Diagramm zum Vergleich als Kurve von y=1 visualisiert). Für die 7-AAD-Diagramme fungiert eine Zellvitalität von 50 % als Vergleichsgröße (gestrichelte Linie).

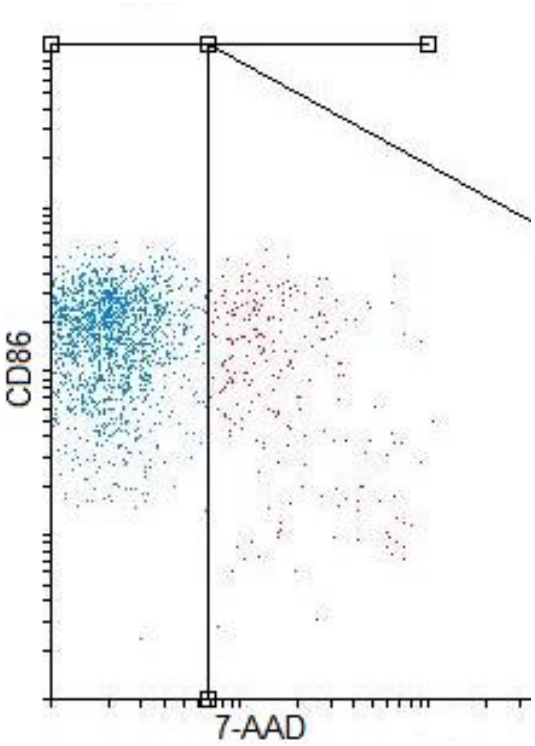



**Abbildung 3-4.** Unterteilung der DCrC-Population in vitale Zellen (7-AAD-negativ; links) und Zellen mit Membranschäden (7-AAD-positiv, rechts).

# 4 Ergebnisse

Die initialen Versuche dienten der Abschätzung der Zytotoxizität der Testsubstanzen. Tabelle 4-1 zeigt diese ersten Annäherungswerte.

**Tabelle 4-1.** Zytotoxische Konzentrationsbereiche der Testsubstanzen nach Auswertung der Vorversuche. Als Kriterium dient eine Reduktion des Anteils der vitalen Zellen unter 50 %.

| Substanz | Schwelle zur Zytotoxizität |
|---|---|
| Bernsteinsäure | > 100 µmol/L |
| Fumarsäure | > 2000 µmol/L |
| Linolensäure | < 10 µmol/L |
| Linolsäure | 10 µmol/L |
| Maleinsäure | > 2000 µmol/L |
| Octinol | > 500 µmol/L |
| Ölsäure | 10 - 50 µmol/L |
| Squalen | -* |
| Undecylensäure | 500 - 1000 µmol/L |

* Squalen kann nicht im Medium gelöst werden.

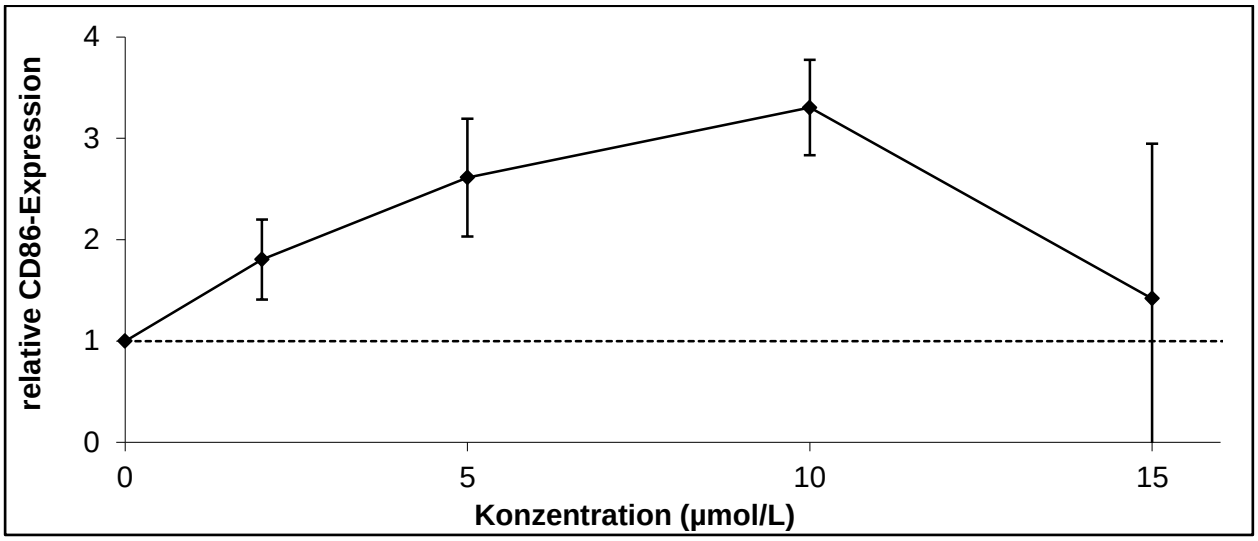
## 4.1 Grafische Darstellung der Konzentrations-Wirkungs-Kurven

Im Folgenden ist der Verlauf der CD86-Expression und der Vitalität in Abhängigkeit von der Konzentration der Testsubstanzen abgebildet (Abbildungen 4-1 bis 4-9). Die Darstellung erfolgt als Liniendiagramm der Mittelwerte aus verschiedenen Versuchen. Die Fehlerbalken haben eine Größe von je einer Standardabweichung nach oben und unten. Die Vitalität wird als Anteil der 7-AAD-negativen Zellen an der Gesamtheit aller Zellen in Prozent dargestellt. Die Expression von CD86 wird im Vergleich zu den Nullkontrollen angegeben.

Die Testsubstanzen können anhand ihres Einflusses auf die CD86-Expression in mehrere Gruppen eingeteilt werden. Die ungesättigten Fettsäuren Linolsäure, Linolensäure, Ölsäure und Arachidonsäure führen bereits bei niedrigen Konzentrationen unter 10 µmol/L zu einem CD86-Anstieg. Undecylensäure und Octinol zeigen einen deutlichen, steten Anstieg des Oberflächenmarkers bei mittleren (100-1000 µmol/L), Maleinsäure hingegen erst signifikant bei höheren Konzentrationen (ab ca. 1000 µmol/L). Die Induktion von CD86 kann im Allgemeinen bei Konzentrationen beobachtet werden, die noch keine ausgeprägte Zytotoxizität bewirken. Bei Bernsteinsäure ergibt sich keine relevante Veränderung von CD86 und bei Fumarsäure lediglich eine geringfügige Steigerung bei einer Konzentration von 2000 µmol/L.

Als einzige der zehn untersuchten Substanzen zeigt Squalen eine mangelnde Löslichkeit. Jeweils am fünften Tag eines Versuchs sind ab Konzentrationen von 10 µmol/L Mizellen in dem Medium der Kokultur mit bloßem Auge erkennbar. Die Verwendung verschiedener Lösungsmittel (DMSO, Ethanol und Methanol) erbrachte keine bessere Löslichkeit. Bei unseren Untersuchungen führte keine Konzentration zu einer relevanten Veränderung von CD86 oder Vitalität gegenüber den Nullkontrollen.

Linolsäure ist eine Substanz, die bei geringen Konzentrationen eine Wirkung auf CD86 zeigt. Dieser Biomarker steigt stetig bis auf das 3,3-fache der Nullkontrollen bei 10 µmol/L an. Hierbei ist die Vitalität bereits auf unter 50 % erniedrigt und sinkt bei 15 µmol/L weiter ab auf 15 % (siehe Abbildung 4-1 und Tabelle 4-2).



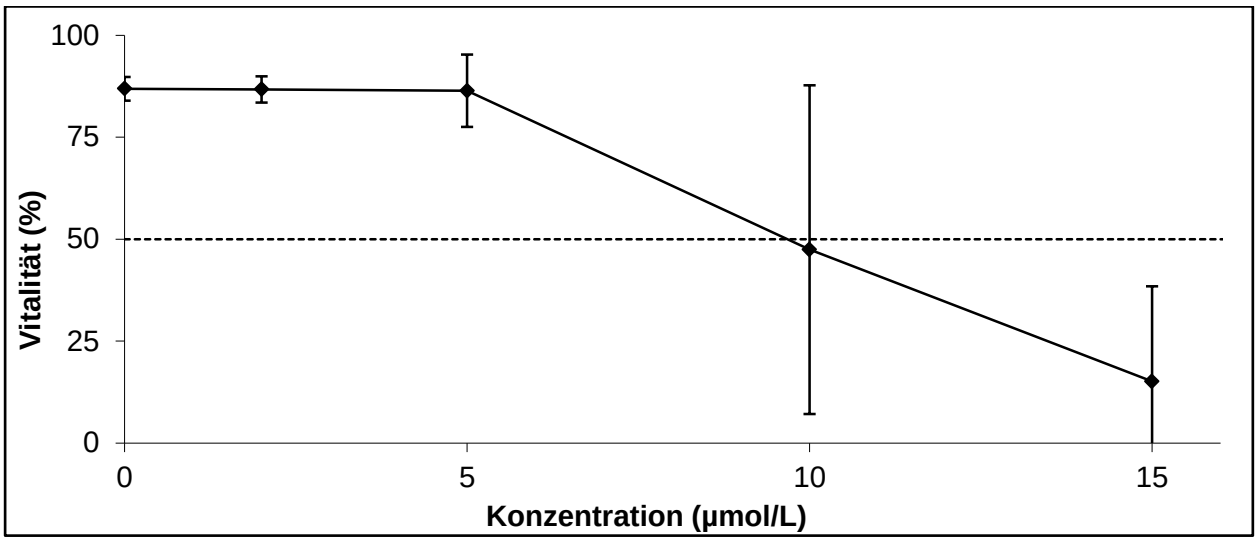
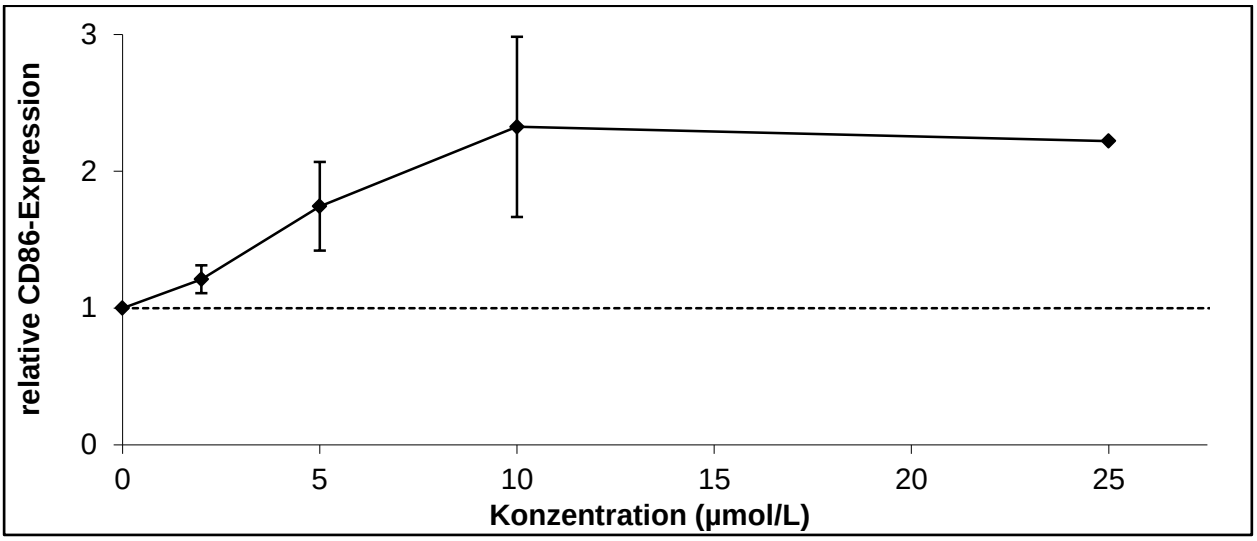




**Abbildung 4-1. Linolsäure.** Die obere Kurve demonstriert die Expression von CD86 im Vergleich zu den Nullkontrollen. Die untere Kurve bildet die Vitalität der Zellen ab. Die Datenpunkte basieren auf den Mittelwerten der untersuchten Proben. Die Fehlerbalken entsprechen je einer Standardabweichung.

**Tabelle 4-2.** Anzahl der Messwerte und PBMC-Spender, die jedem in Abbildung 4-1 dargestellten Wert zugrunde liegen.

| Konzentration Linolsäure (µmol/L) | Anzahl Messwerte (CD86) | Anzahl PBMC-Spender (CD86) | Anzahl Messwerte (Vitalität) | Anzahl PBMC-Spender (Vitalität) |
|---|---|---|---|---|
| 2 | 8 | 3 | 8 | 3 |
| 5 | 8 | 3 | 8 | 3 |
| 10 | 5 | 3 | 9 | 3 |
| 15 | 5 | 3 | 6 | 3 |

Bei der Untersuchung von Ölsäure ist CD86 bereits bei der niedrigsten getesteten Konzentration von 2 µmol/L sichtbar erhöht. Die größte Induktion ist bei 10 µmol/L zu beobachten und erreicht über das Doppelte des Ausganswertes. Eine signifikante Beeinträchtigung der Zellvitalität stellt sich zwischen 10 und 25 µmol/L ein (siehe Abbildung 4-2 und Tabelle 4-3).



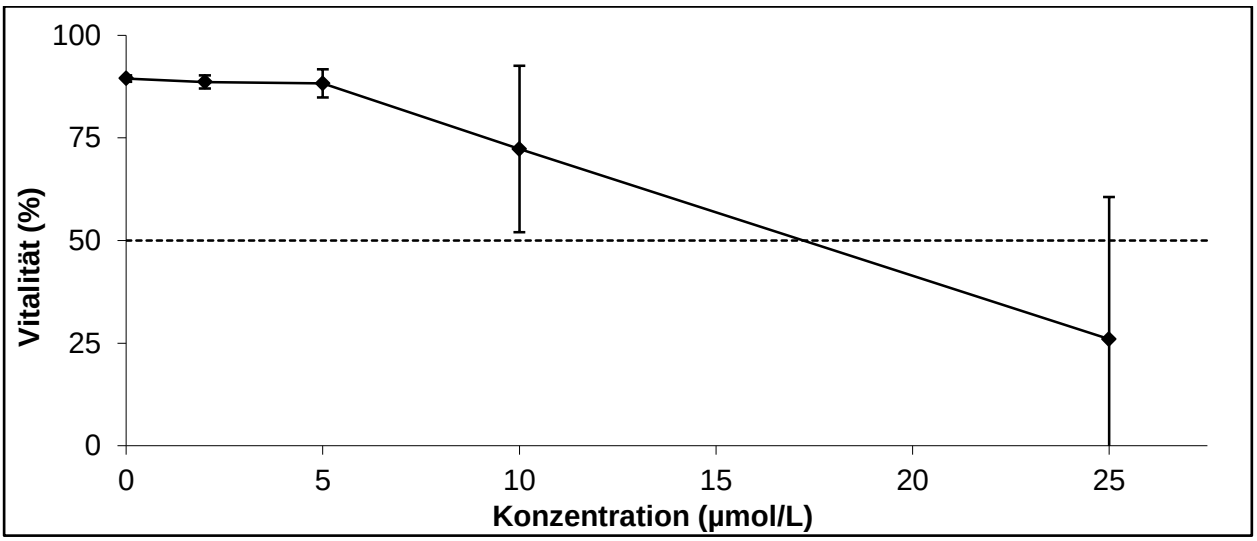
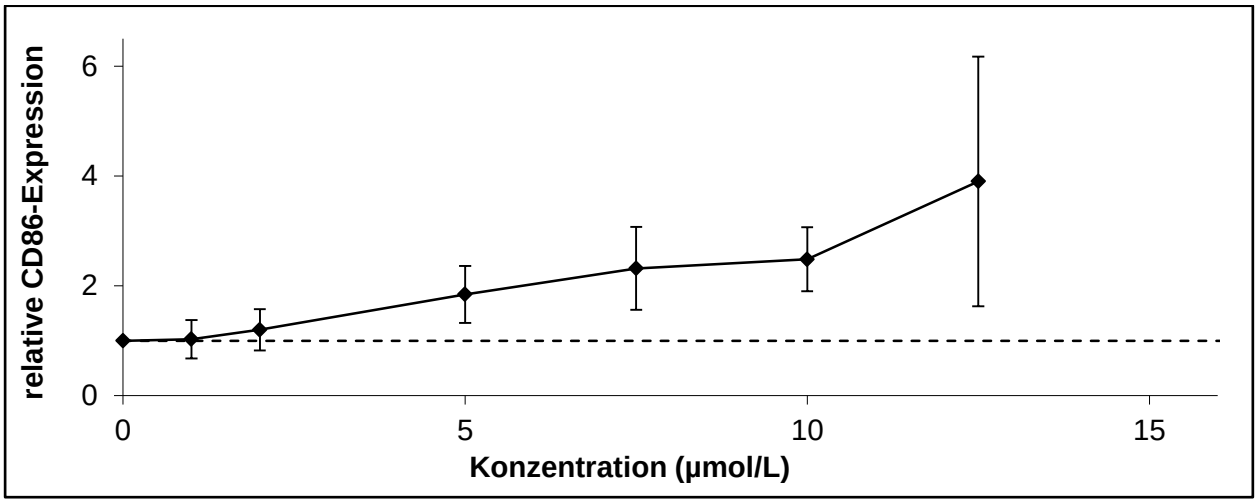




**Abbildung 4-2. Ölsäure.** Die obere Kurve demonstriert die Expression von CD86 im Vergleich zu den Nullkontrollen. Die untere Kurve bildet die Vitalität der Zellen ab. Die Datenpunkte basieren auf den Mittelwerten der untersuchten Proben. Die Fehlerbalken entsprechen je einer Standardabweichung.

**Tabelle 4-3.** Anzahl der Messwerte und PBMC-Spender, die jedem in Abbildung 4-2 dargestellten Wert zugrunde liegen.

| Konzentration Ölsäure (µmol/L) | Anzahl Messwerte (CD86) | Anzahl PBMC-Spender (CD86) | Anzahl Messwerte (Vitalität) | Anzahl PBMC-Spender (Vitalität) |
|---|---|---|---|---|
| 2 | 6 | 3 | 6 | 3 |
| 5 | 6 | 3 | 6 | 3 |
| 10 | 6 | 3 | 6 | 3 |
| 25 | 2 | 1 | 6 | 3 |

Auch bei Linolensäure findet sich ein weitestgehend kontinuierlicher Anstieg von CD86 bis zum Maximum auf das 3,9-fache der Nullkontrollen bei einer Konzentration von 12,5 µmol/L. In diesem Bereich ist die Vitalität der Zellen bereits auf 50 % reduziert und sinkt bei 15 µmol/L auf 1 % ab (siehe Abbildung 4-3 und Tabelle 4-4).



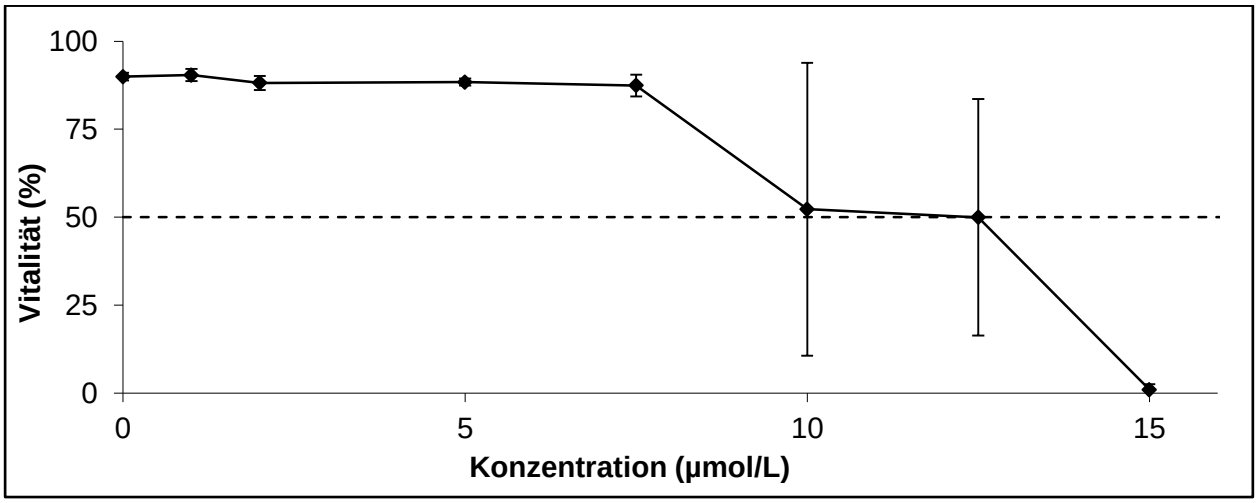
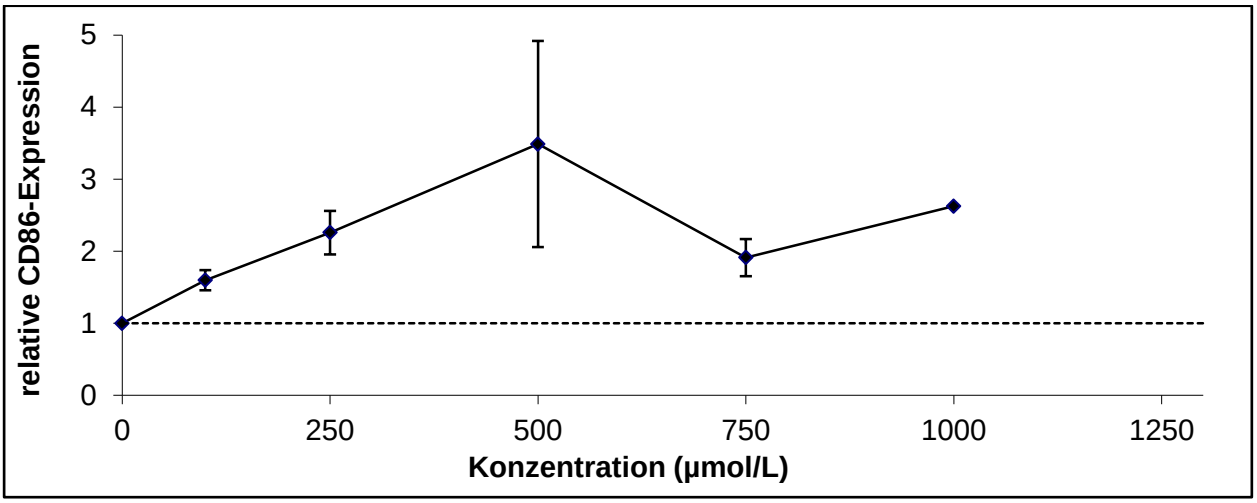




**Abbildung 4-3. Linolensäure.** Die obere Kurve demonstriert die Expression von CD86 im Vergleich zu den Nullkontrollen. Die untere Kurve bildet die Vitalität der Zellen ab. Die Datenpunkte basieren auf den Mittelwerten der untersuchten Proben. Die Fehlerbalken entsprechen je einer Standardabweichung. Bei 15 µmol/L konnte CD86 aufgrund der niedrigen Vitalität nicht bestimmt werden.

**Tabelle 4-4.** Anzahl der Messwerte und PBMC-Spender, die jedem in Abbildung 4-3 dargestellten Wert zugrunde liegen.

| Konzentration Linolensäure (µmol/L) | Anzahl Messwerte (CD86) | Anzahl PBMC-Spender (CD86) | Anzahl Messwerte (Vitalität) | Anzahl PBMC-Spender (Vitalität) |
|---|---|---|---|---|
| 1 | 6 | 3 | 6 | 3 |
| 2 | 6 | 3 | 6 | 3 |
| 5 | 7 | 3 | 7 | 3 |
| 7,5 | 5 | 2 | 5 | 2 |
| 10 | 5 | 2 | 7 | 3 |
| 12,5 | 5 | 2 | 5 | 2 |
| 15 | 0 | 0 | 6 | 3 |

Undecylensäure demonstriert in Konzentrationen zwischen 100 und 1250 µmol/L eine Kurve mit stetigem Anstieg des CD86-Oberflächenmarkers bis zum Maximum einer mehr als dreifachen Expression im Vergleich zu den Nullkontrollen bei 500 µmol/L. Bei einer Konzentration von 1000 µmol/L sinkt die Vitalität der Zellen unter 50 % (siehe Abbildung 4-4 und Tabelle 4-5).



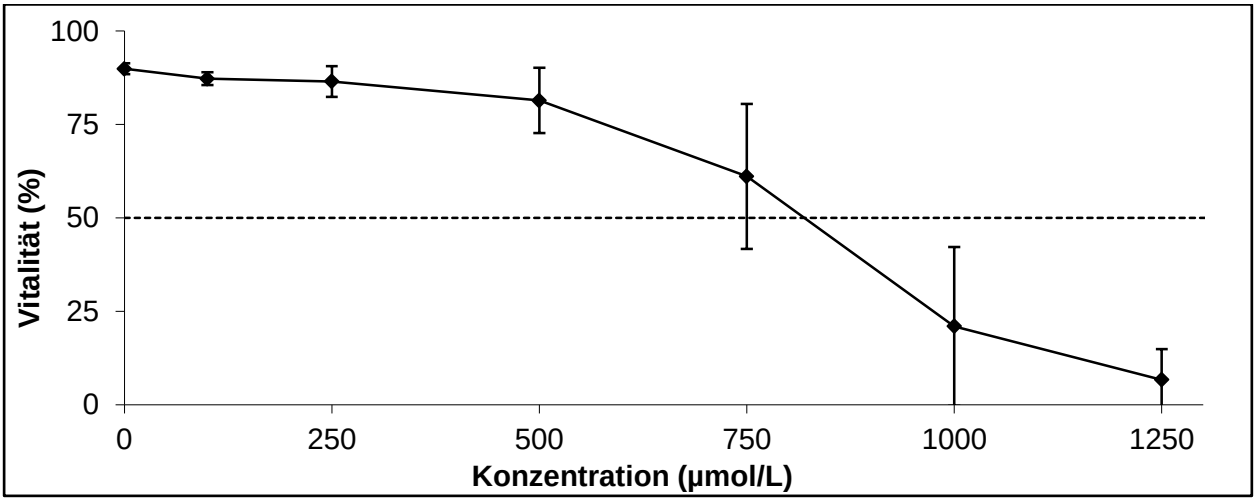




**Abbildung 4-4. Undecylensäure.** Die obere Kurve demonstriert die Expression von CD86 im Vergleich zu den Nullkontrollen. Die untere Kurve bildet die Vitalität der Zellen ab. Die Datenpunkte basieren auf den Mittelwerten der untersuchten Proben. Die Fehlerbalken entsprechen je einer Standardabweichung. Bei 1250 µmol/L konnte CD86 aufgrund der niedrigen Vitalität nicht bestimmt werden.

**Tabelle 4-5.** Anzahl der Messwerte und PBMC-Spender, die jedem in Abbildung 4-4 dargestellten Wert zugrunde liegen.

| Konzentration Undecylensäure (µmol/L) | Anzahl Messwerte (CD86) | Anzahl PBMC-Spender (CD86) | Anzahl Messwerte (Vitalität) | Anzahl PBMC-Spender (Vitalität) |
|---|---|---|---|---|
| 100 | 6 | 3 | 6 | 3 |
| 250 | 4 | 2 | 4 | 2 |
| 500 | 9 | 4 | 9 | 4 |
| 750 | 4 | 2 | 4 | 2 |
| 1000 | 2 | 1 | 8 | 4 |
| 1250 | 0 | 0 | 4 | 2 |

Octinol führt bereits bei einer Konzentration von 250 µmol/L zu einem Anstieg von CD86 auf das 1,7-fache im Vergleich zu den Nullkontrollen. Der höchste Wert (Induktion auf das 3,7-fache) wird bei 2000 µmol/L erreicht, wobei die Vitalität der Zellen hier bereits unter 50 % liegt (siehe Abbildung 4-5 und Tabelle 4-6).

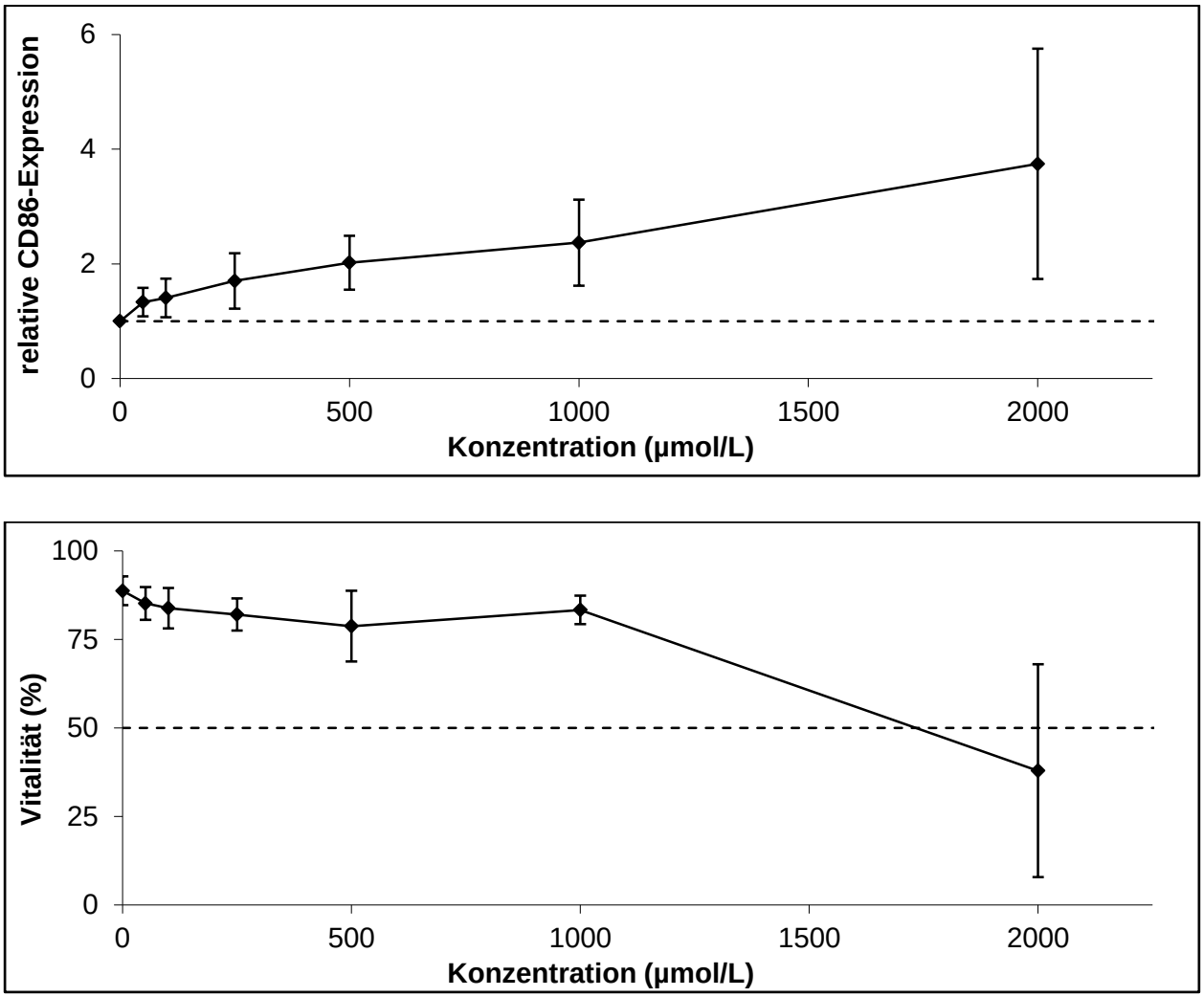
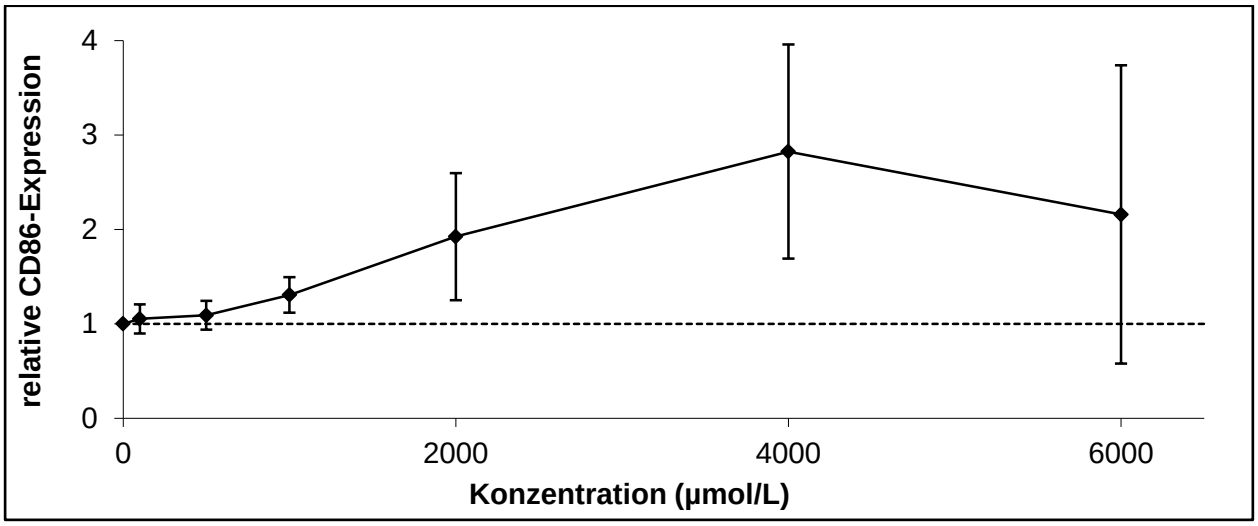



**Abbildung 4-5. Octinol.** Die obere Kurve demonstriert die Expression von CD86 im Vergleich zu den Nullkontrollen. Die untere Kurve bildet die Vitalität der Zellen ab. Die Datenpunkte basieren auf den Mittelwerten der untersuchten Proben. Die Fehlerbalken entsprechen je einer Standardabweichung.

**Tabelle 4-6.** Anzahl der Messwerte und PBMC-Spender, die jedem in Abbildung 4-5 dargestellten Wert zugrunde liegen.

| Konzentration Octinol (µmol/L) | Anzahl Messwerte (CD86) | Anzahl PBMC-Spender (CD86) | Anzahl Messwerte (Vitalität) | Anzahl PBMC-Spender (Vitalität) |
|---|---|---|---|---|
| 50 | 8 | 4 | 8 | 4 |
| 100 | 8 | 4 | 8 | 4 |
| 250 | 6 | 3 | 6 | 3 |
| 500 | 9 | 4 | 9 | 4 |
| 1000 | 7 | 3 | 7 | 3 |
| 2000 | 4 | 2 | 4 | 2 |

Bei Maleinsäure ist erst ab 2000 µmol/l eine Induktion von CD86 auf das 1,9-fache der Nullkontrollen zu beobachten. Bei 4000 µmol/L wird das Maximum (2,8-fache Expression) erreicht. Die Vitalität ist hier bereits teilweise erniedrigt, sinkt aber erst bei 6000 µmol/L unter 50 % (siehe Abbildung 4-6 und Tabelle 4-7).



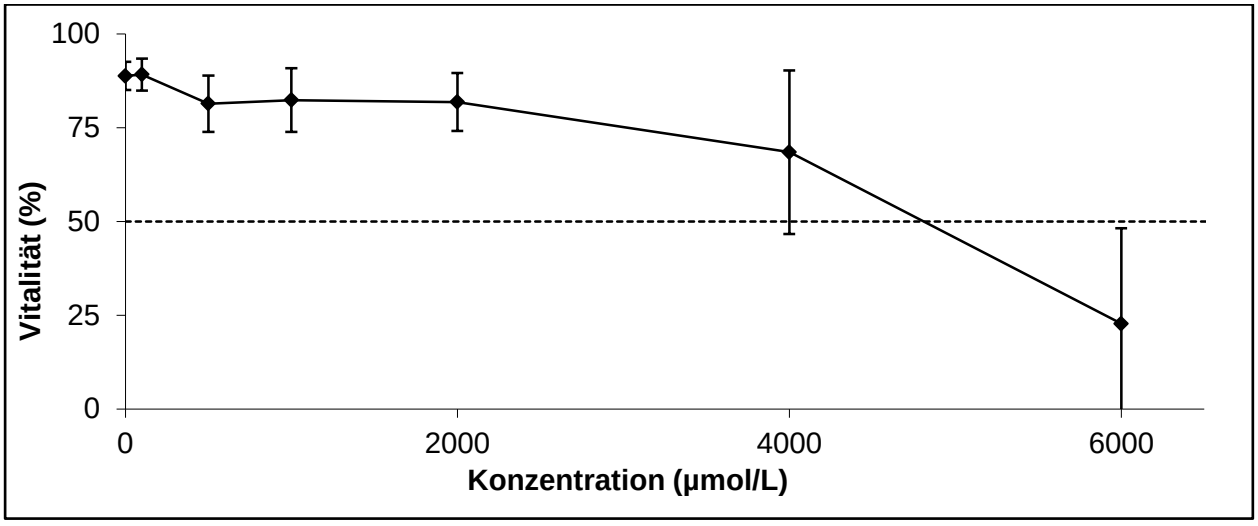
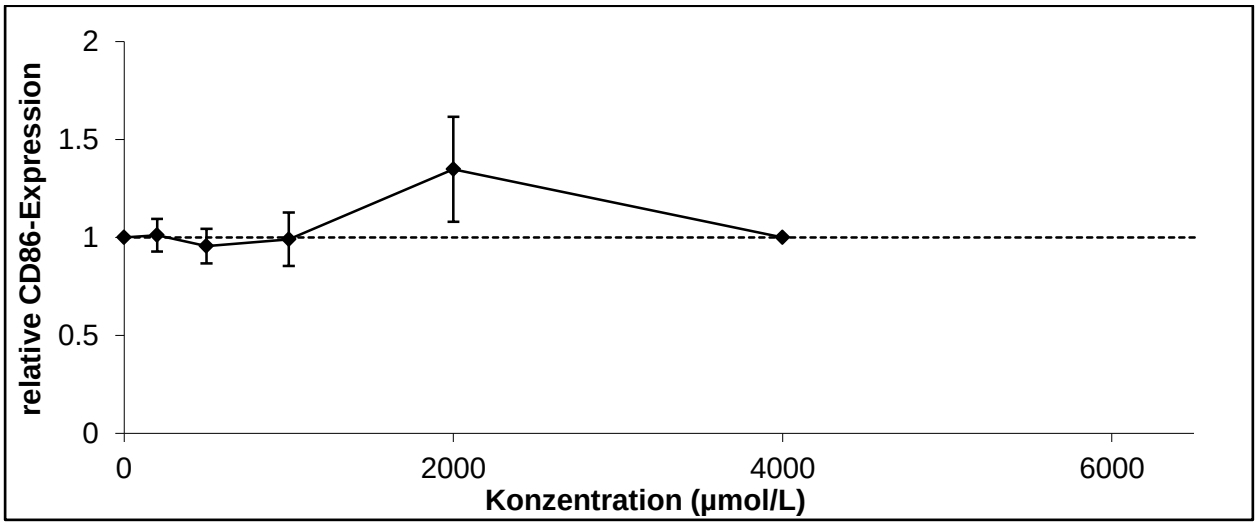




**Abbildung 4-6. Maleinsäure.** Die obere Kurve demonstriert die Expression von CD86 im Vergleich zu den Nullkontrollen. Die untere Kurve bildet die Vitalität der Zellen ab. Die Datenpunkte basieren auf den Mittelwerten der untersuchten Proben. Die Fehlerbalken entsprechen je einer Standardabweichung.

**Tabelle 4-7.** Anzahl der Messwerte und PBMC-Spender, die jedem in Abbildung 4-6 dargestellten Wert zugrunde liegen.

| Konzentration Maleinsäure (µmol/L) | Anzahl Messwerte (CD86) | Anzahl PBMC-Spender (CD86) | Anzahl Messwerte (Vitalität) | Anzahl PBMC-Spender (Vitalität) |
|---|---|---|---|---|
| 100 | 4 | 2 | 4 | 2 |
| 500 | 8 | 3 | 8 | 3 |
| 1000 | 8 | 3 | 8 | 3 |
| 2000 | 10 | 4 | 10 | 4 |
| 4000 | 8 | 3 | 8 | 3 |
| 6000 | 4 | 2 | 8 | 3 |

Die Expression von CD86 bei Untersuchung von Fumarsäure zeigt lediglich bei einer Konzentration von 2000 µmol/L eine geringfügige Erhöhung auf das 1,3-fache der Nullkontrollen. Die Vitalität der Zellen nimmt beginnend bei Konzentrationen von 500 µmol/L stetig ab und sinkt bei 4000 µmol/L unter 50 % (siehe Abbildung 4-7 und Tabelle 4-8).



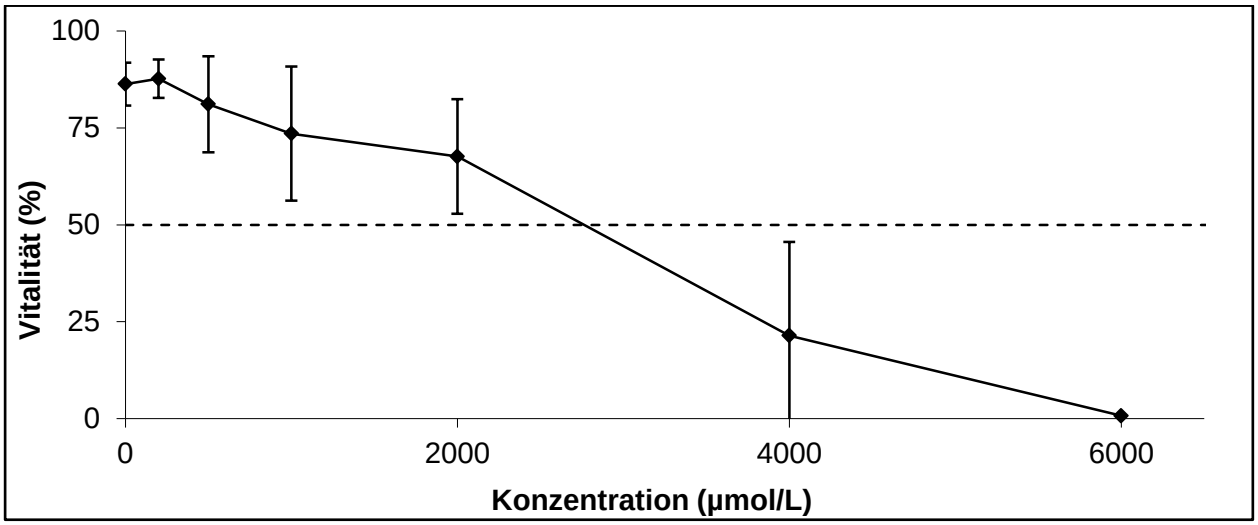
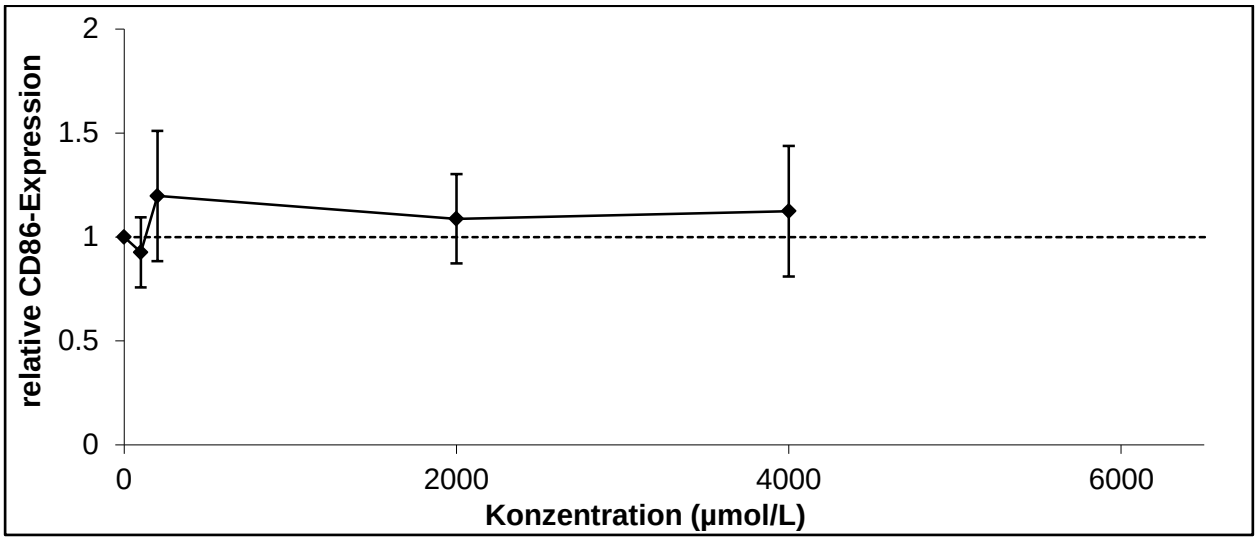




**Abbildung 4-7. Fumarsäure.** Die obere Kurve demonstriert die Expression von CD86 im Vergleich zu den Nullkontrollen. Die untere Kurve bildet die Vitalität der Zellen ab. Die Fehlerbalken entsprechen je einer Standardabweichung. Die Datenpunkte basieren auf den Mittelwerten der untersuchten Proben. Bei 6000 µmol/L konnte CD86 aufgrund der niedrigen Vitalität nicht bestimmt werden.

**Tabelle 4-8.** Anzahl der Messwerte und PBMC-Spender, die jedem in Abbildung 4-7 dargestellten Wert zugrunde liegen.

| Konzentration Fumarsäure (µmol/L) | Anzahl Messwerte (CD86) | Anzahl PBMC-Spender (CD86) | Anzahl Messwerte (Vitalität) | Anzahl PBMC-Spender (Vitalität) |
|---|---|---|---|---|
| 200 | 4 | 2 | 4 | 2 |
| 500 | 4 | 2 | 4 | 2 |
| 1000 | 4 | 2 | 4 | 2 |
| 2000 | 6 | 3 | 6 | 3 |
| 4000 | 2 | 1 | 4 | 2 |
| 6000 | 0 | 0 | 2 | 1 |

Bernsteinsäure kann in keiner Konzentration eine deutliche Steigerung der CD86-Expression erreichen. Die mittleren Werte für CD86 liegen zwischen dem 0,9- und dem 1,2-fachen der Nullkontrollen. Die Vitalität der Zellen fällt zwischen Konzentrationen von 2000 und 6000 µmol/L ab (siehe Abbildung 4-8 und Tabelle 4-9).



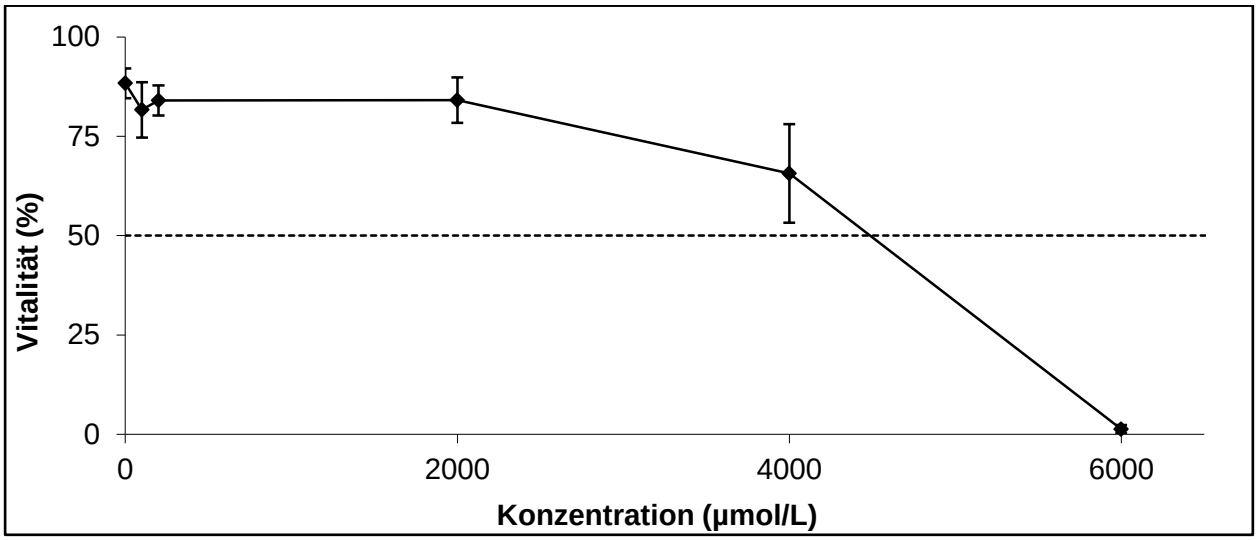



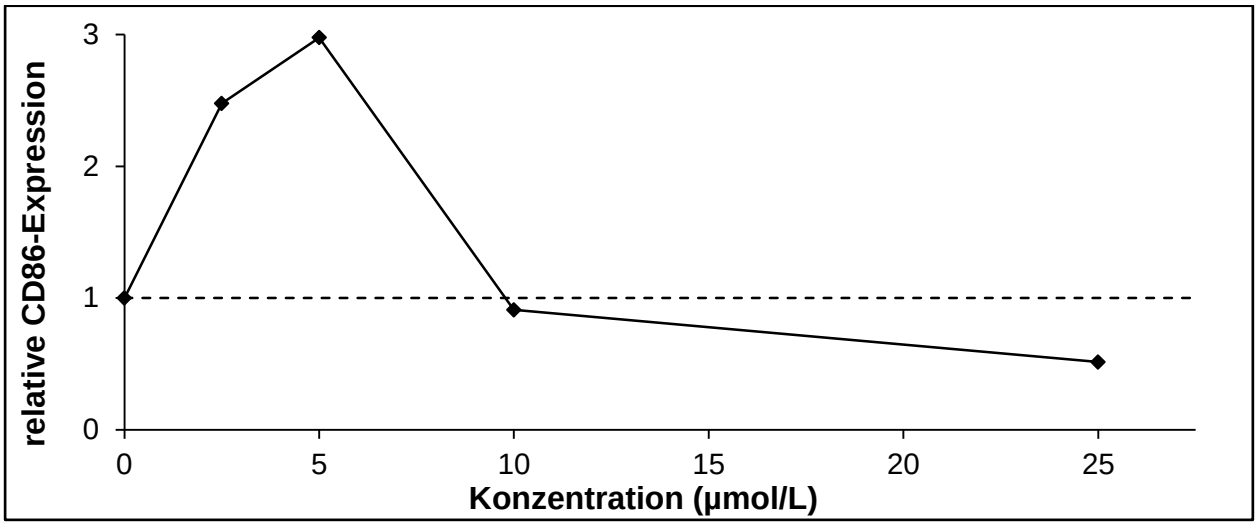

**Abbildung 4-8. Bernsteinsäure.** Die obere Kurve demonstriert die Expression von CD86 im Vergleich zu den Nullkontrollen. Die untere Kurve bildet die Vitalität der Zellen ab. Die Datenpunkte basieren auf den Mittelwerten der untersuchten Proben. Die Fehlerbalken entsprechen je einer Standardabweichung. Bei 6000 µmol/L konnte CD86 aufgrund der niedrigen Vitalität nicht bestimmt werden.

**Tabelle 4-9.** Anzahl der Messwerte und PBMC-Spender, die jedem in Abbildung 4-8 dargestellten Wert zugrunde liegen.

| Konzentration Bernsteinsäure (µmol/L) | Anzahl Messwerte (CD86) | Anzahl PBMC-Spender (CD86) | Anzahl Messwerte (Vitalität) | Anzahl PBMC-Spender (Vitalität) |
|---|---|---|---|---|
| 100 | 4 | 2 | 4 | 2 |
| 200 | 4 | 2 | 4 | 2 |
| 2000 | 6 | 3 | 6 | 3 |
| 4000 | 6 | 3 | 6 | 3 |
| 6000 | 0 | 0 | 4 | 2 |

In Ergänzung zu den Substanzen aus Kreiling et al. (2008) wurde Arachidonsäure in das Repertoire der Testsubstanzen aufgenommen. Diese Chemikalie zeigt in der niedrigsten getesteten Konzentration von 2,5 µmol/L einen Anstieg der CD86-Expression auf das 2,5-fache der Nullkontrollen. Bei einer Konzentration von 5 µmol/L wird die höchste Induktion auf das Dreifache gemessen. Höhere Konzentrationen erweisen sich als ausgeprägt zytotoxisch. Die Vitalität der Zellen ist jedoch bereits bei den Konzentrationen 2,5 und 5 µmol/L beeinträchtigt auf 68 bis 75 % (siehe Abbildung 4-9 und Tabelle 4-10).

Arachidonsäure wurde nur in einem Versuch getestet. Dabei führte sie zur Induktion von CD86 und Zytotoxizität bei noch niedrigeren Konzentrationen als die biochemisch verwandten Substanzen Ölsäure, Linolsäure und Linolensäure.



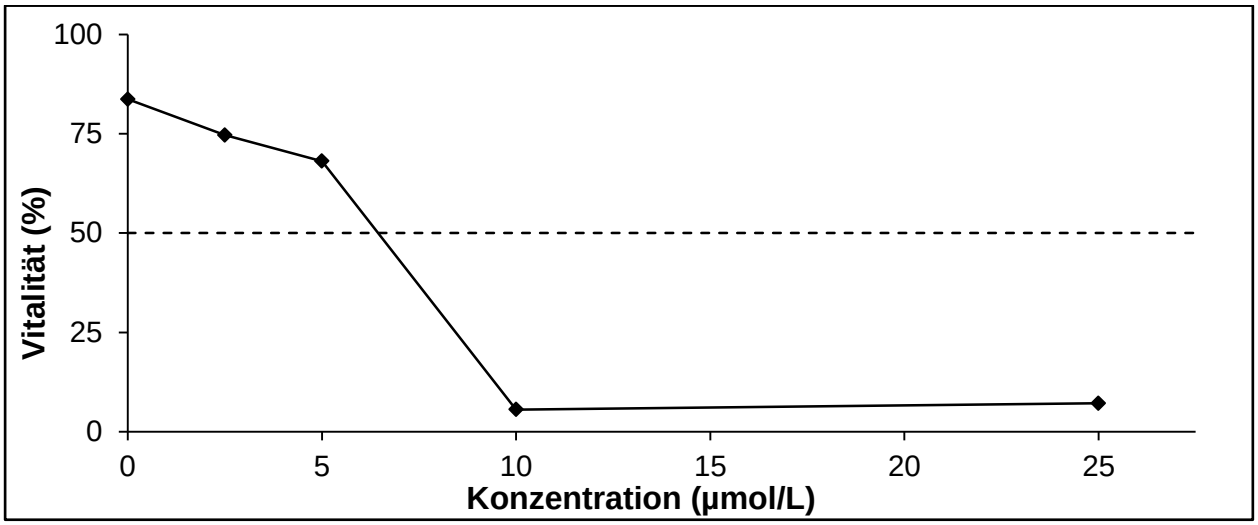




**Abbildung 4-9. Arachidonsäure.** Die obere Kurve demonstriert die Expression von CD86 im Vergleich zu den Nullkontrollen. Die untere Kurve bildet die Vitalität der Zellen ab. Die gemessenen Werte stammen von einem PBMC-Spender. Die Datenpunkte basieren auf den Mittelwerten der untersuchten Proben. Aufgrund der niedrigen Stichprobenzahl wird bei Arachidonsäure auf die Abbildung der Standardabweichung als Fehlerbalken verzichtet.

**Tabelle 4-10.** Anzahl der Messwerte und PBMC-Spender, die jedem in Abbildung 4-9 dargestellten Wert zugrunde liegen.

| Konzentration Arachidonsäure (µmol/L) | Anzahl Messwerte (CD86) | Anzahl PBMC-Spender (CD86) | Anzahl Messwerte (Vitalität) | Anzahl PBMC-Spender (Vitalität) |
|---|---|---|---|---|
| 2,5 | 2 | 1 | 2 | 1 |
| 5 | 2 | 1 | 2 | 1 |
| 10 | 1 | 1 | 2 | 1 |
| 25 | 1 | 1 | 2 | 1 |

## 4.2 Quantifizierung des sensibilisierenden und irritierenden Potenzials mittels $EC_{50}$ und $EC_{50\%}$

Für den Vergleich der Resultate sollen im Folgenden die Konzentrationen verwendet werden, die zur Hälfte des maximalen CD86-Anstiegs ($EC_{50}$) bzw. zur Reduktion der Vitalität um 50 % führen ($EC_{50\%}$). Die Berechnung der Konzentrationen erfolgt anhand der Messwerte der nächstniedrigeren und –höheren Konzentrationen. Abbildung 4-10 vergleicht die Testsubstanzen anhand dieser Werte.

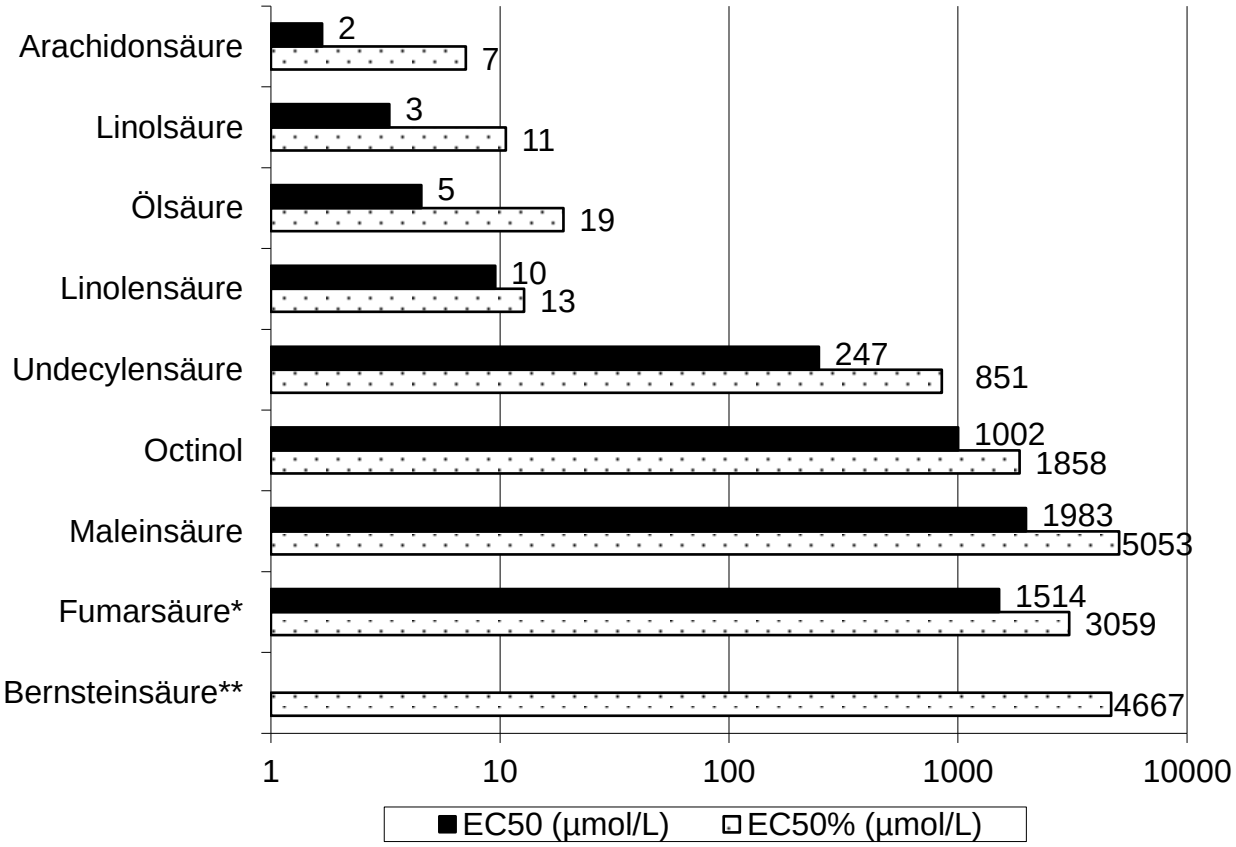



**Abbildung 4-10.** Konzentrationen der Testsubstanzen, die zu einem halbmaximalen Anstieg von CD86 ($EC_{50}$) und Verminderung der Vitalität um 50 % führen ($EC_{50\%}$). Die Darstellung erfolgt auf einer logarithmischen Skala. Squalen ist nicht aufgeführt, da die mangelnde Löslichkeit keine Auswertung erlaubt.

* Fumarsäure führt nur in einer Konzentration von 2000 µmol/L zu einem geringgradigen Anstieg der CD86-Expression.

** Bernsteinsäure zeigt keinen signifikanten Anstieg von CD86.

# 5 Diskussion

## 5.1 Vergleich mit den Ergebnissen im GPMT und LLNA

Von den zehn mit dem LCSA untersuchten Substanzen konnten bei allen außer Squalen die CD86-Expression und die Vitalität bei verschiedenen Konzentrationen getroffen werden. Sieben Substanzen demonstrieren einen Anstieg von CD86 auf über das 1,5-fache der Nullkontrollen.

Bei Arachidonsäure, Ölsäure, Linolsäure und Linolensäure kann ein Anstieg von CD86 bei niedrigen Konzentrationen beobachtet werden ($EC_{50}$ zwischen 2 und 10 µmol/L). Signifikante Zytotoxizität stellt sich bei höheren Konzentrationen ein. Die $EC_{50\%}$-Werte für Irritation liegen zwischen 7 (Arachidonsäure) und 19 µmol/L (Ölsäure).

Für Undecylensäure, Octinol und Maleinsäure liegen die erhobenen Werte für $EC_{50}$ (247, 1002 und 1983 µmol/L) und $EC_{50\%}$ (851, 1858 und 5053 µmol/L) bei höheren Konzentrationen.

Bernsteinsäure konnte in keiner Konzentration bis zum zytotoxischen Bereich bei 6000 µmol/L einen signifikanten, reproduzierbaren Anstieg von CD86 auslösen. Der Mittelwert von CD86 steigt nicht über das 1,25-fache der Nullkontrollen. Der $EC_{50\%}$ liegt bei den höchsten Konzentrationen aller Substanzen (4667 µmol/L).

Fumarsäure demonstriert bei einer Konzentration von 2000 µmol/L einen geringgradigen Anstieg der CD86-Expression auf das 1,35-fache. Die restlichen Konzentrationen führen nicht zu einer relevanten Veränderung von CD86. Der $EC_{50\%}$ beträgt 3059 µmol/L.

In den Tabellen 5-1 und 5-2, sowie der Abbildung 5-1 sind die Resultate des LCSA zum Vergleich mit dem GPMT und dem LLNA aufgeführt (Kreiling et al. 2008). Von den acht Substanzen, die sowohl im LCSA als auch im GPMT untersucht worden sind, stimmen nur die Resultate für Ölsäure zwischen den Versuchsmethoden nicht überein. Diese Substanz ergibt im LCSA ein positives, im GPMT ein negatives Ergebnis. Linolsäure konnte im GPMT aufgrund von mehreren positiven Reaktionen in der Kontrollgruppe

nicht untersucht werden (Kreiling et al. 2008). Squalen ist im LCSA aufgrund mangelnder Löslichkeit nicht beurteilbar. Arachidonsäure und Linolensäure sind im GPMT nicht untersucht worden. Insgesamt ergibt die Untersuchung der ungesättigten Verbindungen im LCSA einen hohen Grad an Übereinstimmung mit dem GPMT, wenn nur Substanzen mit einem $EC_{50}$ unter 1000 µmol/L als potenziell sensibilisierend eingestuft werden. Eine Diskrepanz zwischen den Ergebnissen beider Versuchsmethoden liegt bei Ölsäure vor. Während im GPMT nur 2 von 10 Versuchstieren Reaktionen zeigen, führen im LCSA bereits Konzentrationen von unter 10 µmol/L zu deutlicher Induktion der CD86-Expression (Kreiling et al. 2008).

Im Vergleich mit dem LLNA (Kreiling et al. 2008) führen die ungesättigten Fettsäuren Ölsäure, Linolsäure und Linolensäure sowohl zu einer starken Stimulation der Lymphknoten im LLNA, als auch zu einem Anstieg von CD86 bei bereits geringen Konzentrationen im LCSA. Bernsteinsäure und Fumarsäure erreichen im LLNA nur Stimulationsindizes (SI) von 1,3 bzw. 2,3 (Kreiling et al. 2008) und vermögen CD86 im LCSA nicht signifikant zu induzieren. Undecylensäure stimuliert die Immunzelle in beiden Versuchen, jedoch in geringerem Maße als die anderen ungesättigten Fettsäuren. Abbildung 5-1 lässt die Diskrepanz zwischen den beiden Versuchsmethoden bei Octinol und Maleinsäure erkennen. Diese beiden Substanzen bewirken erst in hohen Konzentrationen einen Anstieg von CD86 im LCSA ($EC_{50}$: 1002 bzw. 1983 µmol/L). Im LLNA hingegen erweist sich Maleinsäure als die Substanz, welche zur stärksten Stimulation der Lymphknoten führt (SI: 16,1; Kreiling et al. 2008). Der Effekt von Octinol liegt nur geringfügig darunter (SI: 11,2).

**Tabelle 5-1.** Vergleich der Ergebnisse im LCSA, LLNA und GPMT (Kreiling et al. 2008).

| Testsubstanzen | LCSA ($EC_{50}$ in µmol/L) | LLNA* | | GPMT** |
|---|---|---|---|---|
| | | SI | EC3 (in %) | |
| Arachidonsäure | 2 | ------ | nicht untersucht | ------ |
| Linolsäure | 3 | 9,1 | 14,1 | nicht beurteilbar*** |
| Ölsäure | 5 | 14,9 | 10,5 | 2/10 |
| Linolensäure | 10 | 10,3 | 9,5 | nicht untersucht**** |
| Undecylensäure | 247 | 4,4 | 19,4 | 4/10 |
| Octinol | 1002 | 11,2 | 4,3 | 0/10 |
| Maleinsäure | 1983 | 16,1 | 3,5 | 0/10 |
| Fumarsäure***** | (1514) | 2,3 | - | 0/10 |
| Bernsteinsäure | - | 1,3 | - | 0/10 |
| Squalen | nicht löslich | 8,2 | 7,1 | 2/10 |

SI: Maximale Lymphknotenstimulation im LLNA im Vergleich zur Gruppe der Negativkontrollen.

EC3: Nachträglich kalkulierte Konzentration, die im LLNA rechnerisch zu einem Anstieg der Lymphknotenstimulation auf das Dreifache führt.

* Resultate im LLNA werden als positiv erachtet, wenn ein Stimulationsindex (SI) von mindestens 3 erreicht wird (Kreiling et al. 2008).

** Resultate im GPMT werden als positiv erachtet, wenn bei mindestens 3 von 10 Versuchstieren reproduzierbare Hautreaktionen nachweisbar sind (Kreiling et al. 2008).

*** Resultate für Linolsäure nicht auswertbar, da viele positive Reaktionen in der Kontrollgruppe (Kreiling et al. 2008).

**** Für Linolensäure konnte in der Studie von Kreiling et al. (2008) aus technischen Gründen kein Re-Challenge durchgeführt werden.

***** Fumarsäure führt im LCSA nur in einer Konzentration (2000 µmol/L) zu einem geringgradigen Anstieg der CD86-Expression.

**Tabelle 5-2.** Theoretische Kategorisierung der Testsubstanzen nach den Ergebnissen im LCSA, LLNA und GPMT. Vergleiche dazu Kreiling et al. 2008. Für den LCSA werden hier nur Ergebnisse mit einem $EC_{50}$ unter 1000 µmol/L als positiv bewertet.

| Testsubstanzen | LCSA | LLNA | GPMT |
|---|---|---|---|
| Arachidonsäure | + | nicht untersucht | nicht untersucht |
| Linolsäure | + | + | nicht beurteilbar |
| Ölsäure | + | + | -- |
| Linolensäure | + | + | nicht untersucht |
| Undecylensäure | + | + | + |
| Octinol | --* | + | -- |
| Maleinsäure | --* | + | -- |
| Fumarsäure | --* | -- | -- |
| Bernsteinsäure | -- | -- | -- |
| Squalen | nicht beurteilbar | + | -- |

\+ positiv

-- negativ

* Die $EC_{50}$-Werte von Octinol, Maleinsäure und Fumarsäure liegen über 1000 µmol/L (1002, 1983 bzw. 1514 µmol/L) und werden hier daher als negativ gewertet.

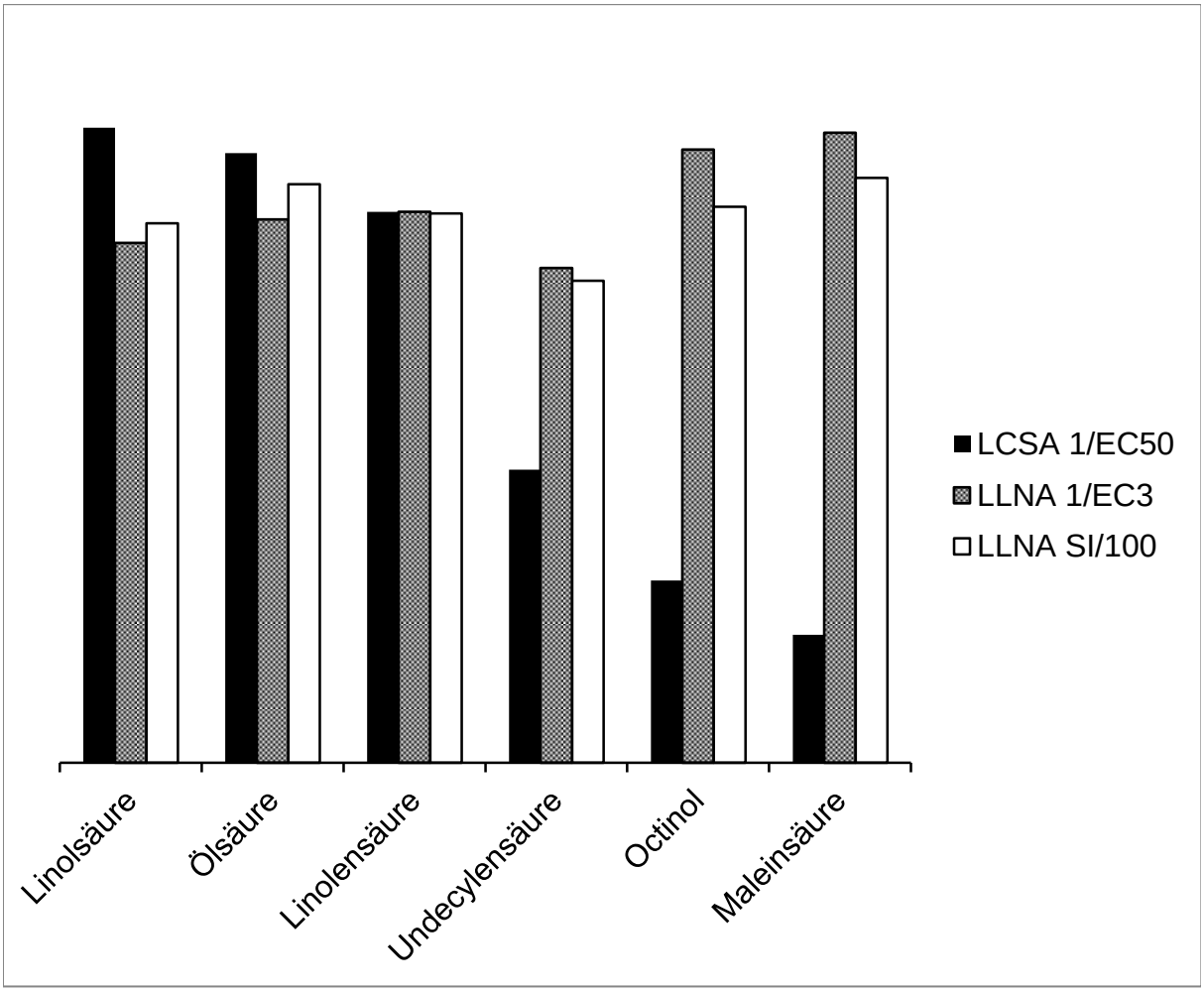



**Abbildung 5-1.** Grafischer Vergleich des ermittelten Sensibilisierungspotenzials von sechs der zehn Testsubstanzen im LCSA und LLNA. Hierbei zeigt sich eine Diskrepanz zwischen beiden Versuchsmethoden bei Octinol und Maleinsäure, sowie in geringerem Maße bei Octinol. Zur Darstellung werden die Kehrwerte des $EC_{50}$ (LCSA) und EC3 (LLNA) sowie der hundertste Teil des SI (LLNA) verwendet. Die Balkengröße basiert auf einer logarithmischen Skala.

## 5.2 Diskussion der Substanzen

Die vier ungesättigten Fettsäuren Arachidonsäure, Linolsäure, Linolensäure und Ölsäure demonstrieren in den hier vorliegenden Untersuchungen größeres Potenzial zur Induktion von CD86 und Zytotoxizität als die anderen Testsubstanzen. Dies steht im Einklang mit den Ergebnissen im LLNA, in dem eine deutliche Stimulation der Lymphknoten beobachtet werden kann (Kreiling et al. 2008). Im GPMT konnten keine Ergebnisse zu Linolsäure und Linolensäure gewonnen werden (siehe Tabelle 5-1), so dass Ölsäure die einzige der Fettsäuren ist, zu der Daten aus dem GPMT vorliegen (Kreiling et al. 2008). Linolsäure konnte bei der genannten Studie nicht untersucht werden, da es zu vermehrten positiven Reaktionen in der Kontrollgruppe kam. Hier zeigte sich im Tierversuch eine Störanfälligkeit, die die Gewinnung von verwertbaren Resultaten verhinderte. Bei den Versuchen mit Linolensäure im GPMT konnte aus technischen Gründen kein Re-Challenge durchgeführt werden (Kreiling et al. 2008). Ölsäure wiederum führte bei zwei von zehn Versuchstieren zu reproduzierbaren Hauterscheinungen, während für eine Bewertung als „sensibilisierend“ Reaktionen bei mindestens 30 % der Versuchstiere benötigt werden (OECD 1992b).

Ungesättigte Fettsäuren spielen eine wichtige Rolle bei Entzündungsreaktionen. So hemmen mit der Nahrung aufgenommene Ω-3-Fettsäuren (zum Beispiel in Fischöl) die Entzündungsaktivität, worauf die gesundheitsfördernde Wirkung zurückgeführt wird (Rangel-Huerta et al. 2012). Fettsäuren beeinflussen das inflammatorische Geschehen auf verschiedenen Wegen. Sie sind metabolische Vorläufer der Eicosanoide (Prostaglandine, Thromboxane und Leukotriene), verändern die Zusammensetzung und Eigenschaften der Zellmembranen (einschließlich der Oberflächenmoleküle), und modulieren über die sogenannten Peroxisom-Proliferator-aktivierten Rezeptoren (PPAR) die Genexpression (Zurier 1993; Hwang 2000). Des Weiteren sind sie in der Lage die Proteinkinase C zu aktivieren (Murakami und Routtenberg 1985) und üben Einfluss auf die monozytäre Sekretion von Zytokinen aus (Baldie et al. 1993). Auch die Hemmung des entzündungsfördernden Transkriptionsfaktors NF-κB (nuclear factor 'kappa-light-chain-enhancer' of activated B-cells) ist beschrieben worden (Draper et al. 2011).

Physiologisch können diese ungesättigten Fettsäuren in Phospholipiden der Zellmembranen gefunden werden (Khaw et al. 2012). Durch Phospholipasen werden sie aus der Zellmembran freigesetzt und dienen als Vorläufer für Eicosanoide (Alvarez et al. 2010). Je nachdem welche Fettsäuren von den Zellen verwendet werden entscheidet sich, welche Eicosanoide resultieren und ob die inflammatorische oder anti-inflammatorische Wirkung überwiegt. Ein Zusammenhang zwischen der Aktivität der Cyclooxygenase 2 (COX-2) und der Expression von CD86 dendritischer Zellen wird angenommen (Lambrechts et al. 2011). Dabei ist zu bedenken, dass der Metabolismus von Eicosanoiden in dendritischen Zellen noch wenig untersucht worden ist (Peters-Golden et al. 2005).

In unseren Untersuchungen führten vier der ungesättigten Fettsäuren zu Induktion von CD86 und Zytotoxizität bei den niedrigsten Konzentrationen aller hier getesteten Substanzen. Dabei ist unklar, in welchem Maße eine vermehrte Synthese von Eicosanoiden eine Rolle spielt, oder ob Veränderungen der Zellmembranen bzw. der Genexpression mittels Aktivierung von PPAR hauptsächlich verantwortlich sind. Die Rolle der Kohlenstoff-Doppelbindungen bleibt dabei unklar. Ein Effekt auf die Zellmembranen, zum Beispiel mittels Beeinflussung der sogenannten „lipid rafts“, ist denkbar. Es handelt sich bei diesen um nanometergroße Ansammlungen von Cholesterol und Sphingolipiden, die für Rezeptormoleküle und die Fluidität der Zellmembranen von Bedeutung sind (Shaikh 2012). Weitere Untersuchungen, zum Beispiel der Konzentrationen von Prostaglandinen oder anderen Eicosanoiden, könnten hier auf Basis des LCSA angestrebt werden, um den Zusammenhang zwischen ungesättigten Fettsäuren und der Expression von CD86 aufzuklären.

Bei einer Literaturrecherche mit der Literaturdatenbank PubMed konnten keine Berichte über Sensibilisierung durch die hier verwendeten Fettsäuren gefunden werden (http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/ - Zugriff am 04.05.2013). Die irritative Wirkung bei Hautapplikation dieser Fettsäuren ist bekannt (Ben-Shabat et al. 2007; Stillman et al. 1975).

Neben den Substanzen, die von Kreiling et al. (2008) im LLNA und GPMT untersucht worden sind, wurde im LCSA zusätzlich Arachidonsäure in die Untersuchungen aufgenommen. Die ihr verwandten ungesättigten Fettsäuren Ölsäure, Linolsäure und

Linolensäure zeigen Auswirkungen im LCSA auf CD86-Expression und Vitalität bei niedrigeren Konzentrationen als andere untersuchte Substanzen. Bisher sind keine Untersuchungen von Arachidonsäure mit dem LLNA oder GPMT publiziert worden (http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/ - Zugriff am 04.05.2013). Die Wirkungen hinsichtlich Induktion der CD86-Expression und Irritation liegen im gleichen Konzentrationsbereich wie bei Ölsäure, Linolsäure und Linolensäure. Die kalkulierten Werte für $EC_{50}$ und $EC_{50\%}$ liegen mit 2 bzw. 7 µmol/L unterhalb der anderen Substanzen. Arachidonsäure ist der potenteste Induktor von CD86 und Zytotoxizität im LCSA unter den Testsubstanzen.

In unseren Untersuchungen erreicht Linolsäure die zweitniedrigsten $EC_{50}$- und $EC_{50\%}$-Werte nach Arachidonsäure. Im LLNA ist die Wirkung mit einem SI von 9,1 und einem EC3 von 14,1 % schwächer als die von Linolensäure und Ölsäure (Kreiling et al. 2008). Die Untersuchungen im GPMT konnten nicht ausgewertet werden, da es zu einer hohen Zahl von positiven Reaktionen in der Kontrollgruppe gekommen ist. Linolsäure ist stärker irritativ als Ölsäure und Linolensäure (Ben-Shabat et al. 2007; Stillman et al. 1975).

Von den hier untersuchten ungesättigten Fettsäuren ergibt sich für Linolensäure ein $EC_{50}$ von 10 µmol/L. Dieser liegt höher als der von Arachidonsäure, Linolsäure und Ölsäure, aber mit Abstand unterhalb der anderen Testsubstanzen. Im LLNA erreicht Linolensäure den niedrigsten EC3 (9,5 %) aller ungesättigten Fettsäuren (Kreiling et al. 2008). Der SI liegt mit 10,3 zwischen Ölsäure und Linolsäure. Im GPMT konnten aus technischen Gründen kein Re-Challenge durchgeführt werden (Kreiling et al. 2008).

Linolensäure ist eine essenzielle Ω-3-Fettsäure (Stark et al. 2008). Für diese Gruppe von Fettsäuren wird eine antiinflammatorische Wirkung und Verminderung des Risikos für kardiovaskuläre Erkrankungen angenommen (Allayee et al. 2009). Andere Untersuchungen haben eine Verminderung von CD86 durch die Ω-3-Fettsäuren Eicosapentaensäure und Docosahexaensäure in einer Kultur von humanen dendritischen Zellen (Wang et al. 2007) und eine Verhinderung der Hochregulierung von CD86 durch Docosahexaensäure in dendritischen Zellen aus dem Knochenmark von Mäusen ergeben (Kong et al. 2010). Möglicherweise führt Linolensäure hier zu einer von den anderen Ω-3-Fettsäuren (Eicosapentaensäure bzw. Docosahexaensäure)

verschiedenen Wirkung. Auch gibt es Hinweise, dass Linolensäure möglicherweise nicht dieselben günstigen Wirkungen für Herz und Kreislauf wie andere Ω-3-Fettsäuren hervorruft (Wang et al. 2006). Diese Einschätzung ist jedoch nicht unumstritten (Mozaffarian 2005; Pan et al. 2012).

Im LLNA ist Ölsäure in der Lage, mit einem maximalen SI von 14,9 die zweitstärkste Stimulation der Lymphknotenzellen nach Maleinsäure auszulösen (Kreiling et al. 2008). Der kalkulierte EC3 liegt bei 10,5 %. Im GPMT ist eine Hautreaktion jedoch nur in zwei von zehn Meerschweinchen reproduzierbar. Im LCSA wird ein deutlicher Anstieg von CD86 bei niedrigen Konzentrationen gemessen ($EC_{50}$: 5 µmol/L).

Undecylensäure ist die einzige der untersuchten Substanzen, die in allen drei Testverfahren ein positives Ergebnis vorweist. Sie ist die einzige positive Substanz im GPMT mit reproduzierbaren Hautreaktionen bei vier von zehn Meerschweinchen (Kreiling et al. 2008; siehe Tabelle 5-1). Im LLNA zeigt sie die schwächste aller positiven Reaktionen (SI: 4,4 und EC3: 19,4 %). Im LCSA steigt der Oberflächenmarker CD86 erst bei Konzentrationen an, die deutlich über denen der anderen ungesättigten Fettsäuren liegen ($EC_{50}$: 247 µmol/L).

Undecylensäure ist eine einfach ungesättigte Fettsäure, die aus Rizinusöl gewonnen wird. Sie ist Bestandteil von verschiedenen Kosmetikprodukten, einschließlich Anti-Schuppen Shampoos. Undecylensäure wird auch zur Behandlung kutaner Pilzinfektionen und Onychomykosen verwendet (Chretien et al. 1980; Rehder und Nguyen 2008). Hautirritative Eigenschaften von Undecylensäure sind dokumentiert worden (Pappinen et al. 2005). Des Weiteren wurden vereinzelte Fälle von allergischer Kontaktdermatitis beschrieben (Anguita et al. 2002; Gelfarb und Leider 1960).

Octinol und Maleinsäure führen im LLNA zu einer ausgeprägten Stimulation der Lymphknoten (SI: 11,2 bzw. 16,1). Die entsprechenden EC3-Konzentrationen liegen bei 4,3 bzw. 3,5 % (Kreiling et al 2008). Im GPMT konnten jedoch bei keinem der Versuchstiere Hautreaktionen ausgelöst werden. Im LCSA wurde zwar ein Anstieg von CD86 beobachtet, der jedoch erst bei höheren Konzentrationen zum Tragen kommt ($EC_{50}$ über 1000 µmol/L). Dabei bleibt offen, ob diese *in vitro* hergestellten Konzentrationen in der menschlichen Haut bei den üblichen Expositionen überhaupt

erreicht werden können. Die Tatsache, dass eine Sensibilisierung erst unter hohen Konzentrationen eintritt, könnte für die unterschiedlichen Ergebnisse zwischen LLNA und GPMT verantwortlich sein (siehe Tabelle 5-1 und Abbildung 5-1; Kreiling et al. 2008). Im Vergleich mit den Ergebnissen im GPMT und LCSA erscheint es möglich, dass Octinol und Maleinsäure im LLNA falsch-positiv sind.

Fumarsäure und Bernsteinsäure sind als einzige der Testsubstanzen in allen drei Testverfahren negativ. Im LLNA werden nur SI von 2,3 bzw. 1,3 erreicht (Kreiling et al. 2008). Im GPMT kann mit keiner der beiden Substanzen eine Hautreaktion ausgelöst werden. Ebenso zeigt sich im LCSA kein signifikanter, reproduzierbarer Anstieg von CD86. Lediglich Fumarsäure zeigt bei einer Konzentration (2000 µmol/L) einen geringgradigen Anstieg der CD86-Expression auf das 1,35-fache (siehe Abbildung 4-7).

Squalen ist im LLNA positiv (SI: 8,2 und EC3: 7,1 %), führt im GPMT aber nur bei zwei von zehn Versuchstieren zu reproduzierbaren Hautreaktionen (Kreiling et al. 2008). Im LCSA kann diese Substanz mangels Löslichkeit im Medium nicht untersucht werden. Auch die Verwendung verschiedener Lösungsmittel konnte hier keine Abhilfe schaffen.

Squalen kommt in Nahrungsmitteln vor, zum Beispiel in Olivenöl (Newmark 1997) und wird als Adjuvans für Impfstoffe angewendet (zum Beispiel in MF59). Untersuchungen im Patch-Test konnten keine Sensibilisierung hervorrufen (Anonym 1982).

## 5.3 Korrelation von $EC_{50}$ & $EC_{50\%}$

Untersuchungen von Textilfarbstoffen im LCSA haben keine Korrelation zwischen dem Anstieg von CD86 und der Zytotoxizität ergeben (Sonnenburg et al. 2012). Bei den Ergebnissen der vorliegenden Untersuchung kann jedoch festgestellt werden, dass die Zytotoxizität der CD86-induzierenden Substanzen mit erhöhten CD86-Werten korreliert (siehe Abbildungen 4-1 bis 4-9).

## 5.4 Limitationen des LCSA

Bei der Durchführung und Auswertung des LCSA müssen einige Limitationen beachtet werden. Speziell betreffen diese die Wahl des Biomarkers, die Löslichkeit der Testsubstanzen und die Übertragbarkeit der Ergebnisse auf die *in vivo*-Situation.

Als Biomarker für das Sensibilisierungspotenzial wird im LCSA CD86 verwendet. Dieser ist bereits ausführlich untersucht worden und zeigt Potenzial für die Verwendung in Sensibilisierungstestmethoden (Dos Santos et al. 2009). Dieses Oberflächenmolekül wird im Rahmen der Aktivierung und Reifung von dendritischen Zellen vermehrt exprimiert und dient beim Kontakt mit T-Zellen als ko-stimulatorisches Signal (Ryan et al. 2007). CD86 vermittelt jedoch nicht nur immunogene Signale über Bindung an CD28, sondern auch tolerogene Signale über das zytotoxische T-Lymphozytenantigen 4 (CTLA4) (Reis e Sousa 2006). Auch scheinen metallische Kontaktallergene wie Nickel keine Auswirkung auf CD86 zu haben, so dass in diesem Fall die alternativen Parameter IL-6 und CCL4 herangezogen werden müssen (Schreiner et al. 2008).

Im Rahmen unserer Untersuchungen zeigen sich bei Squalen Probleme mit der Löslichkeit im Medium. Versuche mit verschiedenen Lösungsmitteln wie DMSO, Ethanol und Methanol resultieren stets in der Bildung von makroskopisch sichtbaren Mizellen bis hinunter zu Konzentrationen von 10 µmol/L in der Zellkultur. Daher kann die tatsächliche Konzentration von Squalen an der Zelloberfläche nicht eingeschätzt werden. Eine mögliche Erklärung dafür besteht darin, dass Squalen als einzige der getesteten lipophilen Substanzen über keine Hydroxyl-Gruppe verfügt. Dies führt zu einer verminderten Löslichkeit in polaren Lösungsmitteln wie zum Beispiel Wasser (Renard et al. 2005).

Im Gegensatz zum zellreichen, geschichteten Milieu der Epidermis bestehen *in vitro*-Tests wie der LCSA in erster Linie aus Zellsuspensionen. Die Zellen befinden sich in direktem Kontakt mit dem wässrigen Medium; eine extrazelluläre Matrix bildet sich nicht in der gleichen Form wie im Organismus. Die räumliche Organisation der Gewebe und der Einfluss anderer Zelltypen als Keratinozyten und dendritische Zellen werden nicht durch den Versuchsaufbau erfasst. Eine Folge davon könnte zum Beispiel die

Überschätzung des Sensibilisierungspotenzials von eingeschränkt hautpenetrierenden Substanzen durch *in vitro*-Tests sein (Wanner et al. 2010).

## 5.5 Kategorisierung von sensibilisierendem Potenzial

Zur Kategorisierung einer (toxikologischen) Wirkung werden Grenzwerte benötigt, die eine Einteilung aller betreffenden Substanzen erlauben. Diese werden in der Regel nach praktischen Gesichtspunkten festgelegt, um den Vergleich verschiedener Substanzen zu erlauben.

Nach den ersten Erfahrungen mit dem LCSA sind bereits Schwellenwerte zur Kategorisierung des sensibilisierenden und irritativen Potenzials vorgeschlagen worden (Wanner et al. 2010). Beispiele können der Tabelle 5-3 entnommen werden.

**Tabelle 5-3.** Vorgeschlagene Einteilung des Sensibilisierungspotentials anhand der $EC_{50}$-Werte im LCSA (Wanner et al. 2010).

| Sensibilisierungspotenzial | $EC_{50}$ |
|---|---|
| schwach | > 100 µmol/L |
| mittel | 50 – 100 µmol/L |
| stark | < 50 µmol/L |

Bei der Anwendung dieser Einteilung auf die vorliegenden Resultate fallen die ungesättigten Fettsäuren Arachidonsäure, Linolsäure, Ölsäure und Linolensäure unter die Gruppe der „starken“ Kontaktallergene. Undecylensäure, Octinol und Bernsteinsäure wären hingegen als schwach sensibilisierend einzustufen. Die übrigen Testsubstanzen konnten keinen signifikanten, reproduzierbaren Anstieg von CD86 bewirken.

Bei der Kategorisierung der Ergebnisse der vorliegenden Studie treten jedoch Probleme auf. Da die niedrigste Kategorie („schwach sensibilisierend“) als ein $EC_{50}$ größer als 100 µmol/L definiert ist, werden die unterschiedlich starken Wirkungen von

Undecylensäure, Octinol und Bernsteinsäure nicht berücksichtigt, obwohl sie mit $EC_{50}$-Werten von 247, 1002 und 1983 µmol/L weit auseinander liegen. Auch wird die dermale Bioverfügbarkeit von potenziellen Kontaktallergenen durch die Größe der Moleküle und ihren Verteilungskoeffizienten (in Wasser und Öl) beeinflusst. Diese den Substanzen inhärenten Eigenschaften bestimmen welche Konzentrationen unter erwartbaren Expositionen erreicht werden können. Wenn eine Induktion von CD86 nur bei Konzentrationen beobachtet wird, die jenseits erwartbarer dermaler Konzentrationen liegt, so wäre auch eine solche Substanz als „nicht sensibilisierend“ einzustufen. Dem trägt die vorgeschlagene Kategorisierung nicht Rechnung (siehe Tabelle 5-3). Unter den ermittelten $EC_{50}$-Werten stellt sich insbesondere bei Octinol und Maleinsäure die Frage, ob die für den Anstieg von CD86 relevanten hohen Konzentrationen ($EC_{50}$ von 1002 bzw. 1983 µmol/L) unter normalen Umständen *in vivo* überhaupt erreicht werden können. Um diese Fragen zu klären, sollten die *in vitro* gewonnenen Erkenntnisse zur Risikoeinschätzung mit Untersuchungen zur epidermalen Bioverfügbarkeit (Davies et al. 2011) und Daten zu Konzentrationen der Substanzen in Kosmetika verglichen werden, soweit diese verfügbar sind.

## 5.6 Fazit

Die Identifikation von Allergenen mit dem LCSA hat bei den bisher durchgeführten Versuchen eine hohe Übereinstimmung mit den vorhandenen Daten aus Tierversuchen und Studien mit menschlichen Probanden gezeigt. Darunter befinden sich verschiedene bekannte Allergene (TNBS, Zimtaldehyd und Dinitrochlorbenzol), Prohaptene, Irritanzien (zum Beispiel Natriumlaurylsulfat und Zink) und Textilfarbstoffe (Schreiner et al. 2007; Schreiner et al. 2008; Wanner et al. 2010; Sonnenburg et al. 2012). Das respiratorische Allergen Trimellitsäureanhydrid führt nicht zu einem Anstieg zu CD86 (Wanner et al. 2010). Für die Identifikation von metallischen Allergenen (Nickel, Cobalt) haben sich IL-6 und CCL4 als geeignete Alternativen zu CD86 erwiesen (Schreiner et al. 2008).

Auch die hier untersuchte Gruppe von Substanzen mit ungesättigten Kohlenstoffverbindungen demonstriert Ergebnisse im LCSA, die weitestgehend mit denen im GPMT sowie der Literatur vereinbar sind. Eine Ausnahme stellen die ungesättigten Fettsäuren dar. Es sind keine weiteren Berichte über ein kontaktallergisches Potenzial dieser Substanzen bekannt. Daher kann ihre starke Induktion von CD86 als falsch-positives Ergebnis im LCSA angesehen werden. Der dafür verantwortliche Mechanismus ist unklar und könnte zum Beispiel durch die Messung der Konzentrationen von Eicosanoiden im LCSA näher analysiert werden. Auch könnte untersucht werden, ob weitere Marker der Reifung dendritischer Zellen in Gegenwart von ungesättigten Fettsäuren vermehrt exprimiert werden, darunter MHC-(major histocompatibility complex-)Moleküle, CD40, CD80 und CD83 (Reis e Sousa 2006). Möglicherweise kann die Spezifität des LCSA durch die Verwendung anderer Biomarker als CD86 oder einer Kombination von verschiedenen Endpunkten optimiert werden. In Frage kommen zum Beispiel CD1a oder Zytokine wie IL-8 (Dos Santos et al. 2009).

Im Vergleich mit dem LLNA und GPMT ist Undecylensäure die einzige der hier untersuchten Substanzen, die in allen drei Testmethoden zu positiven Ergebnissen führt. In Anbetracht der vorliegenden Resultate und der geringen Zahl an Fallberichten über Sensibilisierungen handelt es sich am ehesten um ein schwaches Allergen. Des Weiteren erhärtet sich durch die Ergebnisse im LCSA der Verdacht, dass der LLNA zumindest bei Octinol und Maleinsäure zu falsch-positiven Resultaten führt.

# 6 Literaturverzeichnis


Aeby P, Ashikaga T, Bessou-Touya S, Schepky A, Gerberick F, Kern P, Marrec-Fairley M, Maxwell G, Ovigne JM, Sakaguchi H, Reisinger K, Tailhardat M, Martinozzi-Teissier S, Winkler P. Identifying and characterizing chemical skin sensitizers without animal testing: Colipa's research and method development program. *Toxicol In Vitro* 2010;24:1465-1473.

Allayee H, Roth N, Hodis HN. Polyunsaturated fatty acids and cardiovascular disease: implications for nutrigenetics. *J Nutrigenet Nutrigenomics* 2009;2:140-148.

Alvarez Y, Valera I, Municio C, Hugo E, Padrón F, Blanco L, Rodríguez M, Fernández N, Crespo MS. Eicosanoids in the innate immune response: TLR and non-TLR routes. *Mediators Inflamm* 2010;2010:201929.

Anderson SE, Siegel PD, Meade BJ. The LLNA: A brief review of recent advances and limitations. *J Allergy (Cairo)* 2011;2011:424203.

Angers-Lostau A, Tosti L, Casati S. The regulatory use of the local lymph node assay for the notification of new chemicals in Europe. *Regul Toxicol Pharmacol* 2011;60:300-307.

Anguita JL, Escutia B, Marí JI, Rodríguez M, De La Cuadra J, Aliaga A. Allergic contact dermatitis from undecylenic acid in a commercial antifungal nail solution. *Contact Dermatitis* 2002;46:109.

Anonym. Final report on the safety assessment of squalane and squalene. *Int J Toxicol* 1982;1:37-56.

Ashikaga T, Hoya M, Itagaki H, Katsumura Y, Aiba S. Evaluation of CD86 expression and MHC class II molecule internalization in THP-1 human monocyte cells as predictive endpoints for contact sensitizers. *Toxicol In Vitro* 2002;16:711-716.

Baldie G, Kaimakamis D, Rotondo D. Fatty acid modulation of cytokine release from human monocytic cells. *Biochim Biophys Acta* 1993;1179:125-133.

Ball N, Cagen S, Carrillo JC, Certa H, Eigler D, Emter R, Faulhammer F, Garcia C, Graham C, Haux C, Kolle SN, Kreiling R, Natsch A, Mehling A. Evaluating the sensitization potential of surfactants: integrating data from the local lymph node assay, guinea pig maximization test, and in vitro methods in a weight-of-evidence approach. *Regul Toxicol Pharmacol* 2011;60:389-400.

Basketter D. In vitro approaches to the identification and characterization of skin sensitizers. *Cutan Ocul Toxicol* 2007;26:359-373.

Basketter DA. Skin sensitization: strategies for the assessment and management of risk. *Br J Dermatol* 2008;159:267-273.

Basketter DA. The human repeated insult patch test in the 21st century: a commentary. *Cutan Ocul Toxicol* 2009;28:49-53.

Basketter DA, Kimber I. Information derived from sensitization test methods: test sensitivity, false positives and false negatives. *Contact Dermatitis* 2007;56:1-4.

Basketter DA, Kimber I. Updating the skin sensitization in vitro data assessment paradigm in 2009. *J Appl Toxicol* 2009;29:545-550.

Basketter DA, Gerberick GF, Kimber I. Strategies for identifying false positive responses in predictive skin sensitization tests. *Food Chem Toxicol* 1998;36:327-333.

Basketter DA, Jefferies D, Safford BJ, Gilmour NJ, Jowsey IR, McFadden J, Chansinghakul W, Duangdeeden I, Kullavanijaya P. The impact of exposure variables on the induction of skin sensitization. *Contact Dermatitis* 2006;55:178-185.

Basketter D, Pease C, Kasting G, Kimber I, Casati S, Cronin M, Diembeck W, Gerberick F, Hadgraft J, Hartung T, Marty JP, Nikolaidis E, Patlewicz G, Roberts D, Roggen E, Rovida C, van de Sandt J. Skin sensitisation and epidermal disposition: the relevance of epidermal disposition for sensitisation hazard identification and risk assessment. *Altern Lab Anim* 2007;35:137-154.

Basketter DA, McFadden JF, Gerberick F, Cockshott A, Kimber I. Nothing is perfect, not even the local lymph node assay: a commentary and the implications for REACH. *Contact Dermatitis* 2009;60:65-69.

Bauch C, Kolle SN, Fabian E, Pachel C, Ramirez T, Wiench B, Wruck CJ, van Ravenzwaay B, Landsiedel R. Intralaboratory validation of four in vitro assays for the prediction of the skin sensitizing potential of chemicals. *Toxicol In Vitro* 2011;25:1162-1168.

Beltrani VS, Beltrani VP. Contact dermatitis. *Ann Allergy Asthma Immunol* 1997;78:160-173.

Ben-Shabat S, Baruch N, Sintov AC. Conjugates of unsaturated fatty acids with propylene glycol as potentially less-irritant skin penetration enhancers. *Drug Dev Ind Pharm* 2007;33:1169-1175.

Bergström MA, Ott H, Carlsson A, Neis M, Zwadlo-Klarwasser G, Jonsson CA, Merk HF, Karlberg AT, Baron JM. A skin-like cytochrome P450 cocktail activates prohaptens to contact allergenic metabolites. *J Invest Dermatol* 2007;127:1145-1153.

BGB 2009. Berufskrankheiten-Verordnung. Anlage 1. *BGBl. I* 1997:2625-2626.

Boukhman MP, Maibach HI. Thresholds in contact sensitization: immunologic mechanisms and experimental evidence in humans – an overview. *Food Chem Toxicol* 2001;39:1125-1134.

Brasch J, Becker D, Aberer W, Bircher A, Kränke B, Denzer-Fürst S, Schnuch A. Contact dermatitis. *J Dtsch Dermatol Ges* 2007;10:943-951.

Cao YP, Ma PC, Liu WD, Zhou WQ, Tao Y, Zhang ML, Li LJ, Chen ZY. Evaluation of the skin sensitization potential of chemicals in THP-1/keratinocyte co-cultures. *Immunopharmacol Immunotoxicol* 2012;34:196-204.

Casati S, Aeby P, Kimber I, Maxwell G, Ovigne JM, Roggen E, Rovida C, Tosti L, Basketter D. Selection of chemicals for the development and evaluation of in vitro methods for skin sensitisation testing. *Altern Lab Anim* 2009;37:305-312.

Chretien JH, Esswein JG, Sharpe LM, Kiely JJ, Lyddon FE. Efficacy of undecylenic acid-zinc undecylenate powder in culture positive tinea pedis. *Int J Dermatol* 1980;19:51-54.

Cockshott A, Evans P, Ryan CA, Gerberick GF, Betts CJ, Dearman RJ, Kimber I, Basketter DA. The local lymph node assay in practice: a current regulatory perspective. *Hum Exp Toxicol* 2006;25:387-394.

Corsini E, Mitjans M, Galbiati V, Lucchi L, Galli CL, Marinovich M. Use of IL-18 production in a human keratinocyte cell line to discriminate contact sensitizers from irritants and low molecular weight respiratory allergens. *Toxicol In Vitro* 2009;23:789-796.

Davies M, Pendlington RU, Page L, Roper CS, Sanders DJ, Bourner C, Pease CK, MacKay C. Determining epidermal disposition kinetics for use in an integrated nonanimal approach to skin sensitization risk assessment. *Toxicol Sci* 2011;119:308-318.

Dean JH, Twerdok LE, Tice RR, Sailstad DM, Hattan DG, Stokes WS. ICCVAM Evaluation of the Murine Local Lymph Node Assay. II. Conclusions and recommendations of an independent scientific peer review panel. *Regul Toxicol Pharmacol* 2001;34:258-273.

Demchuk E, Ruiz P, Chou S, Fowler BA. SAR/QSAR methods in public health practice. *Toxicol Appl Pharmacol* 2011;254:192-197.

Dos Santos GG, Reinders J, Ouwehand K, Rustemeyer T, Scheper RJ, Gibbs S. Progress on the development of human in vitro dendritic cell based assays for assessment of the sensitizing potential of a compound. *Toxicol Appl Pharmacol* 2009;236:372-382.

Dos Santos GG, Spiekstra SW, Sampat-Sardjoepersad SC, Reinders J, Scheper RJ, Gibbs S. A potential in vitro epidermal equivalent assay to determine sensitizer potency. *Toxicol In Vitro* 2011;25:347-357.

Draper E, Reynolds CM, Canavan M, Mills KH, Loscher CE, Roche HM. Omega-3 fatty acids attenuate dendritic cell function via NF-κB independent of PPARγ. *J Nutr Biochem* 2011;22:784-790.

Ehling G, Hecht M, Heusener A, Huesler J, Gamer AO, van Loveren H, Maurer T, Riecke K, Ullmann L, Ulrich P, Vandebriel R, Vohr HW. An European inter-laboratory validation of alternative endpoints of the murine local lymph node assay: first round. *Toxicology* 2005a;212:60-68.

Ehling G, Hecht M, Heusener A, Huesler J, Gamer AO, van Loveren H, Maurer T, Riecke K, Ullmann L, Ulrich P, Vandebriel R, Vohr HW. An European inter-laboratory validation of alternative endpoints of the murine local lymph node assay: 2nd round. *Toxicology* 2005b;212:69-79.

Europäische Union, 2003. Directive 2003/15/EC of the European Parliament and the Council of 27 February 2003 amending Council Directive 76/768/EEC on the approximation of laws of the Member States relating to cosmetic products. *Off J Eur Union* 2003;46:26-35.

Europäische Union, 2006. Commission of the European Communities. Regulation (EC) No 1907/2006 of the European Parliament and of the Council of 18 December 2006 concerning the Registration, Evaluation, Authorisation and Restriction of Chemicals (REACH), establishing a European Chemicals Agency, amending Directive 1999/45/EC and repealing Council Regulation (EEC) No 793/93 and Commission Regulation (EC) No 1488/94 as well as Council Directive 76/769/EEC and Commission Directives 91/155/EEC, 93/67/EEC, 93/105/EC and 2000/21/EC. *Off J Eur Union* 2006;49:1-849.

Europäische Union, 2009. Regulation (EC) No 1223/2009 of the European Parliament and of the Council of 30 November 2009 on cosmetic products. *Off J Eur Union* 2009;52:59-209.

Fukunaga A, Khaskhely NM, Sreevidya CS, Byrne SN, Ullrich SE. Dermal dendritic cells, and not Langerhans cells, play an essential role in inducing an immune response. *J Immunol* 2008;180:3057-3064.

Geier J, Lessmann H, Frosch PJ, Pirker C, Koch P, Aschoff R, Richter G, Becker D, Eckert C, Uter W, Schnuch A, Fuchs T. Patch testing with components of water-based metalworking fluids. *Contact Dermatitis* 2003;49:85-90.

Gelfarb M, Leider M. Allergic eczematous contact dermatitis. Report of a case caused by sensitization to undecylenic acid and its zinc salt. *Arch Dermatol* 1960;82:642-643.

Gerberick GF, Cruse LW, Ryan CA. Local lymph node assay: differentiating allergic and irritant responses using flow cytometry. *Methods* 1999;19:48-55.

Gerberick GF, Vassallo JD, Bailey RE, Chaney JG, Morrall SW, Lepoittevin JP. Development of a peptide reactivity assay for screening contact allergens. *Toxicol Sci* 2004;81:332-343.

Gerberick GF, Ryan CA, Dearman RJ, Kimber I. Local lymph node assay (LLNA) for detection of sensitization capacity of chemicals. *Methods* 2007;41:54-60.

Grabbe S, Steinert M, Mahnke K, Schwartz A, Luger TA, Schwarz T. Dissection of antigenic and irritative effects of epicutaneously applied haptens in mice. Evidence that not the antigenic component but nonspecific proinflammatory effects of haptens determine the concentration-dependent elicitation of allergic contact dermatitis. *J Clin Invest* 1996;98:1158-1164.

Homey B, Von Schilling C, Blümel J, Schuppe HC, Ruzicka T, Ahr HJ, Lehmann P, Vohr HW. An integrated model for the differentiation of chemical-induced allergic and irritant skin reactions. *Toxicol Appl Pharmacol* 1998;153:83-94.

Hulette BC, Ryan CA, Gildea LA, Gerberick GF. Relationship of CD86 surface marker expression and cytotoxicity on dendritic cells exposed to chemical allergen. *Toxicol Appl Pharmacol* 2005;209:159-166.

Hwang D. Fatty acids and immune responses – a new perspective in searching for clues to mechanism. *Annu Rev Nutr* 2000;20:431-456.

Johansson H, Lindstedt M, Albrekt AS, Borrebaeck CA. A genomic biomarker signature can predict skin sensitizers using a cell-based in vitro alternative to animal tests. *BMC Genomics* 2011;12:399.

Jonker D, Freidig AP, de Hollander AE, Stierum RH, Woutersen RA, Feron VJ. Safety evaluation of chemical mixtures and combinations of chemical and non-chemical stressors. *Rev Environ Health* 2004;19:83-139.

Jowsey IR. Proactive surveillance of contact allergies: an important component of the risk management strategy for skin sensitizers. *Contact Dermatitis* 2007;56:305-310.

Jowsey IR, Basketter DA, Westmoreland C, Kimber I. A future approach to measuring relative skin sensitising potency: a proposal. *J Appl Toxicol* 2006;26:341-350.

Katsuta Y, Iida T, Inomata S, Denda M. Unsaturated fatty acids induce calcium influx into keratinocytes and cause abnormal differentiation of epidermis. *J Invest Dermatol* 2005;124:1008-1013.

Kehren J, Desvignes C, Krasteva M, Ducluzeau MT, Assossou O, Horand F, Hahne M, Kägi D, Kaiserlian D, Nicolas JF. Cytotoxicity Is mandatory for CD8+ T cell-mediated contact hypersensitivity. *J Exp Med* 1999;189:779-786.

Khaw KT, Friesen MD, Riboli E, Luben R, Wareham N. Plasma phospholipid fatty acid concentration and incident coronary heart disease in men and women: the EPIC-Norfolk prospective study. *PLoS Med* 2012;9:e1001255.

Kimber I, Weisenberger C. A murine local lymph node assay for the identification of contact allergens. *Arch Toxicol* 1989;63:274-282.

Kimber I, Hilton J, Dearman RJ, Gerberick GF, Ryan CA, Basketter DA, Scholes EW, Ladics GS, Loveless SE, House RV, Guy A. An international evaluation of the murine local lymph node assay and comparison of modified procedures. *Toxicology* 1995;103:63-73.

Kligman AM. The identification of contact allergens by human assay. 3. The maximization test: a procedure for screening and rating contact sensitizers. *J Invest Dermatol* 1966;47:393-409.

Kong W, Yen JH, Vassiliou E, Adhikary S, Toscano MG, Ganea D. Docosahexaenoic acid prevents dendritic cell maturation and in vitro and in vivo expression of the IL-12 cytokine family. *Lipids Health Dis* 2010;9:12.

Krasteva M, Peguet-Navarro J, Moulon C, Courtellemont P, Redziniak G, Schmitt D. In vitro primary sensitization of hapten-specific T cells by cultured human epidermal Langerhans cells – a screening predictive assay for contact sensitizers. *Clin Exp Allergy* 1996;26:563-570.

Kreiling R, Hollnagel HM, Hareng L, Eigler D, Lee MS, Griem P, Dreessen B, Kleber M, Albrecht A, Garcia C, Wendel A. Comparison of the skin sensitizing potential of unsaturated compounds as assessed by the murine local lymph node assay (LLNA) and the guinea pig maximization test (GPMT). *Food Chem Toxicol* 2008;46:1896-1904.

Lambrechts N, Nelissen I, Van Tendeloo V, Witters H, Van Den Heuvel R, Hooyberghs J, Schoeters G. Functionality and specificity of gene markers for skin sensitization in dendritic cells. *Toxicol Lett* 2011;203:106-110.

Lebre MC, Antons JC, Kalinski P, Schuitemaker JH, van Capel TM, Kapsenberg ML, de Jong EC. Double-stranded RNA-exposed human keratinocytes promote Th1 responses by inducing a type-1 polarized phenotype in dendritic cells: role of keratinocyte-derived tumor necrosis factor α, type I interferons, and interleukin-18. *J Invest Dermatol* 2003;120:990-997.

Lehé CL, Jacobs JJ, Hua CM, Courtellemont P, Elliott GR, Das PK. Subtoxic concentrations of allergenic haptens induce LC migration and maturation in a human organotypic skin explant culture model: a novel method for identifying potential contact allergens. *Exp Dermatol* 2006;15:421-431.

Löfstedt RE, Vogel D. The changing character of regulation: a comparison of Europe and the United States. *Risk Anal* 2001;21:399-416.

Lu LK, Warshaw EM, Dunnick CA. Prevention of nickel allergy: the case for regulation? *Dermatol Clin* 2009;27:155-161.

Lunder T, Kansky A. Increase in contact allergy to fragrances: patch-test results 1989-1998. *Contact Dermatitis* 2000;43:107-109.

Martin SF. Immunologie der Kontaktallergie. *Hautarzt* 2011;62:739-743.

Martin SF, Esser PR, Schmucker S, Dietz L, Naisbitt DJ, Park BK, Vocanson M, Nicolas JF, Keller M, Pichler WJ, Peiser M, Luch A, Wanner R, Maggi E, Cavani A, Rustemeyer T, Richter A, Thierse HJ, Sallusto F. T-cell recognition of chemicals, protein allergens and drugs: towards the development of in vitro assays. *Cell Mol Life Sci* 2010;67:4171-4184.

Martin SF, Esser PR, Weber FC, Jakob T, Freudenberg MA, Schmidt M, Goebeler M. Mechanisms of chemical-induced innate immunity in allergic contact dermatitis. *Allergy* 2011;66:1152-1163.

Maurer T. Guinea pigs in hypersensitivity testing. *Methods* 2007;41:48-53.

Merk HF, Abel J, Baron JM, Krutmann J. Molecular pathways in dermatotoxicology. *Toxicol Appl Pharmacol* 2004;195:267-277.

Montelius J, Wahlkvist H, Boman A, Fernström P, Gråbergs L, Wahlberg JE. Experience with the murine local lymph node assay: inability to discriminate between allergens and irritants. *Acta Derm Venereol* 1994;74:22-27.

Mozaffarian D. Does alpha-linolenic acid intake reduce the risk of coronary heart disease? A review of the evidence. *Altern Ther Health Med* 2005;11:24-30.

Murakami K, Routtenberg A. Direct activation of purified protein kinase C by unsaturated fatty acids (oleate and arachidonate) in the absence of phospholipids and Ca2+. *FEBS Lett* 1985;192:189-193.

Natsch A, Emter R, Ellis G. Filling the concept with data: integrating data from different in vitro and in silico assays on skin sensitizers to explore the battery approach for animal-free skin sensitization testing. *Toxicol Sci* 2009;107:106-121.

Natsch A, Bauch C, Foertsch L, Gerberick F, Norman K, Hilberer A, Inglis H, Landsiedel R, Onken S, Reuter H, Schepky A, Emter R. The intra- and inter-laboratory reproducibility and predictivity of the KeratinoSens assay to predict skin sensitizers in vitro: results of a ring-study in five laboratories. *Toxicol In Vitro* 2011;25:733-744.

Nestle FO, Di Meglio P, Qin JZ, Nickoloff BJ. Skin immune sentinels in health and disease. *Nat Rev Immunol* 2009;9:679-691.

Newmark HL. Squalene, olive oil, and cancer risk: a review and hypothesis. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* 1997;6:1101-1103.

Nicholson PJ, Llewellyn D, English JS. Evidence-based guidelines for the prevention, identification and management of occupational contact dermatitis and urticaria. *Contact Dermatitis* 2010;63:177-186.

Niebuhr M, Kapp A, Werfel T, Heratizadeh A. Kontaktallergie und Atopie. *Hautarzt* 2011;62:744-750.

OECD 1992a. OECD Guideline for the testing of chemicals No. 402: Acute Dermal Toxicity. Organisation for Economic Cooperation and Development, Paris, Frankreich.

OECD 1992b. Guideline for testing of chemicals No. 406, Skin Sensitisation. Organisation for Economic Cooperation and Development, Paris, Frankreich.

OECD 2010. OECD Guideline for the testing of chemicals No. 429: Skin Sensitisation: Local Lymph Node Assay, adopted 24th April. Organisation for Economic Cooperation and Development, Paris, Frankreich.

Pan A, Chen M, Chowdhury R, Wu JH, Sun Q, Campos H, Mozaffarian D, Hu FB. α-Linolenic acid and risk of cardiovascular disease: a systematic review and meta-analysis. *Am J Clin Nutr* 2012;96:1262-1273.

Pappinen S, Pasonen-Seppänen S, Suhonen M, Tammi R, Urtti A. Rat epidermal keratinocyte organotypic culture (ROC) as a model for chemically induced skin irritation testing. *Toxicol Appl Pharmacol* 2005;208:233-241.

Patlewicz G, Aptula AO, Uriarte E, Roberts DW, Kern PS, Gerberick GF, Kimber I, Dearman RJ, Ryan CA, Basketter DA. An evaluation of selected global (Q)SARs/expert systems for the prediction of skin sensitisation potential. *SAR QSAR Environ Res* 2007;18:515-541.

Pauwels M, Rogiers V. Human health safety evaluation of cosmetics in the EU: a legally imposed challenge to science. *Toxicol Appl Pharmacol* 2010;243:260-274.

Peiser M, Tralau T, Heidler J, Api AM, Arts JH, Basketter DA, English J, Diepgen TL, Fuhlbrigge RC, Gaspari AA, Johansen JD, Karlberg AT, Kimber I, Lepoittevin JP, Liebsch M, Maibach HI, Martin SF, Merk HF, Platzek T, Rustemeyer T, Schnuch A, Vandebriel RJ, White IR, Luch A. Allergic contact dermatitis: epidemiology, molecular mechanisms, in vitro methods and regulatory aspects. Current knowledge assembled at an international workshop at BfR, Germany. *Cell Mol Life Sci* 2012;69:763-781.

Peters-Golden M, Canetti C, Mancuso P, Coffey MJ. Leukotrienes: underappreciated mediators of innate immune responses. *J Immunol* 2005;174:589-594.

Pot LM, Scheitza SM, Coenraads PJ, Blömeke B. Penetration and haptenation of p-phenylenediamine. *Contact Dermatitis* 2013;68:193-207.

Python F, Goebel C, Aeby P. Assessment of the U937 cell line for the detection of contact allergens. *Toxicol Appl Pharmacol* 2007;220:113-124.

Rajan TV. The Gell-Coombs classification of hypersensitivity reactions: a re-interpretation. *Trends Immunol* 2003;24:376-379.

Rangel-Huerta OD, Aguilera CM, Mesa MD, Gil A. Omega-3 long-chain polyunsaturated fatty acids supplementation on inflammatory biomakers: a systematic review of randomised clinical trials. *Br J Nutr* 2012;107 Suppl.2:S159-170.

Rehder P, Nguyen TT. A new concept in the topical treatment of onychomycosis with cyanoacrylate, undecylenic acid, and hydroquinone. *Foot Ankle Spec* 2008;1:93-96.

Reis e Sousa C. Dendritic cells in a mature age. *Nat Rev Immunol* 2006;6:476-483.

Renard E, Poux A, Timbart L, Langlois V, Guérin P. Preparation of a novel artificial bacterial polyester modified with pendant hydroxyl groups. *Biomacromolecules* 2005;6:891-896.

Roberts DW, Aptula AO. Determinants of skin sensitisation potential. *J Appl Toxicol* 2008;28:377-387.

Ropeik DP. Risk Perception in toxicology – part I: moving beyond scientific instincts to understand risk perception. *Toxicol Sci* 2011;121:1-6.

Rougier N, Redziniak G, Mougin D, Schmitt D, Vincent C. In vitro evaluation of the sensitization potential of weak contact allergens using Langerhans-like dendritic cells and autologous T cells. *Toxicology* 2000;145:73-82.

Ryan CA, Kimber I, Basketter DA, Pallardy M, Gildea LA, Gerberick GF. Dendritic cells and skin sensitization: biological roles and uses in hazard identification. *Toxicol Appl Pharmacol* 2007;221:384-394.

Saint-Mezard P, Krasteva M, Chavagnac C, Bosset S, Akiba H, Kehren J, Kanitakis J, Kaiserlian D, Nicolas JF, Berard F. Afferent and efferent phases of allergic contact dermatitis (ACD) can be induced after a single skin contact with haptens: evidence using a mouse model of primary ACD. *J Invest Dermatol* 2003;120:641-647.

Sakaguchi H, Ryan C, Ovigne JM, Schroeder KR, Ashikaga T. Predicting skin sensitization potential and inter-laboratory reproducibility of a human Cell Line Activation Test (h-CLAT) in the European Cosmetics Association (COLIPA) ring trials. *Toxicol In Vitro* 2010;24:1810-1820.

Schäfer T, Böhler E, Ruhdorfer S, Weigl L, Wessner D, Filipiak B, Wichmann HE, Ring J. Epidemiology of contact allergy in adults. *Allergy* 2001;56:1192-1196.

Schnuch A. Genetik der Kontaktallergie. *Hautarzt* 2011;62:732-738.

Schnuch A, Brasch J, Uter W. Polysensitization and increased susceptibility in contact allergy: a review. *Allergy* 2008;63:156-167.

Schnuch A, Uter W, White IR. The EU clinical trials directive jeopardises consumer and occupational safety. *Contact Dermatitis* 2011a;65:251-253.

Schnuch A, Westphal G, Mössner R, Uter W, Reich K. Genetic factors in contact allergy – review and future goals. *Contact Dermatitis* 2011b;64:2-23.

Schreiner M, Peiser M, Briechle D, Stahlmann R, Zuberbier T, Wanner R. A loose-fit coculture of activated keratinocytes and dendritic cell-related cells for prediction of sensitizing potential. *Allergy* 2007;62:1419-1428.

Schreiner M, Peiser M, Briechle D, Stahlmann R, Zuberbier T, Wanner R. A new dendritic cell type suitable as sentinel of contact allergens. *Toxicology* 2008;249:146-152.

Shaikh SR. Biophysical and biochemical mechanisms by which dietary N-3 polyunsaturated fatty acids from fish oil disrupt membrane lipid rafts. *J Nutr Biochem* 2012;23:101-105.

Simonsson C, Andersson SI, Stenfeldt AL, Bergström J, Bauer B, Jonsson CA, Ericson MB, Broo KS. Caged fluorescent haptens reveal the generation of cryptic epitopes in allergic contact dermatitis. *J Invest Dermatol* 2011;131:1486-1493.

Skudlic C, Meyer E, Allmers H, Domagalski E, John SM. „Endemisches“ aerogenes allergisches Kontaktekzem? *Hautarzt* 2011;62:765-769.

Smith CM. Origin and uses of primum non nocere – above all, do no harm! *J Clin Pharmacol* 2005;45:371-377.

Sonnenburg A, Ahuja V, Schreiner M, Platzek T, Stahlmann R. Assessment of the sensitizing potential of textile disperse dyes and some of their metabolites by the loose-fit coculture-based sensitization assay (LCSA). *Arch Toxicol* 2012;86:733-740.

Stark AH, Crawford MA, Reifen R. Update on alpha-linolenic acid. *Nutr Rev* 2008;66:326-332.

Stillman MA, Maibach HI, Shalita AR. Relative irritancy of free fatty acids of different chain length. *Contact Dermatitis* 1975;1:65-69.

Thierse HJ, Gamerdinger K, Junkes C, Guerreiro N, Weltzien HU. T cell receptor (TCR) interaction with haptens: metal ions as non-classical haptens. *Toxicology* 2005;209:101-107.

Thyssen JP, Johansen JD, Menné T. Contact allergy epidemics and their controls. *Contact Dermatitis* 2007a;56:185-195.

Thyssen JP, Linneberg A, Menné T, Johansen JD. The epidemiology of contact allergy in the general population – prevalence and main findings. *Contact Dermatitis* 2007b;57:287-299.

Thyssen JP, Giménez-Arnau E, Lepoittevin JP, Menné T, Boman A, Schnuch A. The critical review of methodologies and approaches to assess the inherent skin sensitization potential (skin allergies) of chemicals - part I. *Contact Dermatitis* 2012a;66 Suppl.1:11-24.

Thyssen JP, Giménez-Arnau E, Lepoittevin JP, Menné T, Boman A, Schuch A. The critical review of methodologies and approaches to assess the inherent skin sensitization potential (skin allergies) of chemicals – part II. *Contact Dermatitis* 2012b;66 Suppl.1:25-52.

Vandebriel RJ, Van Loveren H. Non-animal sensitization testing: state-of-the-art. *Crit Rev Toxicol* 2010;40:389-404.

Vandebriel RJ, Van Och FM, van Loveren H. In vitro assessment of sensitizing activity of low molecular weight compounds. *Toxicol Appl Pharmacol* 2005;207 Suppl.:142-148.

Vocanson M, Hennino A, Rozières A, Poyet G, Nicolas JF. Effector and regulatory mechanisms in allergic contact dermatitis. *Allergy* 2009;64:1699-1714.

Vohr HW, Ahr HJ. The local lymph node assay being too sensitive? *Arch Toxicol* 2005;79:721-728.

Wallace HM. Risk perception in toxicology – part II: toxicology must be the solution not the problem. *Toxicol Sci* 2011;121:7-10.

Wang C, Harris WS, Chung M, Lichtenstein AH, Balk EM, Kupelnick B, Jordan HS, Lau J. n-3 Fatty acids from fish or fish-oil supplements, but not alpha-linolenic acid, benefit cardiovascular disease outcomes in primary- and secondary-prevention studies: a systematic review. *Am J Clin Nutr* 2006;84:5-17.

Wang H, Hao Q, Li QR, Yan XW, Ye S, Li YS, Li N, Li JS. Omega-3 polyunsaturated fatty acids affect lipopolysaccharide-induced maturation of dendritic cells through mitogen-activated protein kinases p38. *Nutrition* 2007;23:474-482.

Wanner R, Sonnenburg A, Quatchadze M, Schreiner M, Peiser M, Zuberbier T, Stahlmann R. Classification of sensitizing and irritative potential in a combined in-vitro assay. *Toxicol Appl Pharmacol* 2010;245:211-218.

Zaghi D, Maibach HI. The local lymph node assay compared with the human maximization test as an indicator of allergic potency in humans using patch test clinic populations. *Cutan Ocul Toxicol* 2009;28:61-64.

Zurier RB. Fatty acids, inflammation and immune responses. *Prostaglandins Leukot Essent Fatty Acids* 1993;48:57-62.

# 7 Abkürzungsverzeichnis

| | |
|---|---|
| 7-AAD | 7-Aminoactinomycin D |
| BGB | Bürgerliches Gesetzbuch |
| CAS-Nr. | Chemical-Abstracts-Service-Nummer |
| CCL4 | Chemokine (C-C motif) ligand 4 |
| CD | Cluster of differentiation |
| COX | Cyclooxygenase |
| CTLA4 | Zytotoxisches T-Lymphozytenantigen 4 |
| DCrC | Dendritic cell-related cells |
| DMSO | Dimethylsulfoxid |
| DPRA | Direct peptide reactivity assay |
| DRK | Deutsches Rotes Kreuz |
| EC3 | Mittlere effektive Konzentration, die zu einer Proliferation der lokalen Lymphknotenzellen auf die dreifache Anzahl führt (im LLNA) |
| $EC_{50}$ | Mittlere effektive Konzentration, die zu einem Anstieg der CD86-Expression um 50 % führt (im LCSA) |
| $EC_{50\%}$ | Mittlere effektive Konzentration, die zu einem Abfall der Vitalität um 50 % führt (im LCSA) |
| ECVAM | European Centre for the Validation of Alternative Methods |
| FCS | Fetal calf serum |
| FSC | Forward scatter |
| GM-CSF | Granulocyte macrophage colony-stimulating factor |
| GPMT | Guinea pig maximisation test |
| h-CLAT | Human cell line activation test |
| IL | Interleukin |
| KC | Keratinozyten |
| KGM-2 | Keratinocyte growth medium-2 |
| LCSA | Loose-fit coculture-based sensitization assay |
| LLNA | Local lymph node assay |
| MHC | Major histocompatibility complex |
| MUSST | Myeloid U-937 skin sensitization test |
| N/V | Nicht verfügbar |
| NF-κB | Nuclear factor ‚kappa-light-chain-enhancer' of activated B-cells |
| OECD | Organisation für wirtschaftliche Zusammenarbeit und Entwicklung |
| PBMC | Peripheral blood mononuclear cells |
| PBS | Phosphate-buffered saline |
| PPAR | Peroxisom-Proliferator-aktivierte Rezeptoren |
| PPD | *p*-Phenylendiamin |
| QSAR | Quantitative structure–activity relationship |
| rLLNA | Reduced local lymph node assay |
| SI | Stimulationsindex (im LLNA) |
| SSC | Side scatter |
| TGF-ß | Transforming growth factor beta |
| TNBS | Trinitrobenzolsulfonsäure |

# 8 Eidesstattliche Versicherung

„Ich, Thomas Armin Frohwein, versichere an Eides statt durch meine eigenhändige Unterschrift, dass ich die vorgelegte Dissertation mit dem Thema: „Untersuchung des Sensibilisierungspotenzials von ungesättigten Verbindungen im Loose-fit Coculture-based Sensitization Assay (LCSA)“ selbstständig und ohne nicht offengelegte Hilfe Dritter verfasst und keine anderen als die angegebenen Quellen und Hilfsmittel genutzt habe.

Alle Stellen, die wörtlich oder dem Sinne nach auf Publikationen oder Vorträgen anderer Autoren beruhen, sind als solche in korrekter Zitierung (siehe „Uniform Requirements for Manuscripts (URM)“ des ICMJE -www.icmje.org) kenntlich gemacht. Die Abschnitte zu Methodik (insbesondere praktische Arbeiten, Laborbestimmungen, statistische Aufarbeitung) und Resultaten (insbesondere Abbildungen, Graphiken und Tabellen) entsprechen den URM (s.o) und werden von mir verantwortet.

Meine Anteile an etwaigen Publikationen zu dieser Dissertation entsprechen denen, die in der untenstehenden gemeinsamen Erklärung mit dem Betreuer angegeben sind. Sämtliche Publikationen, die aus dieser Dissertation hervorgegangen sind und bei denen ich Autor bin, entsprechen den URM (s.o) und werden von mir verantwortet.

Die Bedeutung dieser eidesstattlichen Versicherung und die strafrechtlichen Folgen einer unwahren eidesstattlichen Versicherung (§156,161 des Strafgesetzbuches) sind mir bekannt und bewusst.“

Datum Unterschrift

# 9 Lebenslauf

Mein Lebenslauf wird aus datenschutzrechtlichen Gründen in der elektronischen Version meiner Arbeit nicht veröffentlicht.

# 10 Publikationsliste

- Posterpräsentation: „Ungesättigte Verbindungen im Loose-fit Coculture-based Sensitization Assay (LCSA)“ (Thomas Frohwein, Anna Sonnenburg, Maximilian Schreiner, Ralf Stahlmann; 07. Juli 2011; 2. Berliner Posterkongress „Wissenschaftliches Arbeiten im Reformstudiengang Medizin“, Berlin).

- Posterpräsentation: „Skin sensitization potential of unsaturated compounds in the loose-fit coculture-based sensitization assay (LCSA)“ (Thomas Frohwein, Anna Sonnenburg, Maximilian Schreiner, Ralf Stahlmann; 21. März 2012; 78. Jahrestagung der Deutschen Gesellschaft für Experimentelle und Klinische Pharmakologie und Toxikologie e.V. (DGPT), Dresden).

# 11 Danksagung

Ich möchte mich an dieser Stelle bei allen bedanken, die mir während der Doktorarbeit wertvolle Unterstützung geleistet haben. Die Arbeit konnte ich freundlicherweise am Institut für Klinische Pharmakologie und Toxikologie der Charité – Universitätsmedizin Berlin durchführen. Großer Dank gebührt Herrn Prof. Dr. med. Ralf Stahlmann, der mir nicht nur mit Rat und Anleitung zum wissenschaftlichen Arbeiten zur Seite stand, sondern auch die Faszination am Fach Toxikologie vermittelte.

Einen besonderen Dank möchte ich an Anna Sonnenburg für die Vermittlung der Methoden und die ausgezeichnete Hilfsbereitschaft richten. Gleiches gilt für Dr. Maximilian Schreiner (Bundeswehrkrankenhaus Berlin), der stets ein zuverlässiger, kompetenter Ansprechpartner war.

Aus dem Umfeld des Instituts danke ich des Weiteren für ihre Hilfe: Dipl.-Biol. Aniko Horvath, Petra Pietsch, Prof. Dr. med. Reinhold Kreutz, Prof. Dr. med. Gilbert Schönfelder, PD Dr. Roland Vetter und Harald Weinrich.

Schließlich bedanke ich mich bei meinen Eltern Volker und Jutta Frohwein, meinem Bruder Stefan Frohwein, sowie bei meiner Freundin Kelly Montgomery für Unterstützung und Zuspruch während der intensiven Tätigkeit im Rahmen der Doktorarbeit.