

Klinische Kooperationsgruppe für Umweltdermatologie und Allergologie GSF/TUM
GSF-Forschungszentrum für Umwelt und Gesundheit, Neuherberg

**Methoden- und Geräteentwicklung zur
in vitro Exposition humaner Keratinozyten aus atopischem Ekzem
gegenüber Schadstoffen in der Gasphase**

Dipl.-Biol. Caren Vollmert

Vollständiger Abdruck der von der Fakultät Wissenschaftszentrum Weihenstephan für Ernährung, Landnutzung und Umwelt der Technischen Universität München zur Erlangung des akademischen Grades eines

Doktors der Naturwissenschaften (Dr. rer. nat.)

genehmigten Dissertation.

Vorsitzender:	Univ.-Prof. Dr. B. Hock
Prüfer der Dissertation:	1. Univ.-Prof. Dr. E. F. Elstner 2. Univ.-Prof. Dr. H. Behrendt

Die Dissertation wurde am 01.08.2002 bei der Technischen Universität München eingereicht und durch die Fakultät Wissenschaftszentrum Weihenstephan für Ernährung, Landnutzung und Umwelt am 16.01.2003 angenommen.

Kurzfassung

Epidemiologische Studien zeigen weltweit eine steigende Häufigkeit und einen zunehmenden Schweregrad des atopischen Ekzems beim Menschen. Ziel der vorliegenden Arbeit war, in *in vitro* Experimenten eine mögliche ursächliche Beteiligung der umweltrelevanten Luftschadstoffe Toluol und m-Xylol zu untersuchen.

Hierfür wurde eine Expositionsapparatur in Form eines offenen, kontinuierlich gasdurchströmten Systems konstruiert, das die simultane Exposition von 12 submersen oder 6 luftexponierten Zellkulturen gegenüber Substanzen aus der Gasphase ermöglicht. Die Apparatur eignet sich aufgrund der Langzeitstabilität physikalisch-chemischer und biologischer Betriebsparameter für Langzeitexpositionen, aufgrund ihrer Dichtigkeit für den Einsatz hochtoxischer Substanzen.

Ferner wurden Zellisolierungs- und Kultivierungsmethoden entwickelt, um sterile, homogene und proliferierende Primärkulturen aus humaner Haut von hautgesunden Probanden und Patienten mit atopischem Ekzem zu gewinnen. Eine Dekontaminationsmethode für Hautproben und Keratinozytenkulturen mit 1 % Flucloxacillin gegen die im atopischen Ekzem häufige, multiresistente *Staphylococcus aureus* Infektion verbesserte den Anteil erfolgreicher Isolierung und Kultivierung proliferierender Primärkeratinozyten aus atopischem Ekzem von 30 % auf 90 %, vergleichbar mit Keratinozyten aus gesunder Haut. Das Differenzierungs- und Zytokinsezernierungsverhalten von Keratinozytenkulturen aus läsionaler und ekzemfreier Haut desselben Probanden mit atopischem Ekzem unterschied sich signifikant. Das war ein klarer Hinweis darauf, dass tatsächlich Keratinozyten läsionalen Ursprungs kultiviert wurden.

Darüber hinaus wurden organrekonstruierende Methoden für die Entwicklung eines dreidimensionalen, humanen *in vitro*-Modells für das atopische Ekzem evaluiert, wobei sich humane tote Dermis als geeignetste Biomatrix erwies.

Unter Einsatz der Expositionsapparatur wurden schließlich humane Keratinozyten aus atopischer und gesunder Haut gegenüber VOC (flüchtige organische Substanzen)-Konzentrationen im umwelt- und arbeitsplatzrelevanten Bereich exponiert. Anhand der Zytokinfreisetzung wurden erste Erkenntnisse über eine mögliche ursächliche Beteiligung von umweltrelevanten Luftschadstoffen an der weltweit steigenden Häufigkeit und am zunehmenden Schweregrad des atopischen Ekzems beim Menschen gewonnen:

Keratinozyten aus Atopikerhaut setzten konstitutiv im Mittel doppelt so hohe GM-CSF- und IL-6-Konzentrationen frei wie die Zellen gesunder Probanden. Diese Ergebnisse sprechen dafür, dass die im atopischen Ekzem *in situ* nachgewiesenen erhöhten Zytokinkonzentrationen u. a. keratinozytären Ursprungs sind.

Die konstitutive wie auch die VOC-induzierte Zytokinfreisetzung von IL-1 α , IL-6 und GM-CSF aus Keratinozyten läsionaler und nicht läsionaler Haut desselben Probanden unterschied sich signifikant. Daraus folgt, dass in *in vitro* Untersuchungen zwischen Keratinozyten aus läsionaler und ekzemfreier Atopikerhaut unterschieden werden muss. Vor allem Keratinozyten aus atopisch läsionaler Haut reagierten aus ihrem proinflammatorischen Status heraus empfindlicher auf VOC. Die Ergebnisse unterstützten die allergotoxikologische These von der VOC-sensitiveren atopischen Haut. Da die Auslöser des atopischen Ekzems stark patientenabhängig sind, zeigte nur eine Untergruppe der Probanden eine erhöhte VOC-Empfindlichkeit.

Weitere Ergebnisse dieser Arbeit deuten auf synergistische, multiplikative Kombinationswirkungen von niedrigkonzentrierten, umweltrelevanten VOC-Gemischen auf die *in vitro* Zytokinfreisetzung von IL-1 α , IL-6 und GM-CSF aus Keratinozyten gesunder Haut hin. Beispielsweise entsprach die verstärkte GM-CSF-Freisetzung der Sekretion nach 3 MAK (maximale Arbeitsplatzkonzentration) Toluol-Exposition. Auf Zellen aus atopischem Ekzem zeigten sich keine Kombinationseffekte. Allerdings sezernierten Zellen von Atopikern höhere Absolutkonzentrationen als Zellen gesunder Probanden. Das bedeutet zum einen, dass bei der Beurteilung von umweltrelevanten Einflüssen auf gesunde Haut die MAK-Größen nicht ohne weiteres als Bewertungsmaßstab herangezogen werden können, da diese keine Kombinationseffekte berücksichtigen. Zum anderen lässt sich – nach den Ergebnissen des in der vorliegenden Arbeit angewendeten *in vitro* Expositionssystems – der epidemiologisch beobachtete Prävalenzanstieg des atopischen Ekzems nicht mit der Wirkung des umweltrelevant konzentrierten VOC-Gemischs insbesondere auf Primärkeratinozyten aus atopischem Ekzem begründen.

Die Dissertation behandelt eine auf Methoden- und Geräteentwicklung basierende experimentelle Arbeit im Fachgebiet der Allergotoxikologie. Alle entwickelten Verfahren wie auch die Apparatur können auch im Rahmen weiterer Fragestellungen eingesetzt werden.

Abstract

Epidemiological studies indicate worldwide raising prevalence and severity of atopic dermatitis in human beings. The goal of the present thesis was to investigate a potential causal contribution of the environmentally relevant airborne pollutants toluene and m-xylene in *in vitro* experiments.

For this purpose, an exposure system for gaseous compounds was developed consisting of an open, continuously gas-flooded system which enables the simultaneous exposition of twelve submerge or of six air exposed cell cultures towards substances out of the gas phase. The system is suited for long-time exposures due to the longtime stability of the physical-chemical and the biological operating parameters as well as for the application of highly toxic substances due to its tightness.

Moreover, methods to isolate and cultivate cells were developed to get sterile, homogeneous and proliferating primary cell cultures of human skin from both subjects with healthy skin as well as from patients suffering from atopic dermatitis. A method to decontaminate skin samples and keratinocyte cultures from the often occurring infection with multiresistent *Staphylococcus aureus* by means of 1% flucloxacillin improved the percentage from 30% to 90% of successfully isolated and cultivated, proliferating primary keratinocytes from atopic dermatitis skin, comparable with the keratinocytes from healthy skin. The differentiation and the secretion of cytokines from cultures of keratinocytes from lesional skin was significantly different to those of eczema-free skin of the same patient with atopic dermatitis. This was a clear hint for cultivation of keratinocytes from real lesional origin.

Furthermore, methods to reconstruct organs in culture were evaluated to develop a three-dimensional human *in vitro* model of the atopic dermatitis, with dead human dermis found to be the most suited biomatrix.

Finally, applying the exposition system, human keratinocytes from atopic and healthy skin were exposed towards VOC concentrations of an order of magnitude relevant for environmental and workplace exposures. From the release of cytokines, first insights were found about a potential causal contribution of environmentally relevant airborne pollutants to the worldwide increasing prevalence and incidence of the atopic dermatitis in human beings:

On the average, keratinocytes from the skin of atopics released constitutively twice the concentrations of GM-CSF and IL-6 compared to cells of healthy subjects. These results indicate that the increased concentrations of cytokines in atopic dermatitis, found *in situ*, are originating among other things from keratinocytes.

The constitutive as well as the VOC (volatile organic compounds)-induced release of IL-1 α , IL-6 and GM-CSF from keratinocytes of lesional and non-lesional skin of the same subject were significantly different. This means that in *in vitro* experiments the keratinocytes from lesional skin have to be distinguished from keratinocytes from non-lesional skin of atopics. Especially keratinocytes from atopic lesional skin reacted more sensitively towards VOC with respect to their pro-inflammatory state. These results support the allergotoxicological hypothesis of the more VOC-sensitive atopic skin. As the triggers of atopic dermatitis are strongly depending on the individual subject, an increased sensitivity towards VOC was found only for a subgroup of subjects.

Further results indicate that there is a synergistic, multiplicative combination of impacts of low-concentrated, environmentally relevant mixtures of VOC on the *in vitro* secretion of cytokines from keratinocytes of healthy skin. For example, the increased secretion of GM-CSF resembled that one after an exposition of three MAK (maximum concentrations at the workplace) toluene. In contrast, no combinatory effect was found in atopic dermatitis. But the level of cytokines secreted by cells of atopic patients was higher than the one secreted by keratinocytes of healthy subjects. This means that the MAK values cannot be used offhand to evaluate the environmentally relevant influence on healthy skin, because these values do not take into account combinatory effects. On the other hand, the results of the *in vitro* exposure system applied in the present work do not induce that the increased prevalence of atopic dermatitis - observed from epidemiological studies - is due to the impact of the environmentally concentrated VOC mixture especially on primary keratinocytes from atopic dermatitis.

This thesis comprises an experimental work in the subject of allergotoxicology based on the development of methods and equipment in form of an exposure system for cell cultures towards gaseous compounds. All methods as well as the exposure system can also be used for investigations of other questions.

Inhaltsverzeichnis

ABBILDUNGSVERZEICHNIS	V
TABELLENVERZEICHNIS	XI
ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS	XIV
1 EINLEITUNG	1
1.1 Prävalenz und Schweregrad allergischer Erkrankungen – Konzept der Allergo- toxikologie	1
1.2 Einfluss von Luftschadstoffen auf allergische Erkrankungen	4
1.2.1 Vorbemerkungen	4
1.2.2 Stand der Forschung	6
1.2.3 Einfluss von Keratinozyten und dermalen Fibroblasten auf immunologische Prozesse	10
1.2.4 Zellkultursysteme zur Untersuchung von Schadstoffeffekten	12
1.2.5 Systeme zur <i>in vitro</i> Exposition gegenüber gasförmigen Stoffen	13
1.3 Aufgabenstellung und Ziele der Dissertation	17
2 HINTERGRÜNDE	19
2.1 Struktur und Funktion des humanen Hautorgans	19
2.2 Atopisches Ekzem – Atopische Dermatitis – Neurodermitis	26
2.3 Flüchtige organisch-chemische Verbindungen (VOC)	30
3 MATERIAL	37
3.1 Biologisches Material	37
3.1.1 Humane Hautproben	37
3.1.2 <i>Staphylococcus aureus</i> Kolonien	37
3.2 Lösungen und Zellkulturmedien – Rezepte	38
3.3 Antikörper, Chemikalien, Prüfgase, Zellkulturmedien – Bezugsquellen	40
3.4 sterile Zellkultur-Kunststoffmaterialien – Bezugsquellen	42
3.5 Geräte	43
3.5.1 Komponenten zum Aufbau der Expositionsapparatur	43
3.5.2 sonstige Geräte	44
4 METHODEN	46
4.1 Zellkulturtechniken	46
4.1.1 Zellisolierung und Primärkultur	46
4.1.2 Flucloxacillinbehandlung kontaminierter Primärkeratinozytenkulturen	47
4.1.3 Keratinozytenkultur unter Einsatz beschichteter Membraneinsätze	47

4.1.4	Arretieren der Fibroblastenproliferation	48
4.1.5	Herstellung von Fibroblasten-Kollagengelen	48
4.1.6	Keratinocytenkultur auf Fibroblasten-Kollagengelen und Kollagenschwämmen	49
4.1.7	Keratinocytenkultur auf humaner Dermis	49
4.1.8	Dauerkultur	50
4.1.9	Subkultivieren der Zellen	51
4.1.10	Zellzahl und Vitalitätsbestimmung	51
4.1.11	Einfrieren, Auftauen und Lagerung der Zellen	52
4.1.12	Mycoplasmentest	52
4.2	„Enzyme-linked immunosorbent assays“ (ELISA)	52
4.2.1	Nachweis sezernierter Zytokine im Zellkulturüberstand	52
4.2.2	LDH-Toxizitätstest	53
4.2.3	MTT-Vitalitätstest	54
4.3	Zyto- und Histochemie	54
4.3.1	Herstellung von Zytopräparaten	54
4.3.2	Herstellung von histologischen Paraffin-Präparaten	54
4.3.3	Herstellung von histologischen Cryo-Präparaten	55
4.3.4	Immunochemischer Proteinnachweis	55
4.3.5	Hämatoxylin-Eosin (H.E.)-Färbung	57
4.3.6	Pappenheim-Färbung	57
4.3.7	Färbung mit Bisbenzimid	57
4.4	Mikroskopische Techniken	58
4.4.1	Durchlicht- und Fluoreszenzmikroskopie	58
4.4.2	Probenaufbereitung für Rasterelektronenmikroskopie (REM)	58
4.4.3	Probenaufbereitung für Transmissionselektronenmikroskopie (TEM)	59
4.5	Exposition von Zellen gegenüber flüssigen VOC im Standardinkubator	60
4.6	Exposition von Zellen gegenüber VOC in der Gasphase	60
4.6.1	Grundeinstellung der Gasflussreglersteuereinheit an der Expositionsapparatur	61
4.6.2	Versuchsbedingungen der VOC-Expositionsversuche	61
4.6.3	Messung physikalisch-chemischer Betriebsparameter	63
4.7	Schadstoffanalytik	64
4.7.1	Quantifizierung der VOC-Konzentrationen in der Gasphase	64
4.7.1.1	Analytprobenahme	64
4.7.1.2	Probenaufbereitung und gaschromatographische Analytbestimmung (konventionelle Gaschromatographie)	65
4.7.1.3	Herstellung von Kalibrierlösungen für die konventionelle Gaschromatographie	66
4.7.2	Quantifizierung der VOC-Konzentrationen im Flüssigmedium	66
4.7.2.1	Analytprobenahme	66
4.7.2.2	Probenaufbereitung und gaschromatographische Analytbestimmung (manuelle „headspace“ Gaschromatographie)	67
4.7.2.3	Herstellung von Kalibrierlösungen für die manuelle „headspace“ Gaschromatographie	68
4.8	Statistische Methoden	71
5	ERGEBNISSE	73
5.1	Methodenentwicklungen zur Isolierung und Kultivierung humaner Primärzellen der Haut	73
5.1.1	Antibiotikabehandlung der Gewebeproben	73
5.1.2	Methodenoptimierung der enzymatischen Zellisolierung	75
5.1.3	Selektive Reinkulturen durch optimierte Nährmedien und Biomatrices	77
5.1.4	Proliferations- und Differenzierungsverhalten standardisierter, serieller Primärzellkulturen im submersen System	82

5.2	Entwicklung einer spezifischen Antibiotikabehandlung gegen <i>Staphylococcus aureus</i> in der Zellkultur – Flucloxacillinstudie	87
5.2.1	Zytotoxizitätsstudie	87
5.2.2	Provokationsstudie	90
5.2.3	Flucloxacillinbehandlung kontaminierter Hautproben und Primärzellkulturen aus atopischem Ekzem	91
5.3	Aufbau einer Zellbank	93
5.4	Methodenentwicklung zum Aufbau organähnlicher Gewebekulturen: submerse Kokulturen und luftexponierte Hautorganoidkulturen	94
5.4.1	Luftexponierte Kokulturen auf Anopore™- und Polycarbonatmembranen	95
5.4.2	Luftexponierte Kokulturen auf der Basis von Fibroblasten-Kollagengelen und Kollagenschwämmen	96
5.4.3	Luftexponierte Keratinozytenkulturen auf humaner Dermis	103
5.5	Entwicklung einer Apparatur zur Exposition von Zellkultursystemen gegenüber Stoffen in der Gasphase	106
5.5.1	Vorexperiment zur Demonstration auftretender Problemstellungen: Zelluläre Exposition gegenüber flüssigen VOC im Standardinkubator	106
5.5.2	Schlussfolgerung aus dem Vorexperiment – Entwicklungskonzept für eine Gasphasenexpositionsapparatur	107
5.5.3	Anforderungen an die Expositionsapparatur	108
5.5.4	Technische Realisierung und Funktionsprinzip	109
5.6	Evaluation der Expositionsapparatur – Charakterisierung der Stabilität und Zuverlässigkeit physikalisch-chemischer sowie biologischer Parameter	113
5.6.1	Auswahl eines geeigneten Gesamtvolumenstroms	114
5.6.2	Einstellung einer umweltrelevanten relativen Feuchte im Gesamtvolumenstrom	115
5.6.3	Temperaturregulierung der Zellkultursysteme in der Expositions-kammer	117
5.6.4	Bestimmung des apparaturbedingten Totvolumens	117
5.6.5	VOC-Konzentration in der Gasphase	119
5.6.6	VOC-Konzentration im Flüssigmedium	121
5.6.7	Verdunstungsrate und pH-Wert des Zellkulturmediums	124
5.6.8	Vitalität und Zellzahl	124
5.7	Analyse von VOC-Effekten auf humane Keratinozyten – Einsatz der Expositionsapparatur in allergotoxikologischen Fragestellungen	125
5.7.1	Versuchskonditionen für die <i>in vitro</i> Expositionen von humanen Primärkeratinozyten gegenüber umweltrelevanten Schadstoffen	125
5.7.2	Deskriptive Statistik zu den VOC-Expositionsversuchen	128
5.7.3	Qualitätskontrolle von ELISA-Messsystem und Messergebnissen	130
5.7.3.1	Sensitivität des ELISA-Messsystems	130
5.7.3.2	Reproduzierbarkeit des ELISA-Messsystems	133
5.7.3.3	Reproduzierbarkeit der Messergebnisse	134
5.7.4	Spontansekretion der Zytokine GM-CSF, IL-1 α und IL-6	137
5.7.5	VOC-Effekte auf die Zytokinsekretion aus humanen Keratinozyten	142
5.7.5.1	Auswahlkriterien für die statistischen Analysemethoden	142
5.7.5.2	Mehrfaktorielle Varianzanalyse quantitativer Zytokinkonzentrationen	144
5.7.5.3	Logistische Regressionsanalyse veränderter Konzentrationsverhältnisse	151
5.7.5.4	Datenanalyse aller Konzentrationsdaten anhand der Differenzierung von Fallzahlen und Individuenstärken	171
6	DISKUSSION	188
6.1	Isolierung und Kultivierung humaner Primärzellen aus gesunder Haut und aus atopischem Ekzem	188
6.1.1	Antibiotika-Antimycotika-Behandlung für sterile, <i>in vitro</i> Experimenten vergleichbare, vitale Primärkulturen	188

6.1.2	<i>Staphylococcus aureus</i> -spezifische Antibiotikabehandlung – Einsatz von Flucloxacillin in der Zellkultur	189
6.1.3	Kombination und sukzessiver Einsatz verschiedener Zellisolierungsmethoden	190
6.1.4	Selektive Reinkulturen, Proliferations- und Differenzierungsbedingungen durch gezielte Mediensupplementierung und Einsatz von Biomatrices	192
6.1.5	Fazit und Ausblick	200
6.2	Methodenentwicklung zum Aufbau organähnlicher Gewebekulturen: submerse und luftexponierte Mono- und Kokulturen	201
6.3	Funktionsprinzipien und Funktionsfähigkeit der Expositionsapparatur	206
6.3.1	Beurteilung von Gasdichtigkeit und Wandadsorption	206
6.3.2	Konstruktionsbedingte Funktionsweise der Expositions-kammer – Konstanz der Expositionsbedingungen	207
6.3.3	Konstanz der physikalischen Parameter	208
6.3.4	Konstanz der zellphysiologischen Parameter	209
6.3.5	Einstellung von Prüfgaskonzentrationen	210
6.3.6	Analyse von VOC-Konzentrationen in der Gasphase	211
6.3.7	Analyse von VOC-Konzentrationen im Zellkulturmedium	213
6.3.8	Zusammenfassung	216
6.4	Einsatz der Expositionsapparatur zur Untersuchung von allergotoxikologischen Fragestellungen	218
6.4.1	Intention der VOC-Expositionsversuche	218
6.4.2	Qualitätskontrolle von ELISA-Messsystem und Messergebnissen	219
6.4.2.1	Sensitivität des ELISA-Messsystems und Quantifizierbarkeit der Zielvariablen	219
6.4.2.2	Reproduzierbarkeit und Wiederfindungsrate der Zytokin-konzentrationen in VOC-haltigem Medium	226
6.4.2.3	Reproduzierbarkeit von Expositionsexperimenten und Zytokin-sezernierung	227
6.4.3	Individuenspezifität in der Spontansekretion – Auswirkungen auf die statistische Datenanalyse	230
6.4.3.1	Auswirkungen auf die statistische Analyse des Spontansekretions- verhaltens humaner Keratinozyten	230
6.4.3.2	Auswirkungen auf die statistische Analyse von VOC-Effekten auf die Zytokinsekzernierung aus humanen Keratinozyten	231
6.4.4	Individuenspezifität, Fallgruppenunterschiede und Korrelationen – Biologische Aspekte der Spontansekretion	232
6.4.5	VOC-Effekte auf die Zytokinsekzernierung aus humanen Keratinozyten	243
6.4.5.1	Effekte von VOC-Einzelsubstanzen	243
6.4.5.2	Kombinationseffekte des umweltrelevanten Schadstoffgemischs	244
6.4.5.3	VOC-Effekte im Fallgruppenvergleich	246
6.4.5.4	Expositionsdauer- und zeitabhängige VOC-Effekte	250
6.4.5.5	Fazit	253
6.4.6	„Power analysis“ – Fallzahlab-schätzungen für Folgestudien	254
6.4.7	Ausblick auf weitere Anwendungsgebiete der Expositionsapparatur	260
7	ZUSAMMENFASSUNG	261
8	LITERATUR	266
	ANHANG	I

Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: Histologie humaner Haut (H.E.-Färbung, Vergrößerung: x 50), (1-4) Epidermis: (1) S. corneum, (2) S. granulosum, (3) S. spinosum, (4) S. basale; (5) Dermis	20
Abbildung 2: Enzymatische Keratinozytenisolierung aus humaner Epidermis. (a) komplette Epidermis, (b) keratinozytenfreies Stratum corneum	76
Abbildung 3: Fibroblastendermiskultur	77
Abbildung 4: Keratinozytenisolierungskulturen der Passagen 0 bis 1 (a) 2-3, (b, c) 5-7 bzw. (d) 9-11 Tage nach Aussaat	79
Abbildung 5: Nachweis der Zytokeratinexpression in „cytopspin“-Präparaten von Passage 0-Primärkeratinozyten: (a) Zytokeratin 14, (b) Zytokeratin 6 in adhärenten, proliferierenden Zellen; (c) Zytokeratin 10 in nicht adhären- ten Zellen; (d) PBS-Sekundärantikörper-Negativkontrolle	80
Abbildung 6: Proliferationsverhalten seriell kultivierter Primärkeratinozyten (Datentabelle siehe Anhang A3.1)	82
Abbildung 7: Morphologie hoher Passagen seriell kultivierter Primärkeratinozyten (a, b) Passage 5, (c) Passage 6, (d, e) Passage 7-8, (f) Passage 8-9	83
Abbildung 8: Immunzytochemischer Nachweis der Zytokeratinexpression in „cytopspin“- Präparaten seriell kultivierter, humaner Primärkeratinozyten: (a) Zytokeratin 14 in Keratinozytenpassage 2, (b) Zytokeratin 10 in Keratinozytenpassage 2, (c) Zytokeratin 10 in Keratinozytenpassage 6, (d) Zytokeratin 14 in Keratinozytenpassage 6, (e) PBS-Sekundärantikörper-Negativkontrolle	84
Abbildung 9: Differenzierung submerser Keratinozyten in „Keratinocyte Growth Medium“ (KGM); (a) - (e) mehrschichtiges Wachstum mit zunehmender Verhornung und Abflachung der oberen Zellschichten ausgehend vom Zentrum der Proliferationsinseln; (f) Desquamation der oberen nucleus-freien, keratinisierten Strati	86
Abbildung 10: MTT-Vitalitätstest: Primärkeratinozyten wurden 2,5 h mit 14 Konzentra- tionen von 0 g/ml bis 1,0 g/ml Flucloxacillin inkubiert. Angegeben sind 1 σ -Standardabweichungen (n = 3 bzw. n = 4). (Datentabelle siehe Anhang A3.2)	88
Abbildung 11: Zellmorphologie primärer Keratinozyten nach Inkubation mit Flucloxacillin (Negativkontrolle (a), 2,5 h 0,4 % Flucloxacillin (b), 1 h 1 % Flucloxacillin (c), 2,5 h 1 % Flucloxacillin (d), 2,5 h 2 % Flucloxacillin (e), 2,5 h 3 % Flucloxa- cillin (f), 2,5 h 8 % Flucloxacillin (g), 2,5 h 30 % Flucloxacillin (h))	89

Abbildung 12: Dekontaminationsprozess durch 1 % Flucloxacillinbehandlung gezielt kontaminierter Keratinozytenkulturen (kontaminierte Kultur zum Zeitpunkt 0 (a), kontaminierte Kultur nach 30 min (b), 1 h (d) und 2 h (e) Behandlung, unbehandelte Kultur zum Zeitpunkt 30 min (c) und 2 h (f))	91
Abbildung 13: Prinzip dreidimensionaler Hautorganoidkulturen am Beispiel luftexponierter Kokulturen	94
Abbildung 14: Rasterelektronenmikroskopische Aufnahmen luftexponierter Mono- (a) und Kokulturen (b) auf Polycarbonatmatrices	96
Abbildung 15: Migration und Ausrichtung proliferationsarretierter Fibroblasten im Kollagengel 6 h (a) bzw. 48 h (b) nach Zellaussaat.	97
Abbildung 16: Partielles Keratinozytenwachstum auf Fibroblasten-Kollagengelen (a) Paraffinschnittpräparat, H.E.-Färbung; (b) Organoidoberfläche (REM-Aufnahme)	98
Abbildung 17: Rasterelektronenmikroskopische Oberflächendarstellung eines Keratinozyten-„monolayer“ (a, b) im Vergleich zu einer dreidimensionalen Keratinozyten-Fibroblasten-Kollagengel-Kokultur (c, d); (a, c): Übersichts-, (b, d): Detailaufnahmen	99
Abbildung 18: Übersicht (a) und Detailaufnahme (b) von Paraffinschnittpräparaten hyperproliferierender Keratinozyten-Fibroblasten-Kollagengel-Kokulturen (H.E.-Färbung); die Pfeile markieren dyskeratotische Keratinozyten.	100
Abbildung 19: Keratinozytenkultur im Kollagenschwamm: (a) makroskopische Ansicht sechs Tage nach Zellaussaat; (b) nach 14 Tagen aus dem Kollagenschwamm migrierte, submerse Keratinozytenkultur unter F3-Differenzierungsbedingungen	102
Abbildung 20: Keratinozytenkultur im Kollagenschwammgeflecht (REM-Aufnahme)	102
Abbildung 21: Oberfläche einer 42 Tage alten Dermisorganoidkultur (REM-Aufnahme); die Pfeile markieren das Aussaatareal.	103
Abbildung 22: REM-Detailaufnahme der Dermisorganoidkultur: dichte sowie mehrschichtige Keratinozytenbesiedelung	104
Abbildung 23: REM-Detailaufnahme der Dermisorganoidkultur: partielle Desquamation keratinisierter Strati	105
Abbildung 24: Zeitabhängiger Verlust der Toluol-Konzentration im Zellkulturmedium (Datentabelle siehe Anhang A3.3)	106
Abbildung 25: Schematische Darstellung der Apparatur zur Exposition von Zellkultursystemen gegenüber gasförmigen Stoffen	109
Abbildung 26: Konstruktionsplan der Expositionskammer	111
Abbildung 27: Konstruktionsplan des Kunststoffpostaments	112

Abbildung 28: Photo der Expositionsapparatur	112
Abbildung 29: Detailaufnahme der Expositions-kammer	113
Abbildung 30: Verlauf der Parameter relative Luftfeuchte und Temperatur bei der Exposition von submersen Zellkultursystemen (Datentabelle siehe Anhang A3.4)	116
Abbildung 31: Bestimmung des apparaturbedingten Totzeitvolumens anhand der relativen Luftfeuchte (Datentabelle siehe Anhang A3.5)	118
Abbildung 32: Chromatogramm konventioneller Gaschromatographie	119
Abbildung 33: Zu erwartende Konzentration der unter idealen Gasbedingungen im Zellkulturmedium gelösten VOCs in Abhängigkeit von der Temperatur. Die Legende gibt die in der Gasphase vorliegenden Ausgangsstoffkonzentrationen an (Datentabelle siehe Kapitel 4.7.2.3).	121
Abbildung 34: Chromatogramm der manuellen „headspace“ Gaschromatographie	122
Abbildung 35: Spontansekretion der Zytokine GM-CSF, IL-1 α und IL-6 innerhalb 48 h nach der Keratinozytenaussaat unter individueller Auftrennung der Fallgruppen. Aufgetragen sind die Mediane mit dem 90 % Konfidenzintervall. Individuen mit in allen Messdaten auffällig erhöhten bzw. erniedrigten Zytokinkonzentrationen sind mit * gekennzeichnet, angegeben sind ferner intraindividuelle Signifikanzniveaus im Homogenitätstest innerhalb der Fallgruppe atopisches Ekzem (Tabelle 17).	138
Abbildung 36: Häufigkeitsverteilung spontansezernerter Zytokinkonzentrationen von Interleukin 1 α aus humanen Primärkeratinozyten innerhalb 48 h Inkubation; links: Histogrammdarstellung der Häufigkeitsverteilung von IL-1 α in Konzentrationsklassen [log(pg/ml)], rechts: Plotdarstellung der logarithmisch transformierten IL-1 α -Konzentrationswerte	139
Abbildung 37: Mittlere GM-CSF-Konzentrationsquotienten der Expositionsvariablen nach dem Modell der Varianzanalyse. Aufgetragen sind die kleinsten quadratischen Mittelwert-Schätzer mit der 1 σ Standardabweichung, angegeben ist ferner die Fallzahl der jeweiligen Expositionsvariablen. (Datentabelle siehe Anhang A3.9)	145
Abbildung 38: Mittlere GM-CSF-Konzentrationsquotienten in Abhängigkeit von der Expositionsdauer über alle Expositionsvariablen nach dem Modell der Varianzanalyse. Aufgetragen sind die kleinsten quadratischen Mittelwert-Schätzer mit der 1 σ Standardabweichung, angegeben ist ferner die Fallzahl der jeweiligen Expositionsdauer (KZ: Kurzzeitexposition, LZ: Langzeitexposition). (Datentabelle siehe Anhang A3.10)	147

- Abbildung 39: Mittlere GM-CSF-Konzentrationsquotienten der Fallgruppe nicht läesionales atopisches Ekzem unter Interaktion einzelner Expositionsarten und Expositionsdauer nach dem Modell der Varianzanalyse. Aufgetragen sind die kleinsten quadratischen Mittelwert-Schätzer mit der 1σ Standardabweichung, angegeben ist ferner die Fallzahl der jeweiligen Expositionsvariablen. (Datentabelle siehe Anhang A3.11) 149
- Abbildung 40: Mittlere Interleukin 1α -Konzentrationsquotienten der Expositionsvariablen nach dem Modell der Varianzanalyse. Aufgetragen sind die kleinsten quadratischen Mittelwert-Schätzer mit der 1σ Standardabweichung, angegeben ist ferner die Fallzahl der jeweiligen Expositionsvariablen. (Datentabelle siehe Anhang A3.12) 150
- Abbildung 41: Mittlere Interleukin 6-Konzentrationsquotienten der Expositionsvariablen nach dem Modell der Varianzanalyse. Aufgetragen sind die kleinsten quadratischen Mittelwert-Schätzer mit der 1σ Standardabweichung, angegeben ist ferner die Fallzahl der jeweiligen Expositionsvariablen. (Datentabelle siehe Anhang A3.13) 151
- Abbildung 42: Qualitative, von der Expositionsdauer unabhängige Expositionseffekte auf die GM-CSF-Sekretion aus Keratinozyten normal gesunder Haut nach dem logistischen Regressionsmodell (1). Dargestellt ist der prozentuale Anteil aller exponierten Zellkulturen mit relativ zur Spontansekretion reduzierter (auf der negativen Skala aufgetragen) bzw. erhöhter Zytokinfreisetzung nach der Exposition. 155
- Abbildung 43: Qualitative Effekte auf die GM-CSF-Sekretion aus Keratinozyten normal gesunder Haut für einzelne Expositionsvariablen getrennt nach der Expositionsdauer (3) bzw. unter Aufschlüsselung der Expositionsdauer über alle Expositionsvariablen (4). Dargestellt ist der prozentuale Anteil aller exponierten Zellkulturen mit relativ zur Spontansekretion reduzierter (negative Skala) bzw. erhöhter Zytokinfreisetzung nach der Exposition. (KZ: Kurzzeit-, LZ: Langzeitexpositionen) 157
- Abbildung 44: Fallgruppenspezifisches GM-CSF-Sezernierungsverhalten ohne Interaktion mit einzelnen Expositionsvariablen nach dem log. Regressionsmodell (2) 160

- Abbildung 45: Qualitative Expositionseffekte auf die IL-1 α -Sekretion aus Keratinozyten normal gesunder Haut: (1) expositionsdauerunabhängige logistische Regressionsanalyse; (4) log. Regressionsanalyse: Kurzzeit- (KZ) versus Langzeitexposition (LZ) ohne Interaktion. Dargestellt ist der prozentuale Anteil aller exponierten Zellkulturen mit relativ zur Spontansekretion reduzierter (auf der negativen Skala aufgetragen) bzw. erhöhter Zytokinfreisetzung nach der Exposition. 162
- Abbildung 46: Qualitative Expositionseffekte auf die IL-6-Sekretion aus Keratinozyten normal gesunder Haut: (1) expositionsdauerunabhängige logistische Regressionsanalyse; (4) log. Regressionsanalyse: Kurzzeit- (KZ) versus Langzeitexposition (LZ) ohne Interaktion. Dargestellt ist der prozentuale Anteil aller exponierten Zellkulturen mit relativ zur Spontansekretion reduzierter (negative Skala) bzw. erhöhter Zytokinfreisetzung nach der Exposition. 165
- Abbildung 47: Fallgruppenspezifisches IL-6-Sezernierungsverhalten ohne Interaktion mit einzelnen Expositionsvariablen nach dem logistischen Regressionsmodell (2) 168
- Abbildung 48: Vergleich der Fallzahlen von erhöhten (+) bzw. reduzierten (-) sowie unveränderten (=) GM-CSF-Konzentrationsverhältnissen nach Kurzzeit (KZ)- und Langzeitexpositionen (LZ) pro Expositionsvariable und Fallgruppe. Die Balkenhöhe beschreibt den relativen Anteil in [%], am Balkenkopf ist die absolute Fallzahl n aufgetragen. (Datentabelle siehe Anhang A3.14) 173
- Abbildung 49: Vergleich der Fallzahlen von erhöhten (+) bzw. reduzierten (-) sowie unveränderten (=) IL-1 α -Konzentrationsverhältnissen nach Kurzzeit (KZ)- und Langzeitexpositionen (LZ) pro Expositionsvariable und Fallgruppe. Die Balkenhöhe beschreibt den relativen Anteil in [%], am Balkenkopf ist die absolute Fallzahl n aufgetragen. (Datentabelle siehe Anhang A3.15) 176
- Abbildung 50: Vergleich der Fallzahlen von erhöhten (+) bzw. reduzierten (-) sowie unveränderten (=) IL-6-Konzentrationsverhältnissen nach Kurzzeit (KZ)- und Langzeitexpositionen (LZ) pro Expositionsvariable und Fallgruppe. Die Balkenhöhe beschreibt den relativen Anteil in [%], am Balkenkopf ist die absolute Fallzahl n aufgetragen. (Datentabelle siehe Anhang A3.16) 178
- Abbildung 51: Ausschnitt aus dem immunologischen Zytokinnetzwerk mit Fokus auf keratinozytäres IL-1 α , IL-6 und GM-CSF. (NHK: normale humane Keratinozyten, LZ: Langerhanszellen, APZ: antigenpräsentierende Zellen) 242

- Abbildung 52: Graphische Darstellung des Zeitintervalls größter, nachweisbarer VOC-induzierter Zytokinfreisetzung im zeitlichen Studiendesign (KZ: Kurzzeit-, LZ: Langzeitexposition) 251
- Abbildung 53: „power“ für das Zweistichprobenproblem: zweiseitig und ungleiche Varianzen ($\alpha = 0,05$) – Fallzahlab-schätzung zur Fallgruppen-differenzierung anhand von IL-1 α und IL-6 258-259

Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: Auswahl von konstitutiv und/oder ausschließlich unter Stimulation von humanen Keratinozyten exprimierten und freigesetzten, (pro-)inflammatorischen Mediatorsubstanzen	10
Tabelle 2: Einsatzkonzentrationen von Primär- und Sekundärantikörpern	56
Tabelle 3: Grundeinstellungen der Steuereinheit für Gasflussregler	61
Tabelle 4: Prüfgaskonzentrationen und Volumenströme	62
Tabelle 5: Analytbeladung von Aktivkohleröhrchen	64
Tabelle 6: Henrysche Konstanten und deren Ableitungen für die Löslichkeit in Wasser bei 298,15 K	70
Tabelle 7: VOC-Konzentrationen [g/l] im Flüssigmedium in Abhängigkeit von der Konzentration in der Gasphase und der Temperatur	71
Tabelle 8: Nachweis-, Erfassungs- und Bestimmungsgrenze der Analyten Toluol und m-Xylol durch konventionelle Gaschromatographie	120
Tabelle 9: Fallgruppe atopisches Ekzem	129
Tabelle 10: Anzahl exponierter Zellkulturen mit 48 h Inkubation vor und nach Exposition unter Aufschlüsselung der Expositionsvariablen. Angegeben sind jeweils die Gesamtanzahl der exponierten Zellkulturen sowie in Klammern die Anzahl der den Zellkulturen zugrundeliegenden Individuen (KZ = Kurzzeitexpositionen von 5 h und 8 h, LZ = Langzeitexpositionen von 18 h und 24 h).	130
Tabelle 11: Kalibrierbereich sowie Nachweis-, Erfassungs- und Bestimmungsgrenze der Zytokin-Assays. Angegeben sind die arithmetischen Mittelwerte $\pm 1\sigma$ Standardabweichung der Stichprobe. (Grenzwerte aller ELISA-Platten siehe Anhang A3.6)	131
Tabelle 12: Quantifizierbarkeit der Zytokine GM-CSF, IL-1 α und IL-6 im 48 h-Zellkulturüberstand. Angegeben ist jeweils die entsprechende Anzahl n verwertbarer Konzentrationswerte aus insgesamt 503 untersuchten Proben. [Eine Auflistung aller experimentellen Daten (Spontansekretion, Expositionsvariablen und Zytokinsezernierung nach Exposition sowie ELISA-Platten-ID und Zuverlässigkeit der Daten) getrennt nach Fallgruppen und Individuen ist Tabelle A3.7 (Anhang) zu entnehmen.]	132
Tabelle 13: Reproduzierbarkeit der Spontansekretion von GM-CSF aus humanen Primärkeratinozyten getrennt nach Konzentrationen unterhalb bzw. oberhalb der Bestimmungsgrenze (BG). Angegeben sind die mittlere relative Standardabweichung in [%] sowie in Klammern die absolute zusammengefasste Standardabweichung in [pg/ml].	134

Tabelle 14: Vergleich der Reproduzierbarkeit quantifizierbarer, sezernierter GM-CSF-Konzentrationen aus humanen Primärkeratinozyten 48 h nach Exposition unter jeweils identischen Versuchskonditionen bezüglich Substanz, deren Konzentration und Expositionsdauer. Angegeben ist die mittlere relative Standardabweichung in [%].	136
Tabelle 15: Überschreitungswahrscheinlichkeiten der Kruskal-Wallis χ^2 -Testgrößen zur Homogenität der Verteilung von individuellen, spontansezernierten Zytokinkonzentrationen innerhalb der Fallgruppen	140
Tabelle 16: Fallgruppenspezifische Spontansekretionen pro Zytokin. Angegeben sind die Mediane der in Abbildung 35 aufgetragenen individuellen Zytokinkonzentrationen (d. h., die Individuen sind gleich stark repräsentiert) mit den 90 % Konfidenzintervallen (90 % CI).	141
Tabelle 17: Überschreitungswahrscheinlichkeiten der Kruskal-Wallis χ^2 -Testgrößen zur Homogenität der Verteilung von Zytokinkonzentrationen innerhalb der Fallgruppe atopisches Ekzem. Verglichen wurde die Spontansekretion durch Keratinozyten aus läsionaler und nicht läsionaler Haut desselben Individuums.	142
Tabelle 18: Inter- und intraindividuelle Effekte der Expositionsdauer auf die Sekretion von GM-CSF	148
Tabelle 19: Logistische Regressionsanalyse qualitativer Expositionseffekte auf die Freisetzung von GM-CSF aus humanen Keratinozyten (KZ: Kurzzeit-, LZ: Langzeitexpositionen)	154
Tabelle 20: Logistische Regressionsanalyse qualitativer Expositionseffekte auf die Freisetzung von GM-CSF aus humanen Keratinozyten getrennt nach Kurzzeit- (KZ) und Langzeitexpositionen (LZ)	156
Tabelle 21: Vergleich des GM-CSF-Sezernierungsverhaltens von Fallgruppen nach dem logistischen Regressionsmodell (2) in Form von Zweigruppenvergleichen über alle Expositionsvariablen ohne Interaktion	159
Tabelle 22: Logistische Regressionsanalyse qualitativer Expositionseffekte auf die Freisetzung von Interleukin 1 α aus humanen Keratinozyten (KZ: Kurzzeit-, LZ: Langzeitexpositionen)	161
Tabelle 23: Logistische Regressionsanalyse qualitativer Expositionseffekte auf die Freisetzung von IL-6 aus humanen Keratinozyten (KZ: Kurzzeit-, LZ: Langzeitexp.)	164
Tabelle 24: Vergleich des IL-6-Sezernierungsverhaltens von Fallgruppen nach dem logistischen Regressionsmodell (2) in Form von Zweigruppenvergleichen über alle Expositionsvariablen ohne Interaktion	167

Tabelle 25: Individuelle Differenzierung der Fallgruppen nach Expositionsvariablen und GM-CSF-Konzentrationsverhältnissen	180
Tabelle 26: Individuelle Differenzierung der Fallgruppen nach Expositionsvariablen und IL-1 α -Konzentrationsverhältnissen	182
Tabelle 27: Individuelle Differenzierung der Fallgruppen nach Expositionsvariablen und IL-6-Konzentrationsverhältnissen	184
Tabelle 28: Kenndaten der Zytokin-Assays laut Hersteller Endogen	219
Tabelle 29: Arithmetische Mittel aller Absolutkonzentrationen der Expositionsfolgefreisetzung – ohne Unterscheidung der statistischen Zuverlässigkeit (quantitativ / qualitativ) – differenziert nach Expositionsvariablen und Expositionsdauer (KZ: Kurz-, LZ: Langzeitexposition). Hervorgehoben sind die gegenüber der Fallgruppe gesunde Haut erhöhten absoluten Zytokin-konzentrationen der atopischen Fallgruppen.	248
Tabelle 30: Arithmetische Mittelwerte und Standardabweichungen aller in den VOC-Expositionsversuchen ermittelten Zytokinspontanfreisetzungsdaten pro Fallgruppe (Individuen unterschiedlich stark repräsentiert) sowie exemplarisch von je vier zufällig ausgewählten Messungen pro Individuum der Fallgruppen. Zwischen den Fallgruppen signifikant unterschiedliche Zytokinkonzentrationen wurden fett markiert.	256
Tabelle 31: Fallzahlabeschätzung für Folgestudien basierend auf der in den VOC-Expositionsversuchen festgestellten Variabilität unter Annahme einer Normalverteilung und einer „power“ von 80 % ($\alpha = 0,05$; $\beta = 0,2$)	257

Abkürzungsverzeichnis

3T3	murine Fibroblastenzelllinie
APT	atopy patch test
APZ	antigenpräsentierende Zellen
BAT	Biologischer Arbeitsstofftoleranzwert
BG	Bestimmungsgrenze
BTX	Benzol, Toluol, Xylol
CD 4	Zelloberflächenmolekül (cluster of differentiation 4)
CE	cornified envelope
CGRP	calcitonin gene-related peptide
CLA	kutanes Lymphozytenantigen
ddH ₂ O	zweifach demineralisiertes Wasser (double distilled water)
DFG	Deutsche Forschungsgemeinschaft
DAB	3,3`-Diaminobenzidintetrahydrochlorid
DIN	Deutsches Institut für Normung
DMEM	Dulbecco`s modified Eagle medium, Zellkulturmedium
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonucleinsäure (desoxyribonucleic acid)
DPBS	Dulbecco`s phosphate buffered saline, isotonischer Phosphatpuffer
EDTA	ethylendiamintetraacetic acid
EG	Erfassungsgrenze (sensitivity)
EGF	epidermaler Wachstumsfaktor (epidermal growth factor)
ELAM-1	endothelium adhesion molecule 1
ELISA	enzyme-linked immunosorbent assay
EtOH	Ethanol
F3	Greens-F3-Differenzierungsmedium
F7	Greens-F7-Proliferationsmedium
FAD ₂ /Greens	Greens-Organkulturmedium (Basis: F12/Adenin/DMEM)
Fc _ε RI	hochaffiner IgE-Rezeptor I
FID	Flammenionisationsdetektor
FKS	fötales Kälberserum
GC	Gaschromatograph, -chromatographie
G-CSF	Granulozytenkolonie stimulierender Faktor (granulocytes-colony-stimulating factor)
GDPBS	DPBS mit 0,1 % (w/v) Gelatine
GM-CSF	Granulozyten-Makrophagen-Kolonie-stimulierender Faktor (granulocytes-macrophages-colony-stimulating factor)
HaCaT	immortalisierte, humane Keratinozytenzelllinie
HBSS	Hanks buffered saline, isotonischer Puffer
H.E.	Hämatoxylin-Eosin
HEPES	N-2-Hydroxyethylpiperazin-N`-2-ethansulfonsäure
HMC-1	humane Mastzelllinie
HMDS	Hexamethyldisilazan
HPLC-MS	Hochleistungs/Hochdruck-Flüssigkeits-Chromatographie – Massenspektrometrie - Kopplungstechnik (high performance/pressure liquid chromatography - mass spectrometry)
HSP 72, 90	heat shock protein 72, 90
ICAM-1	intercellular adhesion protein 1

IFN α , γ	Interferon α , γ
IgE, IgG, IgM	Immunglobulin E, G, M
IL-1 α etc.	Interleukin 1 α , 1 β , 2, 3, 4, 5, 6, 8, 10, 12
IL-1 α -R	IL-1 α -Rezeptor
INT	2-(4-iodophenyl)-3-(4-nitrophenyl)-5-phenyltetrazoliumchlorid
kD	Kilodalton (Molekülmasse, 1Da = 1,6605·10 ⁻²⁴ g)
KBM	serumfreies Keratinozytenmedium (keratinocyte basal medium)
KGM	serumfreies Keratinozytenmedium (keratinocyte growth medium)
K-SFM	serumfreies Keratinozytenmedium (keratinocyte serum-free medium)
KZ	Kurzzeitexposition
LDH	Lactatdehydrogenase
LTB ₄	Leukotrien B ₄
LZ	Langzeitexposition
m	männlich
M22-Mix	VOC-Mischung typischer Innenraumbelastungssituation
MAK	Maximale Arbeitsplatzkonzentration
MCAF	monocytes chemotaxic and activating factor
MEM	Modified Eagle Medium
MIP-2	macrophages inflammatory protein 2
MHC	Histokompatibilitätskomplex (major histocompatibility complex)
MTP	Mikrotiterplatte
MTT	3-[4,5-Dimethylthiazol-2-yl]-2,5-diphenyltetrazolium bromide; Thiazolblue
NAD(H+H ⁺)	Nicotinamid-Adenin-Dinucleotid
NG	Nachweisgrenze
NHEK	humane Primärkeratinozytenzelllinie
NHK	normale humane Keratinozyten
NMVOC	Nicht-Methan-VOC
PAH	polyzyklischer, aromatischer Kohlenwasserstoff (polycyclic aromatic hydrocarbonate)
PBMC	mononukleäre Zellen des peripheren Blutkreislaufs (peripher blood mononuclear cells)
PBS	phosphate buffered saline, isotonischer Phosphatpuffer
PC	Polycarbonat
PCB	Polychlorbiphenyle
PET	Polyethylenterephthalat
PGE ₂	Prostaglandin E ₂
PMA	Phorbol-12-myristat-13-acetat
PM _{2,5} , PM ₁₀	partikuläre Stoffe < 2,5 μ m, < 10 μ m Durchmesser (particular matter)
POM	partikulärer/partikelgebundener organisch-chemischer Schadstoff (particulate organic matter)
POP	persistierender, schwer abbaubarer organisch-chemischer Schadstoff (persistent organic pollutants)
ppm	parts per million
P/S	100 U/ml Penicillin/100 μ g/ml Streptomycin
PTFE	Polytetrafluorethylen
RANTES	Chemokin (regulated on activation, normal T cell expressed and secreted)
REM	Rasterelektronenmikroskop, -mikroskopie
ROS	Reaktive Sauerstoffverbindung (reactive oxygen species)
RPMI	Roswell Park Memorial Institut Zellkulturmedium 1640

RT	Raumtemperatur
<i>S. aureus</i>	<i>Staphylococcus aureus</i>
<i>S. corneum</i>	Stratum corneum
SDS	sodium dodecyl sulphat
SVOC	mäßig flüchtige organisch-chemische Substanz (semi volatile organic compound)
T3	Trijodthyronin
TEM	Transmissionselektronenmikroskop, -mikroskopie
TEWL	Transepidermaler Wasserverlust
TGF α , TGF β	Transformierende Wachstumsfaktoren α , β (transforming growth factor α , β)
Th1, Th2	T-Helferlymphozyten Typ I, Typ II
TNF α	Tumornekrosefaktor α
TRK	Technische Richtkonzentration
UV-A, UV-B	ultraviolette Strahlung A,B
VCAM-1	vascular cell adhesion molecule 1
VIP	vasoactive intestinal peptide
VOC	flüchtige organisch-chemische Substanz (volatile organic compound)
v/v	Volumenprozent (volume per volume)
VVOC	sehr flüchtige organisch-chemische Substanz (very volatile organic compound)
w	weiblich
WHO	Weltgesundheitsorganisation (World Health Organization)
w/v	Gewichtsprozent (weight per volume)
ZNS	Zentralnervensystem

Die Nomenklatur physikalischer Einheiten folgt den Richtlinien des Internationalen Einheitensystems (SI) (Système International d'Unités), ISO 1000, DIN 1301.

Die Nomenklatur chemischer Stoffdarstellungen folgt den aktuellen Richtlinien der IUPAC (International Union of Pure and Applied Chemistry).

1 Einleitung

Die vorliegende Dissertation behandelt eine auf Methoden- und Geräteentwicklungen basierende experimentelle Arbeit. Alle entwickelten Verfahren wie auch die neu konstruierte Apparatur können im Rahmen unterschiedlicher Fragestellungen eingesetzt werden. Die hier realisierten ersten Anwendungen fügten sich in die Arbeitsgebiete der Umweltdermatologie und Allergotoxikologie. Ferner enthält diese Arbeit grundlegende methodische Entwicklungen in der Primärzellkultur sowie einen experimentellen Ansatz organrekonstruierender Gewebezellkultur aus dem Arbeitsbereich des „tissue engineering“.

1.1 Prävalenz und Schweregrad allergischer Erkrankungen – Konzept der Allergotoxikologie

Epidemiologische Untersuchungen zeigen, dass die Zahl der diagnostizierten Erkrankungen (Prävalenz) IgE-vermittelter Überempfindlichkeitsreaktionen weltweit stetig ansteigt. Betroffen sind vor allem saisonale Allergien des atopischen Formenkreises, Soforttypreaktionen, wie allergische Rhinitis und Asthma bronchiale, und atopisches Ekzem (Neurodermitis). Daneben ist – als ein Maß für deren Schweregrad – insbesondere für atopisches Ekzem und Asthma bronchiale auch eine deutliche Zunahme der administrativen Inzidenz dieser Erkrankungen zu verzeichnen. Lange Zeit wurde intensiv und kontrovers die Frage diskutiert, ob es sich um einen realen Anstieg von Prävalenz und Inzidenz allergischer Erkrankungen handelt oder ob lediglich mehr Allergien als solche erkannt und diagnostiziert werden^{1,2}. Inzwischen wird jedoch aufgrund der zahlreichen Daten sicher davon ausgegangen, dass es sich um eine eindeutige Zunahme handelt. So zeigen beispielsweise Studien in Australien³, Großbritannien⁴ und Finnland⁵ einen deutlichen Anstieg der Asthmaprävalenz⁶. Laut *Woolcock et al.* können diese Daten weder allein durch erhöhte Allergenbelastung noch ausschließlich mit intensivierten Diagnosestellungen erklärt werden⁷. Studien aus den USA fanden eine Verdopplung der Prävalenz allergischer Rhinitis innerhalb von 10 Jahren auf 20 % der Bevölkerung⁸. In einem vergleichbaren Zeitraum stieg in Finnland das Auftreten allergischer Rhinitis bei 12- bis 18-jährigen von 5 % auf 15 % der Untersuchten⁹. In einer schottischen Studie konnten über

einen Zeitraum von 25 Jahren von 1964 bis 1989 bei Schulkindern von 8 bis 13 Jahren eine Erhöhung der Prävalenzen für allergische Rhinitis von 3 % auf 12 %, für atopische Dermatitis von 5 % auf 12 % gefunden werden¹⁰. Signifikante Zunahmen der Erkrankungshäufigkeit an atopischem Ekzem wurden außerdem von *Schäfer et al.*¹¹ sowie in einer Zwillingsstudie von *Schultz-Larsen et al.*¹² nachgewiesen. Hier wurde eine Verdopplung des Auftretens von atopischem Ekzem von 6 % auf 12 % der untersuchten Zwillingspaare innerhalb eines Zeitraumes von 20 Jahren gezeigt¹³. Deutschen Studien zufolge ist besonders der Anteil an allergieerkrankten Kindern in den letzten 10 Jahren auf 10-20 % angestiegen, bei sogar 30 % der untersuchten Kinder konnten Sensibilisierungen nachgewiesen werden¹⁴. Doch auch Erwachsene erkrankten mittlerweile gehäuft, oftmals erst nach dem 50. oder 60. Lebensjahr, an allergischen Erkrankungen, insbesondere an saisonaler allergischer Rhinokonjunktivitis (Heuschnupfen)²⁵.

Die dieser weltweit zunehmenden Allergieprävalenz zugrundeliegende(n) Ursache(n) ist bzw. sind bisher nicht bekannt. Als mögliche Einflussfaktoren werden neben der sicheren genetischen Prädisposition^{13,15,16,21} sozioökonomische Lebensstilfaktoren^{17,18}, wie z. B. verstärkte Exposition gegenüber Allergenen durch veränderte Ernährungsgewohnheiten (synthetische Nahrungsmittelzusatzstoffe, exotische Früchte)² und Hygienefaktoren (sogenannte Urwaldhypothese)^{18,19} diskutiert²⁰. Ferner finden sich zunehmend Hinweise auf die ursächliche Beteiligung von Umweltschadstoffen, insbesondere Luftschadstoffen aus straßenverkehrsbelasteten Regionen ^{Übersicht in 28} als Risikofaktoren für die Entwicklung allergischer Erkrankungen^{21,22,23,24}. So wurde ein erhöhtes Vorkommen allergischer Erkrankungen zunächst vor allem in westlichen Industrienationen beobachtet. Im Vergleich zu Reinluftgebieten fand sich in Regionen mit hoher Luftschadstoffbelastung außerdem ein höheres Risiko für Bronchialasthma und allergische Rhinitis^{25,26}. Zudem zeigen epidemiologische Studien eine signifikante Abhängigkeit von Prävalenz und Schweregrad respiratorischer Allergien und des atopischen Ekzems von regional überwiegenden Schadstofftypen^{27,28,29}. In Deutschland wurden nach 1990 in einer Reihe voneinander unabhängiger Ost-West-Vergleichsstudien folgende Sachlage beobachtet: Insbesondere bei den ab 1960 geborenen Jahrgängen nahm die Allergieprävalenz im Westen im Vergleich zum Osten deutlich zu, der Einfluss eines „western life style“ sowie ein möglicher Einfluss durch Luftverschmutzung wurde diskutiert^{30,31,32}. Asthmatische und allergische Erkrankungen der Atemwege sowie Sensibilisierungen wurden vor allem

bei Schulkindern im Westen diagnostiziert, während im Osten nicht allergische, irritative Atemwegserkrankungen und vermehrt vor allem intrinsisches, atopisches Ekzem vorherrschten^{27,33,34}. Nicht allergische Atemwegserkrankungen wie die Bronchitis wiesen dabei eine deutliche Korrelation zu lokal vorherrschenden Belastungen mit Schwefeldioxid und partikulären Schwebstoffen (Typ I-Schadstoffe^{35,44}), den aufgrund extensiver Braunkohle- und Ölverbrennung Osteuropa kennzeichnenden Schadstoffen, auf³⁶. In westdeutschen Städten dominieren hingegen durch den Kraftfahrzeugverkehr verursachte Luftverunreinigungen wie Stickoxide, flüchtige organisch-chemische Verbindungen, Ozon und Feinstäube (PM_{2,5}) (Typ II-Luftschadstoffe^{35,44}). Auch hier konnte eine positive Korrelation zwischen dem Auftreten allergischer, aber auch nicht allergischer Erkrankungen und der Wohnortnähe zu hoch verkehrsbelasteten Straßen nachgewiesen werden^{37,38}. Eindeutig negative Korrelationen fanden sich hingegen für die Allergieprävalenz in Bezug auf die SO₂-Konzentration in der Außenluft³⁹. Ost-West Studien aus den Jahren 1994 bis 1997 zeigen vor dem Hintergrund veränderter Luftschadstoffe und westlicher Lebensbedingungen einen Anstieg der Sensibilisierungsrate und Prävalenz allergischer Rhinitis im Osten auf Westniveau, jedoch keine Veränderungen bezüglich asthmatischer Erkrankungen^{40,41,42}. Um mögliche kausale Zusammenhänge zwischen Schadstoffbelastung und Allergieerkrankungen aufzuklären, etablierte *Behrendt* 1992 den Begriff der Allergotoxikologie als ein multifaktorielles, sowohl epidemiologisch als auch experimentell ausgerichtetes Forschungskonzept^{43,44}. Erklärter Untersuchungsgegenstand ist der „Einfluss von Umweltschadstoffen auf Entstehung (Sensibilisierung), Auslösung (Manifestation) und Aufrechterhaltung (Chronifizierung) allergischer Reaktionen“, erklärtes Ziel ist, allergologisch relevante Schadstoffe zu erkennen, deren Wirkungsweisen zu erforschen und die so gewonnenen Erkenntnisse unter Vorsorgeaspekten und im Hinblick auf die Therapie zu nutzen^{43,44}.

1.2 Einfluss von Luftschadstoffen auf allergische Erkrankungen

1.2.1 Vorbemerkungen

Als luftverunreinigende Stoffe, sogenannte Luftschadstoffe, werden alle luftgetragenen chemischen Stoffe verstanden, die über die natürliche Zusammensetzung sogenannter reiner Luft aus 78 % N₂, 21 % O₂, 1 % Ar, 0,03 % CO₂ und Spuren von Edelgasen wie Ne, He, Kr, Xe, ferner CH₄, H₂, N₂O, O₃, NO_x, SO₂, HNO_x, HO₂⁻- und OH⁻-Radikalen hinausgehen. In drei Hauptgruppen unterteilt sind das zum einen anorganische Luftschadstoffe, sogenannte Reizgase wie Schwefeldioxid, Stickoxide und Ozon wie auch grobe Schwebstäube, die mehrheitlich aus der Verfeuerung fossiler Brennstoffe stammen und somit überwiegend anthropogenen Ursprungs sind. Eine zweite große Gruppe bilden die organisch-chemischen Stoffe wie beispielsweise Polychlorbiphenyle (PCB), Dioxine, Pestizide, polyzyklische aromatische Kohlenwasserstoffe (polycyclic aromatic hydrocarbonate, PAH). Vielfach handelt es sich hierbei um persistierende, schwer abbaubare Stoffe (persistent organic pollutants, POP). Hervorzuheben ist hier ferner die große Klasse der flüchtigen organischen Substanzen (volatile organic compounds, VOC), von denen viele auch partikelgebunden vorkommen (particulate organic matter, POM) und die somit zur dritten Gruppe, den partikulären Luftschadstoffen, wie Dieselruß, Schwebstäuben und Aerosolen überleiten. Auch die organisch-chemischen Luftschadstoffe stammen überwiegend aus der Verfeuerung fossiler Brennstoffe.

Die experimentellen Untersuchungen im Rahmen der vorliegenden Dissertation konzentrierten sich auf die Klasse der VOC. Diese resultieren etwa zur Hälfte aus straßenverkehrsbedingten Emissionen. Höchste Konzentrationen findet man von den Aromaten Benzol, Toluol und m-Xylol (BTX) im typischen Verhältnis 1:3:2, die heute ubiquitär vorhanden sind und als Marker für Verkehrsbelastung dienen. Ferner gehören neben den aromatischen Kohlenwasserstoffen zu der Gruppe der VOC weitere Stoffe überwiegend anthropogenen Ursprungs wie Aliphaten, Aldehyde, Ketone, Ester wie auch eine Gruppe pflanzlicher und mikrobieller VOC, Terpene und Isoprene, die vorwiegend aus natürlichen Emissionen stammen. Auf Vorkommen und Bedeutung sowie Wirkungsspektrum und Metabolisierung von VOC wird ausführlich im Kapitel 2.3 eingegangen.

Kenntnisse über irritative, hepato- und neurotoxische, teils kanzerogene sowie hautpenetrierende Wirkweisen der VOC sind überwiegend für den Bereich arbeitsplatz-

relevanter Konzentrationen bekannt und finden Auswirkung in den MAK (Maximale Arbeitsplatzkonzentration)-Richtlinien. Weit weniger bekannt bis unerforscht sind die Auswirkungen umweltrelevanter Konzentrationen, die um Größenordnungen niedriger sind als die MAK-Werte. So lassen sich BTX in verkehrsbelasteten Regionen in Konzentrationen von ca. $15 \mu\text{g}/\text{m}^3$, $45 \mu\text{g}/\text{m}^3$ bzw. $30 \mu\text{g}/\text{m}^3$ nachweisen^{230,231}, während der TRK (Technische Richtkonzentration)-Wert für Benzol $3,2 \text{ mg}/\text{m}^3$, die MAK-Werte für Toluol $190 \text{ mg}/\text{m}^3$ bzw. für m-Xylol $440 \text{ mg}/\text{m}^3$ betragen²³⁴. Im Hinblick auf extrapolierte Dosis-Wirkungsbeziehungen, so z. B. von MAK-Konzentrationen auf umweltrelevante Konzentrationen, besteht wissenschaftlich jedoch große Unsicherheit. Außerdem beurteilen die MAK-Richtwerte keine Kombinationswirkungen. Die Komplexität der Luftschadstoffe lässt jedoch antagonistische oder synergistische ebenso wie unabhängige Wirkungsverstärkungen bzw. -reduzierungen erwarten. Ebenfalls unbekannt sind potentielle Auswirkungen umweltrelevanter Konzentrationen auf Allergien. Ferner ist trotz nachgewiesener Hautpenetration einiger VOC die Metabolisierung dieser Stoffe in den Zellen der humanen Haut bis heute unerforscht. Vor dem Hintergrund der zunehmenden Allergieprävalenz, u. a. des am Hautorgan manifestierten atopischen Ekzems, besteht im Rahmen der Konzeptes der Allergotoxikologie daher dringender Forschungsbedarf zu diesem Themenkomplex.

In der Fragestellung nach möglichen Auswirkungen von VOC auf Allergien ist als erstes zu betonen, dass die Luftschadstoffe nicht als im eigentlichen Sinn allergieauslösend vermutet werden. Allergieauslösend wirken einzig Allergene, Proteine von zumeist 15 kD bis 65 kD Größe wie beispielsweise Pollen, Tierepithel, Proteine in Nahrungsmitteln. Für die Schadstoffe werden hingegen allergiemodulierende, sogenannte adjuvante, d. h. den Allergieverlauf beeinflussende Effekte vermutet²⁴. Das impliziert auch, dass diese Effekte sowohl inhibitorischer als auch fördernder Art sein können. Es werden zwei hauptsächliche Hypothesen für die potentiellen Einflüsse von Schadstoffen auf allergische Erkrankungen formuliert. Zum einen treten Aeroallergene während ihrer Luftverfrachtung mit Luftschadstoffen in Kontakt, so dass Wechselwirkungen auf schadstoffbeladener Allergenträgerebene denkbar sind⁴⁹. Es konnte bereits gezeigt werden, dass partikelassoziierte Pollen eine veränderte Allergenfreisetzung aufweisen^{45,46,47} und die damit veränderte Bioverfügbarkeit von Pollenallergenen von Relevanz für IgE-vermittelte Allergien sein könnte^{48,49}. Die zweite

Hypothese umfasst einen möglichen direkten, irritativen Einfluss der Schadstoffe auf eventuell vorgeschädigte, allergiebetreffene Organe, wie die Haut, Schleimhäute oder die Bindehaut des Auges. Es wird vermutet, dass Chemikalien mit toxisch-irritativem Effekt infolge lokaler Immunsuppression²⁴ und gesteigerter Infektanfälligkeit der respiratorischen Schleimhäute oder auch infolge der Barrierschädigung beim atopischen Ekzem beispielsweise eine Penetration von Aeroallergenen und damit eine Sensibilisierung fördern könnten und somit Einfluss auf die Auslösungsphase allergischer Erkrankungen nähmen^{50,51,52,53}. Möglicherweise werden Konjugate von körpereigenen Proteinen und Schadstoffen prozessiert und schließlich immunogene Epitope präsentiert²⁴. Infolge der Barrierschädigung beim atopischen Ekzem dringen Luftschadstoffe zudem in tiefere Hautschichten vor und könnten dort eine irritative Entzündungsreaktion induzieren bzw. eine bereits bestehende inflammatorische oder allergische Reaktion aufrechterhalten^{50,51}. Dieser direkte Einfluss ist Gegenstand der Untersuchungen der vorliegenden Dissertation.

1.2.2 Stand der Forschung

In bisherigen Forschungsansätzen wurden vielfach ausführlich die inhalativen Auswirkungen von Luftschadstoffen untersucht, wobei sich interessante Hinweise auf immunologisch und allergologisch relevante Reaktionen ergaben^{Übersicht in 24}. So fanden *Magnussen und Jörres* positive Korrelationen von SO₂, O₃ und NO₂ auf die Symptomatik von Asthmatikern^{54,55,56}. Nasale Provokationsstudien mit verkehrsrelevanten Luftschadstoffen zeigten eine gesteigerte Immunantwort bereits etablierter Allergien⁵⁷. Ferner wurde in Expositions-kammerstudien eine additive Wirkung für die genannten Schadstoffe und Allergene wie Pollen oder Hausstaubmilbenkot auf Asthmatiker nachgewiesen^{58,59}. Mit NO₂-Konzentrationen von 2,0 ppm bis 5,5 ppm provozierten *Blomberg et al.* sowie *Sandstrom et al.* zudem direkt inflammatorische Effekte in den Atemwegen nicht allergischer Probanden^{60,61}. Auch nach Dieselruß-Exposition konnten erhöhte nasale Zytokinkonzentrationen bei Gesunden nachgewiesen werden⁶². Bezüglich der Wirkungen von VOC wurden bisher überwiegend Expositions-kammerstudien mit VOC-Mischungen in Konzentrationen typischer Innenraumbelastungssituationen (M22-Mix) durchgeführt, neben inhalativen Schleimhautirritationen wurden vor allem neurotoxische Effekte untersucht. Entsprechende, deutlich konzentrationsabhängige sowie additive Substanzeffekte wurden für Kon-

zentrationen von 2,5 mg/m³ bis 25 mg/m³ M22-Mix nachgewiesen^{63,64}, die Geruchsschwelle lag bei 3 mg/m³ VOC, entsprechend 0,9 ppm Toluoläquivalenten. Nach Exposition mit 25 mg/m³ M22-Mix ließen sich außerdem eine verminderte Lungenfunktion sowie erhöhte bronchiale Reaktivität bei Asthmatikern feststellen⁶⁵. Ferner konstatierten *Molhave et al.* bei Expositionen mit 100 ppm reinen Toluols eine alveolare Toluol-Absorption von 1,6 mg/min⁶⁶, verbunden mit Irritationen der Augen, der nasalen und Rachenschleimhäute sowie der Atemwege, Kopfschmerzen und subjektiven Befindlichkeitsstörungen, jedoch ohne Beeinträchtigung neurologischer Funktionen. Nach Expositionen mit 10 ppm bzw. 40 ppm Toluol wurden keine negativen Effekte festgestellt⁶⁷. *Koren et al.* konnten zudem einen statistisch signifikanten Anstieg von neutrophilen Granulozyten in Nasallavageflüssigkeiten direkt nach 4-stündiger Exposition mit 25 mg/m³ M22-VOC-Mix sowie 18 h nach der Exposition nachweisen⁶⁸. Hinsichtlich solcher inflammatorischen Reaktionen postulierte *Meggs* die Stimulation chemischer Rezeptoren in den oberen Atemwegen durch neurogene Entzündungsmediatoren wie z. B. Substanz P als Ursache unspezifischer, lokal irritativer Störungen nach Schadstoffexposition (neuro-immunologische Reaktionsmuster)⁶⁹. Auch in *in vitro* Studien zu Schadstoffeffekten auf zellulärer Ebene wurden bisher überwiegend Targetzellen des respirativen Atemtraktes wie Bronchialepithelzellen oder immunmodulatorische Mediatorzellen wie Alveolarmakrophagen sowie mononukleäre Zellen des peripheren Blutkreislaufs eingesetzt^{70-76,140-165}. So wurden nach Exposition mit NO₂, SO₂, O₃ bzw. Partikelfractionen (PM10) wiederholt eine erhöhte Freisetzung inflammatorischer Mediatorsubstanzen wie Eicosanoide, Zytokine und Adhäsionsmoleküle sowie deren chemotaktische Effekte auf eosinophile Granulozyten festgestellt. Außerdem war eine Zunahme reaktiver Sauerstoffverbindungen sowie ferner eine erhöhte Permeabilität und ein inhibierender Einfluss auf den Cilien-schlag des Bronchoalveolarepithels zu beobachten^{70,71,72}. Die bereits *in vivo* bei Asthmatikern festgestellte höhere Sensitivität gegenüber Schadgasen, ließ sich *in vitro* bestätigen: Beispielsweise sezernierten humane Bronchialepithelzellen von Atopikern unter NO₂, O₃ bzw. Dieselruß-Exposition signifikant höhere Zytokinkonzentrationen (GM-CSF, IL-6, IL-8, RANTES)^{72,73}. Auch Experimente zur direkten Wirkung von Luftstaubextrakten auf das allergene Potential von basophilen und neutrophilen Granulozyten von Pollenallergikern^{74,75} sowie zur Wirkung von schadstoffbeladenen Pollen auf basophile Leukozyten von Atopikern⁷⁶ zeigten erhöhte Freisetzung von Histamin, Eicosanoiden sowie reaktiven Sauerstoffspezies (ROS).

Weit weniger Studien wurden zu kombinatorisch inhalativen oder isolierten Schadstoffwirkungen auf die menschliche Haut durchgeführt. Aber auch diese ergaben deutliche Hinweise auf allergologisch relevante Effekte, die vor dem Hintergrund steigender Prävalenz und der weitgehend ungeklärten Ätiologie des atopischen Ekzems verstärkt detaillierter Untersuchung und Klärung bedürfen: Die Haut steht in ständigem, direkten Kontakt mit der Umwelt. Ihrer Barrierefunktion zum Schutz einerseits vor physikalischen, chemischen und biologischen Noxen, wie auch andererseits vor einem Feuchtigkeitsverlust des Körpers kommt daher große Bedeutung zu. Im Vergleich zur Resorption an den Schleimhäuten ist die Resorption durch die Haut aufgrund des verhornten Stratum corneums wesentlich geringer. Für die Suszeptibilität von Irritantien ist jedoch die Hautphysiologie von großer Wichtigkeit. Ist die Barriere der Haut gestört, wie beispielsweise beim atopischen Ekzem, oder durch erhöhten Wassergehalt gequollen (Prinzip des Okklusionsverbands), kann durch eine Verkürzung des Diffusionsweges die Aufnahmerate stark zunehmen^{77,237}. So ist beispielsweise eine ekzemauslösende Wirkung von Aeroallergenen wie Hausstaubmilbenkot, Tierepithel und Pollen auf die barrieregeschädigte Haut bei Probanden mit extrinsischem, atopischen Ekzem bekannt^{78,79}. In Epikutantests wurden unterschiedliche Allergene auf trockener, barrieregeschädigter, aber nicht läsionaler Haut appliziert und die Ekzemreaktion dosiswirkungsabhängig beurteilt^{45,80}: Insbesondere bei Patienten mit Ekzempläsionen an üblicherweise unbedeckten, also umwelt- und luftexponierten Körperteilen sowie bei saisonalen Pollenallergiker-Rhinitikern wurde im sogenannten „atopy patch test“ (APT) ein aeroallergen-getriggertes atopisches Ekzem induziert⁸⁰. Interessant ist nun, dass gleichermaßen mit VOC-vorbehandelten Pollen durchgeführte APTs signifikant stärkere Ekzemreaktionen verursachten⁴⁹. Vergleichbare Ergebnisse wurden in Pricktests mit schadstoffexponierten und nativen Pollen erzielt⁴⁸, was einen direkten Effekt von schadstoffmodifizierten Pollen auf die Induktionsphase des atopischen Ekzems am Patienten beweist. Unklar ist bisher, ob diese verstärkte Reaktion in der oben bereits erwähnten, durch Schadstoffe veränderten Freisetzung von Allergenen aus den Pollen oder/und in einem direkten irritativen Effekt der Schadstoffe auf die Haut begründet liegt. In Ganzkörperexpositionsstudien untersuchten *Eberlein-König et al.* den direkten Einfluss von Innenraum-schadstoffen auf physiologische Hautparameter bei Patienten mit atopischem Ekzem: Bereits kurzzeitige Expositionen mit niedrigkonzentriertem NO₂ und Formaldehyd führten zu messbaren Störungen der Hautbarrierefunktion bei Hautgesunden

und in stärkerer Ausprägung bei Patienten mit atopischem Ekzem⁸¹. Auch für stark lipophile, flüchtige Substanzen wie z. B. Toluol und Xylol ist eine entfettende und damit barriereschädigende Wirkung auf die Haut bekannt. In einer Reihe unterschiedlicher Expositionsstudien wurde die perkutane Absorption von VOC untersucht: Für gasförmige VOC wurden dermale Absorptionsraten von 0,013 cm/h für Hexan bis 0,12 cm/h für Xylol und 0,14 cm/h für Toluol festgestellt⁸². Die Absorptionsrate von Toluol in Blut betrug dabei 0,050 nmol/h. Bei kombiniert inhalativ-dermaler Ganzkörperexposition werden bei intakter Hautbarrierefunktion ca. 1 % der Totalabsorption von Toluol oder Xylol perkutan resorbiert^{82,83}, wobei sowohl die Xylolkonzentration im Blut, wie auch die Methylhippursäureexkretion mit 2-4 h Versatz im Vergleich zur inhalativen Exposition auf eine nachhaltige Aufnahme von Xylol aus der Haut in das vaskuläre System nach Ende der Exposition hinweisen⁸⁴. Bei vorliegender Barrierschädigung liegt dieser Prozentsatz jedoch deutlich höher. So wurden im Vergleich zu Hautgesunden bei Probanden mit atopischer Dermatitis eine zwei- bis dreifach erhöhte Absorption von Xylol nachgewiesen: Nach 3,5-stündiger rein dermaler Exposition mit 300 ppm bzw. 600 ppm Xylol wurde eine zweifach höhere Xylolkonzentration im Blut sowie eine zwei- bis dreifach erhöhte Konzentration des Metaboliten Methylhippursäure im Urin ermittelt⁸⁴. In einer weiteren Studie fand sich nach Kontakt der Hände mit flüssigem Xylol eine ebenfalls dreifach erhöhte m-Xylol-Penetration durch atopische Ekzemhaut⁸⁵.

Zusammengefasst zeigen die bisherigen Untersuchungen sowohl positive Schadstoffkorrelationen auf Allergiesymptome in Form gesteigerter Immunantworten bereits bestehender Allergien als auch inflammatorische Effekte bei Nichtatopikern in Form erhöhter Zytokinkonzentration und Granulozytenzahl. Diese *in vivo* Beobachtungen wurden *in vitro* auf Ebene der Mediator- und Effektorzellen an Hand erhöhter Expression und Sekretion inflammatorischer Mediatorsubstanzen und gesteigerter Sensitivität von Atopikerzellen bestätigt. Basierend auf diesen Ergebnissen stellt sich im Hinblick auf den nachgewiesenen irritativen und zusätzlich barriereschädigenden Effekt von VOC auf das Hautorgan die Frage nach direkten Auswirkungen der VOC auf die Zellen der Haut. Des Weiteren stellt sich vor dem Hintergrund der nachgewiesenen erhöhten, perkutanen Resorption von VOC bei atopischem Ekzem insbesondere die Frage nach dem Einfluss potentieller, zellulärer, VOC-bedingter Reaktionen auf die Pathophysiologie des atopischen Ekzems, zumal eine Beteiligung von Keratino-

zyten und Fibroblasten an immunologischen Signalkaskaden seit längerem bekannt ist^{86,87,88,89}.

1.2.3 Einfluss von Keratinozyten und dermalen Fibroblasten auf immunologische Prozesse

Über eine große Anzahl hochaffiner, spezifischer Oberflächenrezeptoren vermögen Keratinozyten und dermale Fibroblasten durch Expression und Sekretion von Zytokinen (Interleukinen, Interferonen, koloniestimulierenden Faktoren, Tumornekrosefaktoren und Wachstumsfaktoren), Adhäsionsmolekülen und niedermolekularen, chemotaktischen Mediatorsubstanzen exogene wie endogene Signale zu vermitteln. Somit eingebunden in ein komplexes, auto- sowie parakrin reguliertes Zytokinnetzwerk sind sie wesentlich an der Entstehung und Unterhaltung von kutanen Entzündungsreaktionen beteiligt^{90,91}. Tabelle 1 zeigt eine Auswahl von konstitutiv und/oder ausschließlich unter Stimulation von humanen Keratinozyten exprimierten und freigesetzten, (pro-)inflammatorischen Mediatorsubstanzen.

Tabelle 1: Auswahl von konstitutiv und/oder ausschließlich unter Stimulation von humanen Keratinozyten exprimierten und freigesetzten, (pro-)inflammatorischen Mediatorsubstanzen^{92,93,94,95}

Mediatorsubstanzen	Expression
Interleukine IL-1 α , IL-3, IL-6, IL-12	konstitutiv
Interleukine IL-8, IL-10, Interleukin 1-Rezeptorantagonist	induziert
Tumornekrosefaktor TNF α	konstitutiv
Interferon IFN α	induziert
Interferon IFN γ	konstitutiv
Granulozyten-(Makrophagen-) Koloniestimulierende Faktoren GM-CSF, G-CSF	induziert
Monozyten chemotaktischer und aktivierender Faktor (MCAF)	konstitutiv
Makrophagen inflammatorisches Protein 2 (MIP-2)	konstitutiv
Transformierende Wachstumsfaktoren TGF α , TGF β	konstitutiv

Als primäre Zytokine der inflammatorischen Initiatorphase gelten die proinflammatorischen, synergistisch wirkenden Zytokine IL-1 α und TNF α ^{87,96}. Keratinozyten verfügen über ein Reservoir von konstitutiv exprimiertem, sequestriertem IL-1 α , das im Fall einer Zerstörung der Zellplasmamembran oder durch Aktivierung von spezifischen Zelloberflächenrezeptorproteinkaskaden in das umgebene Gewebe sezerniert wird. Hier stimuliert IL-1 α u. a. die Produktion von TNF α ^{97,98}, außerdem von IL-6⁹⁹, IL-8^{99,113} und GM-CSF^{100,101} in benachbarten Keratinozyten sowie autokrin über Interleukin 1 α -Rezeptoren erneut von IL-1 α ^{87,388}. Die Expression des membranständigen TNF α wird außerdem durch IFN γ induziert⁹⁸, während TNF α wiederum stimulierend auf die Produktion von GM-CSF¹⁰¹ und IL-1 α ^{102,103}, IL-1 α -Rezeptorantagonist¹⁰², IL-6^{99,103} und IL-8⁹⁹ einwirkt. Durch mehrere Zytokine vermittelte Stimulationen induzieren dabei vielfach zusätzlich verstärkte Zytokinexpressionen^{97,99,101}. Kondo und Mitarbeiter konnten experimentell zeigen, dass von Keratinozyten freigesetzte Zytokine wie IL-1 α , IL-6 und TNF α die Basalmembran passieren¹⁰⁴. Da die primären Zytokine IL-1 α und TNF α u. a. eine verstärkte Expression von Zelloberflächenrezeptoren und Adhäsionsmolekülen wie ELAM-1, VCAM-1 und ICAM-1 induzieren, provozieren sie in der Dermis eine intensive Leukozyteninfiltration^{87,105,106}. Deren zelluläre Adhäsion führt wiederum direkt zu vermehrter Mediatorfreisetzung und leitet so die Amplifikationsphase der kutanen Entzündungsreaktion ein¹⁰⁷. *In vitro* Kokulturversuche zeigten außerdem, dass aus Keratinozyten sezerniertes IL-1 α parakrin zu erhöhter Expression und Freisetzung von IL-6, IL-8 und GM-CSF aus dermalen Fibroblasten führt, die ebenfalls zur Rekrutierung zirkulierender Leukozyten beitragen^{108,109}. Über die genannten proinflammatorischen Funktionen hinaus spielen TNF α , IL-6, IL-8 und GM-CSF zudem eine wichtige Rolle in Differenzierungs- und Proliferationsprozessen von Keratinozyten und Fibroblasten und werden daher für die in inflammatorischen Hauterkrankungen, wie z. B. Psoriasis und atopischem Ekzem, häufig auftretende epidermale Hyperproliferation verantwortlich gemacht^{110,111,112,113}.

Zytokinmodulierende Schadstoffeffekte auf der zellulären Ebene von Keratinozyten und Fibroblasten gesunder Haut sind bereits bekannt. So wurden 1999 in *in vitro*-Untersuchungen zum direkten Einfluss von Luftschadstoffextrakten auf humane Keratinozyten eine dosisabhängig erhöhte Sekretion der proinflammatorischen Zytokine IL-1 α , IL-8 und GM-CSF nachgewiesen; geringfügige Konzentrationserhöhungen wurden außerdem für TNF α und IL-6 festgestellt¹¹⁴. Die Schadstoffzusam-

mensetzungen einzelner Expositionssituationen ließen sich jedoch nicht mit spezifischen Zytokinmustern korrelieren. *Ushio et al.* zeigten ferner signifikant erhöhte Expression und Freisetzung von IL-1 β und IL-8, nicht jedoch von TNF α aus humanen Keratinozyten nach Exposition gegenüber Dieselruß; entsprechende Ergebnisse wurden nach Formaldehydexposition von mit Phorbol-12-myristat-13-acetat (PMA) vorstimulierten Keratinozyten erhalten¹¹⁵. Eine Proteinexpression von IL-1 α , TNF α , HSP 72 und HSP 90 wurde neben zytotoxischen Effekten außerdem in „monolayer“-Kulturen humaner Keratinozyten und Fibroblasten unter Exposition gegenüber Nickelsulfat induziert^{116,117}. Generell wurde eine verstärkte TNF α -Freisetzung aus Keratinozyten nach Expositionen gegenüber Irritantien wie Nickel, PMA, DMSO, SDS^{118,119} sowie nach UV-Strahlung nachgewiesen^{120,121}. Entsprechende Kenntnisse aus *in vitro* Untersuchungen zur Reaktivität von Keratinozyten aus atopischer Ekzematose auf Schadstoffe liegen derzeit nicht vor.

1.2.4 Zellkultursysteme zur Untersuchung von Schadstoffeffekten

Im Rahmen oben aufgeführter Untersuchungen können unterschiedliche Keratinozyten/Fibroblasten-Mono- und Kokultursysteme eingesetzt werden. Konventionelle, mit Zellkulturmedium bedeckte (submerse), zweidimensionale Kulturen erlauben die Analyse direkter Interaktionseffekte der Testsubstanzen mit lebenden Zellen der Basal- und Suprabasalschicht der Haut und sind auf wasserlösliche Substanzen limitiert. Alternativ können Keratinozyten in der Flüssig-/Gasgrenzphase („air-liquid-interphase“) zu dreidimensionalen, differenzierten, mehrschichtigen Epidermisrekonstrukten kultiviert werden. Für diese Technik des „*in vitro* tissue engineering“ bedarf es einer komplexen, definiert abgestimmten Mediensupplementierung von Nährstoffen, proliferations- und differenzierungsregulierenden Mediatoren wie Wachstumsfaktoren, Hormonen, Zytokinen etc. zur Simulation des *in vivo*-Zellmilieus. Diese wird außerdem durch dermal-epidermale Kokulturen, extrazelluläre Matrix-Komponenten oder auch deren synthetische Imitationen unterstützt. Eine Vielzahl unterschiedlichster Methoden befindet sich weltweit in der Entwicklung^{122,123}. Die bisherigen Erfolge zeigen ein mehrschichtiges, differenziertes und keratinisiertes Epithel, dessen Lipidzusammensetzung und Funktionalität im Hinblick auf die Permeabilitätsbarriere sich jedoch noch deutlich von der *in vivo* Situation unterscheidet^{124,125,126}. Vorrangiges Entwicklungsziel ist derzeit einerseits die Optimierung der Kulturbedingungen zur

Generierung einer voll funktionsfähigen Lipidbarriere^{126,127,128,129}, andererseits die Integration eines Gefäßnetzes¹³⁰ sowie zusätzlicher Zelltypen wie z. B. Melanozyten^{Übersicht in 131,132,134} und Langerhanszellen^{133,134}. Langfristig ist zudem die Generierung von Modellkulturen für Wundheilung¹³⁵, Infektionen mit *Candida albicans*¹³⁶ sowie spezielle Hauterkrankungen wie z. B. atopisches Ekzem, Psoriasis¹³⁷, Vitiligo¹³⁸ und Ichthyosis¹³⁹ geplant. Ein derart funktionelles Hautorganmodell bietet nicht nur die Möglichkeit, *in vitro* die Penetrationseigenschaften von Stoffen sowie ihre zellulären und immunmodulatorischen Effekte zu untersuchen, aufgrund des „air-liquid interface“ ist diese Art dreidimensionaler Zellkulturen zudem insbesondere für die Exposition gegenüber gasförmigen Substanzen geeignet.

1.2.5 Systeme zur *in vitro* Exposition gegenüber gasförmigen Stoffen

Für die *in vitro* Exposition von Zellkultursystemen gegenüber gasförmigen Stoffen bedarf es spezieller Expositionskammern zur Simulation physiologischer und/oder troposphärischer Umweltbedingungen sowie zur Realisierung definierter Expositionssituationen. In der Literatur von 1960 bis heute lässt sich die Entwicklung unterschiedlichster experimenteller Ansätze zur *in vitro* Exposition gegenüber flüchtigen Gasen verfolgen. Sie zeichnen sich durch systemspezifische Vor- und Nachteile aus und eignen sich jeweils für einen speziellen Bereich von Fragestellungen^{Übersicht in 140}. Der einfachste Expositionsansatz leitete die Testatmosphäre in Standardzellkulturflaschen mit submersen Monokulturen. Pace und Mitarbeiter entdeckten in den 60er Jahren mit Hilfe eines Expositionssystems invertierter Zellkulturflaschen eine physikalische und biochemische Protektionswirkung durch die den Zell-„monolayer“ überdeckende Mediumschicht^{141,142}. Für oxidativ reaktive und schwer wasserlösliche Gase wie Ozon und NO₂ wurden wiederholt signifikante Effektunterschiede zwischen Expositionen mit direktem Zellkontakt zur Gasphase bzw. Expositionen durch die Mediumphase hindurch nachgewiesen^{143,144,146}. In mediumbedeckten *in vitro* Expositionssituationen resultierten aufgrund von schlechter Löslichkeit der Stoffe¹⁴⁰ sowie von Diffusionsbarrieren in Schüttelkulturen¹⁴⁵ keine realistischen Stoffkonzentrationen im Zellkulturmedium. Erreicht man jedoch optimale Diffusionsbedingungen im System, kann die unter diesen Bedingungen im Medium resultierende Stoffkonzentration mit dem Henry/Raoult'schen Gesetz berechnet und dieser Effekt durch den Einsatz entsprechend höherer Gaskonzentrationen ausgeglichen werden (vergleiche

Methode 4.7.2.3 dieser Arbeit). *Pace et al.* postulierten ferner eine maskierende Pufferwirkung auf die Testsubstanzen durch Medienproteine, v.a. bei Zusatz von fötalem Kälberserum (FKS), sowie artifizielle Metabolitwirkungen¹⁴². Letztere können in Kontrollexperimenten mit gasexponiertem Medium in normaler Atmosphäre ausgeschlossen werden.

Der permanente Zell-Gaskontakt in invertierten „monolayer“-Systemen führt jedoch zur Austrocknung der Zellen und somit zu zytotoxischen Artefakten^{140,146}. *Tu et al.* lösten dieses Problem durch Integration eines invertierten „monolayer“-Systems in eine wasserdampfgesättigte Expositionskammer im Standardinkubator¹⁴⁶. Alternativ gewährleisteten eine Reihe unterschiedlicher Expositionssysteme einen periodischen Zell-Gas/Zell-Medium-Kontakt: So ließen sich große Zellzahlen in Rollflaschenkulturen gegenüber unterschiedlichen Gaskonzentrationen unter sterilen Bedingungen exponieren^{147,148}. Die Aussaat in den Zylinderflaschen führte jedoch zu inhomogenen Zellschichten, das große Totvolumen erforderte zudem große Gasvolumina. Zusätzlich kam es zu Ozonkonzentrationsverlusten im Zellkulturmedium. Eine schwierig zu standardisierende, periodische Gasexposition erfolgte ferner in Petrischalen auf im Standardinkubator installierten Taumelschüttlern („rocking cultures“)^{149,150}. *Valentine (1985)* und *Persinger et al. (2001)* verbesserten diese Methode durch Austausch des Inkubators gegen gasdichte Expositionskammern aus inerten Materialien^{145,151}. Das verbesserte System nach *Valentine* ermöglichte vier simultane Expositionen gegenüber unterschiedlichen Gaskonzentrationen. Zusätzlich war die Luftfeuchte regulierbar und die Gaskonzentration wurde am Expositionsort überprüft¹⁴⁵. Aufgrund der durch den Wechsel von Mediumbedeckung mit wechselnder Schichtdicke, Gasexposition durch einen Restfeuchtfilm und Trockenfallen der Zellen undefinierten Expositionsbedingungen sind die effektiven Expositionskonzentrationen in allen oszillierenden Systemen jedoch schwer zu bestimmen und zu reproduzieren. Dasselbe gilt für die direkte Gaseinleitung in Suspensionskulturen („gas bubbling“)^{zitiert in 152,153}. Zusätzlich stören mechanische Scherkräfte durch die abwechselnde Immersion und Emersion die Zellproliferation und führen zu verstärktem Adhärenzverlust insbesondere von geschädigten Zellen. Ein 1998 von *Mückter et al.* entwickeltes Expositionssystem minimierte diese Scherkräfte mit Hilfe einer äußerst niedrigen Kippfrequenz¹⁵⁴. Auf drei Plattformen wurden bis zu 12 kommerzielle Zellkulturflaschen simultan mit der Testsubstanz aus Verdampfeinheiten gezielt versorgt. Die Exposition erfolgte im Standardinkubator bei 37°C, 5 % CO₂ und 100 % Luftfeuchte.

Die erste Apparatur zur kontinuierlichen Gasexposition wurde 1977 von *Voisin et al.* konzipiert^{155,156}. Sie wird noch heute zur Exposition von Alveolarmakrophagen und Bronchialepithel gegenüber Ozon eingesetzt^{157,158,159,160}. Ein Zweikompartiment-system simulierte die physiologische *in vivo* Situation. Die Zellaussaat auf Celluloseacetat-Membranfiltern ermöglichte eine direkte Gasexposition, die Nährmedienversorgung erfolgte ausschließlich durch Kapillarkräfte aus dem unteren Systemkompartiment. Weitere direkt gasexponierte, „air-liquid interface“-basierte Expositionssysteme wurden u. a. von *Alink et al. (1979)*¹⁵², *Samuelsen et al. (1978)*¹⁶¹, *Behnke et al. (1988)*¹⁶², *Tarkington et al. (1994)*¹⁶³ und *Abe et al. (2000)*¹⁶⁴ etabliert. Bei *Alink et al.* erfolgte die Gasexposition von der zellabgewandten Membranseite, wodurch die effektive Gasexpositionsdosis nicht exakt ermittelt werden konnte. *Samuelsen et al.* und *Rasmussen & Crocker (1981)*^{zitiert in 140} exponierten respiratorische Epithelzellen und Lungenfibroblasten auf Celluloseacetat-Membranfiltern in Perfusionskammern. Durch Invertieren der Kammer¹⁶¹ bzw. durch Entfernen des Zellkulturmediums mittels einer peristaltischen Pumpe¹⁴⁰ wurden die Zellen auf der Membranoberseite gasexponiert. Nach der Exposition erfolgten submerse Folgeinkubationen. Auf diese Weise gasexponierte Kulturen waren bereits gegenüber niedrigen NO₂- und O₃-Konzentrationen äußerst sensitiv. Jedoch erfolgte ein stärkerer Zelladhärenzverlust von den auf Filtermembranen als von auf Glas oder Plastik exponierten Zellen. *Behnke et al.* entwickelten 1988 eine mit einem UV-Simulator gekoppelte Apparatur, die eine Exposition von Pro- und Eukaryonten gegenüber photochemisch transformierten Gasgemischen in umweltrelevanten Konzentrationen ermöglichte¹⁶⁵. Physikalisch-chemische Parameter wie Temperatur, relative Luftfeuchte und Gasdruck wurden dabei innerhalb des Prüfgastransformators ermittelt. Die zelluläre Exposition fand in nachgeschalteten, gasdichten Methylmethacrylat-Boxen mit 3,5 l Volumen in einem konventionellen Inkubator statt. Die gaschromatographische Analyse der Prüfgase erfolgte an Hand von Proben aus dem Transformator sowie dicht hinter der Expositionsbox außerhalb des Inkubators. Eine Istwertkontrolle physikalisch-chemischer Kenndaten „online“ innerhalb der Expositionsbox war jedoch – wie u. a. auch in den Systemen von *Mückter et al.*¹⁵⁴ und *Abe et al.*¹⁶⁴ – nicht möglich¹⁶⁵.

Rasmussen fasste 1984 die wichtigsten Kriterien für *in vitro* Expositionssysteme wie folgt zusammen¹⁴⁰: 1. Wichtigste Voraussetzung für eine kontrollierte und reproduzierbare Exposition ist eine präzise Kontrolle der Schadgasgenerierung und der effektiven Expositionskonzentrationen. Dies erfordert – über die biologisch-medizini-

schen Aspekte der *in vitro*-Systeme hinaus – umfassende physikalisch-technische Kenntnisse. Insbesondere Niedrigkonzentrationsmessungen setzen eine hochgradige Reinheit der Expositionsatmosphäre sowie eine geeignete Messgeräteausstattung voraus. 2. Die Expositionsbedingungen in der Apparatur müssen signifikante Expositionszeiten ohne Artefakte ermöglichen. Die Zellvitalität darf durch Kontrollexpositionen nicht beeinträchtigt werden. So wirkt eine feuchte Testatmosphäre der Zellaustrocknung entgegen und erlaubt Langzeitexpositionen. 3. Eine einfache und schnelle Handhabung der Apparatur und Expositions-kammer sowie der Kulturen beugt ebenfalls Artefakten vor. 4. Sterilität in der Expositionsapparatur gewährleistet zum einen an die Exposition anschließende Zellinkubationen, um – vor allem nach Kurzzeitexpositionen – verzögerte Effekte und angereicherte Biomoleküle nachzuweisen. Zum anderen werden kontaminationsbedingte Artefakte ausgeschlossen. 5. Die Expositionsapparaturen sollten einen direkten Gaskontakt mit den Zellsystemen ermöglichen. Dieser physiologische Expositions-kontakt schließt ungewollte Medieninteraktionen mit der Testsubstanz aus. 6. Zur Simulation von *in vivo* Expositions-konditionen sind vor allem *in vivo* luftexponierte organotypische Kulturen geeignet.

1.3 Aufgabenstellung und Ziele der Dissertation

Die Häufigkeit und der Schweregrad des atopischen Ekzems beim Menschen nehmen stetig zu. Die Allergotoxikologie untersucht die Frage, ob als Ursache hierfür Schadstoffe aus der Umwelt in Frage kommen. Ergebnisse aus entsprechenden Tierversuchen lassen sich nur bedingt auf den Menschen übertragen^{166,167}. *In vivo* Expositionen des Menschen ermöglichen keine differenzierte Beurteilung von durch Hautzellen, wie Keratinozyten und Fibroblasten, oder durch immunmodulatorische Zellen aus dem Blutkreislauf verursachte Reaktionen. Demgegenüber erlaubt ein *in vitro* Testsystem die Untersuchung der direkten Wirkung von Schadstoffen allein auf die Zellen der Haut. Im Rahmen der vorliegenden Arbeit sollte deshalb ein geeignetes *in vitro*-Testsystem zur Analyse dieser Fragestellung entwickelt werden, wobei als Modellschadstoffe flüchtige organische Substanzen (VOC) eingesetzt werden sollten.

Eine grundlegende Voraussetzung für *in vitro* Expositionsversuche bilden geeignete Zellkultursysteme. Eine Aufgabe dieser Arbeit war daher die Entwicklung, Etablierung und Optimierung von Methoden, mit denen sich vergleichbare primäre, humane Keratinozyten und Fibroblasten unterschiedlichen Ursprungs isolieren und kultivieren lassen: Die Zellen sollten sowohl aus gesunder Haut nicht atopischer Probanden als auch aus läsionaler und nicht läsionaler Haut von Probanden mit atopischem Ekzem gewonnen werden. Hierbei waren insbesondere die veränderte mikrobielle Keimbesiedlung der atopischen Haut sowie pathophysiologisch veränderte Kultureigenschaften der Keratinozyten zu berücksichtigen. Langfristig ist die Entwicklung eines vollfunktionellen, humanen *in vitro*-Modells für das atopische Ekzem geplant. Deshalb sollten parallel zu submersen Mono- und Kokulturen methodische Ansätze entwickelt werden, mit denen sich zukünftig dreidimensionale Organoidkulturen rekonstruieren lassen. Die Simulation des *in vivo* Zellmilieus in Form der extrazellulären Matrix und die Regulation der epidermalen Differenzierung mussten hier besonders beachtet werden.

Die Untersuchungen dieser Arbeit sollten sich auf die für straßenverkehrsbedingte Belastungszonen typischen flüchtigen, organisch-chemischen Modellschadstoffen Toluol und m-Xylol konzentrieren. Der reale, umweltrelevante Kontakt der Haut mit diesen Substanzen findet über die Gas- oder Dampfphase statt. Ein wesentlicher Teil der zu lösenden Aufgabe bestand daher in der Entwicklung und Konstruktion einer

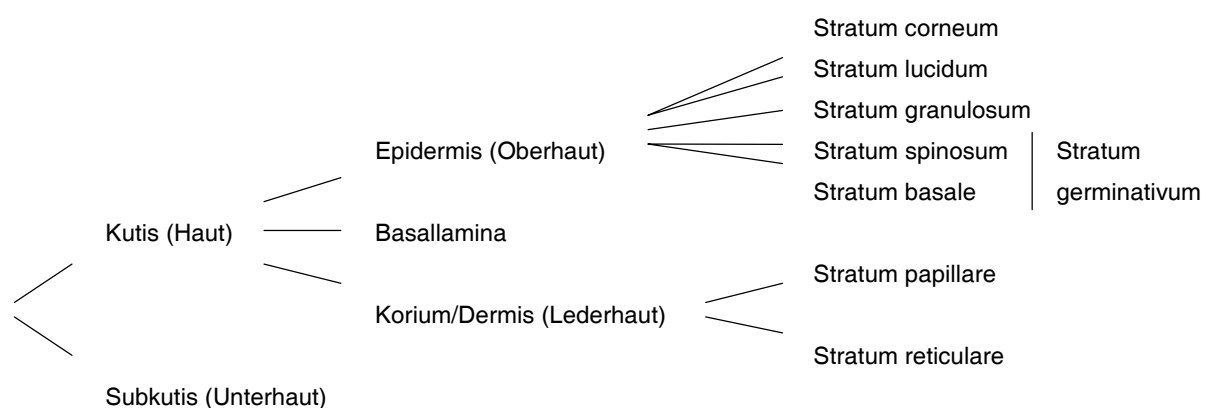
Apparatur, die die Exposition von Zellkultursystemen gegenüber gasförmigen Stoffen unter kontrollierten Bedingungen ermöglicht. Die anschließende experimentelle Evaluation der Expositionsapparatur musste eine detaillierte Charakterisierung der physikalischen, chemischen und biologischen Kenndaten umfassen. Besonderer Wert musste dabei auf eine gründliche Qualitätskontrolle bezüglich der Stabilität und Reproduzierbarkeit aller Betriebsparameter gelegt werden. Schließlich sollten unter Einsatz der Apparatur in ersten Experimenten zur VOC-Exposition von Keratinozyten Erkenntnisse über die Qualität und Quantität von schadstoffinduzierten, direkten, zellulären Auswirkungen gewonnen werden. In einem vereinfachten experimentellen Ansatz sollten deshalb proliferierende Keratinozyten atopischen und nicht atopischen Ursprungs als Modell der Basalzellschicht gegenüber unterschiedlichen Konzentrationen von Toluol und m-Xylol exponiert werden. Das Ziel war, unter Ausschluss zytotoxischer Effekte proinflammatorische und proliferationsmediierende Effekte zu untersuchen. Gleichzeitig sollten aus diesen Untersuchungen sinnvolle Fragestellungen und optimale Versuchsbedingungen für Folgeexperimente abgeleitet werden.

2 Hintergründe

Grundlegende Kenntnisse über die Struktur und Funktion des humanen Hautorgans sind essentiell für das Erfassen der Problematik der *in vitro* Rekonstruktion humaner Hautorganoide ebenso wie für das Nachvollziehen der Barrierefunktion und perkutanen Penetrationsprozesse. Sie werden im Kapitel 2.1 vermittelt. Kapitel 2.2 gibt einen Überblick über die ätiologischen und pathophysiologischen wie immunologischen Aspekte des atopischen Ekzems. Schließlich erläutert Kapitel 2.3 sowohl Vorkommen und Bedeutung als auch den aktuellen Kenntnisstand im Hinblick auf das Wirkungsspektrum und die Metabolisierung von flüchtigen, organisch-chemischen Substanzen.

2.1 Struktur und Funktion des humanen Hautorgans^{168,169,170}

Das Hautorgan bildet mit einer Oberfläche von 1,6-1,8 m² und einer Dicke von nur 1-4 mm das größte Organ des menschlichen, erwachsenen Körpers. Die nachfolgende Graphik und Abbildung 1 verdeutlichen den geschichteten, anatomischen Aufbau der Haut aus Subkutis und Kutis, die sich aus ebenfalls jeweils mehrschichtiger Dermis und Epidermis zusammensetzt. Zusätzlich besitzt die Haut differenzierte Organkomponenten, sogenannte Hautanhangsgebilde wie Haare, Nägel, Talg- und Schweißdrüsen. Eine außerordentlich hohe Enervation durch zahlreiche Rezeptoren, die auf taktile, thermische Reize und Schmerzreize reagieren, zeichnet die Haut als sensibles Organ aus.



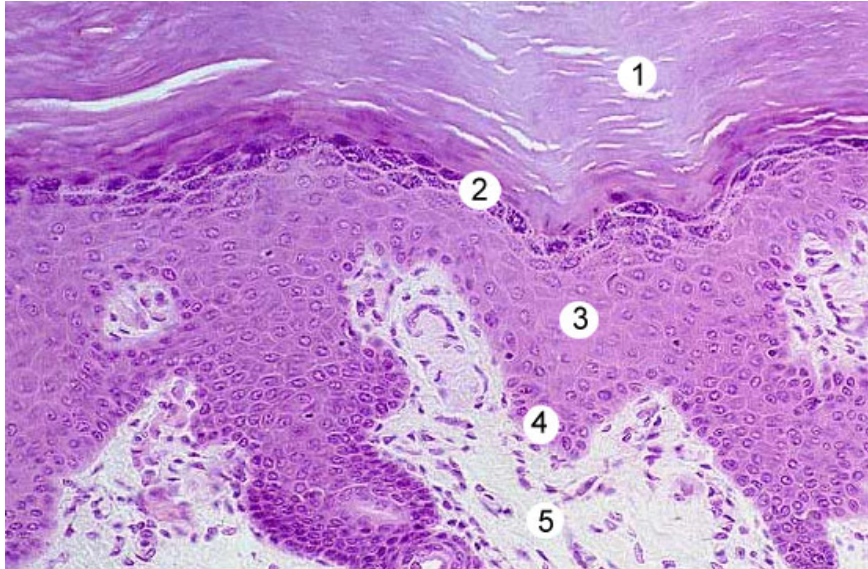


Abbildung 1: Histologie humaner Haut (H.E.-Färbung, Vergrößerung: x 50)¹⁷¹, (1-4) Epidermis: (1) S. corneum, (2) S. granulosum, (3) S. spinosum, (4) S. basale; (5) Dermis

Kutis I: Epidermis

Die Epidermis oder Oberhaut bildet ein mehrschichtiges, an der Oberfläche keratinisiertes Plattenepithel ektodermaler Herkunft. Die Dicke der Epidermis variiert von 0,04-1,5 mm. 85 % der epidermalen Zellen sind Keratinozyten, in basalen Schichten finden sich zudem Melanozyten, Langerhanszellen und Merkelzellen. Täglich erfolgt eine Abstoßung der obersten 2-3 Hornschichten (Desquamation) der Epidermis, die durch darunterliegende Schichten permanent ersetzt werden. Die transepidermale Zellpassage von basal bis apikal dauert circa 30 Tage. Die mitotisch aktiven Zellen des Stratum basale und Stratum spinosum, die gemeinsam das Stratum germinativum bilden, unterliegen bis zur 4. Zellgeneration einer differentiellen Zellteilung mit je einer bleibenden Stammzelle, danach erfolgt die Differenzierung aller neugebildeten Zellen. Die Epidermis wird dadurch in hexagonale Proliferationseinheiten gegliedert, die über je 10-15 Basalzellen bis in das Stratum corneum reichen. Von basal nach apikal werden fünf Schichten unterschieden.

Das Stratum basale bildet eine Reihe proliferierender, zylindrischer Keratinozyten. Ihr Zytoplasma ist reich an intermediären Keratinfilamenten, es beinhaltet alle synthetisierenden Organellen und zeichnet sich durch einen großen Nukleus und viele freie Ribosomen und Polysomen zur Synthese zytoplasmatischer Proteine aus. Basal liegen die Zellen der von Epithelzellen und Fibroblasten gebildeten Basallamina

auf, die eine fixe, dermoepidermale Verbindung vermittelt. Die Fixierung des Stratum basale an diese Basalmembran erfolgt über Hemidesmosomen der Epithelzellen, die bis in die Dermis reichen. Lateral und apikal dienen zahlreiche Desmosomen der interzellulären Verknüpfung. Etwas kleiner als Keratinozyten, mit langen, dendritischen Ausläufern verzweigen sich Melanozyten neuroektodermalen Ursprungs zwischen den Keratinozyten des Stratum basale und der Basalmembran, mit der sie durch Hemidesmosomen verbunden sind. Reife, aus Melanosomen sekretierte Melaningranula wandern über die dendritischen Zellfortsätze mittels zytokriner Sekretion oder Inokulation in benachbarte Keratinozyten und werden dort an Lysosomen gebunden. Ein Melanozyt versorgt durchschnittlich 5-8, maximal bis zu 20 Keratinozyten des Stratum basale und Stratum spinosum.

Das Stratum spinosum besteht aus mehreren Schichten polygonaler Keratinozyten, die zur Oberfläche hin abflachen. Der Name Stachelzellschicht weist auf die charakteristischen Zytoplasmaausläufer mit Desmosomen in deren Spitzenregionen hin. Reichhaltige Tonofibrillen im Zytoplasma, die in die Desmosomen hineinreichen, aber nicht die erweiterten Interzellularräume durchziehen, führen zur Stabilisierung der Haut gegen Scherkräfte. Die oberen, stark abgeflachten Stratum spinosum-Zellschichten synthetisieren membranumschlossene Granula.

Nach 10-14 Tagen transepidermaler Differenzierung vom Stratum basale aus erreichen die Keratinozyten das Stratum granulosum. Die Zellen der 3-5 Schichten sind stark abgeflacht und enthalten viele, stark verdichtete Tonofibrillen. An die Tonofibrillen angelagert findet sich reichlich Keratohyalin, granuläre, aggregierte Proteine, u. a. Filaggrin. Sie werden in den Interzellularräumen abgegeben, was diesen verdichtet und zur epidermalen Barrierefunktion beiträgt. Das Zytoplasma enthält ferner membranumschlossene, lamelläre Granula mit Glucosylceramiden, Cholesterin, freien Fettsäuren und Phospholipiden. Der verminderte Gehalt an Zellorganellen weist auf die beginnende Zelldegeneration hin.

Das dünne Stratum lucidum, eine einzelne homogene Schicht, findet sich nur in der dicken Epidermis der Hand- und Fußflächen. Es zeichnet sich durch lysosomal degradierte, pyknotische Zellkerne und aus dicht gepackten Filamenten bestehendes Zytoplasma aus.

Die oberste Schicht der Epidermis, das Stratum corneum, besteht schließlich aus stark abgeflachten, 30 µm langen, 0,5-0,8 µm dicken, aus toten Korneozyten gebildeten Hornlamellenschichten. Durch die Abflachung der keratinisierten Zellen be-

deckt eine Stratum corneum Zelle etwa 25 Zellen des Stratum basale. Die innere Stratum lucidum-nahe Zone enthält reichlich Keratin; Zellkerne und Organellen sind vollständig abgebaut. Die äußeren Zellschichten sind gänzlich keratinisiert. Der durch Hydrolasen in den oberen Stratum spinosum Schichten beginnende Abbau nahezu aller Zellbestandteile ist hier abgeschlossen. Bemerkenswert sind insbesondere die Veränderungen der Zellmembran. Die übliche Dreierschichtung ist aufgelöst, die Innenseiten bestehen, wie schon im Stratum spinosum und Stratum lucidum, aus Transglutaminase-vernetztem Involucrin, das die chemisch widerstandsfähigste Schicht des Stratum corneum bildet.

Kutis II: Dermis

Die Dermis besteht aus zwei Schichten dichten, faserreichen Bindegewebes mesodermaler Herkunft, die die mechanischen Eigenschaften der Haut bedingen. Die Zwischenräume des Fasergeflechts sind zudem reich an wasserbindenden Glycosaminoglycanen, wie Dermatansulfat, Hyaluronat, Chondroitinsulfat A und C, die wesentlich für den Turgor der Haut sorgen. Aufgrund ihres Gefäßreichtums kommt der Dermis große Bedeutung bezüglich Nährstoffversorgung, Immunabwehr sowie Thermo- und Kreislaufregulation zu. Infolge der großen Anzahl nervöser Rezeptoren und Nerven fungiert sie zudem als Sinnesorgan Haut. Auch die Haarwurzeln und Hautdrüsen reichen bis in die Dermis, teilweise bis in die Subkutis.

Das dickere Stratum reticulare verbindet Kutis und Subkutis. Überwiegend aus engem Typ I-Kollagenfasergeflecht aufgebaut, ist es für Dehnbarkeit und Reißfestigkeit der Haut verantwortlich. Dichte, elastische Fasernetze aus Elastin sorgen durch Rückordnung des gedehnten Kollagenfasergeflechts für die reversible Verschiebbarkeit der Haut. Durch das dünnere und lockere Bindegewebe des Stratum papillare steigen nur dünne elastische Fasern auf, die apikal fibrotubulär an die Basalmembran der Epidermis anknüpfen. Das Stratum papillare besteht insbesondere aus Bindegewebszellen, den Fibroblasten. Es enthält neben einem Gefäßnetz aus Blut- und Lymphkapillaren, Nervenverzweigungen und Meissnerschen Tastkörperchen vor allem Zellen des Immunsystems, wie Lymphozyten, Plasmazellen, Monozyten, Makrophagen und Mastzellen. Neben den elastischen Fasern strahlen Bindegewebspapillen aus Typ III-Kollagenfasern in die Basallamina ein. Diese Ankerfasern sorgen zum einen für die stabile dermoepidermale Verbindung, zusätzlich wird die gemeinsame Kontaktfläche von Dermis und Epidermis vergrößert und somit die Ernäh-

rungssituation der Epidermis verbessert. Höhe und Anzahl der Reteleisten hängen von der mechanischen Beanspruchung der Haut ab. Höchste Papillen weist die Leistenhaut der Handflächen und Fußsohlen auf. Hier erreicht die Dermis eine maximale Dicke von bis zu 3 mm.

Subkutis

Die unterste Schicht der Haut (Subkutis) stellt in Form eines lockeren, gefäß- und fettgewebsreichen Bindegewebes die Verbindung zwischen Kutis und oberflächlicher Körperfazie her. Sie bildet einen wichtigen Fettspeicher sowie Druck- und Wärmeisolator. Das lockere kollagene Bindegewebe dient der Verschiebbarkeit der Haut. Weitmaschige Blut- und Lymphgefäßnetze an der Grenze zwischen Subkutis und Kutis sorgen für die Nährstoffversorgung der Haut.

Barriere- und Schutzfunktion der Haut

Mechanische Festigkeit

Hinsichtlich mechanischer Belastungen zeichnet sich die Haut durch reversible Dehnbarkeit und Verschiebbarkeit sowie Reißfestigkeit aus. Mechanischer Schutz wird außerdem durch Druck-/Zugspannungsminderung bewirkt. Insbesondere das Stratum corneum nimmt von außen einwirkende, mechanische Belastung auf. An Händen und Füßen ist es auf dem stratum lucidum elastisch verschiebbar. In darunter liegenden Zellschichten, wie dem Stratum germinativum, sind die Keratinozyten durch Desmosomen zu einem festen, flexiblen Netzwerk verbunden. Die Basallamina verbindet Epidermis und Dermis durch Hemidesmosomen. Zusätzlich inserieren auf der Koriumseite der Basalmembran Kollagenfasern des Bindegewebes und verleihen der dermoepidermalen Verbindung hohe Reißfestigkeit. Intradermal sorgen zusätzliche Koriumpapillen für eine dickere, festere Leistenhaut an Hand- und Fußflächen. Das Stratum reticulare ist für die besondere Zugfestigkeit der Haut verantwortlich. Weitere Druck- und Stoßbelastungsminderung resultiert aus dem elastischen, subkutanen Fettgewebe.

Permeabilitätsbarriere

Die wichtigste Funktion der Haut ist die Aufrechterhaltung der Permeabilitätsbarriere zwischen dem inneren Körpermilieu und der Umwelt. Dem Stratum corneum fällt dabei die entscheidende Rolle zu. Ein transzellulärer Transport durch das circa 10 µm dicke Stratum corneum ist weder aktiv, noch passiv möglich. Die Interzellularspalten der unteren Epidermis (Stratum basale, Stratum spinosum) sind, wie in jedem Epithel, relativ weit und voll zahlreicher Desmosomen. Auch in oberen Epithelschichten, einschließlich dem Stratum corneum sind Interzellularspalten und Desmosomen vorhanden. Beginnend ab dem Stratum granulosum werden jedoch die Interzellularspalten mit von Lamellengranula exozytierten Lipidlamellen aus Ceramiden, Cholesterin und Fettsäuren abgedichtet und bilden so eine Permeabilitätsbarriere gemäß dem „brick and mortar“-Modell nach *Elias*, wobei die Kerneozyten die Backsteine, die Interzellulärsubstanz den Mörtel repräsentieren¹⁷². Auch ein parazellulärer Transport ist somit nur bedingt möglich. Die Haut hat vielmehr den Charakter einer Lipidmembran, die bevorzugt lipophile Stoffe passieren lässt²³⁷. Die Diffusionsrate eines Stoffes durch das Stratum corneum ist der geschwindigkeitsbestimmende Schritt der perkutanen Resorption²³². Die Permeabilitätsrate der Epidermis ist dabei weniger abhängig von der Epidermisdicke und der Dicke einzelner Schichten, wohingegen die Lipidzusammensetzung und das relative Lipidgewicht die Diffusionsrate erheblich beeinflussen¹⁷³. Einen wesentlichen Einfluss auf die Permeabilität hat zudem der Quellungsstatus des Stratum corneums¹⁷⁴. Für Gase ist die Haut permeabler als für Flüssigkeiten und für Elektrolyte. Die Permeabilitätsbarriere bedingt somit zusätzlich einen wesentlichen Schutz vor Austrocknung durch transepidermalen Wasserverlust. Für größere Moleküle oberhalb 40 kD Molekulargewicht stellt die Basalmembran eine zusätzliche Diffusionsbarriere dar.

Thermoregulation und Regulation des Wasserhaushaltes

Durch das umfassende, anastomosierenreiche Gefäßsystem besitzt die Haut eine relativ hohe Wärmeleitfähigkeit. Die Durchblutung wird über α -adrenerge Gefäßnerven und tonuswirksame Substanzen wie Histamin und Katecholamine geregelt. Eine Kühlung der Haut wird durch Verdunstung von Schweißdrüsensekret erreicht. Eine ständige Wasserverdampfung von 50 ml/h an der Hautoberfläche resultiert in 20 % evaporativer Wärmeabgabe des Körpers. Die Hauttemperatur liegt dabei üblicherweise bei 33-34°C. Für einen gleichzeitigen notwendigen Schutz vor Austrocknung

durch transepidermalen Wasserverlust sorgt insbesondere die oben geschilderte interzelluläre Permeabilitätsbarriere der Haut.

*Barriere gegen Mikroorganismen*¹⁷⁵

Ein Oberflächenhydrolipidfilm aus Talg- und Schweißdrüsensekreten bildet neben einer dünnen Lipidschicht aus Milchsäure, freien Amino- und Fettsäuren und Urocaninsäure den Säureschutzmantel von pH 4,5-5,75 der Epidermis. Während die Fettschicht Wasser und hydrophile Stoffe abweist, stellt der Säureschutzmantel eine Barriere für Bakterien und Mikroorganismen dar. Außerdem hemmen Metabolismusprodukte der residenten, apathogenen Hautflora die Besiedelung der Haut durch Pathogene. Überwunden wird der Fettfilm durch längeres Einwirken von Flüssigkeiten unter Bildung von Emulsionen oder via Haartrichter. Mikroorganismen dringen vor allem in alkalischem Milieu, z. B. in Mündungen apokriner Schweißdrüsen ein.

UV-Filterfunktion

Melanozyten im Stratum basale und Stratum spinosum schützen vor UV-Strahlung mittels UV-induzierter Melaninbildung und Melaninversorgung umliegender Keratinozyten. Langwellige Strahlen (UV-A) bewirken eine Sofortpigmentierung durch vermehrten Melanosomentransfer in die Keratinozyten und eine Photooxidation von Promelanin zu Melanin. UV-B induziert durch Aktivierung der Melanozyten eine Melaninneusynthese und führt so nach einer Latenzzeit von mehreren Tagen zur verzögerten Hautpigmentierung. Melanin kommt außerdem in Haarfollikeln, Makrophagen und frei im Korium vor.

Zusätzlich kommt es zur Bildung einer Lichtschwiele: Unter Einwirkung von UV Strahlung entstehen durch eine Störung in der Keratinozytendifferenzierung weniger stark abgeflachte Korneozyten in unregelmäßigerer Anordnung. Verstärkte Proliferation bedingt zudem eine erhöhte Anzahl übereinander liegender Zellschichten, so dass eine Verdickung der Epidermis resultiert.

2.2 Atopisches Ekzem – Atopische Dermatitis – Neurodermitis

Das durch eine Reihe von Synonymen benannte atopische Ekzem ist eine entzündliche, chronisch rezidivierende, nicht ansteckende Erkrankung der Haut, die mit starkem Juckreiz (Prurigo) einhergeht¹⁷⁶. Sie tritt vielfach (zu 57 %) bereits im ersten Lebensjahr in Form von Milchschorf auf, bei 87 % der Patienten manifestiert sie sich vor dem sechsten Lebensjahr¹⁷⁷. Nur 2 % der Patienten entwickeln erst nach dem 20. Lebensjahr erste Symptome. Die frühe Form befällt vor allem die Kopfhaut, Gesicht und die Streckseiten des Körpers, später bevorzugt Beugen, Nacken und Hände. Die spätere Form wird durch ein trockenes Ekzem und chronisch lichenifizierte Läsionen, im Erwachsenenalter durch die knotige Prurigoform bestimmt. Neben den pathophysiologischen treten zudem charakteristische Hautveränderungen ohne eigentlichen Krankheitswert auf. Hierzu gehören u. a. die doppelte Atopielidfalte, laterale Augenbrauenlichtung, pelzkappenförmiger Haaransatz, Gesichtsblassheit mit periorbitalen Schatten, weißer Dermographismus, Ichthyosis-Hände/-füße¹⁷⁸.

Kennzeichnendes Charakteristikum des atopischen Ekzems ist eine auffallend trockene Haut (Sebastase) mit verstärkter Hautrauigkeit und Schuppung. Eine extreme Störung der Hautbarrierefunktion sowohl der läsionalen als auch der nicht läsionalen atopischen Haut, einhergehend mit einem erhöhten transepidermalen Wasserverlust (TEWL), stellt die schwerwiegendste, hautphysiologische Veränderung dar¹⁷⁹. Läsionale Ekzeme weisen zusätzlich eine reduzierte Hydratation des Stratum corneums auf¹⁸⁰. Ferner findet man das im vorherigen Kapitel erwähnte Filaggrin, ein Vorläufer sogenannter „natural moisturising factors“, auch in nicht läsionaler Haut stark reduziert¹⁸¹. Als Hauptursache der Barrierestörung gilt ein gestörter Lipidmetabolismus, insbesondere ein Defekt in der Ceramidsynthese, und der daraus resultierende, stark reduzierte Gesamtlipid- und Ceramidgehalt im Stratum corneum der läsionalen wie auch der nicht läsionalen Haut¹⁸²: Anstatt der Hydrolyse von Sphingomyelin zu Ceramid und Phosphorylcholin durch das Enzym Sphingomyelinase findet im atopischen Ekzem überwiegend eine Metabolisierung durch Sphingomyelinacylase zu Sphingomyelinphosphorylcholin und freien Fettsäuren statt^{183,184}. Wie bereits eingangs erwähnt, vermag der reduzierte Ceramid- und Lipidgehalt über die gestörte Barrierefunktion zu einer erleichterten Permeabilität exogener Allergene und Irritantien zu führen und trägt auf diese Weise wesentlich zur Pathogenese des

atopischen Ekzems bei^{50,51,185}. Darüber hinaus spielen Ceramide als intrazelluläre Botenstoffe eine wichtige Rolle in Bezug auf die Regulation von Zellzyklus, Apoptose und terminaler Differenzierung, so dass der Stoffwechseldefekt möglicherweise zusätzlich eine gestörte epidermale Homöostase zur Folge hat^{186,187}.

Die beschriebenen, hautphysiologischen Symptome führen zu einem Kreislauf von Juckreiz und Kratzverhalten, die wesentlich zur Entstehung und Unterhaltung des Ekzems beitragen: Die Sebstase der Haut verursacht Juckreiz, die gestörte Barrierefunktion führt zu erhöhter Permeabilität der Haut und infolgedessen zu Entzündungs- und Ekzemreaktionen, die mit verstärktem Juckreiz einhergehen und außerdem zu erhöhter Irritabilität führen¹⁸⁸, die ebenfalls juckreizsteigernd wirkt. Das resultierende Kratzverhalten kann einerseits zu einer verstärkten Entzündungsreaktion, andererseits durch die Reizung sensorischer Neuronen und C-Fasern der Haut zur Freisetzung von Neuropeptiden führen, die wiederum Schmerz- und Juckreiz auszulösen vermögen. Darüber hinaus sind Neuropeptide wie Substanz P, Neurotensin, vasoactive intestinal peptide (VIP) oder calcitonin gene-related peptide (CGRP) modulatorisch an der Mastzelldegranulation und Antigenpräsentation durch Langerhanszellen in der Haut beteiligt^{Übersichten in 189, 190}.

Weitere pathophysiologische Veränderungen der atopischen Ekzemhaut umfassen eine reduzierte Größe und Proliferation von Talgdrüsen¹⁹¹ sowie eine Störung vegetativer Hautfunktionen wie Schweißbildung, Temperaturregelung und Hautdurchblutung: Dies ist ein weiterer Hinweis auf die Bedeutung des neuroendokrinen Systems der Haut an der Pathogenese des atopischen Ekzems, da oben genannte Neuropeptide auch in die Regulation der Hautdurchblutung und Schweißsekretion eingreifen. Darüber hinaus zeigen über 90 % aller Patienten mit atopischem Ekzem, korrelierend mit dem Schweregrad der Erkrankung, eine extreme Besiedelung der mikrobiellen Hautflora mit *Staphylococcus aureus*¹⁹² und *Pityrosporum ovale*¹⁹³. *Staphylococcus aureus* produziert Exotoxine, die als Superantigene Makrophagen und dendritische Zellen aktivieren sowie Proliferation und Zytokinsekretion polyklonaler T-Zellen induzieren können und somit zur Exazerbation des atopischen Ekzems beitragen¹⁹⁴. Zudem kommt es meistens zu einer Sensibilisierung der Patienten, so dass *Staphylococcus aureus*- oder *Pityrosporum ovale*-spezifisches IgE zusätzlich zur Freisetzung vasoaktiver, chemotaktischer und proinflammatorischer Mediatorsubstanzen aus Mastzellen und basophilen Granulozyten führt.

Zur Ätiopathophysiologie des atopischen Ekzems wurden eine Reihe unterschiedlicher Konzepte und Hypothesen formuliert, die die Vielfalt der namentlichen Synonyme widerspiegeln. Die individuell stark unterschiedlichen Krankheitsauslöser und Therapieerfolge sprechen für eine multifaktorielle Kausalität dieser Erkrankung:

Etwa 60 % der Patienten mit atopischem Ekzem weisen eine genetische Prädisposition für allergische Erkrankungen auf. Zwillingsstudien ergaben im Hinblick auf die Manifestation von atopischem Ekzem 75-85 % Konkordanz bei Homozygoten gegenüber 20-30 % bei Heterozygoten^{12,195}. Vermutlich handelt es sich um eine polygene Prädisposition^{196,197}. So werden mehrere Genloci auf den Chromosomen 1, 5¹⁹⁸ und 6 sowie auf den Chromosomen 14 und 16^{199,200} u. a. als für eine erhöhte IgE-Synthese verantwortlich vermutet, letztere sowie Chromosom 3²⁰¹ insbesondere in Bezug auf das atopische Ekzem^{15, Übersichten in 16,197}. Ferner zeigen viele Patienten zusätzlich zu dem atopischen Ekzem weitere allergische Erkrankungen, wie Rhinitis allergica und Asthma bronchiale, wobei die Besserung einer Symptomatik oftmals mit der Verschlechterung einer anderen einhergeht (sogenannter Etagenwechsel).

Weiter gehen vielfach positive wie negative psychosomatische Einflussfaktoren („Neurodermitis“) mit dem Schweregrad der Erkrankung einher oder führen zu deren Manifestation²⁰². Ferner wird für das atopische Ekzem eine Dysregulation des vegetativen Nervensystems durch das Zusammenwirken einer β -adrenergen Blockade mit gleichzeitig α -adrenerger und cholinergischer Hyperreaktivität beschrieben^{203,204,207}. Deren Auswirkungen, eine verstärkte Freisetzung von vasoaktiven Mediatoren (Histamin, Serotonin, Leukotriene, Prostaglandine), werden für die Erklärung sowohl psychosomatischer als auch somatischer Einflüsse auf das zelluläre und humorale Immunsystem herangezogen: Erstens können die Mediatoren auch durch psychischen Stress induziert werden. Zweitens wirken sie einerseits proinflammatorisch, andererseits greifen sie inhibierend in die T-Zell-Regulation (vor allem der T-Suppressorzellen) ein, induzieren so die für das atopische Ekzem bekannte, verminderte zelluläre Immunreaktion und können somit wiederum zu verstärkter IgE-Produktion führen. Bei über 80 % der Patienten lassen sich, mit dem Schweregrad korrelierende, extrem hohe Serum-IgE-Konzentrationen nachweisen. Man unterscheidet daher das intrinsische Ekzem mit normalem IgE-Spiegel vom extrinsischen atopischen Ekzem mit deutlich erhöhter IgE-Bildung^{205,206}. Letzteres zählt zum Atopie-Formenkreis, wobei der Begriff Atopie wie folgt definiert wird: „Familiär auftretende Neigung zur Entstehung von Krankheiten wie Asthma bronchiale, Rhinokonjunktivitis,

atopisches Ekzem, basierend auf einer Überempfindlichkeit von Haut und Schleimhäuten, assoziiert mit erhöhter IgE-Bildung und/oder veränderter nichtspezifischer Reaktivität^{207,208}. Die Mechanismen der erhöhten IgE-Bildung sind nur teilweise bekannt. Die Hauptursache wird in dem zugunsten einer Th2-Immunantwort verschobenen Th1/Th2-Gleichgewicht vermutet²⁰⁹. Im peripheren Blut sowie in T-Zellinfiltraten des akut läSIONalen atopischen Ekzems dominieren deutlich CD4-T-Helferzellen vom Typ II mit der Zytokinsekretion von IL-4, IL-5, IL-10 gegenüber IL-2- und IFN γ -sezernierenden Typ I-Lymphozyten, die vermehrt in chronischen Läsionen vorkommen^{210,211}. Letztere inhibieren die Bildung von IgE²¹², während IL-4 in B-Zellen eine Umschaltung von IgG und IgM zu IgE-Expression induziert („Th1/Th2-switch“)²⁰⁹. Aufgrund von Adhäsionsmolekülen, wie ELAM-1 und vor allem des kutanen Lymphozytenantigens (CLA-homing receptor), auf den Th2-Lymphozyten kommt es zu einer verstärkten Akkumulation dieser Zellen vor allem in läSIONaler atopischer Haut²¹³. Die hohe IL-4-Aktivität induziert hier eine vermehrte Expression von IgE-Rezeptoren auf den antigenpräsentierenden Langerhanszellen²¹⁴. Erst der Nachweis von spezifischem IgE und IgE-Rezeptoren auf Langerhanszellen in der Epidermis^{215,216} wies auf eine Verbindung zwischen der gemäß der Typisierung von Allergiereaktionen nach Coombs und Gell²¹⁷ klassischen, allergischen Typ I Sofortreaktion und der klassischen Typ IV T-Zell-vermittelten, verzögerten Immunreaktion im atopischen Ekzem²¹⁸. Letztere entspricht der Pathogenese des allergischen Kontaktekzems, während erstere etwa 90 % aller allergischen Reaktionen, wie z. B. Rhinitis, Konjunktivitis, Asthma bronchiale, Gastroenteritis und die Anaphylaxie umfasst. Der komplementunabhängige Pathomechanismus der Typ I Reaktion beruht im Wesentlichen auf der Freisetzung vasoaktiver, chemotaktischer und proinflammatorischer Mediatorsubstanzen durch Brückenbildung zweier IgE-Moleküle auf der Oberfläche von Mastzellen und basophilen Granulozyten durch das Allergen. Der Nachweis von spezifischem IgE und IgE-Rezeptoren auf Langerhanszellen in der Epidermis erklärt die zusätzliche, zelluläre Immunreaktion in der Pathogenese des atopischen Ekzems²¹⁸: Langerhanszellen kommen als spezifische Immunzellen der Haut vor allem im tieferen Stratum spinosum der Epidermis vor. In inaktiver Form werden sie mittels E-Cadherin im Epithelzellverband gehalten, wo es zur Aufnahme und Prozessierung von Antigenen kommt^{219,220}. Die somit aktivierte Langerhanszelle reift unter Herabregulation von E-Cadherin und gleichzeitig gesteigerter MHC-Klasse II-Expression heran. Sie gewinnt so ihre Motilität zurück und emigriert aus

dem Keratinozytenverband in regionale Lymphknoten²²¹. Hier werden die antigenspezifischen Epitope zusammen mit Klasse II-MHC-Antigenen exprimiert, mittels Antigenpräsentation vorstimulierte T-Lymphozyten aktiviert und so eine klassische Typ IV T-Zell-vermittelte, verzögerte Immunreaktion induziert. Besonders in läsionaler Haut finden sich Langerhanszellen mit stark erhöhter Expression des hochaffinen IgE-Rezeptors (Fc_εRI)^{206,222,223}, die vermutlich auch mit perkutan aufgenommenen Aeroallergenen reagieren^{224,225,226}. Die in der Einleitung erwähnte Auslösung eines atopischen Ekzems durch Aeroallergene im „atopy patch test“ kann demnach weitestgehend als eine IgE-verstärkte Kontaktsensibilisierung erklärt werden²¹⁸. Die Untersuchung dieses Aspekts ist von großer klinischer Relevanz, da sowohl die Anzahl der Sensibilisierungen mit Aeroallergenen, als auch die Serumkonzentration spezifischer IgE-Antikörper linear mit dem Schweregrad des atopischen Ekzems korrelieren²²⁷.

2.3 Flüchtige organisch-chemische Verbindungen (VOC)

Die äußerst heterogene Stoffgruppe der flüchtigen organisch-chemischen Verbindungen VOC (volatile organic compounds) umfasst flüchtige Kohlenwasserstoffe und sauerstoffhaltige organische Verbindungen wie Aromaten und Aliphaten, Aldehyde, Ketone, Ester sowie Isoprene und Terpene. Wichtige VOC sind Methan, n-Hexan, Ethen, die Aromaten Benzol, Toluol und Xylol sowie die Aldehyde Formaldehyd und Acetaldehyd. Außerdem zählen zu den VOC halogenhaltige Kohlenwasserstoffe und organische Verbindungen mit anderen Heteroatomen. In der vorliegenden Arbeit wurden die methylierten Benzole Toluol und m-Xylol experimentell eingesetzt, weshalb im folgenden insbesondere auf diese Substanzen eingegangen wird.

Anhand ihrer Flüchtigkeit wird laut WHO eine Unterteilung der Substanzen in folgende Untergruppen vorgenommen²²⁸: VVOC (very volatile organic compounds) mit Siedepunkten kleiner 0°C bis 50-100°C, VOC mit Siedepunkten im Bereich von 50-100°C bis 240-260°C sowie schließlich SVOC (semi-volatile organic compounds), organische Verbindungen, die in der Atmosphäre aufgrund ihres Dampfdrucks sowohl in der Gas- als auch in der Aerosolphase auftreten (Siedepunktbereich von 240-260°C bis 380-400°C). Viele flüchtige Stoffe kommen, wie in der Einleitung bereits erwähnt, zudem als partikelgebundene Substanzen vor (POM, mit Siedepunkten > 380°C).

VOCs werden sowohl von anthropogenen als auch von biogenen Quellen emittiert. Wichtigste anthropogene Quellen in Europa sind in Reihenfolge ihrer Bedeutung die industrielle Verfeuerung fossiler Brennstoffe und Biomasse (95% des anthropogenen Methanausstoßes, ca. 15% der Nicht-Methan-VOC (NMVOC)), Emissionen aus dem Straßenverkehr (42% der NMVOC) sowie Verdunstung organischer Lösungsmittel (25-30% der NMVOC)^{229,233}. Zu den biogenen Quellen zählen unter anderem Flora und Fauna in Wäldern, Böden und Feuchtgebieten, limnischen und marinen Ökosystemen sowie Flächenbrände. Durch landwirtschaftlichen Anbau und Nutztierhaltung, Kläranlagen und Deponien sowie Brandrodung werden allerdings viele biogene Quellen stark durch den Menschen beeinflusst.

Je nach Herkunft der VOC finden sich typische Verbindungs- und Konzentrationsmuster. In urbanen Ballungsgebieten liegen die Konzentrationen vieler VOCs um mehr als eine Größenordnung über den globalen Hintergrundkonzentrationen. Die Konzentrationen einzelner VOC weisen zudem einen charakteristischen Jahresgang auf, der substanzspezifisch neben der zeitabhängigen Emission vor allem von den jeweiligen Ausbreitungs- und Abbaubedingungen abhängt. In Gegenwart von NO_x und UV-Strahlung werden beispielsweise 80-90 % der emittierten Xylole, 30 % des Benzols und 68 % des Toluols innerhalb von 6 h (photo-)chemisch umgesetzt²³³. Wie eingangs erwähnt, stammen fast die Hälfte aller luftgetragenen Nicht-Methan-VOC in Deutschland aus verkehrsbedingten Emissionen. Insbesondere die monozyklischen aromatischen Kohlenwasserstoffe Benzol, Toluol und Xylole (BTX-Aromaten) sind heute ubiquitär vorhanden, wobei in Verkehrsbelastungsgebieten deutliche Emissionspitzen im typischen Verhältnis von Benzol zu Toluol zu m-Xylol von 1:3:2 auftreten²³³; m-Xylol hat üblicherweise einen Anteil von 60-70 % an den vorkommenden Xylol-Isomeren. So wurden beispielsweise 1995 bis 1997 in einer Düsseldorfer Verkehrsstudie in stark verkehrsbelasteten Regionen maximale Spitzenwerte von 12,6 µg/m³ Benzol und 40,8 µg/m³ Toluol gemessen. In normal verkehrsbelasteten Gebieten wurden 8,33 µg/m³ Benzol und 24,0 µg/m³ Toluol nachgewiesen, während in verkehrsarmen Arealen 4,94 µg/m³ Benzol und 13,8 µg/m³ Toluol ermittelt wurden²³⁰. In einer weiteren Studie enthielt die Luft einer verkehrsbelasteten Region in Wuppertal-Elbersfeld West die folgenden Konzentrationswerte: 16,8 µg/m³ Benzol, 50,2 µg/m³ Toluol, 30,1 µg/m³ m-/p-Xylol und 9,24 µg/m³ o-Xylol, während in demselben Zeitraum in dem extremen Reinluftgebiet Borken Konzentrationen von

0,78 µg/m³ Benzol, 4,21 µg/m³ Toluol, 3,1 µg/m³ m-/p-Xylol und 0,44 µg/m³ o-Xylol vorherrschten²³¹. Im Jahresmittel werden in Ballungsgebieten Emissionswerte von 5-10 µg/m³, im Emittentennahbereich 20-30 µg/m³ Benzol, 40-80 µg/m³ Toluol und 14-55 µg/m³ m-/p-Xylol sowie 15 µg/m³ o-Xylol nachgewiesen. In Reinluftgebieten sind es weniger als 1 µg/m³ Benzol und 10 µg/m³ Toluol und Xylol^{232,233}.

Toluol wird etwa zu gleich hohen Anteilen aus Automobilabgasen und durch Lösungsmittelverdunstung freigesetzt und dient als Leitkomponente sowohl zur Beurteilung von Straßenverkehrsbelastungssituationen als auch der Innenraumluftqualität. Bezüglich der VOC-Luftverunreinigungen in Innenräumen sind neben Emissionen am Arbeitsplatz vor allem Schadstoffquellen im Inneren von Wohngebäuden sowie die Schadstoffkonzentrationen im Inneren von Kraftfahrzeugen relevant²³³. Neben Baustoffen und Einrichtungsmaterialien kommen hier der Umgang mit Schadstoffen durch Bewohner, Außenlufteinflüsse wie Verkehrsemissionen und schließlich der Luftaustausch zwischen Innen- und Außenbereich zum Tragen. So lassen sich in Wohnräumen allgemein höhere Konzentrationswerte für Aromaten als im Außenluftbereich nachweisen. Toluol findet sich mit im Mittel 100-200 µg/m³ und höheren Konzentrationen^{232,233}, m-/p-Xylol werden in durchschnittlichen Konzentrationen von bis zu 300 µg/m³ nachgewiesen^{232,233}. Ein weiterer wesentlicher Emissionsfaktor im Innenraumbereich ist Formaldehyd.

Das Wirkungsspektrum einer so komplexen Substanzgruppe wie der VOCs auf den Menschen ist äußerst heterogen. Es umfasst sowohl akute Auswirkungen wie Schleimhautreizungen durch Formaldehyd und zentralnarkotische Einflüsse durch Toluol und Xylol, als auch chronisch neurotoxische Wirkungen bei n-Hexan und kanzerogene Effekte wie bei Benzol, um jeweils nur einige typische Substanzen zu nennen.

Zur Charakterisierung der Wirkungen auf den Menschen werden die Toxikokinetik (Stoffaufnahme, Verteilung, Metabolismus und Elimination), akute und chronische Toxizität sowie genotoxische Effekte der einzelnen Substanzen beurteilt. Zur Bewertung der Kanzerogenität werden vor allem Ergebnisse aus tierexperimentellen und epidemiologischen Studien herangezogen. Dabei werden auch Kombinationswirkungen, mögliche Interaktionen von Wirkmechanismen bei Expositionen gegenüber Schadstoffgemischen berücksichtigt. So inhibiert beispielsweise eine gleichzeitige Toluol-Exposition die Metabolisierung von Benzol, andererseits sind aber auch syn-

ergistische Effekte von Toluol und Benzol in ihrer Wirkung auf den Menschen bekannt (siehe unten). Diese Untersuchungen führen schließlich zur Identifikation von Wirkungsschwellen im Niedrigdosisbereich und Festlegung von Grenzwerten, bei deren Einhaltung nach aktuellem Kenntnisstand der Medizin keine Gesundheitschädigungen zu erwarten sind.

Die pulmonale Resorption bildet beim Menschen den wichtigsten Aufnahmeweg für Toluol und Xylol²³². 40-60 % des eingeatmeten Toluols bzw. 50-65 % der Xylole werden resorbiert. Die Distributionsrate und Anreicherung im Organismus folgt proportional zum Lipidgehalt der Organe. Im Zentralnervensystem (ZNS) wird die Stammregion mit den regulatorischen Zentren für Herztätigkeit, Vasomotorik und Atmung am stärksten inkubiert. Die Metabolisierung findet hauptsächlich in der Leber statt²³². Hier wird Toluol schrittweise durch Seitenkettenoxidation durch die Enzyme Cytochrom-P450-Monooxygenase, Alkohol-Dehydrogenase und Aldehyd-Dehydrogenase zu Benzoesäure umgewandelt und nach Konjugation mit Glycin als Hippursäure im Urin ausgeschieden. Nach Sättigung der Glycinkonjugation findet auch eine Glucuronsäurekonjugation statt. Etwa 1 % wird zu Kresol hydroxyliert. Analog wird Xylol nach Oxidation einer Methylgruppe zu Methylbenzoesäure (Toloylsäure) und sich anschließender Glycinkonjugation zu Methylhippursäure (Tolursäure) metabolisiert. Ringhydroxilierung und Glucuronsäurekonjugation finden bei 2 % der Xylole statt²³². Eine intermediäre Epoxidbildung, die beispielsweise die Kanzerogenität von Benzol bewirkt, kann an den substituierten Aromaten Toluol und Xylol chemisch nicht stattfinden.

Toluol interferiert bei kombinierter Exposition mit der Biotransformation von Benzol, Styrol, Xylolen, Trichlorethan und, wie auch Xylole, mit Benzoapyren indem es deren Metabolisierung inhibiert²³². Ethanol wiederum steigert die Aufnahme von Xylol und hemmt den Abbau des Toluols. Etwa 20% der aufgenommenen Methylbenzole werden unverändert durch die Lunge per Exhalation, etwa 80% metabolisiert durch die Nieren ausgeschieden²³². Die Eliminationskinetik von BTX-Aromaten wird zum einen durch die Biotransformationsrate und den Dampfdruck der Substanzen bestimmt. Zum anderen ist sie abhängig von Fettgehalt und Gesamtkörpergewicht. Die Eliminationshalbwertszeit von Toluol im subkutanen Fettgewebe beträgt zwischen 0,5 und 2,7 Tagen, im Blut zwischen 6 und 8 Stunden. Xylol zeigt einen zweiphasigen Verlauf mit einer anfänglichen Halbwertszeit von 1-2 h und anschließend von 20 h^{232,237}.

Aufgrund ihrer stark lipophilen Eigenschaften werden die BTX-Aromaten auch perkutan leicht resorbiert. Der Verteilungskoeffizient des Stoffes in seiner Matrix bildet dabei den Konzentrations-, die Diffusion durch das Stratum corneum den geschwindigkeitsbestimmenden Schritt^{232,237}. So beträgt die Resorptionsrate der Haut für Toluol in lipophilen Lösungsmitteln nach unterschiedlichen Quellen zwischen $0,17-0,5 \text{ mg/cm}^2 \cdot \text{h}$ und $14-23 \text{ mg/cm}^2 \cdot \text{h}$ sowie $0,16-0,69 \text{ mg/cm}^2 \cdot \text{h}$ für in wässriger Lösung appliziertes Toluol^{234,235}. Die Toluol-Aufnahme über Hände und Unterarme bei einstündigem Hautkontakt zu Flüssigtoluol entspricht somit einer achtstündigen rein inhalativen Exposition gegenüber 190 mg/m^3 (1 MAK) Toluol²³². Flüssiges Benzol kann die menschliche Haut bis zu $400 \text{ } \mu\text{g/cm}^2 \cdot \text{h}$ resorbieren, Benzol in anderen Lösungsmitteln in deutlich geringerer Konzentration²³². Die perkutane Resorption von Xylolen liegt bei $150 (42-258) \text{ } \mu\text{g/cm}^2 \cdot \text{h}$, d. h. dass bei Eintauchen zweier Hände in Flüssigxylol ebensoviel Xylol in den Organismus aufgenommen wird wie während einer inhalativen Exposition gegenüber $100 \text{ ppm}^{84,85,236}$. Mit $0,6 \text{ } \mu\text{g/cm}^2 \cdot \text{h}$ ist die Xylol-Aufnahme aus der Gasphase (600 ml/m^3 für 3,5h) vergleichbar gering, während Benzol von Haut und Schleimhäuten auch in Dampf- form wesentlich resorbiert wird, und die dermale Aufnahme von Toluol aus der Gasphase etwa 1 % der inhalativen Aufnahme beträgt ($0,69 \text{ mg/cm}^2 \cdot \text{h}$)²³⁷. Die Permeabilitätskonstanten von Gasen sind, z. B. für m-Xylol um den Faktor 10, größer als die derselben Substanz in Lösung. Da die molekulare Konzentrationen von Gasen und Dämpfen jedoch zumeist sehr viel kleiner sind, sind die Absorptionsraten derselben Substanz in Gasphase oder in Lösung relativ gleich, wie vergleichende Studien zu topischer Flüssigapplikation, Eintauchen in Flüssigkeiten oder Kontakt mit Chemikalien aus der Dampf- oder Gasphase zeigen konnten. Die Stoffwechselforgänge einer lokalen Metabolisierung monozyklischer Aromaten in der Haut sind nicht bekannt, eine Beteiligung der epidermalen, in Keratinozyten nachweisbaren Cytochrom-P450-Isoenzyme wird aber vermutet^{232,238}.

Die Aromaten Benzol, Toluol und Xylol-Isomeren zeigen bereits in niedriger Atemluftkonzentration ($200-300 \text{ mg/m}^3$) akut toxische Auswirkungen auf das zentrale Nervensystem und können in hoher Konzentration (15 g/m^3) über ihre narkotische Wirkung zum Tode führen^{232,234}. Chronisch neuro- und hepatotoxische Effekte wurden ab 400 mg/m^3 Toluol und Xylol festgestellt, während Benzol aufgrund metabolischer

Epoxidbildung bereits im Niedrigkonzentrationsbereich chronische Toxizität im Hinblick auf Blutbildveränderungen und kanzerogenes Potential zeigt^{234,233,232}.

Starke Schleimhautreizungen, Entfettung und Barrierschädigung der Haut²³⁹ sowie narkotische und neurotoxische Effekte bestimmen das akute Vergiftungsbild durch alkylierte Benzole²³². Die Geruchsschwelle liegt für Toluol bei 0,5-100 mg/m³ bzw. 0,13-26 ppm²⁴¹, die Geruchsimmissionsrichtlinie legt den Grenzwert auf 7,6 mg/m³ bzw. 2 ppm fest²⁴⁰. Befindlichkeitsstörungen werden ab 75 ppm (281 mg/m³), erste ZNS-Leistungseinschränkungen ab 88 ppm (332 mg/m³) Langzeitbelastung festgestellt. Akute Schleimhautreizungen treten bei Expositionen gegenüber 750 mg/m³ (196 ppm) auf^{232,234}. Langfristige Intoxikationen von 1300 mg/m³ Toluol oder Xylol verursachen ausschließlich metabolitinduzierte Schädigungen an Leber- und Nierenparenchym, peripheren und zentralen Nervenzellen. Die Wirkungen von p-, m- und o-Xylol auf den Menschen stimmen im Wesentlichen mit den Wirkungen von Toluol überein^{232,234}. Als Geruchsschwelle für Xylole gelten Werte von 0,3 bis 70 mg/m³ (0,07-16 ppm)²⁴¹. Nach wiederholtem Hautkontakt kann flüssiges Xylol eine blasenbildende Dermatose hervorrufen²³⁴. Auch bei Hochdosisexpositionen von 200-300 ppm Toluol oder Xylol wurden keine Blutbildveränderungen nachgewiesen, die nicht auf Verunreinigungen mit Benzol zurückzuführen sind. Im Gegensatz zu Benzol zeigen Toluol und Xylole auch tierexperimentell kein genotoxisches, mutagenes oder kanzerogenes Potential. Embryo-, fetotoxische und teratogene Effekte von Toluol und Xylol sind bisher nicht eindeutig nachgewiesen, jedoch auch nicht auszuschließen^{232,234}.

Für die Allgemeinbevölkerung schlägt die WHO als 24 h-Mittelwert einen Immissionsleitwert von 7,5 mg/m³ Toluol in Luft vor, als Halbstundenmittelwert sollte 1 mg/m³ nicht überschritten werden^{242,232}. Die Senatskommission zur Prüfung gesundheitsschädlicher Arbeitsstoffe der Deutschen Forschungsgemeinschaft (DFG) gibt jährlich aktualisierte Richtlinien für maximale Arbeitsplatzkonzentrationen (MAK) heraus. Laut Definition bezeichnet die MAK die höchstzulässige Konzentration eines reinen Arbeitsstoffes als Gas, Dampf oder Aerosol (Schwebstoffe) in der Luft am Arbeitsplatz, die nach gegenwärtigem Kenntnisstand auch bei langfristiger, täglich achtstündiger Exposition keine Gesundheitsbeeinträchtigung verursacht. Wie einleitend erwähnt, werden Kombinationswirkungen, auch bei häufig verunreinigt vorkommenden Substanzen, hierbei nicht berücksichtigt. Die aktuellen MAK lauten

190 mg/m³ (50 ppm) für Toluol und 440 mg/m³ (100 ppm) für Xylol²⁴³. Die zusätzliche Kennzeichnung von Toluol und Xylol als perkutan resorbierbar („H“) weist auf die Gefahr hin, dass trotz Einhaltung der MAK die dermale Xylol-Resorption zu einem wesentlichen Anstieg der inneren Exposition und in dessen Folge zu toxischen Effekten führt. Bei gleichzeitiger Exposition werden mindestens 30 % der inhalativ aufgenommenen Xylolmenge (Toluol: 0,9 %) auch zusätzlich über die Haut resorbiert^{84,234}. Außerdem führt bei einer Resorptionsrate von ca. 2,5 µg/cm² · min 15-minütiger Kontakt der Hand mit Flüssigxylol zu einer lokalen Konzentration von ca. 5 mg Xylol im venösen Blut des betroffenen Armes, womit der biologische Arbeitstoleranzwert (BAT) überschritten ist^{85,234}. Als höchstzulässige Substanz- oder Metabolitkonzentration nach Expositionsende wurden biologische Arbeitstoleranzwerte von 1,0 mg/l Toluol im Blut oder 3,0 mg/l o-Kresol im Urin bzw. 1,5 mg/l Xylol im Blut oder 2000 mg/l Methylhippur-(Tolur-)säure im Urin festgelegt^{234,243}.

VOCs sind jedoch nicht nur lokal, wegen ihrer direkten Wirkung auf den Menschen, aus humanhygienischen und ökotoxikologischen Gründen bedeutsam, sondern auch global bezüglich ihres Stellenwertes als Ozonvorläufersubstanzen²³³. Die in der Troposphäre als primäre Luftschadstoffe aus Emissionen vorliegenden leicht flüchtigen organischen Verbindungen gehen sehr komplexe (photo-)chemische, zumeist radikalisch ablaufende Umwandlungsreaktionen ein und bewirken so die Bildung zahlreicher sekundärer Luftschadstoffe. Als Reaktionspartner dienen vor allem die äußerst reaktiven OH-Radikale, NO₃-Radikale wie auch das Spurengas Ozon^{233,244}. In Abhängigkeit vom NO_x-Gehalt in der Atmosphäre und der Sonneneinstrahlung bilden sich charakteristische Radikalreaktionsketten aus. Diese intermediären Radikale sind maßgeblich an der Freisetzung oxidativ wirkender Verbindungen beteiligt. Endprodukt der Oxidation aller VOCs ist CO₂²³³. Neben der direkten Beeinflussung des Strahlenhaushaltes durch die Treibhausgase Methan und CO₂ zeigen VOC vor allem eine indirekte Klimawirkung durch die photochemische Bildung von troposphärischem Ozon, die Bildung von Aerosolen und stratosphärischem Wasserdampf. Die in dieser Arbeit eingesetzten, substituierten Aromaten Toluol und Xylol weisen jedoch nur ein geringes Aerosolbildungspotential auf²³⁷.

3 Material

3.1 Biologisches Material

3.1.1 Humane Hautproben

Freiwilligen Probanden (hautgesunden Nicht-Atopikern und Atopikern mit atopischem Ekzem) wurden Hautproben von 0,5-3,0 cm² sowie Biopsien von 4,0 mm Durchmesser entnommen. Für alle Probanden der atopischen Testgruppe wurde die Diagnose extrinsisches, akutes und chronisches atopisches Ekzem mittleren oder schweren Grades gemäß der ärztlichen Standardkriterien erstellt. Die Probanden erhielten derzeit keine systemische Therapie. Zum Zeitpunkt der Probenentnahme waren die betroffenen Hautareale mindestens eine Woche frei von lokal topischer Kortikosteroidtherapie sowie mindestens drei Tage lotionfrei. In zwei Fällen erfolgte vier Tage vor der Probenahme zweimal täglich eine Vorbehandlung mit 0,3 % Gentiana Kristallviolett zur Reduzierung der *Staphylococcus aureus*-Besiedlung der Haut. Hierauf wird in den Ergebnissen gesondert eingegangen. Alter, Geschlecht und Atopiestatus bezüglich atopischen Ekzems, Asthma bronchiale und allergischer Rhinitis sowie Lokalisation der Hautproben aller Probanden sind bekannt. Probanden mit atopischem Ekzem wurde jeweils eine Hautprobe aus läsionaler und aus nicht läsionaler Haut entnommen.

Die Probenentnahmen erfolgten in der Klinik und Poliklinik für Dermatologie und Allergologie der Technischen Universität München. Dem Antrag zur Beprobung freiwilliger Probanden wurde durch die Ethikkommission der Bayerischen Landesärztekammer stattgegeben.

3.1.2 *Staphylococcus aureus* Kolonien

Blutagarplatten mit *Staphylococcus aureus* Kolonien, isoliert von Patienten mit atopischem Ekzem, wurden von der mykologischen Abteilung der Klinik und Poliklinik für Dermatologie und Allergologie der Technischen Universität München zur Verfügung gestellt.

3.2 Lösungen und Zellkulturmedien – Rezepte

Agar 100:	48 g	Agar 100
	26 g	Dodecanylsuccinicanhydrid
	26 g	Methylnadicanhydrid
	2 g	Benzyldimethylamin, Katalysator
Antibiotika-Antimycotika-Lsg. I ²⁶⁷ :		MEM
	3,0 % (w/v)	Gentamicin
	4,0 % (v/v)	Antibiotika-Antimycotika-Solution(100x) (10000 U Penicillin, 10000 µg Streptomycin, 25 µg Amphotericin B)
Antibiotika-Antimycotika-Lsg. II ²⁶⁷ :		MEM
	1,5 % (w/v)	Gentamicin
	2,0 % (v/v)	Antibiotika-Antimycotika-Solution(100x)
Antibiotika-Antimycotika-Lsg. III ²⁶⁷ :		MEM
	1,0 % (v/v)	Antibiotika-Antimycotika-Solution(100x)
Bleicitratlösung:	1,33 g	Pb(NO ₃) ₂
	1,76 g	Na ₃ (C ₆ H ₅ O ₇) · 2 H ₂ O
	ad 30 ml	ddH ₂ O
Cacodylatpuffer, 0,08 M, pH 7,2:	17,125 g	Cacodylsäure-Natriumsalz
	0,05 g	CaCl ₂
	ad 1 l	ddH ₂ O
DMEM/F12 (3:1):	125 ml	HAM`S F12 mit NaHCO ₃
	375 ml	DMEM
DPBS, pH 7,4:	137 mM	NaCl
	2,7 mM	KCl
	6,5 mM	Na ₂ HPO ₄
	1,5 mM	KH ₂ PO ₄
		ddH ₂ O
Einfriermedium:	90% (v/v)	FKS
	10% (v/v)	DMSO steril, cell culture grade
F3-Differenzierungsmedium ²⁶⁷ :	50 µl	EGF (100 µl/ml)
	400 µl	Hydrocortison (0,5 mg/ml)
	500 µl	Insulin (5 mg/ml)
	ad 5 ml	DMEM/HAM`S F12 (3:1)
	430 ml	DMEM/HAM`S F12 (3:1)
	5 ml	L-Glutamin (200 mM)
	5 ml	Sodiumpyruvat (100 mM)
	5 ml	Nonessential aminoacids (100x)
	50 ml	FKS

F7-Proliferationsmedium ²⁶⁷ :	5ml	Adeninhydrochlorid (128 mg/100 ml)
	50 µl	EGF (100 µl/ml)
	400 µl	Hydrocortison (0,5 mg/ml)
	500 µl	Insulin (5 mg/ml)
	500 µl	Isoprotenerol (10^{-3} M)
	500 µl	Humantransferrin (5 mg/ml)
	500 µl	Trijodthyronin (40 µg/2 ml)
	ad 5 ml	DMEM/HAM`S F12 (3:1)
	430 ml	DMEM/HAM`S F12 (3:1)
	5 ml	L-Glutamin (200 mM)
	5 ml	Sodiumpyruvat (100 mM)
	5 ml	Nonessential aminoacids (100x)
	50 ml	FKS
FAD ₂ /Greens:	500 ml	DMEM/HAM`S F12 (3:1)
	10% (v/v)	FKS
	100 U/ml	Penicillin/Streptomycin
	Supplemente pro 500ml:	
	50µl	EGF (100 µg/ml) frisch ansetzen!
	500µl	Insulin (5 mg/ml)
	500µl	T3 (20 µg/ml DMEM/FKS)
	1 ml	Hydrocortison (40 µg/1ml DMEM/FKS)
	5ml	Adenin (128 mg/100ml)
	500µl	Choleratoxin (2 µg/ml) frisch ansetzen!
	25 mg	L-Ascorbinsäure frisch ansetzen!
Fötales Kälberserum (FKS):	Hitzeinaktivierung, 30 min, 56°C	
Fibroblasten-Medium:	DMEM 25mm Hepes	
	20% (v/v)	FKS
	100 U/ml	Penicillin/Streptomycin
GDPBS, pH 7,4:	DPBS, pH 7,4	
	0,1 % (w/v)	Gelatine
HAM`S F12:	10,63g	Nutrient mixture HAM`S F12
	11,2 g	NaHCO ₃
	ad 1l	ddH ₂ O
Keratinocyte Growth Medium (KGM):	Keratinocyte Basal Medium (KBM)	
	30 µg/ml	Bovine Pituary Extract
	0,5 µg/ml	Hydrocortison
	5,0 µg/ml	Insulin
	0,1 ng/ml	Human Epidermal Growth Factor
	0,1 % (w/v)	Gentamicin
Keratinocyte-SFM (K-SFM):	Keratinocyte-Serum-Free-Medium	
	25 µg/ml	Bovine Pituary Extract
	0,15 ng/ml	Epidermal Growth Factor

3.3 Antikörper, Chemikalien, Prüfgase, Zellkulturmedien – Bezugsquellen

Adenin	(Sigma, Deisenhofen, Deutschland)
Agar 100	(Plano, Wetzlar, Deutschland)
Agar Agar	(Sigma, Deisenhofen, Deutschland)
Aktivkohleröhrchen, Typ NIOSH, 150 mg	(Dräger, Lübeck, Deutschland)
Antibiotika-Antimycotika-Solution	(Gibco BRL, Eggenstein, Deutschland)
Anti-Ki67/MIB1	(Dianova, Hamburg, Deutschland)
Anti-mouse IgG, Peroxidase-konjugiert	(Sigma, Deisenhofen, Deutschland)
Anti-mouse IgM, μ -chain, Peroxidase-konjugiert	(Sigma, Deisenhofen, Deutschland)
Anti-rabbit IgG, Peroxidase-konjugiert	(Sigma, Deisenhofen, Deutschland)
Benzylalkohol p.a., Charge K 25799326	(Merck, Darmstadt, Deutschland)
Bleinitrat ($\text{Pb}(\text{NO}_3)_2$)	(Merck, Darmstadt, Deutschland)
Borax	(Merck, Darmstadt, Deutschland)
Bovine Pituitary Extract	(Gibco BRL, Eggenstein, Deutschland)
Cacodylsäure-Natriumsalz	(Merck, Darmstadt, Deutschland)
Calciumchlorid (CaCl_2)	(Sigma, Deisenhofen, Deutschland)
Choleratoxin	(Sigma, Deisenhofen, Deutschland)
Kollagen Typ I aus Rattenschwanzsehne	(Falcon/Becton Dickinson GmbH, Heidelberg, Deutschland)
Cytotoxicity Detection Kit (LDH)	(Boehringer Mannheim, Mannheim, Deutschland)
Dinatriumhydrogenphosphat (Na_2HPO_4)	(Sigma, Deisenhofen, Deutschland)
Dispase, 0,9 U/mg	(Gibco BRL, Eggenstein, Deutschland)
Dulbecco`s Modified Essential Medium (DMEM)	(Gibco BRL, Eggenstein, Deutschland)
DMSO steril	(Sigma, Deisenhofen, Deutschland)
DePex/DPX Mounting Medium	(Fluka, Deisenhofen, Deutschland)
ELISA anti-human GM-CSF	(Endogen USA, Biozol, Eching, Deutschland)
ELISA anti-human Interleukin 1α	(Endogen USA, Biozol, Eching, Deutschland)
ELISA anti-human Interleukin 6	(Endogen USA, Biozol, Eching, Deutschland)
ELISA anti-human $\text{TNF}\alpha$	(Endogen USA, Biozol, Eching, Deutschland)
Epidermal Growth Factor (EGF)	(Gibco BRL, Eggenstein, Deutschland)
Eosin B	(Merck, Darmstadt, Deutschland)
Ethanol 100%	(Merck, Darmstadt, Deutschland)
Fluorescent Mounting Medium	(Dako, Hamburg, Deutschland)
Fötales Kälberserum (FKS), Chargen 369 L, 245 S, 445 S	(Biochrom/Seromed, Berlin, Deutschland)
Gelatine	(Sigma, Deisenhofen, Deutschland)
Gentamicin	(Biochrom/Seromed, Berlin, Deutschland)
Giemsa Azur-Eosin-Methylenblau-Lsg.	(Merck, Darmstadt, Deutschland)
Glutaraldehyd, 25 %	(Serva, Heidelberg, Deutschland)
Glutaraldehyd, 70 %, EM grade	(Polysciences, Eppelheim, Deutschland)
Hanks buffered saline solution (HBSS) (1x)	(Gibco BRL, Eggenstein, Deutschland)
Hexamethyldisilazane (HMDS)	(Polysciences, Eppelheim, Deutschland)
Hoechst 33258	(Sigma, Deisenhofen, Deutschland)
Humantransferrin	(Sigma, Deisenhofen, Deutschland)
Hydrocortison	(Sigma, Deisenhofen, Deutschland)
Insulin	(Sigma, Deisenhofen, Deutschland)
Isoprotenerol	(Sigma, Deisenhofen, Deutschland)
Kaliumchlorid (KCl)	(Merck, Darmstadt, Deutschland)

Kaliumdihydrogenphosphat (KH ₂ PO ₄)	(Merck, Darmstadt, Deutschland)
Keratinocyte Basal Medium (KBM)	(Clonetics/Bio Whittaker, Taufkirchen, Deutschland)
Keratinocyte Growth Medium (KGM)	(Clonetics/Bio Whittaker, Taufkirchen, Deutschland)
Kohlendioxid (CO ₂), 30 kg, 49,5 bar	(Air liquide - Technische Gase GmbH, Bopfingen, Deutschland)
Keratinocyte Serum-Free Medium (K-SFM)	(Gibco BRL, Eggenstein, Deutschland)
L-Ascorbinsäure	(Sigma, Deisenhofen, Deutschland)
Leit C Conductive Carbon Cement	(Neubauer, Münster, Deutschland)
L-Glutamin	(Gibco BRL, Eggenstein, Deutschland)
m-Xylol reinst, Charge K 24945688 824	(Merck, Darmstadt, Deutschland)
Mayers Hämalan	(Merck, Darmstadt, Deutschland)
May-Grünwalds Eosin-Methylenblau-Lsg.	(Merck, Darmstadt, Deutschland)
Methylenblau	(Merck, Darmstadt, Deutschland)
Mitomycin C	(Sigma, Deisenhofen, Deutschland)
Modified Eagle Medium (MEM) mit Glutamax I	(Gibco BRL, Eggenstein, Deutschland)
Monoclonal anti-human Cytokeratine 6, IgG1 mouse	(Progen Biotechnik GmbH, Heidelberg, Deutschland)
Monoclonal anti-human Cytokeratine 8,60 mouse	(Sigma, Deisenhofen, Deutschland)
Monoclonal anti-human Cytokeratine 14 mouse	(Sigma, Deisenhofen, Deutschland)
Monoclonal anti-human GM-CSF AB-1 mouse	(Calbiochem-Novabiochem, Bad Soden, Deutschland)
Monoclonal anti-human Pan Cytokeratine mouse IgG, FITC conjugated	(Sigma, Deisenhofen, Deutschland)
Monoclonal CBL 232 anti-human Zytokeratin 5,8	(Dianova, Hamburg, Deutschland)
MTT	(Sigma, Deisenhofen, Deutschland)
Mycoplasma Detection Kit	(Boehringer Mannheim, Mannheim, Deutschland)
NaCl	(Sigma, Deisenhofen, Deutschland)
Natriumbituminosulfonat hell, Konzentrat	(Ichthyol Gesellschaft Cordes, Hamburg, Deutschland)
Natriumchlorid (NaCl)	(Sigma, Deisenhofen, Deutschland)
Natriumhydrogencarbonat	(Gibco BRL, Eggenstein, Deutschland)
Nonessential aminoacids (100x)	(Gibco BRL, Eggenstein, Deutschland)
Nutrient mixture HAM'S F12	(Sigma, Deisenhofen, Deutschland)
Osmiumtetroxid 4% Lsg.	(Polysciences, Eppelheim, Deutschland)
PBS, Dulbecco's	(Gibco BRL, Eggenstein, Deutschland)
PBS, Dulbecco's w/o Mg ²⁺ , w/o Ca ²⁺ , w/o Na(CO ₃) ₂	(Gibco BRL, Eggenstein, Deutschland)
Penicillin/Streptomycin (P/S), 10000U/ml	(Gibco BRL, Eggenstein, Deutschland)
Permafluor Mounting Medium	(Immunotech, Hamburg, Deutschland)
Polyclonal anti-human Interleukin 1 α	(Endogen USA, Biozol, Eching, Deutschland)
Polyclonal anti-human Interleukin 6	(Endogen USA, Biozol, Eching, Deutschland)
Polyclonal anti-human TNF α	(Endogen USA, Biozol, Eching, Deutschland)
Prolex Staph. Kit Coagulasetest	(Hain-Diagnostika GmbH, Nehren, Deutschland)
Propylenoxid	(Sigma, Deisenhofen, Deutschland)
RPMI 1640 Glutamax I	(Gibco BRL, Eggenstein, Deutschland)
Saccharose	(Merck, Darmstadt, Deutschland)
Silicagel	(Merck, Darmstadt, Deutschland)
Sodium Dodecyl Sulfat (SDS)	(Merck, Darmstadt, Deutschland)
Sodiumpyruvat	(Gibco BRL, Eggenstein, Deutschland)

- Staphylex Injektion 1g (Flucloxacillin)
(*SmithKline Beecham Pharma, München, Deutschland*)
- Synthetische Luft, technisches Gas, KW-frei, 79-80 Vol% N₂, 20-21 Vol% O₂,
< 5 vpm H₂O, < 0,2 vpm Methan, < 0,1 vpm Stickoxide, Volumen 50 l, Fülldruck
200 bar (*Air liquide - Technische Gase GmbH, Bopfingen, Deutschland*)
- Tissue Tek O.T.C. Compound 4583
(*Sakura Finetek Europe B.V., Zoeterwoude, Niederlande*)
- Toluol p.a., Charge K 25487625 833 (*Merck, Darmstadt, Deutschland*)
- Trijodthyronin (T3) (*Sigma, Deisenhofen, Deutschland*)
- Trinatriumdihydrat (Na₃(C₆H₅O₇) · 2 H₂O) (*Merck, Darmstadt, Deutschland*)
- Trypanblau-Lösung, 0,5 % (*Boehringer Mannheim, Mannheim, Deutschland*)
- Trypsin (10x) (*Gibco BRL, Eggenstein, Deutschland*)
- Trypsin/EDTA (10x, 5g Trypsin/2g EDTA/8,5g NaCl/l)
(*Gibco BRL, Eggenstein, Deutschland*)
- Uranylacetat (*Merck, Darmstadt, Deutschland*)
- Vectastain ABC-Kit, Elite PK-6200 Universal
(*Vector Laboratories Inc., Burlingame, USA*)
- Zertifiziertes Prüfgasgemisch Toluol 0,7 ppm/m-Xylol 0,4 ppm, Rest synthetische
Luft: Flaschenvolumen 10 l, Fülldruck 150 bar, Flascheninhalt 1,5 l, relative Analy-
sengenauigkeit 6 %, 12 Monate Stabilitätsgarantie. Realkonzentrationen laut Analy-
senzertifikaten 0,695 ppm Toluol/0,405 ppm m-Xylol.
(*SIAD, St. Pantaleon, Österreich*)
- Zertifiziertes Prüfgasgemisch Toluol 500 ppm, Rest synthetische Luft:
Flaschenvolumen 40 l, Fülldruck 22 bar, Flascheninhalt 880 l, relative Analysen-
genauigkeit 2 %, 12 Monate Stabilitätsgarantie. Realkonzentrationen laut Analysen-
zertifikaten 496, 499 ppm. (*SIAD, St. Pantaleon, Österreich*)
- Zertifiziertes Prüfgasgemisch m-Xylol 500 ppm, Rest synthetische Luft:
Flaschenvolumen 40 l, Fülldruck 10 bar, Flascheninhalt 400 l, relative Analysen-
genauigkeit 2 %, 12 Monate Stabilitätsgarantie. Realkonzentrationen laut Analysen-
zertifikaten 499, 501, 502 ppm. (*SIAD, St. Pantaleon, Österreich*)
- Zertifiziertes Prüfgasgemisch Toluol 1000 ppm, Rest synthetische Luft:
Flaschenvolumen 40 l, Fülldruck 10 bar, Flascheninhalt 400 l, relative Analysen-
genauigkeit 2 %, 12 Monate Stabilitätsgarantie. Realkonzentrationen laut Analysen-
zertifikaten 997, 998, 1000 ppm. (*SIAD, St. Pantaleon, Österreich*)

3.4 sterile Zellkultur-Kunststoffmaterialien – Bezugsquellen

- Biocoat Cell Culture Inserts: Kollagen I, Kollagen IV, Fibronectin, Laminin, Matrigel®
(*Falcon/Becton Dickinson GmbH, Heidelberg, Deutschland*)
- CryoSystem™-Röhrchen 2 ml (*Nunc, Wiesbaden, Deutschland*)
- Cryo-Röhrchen, PP, steril 2 ml (*Greiner, Solingen, Deutschland*)
- Deep-„well“- „Multiwell“-Platten, 6-„well“
(*Falcon/Becton Dickinson GmbH, Heidelberg, Deutschland*)
- Einmalpipetten 1 ml, 5 ml, 10 ml, 25 ml, graduiert (*Greiner, Solingen, Deutschland*)
- Eppendorf „Research“-Pipettenspitzen (*Eppendorf, Hamburg, Deutschland*)
- Omnifix® Einwegspritzen 1 ml, 5 ml, 10 ml, 20 ml, 50 ml
(*B. Braun Melsungen AG, Melsungen, Deutschland*)
- Membraneinsätze (Anopore™, 0,2 µm) (*Nunc, Wiesbaden, Deutschland*)
- Membraneinsätze (Polycarbonat, 3,0 µm) (*Nunc, Wiesbaden, Deutschland*)

Membraneinsätze (Polycarbonat, 3,0 µm)	
	<i>(Falcon/Becton Dickinson GmbH, Heidelberg, Deutschland)</i>
Polypropylen-Röhrchen 50 ml	
	<i>(Falcon/Becton Dickinson GmbH, Heidelberg, Deutschland)</i>
Polypropylen-Röhrchen 15 ml	
	<i>(Falcon/Becton Dickinson GmbH, Heidelberg, Deutschland)</i>
Polystyrol Nunclon™ Zellkulturflaschen 50 ml, 25 cm ² , Schräghals	
	<i>(Nunc, Wiesbaden, Deutschland)</i>
Polystyrol Nunclon™ Zellkulturflaschen 260 ml, 80 cm ² , Schräghals	
	<i>(Nunc, Wiesbaden, Deutschland)</i>
Polystyrol Nunclon™ Soloflask™ 600 ml, 185 cm ² , Schräghals	
	<i>(Nunc, Wiesbaden, Deutschland)</i>
Polystyrol Petri-Zellkulturschalen 40x12 mm, 58x15 mm, 92x17 mm	
	<i>(Nunc, Wiesbaden, Deutschland)</i>
Polystyrol Nunclon™ „Multiwell“-Platten 6-„well“, 24-„well“, 96-„well“	
	<i>(Nunc, Wiesbaden, Deutschland)</i>
Reaktionsgefäße Safelock 0,5 ml, 0,7 ml, 1,5 ml, 2,0 ml	
	<i>(Eppendorf, Hamburg, Deutschland)</i>
Spritzenfilter (steril):	
Millex-GP 0,22 µm	
	<i>(Millipore GmbH, Eschborn, Deutschland)</i>
Nalgene 0,22 µm	
	<i>(Nalgene/Nalge, Nunc, Wiesbaden, Deutschland)</i>
Minisart® 0,20 µm, 0,45 µm	
	<i>(Sartorius, Göttingen, Deutschland)</i>
Stericup Vakuum Filtrationssystem 0,2 µm; 500 ml, 1000 ml	
	<i>(Millipore GmbH, Eschborn, Deutschland)</i>
TC ChamberSlides™ Permanox, 4, 8 oder 16 Kammern	
	<i>(Nunc, Wiesbaden, Deutschland)</i>
TC ChamberSlides™ Glas, 4, 8 oder 16 Kammern	
	<i>(Nunc, Wiesbaden, Deutschland)</i>

3.5 Geräte

3.5.1 Komponenten zum Aufbau der Expositionsapparatur

4Kanal-Betriebsgerät für Gasflussregler 247 D	
	<i>(MKS Instruments Deutschland GmbH, München, Deutschland)</i>
Reduziererschraubungen, PTFE-Klemmringe	
	<i>(Best, Neufahrn, Deutschland)</i>
PTFE-Schlauch, 4,35 x 6,35 mm	
	<i>(Bola Laborgeräte, Lauda-Königshofen, Deutschland)</i>
Edelstahlrohr, ¼ Zoll Außendurchmesser x 5,3 mm Innendurchmesser	
	<i>(CS-Chromatographie, Langerwehe, Deutschland)</i>
Elektronische Gasflussregler 1259 C	
	<i>(MKS Instruments Deutschland GmbH, München, Deutschland)</i>
Flaschendruckminderer für synthetische Luft bzw. Prüfgase oder Kohlendioxid: zweistufig, aus Pressmessing, nach DIN 8546, mit 2 Manometern, Membran, Abgang: ¼ Zoll-Innengewinde-Klemmringverschraubung, Eingangsdruck 0-200 bar, Ausgangsdruck 0-4 bar	
	<i>(Fuge H.L., Sarstedt, Deutschland)</i>
Temperiergerät DC 30 mit Kältebad K 20	
	<i>(Haake GmbH, Karlsruhe, Deutschland)</i>
Waschflaschen Duran	
	<i>(Schott Glaswerke, Mainz, Deutschland)</i>
Vitonschlauch	
	<i>(Deutsch+Neumann GmbH, Berlin, Deutschland)</i>

Die Expositions-kammer aus Glas ist eine Sonderanfertigung lt. Konstruktionsplan (vergl. 5.5.4) von der Firma *Greiner und Gaßner Glastechnik GmbH, München, Deutschland*;

verwendetes Material:

Bola Laborverschraubungen HT, GL 18, D 6,35mm, SW22

(*Bola Laborgeräte, Lauda-Königshofen, Deutschland*)

Duranglas-Doppelrohre, 200 mm Durchmesser, mit Planschliff NW 200

(*Schott Glaswerke, Mainz, Deutschland*)

Gewindeansätze GL 18

(*Schott Glaswerke, Mainz, Deutschland*)

Glasansatz 10x2 mm, O-Ring 200 mm FEP (*Schott Glaswerke, Mainz, Deutschland*)

Schnellverschluss 200 mm

(*Schott Glaswerke, Mainz, Deutschland*)

Eine Edelstahlplatte 170 x 115 mm, 10 mm Ränder gekantet lt. Plan und ein Kunststoffgestell lt. Konstruktionsplan (vergl. 5.5.4) wurden in den *Werkstätten der GSF, Forschungszentrum für Umwelt und Gesundheit, Neuherberg, Deutschland* angefertigt.

3.5.2 sonstige Geräte

AutoSystem XL Gaschromatograph (FID) (*Perkin Elmer, Überlingen, Deutschland*)

GC-Quartz-Kapillarsäule PE-1, 30 m x 0,25 mm x 1,00 Mikron

(*Perkin Elmer, Überlingen, Deutschland*)

GC-Septen Thermogreen LB-2 Septa, 11 mm (7/16")

(*Supelco, USA*)

Biofuge pico max. 13000

(*Heraeus Instruments, Hanau, Deutschland*)

CO₂-Inkubator (konstant 5% CO₂, 37°C, 95% H₂O)

(*Heraeus Instruments, Hanau, Deutschland*)

Cryo-Lagerbehälter Locator 6 plus

(*Barnstedt/Thermolyne Corp./Nunc, Wiesbaden, Deutschland*)

Cryo-Mikrotom HM505E, Messer C

(*Microm, Walldorf, Deutschland*)

Digital-Hygro-/Thermometer GFTH 95, 0(-20)...+70°C, 10...95 % r. F.

(*Greisinger electronic, Deutschland*)

ELISA-Reader MRX, Photometer

(*Dynatech/Dynex Labsystems, Frankfurt, Deutschland*)

Eppendorf „Research“-Pipette 0,5-10 µl (*Eppendorf, Hamburg, Deutschland*)

Eppendorf „Research“-Pipette 10-100 µl

(*Eppendorf, Hamburg, Deutschland*)

Eppendorf „Research“-Pipette 50-200 µl

(*Eppendorf, Hamburg, Deutschland*)

Eppendorf „Research“-Pipette 100-1000 µl

(*Eppendorf, Hamburg, Deutschland*)

Fluoreszenzmikroskop LB 100 T, x 50, x 100, x 200, x 400, x 500

(*Leica, Bensheim, Deutschland*)

Fotoeinrichtung MPS 52, MPS 48, Data für LB 100 T (*Leica, Bensheim, Deutschland*)

Glasringe 20 mm Außendurchmesser;

18 mm Innendurchmesser;

12 mm Höhe

Sonderanfertigung (*Greiner und Gaßner Glastechnik GmbH, München, Deutschland*)

Handpumpe

(*Dräger Sicherheitstechnik GmbH, Lübeck, Deutschland*)

Invertmikroskop Diavert, x 100, x 200, x 400

(*Leitz, Wetzlar, Deutschland*)

Kritischer-Punkt-Trocknungsgerät CPD 030

(*BalTec AG, Balzers, Liechtenstein*)

Kunstlichtdiafilme EPY 64T, EPJ 160T

(*Kodak, Ltd., Großbritannien*)

Labofuge 400 R function line, Rotor 8179

(*Heraeus Instruments, Hanau, Deutschland*)

Lichtmikroskop Axioplan 2, digitales MC 80 DX Photosystem, KS 300 Software	(Zeiss, Jena, Deutschland)
Lichtmikroskop DMRB	(Leica, Bensheim, Deutschland)
Neubauer-Zählkammer	(Assistent/Karl Hechter GmbH, Sondheim, Deutschland)
pH-Meter CG 841	(Schott Geräte GmbH, Hofheim, Deutschland)
Präzisionsspritzen, gasdicht	(Hamilton, Bonaduz, Schweiz)
Präzisionswaage MC1, Research RC 210 P	(Sartorius, Göttingen, Deutschland)
Probengefäße, 2,0 mm, Glas	(Chromacol LTD; Abimed GmbH, Langenfeld, Deutschland)
Rasterelektronenmikroskop JSM 6300	(Jeol, Tokyo, Japan)
Reichert Jung 2050 Supercut Mikrotom	(Cambridge Instruments GmbH, Nussloch, Deutschland)
Rotilabo-Alukappen Septum PTFE-Butylkautschuk	(Roth GmbH, Karlsruhe, Deutschland)
Sanoclav Hochdruck-Kleinsterilisator La-MCS-203	(A. Wolf med.-pharm.-Geräte Sanoclav, Geislingen, Deutschland)
Sensicam, digitale Kamera für Leica DMRB	(PCO, Kelheim, Deutschland)
Sezierbesteck: Pinzetten, Skalpellgriff, Scheren	(Assistent/Karl Hechter GmbH, Sondheim, Deutschland)
Skalpellklingen steril	(Ernst H. Bayha GmbH, Tuttlingen, Deutschland)
Spiegelreflexkamera XR-X 3000 für Diavert-Mikroskop	(Ricoh, Company, Ltd., Tokyo, Japan)
Sputter Coater SCD 050	(BalTec AG, Balzers, Liechtenstein)
Stabthermometer (-10°C - +100°C)	(Amarell-Elektronik, Kreuzwertheim, Deutschland)
Stahlnetze, Sonderanfertigung	(Générale de Systèmes et d'Équipements, St. Ouen L'Aumone, Frankreich)
Stahlringe, Sonderanfertigung	(Sonomeca, Noisy-le-Sec, Frankreich)
Stereolupe	(Leica, Bensheim, Deutschland)
Sterican [®] Kanülen	(B. Braun Melsungen AG, Melsungen, Deutschland)
Sterilwerkbank Laminar flow	(Ceag Schirp Reinraumtechnik, Selm-Bork, Deutschland)
Taumelschüttler Polymax 1040	(Heidolph Instruments GmbH&Co.KG, Schwabach, Deutschland)
Transmissionselektronenmikroskop JEM 1210	(Jeol, Tokyo, Japan)
Ultracut E	(Leica, Bensheim, Deutschland)
Vakuum-Membranpumpe	(Bachhofer, Reutlingen, Deutschland)
Verschlusszange LaPhaPack	(Werner Reifferscheidt GmbH, Langerwehe, Deutschland)
V.I.P. E150 Gewebeentwässerungs- und Paraffineinbettungsautomat	(Vogel Medizin Technik und Elektronik, Gießen, Deutschland)
Wasserbad 1083	(Gesellschaft für Labortechnik GmbH, Burgwedel, Deutschland)
Wasserbad B-481	(Büchi, Schweiz)

4 Methoden

4.1 Zellkulturtechniken

Die methodische Entwicklung geeigneter Zellkulturtechniken ist Gegenstand der vorliegenden Arbeit. Daher werden an dieser Stelle die jeweils optimierten und standardisierten Techniken dargestellt, während die konzeptionellen Methodenentwicklungen und -etablierungen ausführlich im Ergebnisteil (Kapitel 5.1 bis 5.4) erläutert werden.

4.1.1 Zellisolierung und Primärkultur

Nach chirurgischer Exzision der Hautproben wurden diese sofort in steriles DMEM-Medium mit 20% (v/v) fötalem Kälberserum (FKS) und je 100 U/ml Penicillin/Streptomycin (P/S) überführt und bei 4°C gelagert. Hautproben aus atopischem Ekzem wurde außerdem 1 % (w/v) Flucloxacillin zugegeben.

Die Zellisolierung erfolgte innerhalb von 24 h nach der Exzision. Nach Entfernen von Fettgewebe und Haaren wurde die Hautprobe bei Raumtemperatur drei je 20-minütigen Antibiotika-Antimycotika-Bädern (I-III)²⁶⁷ unterzogen. Hautproben aus atopischem Ekzem wurden zusätzlich 20 min bei Raumtemperatur mit 1,0 % (w/v) Flucloxacillin-MEM-Lösung inkubiert. Es folgte eine ein- bis zweistündige Inkubation in Dispase (2 U/ml) bei 37°C (5 % CO₂, 95 % relative Luftfeuchte) bis die Epidermis sich mittels Pinzetten mechanisch von der Dermis trennen ließ.

Die Keratinozyten wurden sukzessiv in je fünfminütigen Inkubationen mit einem Magnetührer in frischem, zehnfach konzentrierten Trypsin/EDTA vereinzelt. Der Trypsin-Verdau wurde in 20 % (v/v) FKS-haltigem DMEM-Medium gestoppt, die Epidermis wurde erneut in Trypsin/EDTA inkubiert. Abschließend wurden noch ungelöste Keratinozyten durch Scherkräfte mittels wiederholten Pipettierens mechanisch isoliert. Das Stratum corneum wurde entfernt. Nach fünfminütigem Zentrifugieren bei 150 g wurden die Keratinozyten in supplementiertem K-FSM-Medium aufgenommen und in Polystyrol-Zellkulturflaschen ausgesät.

Die Dermis-Stückchen wurden in kleinen Polystyrol-Zellkulturflaschen trocken aufgesetzt. Bei Adhärenz nach 24 h wurde DMEM-Medium mit 20 % (v/v) FKS,

100 U/ml Penicillin und 100 µg/ml Streptomycin (P/S) zugegeben. Nach 5-10 Tagen Inkubation migrierten humane Fibroblasten aus der Dermis.

Die Zellkultur erfolgte mit zweitägigem Mediumwechsel im Inkubator unter standardisierten Bedingungen (37°C, 5 % CO₂, 95 % relative Luftfeuchte). Alle Isolierungsschritte wurden unter sterilen Bedingungen in einer Laminar flow-Sterilwerkbank durchgeführt.

4.1.2 Flucloxacillinbehandlung kontaminierter Primärkeratinozytenkulturen

Mit *Staphylococcus aureus* kontaminierte Zellkulturen wurden zunächst dreimal mit PBS gewaschen. Anschließend wurde mit 1 % (w/v) Flucloxacillin-MEM-Lösung für 20 min unter Standardbedingungen (37°C, 5 % CO₂, 95 % relative Luftfeuchte) inkubiert. Waren noch immer Kontaminationen mikroskopisch sichtbar, wurde die Inkubation mit frischer Antibiotikallösung bis zur vollständigen Dekontamination der Zellkultur wiederholt. Zwischen den Inkubationsschritten wurde jeweils dreimal mit PBS gewaschen. Die Dekontamination wurde zunächst unter antibiotikafreien Kulturbedingungen überprüft, anschließend wurden die Kulturen unter Standardbedingungen nur mit 100 U/ml Penicillin und 100 µg/ml Streptomycin kultiviert. Ebenso wurde in der Provokationsstudie verfahren (vergleiche 5.2.2).

4.1.3 Keratinozytenkultur unter Einsatz beschichteter Membraneinsätze

Primäre Keratinozyten wurden in Kunststoffeinsätzen auf mit Kollagen I, Kollagen IV, Fibronectin, Matrigel® (alle murinen Ursprungs) bzw. humanem Laminin beschichteten Membranen aus Polyethylenterephthalat (PET) mit 23,1 mm Durchmesser, 3,0 µm Porengröße und einer Porendichte von $0,8 \cdot 10^6/\text{cm}^2$ ausgesät und in mit 2,5 ml Medium gefüllte Zellkulturplatten mit 6 Vertiefungen eingesetzt. Alternativ wurden unbeschichtete Membraneinsätze aus Polycarbonat (PC) bzw. PET mit 3,0 µm Porengröße und Porendichten von $0,8 \cdot 10^6/\text{cm}^2$ bzw. $2,0 \cdot 10^6/\text{cm}^2$ sowie Aluminiumoxid mit 0,2 µm Porengröße eingesetzt. Die Matrices wurden zunächst 30 min bei Raumtemperatur in dem späteren Kulturmedium gewaschen, anschließend 2 h äquilibriert. Das Medium wurde erneuert und Keratinozyten wurden ausgesät. Die Zelldichte betrug zwischen $0,1-0,5 \cdot 10^6$ Zellen/ml in 2,0 ml Gesamtzell-

suspension pro Membraneinsatz. Die Matrices sind nicht transparent, so dass eine mikroskopische Kontrolle der Zellkulturen nicht möglich war.

4.1.4 Arretieren der Fibroblastenproliferation

Subkonfluente humane Primärfibroblasten sowie murine 3T3-Fibroblasten wurden im Verhältnis 1:4 subkultiviert und nach 24 h Inkubation einer 4-5-stündigen Mitomycin C-Behandlung (8 µg/ml) in DMEM mit 20 % FKS (v/v), 100 U/ml P/S bei 37°C (5 % CO₂, 95 % relative Luftfeuchte) unterzogen. Es folgten je 2 Waschgänge à 10 min in PBS mit Ca²⁺/Mg²⁺, sowie PBS ohne Ca²⁺/Mg²⁺, Trypsinieren der Zellen und Neuaussaat von je 4000 Zellen/cm² in DMEM mit 20 % (v/v) FKS, 100 U/ml P/S. Bei Lagerung im Inkubator (37°C, 5 % CO₂, 95 % relative Luftfeuchte) und zweimaligem Mediumwechsel pro Woche waren die vitalen, proliferationsarretierten Fibroblastenkulturen etwa 4 Wochen einsetzbar.

4.1.5 Herstellung von Fibroblasten-Kollagengelen

Die Fibroblasten-Kollagenlösung zum Beschichten der Membraneinsätze nach *Fusenig et al.* bestand aus 80 % (v/v) essigsaurer Kollagenlösung (4 mg/ml Rattenschwanz-Kollagen Typ I in 0,1 % (v/v) Essigsäure), 10 % (v/v) Hanks-Puffer mit Phenolrot, (Mischung auf Eis neutralisieren mit 5 M NaOH) und 10 % (v/v) in FKS aufgenommenen, Mitomycin C-arretierten Fibroblasten. Je 1,0-2,5 ml Fibroblasten-Gellösung ($2-5 \cdot 10^5$ Zellen/ml Kollagengel) wurden in unbeschichteten PC- bzw. PET-Membraneinsätzen luftblasenfrei aufgetragen. Nach 1-2 h Inkubation (37°C, 5 % CO₂, 95 % relative Luftfeuchte) wurden sterile Glasringe unter gleichmäßigem Druck auf die Gele aufgesetzt. Nach 1 h wurde die durch die Komprimierung des Gels ausgetretene Flüssigkeit abgesogen, die Gele dann 12 h mit FAD₂/Greens oder F7-Proliferationsmedium bei 37°C (5 % CO₂, 95 % relative Luftfeuchte) äquilibriert. Alternativ wurden Fibroblasten-Kollagengele nach der Methode des *Centre Charles Zviak, L'ORÉAL, Clichy*²⁶⁷, in 6- bzw. 12-„well“-Platten gegossen: Zusammensetzung pro 2-3 Gele: 3,22 ml MEM, 0,65 ml FKS, 0,35 ml 0,1 n NaOH, 0,6 ml 0,001 % (v/v) Essigsäure, 0,2 ml 10 % FKS in MEM-Hepes, $1 \cdot 10^6$ Mitomycin C-arretierte Fibroblasten/0,5 ml 10 % FKS in MEM-Hepes, 1,5 ml essigsaurer Kollagenlösung

(4 mg/ml Rattenschwanz-Kollagen Typ I in 0,1 % (v/v) Essigsäure). Die Gele wurden mit F7-Proliferationsmedium bei 37°C (5 % CO₂, 95 % relative Luftfeuchte) äquilibriert. Nach Kontraktion der Gele wurden sterile Edelstahlringe unter gleichmäßigem Druck auf die Gele aufgesetzt.

4.1.6 Keratinozytenkultur auf Fibroblasten-Kollagengelen und Kollagenschwämmen

Primäre, humane Keratinozyten der Passagen 1-4 wurden in einer Konzentration von $1 \cdot 10^6$ Zellen/ml pro Membraneinsatz in Glasringen bzw. $1-5 \cdot 10^5$ Zellen/0,25-0,5 ml in Stahlringen auf Fibroblasten-Kollagengelen ausgesät. Alternativ wurden $1-5 \cdot 10^5$ Keratinozyten/250 µl in Edelstahlringen auf, in Medium luftblasenfrei äquilibrierten, Kollagengelschwämmen ausgesät. Nach 24 h Inkubation und erfolgter Adhärenz der Keratinozyten wurden die Ringe vorsichtig entfernt. Sie verhinderten eine Zellbesiedelung der Membraneinsatz- bzw. Kulturschalenwände. Beim späteren Ablösen des Epithels würde dieses sonst einreißen. Fibroblasten-Kollagengele aus 24-„well“-Platten wurden nun auf Edelstahlnetze überführt. Die Organoidkultur wurde für 1-5 Tage submers unter Proliferationsbedingungen (F7-Proliferationsmedium, 37°C, 5 % CO₂, 95 % relative Luftfeuchte), anschließend für 10-20 Tage unter Differenzierungsbedingungen inkubiert (F3-Differenzierungsmedium, 37°C, 5 % CO₂). Um das Epithel luftexponiert zu halten, wurde das F3-Differenzierungsmedium lediglich außerhalb des Membraneinsatzes bzw. bis an den oberen Kollagenrand zugegeben. Der Mediumwechsel erfolgte sukzessiv über 4 Tage: 100 % F7 - 80:20 % F7:F3 - 50:50 % F7:F3 - 20:80 % F7:F3 - 100 % F3.

4.1.7 Keratinozytenkultur auf humaner Dermis

Zur Konditionierung der Dermis wurden frische Hautproben in PBS gewaschen und das Fettgewebe entfernt (vergleiche 4.1.1). Es folgten drei 20-minütige Antibiotika-Antimycotika-Bäder (I-III)²⁶⁷ bei Raumtemperatur. Nach erneutem Waschen in PBS wurden die Hautproben mit der Dermisseite auf Petrischalenböden bei -20°C eingefroren. Mehrfaches Auftauen und Einfrieren zerstörte die Proliferationsfähigkeit der Dermiszellen. Die Epidermis wurde in halbgefrorenem Zustand mittels eines Skal-

pells oder eines Dermatoms dünn abgehoben. Alternativ wurde die Antibiotika-Antimycotika-behandelte Hautprobe zunächst für 10 Tage in zweitägig erneuertem PBS ohne $\text{Ca}^{2+}/\text{Mg}^{2+}$ bei 37°C (5 % CO_2 , 95 % relative Luftfeuchte) inkubiert. Nach etwa 10 Tagen ließ sich die Epidermis mittels Pinzetten von der Dermis trennen. Nun folgte der mindestens zehnmahlige Wechsel von je 15 min Inkubation in 37°C und -20°C . Anschließend wurde die so entstandene epidermisfreie Dermis bei -80°C gelagert. Sie diente, eingesetzt in Membraneinsätzen oder auf Stahlnetzen, als Substratgrundlage zur Aussaat primärer Keratinozyten (vergleiche 4.1.6). Vor der Aussaat wurde die Dermis 4-5 Tage in antibiotikafreiem F7 unter Überprüfung der Sterilität der Probe vorkonditioniert. Mittels eines Stahlringes wurde das Aussaatereale zunächst begrenzt, um das Anwachsen der Zellen an die Membraneinsatzwand zu vermeiden. Nach 24 h Inkubation der Zellen wurde der Stahlring entfernt. Die Kultur wurde wahlweise weiter submers oder luftexponiert gehalten. Alternativ wurden $1-4 \cdot 10^5$ Keratinozyten/15 μl direkt luftexponiert ausgesät und kultiviert.

4.1.8 Dauerkultur

Neben frisch gewonnenen Primärkulturen wurde mit unterschiedlichen Zelllinien gearbeitet. Die immortalisierte, humane Keratinozytenzelllinie HaCaT sowie die murine Fibroblastenzelllinie 3T3 waren in der institutseigenen Zellbank in flüssigem Stickstoff gefroren vorhanden. Die Primärkeratinozytenzelllinie NHEK wurde von Frau Dr. Christine Hohenadl, Institut für Molekulare Virologie der GSF, Neuherberg, zur Verfügung gestellt.

Die HaCaT-Zellen wurden mit DMEM oder RPMI 1640-Medium mit 2 mM Glutamin, 10 % (v/v) hitzeinaktiviertem fötalen Kälberserum FKS sowie P/S, die 3T3-Fibroblasten mit DMEM, 20 % (v/v) FKS, P/S in Dauerkultur gehalten. NHEK-Primärkeratinozyten erhielten serumfreies Keratinozytenmedium KBM mit 15 mg/ml Rinderhypophysenextrakt, 2,5 mg/ml Insulin, 0,25 mg/ml Hydrocortison, 0,05 $\mu\text{g}/\text{ml}$ humanem EGF, Gentamicinsulfat, Amphotericin-B und P/S (KGM). Die Zelllinien wuchsen als subkonfluente „monolayer“-Kulturen in Polystyrol-Zellkulturflaschen im Inkubator unter konstanten Bedingungen (37°C , 5 % CO_2 , 95 % relative Luftfeuchte). Alle Arbeitsschritte zur Zellkultivierung wurden an einer sterilen Werkbank durchgeführt.

4.1.9 Subkultivieren der Zellen

Zur Subkultivierung 70-80 % subkonfluent gewachsener Zellen wurde zunächst mittels einer Membranvakuumpumpe das überstehende Medium abgesogen und die Zellen einmal mit un-supplementiertem Medium oder Puffer gewaschen. Anschließend wurden die Zellen mittels zehnfach konzentrierter Trypsin-EDTA-Lösung unter ständigem Schwenken auf dem Taumelschüttler vom Boden der Kulturflasche gelöst. Die Dauer des Ablösevorganges variierte zwischen den unterschiedlichen Zelllinien von 5-20 min. Zellen mit längerer Ablösedauer wurden unter zwischenzeitlichem Schwenken im Inkubator belassen. Die Trypsinwirkung wurde durch Zugabe eines 1-2fachen Volumens Vollmedium (DMEM mit 20 % (v/v) FKS + P/S) inhibiert und die Zellen in einem 50 ml-Falcontube bei 150 g für 5 min bei Raumtemperatur zentrifugiert. Der Überstand wurde abgesogen und verworfen, das Zellpellet wurde in Kulturmedium resuspendiert, die Zellzahl bestimmt und eingestellt. Die Zellen wurden in definierten Verdünnungen in neuen Zellkulturflaschen angesetzt oder gemäß der Versuchsprotokolle weiterbehandelt.

4.1.10 Zellzahl und Vitalitätsbestimmung

Zur Zellzahlbestimmung wurden Zellen in definierter Menge Medium aufgenommen und die Suspension, 2:1 mit Trypanblau-Lösung (0,5 % (w/v) in DPBS) verdünnt, wenige Minuten inkubiert. In einer Neubauer Zählkammer wurde die Zellzahl der Ausgangssuspension bestimmt.

Durch die Trypanblauausschlussfärbung ließ sich zudem die Vitalität der Zellen bestimmen. Während lebende Zellen hell mit blau-contrastiertem Rand erscheinen, ist der Farbstoff in tote Zellen komplett eingedrungen, so dass sich diese dunkelblau gefärbt von den lebenden Zellen deutlich abheben. Es wurden, so vorhanden, mindestens 2 x 200 Zellen pro Kammer gezählt und der Totzellanteil prozentual ermittelt.

4.1.11 Einfrieren, Auftauen und Lagerung der Zellen

Vor dem Einfrieren der Zellen wurden diese trypsinisiert und zweimal mit Vollmedium gewaschen. Etwa $5 \cdot 10^6$ Zellen wurden in 1 ml Einfriermedium resuspendiert und in 2,0 ml Cryoröhrchen überführt. Die Zellen wurden zunächst für 2 h bei -20°C , dann 24 h bei -80°C vorgefroren und später in flüssigem Stickstoff gelagert.

Tiefgefrorene Zellen wurden zügig im Wasserbad bei 37°C aufgetaut, in 10 ml Vollmedium (20 % FKS) aufgenommen und bei 150 g zentrifugiert. Die Zellen wurden in Kulturmedium resuspendiert und kultiviert. Nach 24 h erfolgte ein Mediumwechsel, um nicht angewachsene Zellen und Zellbruchstücke zu entfernen.

4.1.12 Mycoplasmentest

Zur Überprüfung der Zelllinien, Medien und FKS auf Mycoplasmenfreiheit wurden zwei voneinander unabhängige Methoden angewendet:

1. Durchführung des Mycoplasma Detection Kit laut Herstellerangaben (*Boehringer Mannheim*);
2. Färbung mit Bisbenzimid-Farbstoff Hoechst 33258.

Ein Aliquot der zu testenden Zellen/Lösungen wurde 5 min auf Eis mit 70 % (v/v) Ethanol oder Methanol/Eisessig (3:1) fixiert. Der Blaufluoreszenzfarbstoff wurde in 1:10 Verdünnung in PBS einer 5 mM Stammlösung eingesetzt. Die Inkubation erfolgte im Dunkeln für 2-3 min auf Eis. Nach mehrfachem Waschen/Zentrifugieren (150 g) der Zellen in PBS erfolgte die Auswertung fluoreszenzmikroskopisch. Der Farbstoff interkaliert in die DNA. Eine eventuelle Mycoplasmenkontamination würde durch dichte, punktförmige, intensiv leuchtende Signale deutlich.

4.2 „Enzyme-linked immunosorbent assays“ (ELISA)

4.2.1 Nachweis sezernerter Zytokine im Zellkulturüberstand

Nach jeweils 24- bzw. 48-stündiger Inkubation wurde der Zellkulturüberstand gesammelt, bei 2500 g 10 min zentrifugiert und die zellfreien Überstände bis zur analytischen Bestimmung bei -80°C aufbewahrt. Die Konzentrationen folgender Zytokine wurden mittels ELISA-Technik laut Herstellerangaben in den zellfreien Zellkultur-

überständen quantifiziert: Interleukin 1 α (IL-1 α), Interleukin 6 (IL-6), Granulozyten-Makrophagen-Kolonie-stimulierender Faktor (GM-CSF) und Tumornekrosefaktor α (TNF α).

Die Zytokinkonzentrationen wurden anhand der gemessenen Extinktionen nach der plattenspezifischen, linearen oder quadratischen 6-Punkt-Kalibrierkurve im Doppelansatz berechnet. Nachweis-, Erfassungs- und Bestimmungsgrenze jeder ELISA-Platte wurden nach dem linearen Kalibrierkurvenverfahren über 5 oder 6 Punkte nach DIN 32645 ermittelt^{257,258} (vergleiche 4.8). Diese lineare Kurve ist über ihren gesamten Bereich deckungsgleich mit der linearen oder quadratischen 6-Punkt-Kalibrierfunktion.

4.2.2 LDH-Toxizitätstest

Je 100 μ l der vor und nach der Gasexposition gesammelten, zellfreien Keratinozytenkulturüberstände sowie zellfreie Organoidkulturüberstände wurden in 96-,well“-Mikrotiterplatten mit je 100 μ l Reaktionslösung (INT-Tetrazoliumsalz + Diaphorase) laut Herstellerangabe für 30 min unter Lichtausschluss inkubiert. Lactat wird bei vorhandener Lactatdehydrogenase (LDH) unter NAD-Reduktion zu Pyruvat umgesetzt. Anschließend setzt der Katalysator Diaphorase mittels Protonentransfer (NADH+H⁺-Oxidation) das gelbe INT-Tetrazoliumsalz in rotes Formazansalz um. Die Reaktion wurde mit je 50 μ l 1 N HCl gestoppt und die Farbintensität der Lösungen bei einer Wellenlänge von $\lambda = 490$ nm (Referenzwellenlänge $\lambda > 600$ nm) photometrisch ausgewertet. Ein positiver Nachweis des in allen tierischen Zellen vorkommenden zytosmatischen Enzyms Lactatdehydrogenase im Zellkulturüberstand dient als Indiz defekter Zellplasmamembranen und Zelltod²⁴⁷. Als Positivkontrolle wurden zellfrei zentrifugierte Mediumüberstände von durch 3 x 30 s Ultraschall zerstörten Keratinozyten eingesetzt. Als Blindwerte wurden reine Mediumkontrollen analysiert. Expositionen gegenüber synthetischer Luft sowie Inkubatorzellkulturkontrollen dienten zur Überprüfung möglicher Zelltoxizität durch gasunabhängige Effekte.

4.2.3 MTT-Vitalitätstest

Der MTT-Test mitochondrialer Aktivität dient als indirekter Nachweis für Zellproliferation und Vitalität. Je $1,5 \cdot 10^4$ Zellen in 200 μl Medium wurden pro Vertiefung einer 96-, „well“ Mikrotiterplatte eingesetzt. Es folgte die Inkubation mit zu testenden Substanzen definierter Konzentration über einen definierten Zeitraum im Inkubator. Nach der Zugabe von je 25 μl /Vertiefung der gefilterten MTT-Stocklösung (5 mg/ml) schloss sich eine weitere Inkubation bei 37°C über 6 h an. Das Tetrazoliumsalz MTT wurde mitochondrial zu dunkelblauen Kristallen reduziert. Durch Zugabe von 100 μl /Vertiefung 10 % (w/v) SDS wurden Zellen und Kristalle lysiert. Nach weiteren 24 h Inkubation bei Raumtemperatur im Dunkeln erfolgte die Messung der Blau-Intensität, proportional zu mitochondrialer Aktivität und Zellzahl, im Photometer bei $\lambda = 595 \text{ nm}$.

4.3 Zyto- und Histochemie

4.3.1 Herstellung von Zytopräparaten

Je 150 μl Zellsuspension humaner Primärkulturen wurden in einer Zelldichte von $1 \cdot 10^6$ Zellen/ml Kulturmedium mit 150 g für 10 min bei 4°C auf Glasobjektträger zentrifugiert („cytospin“-Präparate). Alternativ wurden Keratinozyten in einer Zelldichte von $4 \cdot 10^4$ Zellen/ cm^2 für 24 h auf Glas- oder Permax-Zellkulturobjektträgern kultiviert. Ein Teil der Präparate wurde unfixiert eingefroren. Die übrigen Schnitte wurden für 5 min bei 4°C mit 2 % (w/v) Paraformaldehyd, pH 7,4 fixiert. Die Präparate wurden bei -20°C gelagert, bei Raumtemperatur aufgetaut, gegebenenfalls fixiert und anschließend zytochemisch weiterbehandelt.

4.3.2 Herstellung von histologischen Paraffin-Präparaten

Frisch entnommene humane Hautproben wurden direkt nach der Exzision 24 h in 3,7 % (v/v) gepuffertem Formalin fixiert. Organoidkulturproben wurden zum Schutz der oberen Zellschichten in 4 % (w/v) Agar Agar eingebettet und anschließend 24 h in 3,7 % (v/v) gepuffertem Formalin fixiert. Das fixierte Gewebe wurde in einem *V.I.P. E150* Gewebeentwässerungs- und Paraffineinbettungsautomat mit Druck- und Vakuumeinrichtung durch eine aufsteigende Alkoholreihe entwässert, in Xylol inku-

biert und schließlich mit flüssigem Paraffin bei 60°C infiltriert. Das paraffingetränkte Gewebe wurde in Blöcke gegossen und nach Aushärtung des Paraffins am *Reichert Jung 2050 Supercut* Mikrotom mit Einmalklingen in 4-6 µm Schichtdicke seriell geschnitten. Die Paraffinschnitte wurden 2 h bei 60°C auf Objektträger fixiert, bei Raumtemperatur gelagert und vor der Weiterbehandlung mittels Xylol und absteigender Alkoholreihe entparaffiniert und rehydriert.

4.3.3 Herstellung von histologischen Cryo-Präparaten

Humane Hautproben wurden direkt nach der Exzision in flüssigen Stickstoff überführt. Organoidkulturproben wurden zum Schutz der oberen Zellschichten in Tissue Tek eingebettet, in flüssigem Stickstoff gefroren und bei -80°C aufbewahrt. Anschließend wurden serielle Cryoschnitte von 4-6 µm Dicke angefertigt (Cryo-Cut Mikrotom, Messer C, -25°C). Die Gewebeschnitte wurden auf Objektträger überführt und luftgetrocknet. Ein Teil der Präparate wurde unfixiert eingefroren. Die übrigen Schnitte wurden für 5 min bei 4°C mit 2 % (w/v) Paraformaldehyd, pH 7,4 fixiert. Die Präparate wurden bei -20°C gelagert, bei Raumtemperatur (RT) aufgetaut, gegebenenfalls fixiert und anschließend histochemisch weiterbehandelt.

4.3.4 Immunochemischer Proteinnachweis²⁴⁵

Zyto- sowie Histopräparate wurden nach fünfminütiger Fixierung mit 2 % (w/v) Paraformaldehyd, pH 7,4 bei 4°C und anschließender aufsteigender Alkoholreihe (50-100 %) für 10 min mit 100 % Methanol bei -20°C inkubiert. Die Fixierung wurde mittels Trypanblauenpenetration an einem Kontrollpräparat überprüft. Nach anschließender absteigender Alkoholreihe wurde das Präparat 10 min in 1 % (w/v) GDPBS unter leichtem Rühren gewaschen. Es folgte 1 h Inkubation mit 10 % (v/v) Serum der Sekundärantikörperspecies in PBS, gefolgt von der Primärantikörperinkubation bei 4°C über Nacht (Antikörperkonzentrationen, vergleiche Tabelle 2). Die Histopräparate wurden anschließend zur Inhibition natürlicher Gewebeperoxidasen mit 1 % (v/v) Wasserstoffperoxid in Methanol inkubiert (10 min, RT). In allen Präparaten wurden mit Avidin (50 µg/ml) und Biotin (20 µg/ml) nacheinander für je 30 min unspezifische Bindungen blockiert. Allen Inkubationsschritten waren Waschschrte mit GDPBS

zwichengeschaltet. Es folgte die einstündige Inkubation mit biotinyliertem Sekundärantikörper in 10 % (v/v) Humanserum-GDPBS bei Raumtemperatur (Antikörperkonzentrationen, vergleiche Tabelle 2). Nach erneutem Waschen wurde 1 h bei Raumtemperatur mit Avidin-Biotin-Komplex (Vectastain ABC-Kit, Elite PK-6200 Universal, *Vector Laboratories Inc., Burlingame, USA*) inkubiert und wiederum mit GDPBS gewaschen. 1 µg/ml DAB wurde im Ultraschallbad in Puffer gelöst, 1 µl H₂O₂ zugegeben und direkt auf das Zellpräparat aufgetragen. Die Farbreaktion erfolgte unter Sichtkontrolle von parallel durchgeführten Positiv- und Negativkontrollen unter dem Mikroskop und wurde mit Leitungswasser gestoppt. Nach einer Kernfärbung mit Hämalaun für 2-3 min und anschließender Entwässerung wurde das Präparat mit DePex eingedeckt und mikroskopisch ausgewertet. Parallel wurden jeweils Kontrollpräparate mit PBS anstelle des Primärantikörpers und dem substratkonjugierten Zweitantikörper inkubiert, um unspezifische Färbungen auszuschließen. Im Falle fluoreszenzmarkierter Antikörper wurden Kontrollschnitte mit PBS inkubiert, um eine Eigenfluoreszenz des Gewebes auszuschließen.

Tabelle 2: Einsatzkonzentrationen von Primär- und Sekundärantikörpern

Primärantikörper		Verdünnung
Monoclonal anti-human Zytokeratin 5,8	mouse IgG1	1 :10
Monoclonal anti-human Zytokeratin 6	mouse IgG1	unverdünnt
Monoclonal anti-human Zytokeratin 10,11	mouse IgG	1 :10
Monoclonal anti-human Zytokeratin 14	mouse IgM	1 :100
Monoclonal anti-human Pan Zytokeratin	mouse IgG FITC -konjugiert	1 :50
Monoclonal anti-human GM-CSF	mouse IgG	1 :20
Polyclonal anti-human Interleukin 1 α	rabbit IgG	1 :20
Polyclonal anti-human Interleukin 6	rabbit IgG	1 :20
Polyclonal anti-human TNF α	rabbit IgG	1 :20
Anti-Ki67/MIB1	mouse IgG1	1 :10
Sekundärantikörper		
Anti-mouse IgM, μ -chain	Peroxidase-konjugiert	1 :50
Anti-mouse IgG	Peroxidase-konjugiert	1 :50
Anti-rabbit IgG	Peroxidase-konjugiert	1 :50

4.3.5 Hämatoxylin-Eosin (H.E.)-Färbung

Als Übersichtsfärbung wurde in Anlehnung an Burck²⁴⁶ eine Hämatoxylin-Eosin-Färbung (H.E.) durchgeführt. Fixierte Präparate wurden mit Mayers Hämalaun, 1:4 mit Leitungswasser verdünnt für 5 min bei Raumtemperatur gefärbt. Die Schnitte wurden 15 min in fließendem Leitungswasser gebläut und 1 min in einer 1 %igen wässrigen Eosin-Lösung mit 1 Tropfen Eisessig/100 ml gefärbt. Anschließend wurde kurz in ddH₂O differenziert, durch eine aufsteigende Alkoholreihe (50-100 %) sowie Xylol für je 2 min entwässert und abschließend mit DePex eingedeckt.

4.3.6 Pappenheim-Färbung

Die panoptische Färbung nach Pappenheim kombiniert die May-Grünwald-Färbung mit der Giemsa-Färbung²⁴⁶. Fixierte Präparate wurden mit May-Grünwald-Konzentrat überschichtet. Nach 5 min Inkubation folgten weitere 5 min Inkubation mit einer 1:2 Verdünnung. Nach kurzem Spülen mit ddH₂O wurde für 15 min mit Giemsa-Lösung, 1:20 in ddH₂O oder Puffer, überschichtet. Die Schnitte wurden erneut mit ddH₂O gespült, entwässert und mit DePex eingedeckt.

4.3.7 Färbung mit Bisbenzimid

Fixierte Präparate wurden 10 min in PBS rehydriert und anschließend für 2-3 min bei Raumtemperatur mit einer 1:10 Verdünnung einer 5 mM Stammlösung des Hoechst 33258 Bisbenzimid-Fluoreszenz-Farbstoffs im Dunkeln inkubiert. Anschließend wurde mehrfach je 10 min gründlich mit PBS gewaschen. Die Objektträger mit den gefärbten Präparaten wurden dann bei 4°C in einer Küvette mit PBS gelagert. Nach 2 Tagen ist ein optimaler Kontrast blaugefärbter Zellkerne auf ungefärbtem, dunklen Hintergrund erreicht und die Objekte wurden mit PBS und Deckglas unter dem Fluoreszenzmikroskop ausgewertet. Die Schnitte dürfen nicht mit Permafluor eingedeckt werden, da sonst eine starke unspezifische Hintergrundfärbung auftritt!

4.4 Mikroskopische Techniken

4.4.1 Durchlicht- und Fluoreszenzmikroskopie

Alle *in vitro*-Kulturen wurden während der Versuchsdurchführungen regelmäßig unter einem Invertlichtmikroskop (*Leitz Diavert*) hinsichtlich morphologischer Veränderungen beobachtet. Die Photodokumentation erfolgte mit einer *Ricoh XR-X 3000* Spiegelreflexkamera auf *Kodak Ektachrome EPY 64 T* Kunstlicht-Diafilmen.

Für die Auswertung der zytologischen und histologischen Präparate stand ein Durchlicht- und Fluoreszenzmikroskop (*Leica LB 100 T*) zur Verfügung. Die Photodokumentation erfolgte mit einem *Leica MPS 52* Photosystem auf Diakunstlichtfilmen (*Kodak Ektachrome EPJ 160 T*). Außerdem wurde ein Lichtmikroskop *Zeiss Axioplan 2* mit einem digitalen *MC 80 DX* Photosystem und *Zeiss KS 300* Software benutzt.

4.4.2 Probenaufbereitung für Rasterelektronenmikroskopie (REM)

Organoidgewebekulturen wurden in F3-Differenzierungsmedium, 37°C, mittels entfetteter Skalpellklingen samt Filtermembran vom Kultureinsatz getrennt. Die Organoidorientierung wurde markiert, die gewünschte Probengröße geschnitten. Humane Primärkeratinozyten wurden auf Deckgläsern (23 mm Durchmesser) kultiviert. Die Präparate wurden nach kurzem Waschen in PBS, 37°C, in 2 % (v/v) Glutaraldehyd in 0,08 M Cacodylatpuffer, 37°C, überführt. Die Fixierlösung wurde nach 15 min erneuert und die Organoidpräparate nach 2 h Inkubation bei Raumtemperatur in 7 % (w/v) Saccharose-Cacodylatpuffer überführt. Primärkeratinozyten wurden bei 37°C für nur 30 min in 2 % (v/v) Glutaraldehyd in 0,08 M Cacodylatpuffer fixiert und anschließend ebenfalls in 7 % (w/v) Saccharose-Cacodylatpuffer, RT, überführt. Der Waschpuffer wurde dreimal alle 15 min gewechselt und dabei auf 4°C abgekühlt. Es folgte 1 h Postfixierung in 2 % (v/v) Osmiumtetroxid in 0,08 M Cacodylatpuffer, 4°C. Die Zellpräparate wurden anschließend im *CPD 030* Kritischer-Punkt-Trocknungsgerät getrocknet. Organoidpräparate wurden mittels einer aufsteigenden Alkoholkonzentrationsreihe entwässert: 30 %-50 %-70 %-100 % (v/v) EtOH und anschließend in Hexamethyldisilazane (HMDS) getrocknet: 3:1 EtOH/HMDS - 2:1 EtOH/HMDS - 1:3 EtOH/HMDS - 100 % HMDS. Die Inkubationen erfolgten für je 3 x 10 min bei Raumtemperatur. Der Wechsel der filtrierten Lösungen (Filterporengröße 0,2-0,4 µm) erfolgte über sukzessive Gradienten, um ein Trockenfallen der Präparate zu ver-

meiden. Anschließend wurden die Proben 24 h bei Raumtemperatur im Exsikkator über Silicagel getrocknet. Die getrockneten Präparate wurden in exakter Orientierung mit einem Kohlenstoffkleber auf Probentellern befestigt und in einer *BalTec SCD 050* Sputter-Anlage mit 10-20 nm Gold beschichtet. Die rasterelektronenmikroskopische Auswertung erfolgte in einem *Jeol JSM 6300* Rasterelektronenmikroskop bei einer Beschleunigungsspannung von 20 kV.

4.4.3 Probenaufbereitung für Transmissionselektronenmikroskopie (TEM)

Organoidgewebekulturen wurden in F3-Differenzierungsmedium, 37°C, mittels entfetteter Skalpellklingen samt Filtermembran vom Kultureinsatz getrennt. Die Organoidorientierung wurde markiert, die gewünschte Probengröße geschnitten. Die Präparate wurden nach kurzem Waschen in PBS, 37°C, in 2 % (v/v) Glutaraldehyd in 0,08 M Cacodylatpuffer, 37°C, überführt. Die Fixierlösung wurde nach 15 min erneuert und die Präparate nach 2 h Fixierung bei Raumtemperatur in 7 % (w/v) Saccharose-Cacodylatpuffer, RT, überführt. Der Waschpuffer wurde dreimal alle 15 min gewechselt und dabei auf 4°C abgekühlt. Es folgte 1h Postfixierung in 1 % (v/v) Osmiumtetroxid in 0,08 M Cacodylatpuffer, 4°C. Die Proben wurden in 7 % (w/v) Saccharose-Cacodylatpuffer, 4°C, überführt und der Waschpuffer mehrfach gewechselt. Die Dehydrierung der Proben erfolgte mittels einer aufsteigenden Alkoholkonzentrationsreihe 50 %-70 %-90 %-100 % (v/v) EtOH, je 2 x 15 min bei Raumtemperatur. Nachfolgend wurden die Proben bei Raumtemperatur über sukzessive Infiltration in Agar 100-Harz eingebettet: 2 x 5 min Inkubation in 100 % Propylenoxid, 2 x 30 min 3:1 Propylenoxid/Agar 100, 2 x 30 min 1:3 Propylenoxid/Agar 100, 100 % (w/v) Agar 100 über Nacht. Nach 4 h Inkubation in Agar 100 mit Katalysator Benzyl-dimethylamin erfolgte die Flacheinbettung bei Raumtemperatur.

Von den in Kunstharz eingebetteten Proben wurden Semi- und Ultradünnschnitte von 500 nm bzw. 70 nm Dicke mit einem Diamantmesser am *Leica Ultracut E* Mikrotom angefertigt. Die Semidünnschnitte wurden mit 1 % (w/v) Methylenblau in 1 % (w/v) Boraxlösung gefärbt und im Lichtmikroskop (*Leica DMRB*) untersucht. Die Photodokumentation erfolgte digital mittels einer *PCO Sensicam* CCD-Kamera mit einer Auflösung von 1280x1024 Pixel. Die Ultraschnitte wurden auf Kupfernetzen mit gesättigter, alkoholischer Uranylacetatlösung (70 % (v/v) EtOH) und wässriger Bleicitratlösung kontrastiert und anschließend im Transmissionselektronenmikroskop

Jeol JEM 1210 bei einer Beschleunigungsspannung von 120 kV in 1500- bis 15000facher Vergrößerung untersucht.

4.5 Exposition von Zellen gegenüber flüssigen VOC im Standardinkubator

Je $1 \cdot 10^5$ humane Primärkeratinozyten der Passagen 2-4 wurden in je 3,0 ml Keratinozyten-serumfreiem-Medium (K-SFM, P/S) in Zellkulturplatten mit 6 Vertiefungen von 3,0 cm Durchmesser ausgesät. Nach 48 h Inkubation unter Standardbedingungen (37°C, 5 % CO₂, 95 % Luftfeuchte) folgte die Exposition gegenüber VOC. Hierfür wurde flüssiges Toluol direkt ohne Lösungsvermittler im K-SFM Zellkulturmedium gelöst. Nach dem Henryschen Gesetz lässt sich die im Phasengleichgewicht aus der Stoffkonzentration in der Gasphase resultierende Stoffkonzentration in der Flüssigphase berechnen (vergleiche Kapitel 4.7.2.3). Die theoretisch aus den gasförmigen Konzentrationen 570 mg/m³ Toluol (3 MAK), 190 mg/m³ Toluol (1 MAK), 19 mg/m³ Toluol (0,1 MAK) und 0,08 mg/m³ Toluol (umweltrelevante Konzentration) bei 37°C im wässrigen Medium resultierenden VOC-Konzentrationen wurden hergestellt (vergleiche Tabelle 7). Eine bestmögliche Mischung der im wässrigen Medium schlecht löslichen, organischen Substanzen wurde durch wiederholte, jeweils 30-60 s dauernde Ultraschallbehandlung erreicht. Je 3,0 ml des VOC-haltigen Zellkulturmediums wurden auf die subkonfluenten Zell„monolayer“ pipettiert und die Kulturen im Brutschrank unter Standardbedingungen inkubiert. Zum Zeitpunkt 0, nach 1 h, 2 h und 5 h Exposition wurden je 500 µl Zellkulturmedium in Probengläser überführt und mit Teflonsepten gasdicht verschlossen. Bis zur gaschromatographischen Analyse wurden die Proben bei 4°C aufbewahrt. Nach 5 h Exposition wurden die Zellkulturen mittels Zellzahlbestimmung, MTT-Test, Trypanblauausschlussfärbung und LDH-Nachweis²⁴⁷ bezüglich Proliferation, Zellvitalität und Toxizität untersucht.

4.6 Exposition von Zellen gegenüber VOC in der Gasphase

Die Entwicklung und Etablierung der eingesetzten Apparatur zur Exposition von Zellsystemen gegenüber gasförmigen Substanzen sind Gegenstand der vorliegenden Arbeit. Daher werden deren Entwicklungskonzept, Konstruktion und technische Cha-

rakteristika explizit und zusammenhängend im Ergebnisteil (Kapitel 5.5 und 5.6) dargestellt und an dieser Stelle nur einige technische Geräteeinstellungen und standardisierte Versuchskonditionen erläutert.

4.6.1 Grundeinstellung der Gasflussreglersteuereinheit an der Expositionsapparatur

Vor Inbetriebnahme der Steuereinheit mussten die Funktionen der einzelnen Kanäle definiert werden. Die Regelbereiche der installierten Gasflussregler wurden via Dezimalstelle und Bereichsfaktor determiniert. Ferner mussten substanzspezifische Korrekturfaktoren berücksichtigt werden. Der Gaskorrekturwert für synthetische Luft bzw. Prüfgase im Trägergas synthetische Luft ist 1,0, der Korrekturwert für CO₂ beträgt 0,7. Das Produkt aus Bereichsfaktor und Gaskorrekturwert wurde als Skalierfaktor an der Steuereinheit eingestellt. Folgende Einstellungen wurden vorgenommen:

Tabelle 3: Grundeinstellungen der Steuereinheit für Gasflussregler

	Regelbereich	Dezimalstelle	Bereichsfaktor	Skalierfaktor
Kanal 1: synth. Luft	1000 ml/min	0 (000)	100	100
Kanal 2: CO ₂	50 ml/min	3 (00.0)	050	035
Kanal 3: VOC	50 ml/min	3 (00.0)	050	050
Kanal 4: VOC	500 ml/min	4 (000.)	050	050

Nach dem Erreichen einer konstanten Betriebstemperatur wurde die Nullpunkteinstellung der Kanäle vorgenommen. Vor jedem Expositionsversuch wurden 30 min Vorlauf zur Thermoregulation des Steuergeräts eingehalten. Nach 30 min waren die Nullwerte der einzelnen Kanäle erreicht oder wurden gegebenenfalls nachjustiert.

4.6.2 Versuchsbedingungen der VOC-Expositionsversuche

Als Zellkultursystem wurden submerse Primärzellkulturen humaner Keratinozyten eingesetzt. Die Primärzellen stammten aus Biopaten normalgesunder Haut, ferner aus läsionaler sowie nicht läsionaler Haut von Probanden mit atopischem Ekzem. Die Aussaat der Zellsuspension erfolgte stets im identischen Doppelansatz mit einer Konzentration von je $1 \cdot 10^5$ Zellen/3,0 ml serumfreien Keratinozytenmediums

(K-SFM, P/S) in Zellkulturplatten mit 6 Vertiefungen von 3,0 cm Durchmesser. Es kamen ausschließlich die Zellkulturpassagen 2-4 zum Einsatz. Anschließend wurden die Kulturen 24 h bzw. 48 h unter Standardbedingungen inkubiert (37°C, 5 % CO₂, 95 % Luftfeuchte). Nach einem Mediumwechsel (3,0 ml KGM, P/S) folgte die Schadgasexposition im zentralen Gasfluss in der eigens zu diesem Zweck entwickelten Expositionsapparatur. Als Zellkulturmedium wurde KGM eingesetzt, da es im Gegensatz zu K-SFM eine gaschromatographische Trennung des Toluolsignals von den Signalen der Medienkomponenten erlaubte. Stets wurden eine oder zwei Zellkulturplatten mit maximal 6 bzw. 12 subkonfluenten Zellkulturen simultan exponiert.

Zur Berechnung der einzusetzenden Prüfgaskonzentrationen wurden die angestrebten Zielkonzentrationen, der Gesamtvolumenstrom sowie die durch die Mischungsverhältnisse bedingten Verdünnungsfaktoren berücksichtigt. Unter Einrechnung von apparativ, über die Gasflussregler, regulierbaren Verdünnungsfaktoren wurden statische Prüfgase auf Basis synthetischer Luft in Konzentrationen von 500 ppm sowie 1000 ppm Toluol bzw. 500 ppm m-Xylol sowie ein Prüfgasgemisch mit 0,7 ppm Toluol und 0,4 ppm m-Xylol eingesetzt. Die je nach Zielkonzentration über die Gasflussregler eingestellten Volumenströme der VOC-Prüfgase und des Grundgases synthetische Luft sind Tabelle 4 zu entnehmen. Der Gesamtvolumenstrom blieb mit 500 ml/min, der CO₂-Gehalt mit 5 % über die gesamte Expositionsdauer gleichbleibend konstant.

Die Einstellung der Luftfeuchte im Trägergas synthetische Luft erfolgte bei 5,0°C (reverses Temperiersystem). Das Temperiersystem in der Expositions-kammer erzeugte bei einer Wasserbadtemperatur von 34°C eine konstante Temperatur des Zellkulturmediums von 31°C. Die resultierende relative Luftfeuchte in der Expositions-kammer betrug 50-60 %.

Tabelle 4: Prüfgaskonzentrationen^{243, 230,231} und Volumenströme

statisches VOC-Prüfgas	Zielkonzentration VOC	Volumenstrom [ml/min]			
		VOC	CO ₂	synth. Luft	gesamt
Toluol 500 ppm	0,1 MAK: 19 mg/m ³ / 5 ppm (ml/m ³)	5	25	470	500
	1 MAK: 190 mg/m ³ / 50 ppm (ml/m ³)	50	25	425	500
	3 MAK: 570 mg/m ³ /150 ppm (ml/m ³)	150	25	325	500
Toluol 1000 ppm	3 MAK: 570 mg/m ³ /150 ppm (ml/m ³)	75	25	400	500
m-Xylol 500 ppm	0,1 MAK: 44 mg/m ³ / 10 ppm (ml/m ³)	10	25	465	500
	1 MAK: 440 mg/m ³ /100 ppm (ml/m ³)	100	25	375	500
Toluol/m-Xylol 0,695 ppm / 0,405 ppm	Umwelt 3:2: 0,08 mg/m ³ / 0,021 ppm (ml/m ³) Toluol 0,053 mg/m ³ / 0,012 ppm (ml/m ³) m-Xylol	15	25	460	500

Es wurden Kurzzeitexpositionen von 5 h und 8 h Dauer sowie Langzeitexpositionen von 18 h und 24 h Dauer durchgeführt, gefolgt von weiteren 48 h Standardinkubation in 3,0 ml K-SFM + P/S (37°C, 5 % CO₂, 95 % relative Luftfeuchte). Nach jeweils 48-stündiger Inkubation desselben Zellkulturansatzes vor und nach dessen Exposition wurden 2,5 ml Zellkulturüberstand gesammelt, bei 2500 g 10 min zentrifugiert und die zellfreien Überstände bis zur analytischen Bestimmung bei -80°C aufbewahrt. Auf die Methoden zur Bestimmung biologischer Parameter im Anschluss an die Exposition, wie Analyse von Zellzahl, Vitalität/Zytotoxizität und Zytokinnachweis im Zellkulturmedium, wird in den jeweiligen Methodenkapiteln unter 4.1 Zellkulturtechniken und 4.2 „Enzyme-linked immunosorbent assays“ (ELISA) gesondert eingegangen. Für alle Zellgruppen und alle Expositionszeiten wurden jeweils Kontrollexpositionen mit 95 % synthetischer Luft, 5 % CO₂ in der Apparatur sowie unter Standardbedingungen im Inkubator durchgeführt.

4.6.3 Messung physikalisch-chemischer Betriebsparameter

Die Parameter Temperatur und relative Feuchte der Expositionsatmosphäre sowie die Temperatur des Zellkulturmediums wurden während der gesamten Expositionsdauer mehrfach mit Hilfe eines digitalen Thermohygrometers bzw. eines Quecksilber-Stabthermometers über den Probenahmeport im Inneren der Expositions-kammer ermittelt. Der pH-Wert des Zellkulturmediums wurde jeweils zu Beginn sowie direkt im Anschluss an die Expositionen am pH-Meter gemessen.

Auf die Ermittlung der Prüfgaskonzentrationen wird im folgenden Kapitel 4.7 gesondert eingegangen.

4.7 Schadstoffanalytik

4.7.1 Quantifizierung der VOC-Konzentrationen in der Gasphase

4.7.1.1 Analytprobenahme

Zur Kontrolle der Prüfgaskonzentrationen in der Expositions-kammer erfolgte eine Aktivprobenahme über den Probenahmeport im Inneren der Expositions-kammer. Mit Hilfe einer manuellen Pumpe wurde ein definiertes Probenvolumen auf Aktivkohle-röhrchen²⁴⁸ (Typ NIOSH, 150 mg) gezogen. Ein Nadelventil begrenzte den Volumen-strom der Pumpe auf 100 ml/min, so dass die Probenahme nicht störend auf die Ver-suchsbedingungen in der Expositions-kammer einwirkte. Die Einstellung des Pum-penvolumenstroms wurde am Seifenblasenströmungsmessgerät vorgenommen und überprüft.

Die maximale Ladekapazität der Aktivkohleröhrchen liegt bei etwa 20 mg Kohlen-wasserstoffen. Um einen Substanzdurchbruch in die Kontrollsorptions-schicht sicher ausschließen zu können, sollte maximal mit 4 mg, optimalerweise mit weniger als 1 mg Kohlenwasserstoffen beladen werden. 100 µg Kohlenwasserstoffe gewährle-isten als Minimum eine adäquate gaschromatographische Analytik. Für eine optimale gaschromatographische Analyse wurde ein Leitwert von 500 µg Beladung einge-halten (vergleiche Tabelle 5).

Tabelle 5: Analytbeladung von Aktivkohleröhrchen

Analyt pro Exposition	Konzentration [mg/m ³]	Konzentration pro Aktivkohleröhrchen [µg]
3 MAK Toluol	570	494
1 MAK Toluol	190	494
1 MAK m-Xylol	440	499
0,1 MAK m-Xylol	44	495
Umwelt 3:2 Toluol/m-Xylol	0,08/0,053	Nachweis technisch nicht möglich, da benötigtes Probevolumen zu groß

Um zu kontrollieren, dass während der gesamten Expositions-dauer konstante Prüf-gaskonzentrationen vorherrschten, wurden über den Expositions-zeitraum verteilt mehrfach zu unterschiedlichen Zeitpunkten Aktivkohleröhrchen beladen.

Um Substanzverlust oder Kontamination weitestgehend ausschließen zu können, wurden die Röhrchen direkt im Anschluss an die Probenahme an beiden Enden mit

Polyethylenkappen dicht verschlossen und bis zur Aufbereitung zur Analyse in mit Teflondeckeln verschlossenen Duranglasflaschen im Kühlschrank aufbewahrt. Zur Kontaminationskontrolle wurden zusammen mit den Analytproben unbeprobte Aktivkohleröhrchen als Negativkontrollen aufbewahrt. Mit Hilfe von Mehrfachbeprobungen einer identischen Expositionssituation und deren anschließenden Analysen zu versetzten Zeitpunkten wurde außerdem die Lagerstabilität der Analyten getestet.

4.7.1.2 Probenaufbereitung und gaschromatographische Analytbestimmung (konventionelle Gaschromatographie)

Zur Probenaufbereitung wurde die Aktivkohle der Probenröhrchen quantitativ in ein 2,0 ml-Probengefäß überführt und dieses nach Zugabe von 1,0 ml Desorptionsmittel Benzylalkohol mit einem Teflonseptum gasdicht verschlossen. Auf einem Schüttler erfolgte über Nacht die Flüssigdesorption der gesammelten Analyten vom Sorbens Aktivkohle nach dem Phasengleichgewichtsverfahren.

Zur anschließenden gaschromatographischen Analyse der Proben wurde ein *Perkin Elmer AutoSystem XL* Gaschromatograph (GC) mit Systemsoftware *Turbochrome Navigator* mit apolarer Quartz-Kapillarsäule (Länge 30 m, Innendurchmesser 0,25 mm, Filmdicke 1,00 µm), Flammenionisationsdetektor (FID) und Autosampler eingesetzt. Die Trennung der Analyten auf der apolaren Säule erfolgte nach Siedepunkten. Im FID wurde der von den ionisierten, kohlenwasserstoffhaltigen Analyten erzeugte Strom in Spannungswerte moduliert nachgewiesen.

In Vorversuchen wurde durch Variieren der Betriebsparameter bezüglich Temperaturprogramm, Splitverhältnis und Signalverstärkung ein auf die Analyten optimiertes Programm erstellt:

Injektionsvolumen:	1,0 µl bei Split 30 ml/min
Ofentemperatur:	8 min 100°C, Gradient 30°C/min bis 220°C, 15 min 220°C
Detektor:	FID bei 275°C, Signalabschwächung 2 ⁴ , Signaldichte 3,1250 pts/s

Mit diesem Programm wurde eine vollständige Trennung der Analyten bei optimaler Peakhöhe erreicht.

Alle Analysen wurden als Mehrfachmessungen von n = 2 oder n = 3 durchgeführt. Zusätzlich zu den Proben wurden Kalibrierlösungen bekannter Analytkonzentration analysiert. Auch die Kalibrierung erfolgte nach dem Phasengleichgewichtsverfahren.

Zur Bestimmung der Wiederfindungsrate wurden zusätzlich reine Kalibrierlösungen ohne Aktivkohle analysiert. Aus dem Quotienten der Peakflächen im Chromatogramm ließ sich die Desorptionsrate ermitteln.

4.7.1.3 Herstellung von Kalibrierlösungen für die konventionelle Gaschromatographie

Die zu analysierenden Analytproben lagen in Konzentrationen von 0,1-0,5 mg Analyt pro Aktivkohleprobenröhrchen, gelöst in 1,0 ml Desorptionsmittel Benzylalkohol, vor. Es wurden daher Kalibrierlösungen für 0, 125, 250, 500 und 750 µg Analytkonzentration pro 1,0 ml Benzylalkohol hergestellt. Die Dosierung der Flüssigsubstanzen erfolgte mit Präzisionspritzen für 25, 100, 250 und 1000 µl unter gleichzeitiger gravimetrischer Kontrolle auf der Präzisionswaage ($\rho_{\text{Toluol}} = 0,867 \text{ kg/l}$, $\rho_{\text{m-Xylol}} = 0,864 \text{ kg/l}$, $\rho_{\text{Benzylalkohol}} = 1,0455 \text{ kg/l}$). Die realen Konzentrationen wurden aus den gravimetrisch bestimmten Daten berechnet. Die Stammlösungen sowie die daraus verdünnten Kalibrierlösungen wurden direkt in mit Teflonsepten gasdicht verschlossenen Probengläsern (Rollrandflaschen mit teflonkaschierten Butylgummistopfen und Aluminiumbörtelkappen) angesetzt.

4.7.2 Quantifizierung der VOC-Konzentrationen im Flüssigmedium

4.7.2.1 Analytprobenahme

Zur Bestimmung der unmittelbar auf die Zellen wirkenden, aus der Konzentration in der Gasphase resultierenden VOC-Konzentration im Zellkulturmedium, wurden direkt im Anschluss an die Exposition je 500 µl Probe aus den Kulturschalen entnommen, in 2,0 ml-Rollrandprobengläser überführt und diese mit Teflonkappen sofort gasdicht verschlossen. Bis zur Analyse mittels manueller „headspace“ Gaschromatographie wurden die Proben bei 4°C im Kühlschrank aufbewahrt.

4.7.2.2 Probenaufbereitung und gaschromatographische Analytbestimmung (manuelle „headspace“ Gaschromatographie)

Im Gegensatz zur konventionellen Gaschromatographie wird in der „headspace“ Gaschromatographie die analythaltige Probe nicht flüssig, sondern gasförmig injiziert. Da ein „headspace“ Gaschromatograph nicht zur Verfügung stand, wurde in Anlehnung an die Methode der „headspace“ Gaschromatographie^{249,250,251} die VOC-exponierten Zellkulturmedienproben in gasdichten Probengefäßen daher zunächst für 1 h im geschlossenen Wasserbad auf 60°C gleichmäßig erhitzt. Nach Einstellung des Phasengleichgewichtes wurde, nach einer von Risse entwickelten, manuellen Methode²⁵², ein definiertes Aliquot aus der Gasphase („headspace“) entnommen und direkt in einen konventionellen Gaschromatographen injiziert. Eine gasdichte 100 µl-Präzisionsspritze wurde mittels Durchsaugen reiner Luft über 2 min konditioniert. Eine auf die Kanüle gesteckte Kunststoffspitze diente als Abstandhalter und gewährte ein gleichmäßig tiefes Eindringen in das Probengefäß und die Entnahme der Gasproben an vergleichbarer Stelle. Nach dreifachem Aufziehen der Prüfgasprobe wurde ein Probenvolumen von 100 µl gleichmäßig zügig in den Gaschromatographen injiziert und das Analysenprogramm gestartet. Zusätzlich zu den Proben wurden Kalibrierlösungen bekannter Analytkonzentration analysiert. Die gaschromatographische Analyse erfolgte unter folgenden Bedingungen:

Gaschromatograph:	AutoSystem XL (<i>Perkin Elmer</i>)
Trennsäule:	PE-1 (30 m x 0,25 mm x 1 µm)
Injektor:	250°C, Split 1:20
Ofentemperatur:	6 min 100°C isotherm
Detektor:	FID bei 250°C, Signalabschwächung 2 ⁵ , Signaldichte 3,1250 pts/s

Alle Analysen wurden als Mehrfachmessungen von n = 3 oder n = 5 durchgeführt (multiple „headspace“ Extraktion). Dabei war darauf zu achten, dass ausreichend große Zeitintervalle die Wiederherstellung der Phasengleichgewichte ermöglichten. Wiederholungsmessungen von n = 5 ermöglichten, einzelne Ausreißer zu erkennen und zu eliminieren. Nach mehr als fünf direkt nacheinander durchgeführten Injektionen aus dem identischen Probengefäß zeigte sich eine sukzessiv reduzierte VOC-Konzentration. Ein wichtiger Faktor in Hinsicht auf die Reproduzierbarkeit und Genauigkeit der Analysen war ferner die Dichtigkeit des GC-Injektionsseptums. Un-

dichte Septen führten zu Verlusten an Analyten. Deshalb wurde der Druck des GC-Trärgases Helium ständig kontrolliert, immer wieder zwischengeschaltete Kalibrierstandardanalysen durchgeführt und das Septum regelmäßig erneuert. Gleichermaßen wurde die Dichtigkeit der Injektionsspritze regelmäßig überprüft und gegebenenfalls erneuert.

4.7.2.3 Herstellung von Kalibrierlösungen für die manuelle „headspace“ Gaschromatographie

Der Konzentrationsbereich der Kalibrierlösungen richtete sich nach den VOC-Konzentrationen der zu analysierenden Proben. Zu deren Berechnung anhand der Stoffübergänge im VOC-Gleichgewicht zwischen Gas- und Flüssigkeitsphase wurden das Daltonsche und das Henrysche Gesetz herangezogen^{253, 254}. Da dieser Zusammenhang in der Literatur so nicht zu finden ist, wird die Herleitung und Anwendung der Gleichungen kurz dargestellt:

Die Gasphase dient als Reservoir, d.h. die Verhältnisse in der Gasphase sind konstant: $p = \text{const.}$, $T = \text{const.}$, $V = \text{const.}$ Unter dieser Voraussetzung gilt das ideale Gasgesetz:

$$p = n \times \frac{R \times T}{V} \quad \text{I.}$$

n ist die Stoffmenge in mol, R die allgemeine Gaskonstante, T die Temperatur, V das Volumen und p der Druck.

Weiter gilt das Partialdruckgesetz nach Dalton, daraus folgt:

$$\begin{aligned} p^{\text{gesamt}} &= p^{\text{Toluol}} + p^{\text{m-Xylol}} + p^{\text{synth. Luft}} \\ &= \left(n^{\text{Toluol}} + n^{\text{m-Xylol}} + n^{\text{synth. Luft}} \right) \times \frac{R \times T}{V} \end{aligned} \quad \text{II.}$$

wobei für jeden Partialdruck jeder Teilkomponente das ideale Gasgesetz gilt, z.B.:

$$p^{\text{Toluol}} = n^{\text{Toluol}} \times \frac{R \times T}{V} \quad \text{III.}$$

So ließ sich unter Anwendung des Daltonschen Gesetzes über die bekannten eingesetzten Stoffmengen der Partialdruck der Gase berechnen.

Formuliert man das Daltonsche Gesetz für einzelne Molenbrüche oder Stoffmengenanteile x , gilt:

$$x^{\text{Toluol}} = \frac{n^{\text{Toluol}}}{n_{\text{Gas}}^{\text{gesamt}}} \quad \text{IV.}$$

$$\text{wobei } n_{\text{Gas}}^{\text{gesamt}} = n^{\text{Toluol}} + n^{\text{m-Xylol}} + n^{\text{synth.Luft}} \quad \text{V.}$$

$$\text{und } x^{\text{Toluol}} + x^{\text{m-Xylol}} + x^{\text{synth.Luft}} = 1 \quad \text{VI.}$$

Daraus folgt:

$$\begin{aligned} p^{\text{Toluol}} &= n^{\text{Toluol}} \times \frac{R \times T}{V} \\ &= x^{\text{Toluol}} \times n_{\text{Gas}}^{\text{gesamt}} \times \frac{R \times T}{V} \\ &= x^{\text{Toluol}} \times p^{\text{gesamt}} \end{aligned} \quad \text{VII.}$$

Zusammenfassend gilt: der Partialdruck eines Stoffes ist seinem Molenbruch proportional.

Unter Gleichgewichtsbedingung zwischen Gasphase und Flüssigkeitsphase stimmen die chemischen Potentiale der Stoffe in der Gasphase mit den chemischen Potentialen in der flüssigen Phase überein. Dies bedeutet insbesondere, dass der in der Gasphase eingestellte Partialdruck dem Dampfdruck des in der Flüssigphase gelösten Stoffes entspricht.

Hier gilt in idealen Lösungen das Raoult'sche Gesetz: Der Partialdruck in der Gasphase ist proportional zum Molenbruch des im Flüssigmedium gelösten Stoffes.

Proportionalitätskonstante ist dabei der Partialdruck der reinen Substanz, z.B. $p_{\text{Toluol}}^{\ominus}$.

$$p_{\text{Toluol}}^{\text{Gasphase}} = x_{\text{Toluol}}^{\text{Flüssigmedium}} \times p_{\text{Toluol}}^{\ominus} \quad \text{VIII.}$$

Für Substanzen, die in nur geringer Konzentration gelöst vorliegen, sogenannte ideale verdünnte Lösungen, gilt das daraus abgeleitete Henrysche Gesetz:

$$p_{Toluol}^{Gasphase} = x_{Toluol}^{Flüssigmedium} \times \frac{1}{K_{Henry,Toluol}} \quad \text{IX.}$$

K_{Henry} ist die Henrysche Proportionalitätskonstante des niedrig konzentrierten, gelösten Stoffes.

Für die Konzentration C_{Toluol} des gelösten Stoffes erhält man:

$$\begin{aligned} C_{Toluol}^{Flüssigmedium} &= p_{Toluol}^{Gas} \times K_{Henry,Toluol} \\ &= p_{Toluol}^{Gas} \times K_{Henry,Toluol}^{\ominus} \times \exp\left(\frac{-d \ln K_{Henry,Toluol}}{d\left(\frac{1}{T}\right)} \times \left(\frac{1}{T} - \frac{1}{T^{\ominus}}\right)\right) \end{aligned} \quad \text{X.}$$

K_{Henry}^{\ominus} ist der Wert der tabellierten Henryschen Konstanten unter Standardbedingungen, T^{\ominus} ist die Normaltemperatur von 298,15 K. Auch die Ableitung von $\ln K_{Henry}$ ist tabelliert^{255, 256} (vergleiche Tabelle 6).

Tabelle 6: Henrysche Konstanten und deren Ableitungen für die Löslichkeit in Wasser bei 298,15 K^{255,256}

Substanz	K_{Henry}^{\ominus} [mol/kgxbar]	$d(\ln(K_{Henry}))/d(1/T)$ [K]
Toluol	0,15	4000
m-Xylol	0,13	4200

Unter Einsatz der bekannten Größen, der Werte für den in der Gasexpositionsapparatur vorliegenden Partialdruck (berechnet via Stoffmengenanteile, Gleichung III.) und der Temperatur, sowie der tabellierten Werte der Henryschen Gas-konstanten in Gleichung X. ließen sich schließlich die theoretischen Konzentrationen der im Zellkulturmedium gelösten VOCs errechnen (vergleiche Tabelle 7). Die unter idealen Bedingungen über das Phasengleichgewicht in die Flüssigphase übertretenden VOC-Konzentrationen lagen demnach, in Abhängigkeit von der Temperatur, zwischen $1,32 \cdot 10^{-4}$ mg/l (20°C) und 1,82 mg/l (30°C) für m-Xylol, bzw. zwischen $2,33 \cdot 10^{-4}$ mg/l (20°C) und 2,69 mg/l (30°C) für Toluol.

Tabelle 7: VOC-Konzentrationen [g/l] im Flüssigmedium in Abhängigkeit von der Konzentration in der Gasphase und der Temperatur

°C	3 MAK Toluol	1 MAK Toluol	1/10 MAK Toluol	1 MAK m-Xylol	1/10 MAK m-Xylol	Umwelt Toluol	Umwelt m-Xylol
20	1,66E-03	5,53E-04	5,53E-05	1,10E-03	1,10E-04	2,33E-07	1,32E-07
21	1,74E-03	5,81E-04	5,81E-05	1,16E-03	1,16E-04	2,45E-07	1,39E-07
22	1,83E-03	6,10E-04	6,10E-05	1,22E-03	1,22E-04	2,57E-07	1,47E-07
23	1,92E-03	6,41E-04	6,41E-05	1,28E-03	1,28E-04	2,70E-07	1,54E-07
24	2,02E-03	6,73E-04	6,73E-05	1,35E-03	1,35E-04	2,83E-07	1,62E-07
25	2,12E-03	7,06E-04	7,06E-05	1,42E-03	1,42E-04	2,97E-07	1,71E-07
26	2,22E-03	7,41E-04	7,41E-05	1,49E-03	1,49E-04	3,12E-07	1,80E-07
27	2,33E-03	7,78E-04	7,78E-05	1,57E-03	1,57E-04	3,27E-07	1,89E-07
28	2,45E-03	8,16E-04	8,16E-05	1,65E-03	1,65E-04	3,43E-07	1,99E-07
29	2,57E-03	8,55E-04	8,55E-05	1,73E-03	1,73E-04	3,60E-07	2,09E-07
30	2,69E-03	8,96E-04	8,96E-05	1,82E-03	1,82E-04	3,77E-07	2,19E-07

Aus einer Stammlösung von 134,5 mg/l Toluol und 91,0 mg/l m-Xylol wurden Kalibrierlösungen für die entsprechenden Konzentrationsbereiche hergestellt. Für die Stammlösung wurden bei einer Dichte für Toluol von 0,867 kg/l 15,5 µl Toluol sowie 10,5 µl m-Xylol (Dichte m-Xylol: 0,864 kg/l) ad 100 ml Gesamtvolumen benötigt. Durch kräftiges Schütteln über 3 x 40 min bei Raumtemperatur wurde versucht, eine homogene Durchmischung der Lösung zu erreichen. Die Stammlösung wurde in einem mit Vitonstopfen verschlossenen Messkolben angesetzt, die daraus verdünnten Kalibrierlösungen direkt in mit Teflonsepten gasdicht verschlossenen Probenfläschern. Die Dosierung der Flüssigsubstanzen erfolgte mit Präzisionspritzen für 25, 100, 250, 1000 und 2500 µl (*Hamilton*) unter gleichzeitiger gravimetrischer Kontrolle auf der Präzisionswaage. Die realen Konzentrationen wurden aus den gravimetrischen Daten berechnet.

4.8 Statistische Methoden

Im Rahmen der Qualitätskontrolle durchgeführter ELISA-Techniken wurden Nachweis- ($\alpha = 0,01$; $\beta = 0,5$), Erfassungs- ($\alpha = \beta = 0,01$) und Bestimmungsgrenzen ($\alpha = 0,01$; $k = 4$) nach dem Kalibrierkurvenverfahren gemäß der DIN-Norm 32645 berechnet^{257,258} (vergleiche 4.2.1). Die statistische Streuung einer Serie von Mehrfachwerten wurde stets als zusammengefasste Standardabweichung (σ_{pooled} , wobei gilt: $\sigma_{\text{pooled}}^2 = \text{mean square error}$, mittlere Varianz) oder mittlere relative Standardabweichung (σ [%], mittlerer Variationskoeffizient [%]) angegeben²⁵⁹. Mittelwerte wurden

stets mit einem Vertrauensbereich von $\pm 1\sigma$ Standardabweichung der Stichprobe angegeben. Das 90 %-Konfidenzintervall für Mediane wurde für alle $n >$ bzw. $= 6$ mit dem exakten, konservativen Binomialtest zu $p_0 = 0,5$ mit Testniveau $\alpha = 0,10$ berechnet; für Mediane aus $n = 4$ bzw. $n = 5$ wurden ungefähre, nicht konservative 90 %-Konfidenzintervalle (Konfidenzniveau = 87,5 %) angegeben^{260,261}. Die statistischen Auswertungen der in der Primärstudie erhobenen Daten wurden in Zusammenarbeit mit der Arbeitsgruppe Biostatistik, Institut für Biomathematik und Biometrie der GSF, Neuherberg, durchgeführt. Folgende Software wurde verwendet: SAS 6.12, S-Plus 2000, Systat 9.0 für MS Windows. Zur statistischen Auswertung ohne Verteilungsannahme der spontansezernierten Zytokinkonzentrationen wurde der Kruskal-Wallis Rangsummentest als nonparametrische χ^2 Statistik²⁶² in Form einer Einweg-Varianzanalyse angewendet. Zur Untersuchung von expositionsinduzierten Effekten wurden erstens die Zytokinkonzentrationsverhältnisse (nach/vor Exposition) quantitativer Zytokinkonzentrationen in mehrfaktoriellen Varianzanalysen^{258, 263}, zweitens qualitative, binäre Daten veränderter Zytokinkonzentrationsverhältnisse in logistischen Regressionsanalysen²⁵⁸ untersucht. Wahrscheinlichkeiten von $p < 0,05$ wurden als signifikant die Nullhypothese widerlegend bewertet. Basierend auf der festgestellten Variabilität wurden unter Voraussetzung einer Normalverteilung und einer „power“ von 80 % ($\alpha = 0,05$; $\beta = 0,2$) Fallzahlabeschätzungen zur Unterscheidung von Fallgruppen anhand der Merkmale GM-CSF, IL-1 α und IL-6 berechnet (Software: Mathematika 3.0).

5 Ergebnisse

5.1 Methodenentwicklungen zur Isolierung und Kultivierung humaner Primärzellen der Haut

Der biologisch experimentelle Teil der vorliegenden Arbeit basierte auf Primärzellkulturen humaner Keratinozyten und Fibroblasten. Sie dienten als submerse Mono- und Kokulturen sowohl der Methodenentwicklung zum Aufbau luftexponierter, dreidimensionaler Organoidkulturen, als auch als Modellsystem für *in vitro* Expositionen gegenüber umweltrelevanten Schadstoffen. Grundlegende Aufgabe war daher zunächst die Etablierung optimaler Zellisolierungs- und Kultivierungsbedingungen zur Gewinnung von homogenen, proliferierenden und sterilen Reinkulturen aus normalgesunder Haut und aus atopischem Ekzem.

Die folgenden Methoden wurden teils auf der Basis in der Literatur beschriebener Methoden (als Referenzen angegeben) angepasst und optimiert, teils neu entwickelt, evaluiert und etabliert (vergleiche auch Kapitel 4.1 Zellkulturtechniken):

- ◆ Antibiotikabehandlung der Gewebeproben
- ◆ Methodenoptimierung der enzymatischen Zellisolierung
- ◆ Selektive Reinkulturen durch optimierte Nährmedien und Biomatrices
- ◆ Proliferations- und Differenzierungsverhalten standardisierter, serieller Primärzellkulturen im submersen System

5.1.1 Antibiotikabehandlung der Gewebeproben

Aufgrund der natürlichen Besiedelung der Haut durch Mikroorganismen war vor allem die Sterilisierung der Proben unter zugleich nicht zelltoxischen Bedingungen von großer Wichtigkeit. Eine ausschließlich antibiotische Behandlung mit 100 U/ml Penicillin und 100 µg/ml Streptomycin gegen grampositive und gramnegative Bakterien, wie in der Zellkultur üblich^{264,265}, erwies sich als nicht ausreichend gegen das Spektrum humaner Hautkeime. Die isolierten Monokulturen zeigten unter 37°C-Kulturbedingungen exponentiell wachsende mikrobielle Kontaminationen. Eine zusätzliche Inkubation der Hautproben mit 70 % Ethanol²⁶⁶ für wenige Minuten in Kombination mit der Streptomycin/Penicillin-Behandlung zeigte sich, die Sterilität betreffend,

als wirkungsvoll. Gleichzeitig war jedoch der Zellverlust, insbesondere bei Proben kleineren Durchmessers, durch stark zytotoxische Effekte des Ethanols in den äußeren Zellschichten immens. Die Ausbeute an vitalen, proliferationsfähigen Zellen war um bis zu 60 % reduziert. Daraus resultierten aufgrund der geringen Zelldichte vielfach vereinzelt adhärente, aber nicht proliferierende Zellen. Nach einem Methodenprotokoll des *Centre Charles Zviak, L'ORÉAL, Clichy*²⁶⁷, wurde die Antibiotika-Behandlung um das Antimycotikum Amphotericin B, wirksam gegen Pilze und Hefen, sowie das Antibiotikum Gentamicin mit Wirkungsspektrum gegen grampositive, gramnegative Bakterien und Mycoplasmen erweitert. Gleichzeitig wurde zudem mit hohen, zelltoxischen und proliferationshemmenden Konzentrationen von 400 µg/ml bzw. 200 µg/ml Streptomycin und 400 U/ml bzw. 200 U/ml Penicillin für nur kurze Zeitintervalle von 20 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert²⁶⁷. Diese kurzen Zeitintervalle hochkonzentrierter Inkubation reduzierten bei verbesserter antimikrobieller Wirkung die zytotoxischen und proliferationsinhibierenden Antibiotikaeffekte. Außerdem entsprachen sie mit 20 Minuten Dauer dem Generationszyklus der meisten Mikroorganismen, so dass durch das Erneuern der Lösung nicht nur tote Mikroorganismen und ihre zytotoxischen Stoffwechselprodukte entfernt wurden, sondern zusätzlich ein exponentielles Wachstum möglicher resistenter Stämme unterbunden wurde. Drei aufeinanderfolgende Zyklen von je 20 Minuten kombinierter Antibiotika-Antimycotika-Inkubation unterschiedlicher Konzentrationen und relativer Zusammensetzung (vergl. Kapitel 3.2 und 4.1.1) führten letztlich zu sterilen, vitalen, proliferierenden Zellkulturen aus normalgesunder Haut.

Hautproben von Probanden mit atopischem Ekzem, insbesondere Proben aus läsionaler Haut, bedurften zusätzlicher Behandlung gegen die häufige Infektion mit *Staphylococcus aureus* (*S. aureus*). Eine zweimal täglich Behandlung der Probeentnahmestelle mit 3,0 % Gentianaviolettlösung für 4 Tage vor der Exzision²⁶⁸ reduzierte zwar die Kontamination mit *S. aureus*, konnte sie aber nicht vollständig unterbinden. Im Rahmen dieser Arbeit wurde daher eine neue, wirksame, nicht zelltoxische, spezifisch gegen *Staphylococcus aureus* gerichtete Antibiotikabehandlung entwickelt und etabliert: Im Anschluss an die oben beschriebene Antibiotika-Antimycotika-Behandlung erfolgte schließlich eine ebenfalls 20-minütige Inkubation mit 1 % Flucloxacillin-MEM-Lösung. Dieser Schritt wurde so häufig wiederholt, bis mikroskopisch keine Kontamination mehr sichtbar war. Traten nach der enzymatischen Zellisolierung in Einzelfällen dennoch Kontaminationen mit *S. aureus* in den Reinkulturen auf, konn-

ten auch diese erfolgreich behandelt werden. Die Entwicklung und Realisierung dieser in der *in vitro* Zellkultur erstmals angewendeten Methode wird im Kapitel 5.2 ausführlich dargestellt.

5.1.2 Methodenoptimierung der enzymatischen Zellisolierung

Zur enzymatischen Trennung von Dermis und Epidermis werden in der Literatur verschiedene Methoden beschrieben^{264,266,269-273}. Dabei werden insbesondere die Konzentrationen von Thermolysin^{270,273,273}, Dispase^{271,273,274} und/oder Trypsin^{272,273}, die Behandlungsdauer und -temperatur variiert. Im Rahmen der vorliegenden Arbeit wurde eine optimale, nicht zytotoxische dermal-epidermale Trennung der Hautproben durch 2 U/ml konzentrierte Dispase erreicht. Im Gegensatz zu Trypsin spaltet Dispase, wie Thermolysin, selektiv die interzellulären Verbindungen der Basallamina, ohne Zellmembranen anzugreifen und führte so zu einer zellschonenderen Trennung von Dermis und Epidermis. Der enzymatische Verdau wurde sowohl für eine Dauer von 24 h bei 4°C^{264,266}, als auch für 5-6 h bei Raumtemperatur sowie für 1-2 h bei 37°C²⁶⁴ durchgeführt. Letztere Behandlung erwies sich als effektiv und bezüglich der in der anschließenden Fibroblastenkultur benötigten Dermis zugleich als schonendste Behandlung. Längere Inkubationen mit Dispase führten zur Dissoziation der Fibroblasten und stärkerer Zerfaserung des dermalen Gewebes mit daraus folgender inhibierter Fibroblastenmigration aus dem Gewebe. Die bis zur vollständigen dermal-epidermalen Trennung nötige Inkubationsdauer richtete sich zum einen nach der Größe, zum anderen nach der von der *in vivo*-Lokalisation abhängigen Beschaffenheit der Hautprobe. Je kleiner die Probe, aber vor allem je dünner die Dermis, umso schneller konnte die intakte Epidermis mit Pinzetten vorsichtig von der Dermis abgezogen werden. Eine optimale, gewebeschonende Trennung erfolgte daher bei Spalthautpräparaten. Durch wiederholtes Abstreifen noch auf der Dermis lose haftender Basalkeratinozyten mit der Rückseite einer gebogenen Pinzette konnte die Gesamtausbeute proliferationsfähiger Keratinozyten um 15-20 % erhöht werden. Die Isolierung der Keratinozyten aus der Epidermis erfolgte in einem zweiten enzymatischen Schritt mittels Trypsin. Es wurden unterschiedliche Konzentrationen reinen Trypsins (0,1 %, 0,05 % bzw. 0,025 %)^{273,264,267} sowie eine Trypsin-EDTA-Lösung (0,05 % Trypsin/0,02 % EDTA)^{265,266,267,273,273} getestet. Die Inkubationen erfolgten bei Raumtemperatur unter mikroskopischer Kontrolle. Nach 5-7 min wurde die Dissozia-

tion der Zellen durch mechanische Scherkräfte mittels Pipettierens²⁶⁴ forciert. Reines Trypsin zeigte, unabhängig von der Konzentration, im Vergleich zu Trypsin-EDTA eine deutlich geringere enzymatische Aktivität. Die daher benötigte, zwei- bis dreimal längere Inkubationsdauer führte zu verstärkter Zytotoxizität (ca. 50-65 %). Mittels Trypsin/EDTA konnten mit der geschilderten Methode pro 4,0 mm-Biopsie bis zu 1×10^6 epidermale Zellen mit einer Vitalität von 70-75 % isoliert werden. Abhängig vom Anteil der proliferationsfähigen Keratinozyten in der Mischkultur aus Keratinozyten, Melanozyten und Langerhanszellen, wurde die für eine proliferierende Zellkultur vorausgesetzte, minimale Zellaussaatdichte von $6,25 \cdot 10^4$ - $1,25 \cdot 10^5/\text{cm}^2$ in nur zwei Drittel der Isolierungskulturen erreicht. Um bei gleichbleibender oder geringerer Zytotoxizität eine höhere Keratinozytenausbeute zu erreichen, wurde schließlich in Anlehnung an bekannte Protokolle^{264,265} eine neue, sukzessive Vereinzelung der epidermalen Keratinozyten mittels zehnfach konzentrierter Trypsin/EDTA-Lösung (0,5 % Trypsin/ 0,2 % EDTA) auf dem Magnetrührer etabliert. Kleine, sterile Magnetstäbe sorgten für eine ständige Durchmischung und zusätzliche mechanische Scherkräfte. Nach einer Inkubationsdauer von nur 4-5 min wurden die in großer Menge gelösten Keratinozyten in dem zweifachen Volumen eines mit 20 % FKS supplementierten Zellkulturmediums aufgenommen. Die enzymatische Wirkung des Trypsins wird durch das FKS inaktiviert, so dass bereits gelöste, isolierte Keratinozyten nun nicht länger der zytotoxischen Wirkung des aktiven Trypsins ausgesetzt wurden. Die verbleibende Epidermis wurde erneut mit frischer Enzymlösung inkubiert und so sukzessiv alle proliferationsfähigen Keratinozyten isoliert.

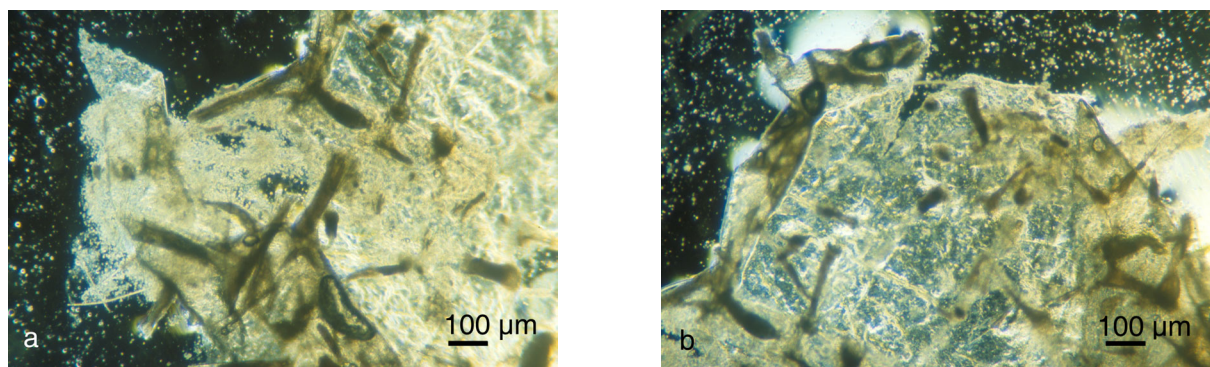


Abbildung 2: Enzymatische Keratinozytenisolierung aus humaner Epidermis.
(a) komplette Epidermis, (b) keratinozytenfreies Stratum corneum

Abbildung 2 zeigt eine Epidermis zu Beginn (a) und im Verlauf (b) der Keratinozytenisolierung. In Abbildung 2 b sind bereits einige zellfreie Stellen unterhalb des verbleibenden Stratum corneums zu erkennen. Mit dieser neuen, sukzessiven, enzymatischen

tisch/chemisch-mechanischen Kombinationsmethode (vergleiche 4.1.1) konnte bei gleichbleibender Vitalität von 70-75 % die Anzahl isolierter, epidermaler Zellen auf bis zu $3-4 \cdot 10^6$ Zellen pro 4,0 mm-Biopsie erhöht werden.

5.1.3 Selektive Reinkulturen durch optimierte Nährmedien und Biomatrices

Unter Einsatz zellspezifischer, gezielt supplementierter Zellkulturmedien wurden selektive Reinkulturen primärer Fibroblasten und Keratinozyten gezüchtet. Die zwei wesentlichen, in der Literatur vertretenen Fibroblastenisolierungsmethoden sind einerseits die enzymatische Zellisolierung aus der Dermis mittels Trypsin, andererseits die Migration aus Dermisexplantatkulturen^{269,274}. Im Rahmen der vorliegenden Arbeit wurde die zweite Methode eingesetzt: Im Anschluss an die Dispasebehandlung wurde die Dermis kurz in FKS-haltigem Medium gewaschen, in Zellkulturflaschen trocken aufgesetzt und dann für 24 h unter Standardbedingungen inkubiert. Die adhärenente Dermis wurde vorsichtig mit Medium überspült. Nach 6-10 Tagen Inkubation migrierten Fibroblasten aus der Dermis und bildeten konfluente „monolayer“ (vergleiche Abbildung 3). Die effektivste Migration und Proliferation humaner, dermaler Fibroblasten wurde dabei mit 20 % FKS supplementiertem DMEM erzielt. Aufgrund der effizienten Fibroblastenproliferation wurden Mastzellen und andere aus der Dermis migrierte Zellen von den Fibroblasten überwachsen und verdrängt. Aus 90 % aller Dermiskulturen konnten mit dieser Methode (vergleiche 4.1.1) humane Fibroblastenreinkulturen gewonnen werden. Die Dermis wurde nach dem Passagieren der Fibroblasten erneut aufgesetzt und weitere Fibroblastenkulturen gewonnen. (Zur selektiven Mastzellkultur vergleiche Anhang, Kapitel A 1).

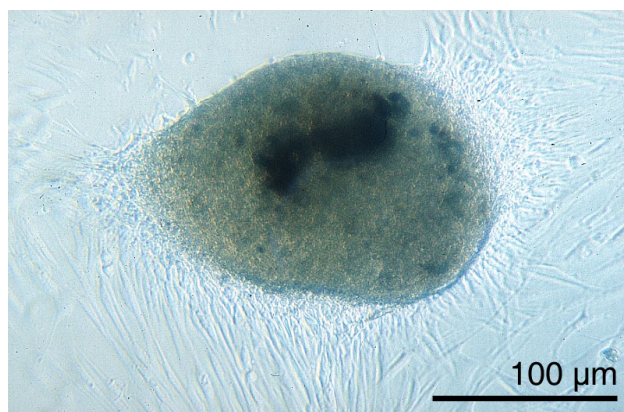


Abbildung 3: Fibroblastendermiskultur

Auch in der epidermalen Zellsuspension wurde die Proliferation der Keratinozyten mit keratinozytenspezifischen Nährmedien selektiv unterstützt. Grundvoraussetzung einer proliferativen Keratinozytenkultur waren zum einen die Adhärenz innerhalb von 24 h nach der Aussaat, zum anderen das „spreading“ der Zellen auf ihrer Wachstumsunterlage. Abhängig von der Lokalisation der Hautprobe waren nur etwa 1-10 % der isolierten Zellsuspension generative, proliferationsfähige Keratinozyten. Die übrigen, nichtadhärenten vitalen und toten Zellen wurden mit dem ersten Mediumwechsel nach 24 h Inkubation in absoluter Ruhe entfernt. Erfolgte dieser Mediumwechsel später, kam es zur Apoptose der nicht adhärenen und in deren Folge der bereits adhärenen Zellen. In hochsupplementierten, serumfreien (K-SFM) und serumhaltigen Keratinozytenmedien wie FAD₂/Greens und F7-Proliferationsmedium erlangten die Keratinozyten zwar Adhärenz, es erfolgte jedoch kein „spreading“. Die Zellen verblieben über 2-4 Wochen unverändert adhären und vital, aber abgekugelt rund und nicht proliferativ. In der Literatur beschriebene Medienvariationen wie die Zugabe von Ascorbinsäure^{124,269}, der Start der Kultur mit FKS-freiem FAD₂/Greens oder mit FAD₂/Greens bzw. F7 ohne epidermalen Wachstumsfaktor bis zur ersten Passage der Keratinozyten²⁶⁴ zeigten keine proliferationsfördernde Wirkung. Erst der Einsatz von serumfreiem K-SFM mit niedrig supplementiertem, epidermalen Wachstumsfaktor und Rinderhypophysenextrakt²⁶⁷ führte schließlich zu proliferierenden Keratinozytenkulturen sowohl in Reinkultur, wie auch in Kokultur mit arretierten Fibroblasten (siehe unten). Als entscheidender Faktor für das „spreading“ und die Proliferation stellte sich die niedrige Calciumkonzentration des Zellkulturmediums von kleiner 0,1 mmol Ca²⁺ heraus. Unter diesen Bedingungen (vergleiche 4.1.1) wurde schließlich die beste Adhärenzrate mit anschließendem „spreading“ sowie verstärkte Proliferation bei zugleich inhibierter Differenzierung erreicht. Zudem zeigten sich diese Kultureigenschaften auch nach der Cryokonservierung unverändert. Auf diese Weise konnten schließlich aus 90 % aller Hautproben primäre Keratinozytenreinkulturen gewonnen werden. Abbildung 4 zeigt die typischen Stadien früher Keratinozytenprimärkulturen der Passage 0 bis 1: Kugelförmige, aber adhärenente, vitale Zellen zeigten nach einigen Tagen ein erstes „spreading“ auf dem Zellkulturflaschenboden (nach 2-3 Tagen circa 3-7 Zellen pro 100fach-Vergrößerungsfeld). Aus diesen Zellen bildeten sich Proliferationsinseln (circa 3 pro 100fach-Vergrößerungsfeld nach 5-7 Tagen), die zur Bildung eines Keratinozyten-„monolayer“ führten.

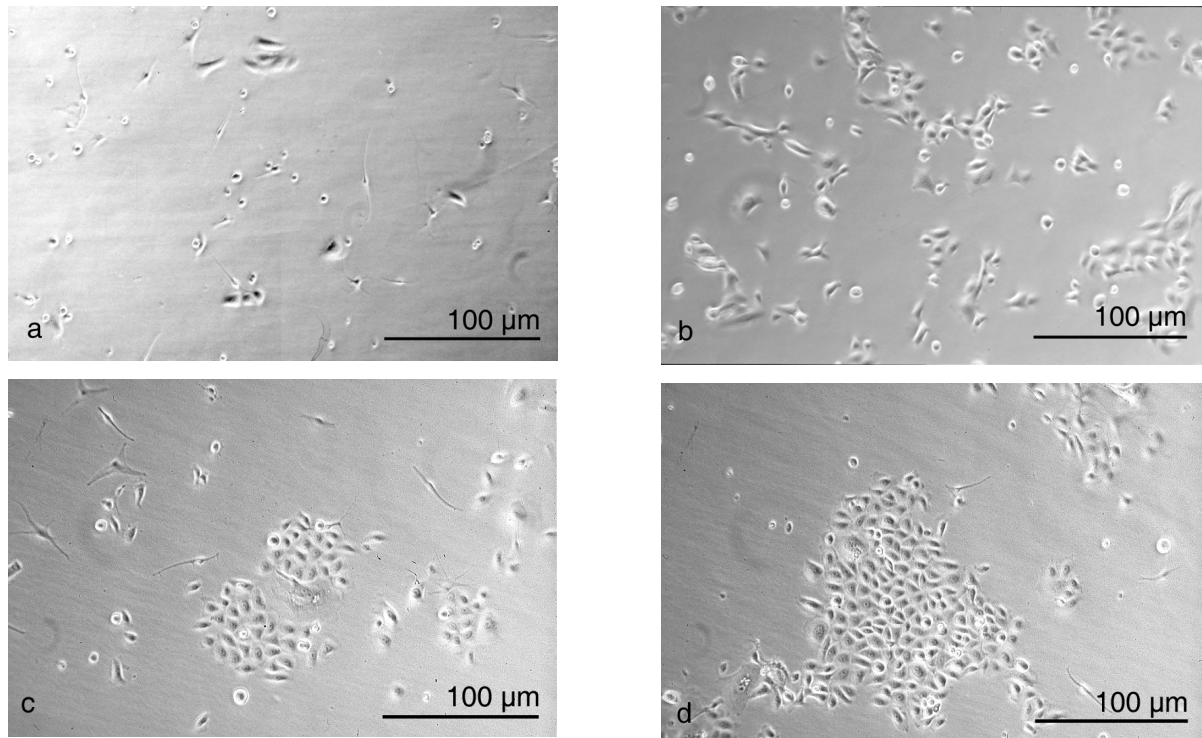


Abbildung 4: Keratinozytenisolationenkulturen der Passagen 0 bis 1
(a) 2-3, (b, c) 5-7 bzw. (d) 9-11 Tage nach Aussaat

Immunzytochemisch zeigten diese primären Keratinozyten mit Expression der Zytokeratine 5 und 14 das typische Zytokeratinmuster basaler, proliferationsfähiger Keratinozyten, während die nach 24 h nicht adhärenen Zellen im Kulturüberstand die Zytokeratine 1 und 10 differenzierter Keratinozyten exprimierten. Die proliferierenden Primärkulturen zeigten außerdem für *in vitro* Kulturen typische, hyperproliferative Eigenschaften, nachgewiesen anhand von Zytokeratin 6-Expression (vergleiche Abbildung 5).

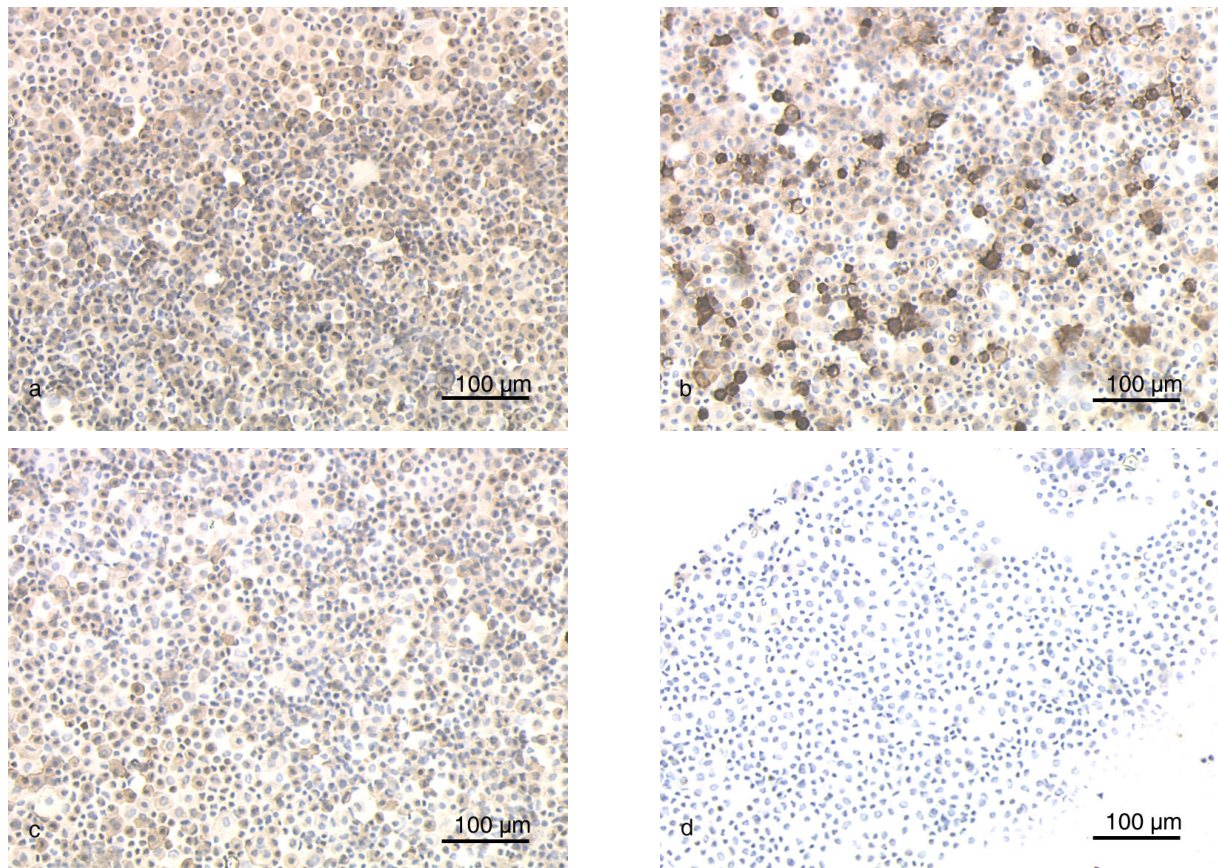


Abbildung 5: Nachweis der Zytokeratinexpression in „cytospin“-Präparaten von Passage 0-Primärkeratinozyten: (a) Zytokeratin 14, (b) Zytokeratin 6 in adhären, proliferierenden Zellen; (c) Zytokeratin 10 in nicht adhären Zellen; (d) PBS-Sekundärantikörper-Negativkontrolle

Ein weiteres serumfreies Keratinozytenmedium mit ebenfalls niedriger Calciumkonzentration von $0,15 \text{ mmol Ca}^{2+}$ (KGM) zeigte annähernd vergleichbare Kulturraten, führte aber bedeutend schneller zu einer ausgeprägten Differenzierung der Keratinozyten (ausführlich dargestellt im folgenden Kapitel 5.1.4 Proliferation und Differenzierungsverhalten seriell kultivierter Primärkeratinozyten).

Parallel zu den Experimenten mit unterschiedlichen Nährmedien und Supplementen wurde, um eine bessere Adhärenz zu erreichen, die extrazelluläre Matrix *in vitro* simuliert. Zu 50-70 % subkonfluente „monolayer“ ($4 \cdot 10^3/\text{cm}^2$) aus Mitomycin C-arretierten, murinen 3T3-Fibroblasten^{265,275,276} bzw. humanen, autologen Primärfibroblasten²⁷⁷ dienen dabei als Adhärenz- und Wachstumsgrundlage für die Keratinozyten ($1,25 \cdot 10^4$ - $2,5 \cdot 10^4/\text{cm}^2$)²⁶⁴. Aus der Inkubation der Fibroblasten mit Mitomycin C^{264,277} (vergleiche 4.1.4) resultierten vitale, aber proliferationsinhibierte Zellen, so dass eine

interzelluläre Kommunikation in der Kokultur möglich war, die Fibroblasten die langsamer proliferierenden Keratinozyten aber nicht überwachsen konnten²⁷⁵. In FAD₂/Greens Medium gelang es, erste primäre Keratinozyten in Fibroblasten-Kokulturen zu kultivieren. Doch bereits leichtes Bewegen der Zellkulturgefäße führte zu partiellem Adhärenzverlust und anschließendem Zelltod. Insbesondere passagierte Zellen oder in flüssigem Stickstoff zwischengelagerte Kokulturen wiesen bei neuer Aussaat mangelnde Adhärenz und Proliferation auf. Erst der Einsatz von niedrig supplementiertem, serumfreien K-SFM führte schließlich, gleichermaßen in Reinkultur (wie oben geschildert) wie auch in Kokultur mit arretierten Fibroblasten, zu proliferierenden Keratinozytenkulturen. Die Aussaat-effizienz von Subkulturen betrug zunächst 50 % bis 60 %, unter standardisierten Isolierungs- und Kulturbedingungen schließlich zwischen 80 % und 90 %.

Außerdem wurde die Adhärenz von Keratinozyten auf diversen Biomatrices getestet. Reinkulturen primärer Keratinozyten wurden auf mit Kollagen I, Kollagen IV, Fibronectin, Laminin und Matrigel[®] beschichteten Membranen kultiviert (vergleiche 4.1.3). Mit FAD₂/Green kultivierte, primäre Keratinozyten erreichten gleichermaßen auf allen beschichteten Matrices eine höhere Adhärenz und Proliferationsrate im Vergleich zu unbeschichteten Membranen und Kunststoffkulturschalen. In Kulturen mit K-SFM konnten jedoch, wie zwischen Keratinozytenreinkulturen und Kokulturen mit arretierten Fibroblasten, auch zwischen den unterschiedlich beschichteten und unbeschichteten Membranen keine medienunabhängigen Unterschiede in Adhärenz und Proliferation nachgewiesen werden.

5.1.4 Proliferations- und Differenzierungsverhalten standardisierter, serieller Primärzellkulturen im submersen System

Im Anschluss an die Isolierungskultur (Passage 0) wurden die Primärzellen seriell kultiviert. Die Subkultivierung erfolgte bei 70-80 % Subkonfluenz und mindestens fünf Mitosestadien im Mikroskopsichtfeld bei hundertfacher Vergrößerung. Die Vitalität subkultivierter Keratinozyten der Passagen 0 bis 4, ermittelt durch drei voneinander unabhängige Testverfahren, Trypanblauausschlussfärbung (4.1.10), Nachweis der Mitochondrien- (MTT-Vitalitätstest, 4.2.3) und Lactatdehydrogenaseaktivität (LDH-Toxizitätstest, 4.2.2), betrug zwischen 90 % und 95 %. Die Sterilität und Mycoplasmenfreiheit der Kulturen wurde in antibiotikafreien Parallelkulturansätzen bestätigt (vergleiche 4.1.12). Die Keratinozytenpassagen 0 bis 4 zeigten eine Aussaat-effizienz von 80 % bis 90 %. Abbildung 6 stellt das Proliferationsverhalten in K-SFM seriell kultivierter Primärkeratinozyten dar. Die ersten 24 h der Kultur beinhalten die Phase der zellulären Adhärenz und beginnenden Proliferation. Während der darauf folgenden „log-phase“ exponentiellen Wachstums wiesen die Passagen 1 und 2 eine Verdopplungszeit von ca. 24 h, die Passagen 3 und 4 von ca. 26 h auf. Die Keratinozyten dieser Passagen zeigten unveränderte Morphologie und Vitalität.

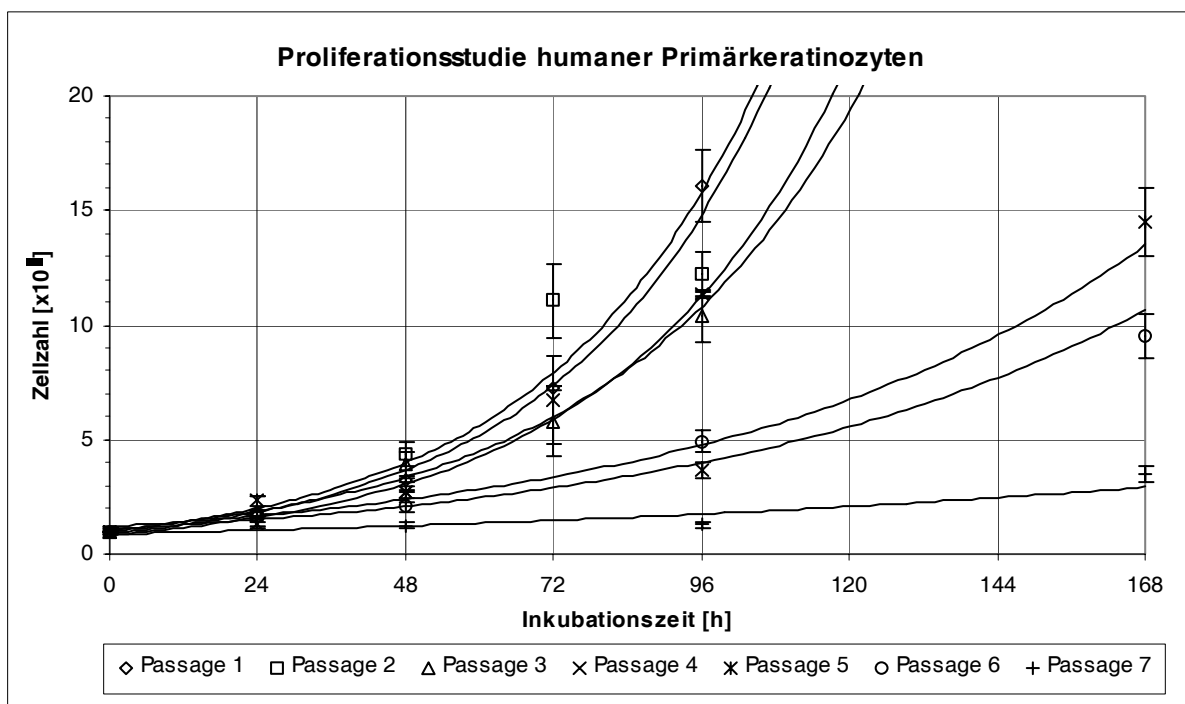


Abbildung 6: Proliferationsverhalten seriell kultivierter Primärkeratinozyten (Datentabelle siehe Anhang A3.1)

Die Passagen 5 und 6 wiesen hingegen neben deutlich verminderter Proliferationsaktivität auch morphologische Veränderungen auf, die auf zunehmende Differenzierung und Zellalterung zurückzuführen waren (vergleiche Abbildung 7 a-c). Während die Keratinozyten der Passagen 0 bis 4 vor allem Zytokeratine 5 und 14 generativer Proliferationszellen exprimierten, dominierten in den Passagen 5 und höher die differenzierungsassoziierten Zytokeratine 1 und 10 (vergleiche Abbildung 8). Gleichzeitig sank die Vitalität auf zunächst ca. 75 % (Passage 5), später unter 60 % (Passage 6). In den Passagen 7 und höher dominierten Keratinozyten deutlich nekrotischen sowie apoptotischen Charakters (vergleiche Abbildung 7 d-f). Fibroblastenkulturen zeigten dahingegen mit einer Verdopplungszeit von ca. 36 h über mindestens 10 Passagen stabile Proliferationseigenschaften.

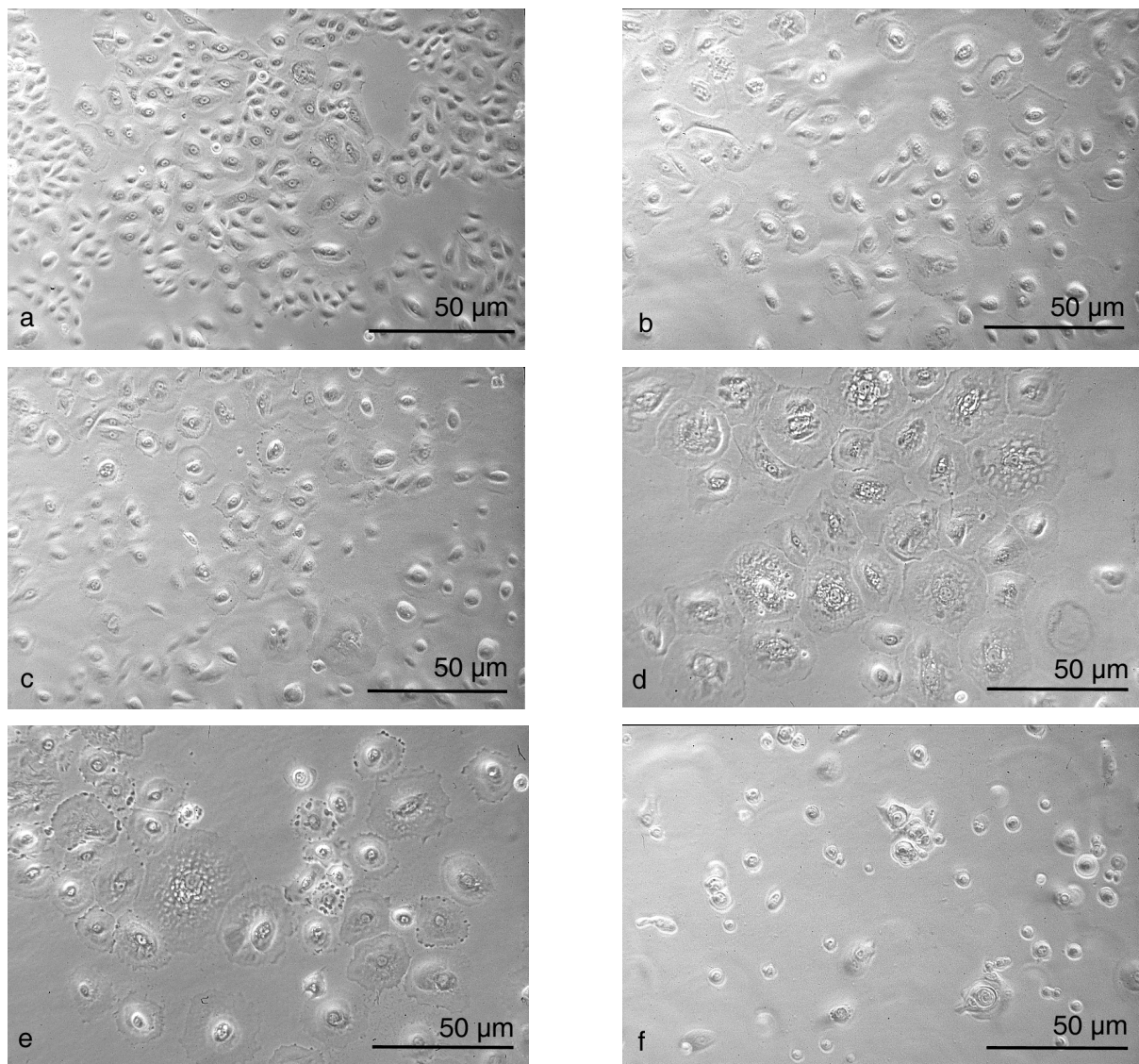


Abbildung 7: Morphologie hoher Passagen seriell kultivierter Primärkeratinozyten (a, b) Passage 5, (c) Passage 6, (d, e) Passage 7-8, (f) Passage 8-9

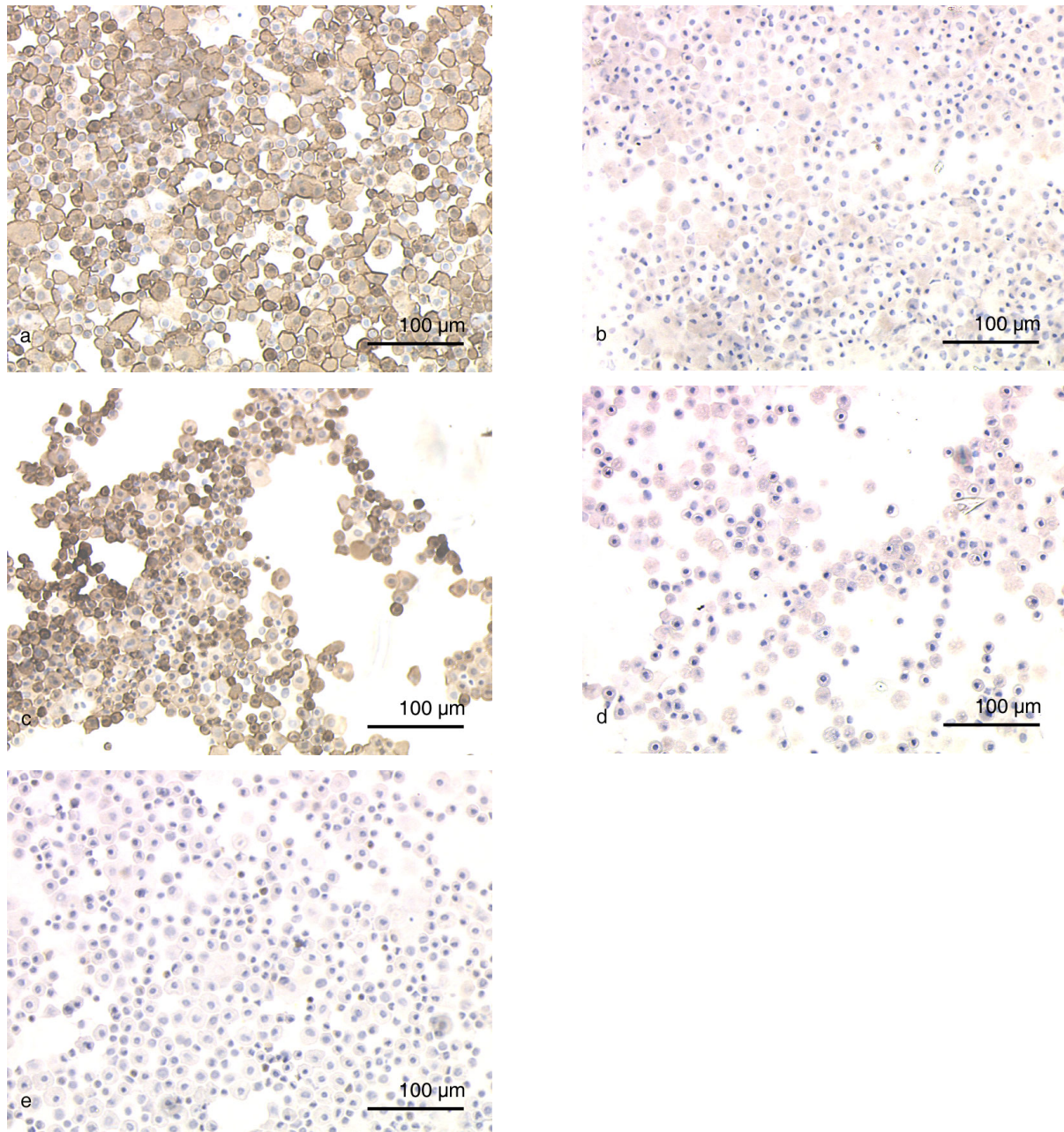


Abbildung 8: Immunzytochemischer Nachweis der Zytokeratinexpression in „cytopsin“-Präparaten seriell kultivierter, humaner Primärkeratinozyten: (a) Zytokeratin 14 in Keratinozytenpassage 2, (b) Zytokeratin 10 in Keratinozytenpassage 2, (c) Zytokeratin 10 in Keratinozytenpassage 6, (d) Zytokeratin 14 in Keratinozytenpassage 6, (e) PBS-Sekundärantikörper-Negativkontrolle

Das Proliferations- und Differenzierungsverhalten, respektive die Aussaat-effizienz und Vitalität standardisierter Isolierungs- und Subkulturen erwiesen sich als abhängig vom Alter und unabhängig vom Geschlecht des Probanden. Mit wenigen Ausnahmen zeigten die Zellen jüngerer Probanden eine höhere Proliferationsaktivität und Vitalität. Die Aussaat-effizienz und Vitalität in K-SFM standardisierter Isolierungs- und Subkulturen aus läSIONALER wie auch nicht läSIONALER Haut von Probanden mit

atopischem Ekzem zeigten nach Einführung der Flucloxacillinbehandlung (vergleiche 5.2) keine Unterschiede zu Zellkulturen pathologisch unauffälliger Haut. Die Proliferationsraten bis einschließlich Passage 4 waren ebenfalls den interindividuellen Streuungen der Zellkulturen von gesunden Probanden vergleichbar. Lediglich die Differenzierung und Zellalterung setzte wenig früher, aber deutlich stärker ein: In Passage 5 zeigten ad hoc nahezu alle Keratinozyten atopischer Probanden ein flächiges „spreading“, in Passage 6 waren nur mehr nekrotische und apoptotische Zellen zu verzeichnen. Die Lokalisation der Hautproben aus läSIONalem oder nicht läSIONalem atopischen Ekzem zeigte keinen Einfluss auf die Proliferations- und Differenzierungseigenschaften von Fibroblasten und Keratinozyten.

Stärker supplementierte Zellkulturmedien wie KGM oder F3 induzierten gezielt eine Differenzierung der Keratinozyten in früheren Passagen. Bereits in Passage 2 zeigte sich morphologisch ein starkes, flächiges „spreading“ der Keratinozyten mit breitem Plasmasaum und unregelmäßigem Rand, vergleichbar dem Erscheinungsbild von in K-SFM kultivierten Keratinozyten der Passage 5 bis 6 (vergleiche Abbildung 7 (a) - (c) und Abbildung 8 (c), (d)). Trotz submerser Kulturbedingungen folgte, ausgehend vom Zentrum der Proliferationsinseln, ein mehrschichtiges Wachstum mit zunehmender Verhornung und Abflachung der oberen Zellschichten (vergleiche Abbildung 9 a-d). Der entstehende Zellverband ließ sich durch Trypsin/EDTA nur schwer vom Kulturflaschenboden lösen und nicht dissoziieren. Ein Passagieren dieser Zellen war somit nicht möglich. Die Kulturen konnten jedoch unter regelmäßigem Medienwechsel dauerhaft über 3-4 Wochen in KGM bzw. F3 kultiviert werden. Nach 7-10 Tagen Kultivierung begannen die jeweils oberen Zellschichten sich abzulösen: Abbildung 9 e, f zeigt diese nahezu zellfreien, keratinisierten, Stratum corneum-ähnlichen Strati, die frei im Medium schwimmen. Die beobachtete Morphologie der Zelldifferenzierung wurde unterstützt durch immunzytochemische Zytokeratinnachweise: Während im „monolayer“ bzw. in den unteren Zellstrati ausschließlich die Zytokeratine 5 und 14 nachweisbar waren, dominierten in den oberen und abgelösten Zellschichten die Keratine 1 und 10 (nicht gezeigt).

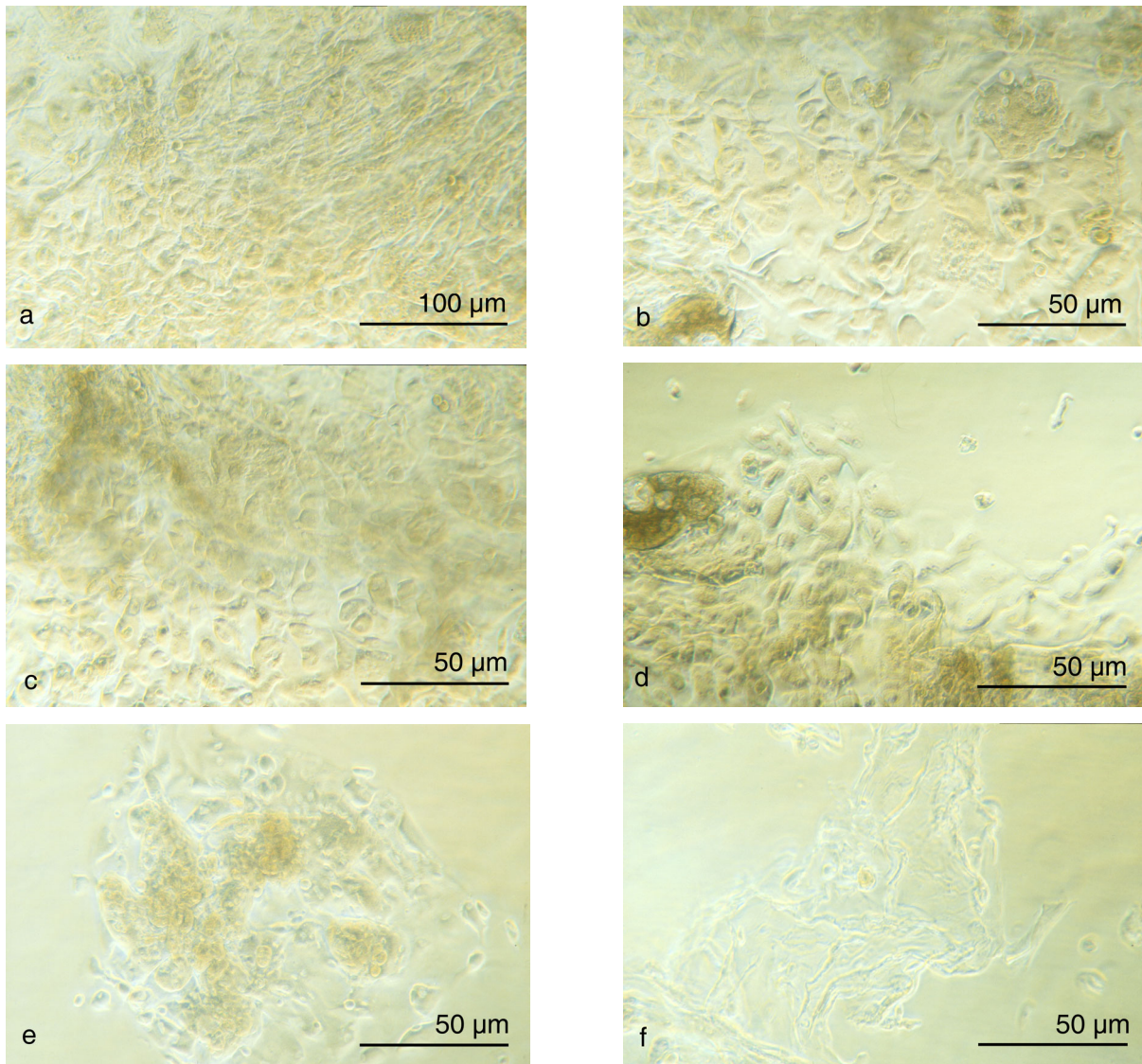


Abbildung 9: Differenzierung submerser Keratinozyten in „Keratinocyte Growth Medium“ (KGM); (a) - (e) mehrschichtiges Wachstum mit zunehmender Verhornung und Abflachung der oberen Zellschichten ausgehend vom Zentrum der Proliferationsinseln; (f) Desquamation der oberen nucleus-freien, keratinisierten Strati

5.2 Entwicklung einer spezifischen Antibiotikabehandlung gegen *Staphylococcus aureus* in der Zellkultur – Flucloxacillinstudie

70 % aller Hautproben von Probanden mit atopischem Ekzem wiesen Kontaminationen mit grampositiven, antibiotikaresistenten *Staphylococcus aureus*-Kolonien auf, gegen die die üblicherweise in der Zellkultur eingesetzten Antibiotika wie Penicillin, Streptomycin und Gentamicin keine Wirkung zeigten. Als Alternative wurde deshalb im Rahmen dieser Arbeit erstmals der in der systemischen *in vivo*-Therapie übliche Einsatz von penicillinaseresistenten Isoaxylpenicillinen wie Flucloxacillin^{283,286} in die Zellkultur übertragen und dessen Wirksamkeit überprüft. Lyophilisiertes Flucloxacillinatrium zur Injektion (*Staphylex, SmithKline Beecham*) bot in der Zusammensetzung von 1 g Flucloxacillin und 2,2 mmol Natrium ohne weitere Zusatzstoffe die reinste Antibiotikum-Präparation auf dem Markt. Neben der Wirksamkeit unterschiedlicher Konzentrationen Flucloxacillin gegen *S. aureus* in der Zellkultur musste vor allem deren zytotoxisches Potential getestet werden.

5.2.1 Zytotoxizitätsstudie

Normalgesunde humane Primärkeratinozyten wurden mit 14 unterschiedlichen Flucloxacillinkonzentrationen von 0 g/ml bis 1,0 g/ml Flucloxacillin in MEM inkubiert. Abbildung 10 zeigt die im MTT-Vitalitätstest als Maß für die Zellproliferation nachgewiesene Mitochondrienaktivität. Die 1 σ -Standardabweichung der Negativkontrolle (n = 4) markiert den Bereich nicht zytotoxischer Flucloxacillinkonzentrationen von 0 % bis 1 % (0,01 g/ml) Flucloxacillin. Nach Inkubation mit höheren Antibiotikakonzentrationen nimmt die Proliferation deutlich ab.

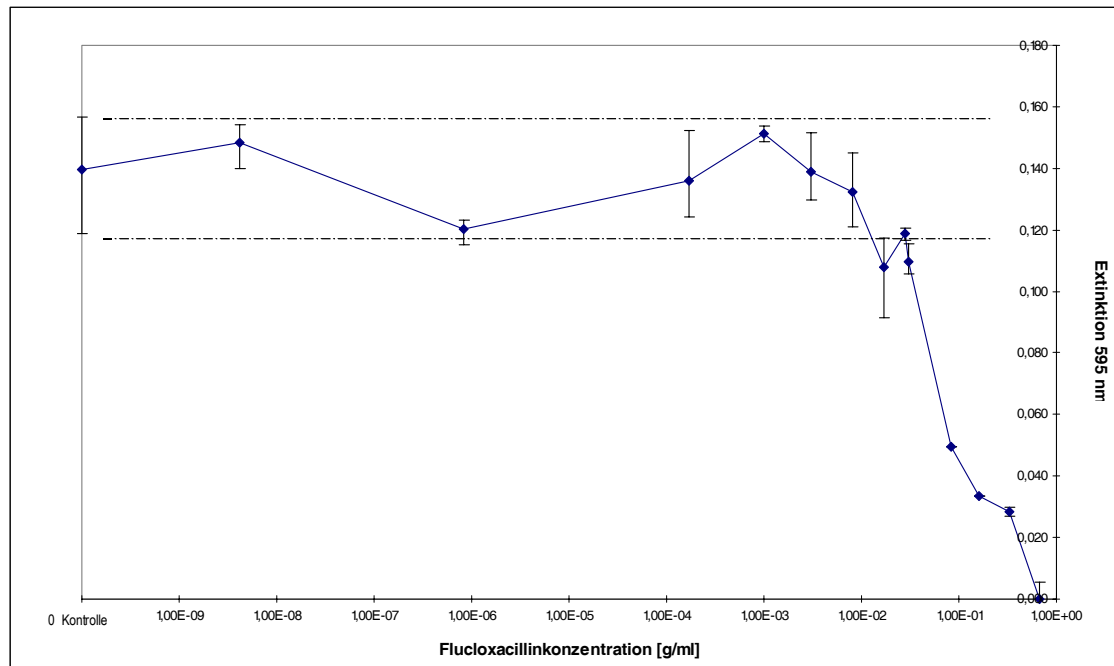


Abbildung 10: MTT-Vitalitätstest: Primärkeratinozyten wurden 2,5 h mit 14 Konzentrationen von 0 g/ml bis 1,0 g/ml Flucloxacillin inkubiert. Angegeben sind 1 σ -Standardabweichungen (n = 3 bzw. n = 4). (Datentabelle siehe Anhang A3.2)

Vergleichbare Ergebnisse wurden in einer unabhängigen Methode durch Trypanblau-Ausschlussfärbung erzielt und zusätzlich durch die Zellmorphologie unterstützt (vergleiche Abbildung 11 a-h): Morphologie und Adhärenzgrad der mit 0,2 % und 0,4 % Flucloxacillin behandelten Keratinozyten waren vergleichbar mit Keratinozyten der Negativkontrolle (Abbildung 11 a, b). Auch nach nur kurzen Inkubationszeiten mit 1 % Antibiotikallösung verhielten sich die Zellen morphologisch unauffällig (Abbildung 11 c), nach mehr als zweistündiger Inkubation zeigten sich erste morphologische Veränderungen (Abbildung 11 d). Höhere Flucloxacillinkonzentrationen führten zunächst zum Adhärenzverlust der Keratinozyten. Wenige Zellen wiesen nekrotische Veränderungen auf, die Mehrheit zeigte eine kondensierte, typisch präapoptotische Morphologie (Abbildung 11 e, f). Nach Inkubation mit 8 % Flucloxacillin zeigten die Zellen fortgeschrittene Apoptose mit beginnender Zelllyse (Abbildung 11 g), Abbildung 11 h zeigt die totale Zelllyse nach 30 % Flucloxacillin.

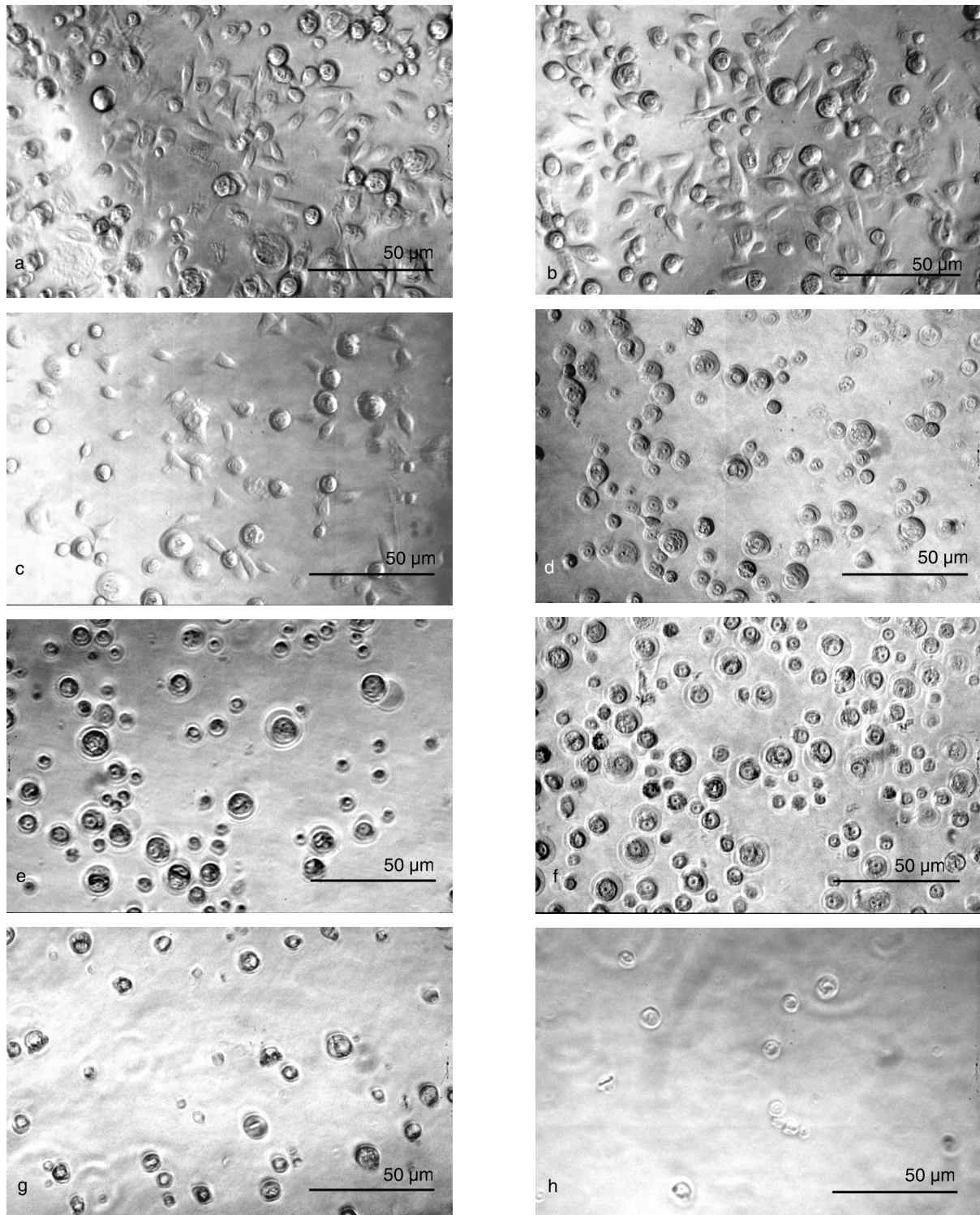


Abbildung 11: Zellmorphologie primärer Keratinozyten nach Inkubation mit Flucloxacillin (Negativkontrolle (a), 2,5 h 0,4 % Flucloxacillin (b), 1 h 1 % Flucloxacillin (c), 2,5 h 1 % Flucloxacillin (d), 2,5 h 2 % Flucloxacillin (e), 2,5 h 3 % Flucloxacillin (f), 2,5 h 8 % Flucloxacillin (g), 2,5 h 30 % Flucloxacillin (h))

5.2.2 Provokationsstudie

Um die Wirksamkeit der Flucloxacillinbehandlung unter definierten Bedingungen zu testen, wurden sterile Keratinozytenkulturen aus atopischem Ekzem gezielt mit *S. aureus*-Kulturen kontaminiert und anschließend mit 1 %, der höchsten, nicht zytotoxischen Flucloxacillinkonzentration behandelt. Eine Kontrollgruppe identischer Zellen blieb steril und unbehandelt, eine weitere blieb steril, wurde aber behandelt, eine dritte wurde kontaminiert, blieb aber unbehandelt. 5 h nach der gezielten Kontamination wurden die Zellkulturen zunächst mehrfach mit Phosphatpuffer gewaschen, anschließend mit 1 % Flucloxacillinlösung, analog der etablierten Methode konventioneller Antibiotikabehandlung (vergleiche 5.1.1), in mehreren Zyklen für je 20 min inkubiert, bis die Sterilität der Zellkulturen wiederhergestellt war. Abbildung 12 zeigt den Prozess der Dekontaminierung nach 30 min (b), 1 h (d) und 2 h (e) Flucloxacillintherapie, während die jeweils unbehandelte, infizierte Kontrollkultur exponentiell wachsender *S. aureus* Kontamination unterlag (c, f). Abbildung 12 a zeigt zum Vergleich eine kontaminierte Keratinozytenkultur 5 h nach der Kontamination zum Zeitpunkt 0 der Behandlung. Nach 2 h Behandlung waren alle Kulturen erfolgreich und dauerhaft dekontaminiert. Die Vitalität behandelter und unbehandelter Zellen war mit 80-85 %, respektive 90-95 % annähernd vergleichbar. Innerhalb der folgenden 12-24 h Inkubation mit standardsupplementiertem Zellkulturmedium erreichten die behandelten Zellkulturen ebenfalls wieder eine Vitalität von 90-95 %, während kontaminierte, unbehandelte Kulturen starben.

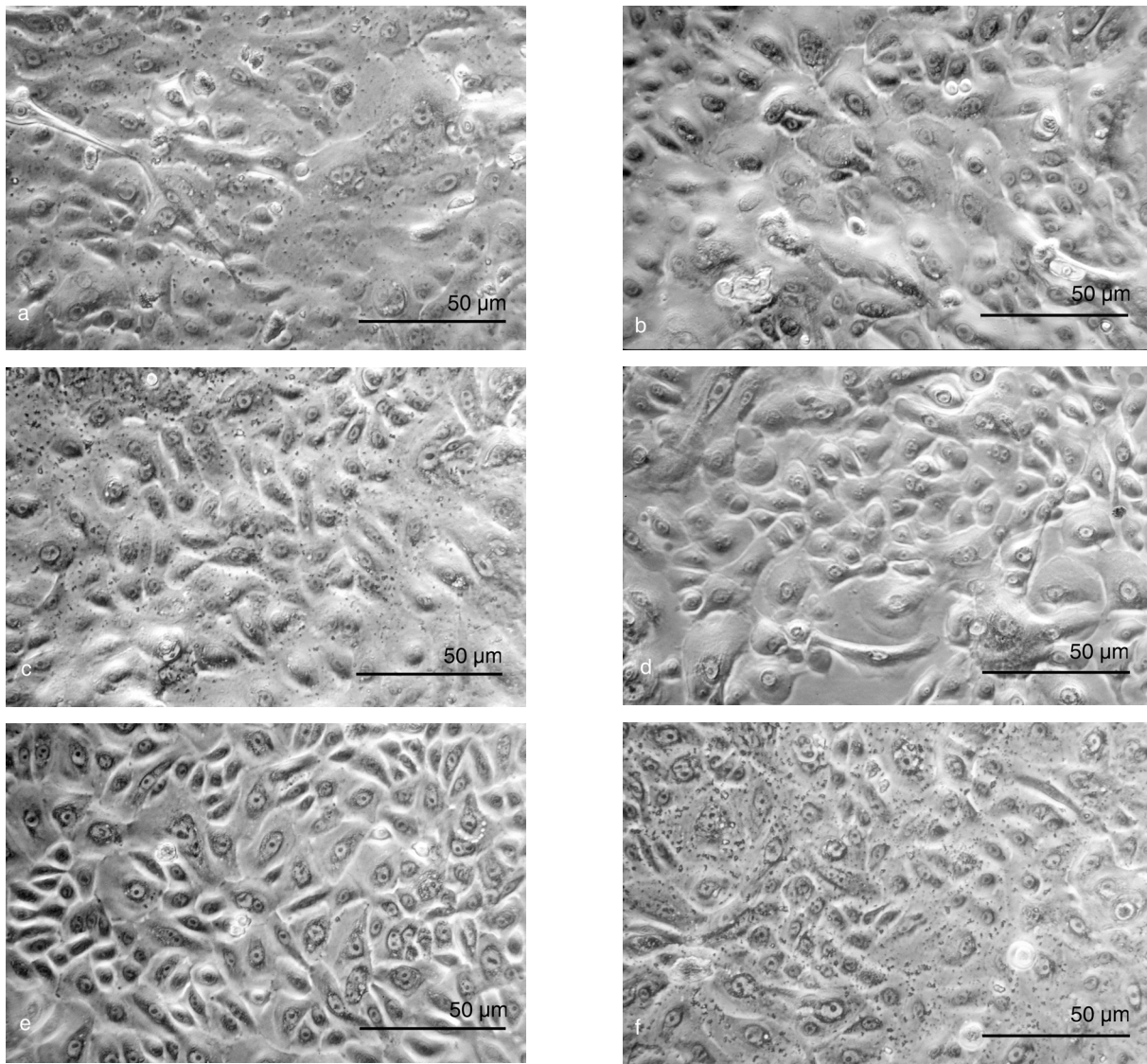


Abbildung 12: Dekontaminationsprozess durch 1 % Flucloxacillinbehandlung gezielt kontaminierter Keratinozytenkulturen (kontaminierte Kultur zum Zeitpunkt 0 (a), kontaminierte Kultur nach 30 min (b), 1 h (d) und 2 h (e) Behandlung, unbehandelte Kultur zum Zeitpunkt 30 min (c) und 2 h (f))

5.2.3 Flucloxacillinbehandlung kontaminierter Hautproben und Primärzellkulturen aus atopischem Ekzem

Bereits das Überführungsmedium frisch entnommener Hautproben aus atopischem Ekzem wurde mit 1 % Flucloxacillin angereichert. Anschließend an die in 5.1.1 beschriebene, konventionelle Antibiotika-Antimycotika-Behandlung humaner Hautproben aus atopischem Ekzem wurde ebenfalls für je 20 min mit 1 % Flucloxacillin-MEM-Lösung inkubiert bis mikroskopisch keine Kontamination mehr sichtbar war. Bei 70 % der Hautproben führte bereits eine 20-minütige Inkubation zur vollstän-

digen Dekontamination. In Einzelfällen traten nach der enzymatischen Zellisolierung Kontaminationen mit *S. aureus* in den Reinkulturen auf. Diese konnten entsprechend der in der Provokationsstudie durchgeführten Methode erfolgreich behandelt werden. Die Dekontamination wurde zunächst unter antibiotikafreien Kulturbedingungen überprüft, anschließend wurden die Kulturen unter Standardbedingungen nur mit 100 U/ml Penicillin und 100 µg/ml Streptomycin kultiviert.

Die Kombination der oben beschriebenen Antibiotika-Antimycotika Behandlung mit der neu entwickelten anti-*Staphylococcus aureus* Behandlung führte zu sterilen, vitalen und proliferierenden Primärkeratinozytenkulturen aus atopischem Ekzem. Der Routineeinsatz dieser Antibiotikabehandlung bei Hautproben aus läsionaler und nicht läsionaler Haut aus atopischem Ekzem konnte die Anzahl erfolgreicher Isolierung und Kultivierung primärer Keratinozyten aus atopischem Ekzem von zuvor 30 % auf 90 % steigern.

5.3 Aufbau einer Zellbank

Mit den in den Kapiteln 5.1 und 5.2 beschriebenen Methoden ließ sich zunächst eine mittlere Angehrate der isolierten Primärkulturen von größer 50 % für Primärkeratinozyten aus nicht pathologischer Haut und etwa 30 % aus ekzematöser oder nicht läSIONALER Atopikerhaut erreichen. Die mittlere Kulturrate für Primärfibroblasten lag bei größer 75 % aus gesunder und etwa 40 % aus atopischer Haut. Durch Optimierung und Standardisierung der enzymatischen Zellisolierungsmethoden und der zell-spezifischen Kulturmedien (vergleiche 5.1) konnte die Erfolgsrate für Primärkulturen aus pathologisch unauffälligen Hautproben auf 90 % erhöht werden. Nach Entwicklung und Etablierung der anti-*Staphylococcus* spezifischen Flucloxacillinbehandlung (vergleiche 5.2) wurde diese Kulturrate schließlich auch für Keratinozyten und Fibroblasten aus Hautproben von Probanden mit atopischem Ekzem erreicht. Mittels an den jeweiligen Entwicklungsstatus der Zellen angepassten Nährstoffkonditionen konnte zudem ein stabiles Proliferations- und Differenzierungsverhalten der Keratinozyten über mehrere Passagen erzielt werden (vergleiche 5.1.4). Die Eigenschaften unter diesen standardisierten Bedingungen isolierter und kultivierter Zellen zeigten sich auch nach Cryokonservierung unverändert. So ist es gelungen, eine in flüssigem Stickstoff konservierte Zellbank aus humanen Primärkeratinozyten der Passagen 1-3 von 38 Individuen mit pathologisch unauffälliger Haut und 13 Individuen mit atopischem Ekzem sowie humaner Primärfibroblasten der Passagen 1-4 von 47 hautgesunden Individuen und 5 Individuen mit atopischem Ekzem aufzubauen. Von 29 Individuen stehen Keratinozyten und Fibroblasten desselben Spenders zur Verfügung, von 7 Individuen mit atopischem Ekzem liegen sowohl Keratinozytenkulturen läSIONALER als auch ekzemfreier Haut vor.

5.4 Methodenentwicklung zum Aufbau organähnlicher Gewebekulturen: submerse Kokulturen und luftexponierte Hautorganoidkulturen

Ziel des „tissue engineering“ ist die *in vitro* Rekonstruktion *in vivo*-ähnlicher Organokulturen. Abbildung 13 zeigt das Prinzip von Hautorganoidkulturen am Beispiel luftexponierter Kokulturen.

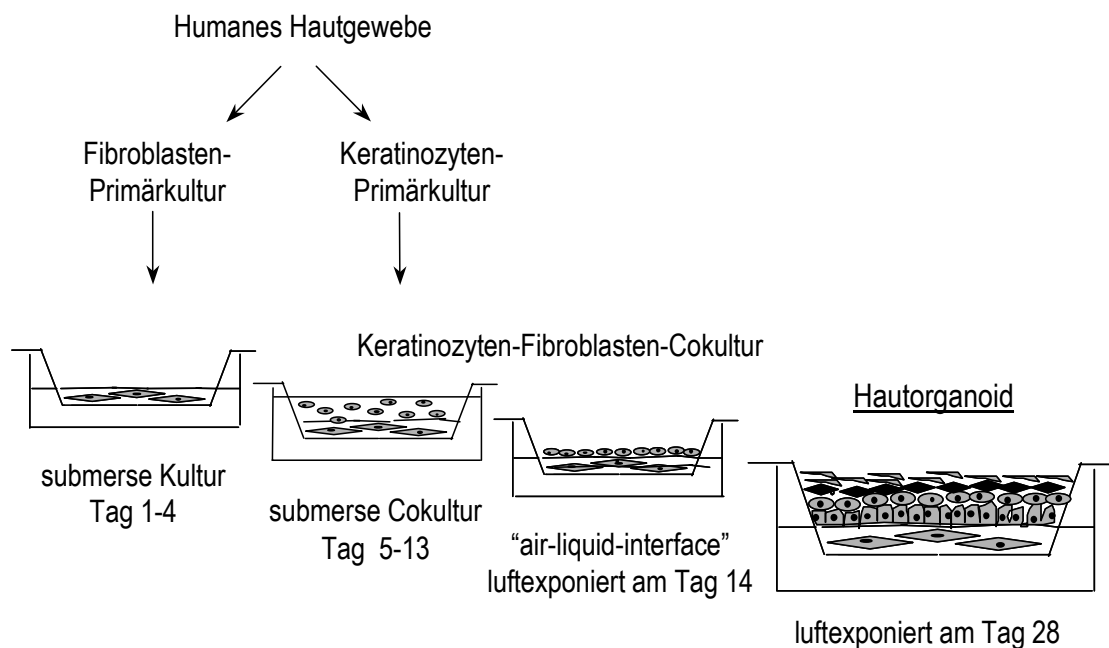


Abbildung 13: Prinzip dreidimensionaler Hautorganoidkulturen am Beispiel luftexponierter Kokulturen

Diese dreidimensional wachsenden Hautorganoidkulturen basieren auf den Reinkulturen humaner Primärkeratinozyten und -fibroblasten. Als erste Schritte der Methodenentwicklung wurden daher zunächst fundamentale Kulturbedingungen bezüglich interzellulärer Kommunikation und Nährmedienzusammensetzung für proliferierende Kokulturen sowie diverse, alternative Biomatrices getestet und optimiert. Anschließend wurden gezielt entwicklungsspezifisch supplementierte Zellkulturmedien eingesetzt, um unter gleichzeitiger Luftexposition der Keratinozyten Zelldifferenzierungsprozesse zu provozieren.

Die folgenden Methoden wurden auf der Basis von in der Literatur beschriebenen Methoden weiterentwickelt, optimiert und evaluiert:

- ◆ Luftexponierte Kokulturen auf Anopore™- und Polycarbonatmembranen
- ◆ Luftexponierte Kokulturen auf der Basis von Fibroblasten-Kollagengelen
- ◆ Luftexponierte Keratinozytenkulturen auf humaner Dermis

5.4.1 Luftexponierte Kokulturen auf Anopore™- und Polycarbonatmembranen

Zur Analyse der Adhärenz, der Vitalität sowie des Proliferations- und Differenzierungsverhaltens auf unterschiedlichen Matrices und unter wechselnden Nährstoff- und Inkubationsbedingungen wurden Mono- und Kokulturen humaner, autologer Fibroblasten und Keratinozyten submers und luftexponiert kultiviert. Als anorganische bzw. organische Matrices dienten unbeschichtete Membraneinsätze aus Aluminiumhydroxid (Anopore™) bzw. Polycarbonat. Keratinozyten der Passage 3 wurden in einer Zelldichte von $0,2-1 \cdot 10^6$ in F7-Proliferationsmedium ausgesät und 12 Tage submers kultiviert. Anschließend folgten weitere 14 Tage luftexponierter Kultur in F3-Differenzierungsmedium. Vor der Luftexposition wurden die Keratinozyten in vier Tagen submerser Kultur sukzessiv von F7 auf F3-Differenzierungsmedium umkonditioniert. (Die Etablierung der Kulturmedien F3/F7 sowie der Methode der sukzessiven Medientumkonditionierung erfolgte in zeitgleich durchgeführten Fibroblasten-Kollagenkulturen und wird im Folgekapitel 5.4.2 erläutert.) Durch den sukzessiven Medienwechsel konnte die Vitalität der Zellkulturen, gemessen anhand der LDH-Freisetzung, im Vergleich zum direkten Medienwechsel mit der Aussaat neuer Zellen oder Luftexposition der Kulturen deutlich verbessert werden. Die Monokulturen zeigten auf Polycarbonatmembranen im Vergleich zu Anopore™-Membranen eine um den Faktor 1,5-2 höhere Aussateffizienz. Alternativ wurden vor der Keratinozytenaussaat $2 \cdot 10^6$ autologe Fibroblasten in DMEM ausgesät und zwei Tage kultiviert. Während dieser zwei Tage erfolgte ein sukzessiver Mediumwechsel von DMEM auf F7-Proliferationsmedium. Im Vergleich zur Keratinozytenmonokultur wiesen die Kokulturen eine deutlich effektivere Keratinozytenadhäsion und -proliferation auf (Abbildung 14). Es erfolgte jedoch keine Differenzierung oder Stratifizierung der Keratinozyten.

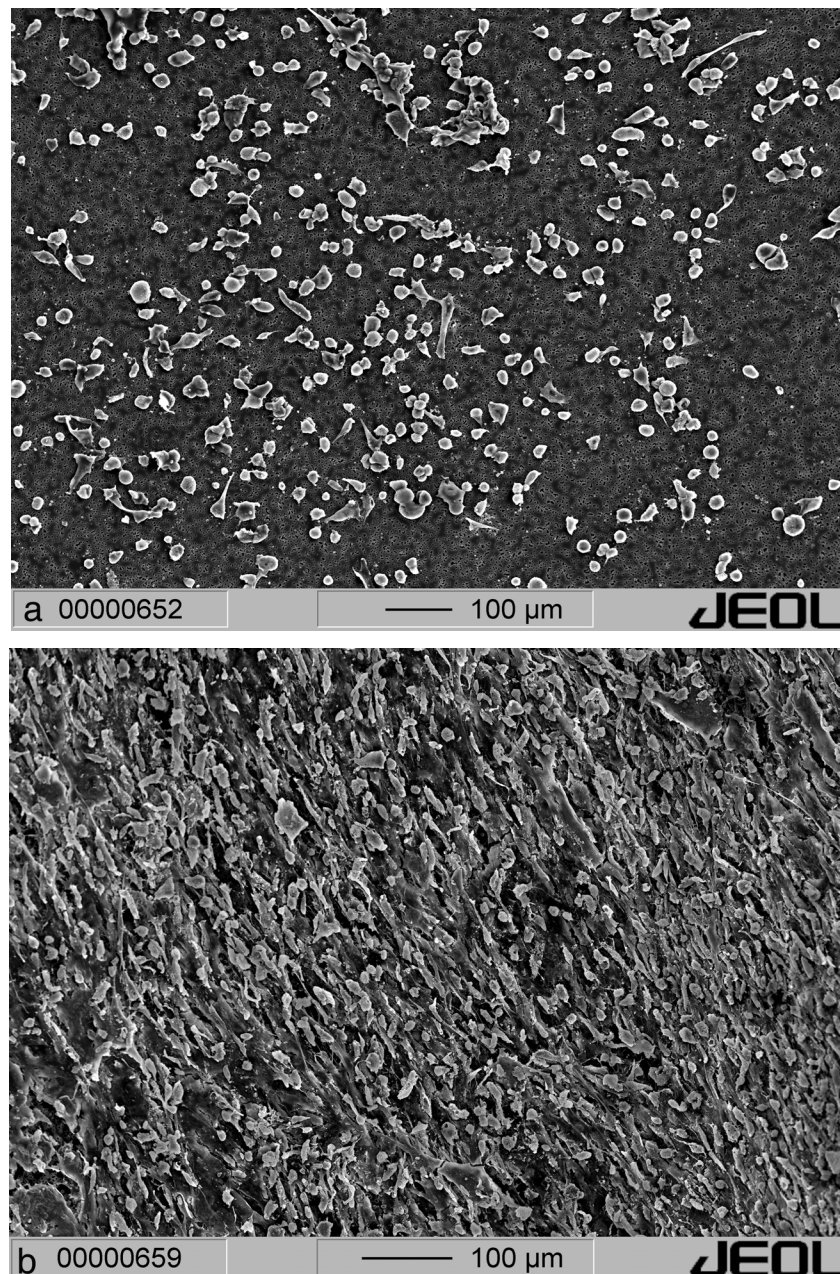


Abbildung 14: Rasterelektronenmikroskopische Aufnahmen luftexponierter Mono- (a) und Kokulturen (b) auf Polycarbonatmatrices

5.4.2 Luftexponierte Kokulturen auf der Basis von Fibroblasten-Kollagengelen und Kollagenschwämmen

Kokulturen auf Kollagelmatrix

Proliferationsarretierte, humane Primärfibroblasten in Kollagen Typ I -Gelen bildeten die Biomatrix weiterer luftexponierter Kokulturen. Es wurden im Wesentlichen zwei bekannte auf Fibroblasten-Kollagengelen basierende Hautorganoidkulturtechniken angewendet und gemäß der Ergebnisse einzelne Parameter gezielt variiert und kom-

biniert. Nach der zunächst angewendeten Methode nach *Fusenig et al.*²⁶⁹ setzte sich die Fibroblasten-Kollagenlösung aus 80 % mit NaOH neutralisierter Kollagenlösung, 10 % Hanks-Puffer und 10 % der in FKS resuspendierten, mittels Mitomycin C arretierten Fibroblasten zusammen. $5 \cdot 10^5$ Zellen/2,5 ml der Fibroblastengellösung wurden auf unbeschichtete Membraneinsätze von 23 mm Durchmesser luftblasenfrei aufgetragen. Nach einstündiger Standardinkubation wurden sterile Glasringe auf die inzwischen gelierten Gele aufgesetzt. Nach einer weiteren Stunde Inkubation wurde die durch die Komprimierung des Gels ausgetretene Flüssigkeit entfernt und die Fibroblasten-Kollagengele vor der Keratinozytenaussaat für 12 h mit FAD₂/Greens-Medium äquilibriert.

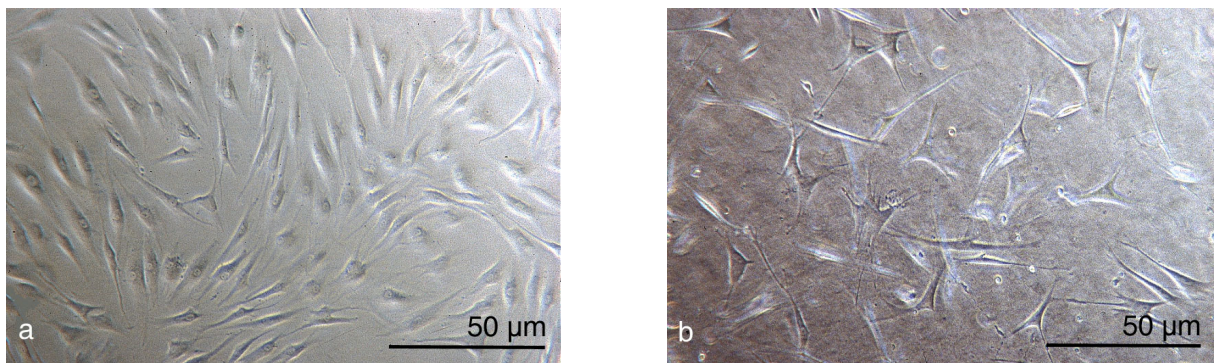


Abbildung 15: Migration und Ausrichtung proliferationsarretierter Fibroblasten im Kollagengel 6 h (a) bzw. 48 h (b) nach Zellaussaat.

Abbildung 15 a, b zeigt die dreidimensionale Ausrichtung der proliferationsarretierten Fibroblasten durch Migration im Kollagengel nach 6 h bzw. 48 h. Dabei kontrahierten die Kollagengele innerhalb von 24 h auf ca. 18 mm, nach 48 h auf ca. 15 mm Durchmesser und 3-4 mm Dicke. Nach 12 h Inkubation wurde das Medium im Glasring entfernt und durch je 1,0 ml Primärkeratinozytensuspension ($9 \cdot 10^5$ Zellen/ml) ersetzt. Die Glasringe schränkten das Areal der Keratinozytenbesiedelung ein, so dass die Wände der Membraneinsätze zellfrei blieben. Nach 24 h waren die Keratinozyten auf dem Kollagengel adhärent und Zellkulturüberstände sowie die Glasringe wurden vorsichtig entfernt. Die Nährstoffversorgung der nun luftexponierten Kokultur erfolgte ausschließlich über das durch die Fibroblasten vorkonditionierte Medium unterhalb der Membraneinsätze. Die Verwendung besonders großvolumiger 6-„well“-Kulturplatten ermöglichte die Versorgung mit einem ausreichenden Nährmedienvolumen. Ein Mediumwechsel erfolgte alle zwei Tage. Aufgrund der nicht transparenten Membranstrukturen war eine begleitende, mikroskopische Kontrolle der Organoidentwicklung

nicht möglich. Nach vier Wochen wurden histologische REM-, TEM- sowie Cryo- und Paraffinpräparate der Kulturen angefertigt und mikroskopisch analysiert. Ein präparationsbedingtes Ablösen der Keratinozytenstrati vom Fibroblasten-Kollagengel während der Fixierung wurde durch vorausgehende Überschichtung der Organoidkulturen mit Agar Agar bzw. Cryoteclösung verhindert. Zellschonende Methoden der Präparation und Fixierung für elektronenmikroskopische Organoidpräparate wurden evaluiert und etabliert (vergleiche 4.4.2 und 4.4.3). Die proliferationsarretierten Fibroblasten, murine 3T3-Fibroblasten sowie autologe humane Fibroblasten, behielten auch nach der Aussaat von Keratinozyten auf die Geloberfläche die lockere Struktur stationärer, dreidimensional ausgerichteter Zellen im Kollagengel bei. - Native Fibroblasten proliferierten dahingegen im Kollagengel zu einem dichten Zellverband parallel ausgerichteter, langgestreckter Zellen, die nach Keratinozytenaussaat chemotaktisch auf diese zu migrierten und sie überwuchsen, gefolgt von der Bildung von Zellagglomeraten und deren Adhärenzverlust vom leeren Kollagengel. - Auf proliferationsarretierten Fibroblasten-Kollagengelen kultivierte Keratinozyten erzielten nur partiell eine äußerst heterogene, basale Adhärenz (vergleiche Abbildung 16). Die Zellen zeigten eine nur geringe, heterogene Proliferation (a). Die Morphologie von zum Teil abgekugelten Zellen ließ zudem auf mangelnde Vitalität schließen (b). Eine Differenzierung oder Stratifizierung fand nicht statt.

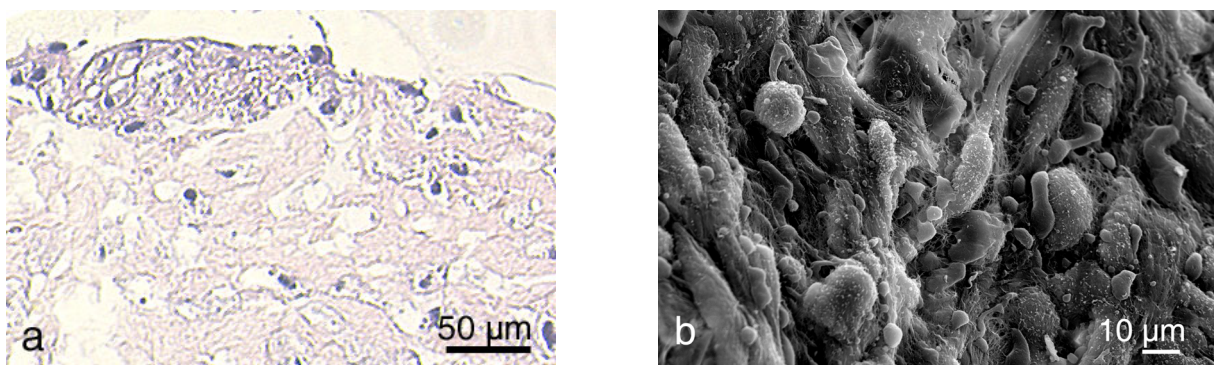


Abbildung 16: Partielles Keratinozytenwachstum auf Fibroblasten-Kollagengelen (a) Paraffinschnittpräparat, H.E.-Färbung; (b) Organoidoberfläche (REM-Aufnahme)

Um die Bildung eines homogenen, basalen Keratinozyten-„monolayer“ zu gewährleisten, wurde daher in weiteren Kokulturansätzen, in Anlehnung an die Organoidkulturmethode des *Centre Charles Zviak, L'ORÉAL*²⁶⁷, der luftexponierten Kultur eine siebentägige submerse Proliferationsphase in F7-Medium vorangestellt. Die anschließende, luftexponierte Differenzierungsphase wurde durch gezielte Nährstoff-

supplementierung des F3-Mediums unterstützt. Die Nährstoffzusammensetzungen von F7 und F3 ähneln der von FAD₂/Greens (vergleiche 3.2), sind jedoch dem jeweiligen Differenzierungsstatus der Kultur spezifischer angepasst. Um zusätzlich eine höhere Zellvitalität zu erreichen wurde zudem ab einer Subkonfluenz von 60 % der Fibroblasten- und Keratinozytenmonokulturen eine sukzessive Umkonditionierung auf das Medium der Organoidkultur (DMEM => F7 bzw. K-SFM => F7) eingeführt. Ebenso wurden die Organoidkulturen in vier Tagen submerser Kultur sukzessiv von F7-Proliferations- auf F3-Differenzierungsmedium umgewöhnt (Methode, vergleiche 4.1.6). Unter diesen Kulturbedingungen wurde bei höherer Zellvitalität eine homogenere basale Keratinozytenbesiedelung der Fibroblasten-Kollagenmatrix erzielt. Bereits makroskopisch wurde mit zunehmender Kulturdauer eine zunehmende Dichte und Dicke des Keratinozytenrasens deutlich. Abbildung 17 zeigt im Vergleich die rasterelektronischen Aufnahmen eines zweidimensionalen, konfluenten Keratinozyten-„monolayer“ mit deutlich ausgeprägten, interzellulären Zell-Zellkontakten (a, b) sowie einer dichten, sichtbar dreidimensionalen Kokultur (c, d).

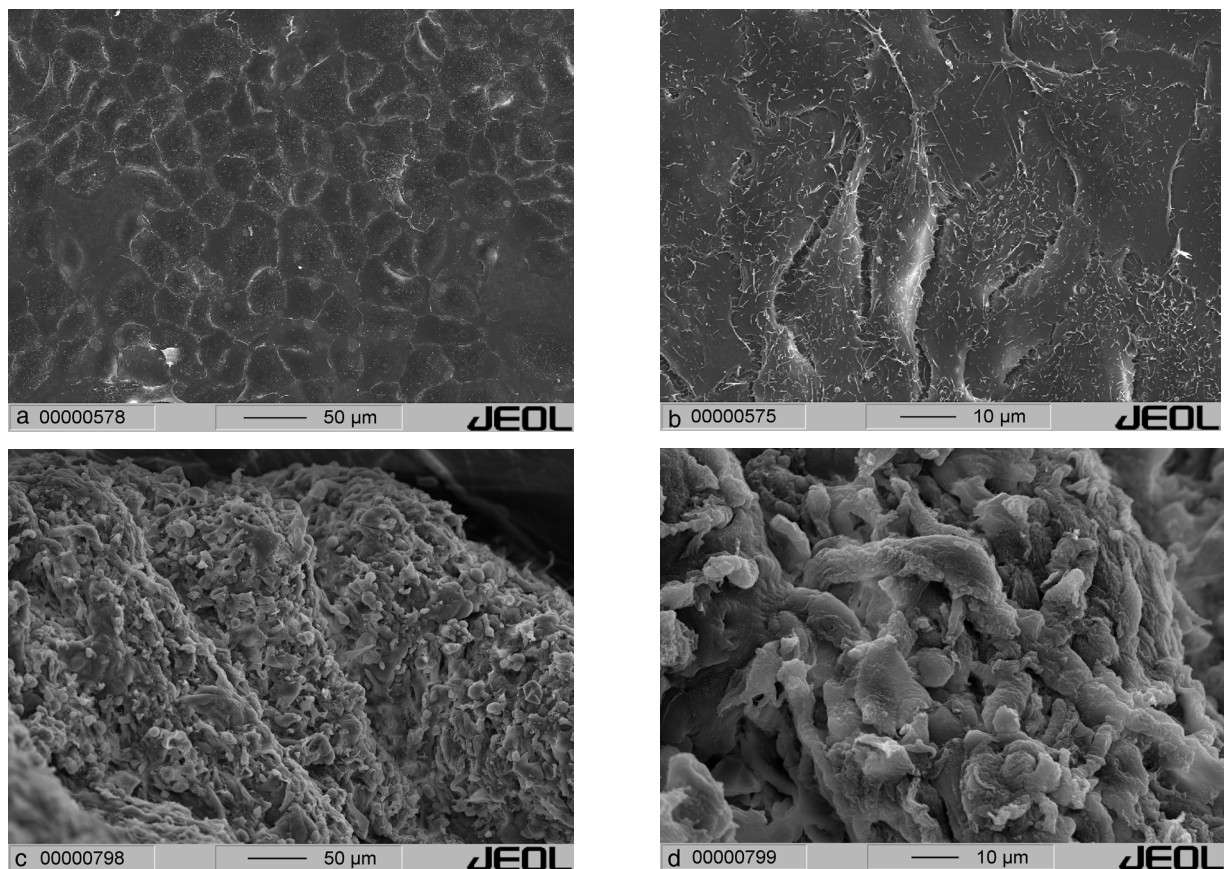


Abbildung 17: Rasterelektronenmikroskopische OberflächenDarstellung eines Keratinozyten-„monolayer“ (a, b) im Vergleich zu einer dreidimensionalen Keratinozyten-Fibroblasten-Kollagengel-Kokultur (c, d); (a, c): Übersichts-, (b, d): Detailaufnahmen

Die H.E.-Färbung von Paraffinschnittpräparaten der Organoidkulturen verdeutlichte neben der gleichmäßigen Adhärenz ein mehrschichtiges, ungerichtetes Wachstum von Keratinozyten unterschiedlicher Differenzierungsstadien (vergleiche Abbildung 18). Insgesamt zeigte sich die typische Morphologie einer ungerichteten Hyperproliferation. Während der Großteil der Keratinozyten das Differenzierungsstadium eines Stratum spinosum nicht überstieg, zeigten manche Zellen Differenzierungsanzeichen in Form einer zunehmenden Vakuolisierung. Eine Reihe dyskeratotischer Keratinozyten (durch Pfeile hervorgehoben) zeugte mit verfrühter Verhornung ebenfalls von spontaner, ungerichteter Differenzierung. Eine gerichtete Stratifizierung der Kulturen fand unter diesen Kulturbedingungen nicht statt.

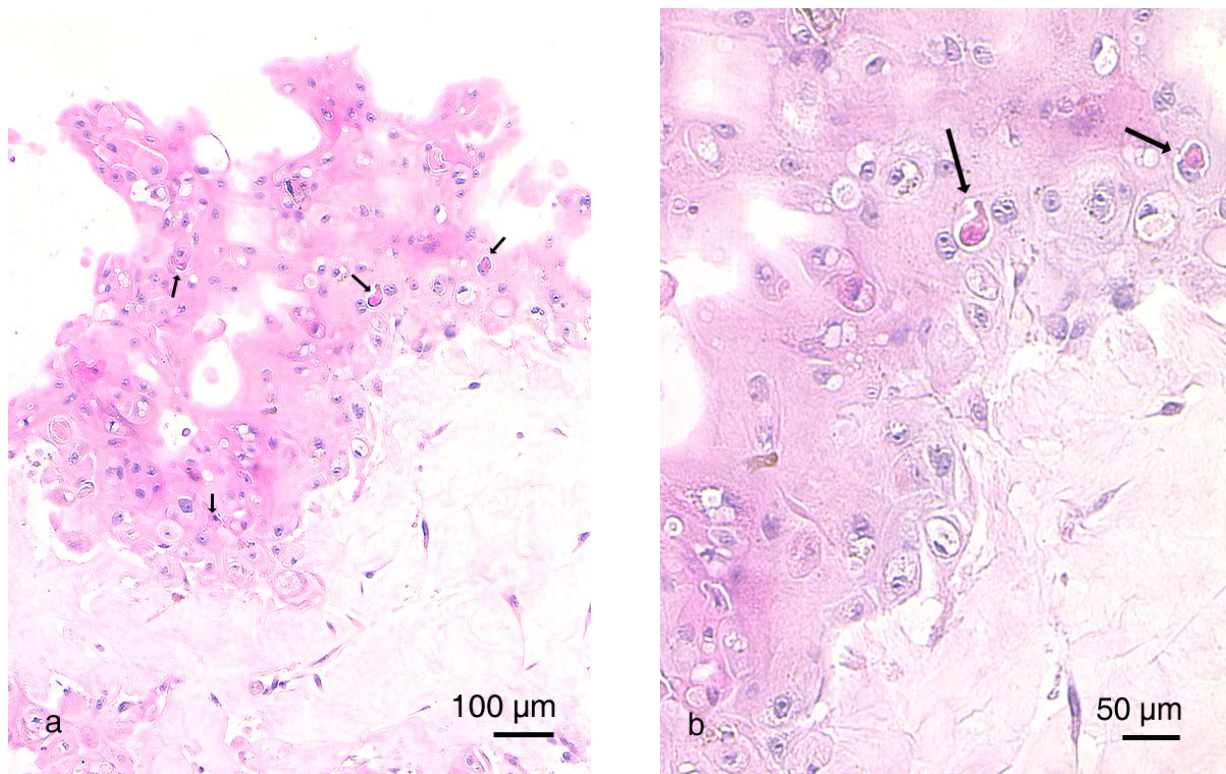


Abbildung 18: Übersicht (a) und Detailaufnahme (b) von Paraffinschnittpräparaten hyperproliferierender Keratinozyten-Fibroblasten-Kollagenengel-Kokulturen (H.E.-Färbung); die Pfeile markieren dyskeratotische Keratinozyten.

pH-Einstellung der Fibroblasten-Kollagengellösung

Die Methode nach *Fusenig et al.* wies eine weitere Problematik auf. Durch die Übereinstimmung von Äquivalenz- und Neutralpunkt bei der Titration, gestaltete sich die Einstellung eines neutralen pH-Wertes der Fibroblasten-Kollagengellösung als äußerst diffizil. Nur geringe pH-Wertabweichungen zeigten bereits immense Auswirkung nicht nur in Form erhöhter Geschwindigkeit des Geliervorgangs und festerer Konsistenz des Kollagengels sondern auch in Form reduzierter Vitalität der Fibroblasten im Gel. Die Zusammensetzung der Fibroblasten-Kollagengellösung nach der Methode des *Centre Charles Zviak, L'ORÉAL* (vergleiche 4.1.5) wies dagegen eine stärkere Pufferkapazität auf und ermöglichte eine problemlose pH-Einstellung. Trotz etwa vergleichbarer Zelldichte von $5 \cdot 10^5$ Zellen/3,0 ml kam es hier zu einer stärkeren Kontraktion der Kollagengele innerhalb von 24 h auf ca. 15 mm, nach 48 h auf ca. 8-10 mm Durchmesser und 1-2 mm Dicke. Das Keratinozytenaussaatareal wurde durch sterile Edelstahlringe auf 1,0 cm² begrenzt, die Kulturen zur Luftexposition auf sterile Edelstahlnetze transferiert. In Kombination mit der oben erläuterten, an den Differenzierungsstatus angepassten Nährstoffzusammensetzung und sukzessiven Medienumkonditionierung konnten an Zelldichte und -vitalität zunehmende Organoidkulturen erzielt werden. Eine geordnete Stratifizierung wurde jedoch auch mit dieser Methode nicht erreicht. Die Verwendung von murinen 3T3-Fibroblasten oder autologen, humanen Fibroblasten zeigte keinen Einfluss auf Adhärenz, Vitalität, Struktur und Stratifizierung der Keratinozyten. Ebenso blieb die Verwendung von PC- oder PET-Membraneinsätzen unterschiedlicher Porengröße und -dichte ohne Einfluss auf die genannten Parameter.

Mono- und Kokulturen auf Kollagenschwammmatrix

Alternativ zum Fibroblasten-Kollagengel wurden Fibroblasten-Keratinozytenkokulturen sowie reine Keratinozytenkulturen unter Anwendung der oben geschilderter Methode nach *L'ORÉAL* in Kombination mit sukzessiver Medienumkonditionierung auf industriell gefertigten, üblicherweise in der Wundheilung sowie in Organexplantatkulturen eingesetzten Kollagenschwämmen^{278,279} kultiviert. Eine begleitende, mikroskopische Kontrolle der Kulturentwicklung war wiederum aufgrund der Dicke der Kollagenschwammes nicht möglich. Makroskopisch war jedoch bereits nach sechs Tagen submerser F7-Proliferationskultur eine zunehmende Verdichtung im Aussaatareal erkennbar (vergleiche Abbildung 19 a). Aus dem Kollagenschwamm auf den Kultur-

schalenboden abgewanderte Keratinozyten zeigten zudem die unter submerser F3-Kultur typischen Differenzierungsmerkmale, wie ein mehrschichtiges Wachstum unter Bildung eines festen Zellverbandes mit zunehmender Verhornung sowie Abflachen und schließlich Ablösen der oberen Zellschichten (Abbildung 19 b). Nach acht Tagen submerser und 34 Tagen luftexponierter Kultur im trockenen Inkubator wurde die Kultur rasterelektronenmikroskopisch ausgewertet. Abbildung 20 zeigt eine ausgeprägte Integration der Keratinozyten in das Kollagengeflecht. Der Nachweis äußerst niedriger LDH-Aktivität über die gesamte Kulturdauer wies zudem eine hohe Vitalität der Keratinozyten nach. Eine gerichtete Differenzierung oder Stratifizierung der Keratinozyten auf der Schwammoberfläche fand jedoch nicht statt. Der Vergleich parallel kultivierter, auf Kollagenschwammmatrix basierender Organoidansätze mit erstens humanen Primärkeratinozytenkulturen, zweitens der Primärkulturzelllinie NHEK sowie drittens der immortalisierten Keratinozytenzelllinie HaCaT erzielte adäquate Ergebnisse.

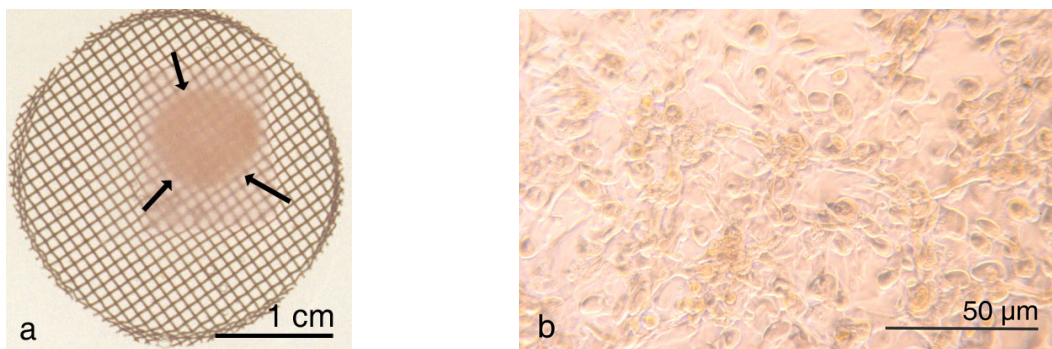


Abbildung 19: Keratinozytenkultur im Kollagenschwamm: (a) makroskopische Ansicht sechs Tage nach Zellaussaat; (b) nach 14 Tagen aus dem Kollagenschwamm migrierte, submerser Keratinozytenkultur unter F3-Differenzierungsbedingungen

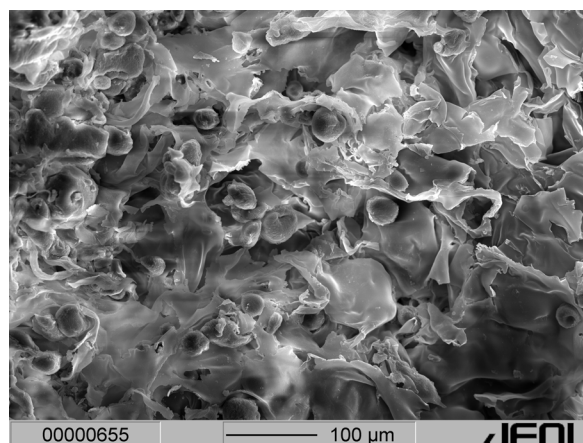


Abbildung 20: Keratinozytenkultur im Kollagenschwammgeflecht (REM-Aufnahme)

5.4.3 Luftexponierte Keratinozytenkulturen auf humaner Dermis

Alternativ zu den Kollagengelbasierten Fibroblastenkeratinozytenkokulturen wurde in Anlehnung an in der Literatur beschriebene Methoden²⁶⁷ humane, epidermisfreie und proliferationsarretierte Dermis (hier verwendete Methode vergleiche 4.1.7) als Substrat für luftexponierte, autologe Keratinozytenkulturen ($5 \cdot 10^5$ Zellen/cm²) eingesetzt. Das Aussaatereale wurde mittels eines Stahlringes begrenzt und dieser nach 24 h Inkubation entfernt. Die Kultur wurde gemäß den in Kollagengelkokulturen optimierten, in 5.4.2 erläuterten Kulturbedingungen zunächst unter Proliferationskonditionen sieben Tage submers, anschließend, eingesetzt in Membraneinsätzen oder auf Stahlnetzen, unter Differenzierungskonditionen 14-35 Tage luftexponiert gehalten. Alternativ wurden mit vergleichbaren Ergebnissen, in Anlehnung an die Methode nach *Watt*, 15 μ l hochkonzentrierter Zellsuspension ($1-4 \cdot 10^5$ Keratinozyten) direkt luftexponiert auf der Dermis ausgesät und kultiviert. Sämtliche Medienwechsel erfolgten sukzessiv.

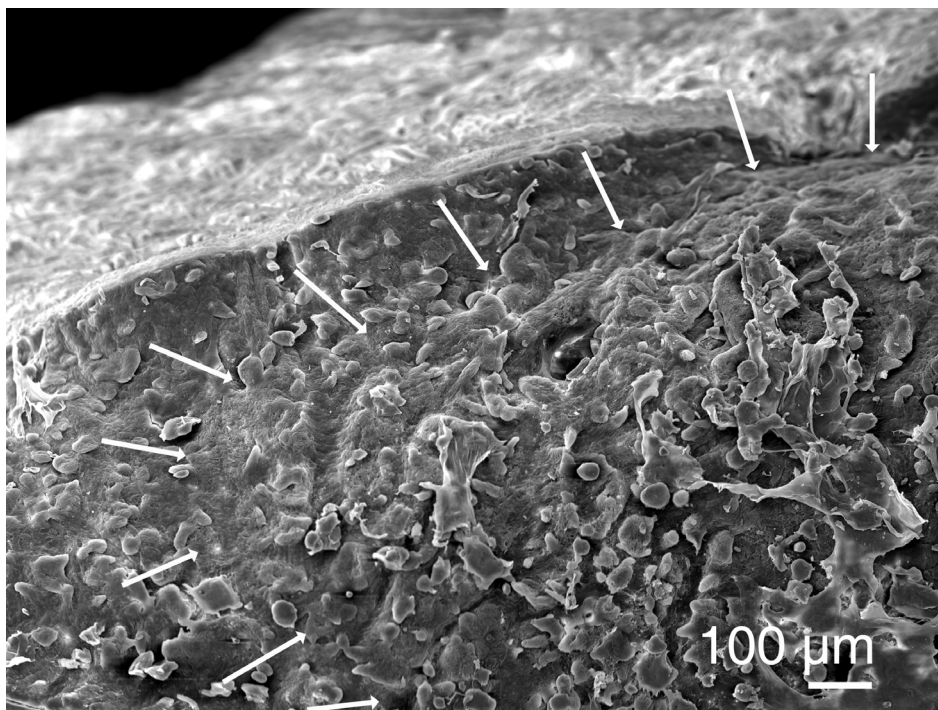


Abbildung 21: Oberfläche einer 42 Tage alten Dermisorganoidkultur (REM-Aufnahme); die Pfeile markieren das Aussaatereale.

Abbildung 21 zeigt in einer rasterelektronenmikroskopischen Übersichtsaufnahme die Oberfläche einer 42 Tage alten Dermisorganoidkultur. Die Pfeile bezeichnen den Rand des ursprünglichen Aussaatereals, das sich deutlich von der umgebenden Dermisoberfläche mit nur wenigen, ausgewanderten Keratinozyten hervorhebt. Eine auf-

fallend inhomogene, dreidimensionale Zellmorphologie deutete auf eine heterogene Differenzierung und Stratifizierung der Organoidkultur. Detailaufnahmen zeigten sowohl Zonen dichter Keratinozytenbesiedelung (vergleiche Abbildung 22) sowie unterschiedliche Stadien mehrschichtigen Wachstums als auch partielle Stratifizierung und Desquamation in Form großflächig keratinisierter, sich ablösender Zellschichten (vergleiche Abbildung 23).

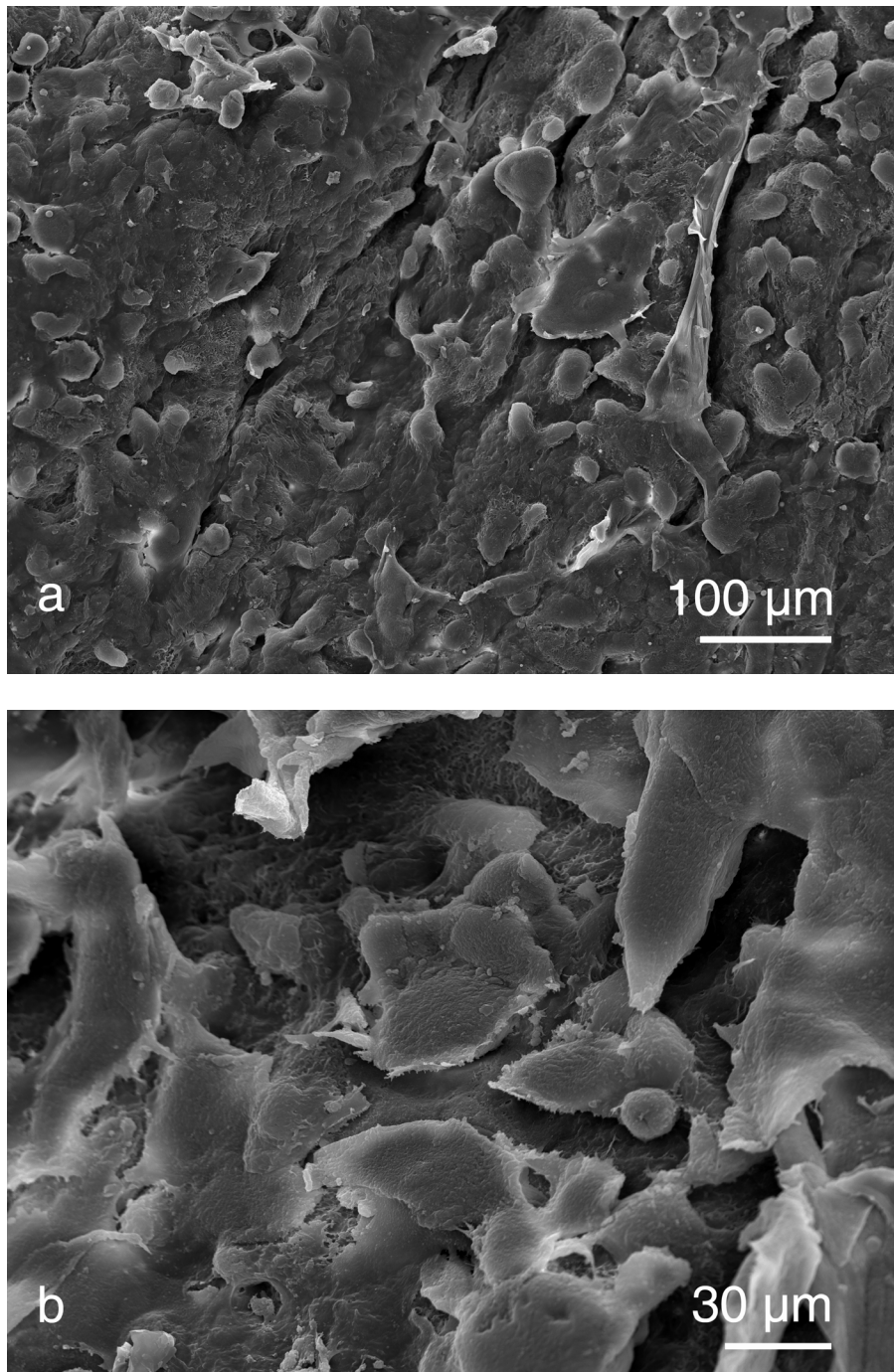


Abbildung 22: REM-Detailaufnahme der Dermisorganoidkultur: dichte sowie mehrschichtige Keratinozytenbesiedelung

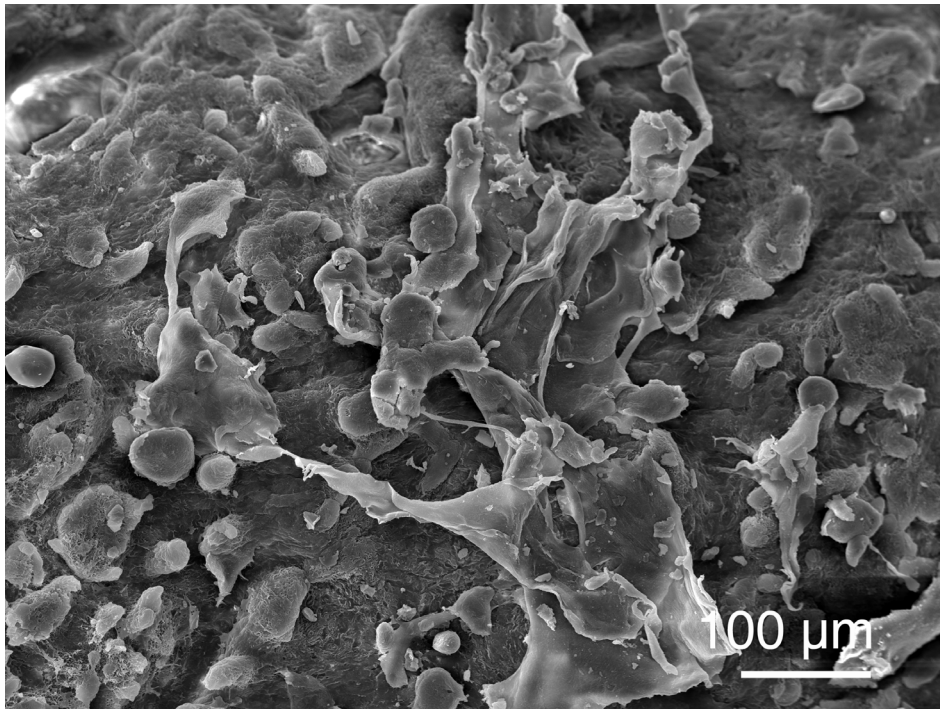


Abbildung 23: REM-Detaillaufnahme der Dermisorganoidkultur: partielle Desquamation keratinisierter Strati

5.5 Entwicklung einer Apparatur zur Exposition von Zellkultursystemen gegenüber Stoffen in der Gasphase

5.5.1 Vorexperiment zur Demonstration auftretender Problemstellungen: Zelluläre Exposition gegenüber flüssigen VOC im Standardinkubator

Die Wirkung von Toluol auf humane Primärkeratinozyten wurde im reinen Flüssigsystem untersucht. Flüssiges Toluol wurde in vier unterschiedlich hohen Konzentrationen direkt im wässrigen Zellkulturmedium gelöst, um mögliche Fremdeffekte durch Lösungsvermittler auszuschließen. Die zum Zeitpunkt 0, nach 1 h, 2 h und 5 h Exposition entnommenen Zellkulturüberstände wurden mittels manueller „headspace“ Gaschromatographie analysiert. Abbildung 24 zeigt als ein Maß für die Konzentration die Peakflächen des Chromatogramms in Abhängigkeit von der Zeit und verdeutlicht den extremen Konzentrationsverlust von Toluol im Zellkulturmedium innerhalb kurzer Zeit. Über die Phasengleichgewichtseinstellung fand ein Konzentrationsausgleich zwischen der Flüssig- und der Gasphase innerhalb der Zellkulturplatte sowie mit der Gasphase des Inkubators statt. Bereits nach einer Expositionszeit von 1 h war der Toluolgehalt im Medium um mehr als 50 % des Ausgangswertes reduziert.

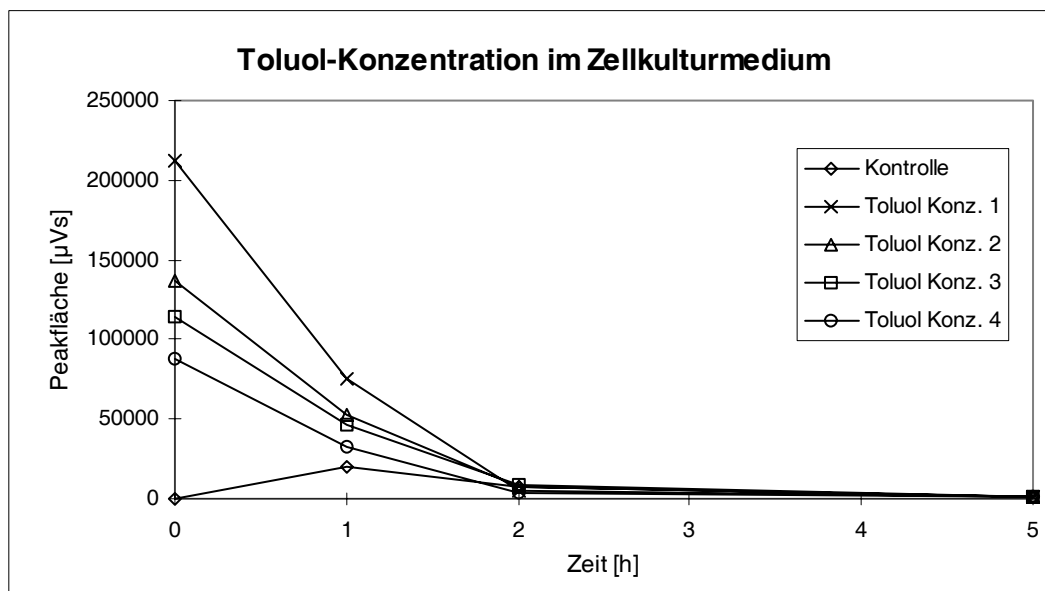


Abbildung 24: Zeitabhängiger Verlust der Toluol-Konzentration im Zellkulturmedium (Datentabelle siehe Anhang A3.3)

Zusätzlich kam es sehr schnell zu einem Konzentrationsausgleich zwischen unterschiedlich hoch konzentrierten Zellkulturmedien in der Zellkulturplatte. So war nach

1 h Inkubation auch in der Negativkontrolle ein Toluolgehalt nachweisbar, nach 2 h war unabhängig von der Ausgangskonzentration in allen Zellkulturmedien ein einheitlicher Toluolgehalt feststellbar. Nach 5 h Exposition war nurmehr ein qualitativer Nachweis von Toluol in allen Zellkulturüberständen möglich. Die nach 5 h Exposition bestimmten zellulären Parameter bezüglich Proliferation und Vitalität der exponierten Zellen zeigten gegenüber der Negativkontrolle keinerlei Beeinflussung durch die Exposition mit unterschiedlichen Konzentrationen von Toluol.

5.5.2 Schlussfolgerung aus dem Vorexperiment – Entwicklungskonzept für eine Gasphasenexpositionsapparatur

Das Demonstrationsexperiment der zellulären Exposition gegenüber flüssigen VOC im Standardinkubator zeigte, wie erwartet, einen extremen Konzentrationsverlust an Toluol aus dem Zellkulturmedium innerhalb kürzester Zeit. Über die Einstellung des Phasengleichgewichtes entlang des Konzentrationsgefälles an der Phasengrenze flüssig-gasförmig kam es sowohl zum Konzentrationsausgleich innerhalb der Zellkulturplatte, so auch zwischen den ursprünglich unterschiedlich VOC-haltigen Medien der Zellkulturen, als auch zum Konzentrationsausgleich mit der Gasphase im Inkubator. Die bereits nach 1 h um mehr als die Hälfte reduzierten Ausgangskonzentrationen verdeutlichten, dass unter diesen Bedingungen im Standardinkubator nicht einmal Kurzzeitexpositionen möglich sind. Die Notwendigkeit einer geschlossenen, homogen konzentrierten Expositions-kammer lässt sich jedoch im konventionellen Zellkulturinkubator nur schwer realisieren: Einerseits ist die Erzeugung einer homogen konzentrierten Expositionsatmosphäre im gesamten Inkubator aufgrund seiner Größe, des schlechten Strömungsprofils sowie mangelnder Gasdichtigkeit nur schwer zu erreichen und vor allem nicht kontrollierbar. Andererseits sind geschlossene Systeme gasdicht konstruierter Zellkulturgefäße für die Kultivierung von Zellen nicht einsetzbar, da für deren Proliferation O_2 -Austausch und für die Aufrechterhaltung des Medium-pH-Wertes CO_2 -Austausch gewährleistet sein müssen. Unabhängig von der Notwendigkeit einer geeigneten Expositions-kammer stellte sich bei der Exposition gegenüber flüssigen VOC das zusätzliche Problem der schlechten und inhomogenen Löslichkeit dieser hydrophoben und extrem flüchtigen Stoffe im wässrigen Zellkulturmedium. Der gebräuchliche Einsatz von Lösungsvermittlern wie beispielsweise DMSO musste in dieser Studie jedoch vermieden werden. Denn neben

möglichen zellulären Effekten durch den Lösungsvermittler selbst ändert sich zudem das chemische Potential eines Stoffes (z. B. auch bezüglich seiner Penetrationseigenschaften) gemäß seines Zustandes als Lösung, Suspension oder Emulsion. Ausschlaggebend kam hinzu, dass eine Exposition gegenüber VOC aus der Gasphase vielmehr den umweltrelevanten und physiologischen *in vivo* Bedingungen entspräche. Es bot sich daher an, das beobachtete Prinzip der Phasengleichgewichtseinstellung in umgekehrter Weise für die Exposition submerser Flüssigkultursysteme gegenüber VOC aus der Gasphase zu nutzen. Diese gasförmige Schadstoffapplikation ermöglichte zusätzlich auch die Exposition luftexponierter Zellkultursysteme. Infolgedessen wurde im Rahmen dieser Arbeit eine gasdichte Expositionsapparatur in Form eines offenen, kontinuierlich gasdurchströmten Systems entwickelt. Im folgenden werden zunächst die Anforderungen an die Apparatur sowie deren technische Realisierung und Funktionsprinzip dargestellt.

5.5.3 Anforderungen an die Expositionsapparatur

Grundlegende Voraussetzungen, um Substanzverlust und sogenannten „memory“ Effekten durch Wandadsorption vorzubeugen, waren einerseits die Gasdichtigkeit der Apparatur, andererseits die Wahl chemisch inerte Materialien für sämtliche Apparaturkomponenten.

Eine präzise Einstellung der Prüfgaskonzentrationen verlangte eine exakte Regulierbarkeit der Gasvolumenströme sowie ein Zusammenführen der Einzelgase. Um reale Umweltsituationen definiert simulieren zu können, musste die relative Luftfeuchte einstellbar sein.

Für die Konstruktion der Expositions-kammer war zu beachten, dass mehrere Zellkulturen simultan exponiert werden sollten. Um eine homogene Exposition dieser Zellkulturen zu gewährleisten und Verwirbelungen zu vermeiden, musste die Kammer ein geeignetes Strömungsprofil aufweisen.

Zur Vermeidung prüfgasunabhängiger Effekte mussten bezüglich pH-Wert und Temperatur des Zellkulturmediums konstante Zellinkubationsbedingungen eingehalten werden. Schließlich war eine Vorrichtung zur Probenahme erforderlich, um eine Kontrolle und Dokumentation der Expositionsbedingungen zu gewährleisten, ohne gleichzeitig störend auf diese einzuwirken.

Diese Anforderungen an die Expositionsapparatur lagen sowohl im physikalisch-chemischen als auch im zellbiologischen Bereich. Dieser Komplexität entsprechend wurde die Apparatur in interdisziplinärer Zusammenarbeit mit dem Chemiker Dr. Uwe Risse entwickelt.

5.5.4 Technische Realisierung und Funktionsprinzip

Abbildung 25 zeigt eine schematische Darstellung der Expositionsapparatur. Sämtliche Gasleitungen wurden aus $\frac{1}{4}$ Zoll-Edelstahlrohr konstruiert, einzige Ausnahme bildet das Temperiersystem zur Einstellung der relativen Luftfeuchte (siehe unten). Swagelok-Verschraubungen aus Edelstahl mit Teflondichtungen stellen die Übergänge dar. Die verwendeten Flaschendruckminderer bestanden aus Pressmessing und Messingmembranen.

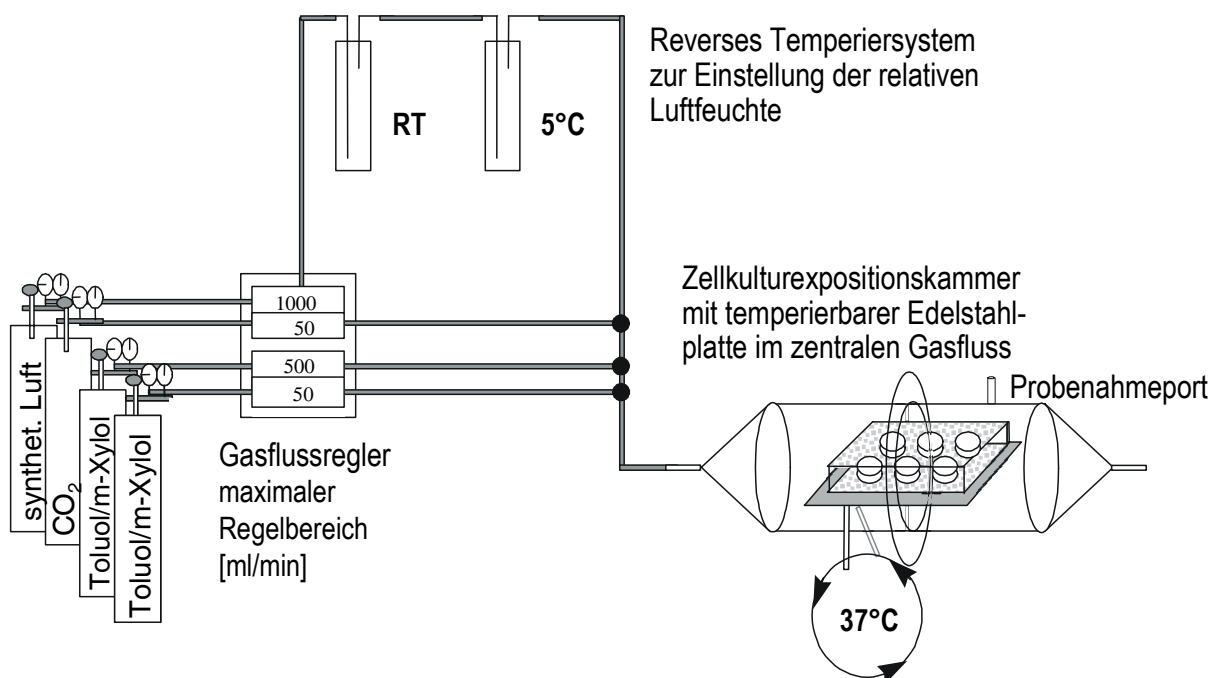


Abbildung 25: Schematische Darstellung der Apparatur zur Exposition von Zellkultursystemen gegenüber gasförmigen Stoffen

In der Apparatur sollten zertifizierte, statische Prüfgasgemische eingesetzt werden. Die Gasvolumenströme wurden durch elektronische Gasflussregler mittels Magnetventilen eingestellt und kontrolliert. Die Gasflussregler bestanden aus einer Steuereinheit und Messeinheiten, deren Regelbereiche mit bis zu 50 ml/min, 500 ml/min

und 1000 ml/min gemäß den benötigten Volumenströmen gewählt wurden (vergleiche hierzu Tabelle 4 in Kapitel 4.6.2). Das anschließende Zusammenführen der Einzelgasströme in der Apparatur führte zu einer dynamischen Verdünnung der statischen Prüfgase.

Im Trägergas synthetische Luft wird mittels eines reversen Temperiersystems die relative Luftfeuchte definiert eingestellt. Hierfür wird die synthetische Luft zunächst bei Raumtemperatur durch eine mit destilliertem Wasser gefüllte Waschflasche geführt und dabei mit hoher relativer Feuchte angereichert. In einer zweiten, ebenfalls mit destilliertem Wasser gefüllten, temperierbaren Waschflasche kühlt die Luft auf die gewählte Temperatur herunter, resultierend in der gewünschten, spezifischen relativen Luftfeuchte. Die Temperaturregelung erfolgt in einem Temperierbad mit elektronischem Kühlaggregat. Die zu- und abführenden Verbindungen des Temperiersystems bestehen aus praktischen Gründen aus flexiblem, chemisch inerten Vitonschlauch, die Übergänge zu den Waschflaschen sind mit Teflonschlauch abgedichtet. Zusätzlich zu den Prüfgasen und dem Trägergas synthetische Luft wird zur Aufrechterhaltung des pH-Wertes im Bicarbonat-gepufferten Zellkulturmedium ein konstanter Volumenstrom Kohlendioxid (CO_2) zugemischt. Da die Luftfeuchte zusätzlich Wandadsorption verhindert³⁵⁶, werden die Einzelgase direkt hinter den Gasflussreglern zusammengeführt und anschließend in die eigentliche Expositions-kammer geleitet.

Die eigens für die vorliegende Arbeit konstruierte Expositions-kammer besteht aus zwei Duranglasrohren von 100 mm bzw. 80 mm Länge und 200 mm Durchmesser (vergleiche hierzu den Konstruktionsplan in Abbildung 26). Diese werden mit Hilfe eines Schnellspannrings (200 mm, *Schott*) mittig über zwei Planflansche (NW 200, *Schott*) mit Nut und Dichtungsring (O-Ring, 200 mm, FEP, *Schott*) gasdicht zusammengesetzt. Beide Kammerhälften laufen auf der dem Flansch entgegengesetzten Seite über 150 mm trichterförmig in 10 x 2,2 mm Glasrohren von je 100 mm Länge aus. Die längere (100 mm) Kammerhälfte verfügt zusätzlich über zwei Gewindeein-sätze GL 18 zum Anschluss eines Temperierkreislaufes, die kürzere (80 mm) Hälfte besitzt einen zusätzlichen Glasansatz 18 x 1,5 mm von 15 mm Länge als Probe-nahmeport. Das Kammervolumen beträgt 9,068 l.

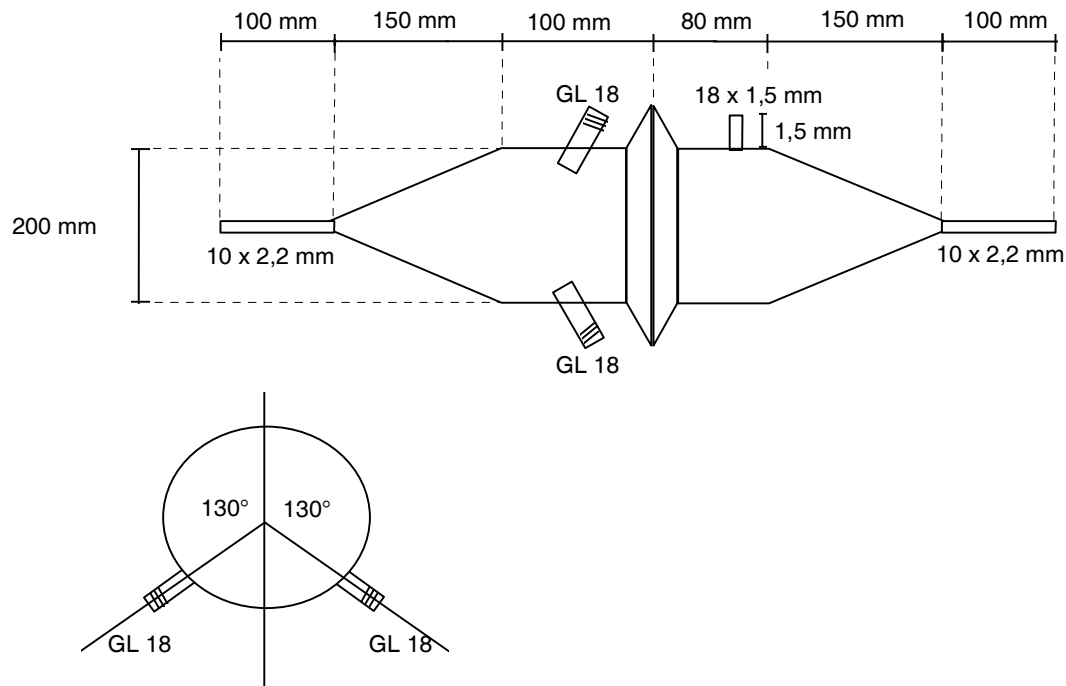


Abbildung 26: Konstruktionsplan der Expositionskammer

Durch die zwei GL 18 Gewindeeinsätze wird ein flexibler Vitonschlauch geführt, der spiralförmig mit Heißkleber unter einer Edelstahlplatte (von 170 x 115 mm Größe, 2 mm Dicke, mit 10 mm gekanteten Rändern) fixiert und an ein weiteres Temperierbad angeschlossen wird. Auf der somit temperierbaren Edelstahlplatte werden die Zellkulturschalen im zentralen Gasfluss exponiert. Die Fläche der Edelstahlplatte ist der der Zellkulturschalen angepasst, so dass die Simultanexposition von bis zu 12 Zellkulturen möglich ist.

Der mit einem Teflonstopfen abdichtbare Probenahmeport dient der Istwertkontrolle physikalischer Messgrößen, wie Temperatur und relativer Feuchte. Für die Messung im Inneren der Expositionskammer wird der Teflonstopfen entfernt und der Spalt zwischen Messgerät und Probenahmeport mit Teflonband abgedichtet. Ebenso werden durch einen durchbohrten Vitonstopfen am Probenahmeport spezifische Gasvolumina auf Aktivkohleröhrchen gezogen (vergleiche hierzu Kapitel 4.7.1.1).

Die Expositionsapparatur wurde in einem Sicherheitsabzug mit Aktivfilter installiert, so dass freigesetzte Stoffe weder in die Innenraumluft noch unfiltriert in die Außenluft gelangen können. Für die Expositionskammer wurde ein Untergestell mit U-förmigen, an die Glaskammer angepassten Halbbögen konstruiert (vergleiche Abbildung 27). Mit einem spannbaren Edelstahlbügel wurde die mit Gaszuleitung und Temperiereinheit verbundene Kammerhälfte auf dem Postament permanent

fixiert. Die zweite Kammerhälfte blieb für Einsatz und Entnahme der Zellkulturplatten flexibel montierbar. Anschließend wurde sie ebenfalls mit einem spannbaren Edelstahlbügel fixiert. Abbildung 28 zeigt die gesamte Expositionsapparatur, Abbildung 29 eine Aufnahme der Expositions-kammer im Detail.

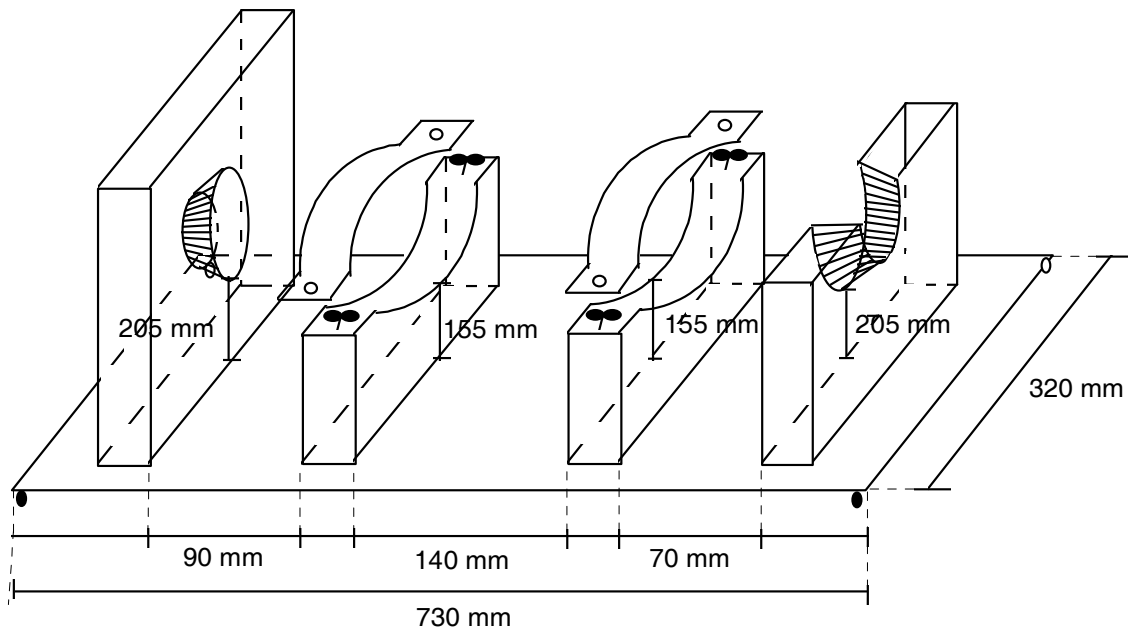


Abbildung 27: Konstruktionsplan des Kunststoffpostaments

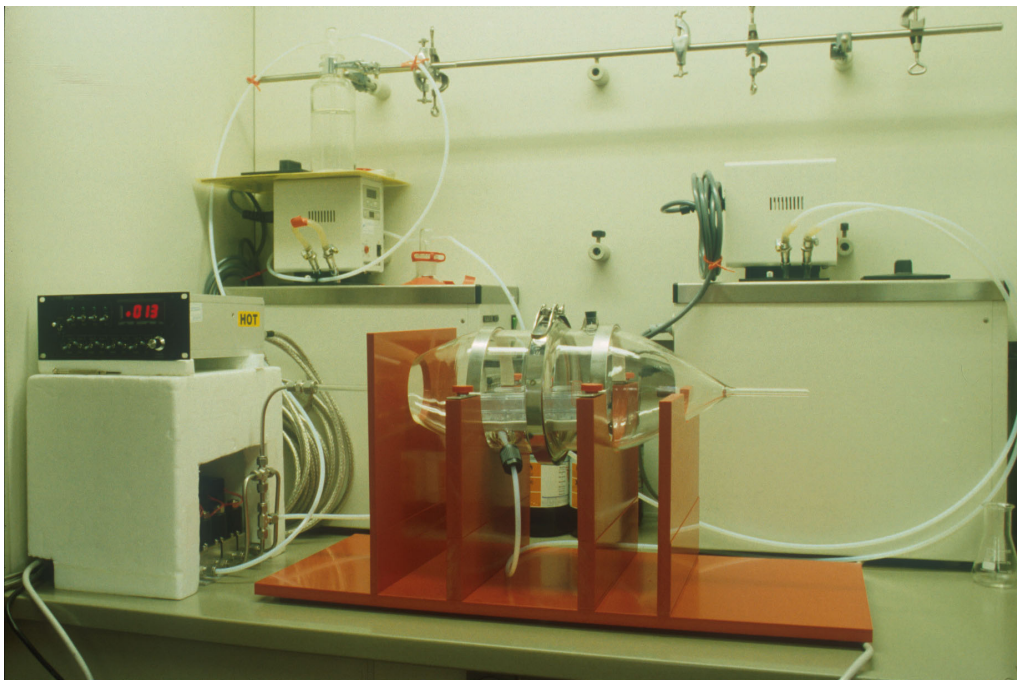


Abbildung 28: Photo der Expositionsapparatur

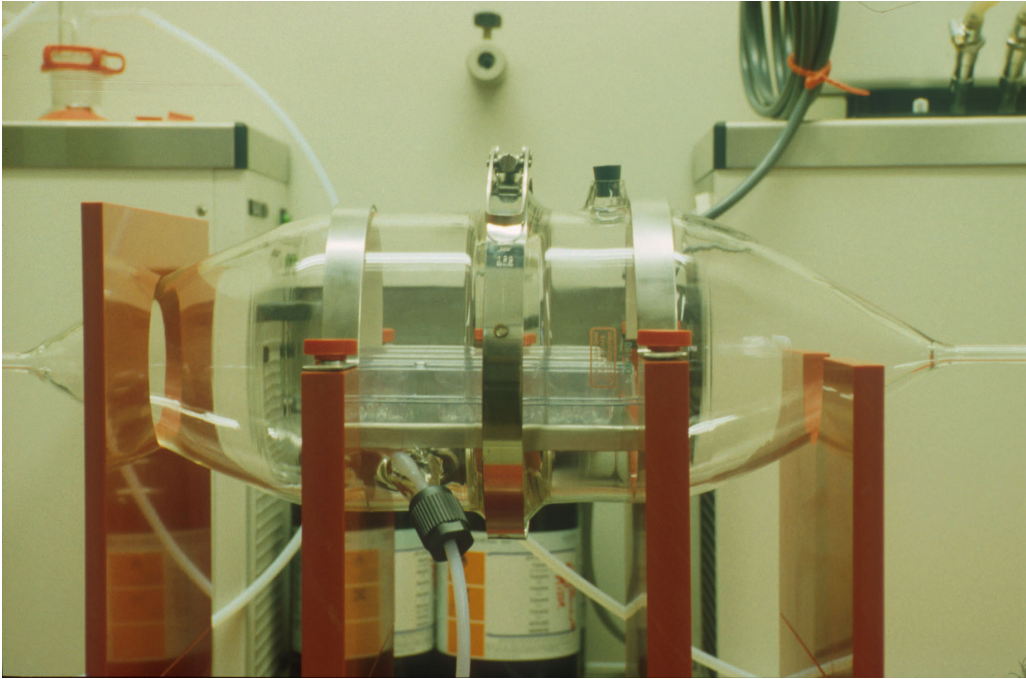


Abbildung 29: Detailaufnahme der Expositions-kammer

5.6 Evaluation der Expositionsapparat – Charakterisierung der Stabilität und Zuverlässigkeit physikalisch-chemischer sowie biologischer Parameter

Die Expositionsapparat wurde zunächst in einer Serie von Experimenten hinsichtlich prinzipieller Funktionsfähigkeit sowie optimaler Betriebsparameter sorgfältig evaluiert. Hierzu wurden als erstes folgende Vorversuche zur Charakterisierung physikalisch-chemischer Parameter durchgeführt:

- ◆ Auswahl eines geeigneten Gesamtvolumenstroms
- ◆ Einstellung einer umweltrelevanten relativen Feuchte im Gesamtvolumenstrom
- ◆ Temperaturregulierung der Zellkultursysteme in der Expositions-kammer
- ◆ Bestimmung des apparaturbedingten Totvolumens

Unter Einsatz der Expositionsapparat sollten die Wechselwirkungen von flüchtigen, organisch-chemischen Stoffen (VOC) mit humanen Keratinozyten untersucht werden. Die Versuchsbedingungen der Experimente sind im Methodenkapitel 4.6.2 eingehend erläutert. Neben ersten Erkenntnissen zur Wirkungsrelevanz der VOC in

Hinsicht auf das atopische Ekzem beim Menschen (dargestellt ab Kapitel 5.7), dienten diese ersten Untersuchungen vor allem auch der Demonstration und weiteren Charakterisierung der Funktionsfähigkeit der Apparatur. Zusätzlich zu den oben genannten wurden weitere, sowohl rein von der Expositionsapparatur als auch vom Zellkultursystem abhängige Parameter ermittelt:

- ◆ VOC-Konzentration in der Gasphase
- ◆ VOC-Konzentration im Flüssigmedium
- ◆ Verdunstungsrate und pH-Wert des Zellkulturmediums
- ◆ Vitalität und Zellzahl

5.6.1 Auswahl eines geeigneten Gesamtvolumenstroms

Bei der Festlegung des erforderlichen Gesamtvolumenstroms müssen folgende Faktoren berücksichtigt werden: Mit 9,068 l hat die Expositions-kammer ein relativ großes Volumen. Um die Wandabsorption der Gase möglichst gering zu halten, ist ein genügend großer Volumenstrom notwendig. Bei zu großem Volumenstrom besteht jedoch die Gefahr einer hohen Verdunstungsrate des Zellkulturmediums. Je geringer aber der Fluss, umso größer ist die Gefahr der Ausbildung von Diffusionsbarrieren über dem Zellkulturmedium, so dass der Stofftransport durch stehende Luftgrenzschichten gestört würde. Ein weiterer wichtiger Faktor ist die Kontrollierbarkeit der Expositionsbedingungen. Eine Messung oder Probenahme über den Probenahmeport darf das Konzentrations- und Gasflusssystem nicht stören. Es muss also auch hierfür ein genügend großer Volumenstrom vorhanden sein.

Unter Berücksichtigung der oben aufgeführten Überlegungen bewährte sich experimentell ein Gesamtvolumenstrom von 500 ml/min. Ungeachtet des Totvolumens wird unter diesen Bedingungen eine Totalerneuerung des Gesamtvolumens in der Expositions-kammer in ca. 18 min gewährleistet. Der Gesamtvolumenstrom wurde in allen Versuchen unabhängig von der Schadgaskonzentration konstant eingehalten, um einen systematischen Fehler, durch beispielsweise veränderte Diffusionsprozesse, auszuschließen.

5.6.2 Einstellung einer umweltrelevanten relativen Feuchte im Gesamtvolumenstrom

Die relative Luftfeuchte hängt neben der absoluten Luftfeuchte, dem tatsächlichen Wassergehalt in g/m^3 Luft, entscheidend von Lufttemperatur und Luftdruck ab. Je wärmer die Luft, umso höher ist ihre Wasseraufnahmekapazität. Kühlt stark mit Wasserdampf angereicherte Luft ab, wird die Sättigungsgrenze überschritten, und ein Teil des Wassers kondensiert. Das zweistufige, reverse Temperiersystem zur Einstellung der relativen Luftfeuchte in der Expositionsapparatur folgt diesem Prinzip: Bei Raumtemperatur wird das Trägergas synthetische Luft zunächst mit hoher Feuchte angereichert, in einem zweiten Schritt wird dann durch gezielte Temperatureinstellung die gewünschte relative Luftfeuchte eingestellt.

Da realistische, umweltrelevante Außenluftbedingungen simuliert werden sollten und in der Bundesrepublik Deutschland in mittleren Höhen im Jahresmittel eine relative Luftfeuchte von 50-60 % herrscht, wurde die relative Feuchte auf diesen Wert eingestellt. Da ausschließlich eine Befeuchtung des Grundgases erfolgte, war experimentell die relative Feuchte des Gesamtvolumenstroms maximal in der Größenordnung des prozentualen Anteils des Trägergases am Gesamtvolumenstrom realisierbar. Die Justierung des reversen Temperiersystems musste deshalb in Abhängigkeit von der relativen Zusammensetzung des Gesamtvolumenstroms des jeweiligen Expositionsansatzes erfolgen. Art und Anzahl der zu exponierenden Zellkultursysteme haben zusätzlich entscheidende Auswirkungen auf die relative Feuchte im System. So tragen submerse Kulturen durch die Größe ihrer Verdunstungsoberfläche in hohem Maße zur Befeuchtung der Atmosphäre der Expositions-kammer bei, während Organ-kulturen deutlich kleinere Verdunstungs-oberflächen aufweisen. Zusätzlich zur Einstellung des reversen Temperiersystems kann dieser Faktor durch Variieren der Temperatureinstellung der Proben-trageplatte in Relation zu der in der Kammer vor-herrschenden Lufttemperatur kompensiert werden. In der Simultanexposition von je 6 submersen Zellkulturen wurde so exemplarisch in 13 voneinander unabhängigen Expositionsansätzen eine mittlere relative Luftfeuchte von 57,8 % \pm 8,5 % erreicht. In unabhängigen Expositionsexperimenten von je 12 submersen Zellkultursystemen wurde eine mittlere relative Luftfeuchte von 61,5 % \pm 4,6 % erzielt, was einer relativen Standardabweichung von 7,5 % entspricht ($n = 22$). Zur Einstellung einer

konstanten relativen Feuchte von $\pm 1,5\%$ innerhalb eines Expositionsansatzes wurde eine Vorlaufzeit von 45-55 min benötigt.

Abbildung 30 zeigt exemplarisch den typischen Verlauf der relativen Luftfeuchte nach dem Einsetzen einer Kulturschale mit 6 submersen Zellkulturen in die vorkonditionierte Expositionsapparatur. Durch das Öffnen der Kammer herrschten zu Beginn der Exposition annähernd Raumluftbedingungen von $28,0^\circ\text{C}$ und $41,8\%$ relative Feuchte. Der Gasvolumenstrom betrug 475 ml/min synthetische Luft und 25 ml/min CO_2 . Die zweite Waschflasche des Temperiersystems wurde auf 5°C gekühlt, die Temperierplatte in der Kammer hatte Raumtemperatur. Innerhalb weniger Minuten war ein starker Anstieg der relativen Luftfeuchte mit einem Maximum bei 8-10 min zu verzeichnen. Anschließend sank der Wert langsam wieder ab. Schließlich stellte sich nach etwa 45-55 min eine konstante Luftfeuchte von $53,2\% \pm 0,5\%$ ein. Die Lufttemperatur entsprach mit $28,1^\circ\text{C} \pm 0,1\text{ K}$ der Raumtemperatur, die Medientemperatur lag bei $27\text{-}28^\circ\text{C}$. Die Istwerte von relativer Luftfeuchte und Temperatur wurden in „online“-Direktmessungen über eine Messsonde im Probenahmeport der Expositions-kammer erhoben.

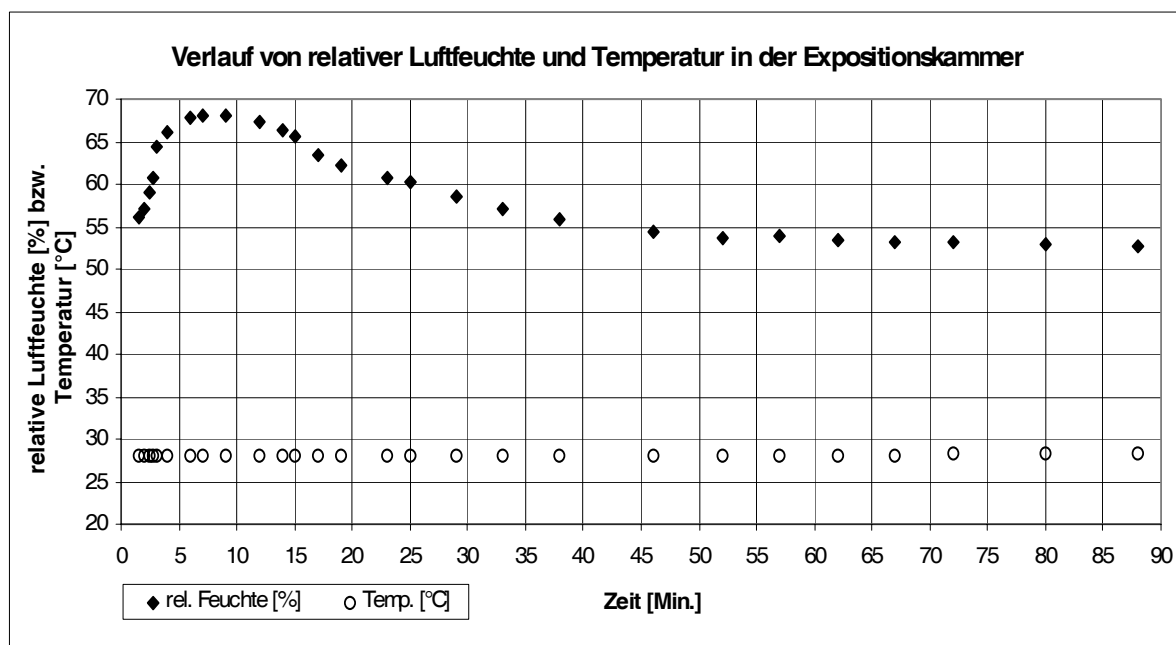


Abbildung 30: Verlauf der Parameter relative Luftfeuchte und Temperatur bei der Exposition von submersen Zellkultursystemen (Datentabelle siehe Anhang A3.4)

5.6.3 Temperaturregulierung der Zellkultursysteme in der Expositionskammer

Die Exposition der Zellkultursysteme erfolgt auf einer temperierbaren Edelstahlplatte im zentralen Gasfluss, die eine konstante Temperatur der Zellkulturmedien während der Exposition gewährleistet.

Unter *in vitro*-Standardbedingungen werden Zellkulturen bei 37°C inkubiert. *In vivo* weist die menschliche Haut einen Temperaturgradienten von 37°C in der Dermis bis 33°C in oberen Epidermisschichten auf.

Blieb die Temperiereinheit ausgeschaltet, entsprachen Luft- und Medientemperatur in der Expositionskammer der im Sicherheitsabzug vorherrschenden Raumtemperatur, die aufgrund der Abwärme der elektronischen Geräte üblicherweise um etwa 2°C über der Innenraumtemperatur lag (Febr.-April: 22,2 °C +/- 1,0 K (n = 13), Mai-Juli: 26,0°C +/- 1,3 K (n = 22)). In Abhängigkeit von der Einstellung einer relativen Luftfeuchte von 50 % bis maximal 60 % (vergleiche vorheriges Kapitel) war für submerse Zellkultursysteme eine Temperaturregulierung von maximal 34°C Wassertemperatur, resultierend in 31°C Zellkulturmedientemperatur möglich. Für Organkulturen konnten bei 38°C Wassertemperatur Werte bis 34°C im Zellkulturmedium erreicht werden. Die Lufttemperatur in der Expositionskammer betrug dabei 29,3°C bis 29,5°C bzw. 32,3°C bis 32,6°C.

Exemplarisch in 21 voneinander unabhängigen Expositionsversuchen submerser Zellkulturen erhobene Lufttemperaturdaten wiesen bei einem Minimum von 24,5°C und einem Maximum von 27,5°C einen mittleren Wert von 25,7°C +/- 0,9 K auf, was einer relativen Standardabweichung von 3,5 % entspricht. Die Vorlaufzeit bis zu einer Temperaturkonstanz von +/- 0,2 K innerhalb eines Expositionsansatzes betrug 15-20 min.

5.6.4 Bestimmung des apparaturbedingten Totvolumens

Um über die gesamte Expositionsdauer konstante Versuchsbedingungen zu gewährleisten, muss das apparaturbedingte Totvolumen bekannt sein. Es gibt Auskunft über den benötigten Gasvorstrom bzw. die Vorlaufzeit zur Einstellung konstanter Versuchsbedingungen bezüglich Prüfgaskonzentration, relativer Feuchte und Temperatur in der Expositionskammer.

Bei einem Gesamtvolumenstrom von 500 ml/min wurden nach 3-4 Minuten, entsprechend 1,5-2,0 l Volumen, erste Veränderungen in der Expositions-kammer messbar. Nach 15-20 min Einstellzeit konnten konstante Temperatur-, nach 45-55 min konstante Feuchtwerte gemessen werden (vergleiche Abbildung 31 sowie Abbildung 30 in Kapitel 5.6.2). Eine konstante Prüfgaskonzentration stellte sich ebenfalls nach einer Vorlaufzeit von 45-50 min ein. Das Totvolumen der Apparatur beträgt demnach 22,5 l bis 25 l. Der nur 2,5fache Wert des Kammervolumens spricht zum einen für die Dichtigkeit des Systems und zum anderen für das Auftreten nur sehr geringer Wandadsorptionseffekte.

Abbildung 31 zeigt exemplarisch die Einstellung der relativen Luftfeuchte in der Expositions-kammer bei konstanter Temperatur, ausgehend von einem mit unbefeuchteter, synthetischer Luft vorkonditionierten, zellkulturfreien System. Die Veränderung der relativen Luftfeuchte fand direkt ohne zeitliche Verzögerung statt, ein konstanter Wert wurde nach etwa 45-55 min erreicht. Die Daten wurden durch „online“-Messungen der Temperatur und relativen Feuchte im Inneren der Expositions-kammer erhoben.

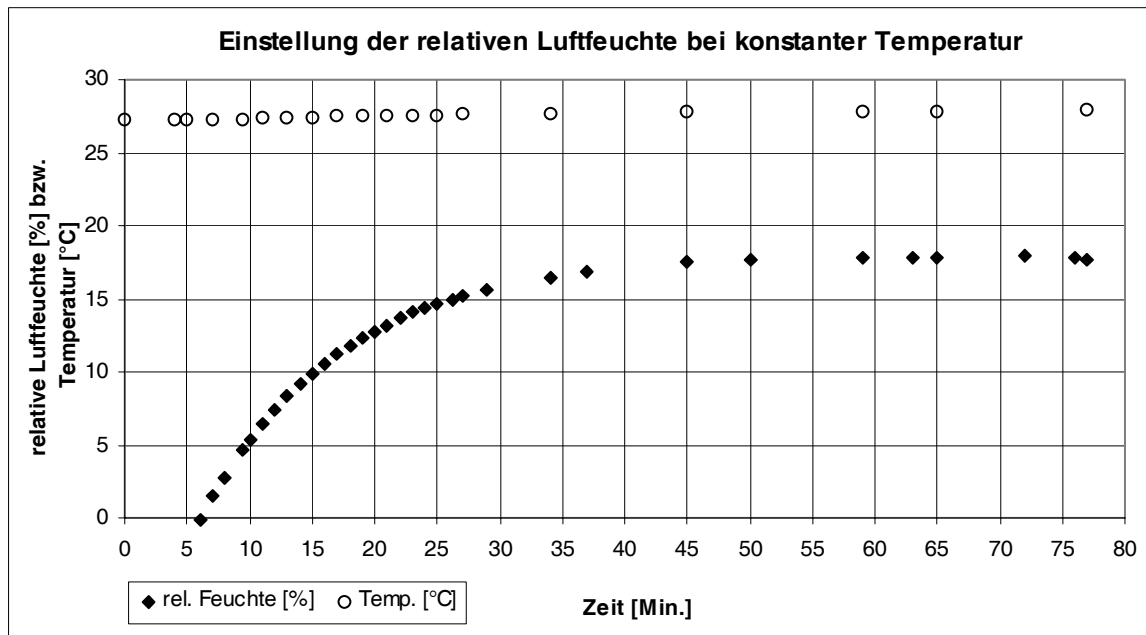


Abbildung 31: Bestimmung des apparaturbedingten Totzeitvolumens anhand der relativen Luftfeuchte (Datentabelle siehe Anhang A3.5)

5.6.5 VOC-Konzentration in der Gasphase

Zum quantitativen Nachweis der realen VOC-Prüfgaskonzentration in der Expositions-kammer wurden definierte Probenvolumina auf Aktivkohleröhrchen gezogen, die angereicherten Analyten anschließend mit Benzylalkohol desorbiert und gaschromatographisch analysiert (Methode, siehe Kapitel 4.7.1).

Abbildung 32 zeigt exemplarisch ein typisches Chromatogramm. Die Trennung der Analyten auf der apolaren Säule erfolgte nach Siedepunkten. So erscheint Toluol als am stärksten flüchtige Komponente als erster Peak nach einer Retentionszeit von 4,10 min, gefolgt von m-Xylol nach 6,14 min. Die Retentionszeiten blieben mit einer maximalen Abweichung von 0,007 min stabil. Die Trennung erfolgte bei 100°C. Nach 8 min begann die Ausheizphase bei schließlich 220°C, in der die Säule mit einem Hauptpeak nach 10,18 min von dem Desorptionsmittel Benzylalkohol gereinigt wird. Der Peak bei 8,59 min stellt eine Oxokomponente, eine Verunreinigung des Benzylalkohols dar. Mit diesem Temperaturprogramm wurde eine klare Trennung der Analyten erreicht, mit Hilfe des Splitverhältnisses am Injektor und der Regulierung des Signals am Detektor wurde die Peakhöhe optimiert. Die Peakfläche ist der Analytkonzentration proportional.

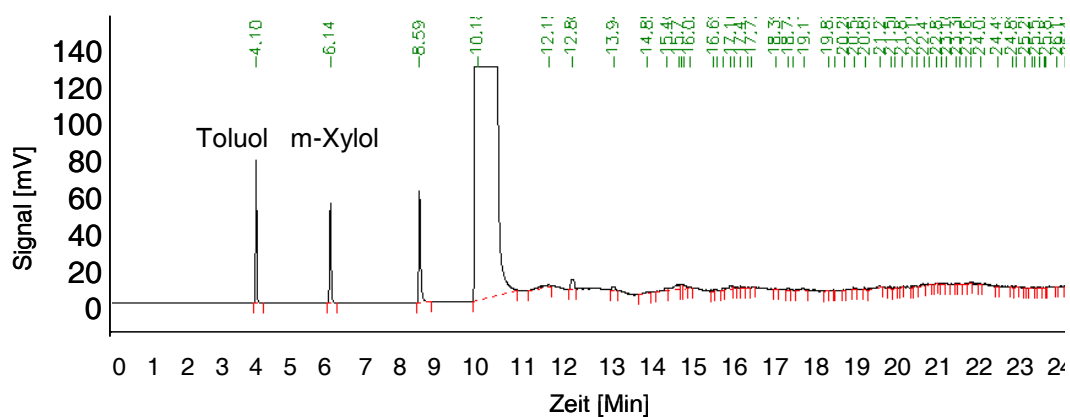


Abbildung 32: Chromatogramm konventioneller Gaschromatographie

Untersucht wurden 37 Analytprobenröhrchen aus 34 Expositionen. Für die Quantifizierbarkeit mit Hilfe eines linearen 6-Punkt-Kalibrierbereichs von 0-750 µg/ml Toluol bzw. m-Xylol ergaben sich die in Tabelle 8 dargestellten Grenzwerte.

Tabelle 8: Nachweis-, Erfassungs- und Bestimmungsgrenze der Analyten Toluol und m-Xylol durch konventionelle Gaschromatographie

	Toluol	m-Xylol
Nachweisgrenze	58,98 µg/ml	63,97 µg/ml
Erfassungsgrenze	118,0 µg/ml	127,9 µg/ml
Bestimmungsgrenze	199,9 µg/ml	216,8 µg/ml

In den Mehrfachbestimmungen ($n = 2$ oder $n = 3$) aller Proben wurden in den Konzentrationsbereichen von 0-405 µg/ml Toluol und 0-887 µg/ml m-Xylol relative Standardabweichungen von $\sigma_{\text{pooled}} = 5,5 \%$ erzielt. Die über die Gasflussregler eingestellten Konzentrationen wurden mit einer Genauigkeit von 89 % +/- 10 % erreicht. Das entspricht einer statistischen, relativen Unsicherheit von 11 %, davon entfallen 5,5 % auf die relative Messgenauigkeit der gaschromatographischen Methode.

Zur Qualitätssicherung der VOC-Analytik wurden Untersuchungen zum Einfluss möglicher Störkomponenten durchgeführt. Neben der in Kapitel 4.7.1.3 beschriebenen Kalibrierung des analytischen Systems wurden Blindwert, Sammeleffizienz und Desorptionsrate bestimmt. Außerdem wurde die Lagerstabilität der Probennahmesysteme geprüft:

In den aus Kontrollexpositionen mit reiner synthetischer Luft und CO₂ stammenden Proben ergab sich ein Blindwert von 0,00. Es fanden sich keinerlei Spuren von VOC aus vorherigen Expositionen. Zur Ermittlung von Sammeleffizienz und Desorptionsrate wurden Kalibrierlösungen bekannter Analytkonzentration analysiert. Die Kalibrierlösungen wurden sowohl mit als auch ohne Aktivkohle analysiert. Aus dem Quotienten der Peakflächen ließ sich eine Desorptionsrate von im Mittel 96,8 % +/- 9,9 % über 126 analysierte Kalibrierlösungen ermitteln.

Mehrfachbeprobungen einer identischen Expositionssituation mit anschließenden Analysen zu unterschiedlichen Zeitpunkten wiesen unter den im Methodenkapitel 4.7.1.1 beschriebenen Bedingungen eine Lagerstabilität der Analyten von mindestens vier Wochen nach. Zusammen mit den Analytproben gelagerte, unbeprobte Aktivkohleröhrchen ließen als Negativkontrollen zudem eine Kreuzkontamination während der Analytprobenaufbewahrung ausschließen.

5.6.6 VOC-Konzentration im Flüssigmedium

Die Keratinozyten im submersen Zellkultursystem hatten aufgrund der Überschichtung mit Nährmedium keinen direkten Kontakt zur Gasphase. Die submersen Zellen wurden daher effektiv mit der aus der VOC-Konzentration in der Gasphase resultierenden VOC-Konzentration im Zellkulturmedium exponiert. Die Quantifizierung der im Zellkulturmedium gelösten VOC erfolgte mittels manueller „headspace“ Gaschromatographie (vergleiche 4.7.2). Als Referenzwerte dienten unter der Voraussetzung idealer Gas-, Strömungs- und Diffusionsbedingungen theoretisch ermittelte Gelöststoffkonzentrationen (vergleiche Abbildung 33): Die unter idealen Bedingungen in die Flüssigphase übertretenden VOC-Konzentrationen entsprachen im Mittel, abhängig von der Temperatur, zwischen 0,25 % (20°C) und 0,41 % (30°C) für m-Xylol, bzw. für Toluol zwischen 0,29 % (20°C) und 0,47 % (30°C) der in der Gasphase eingesetzten VOC-Konzentrationen (vergleiche Datentabelle in Kapitel 4.7.2.3). Zur Berechnung der Stoffübergänge im VOC-Gleichgewicht zwischen Gas- und Flüssigkeitsphase wurden, wie im Kapitel 4.7.2.3 ausgeführt, das Daltonsche und das Henrysche Gesetz herangezogen²⁵³.

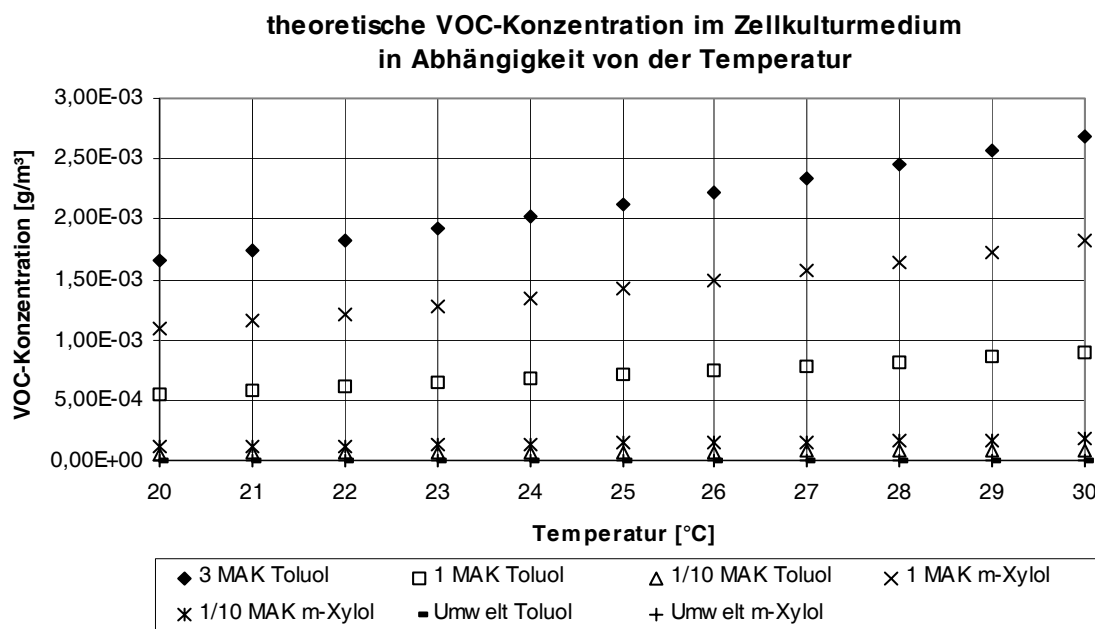


Abbildung 33: Zu erwartende Konzentration der unter idealen Gasbedingungen im Zellkulturmedium gelösten VOCs in Abhängigkeit von der Temperatur. Die Legende gibt die in der Gasphase vorliegenden Ausgangsstoffkonzentrationen an (Datentabelle siehe Kapitel 4.7.2.3).

Abbildung 34 zeigt exemplarisch ein typisches „headspace“ Chromatogramm. Nach einem kleinen Injektionssignal bei 1,32 min und einer Zellkulturmedienkomponente bei 1,43 min folgt nach 2,79 min das Signal für Toluol, gefolgt von dem m-Xylol-Signal nach 4,18 min. Die substanzcharakteristischen Retentionszeiten blieben mit Abweichungen $< 0,003$ min dauerhaft konstant.

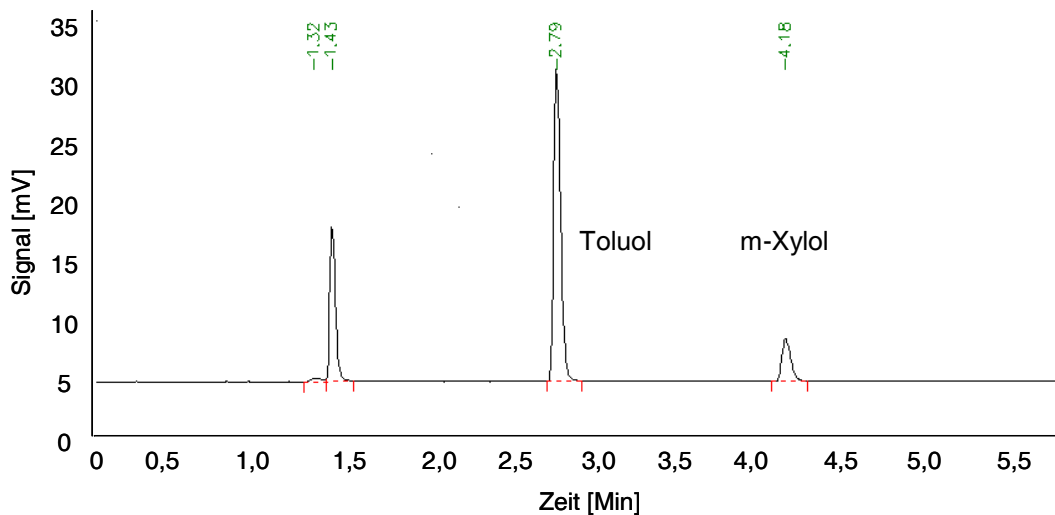


Abbildung 34: Chromatogramm der manuellen „headspace“ Gaschromatographie

Bei dem zunächst eingesetzten Zellkulturmedium K-SFM mit einem Hauptpeak bei 1,430 min sowie Nebensignalen bei 1,935 min, 2,783 min und 3,310 min kam es zu einer Überlagerung mit dem Toluolsignal bei 2,790 min. Als praktikabler erwies sich ein vergleichbares Keratinozytenmedium KGM, das lediglich die folgenden Signale in der „headspace“-GC aufzeigt: ein Nebensignal bei 1,365 min und, wie K-SFM, einen Hauptpeak bei 1,430 min.

Aufgrund der schlechten Löslichkeit von flüssigem Toluol und m-Xylol im wässrigen System war es schwierig, homogen konzentrierte Kalibrierlösungen herzustellen. Vielfach wurden so zum einen die den vollzogenen Verdünnungsschritten theoretisch entsprechenden Konzentrationsverhältnisse nicht erreicht. Zum anderen schwankte die Reproduzierbarkeit in Mehrfachmessungen identischer Kalibrierlösungen zwischen 8,7 % und 62,6 %. Bezogen auf unterschiedliche Kalibrierlösungen wurden somit die theoretischen, im Phasengleichgewicht unter idealen Bedingungen erreichbaren VOC-Konzentrationswerte einer Probe zu zwischen 70 % und 200 % erreicht. Eine Kalibration auf absolute Konzentrationen war daher nicht möglich.

Jedoch waren - unabhängig vom Kalibrationssystem - die Messsignale bezogen auf die Konzentrationen proportional und reproduzierbar: Die Flächenwerte für Toluol und m-Xylol wiesen im Mittel aller erhobenen Mehrfachmessungen eine Standardabweichung von 12,3 % auf. Durch Standardisierung und Optimierung der in Kapitel 4.7.2.2 beschriebenen Methode konnten schließlich in Wiederholmessungen ($n = 3$ oder $n = 5$) Standardabweichungen von $< 10\%$ sowie in Reihenmessungen mit zwischengeschalteten Raumluftanalysen „memory“ Effekte von $< 1\%$ der zuvor analysierten Probenpeakfläche erreicht werden. Die jeweils 12 Zellkulturen desselben Expositionsversuchs zeigten eine relative Standardabweichung ihrer Peakflächen von σ_{pooled} aller Expositionsexperimente = 14,4 %, unabhängig von der Lokalisation der Kulturen in der Zellkulturplatte und in der Expositions-kammer.

Nach Kontrolleexpositionen mit 95 % synthetischer Luft und 5 % CO_2 wurden keinerlei Spuren von Toluol oder m-Xylol in den Zellkulturüberständen nachgewiesen. In mit umweltrelevantem VOC-Gemisch exponierten Medien wurden Peakflächen um 1000 μVs qualitativ ermittelt. Diese Werte waren jedoch nicht zuverlässig quantifizierbar. Als niedrigste VOC-Konzentration konnte mit der angewandten Methode der aus der Exposition mit 1 MAK m-Xylol resultierende Medium-VOC-Gehalt sicher quantifiziert werden. Die Reproduzierbarkeit der Peakflächen in Mehrfachmessungen identischer Proben zeigte keinen Unterschied zu der höherer VOC-Konzentrationen wie 1 bzw. 3 MAK Toluol. Die relativen Standardabweichungen innerhalb der 12 Zellkulturen *identischer Expositionsexperimente* betragen im Mittel aller 1 MAK m-Xylol-Expositionen $\sigma_{\text{pooled}} = 13,9\%$, im Vergleich zu $\sigma_{\text{pooled}} = 14,7\%$ aller 1 MAK Toluol-Expositionen und $\sigma_{\text{pooled}} = 14,5\%$ aller 3 MAK Toluol-Expositionen. Die Streuung der Peakflächen *aller analysierten Proben derselben Expositionsvariante* betrug für Expositionen mit 1 MAK m-Xylol $\sigma_{\text{pooled}} = 13,5\%$, für Expositionen mit 1 MAK Toluol $\sigma_{\text{pooled}} = 13,9\%$ und für Expositionen mit 3 MAK Toluol $\sigma_{\text{pooled}} = 22,2\%$. Die Daten aus 5 h, 8 h, 18 h und 24 h Expositionsdauer waren dabei jeweils homogen über den gesamten Wertebereich verteilt. Das Phasengleichgewicht wurde demnach in allen Expositionszeitvarianten gleichermaßen erreicht.

(Die hier zugrundeliegende Versuchsmatrix wird in den Kapitel 4.6.2, 5.7.1 und 5.7.2 ausführlich erläutert.)

5.6.7 Verdunstungsrate und pH-Wert des Zellkulturmediums

Als weitere vom Zellkultursystem abhängige Daten wurden die Verdunstungsrate und der pH-Wert des Nährmediums bestimmt. In direkter Abhängigkeit von der Größe der überströmten Oberfläche sowie der Temperatur und relativen Feuchte der Luft ergab sich eine relative mittlere Verdunstungsrate von 18,5 % \pm 4,9 % über die Expositionsdauer (absolute Standardabweichung 6,0 %, n = 90), die in Absolutwerten einem Flüssigkeitsverlust von 0,52 ml \pm 0,25 ml bei 2,81 ml \pm 0,13 ml Ausgangsvolumen entsprach.

In Analogie zu Standardbedingungen in der Zellkulturinkubation diente während der Exposition ein gleichbleibend konstanter Kohlendioxidgehalt von 5 % der Aufrechterhaltung des pH-Wertes im Bicarbonat-gepufferten Zellkulturmedium. Bei einem konstanten Gesamtvolumenstrom von 500 ml/min in allen Versuchen wurde das Kohlendioxid (CO₂) unabhängig von der Schadgaskonzentration mit einem Volumenstrom von 25 ml/min dosiert. Auf diese Weise wurde, unabhängig von Substanz und Konzentration des Prüfgases, eine pH-Wertkonstanz im Rahmen von \pm 0,02 (0,3 %) um pH 7,28 (n = 31) erreicht. Identische Zellkulturansätze, die parallel zur Expositionsdauer unter Standardbedingungen im Brutschrank inkubiert wurden, wiesen Werte von pH 7,29 und pH 7,30 auf.

5.6.8 Vitalität und Zellzahl

Im Anschluss an die der Exposition folgenden 48 h-Inkubation unter Standardbedingungen im Zellkulturinkubator wurden zelluläre Parameter wie Vitalität und Zellzahl bestimmt. Die Zellvitalität von 42 exponierten Kulturen, gemessen durch die zwei voneinander unabhängigen Methoden Trypanblauausschluss und Lactatdehydrogenasefreisetzung, betrug unabhängig von Art und Dauer der Exposition 87,4 % \pm 11,7 %. Bisbenzimidfärbungen zeigten zudem keine apoptotisch verdichteten Zellkerne. Die mittlere Zellzahl aus 60 exponierten Zellkulturen betrug $2,4 \cdot 10^5 \pm 1,0 \cdot 10^5$ Zellen, was einer relativen Standardabweichung von 41,7 % entsprach. Hierbei musste jedoch der relativ hohe methodische Fehler der Zellzahlbestimmung von 10-15 % berücksichtigt werden, der sich im vorliegenden Fall aufgrund der niedrigen Zellzahlen um zusätzliche 10-20 % auf 25-35 % erhöhte. Die Höhe der absoluten Zellzahl war aufgrund des Aussaatareals von 7,07 cm² in der 6-,„well“-Platte limitiert.

5.7 Analyse von VOC-Effekten auf humane Keratinozyten – Einsatz der Expositionsapparatur in allergotoxikologischen Fragestellungen

5.7.1 Versuchskonditionen für die *in vitro* Expositionen von humanen Primärkeratinozyten gegenüber umweltrelevanten Schadstoffen

Als Modellsubstanzen für Schadstoffe in straßenverkehrsbelasteten Regionen kamen die flüchtigen, organischen Verbindungen Toluol und, als Hauptkomponente der Xylol-Isomere in der Umwelt, m-Xylol zum Einsatz. Von einem Einsatz von dem mit Toluol und Xylol vielfach vergesellschafteten Benzol wurde aufgrund seiner mutagenen Wirkung in diesem Projekt abgesehen, da ausschließlich inflammatorische und immunmodulatorische Schadstoffeffekte untersucht werden sollten. Um substanzspezifische Effekte sowie umweltrelevante Kombinationseffekte zu untersuchen, erfolgten sowohl Expositionen gegenüber Einzelstoffen als auch gegenüber einem Stoffgemisch. Da unterschiedliche reale Expositionssituationen unter kontrollierten Bedingungen untersucht werden sollten, wurden einerseits umweltrelevante Außenluftbedingungen simuliert: Die Zielkonzentration des in Konzentration und Zusammensetzung (Toluol : Xylol im Verhältnis 3 : 2) für Straßenverkehrsbelastungssituationen typischen Toluol/m-Xylol-Gemischs wurde auf der Basis epidemiologischer Freiluftmessungen gewählt^{230,231}. Die andererseits als Referenzkonzentrationen dienenden Stoffkonzentrationen der Einzelkomponenten Toluol und m-Xylol wurden in Anlehnung an die Richtlinien für maximale Arbeitsplatzkonzentrationen (MAK) gewählt: In toxikologischen *in vitro* Experimenten der MAK-Kommission werden üblicherweise Stoffkonzentrationen von 0,1 MAK, 1 MAK und 3 MAK eingesetzt. Da erste Erkenntnisse über die Qualität, Quantität und Konzentrationsabhängigkeit VOC-induzierter Effekte gewonnen werden sollten, wurde aufgrund der hohen Anzahl von Versuchsvariablen zugunsten einer breiteren Konzentrationsspanne bis 3 MAK auf Expositionen gegenüber 0,1 MAK verzichtet. Unter Einsatz statischer Prüfgase auf Basis synthetischer Luft in Konzentrationen von 500 ppm sowie 1000 ppm Toluol bzw. 500 ppm m-Xylol sowie einem Prüfgasgemisch mit 0,7 ppm Toluol und 0,4 ppm m-Xylol wurden schließlich Expositionsbedingungen von 1 und 3 MAK Toluol, 1 MAK m-Xylol sowie von einem umweltrelevanten Verhältnis von

0,08 mg/m³ Toluol und 0,053 mg/m³ m-Xylol realisiert*. Eine Exposition gegenüber 3 MAK m-Xylol war im Rahmen der hier vorgesehenen Versuchsdurchführung technisch nicht möglich, da aufgrund des Dampfdrucks die Gaskonzentration in Stahlflaschenabfüllungen 500 ppm m-Xylol, bzw. 1000 ppm Toluol nicht übersteigen kann. Höher konzentrierte Gase würden bei der Komprimierung verflüssigt, so dass für diese Konzentrationen eine dynamische Prüfgaserzeugung in einem Prüfgasgenerator angezeigt wäre.

In den durchgeführten Experimenten wurde der Fokus somit auf Toluol als Leitkomponente für Aromaten und VOC gelegt: In der Außenluft tritt es als stärkste Komponente in Straßenverkehrsbelastungssituationen auf; im Innenraum bilden vor allem Lösungsmittel aus Farben, Bodenbelägen und Möbeln die Hauptquelle des Toluol. Daher werden Stoffkonzentrationen und Kalibrierungen üblicherweise auf Toluoläquivalente bezogen.

Zur Analyse von Kurzzeiteffekten wurden Expositionen von 5 h Dauer durchgeführt. Da MAK-Richtwerte immer auf die Expositionsdauer einer Arbeitsschicht bemessen sind, wurde eine weitere Probenahme nach 8 h Exposition vorgenommen. Vielfach äußern sich Schadstoff-induzierte Effekte als verzögerter Reaktionstyp. Zudem sind Transportprozesse von VOC in die Haut wie innerhalb der Haut und die dafür benötigte Zeit nicht bekannt. Möglicherweise wird eine Anzahl von Effekten erst durch Stoffwechselprodukte hervorgerufen. Auch der Zeitbedarf für die Verstoffwechslung spezifischer Schadstoffe in der Haut ist unbekannt. Deshalb wurden in einem weiteren Versuchsansatz über 18 h und 24 h Expositionsdauer mögliche Langzeiteffekte untersucht.

Luftexponierte Hautorganoidkulturen konnten zum Zeitpunkt der Expositionsversuche nicht in ausreichender Qualität produziert werden und ließen daher keine

* Der in dieser Arbeit verwendete Terminus „Exposition gegenüber x MAK Toluol bzw. m-Xylol“ bezieht sich generell auf die VOC-Expositionskonzentrationen in der Gasphase. Die im submersen Zellkultursystem schließlich auf die Zellen einwirkenden VOC-Konzentrationen sind um Größenordnungen niedriger (<1%) als die in der Gasphase applizierten VOC, da die im Zellkulturmedium enthaltenen VOC-Konzentrationen aus dem Phasengleichgewicht mit der MAK-orientierten VOC-Gaskonzentration resultieren. Die im Zellkulturmedium enthaltenen Stoffkonzentrationen können prinzipiell nicht mit MAK-Richtwerten verglichen werden, da sich letztere in [ppm] auf vol/vol-Konzentrationen innerhalb der Gasphase beziehen und nur hierfür gültig sind.

reproduzierbaren Ergebnisse erwarten. Als Zellkultursystem wurden daher – als ein Modell des proliferierenden Stratum basale – submerse Primärzellkulturen humaner Keratinozyten eingesetzt (Passagen 2-4). Die Expositionsversuche simulierten so das im Fall der Barrierschädigung des atopischen Ekzems postulierte Eindringen von VOC in tiefere, generative Hautschichten. Vergleichend wurden Primärzellen aus Biopaten normalgesunder Haut, ferner aus läsionaler sowie nicht läsionaler Haut von Probanden mit atopischem Ekzem eingesetzt. Vorversuche hatten nach 48 h Kultur eine maximale Anreicherung der Zytokine im Zellkulturmedium unter gleichzeitig ausreichender Nährstoffversorgung und vitalen Kulturbedingungen gezeigt (vergleiche Kapitel 5.7.3.1). Auf die Aussaat identischer Zellzahlen folgte daher – zur anschließenden Analyse der Spontansekretion – eine Inkubationszeit von 48 h unter Standardbedingungen (37°C, 5 % CO₂, 95 % relative Luftfeuchte). Anschließend fand die Exposition gegenüber VOC statt, gefolgt von erneutem Mediumwechsel und weiteren 48 h Standardinkubation. Die 48 h Zellkulturüberstände wurden gesammelt (vergleiche Methodenkapitel 4.6.2) und hinsichtlich ihres VOC-, LDH-, und Zytokin-gehalts vergleichend analysiert. Als Zellkulturmedium wurde KGM eingesetzt, da es im Gegensatz zu K-SFM eine gaschromatographische Trennung des Toluolsignals von Signalen einzelner Medienkomponenten erlaubte (vergleiche Vorversuche, Kapitel 5.6.6). Die VOC-Expositionen wurden unter den folgenden, in Vorversuchen optimierten Expositionsbedingungen durchgeführt (vergleiche Kapitel 5.6): Simultanexposition von 12 submersen Zellkulturen, 25,7°C +/- 0,9 K Lufttemperatur, 31°C Mediumtemperatur, 61,5 % +/- 4,6 % relative Luftfeuchte, 5 % CO₂, Medien-pH 7,28 +/- 0,02, 500 ml/min Gesamtvolumenstrom. Für ein vollständig faktorielles, balanciertes Versuchsdesign wurden pro Fallgruppe und Expositionsvariable jeweils mindestens fünf Experimente durchgeführt. Für alle Fallgruppen und Expositionszeiten wurden jeweils Kontrollexpositionen mit 95 % synthetischer Luft und 5 % CO₂ in der Apparatur sowie unter Standardbedingungen im Inkubator durchgeführt.

Als Zielparameter zum Nachweis inflammatorischer und immunmodulatorischer Effekte wurde die Abspaltung bzw. Sekretion der proinflammatorischen Zytokine Tumornekrosefaktor α , Interleukin 1 α , Interleukin 6 und Granulozyten-Makrophagen-Kolonie-stimulierender Faktor durch VOC-exponierte Keratinozyten gewählt. Wie einleitend dargestellt (vergleiche Kapitel 1.2, Seite 10 bis 12), löst die Freisetzung dieser Zytokine in das umgebende Gewebe *in vivo* eine para- sowie autokrine, proinflammatorische Signalkaskade aus und kann so wesentlich zur Entstehung und

Unterhaltung von kutanen Entzündungs- und Immunreaktionen beitragen⁸⁶⁻⁹¹. Die Konzentrationen der in das Zellkulturmedium freigesetzten Zytokine wurden mittels eines kommerziellen ELISA-Messsystems bestimmt. Neben der ELISPOT-Technik^{280,373} – die jedoch für adhärent wachsende Zellen wie Keratinozyten eher ungeeignet ist – war der Zytokin-ELISA zur Zeit der Experimentdurchführung die einzige Methode, um extrazelluläre, freigesetzte Zytokinkonzentrationen nachzuweisen. Als Schlussfolgerung aus der in der ELISA-Qualitätskontrolle nachgewiesenen „inter“- und „intraassay“-Reproduzierbarkeit identischer Zytokinkonzentrationen (vergleiche 5.7.3.2) wurden alle jeweils vor und nach Exposition gesammelten 48 h-Kulturüberstände derselben Zellkultur ausschließlich innerhalb derselben ELISA-Platte analysiert. Prinzipiell wurden alle Proben nur einmal aufgetaut und anschließend alle Parameter bestimmt. Eine durch Zellyse bedingte Mediatorfreisetzung wurde mittels negativem LDH-Nachweis im Zellkulturmedium ausgeschlossen. D. h., die gemessenen Zytokinkonzentrationen resultierten aus einem aktiven Zytokin-sezernierungsprozess.

Eine Übersicht über die Experimentvariablen der VOC-Expositionsversuche (Fallgruppen, Expositionsvariablen, Expositionsdauer und ein Zeitschema der Experimente) befindet sich im Anhang (Kapitel A1) dieser Dissertation.

5.7.2 Deskriptive Statistik zu den VOC-Expositionsversuchen

Die Spender der exponierten Primärkeratinozyten gliederten sich in zwei voneinander unabhängige Stichproben freiwilliger Probanden: eine Kontrollgruppe mit normalgesunder Haut sowie eine Gruppe Atopiker mit atopischem Ekzem.

Die Kontrollgruppe setzte sich aus 19 Individuen (9 w, 10 m) im Alter von 30 bis 80 Jahren zusammen. Ihr Atopiestatus bezüglich atopischen Ekzems, Asthma bronchiale und allergischer Rhinitis war negativ, nur eine Person war Raucherin. Die Fallgruppe mit extrinsischem, atopischen Ekzem bestand aus 9 Individuen im Alter von 22 bis 60 Jahren. Die genaue Zusammensetzung und der Atopiestatus der Gruppe ist der Tabelle 9 zu entnehmen. Diese Fallgruppe unterteilte sich in zwei weitere, in 7 Fällen paarig verbundene Stichproben, da sowohl Keratinozyten aus läsionaler Ekzemhaut als auch aus nicht läsionaler Haut desselben Individuums isoliert wurden.

Tabelle 9: Fallgruppe atopisches Ekzem

ID	Alter	Genus	Probenlokalisierung		Atopiestatus			Raucher
			läsional	nicht läsional	atop. Ekzem	Asthma	Rhinitis	
AA	26	w	Hand	Gesäß	+	+	+	-
AW	28	w	Armbeuge	Gesäß	+	-	+	-
DK	22	w	Kniekehle	Gesäß	+	+	+	-
GK	31	w	Genick	Gesäß	+	-	-	+
GS	58	m	-	Schulter	+	+	-	-
MK	60	m	Gesäß	Gesäß	+	-	+	-
SH	27	w	Hand	Gesäß	+	-	+	+
SW	27	w	Genick	Gesäß	+	-	-	-
VM	26	w	Armbeuge	-	+	-	-	-

Insgesamt wurden in der Expositionsapparatur 66 voneinander unabhängige Experimente mit in der Regel jeweils 12, insgesamt 665 subkonfluenten Zellkulturen durchgeführt. 162 dieser Kulturen wurden in Vorversuchen für die Dauer von jeweils 24 h vor und nach der Exposition inkubiert, 503 Kulturen für eine Zeit von jeweils 48 h. Eine genaue Aufschlüsselung dieser 503 Zellkulturen nach den Expositionsvariablen ist der Tabelle 10 zu entnehmen. Die Exposition jeder Zellkultur wurde als *Doppelansatz* ($n = 251$) aus *identischer Zellsuspension simultan* durchgeführt. Zu einem *späteren Zeitpunkt* wurden *Zellkulturen desselben Individuums* unter *gleichen Expositionsbedingungen* erneut exponiert. Ebenso wurde mit *allen Individuen derselben Fallgruppe* verfahren. Die zeitliche Reihenfolge der einzelnen Wiederholungsexperimente erfolgte zufällig. Bei der Durchführung der Experimente wurden die Fallgruppen als Einheit angesehen, so dass innerhalb jeder Fallgruppe alle Kombinationen der Expositionsvariablen mehrfach durchgeführt wurden, jedoch nicht jede Kombination mit jedem Individuum. Die Individuen gingen somit unterschiedlich häufig in die Experimente einer Fallgruppe ein. Tabelle A3.7 (Anhang) zeigt eine Auflistung der Daten aller Expositionsversuche getrennt nach Fallgruppen und Individuen.

Tabelle 10: Anzahl exponierter Zellkulturen mit 48 h Inkubation vor und nach Exposition unter Aufschlüsselung der Expositionsvariablen. Angegeben sind jeweils die Gesamtanzahl der exponierten Zellkulturen sowie in Klammern die Anzahl der den Zellkulturen zugrundeliegenden Individuen (KZ = Kurzzeitexpositionen von 5 h und 8 h, LZ = Langzeitexpositionen von 18 h und 24 h).

Gaskonzentration	Kontrolle normal		atop. Ekzem läsional		atop. Ekzem nicht läsional		Gesamtanzahl exp. Kulturen		
	KZ	LZ	KZ	LZ	KZ	LZ	KZ	LZ	gesamt
1 MAK Toluol	16 (6)	16 (5)	16 (5)	18 (7)	16 (6)	14 (6)	48	48	96
3 MAK Toluol	22 (4)	34 (4)	14 (4)	18 (4)	24 (5)	20 (6)	60	72	132
1 MAK m-Xylol	16 (7)	28 (7)	12 (3)	12 (4)	18 (4)	20 (7)	46	60	106
Umwelt Toluol/m-Xylol	18 (6)	16 (4)	10 (3)	18 (3)	20 (5)	38 (7)	48	72	120
Kontrolle synth. Luft	4 (2)	4 (2)	4 (2)	4 (2)	4 (2)	4 (2)	12	12	24
Inkubator-Kontrolle	4 (2)	6 (2)	6 (3)	2 (1)	4 (2)	3 (2)	14	11	25
Gesamtanzahl exponierter Kulturen	80	104	62	72	86	99			
	184 (19)		134 (8)		185 (8)				
	503 (28)								

5.7.3 Qualitätskontrolle von ELISA-Messsystem und Messergebnissen

5.7.3.1 Sensitivität des ELISA-Messsystems

Die Konzentrationen freigesetzter Zytokine wurden mittels ELISA-Technik in den Zellkulturüberständen nach jeweils 24- bzw. 48-stündiger Inkubation desselben Zellkulturansatzes vor und nach dessen Exposition bestimmt. Die für Einfachproben geltende Nachweis-, Erfassung- und Bestimmungsgrenze jeder ELISA-Platte wurde nach dem linearen Kalibrierkurvenverfahren nach DIN 32645^{257,258} ermittelt (vergleiche Tabelle 11). Die Nachweisgrenze (NG) entspricht dabei der Konzentration, die laut Kalibrierfunktion dem kritischen Wert der Messgröße zuzuordnen ist, d.h. Zytokine dieser Konzentration werden in 50 % der Fälle qualitativ als vorhanden und der Wert als größer der Leerprobe reinen Zellkulturmediums erkannt ($p = 0,01$). Die Erfassungsgrenze (EG), im Fall gleich großer Fehler 1. und 2. Art ($\alpha = \beta$) der zweifachen Nachweisgrenze entsprechend, gibt den Mindestgehalt an, dessen Nachweis mit einer Wahrscheinlichkeit von größer gleich 99 % erfolgt ($p = 0,01$). Erst oberhalb der Bestimmungsgrenze (BG) wird die Zytokinkonzentration mit einer relativen Ergebnisunsicherheit von 25 % ($k = 4$) mit dem vorgegebenen Signifikanzniveau von $p = 0,01$ zuverlässig quantitativ bestimmt.

Tabelle 11: Kalibrierbereich sowie Nachweis-, Erfassungsgrenze und Bestimmungsgrenze der Zytokin-Assays. Angegeben sind die arithmetischen Mittelwerte $\pm 1\sigma$ Standardabweichung der Stichprobe. (Grenzwerte aller ELISA-Platten siehe Anhang A3.6)

Zytokin	Kalibrierbereich [pg/ml]	Anzahl ELISA-Platten	Nachweisgrenze [pg/ml] $p = 0,01$	Erfassungsgrenze [pg/ml] $p = 0,01$	Bestimmungsgrenze [pg/ml] $p = 0,01, k = 4$
IL-1 α	1,638-160	21	6,1 \pm 4,1	12,1 \pm 8,3	27,4 \pm 24,2
IL-6	1,638-160	21	5,9 \pm 4,4	11,8 \pm 8,7	22,8 \pm 17,4
GM-CSF	2,458-240	21	4,7 \pm 2,5	9,4 \pm 5,0	17,7 \pm 9,5
TNF α	1,638-160	7	10,5 \pm 5,2	21,0 \pm 10,5	48,2 \pm 30,0

Vorversuche ergaben, dass Keratinozytenkulturen ($n=162$) mit einer Aussaatdichte von $1 \cdot 10^5$ Zellen/7,1 cm² und 3,0 ml Zellkulturmedium innerhalb 24 h Inkubationszeit – sowohl spontan als auch nach VOC-Exposition – nur äußerst geringe Zytokinkonzentrationen in das Zellkulturmedium freisetzen. So war weder spontan noch nach VOC-Exposition freigesetztes TNF α in den 24 h-Zellkulturüberständen nachweisbar. Weniger als 10 % der 24 h-Konzentrationswerte für sezerniertes IL-6 lagen oberhalb der Nachweisgrenze von im Mittel 5,9 pg/ml \pm 4,4 pg/ml, jedoch deutlich unterhalb der Bestimmungsgrenze von 22,8 pg/ml \pm 17,4 pg/ml. Für GM-CSF, gleichermaßen vor und nach der Exposition, und IL-1 α , überwiegend Konzentrationswerte vor der Exposition, wurden ca. 70 % der 24 h-Konzentrationswerte oberhalb der Nachweisgrenze ermittelt (GM-CSF: 4,7 pg/ml \pm 2,5 pg/ml; IL-1 α : 6,1 pg/ml \pm 4,1 pg/ml). Doch weniger als 10 % dieser Werte lagen oberhalb der Bestimmungsgrenze von 17,7 pg/ml \pm 9,5 pg/ml für GM-CSF bzw. 27,4 pg/ml \pm 24,2 pg/ml für IL-1 α und waren somit zuverlässig quantifizierbar. Eine Abhängigkeit von der mit geringer Schwankungsbreite eingesetzten Zellzahl ergab sich dabei nicht.

Um eine stärkere Aufkonzentrierung der freigesetzten Zytokine im Zellkulturmedium zu erreichen, wurden die Kulturbedingungen in Richtung auf eine maximale Zellzahl sowie ein minimal benötigtes Mediumvolumen und eine maximal mögliche Inkubationszeit bei gleichzeitig ausreichender Nährstoffversorgung variiert. Das Aussaatareal der 6-„well“-Zellkulturplatte erlaubte mit einer Fläche von 7,1 cm² pro Vertiefung bei einer Aussaatdichte von $1 \cdot 10^5$ Zellen und 3,0 ml Zellkulturmedium unter vitalen Kulturbedingungen eine maximale Zytokinkonzentrationsanreicherung innerhalb einer Inkubationszeit von 48 h. Lediglich für TNF α lagen auch die nach 48 h Inkubation ermittelten Konzentrationswerte im Bereich von 0,0-0,2 pg/ml vor der Exposition bzw. 0,0-0,5 pg/ml nach der Exposition in allen Proben deutlich unterhalb der Nachweisgrenze. Da die Primärkeratinozyten also weder spontan, noch unter VOC-Expo-

sition messbare $\text{TNF}\alpha$ -Konzentrationen freisetzen, wurde in weiteren Untersuchungen vom Nachweis dieses Parameters abgesehen. Die anderen Zytokine wurden im Vergleich zur 24 h-Inkubation innerhalb 48 h deutlich stärker angereichert: Tabelle 12 zeigt anhand der Quantifizierbarkeit durch das ELISA-Analysesystem die Verteilung der in den Experimenten erzielten Konzentrationsdaten der innerhalb 48 h freigesetzten Zytokine in je 503 Zellkulturüberständen vor und nach Exposition. Sie gibt somit – gemittelt über alle Fallgruppen und Expositionsvarianten – einen ersten Eindruck über Spontansekretion und mögliche Expositionseffekte: Die Primärkeratinozyten zeigten eine starke GM-CSF-Freisetzung. Über 50 % der Konzentrationsdaten wurden oberhalb der Bestimmungsgrenze von 17,7 pg/ml +/- 9,5 pg/ml ermittelt. Ferner wurde eine hohe Spontansekretion von Interleukin 1α , aber nur geringfügige Interleukin 6-Sekretion – über 50 % der Konzentrationswerte vor und nach der VOC-Exposition waren kleiner als die Nachweisgrenze bei 5,9 pg/ml +/- 4,4 pg/ml – nachgewiesen. Während sich für GM-CSF und IL-6 die relative Verteilung der Zytokinkonzentrationsdaten vor und nach Exposition kaum veränderte, war für IL- 1α eine deutliche Reduzierung der Zytokinkonzentrationen nach erfolgter Exposition erkennbar.

Tabelle 12: Quantifizierbarkeit der Zytokine GM-CSF, IL- 1α und IL-6 im 48 h-Zellkulturüberstand. Angegeben ist jeweils die entsprechende Anzahl n verwertbarer Konzentrationswerte aus insgesamt 503 untersuchten Proben. [Eine Auflistung aller experimentellen Daten (Spontansekretion, Expositionsvariablen und Zytokinseznierung nach Exposition sowie ELISA-Platten-ID und Zuverlässigkeit der Daten) getrennt nach Fallgruppen und Individuen ist Tabelle A3.7 (Anhang) zu entnehmen.]

	GM-CSF vor Exp.	GM-CSF nach Exp.	IL- 1α vor Exp.	IL- 1α nach Exp.	IL-6 vor Exp.	IL-6 nach Exp.
n < NG	51	50	46	254	264	296
NG < n < EG	68	78	67	116	81	97
EG < n < BG	88	106	102	75	58	47
n > BG	282	252	284	58	96	63
davon n extrapoliert	29	25	2	2	9	2
n gesamt	489	486	499	503	499	503

5.7.3.2 Reproduzierbarkeit des ELISA-Messsystems

Die Qualitätskontrolle bezüglich der Reproduzierbarkeit der experimentellen Ergebnisse beurteilt zum einen allein das Messsystem Zytokin-ELISA. Hierzu wurde

1. die Reproduzierbarkeit von Mehrfachmessungen identischer Zellkulturüberstände innerhalb derselben („intraassay“) oder in unterschiedlichen („interassay“) ELISA-Platten bestimmt (1),
2. die Wiederfindungsrate definierter Zytokinkonzentrationen unter dem Einfluss unterschiedlicher Toluol- und m-Xylolkonzentrationen der Probe im „intraassay“ untersucht (2),
3. zur Beurteilung der Zeitabhängigkeit der photometrischen Bestimmung derselben ELISA-Platte ein abhängiger „interassay“ durchgeführt (3).

ad (1): In analytischen Doppelbestimmungen identischer Zellkulturüberstände innerhalb derselben ELISA-Platte („intraassay“) wurde für 486 Doppelwertpaare mit Einzelwertkonzentrationen größer der Nachweisgrenze eine mittlere relative Standardabweichung von 13,8 % erzielt. Aufgetrennt nach Zytokinen ergaben sich folgende Werte: $\sigma_{IL-1\alpha} = 15,4 \%$, $\sigma_{IL-6} = 5,9 \%$, $\sigma_{GM-CSF} = 13,2 \%$.

Doppelbestimmungen identischer Zellkulturüberstände wurden zudem in voneinander unabhängigen ELISA-Platten durchgeführt („interassay“). Für Doppelwertpaare mit Einzelwertkonzentrationen größer der Nachweisgrenze wurde für IL-1 α die mittlere relative Standardabweichungen von $\sigma_{IL-1\alpha} = 29,6 \%$ für Konzentrationen von 1,7 pg/ml bis 43 pg/ml erzielt. Gleichmaßen wurde für GM-CSF eine mittlere relative Standardabweichung von $\sigma_{GM-CSF} = 44,8 \%$ für niedrige Konzentrationen von 5,7 pg/ml bis 17 pg/ml bzw. $\sigma_{GM-CSF} = 36,0 \%$ für hohe GM-CSF-Konzentrationen von 64 pg/ml bis 130 pg/ml erreicht. Das jeweilige Verhältnis der Zytokinkonzentrationen derselben Zellkulturen vor und nach der Exposition innerhalb einer Platte zeigt im „interassay“ jedoch nur eine mittlere relative Streuung um den Mittelwert von $\sigma = 15,2 \%$.

ad (2): Die Wiederfindungsrate definierter Zytokinkonzentrationen in mit unterschiedlichen Konzentrationen von Toluol/m-Xylol-angereichertem Medium (umweltrelevante Konzentration bis 3 MAK) war jeweils über den gesamten Kalibrierbereich für die Zytokine IL-1 α , IL-6 und GM-CSF größer als 95 %.

ad (3): Die photometrische Analyse identischer ELISA-Platten wurde in Zeitintervallen von 3 min mehrfach wiederholt. Die mittlere relative Standardabweichung aller Messdaten dieser abhängigen „interassay“ betrug 4,1 %, das Verhältnis der Einzeldaten zueinander blieb aber innerhalb der Messungen konstant.

5.7.3.3 Reproduzierbarkeit der Messergebnisse

Zusätzlich zur Reproduzierbarkeit des Messsystems bewertet die Qualitätskontrolle die Reproduzierbarkeit der Expositionsexperimente sowie die individuenabhängige, natürliche Streuung der Zytokinkonzentrationen. Hierzu wurde

1. die Streuung vergleichbarer Doppelansätze identischer Zellsuspensionen im identischen Expositionsversuch ermittelt (1),
2. die Streuung aller Wiederholungen solcher Doppelansätze mit Zellen desselben Individuums unter gleichen Expositionsbedingungen betrachtet (2),
3. alle unter gleichen Expositionsbedingungen erzielten Zytokinkonzentrationen von Zellkulturen unterschiedlicher Individuen derselben Fallgruppe verglichen (3).

Tabelle 13: Reproduzierbarkeit der Spontansekretion von GM-CSF aus humanen Primärkeratinozyten getrennt nach Konzentrationen unterhalb bzw. oberhalb der Bestimmungsgrenze (BG). Angegeben sind die mittlere relative Standardabweichung in [%] sowie in Klammern die absolute zusammengefasste Standardabweichung in [pg/ml].

Fallgruppen	> BG (6,59-515 pg/ml)			< BG (0,00-29,6 pg/ml)		
	vergleichbare Doppelansätze (1)	Wiederholungen pro Ind. (2)	Fallgruppe gesamt, alle Ind. (3)	vergleichbare Doppelansätze (1)	Wiederholungen pro Ind. (2)	Fallgruppe gesamt, alle Ind. (3)
Kontrolle normal	11,4 % (9,8)	39,2 % (32,5)	99,3 % (68,5)	33,9 % (2,2)	54,3 % (3,5)	61,0 % (4,2)
atop. Ekzem läsional	14,8 % (27,4)	60,6 % (58,2)	87,3 % (74,8)	31,4 % (2,8)	44,8 % (5,6)	62,8 % (6,8)
atop. Ekzem nicht läsional	10,0 % (18,3)	56,1 % (76,3)	118,8 % (99,9)	16,0 % (2,7)	44,4 % (7,7)	46,3 % (6,1)
Fallgruppen gesamt	11,9 % (20,0)	50,6 % (62,2)	105,4 % (84,9)	28,8 % (2,5)	49,5 % (5,4)	63,8 % (6,1)

Tabelle 13 zeigt exemplarisch die Reproduzierbarkeit für die Spontansekretion von GM-CSF innerhalb 48 h nach der Zellaussaat. Für das Zytokin Interleukin 1 α ergaben sich in allen Kategorien (1-3) etwas niedrigere relative Standardabweichungen, die Reproduzierbarkeit von Interleukin 6 war mit der von GM-CSF vergleichbar.

ad (1): Die mittlere Standardabweichung von 11,9 % für sicher quantifizierbare GM-CSF-Konzentrationen vergleichbarer Doppelansätze identischer Zellsuspensionen stimmte in allen Fallgruppen mit der durch das ELISA-Messsystem bedingten „intraassay“-Reproduzierbarkeit identischer Proben von $\sigma_{\text{GM-CSF}} = 13,3 \%$ (vergleiche oben) überein.

ad (2): Die intraindividuelle Streuung voneinander unabhängiger Doppelansätze lag mit im Mittel 50,6 % deutlich höher als die vergleichbarer Doppelansätze identischer Zellsuspensionen. Die Standardabweichungen erstreckten sich individualspezifisch über einen weiten Bereich von 8,8 % (Individuum HF) bis 81,9 % (Individuum ii) in der Kontrollgruppe, von 17,4 % (Individuum DK) bis 133,4 % (Individuum AW) in der läSIONalen Fallgruppe bzw. von 16,4 % (Individuum AA) bis 112,0 % (Individuum DK) in der Fallgruppe nicht läSIONales atopisches Ekzem. Obwohl einzelne Individuen mit sehr hohen intraindividuellen Streuungen die zusammengefassten Standardabweichungen dominierten, zeigten die drei Fallgruppenmittel jedoch auch hier vergleichbare Werte.

ad (3): Auch die interindividuellen Streuungen der gesamten Fallgruppe lagen mit gemittelten 105,4 % in allen Testgruppen in vergleichbarer Größenordnung. Diese hohe, interindividuelle Streuung der Zytokinkonzentrationen innerhalb der Fallgruppen wird im folgenden Kapitel 5.7.4 genauer analysiert.

Tabelle 13 unterscheidet zudem die Reproduzierbarkeit von Konzentrationswerten oberhalb und unterhalb der Bestimmungsgrenze. Im Vergleich zu den sicher quantifizierbaren Zytokinkonzentrationen wiesen vergleichbare, intraindividuelle Doppelansätze (1) mit Konzentrationen kleiner der Bestimmungsgrenze erhöhte Standardabweichungen auf. Unabhängige intra- (2) sowie interindividuelle (3) Konzentrationsdaten unterhalb der Nachweisgrenze zeigten dahingegen kleinere relative Standardabweichungen als die Konzentrationswerte oberhalb der Bestimmungsgrenze, wobei Konzentrationswerte kleiner der Nachweisgrenze höhere relative Streuungen aufwiesen als Werte oberhalb der Nachweis- oder Erfassungsgrenze. Eine auf den Gesamtmittelwert eines Konzentrationsbereichs von 6,59 bis 515 pg/ml bezogene relative Standardabweichung ist jedoch nicht direkt vergleichbar mit einer auf einen Wertebereich von 0,00 bis 29,6 pg/ml bezogenen relativen Streuung. Unter Berücksichtigung der statistischen Zuverlässigkeit sowie der Größe des jeweiligen Konzentrationsintervalls verfügten auch in Kategorie (2) und (3) die qualitativen Konzentra-

tionswerte unterhalb der Bestimmungsgrenze über eine größere statistische Unsicherheit als die quantifizierbaren Konzentrationswerte oberhalb der Bestimmungsgrenze.

Tabelle 14 zeigt exemplarisch die mittleren, über alle jeweils identischen Expositionskonditionen gemittelten Standardabweichungen quantitativ bestimmter GM-CSF-Konzentrationen aus 48 h Inkubation nach Expositionsende. Wie in der Spontansekretion wiesen die Zytokinkonzentrationen vergleichbarer Doppelansätze aus identischer Exposition (1) auch nach der Versuchsdurchführung lediglich Streuungen in der Größenordnung der durch das ELISA-Analysesystem bedingten Messungengenauigkeit auf. Intra- (2) und interindividuelle (3) Wiederholungsversuche zeigten nach erfolgter Exposition niedrigere Standardabweichungen, also eine höhere Reproduzierbarkeit als nach Spontansekretion vor der Exposition erzielt wurde. Dieses Ergebnis wurde sowohl nach Expositionen mit VOC als auch in Kontrollversuchen beobachtet. Wie nach Spontansekretion zeigten einzelne Individuen auch nach Exposition auffällig erhöhte oder niedrige Konzentrationen sowie individuen spezifische Standardabweichungen. Die Reproduzierbarkeit war dabei unabhängig von den unterschiedlichen Expositionskonditionen.

Tabelle 14: Vergleich der Reproduzierbarkeit quantifizierbarer, sezernierter GM-CSF-Konzentrationen aus humanen Primärkeratinozyten 48 h nach Exposition unter jeweils identischen Versuchskonditionen bezüglich Substanz, deren Konzentration und Expositionsdauer. Angegeben ist die mittlere relative Standardabweichung in [%].

Fallgruppen	mittlere relative Standardabweichung für		
	vergleichbare Doppelansätze pro ident. Expositionskonditionen (1)	Wiederholungen pro Individuum pro ident. Expositionskonditionen (2)	Fallgruppe gesamt, alle Individuen pro ident. Expositionskonditionen (3)
Kontrolle normal	11,6 %	17,3 %	56,5 %
atop. Ekzem läsional	11,3 %	39,2 %	55,4 %
atop. Ekzem nicht läsional	11,8 %	34,3 %	76,5 %
Fallgruppen gesamt	11,6 %	30,3 %	62,8 %

5.7.4 Spontansekretion der Zytokine GM-CSF, IL-1 α und IL-6

Abbildung 35 zeigt in individueller Auftrennung der Fallgruppen die Spontansekretion der Zytokine GM-CSF, Interleukin 1 α und Interleukin 6 innerhalb 48 h nach der Keratinozytenaussaat. Die Abszissenbeschriftung gibt zudem die Anzahl der Versuchswiederholungen pro Individuum an. Um in dieser Auswertung auch die qualitativen Konzentrationsdaten unterhalb der Bestimmungsgrenze zu berücksichtigen, wurden anstatt der auf quantitativen Absolutwerten basierenden arithmetischen Mittelwerte die intraindividuellen Mediane aufgetragen (Datentabellen siehe Anhang A3.8). Die 90 %-Konfidenzintervalle der Mediane zeigten eine interindividuell stark variierende intraindividuelle Variabilität. D. h., das Ausmass der in Wiederholungsexperimenten in unabhängigen Zellkulturen desselben Probanden ermittelten intraindividuellen Streuung der spontanen Zytokinsekretion unterschied sich stark zwischen den einzelnen Probanden. Auffallend waren ferner, insbesondere für die Zytokinsekretion von GM-CSF und IL-6, extreme interindividuelle Streuungen über einen breiten Konzentrationsbereich innerhalb der Fallgruppen. Einzelne Individuen mit in allen Einzelmessungen auffällig höheren oder niedrigeren Zytokinkonzentrationen als bei homogener Verteilung - d.h. einem ähnlichen Sekretionsverhalten der untersuchten Keratinozyten innerhalb einer Fallgruppe - zu erwarten wären, wurden im Histogramm mit Sternen markiert. Lediglich die Fallgruppe nicht läasionales atopisches Ekzem zeigte augenscheinlich eine weitestgehend homogene IL-1 α -Sekretion. Die Abbildung zeigt ferner intraindividuelle Signifikanzniveaus eines Homogenitätstests zwischen Keratinozyten läSIONALen und nicht läSIONALen Ursprungs (vergleiche dazu Text und Tabelle 17 auf Seite 142).

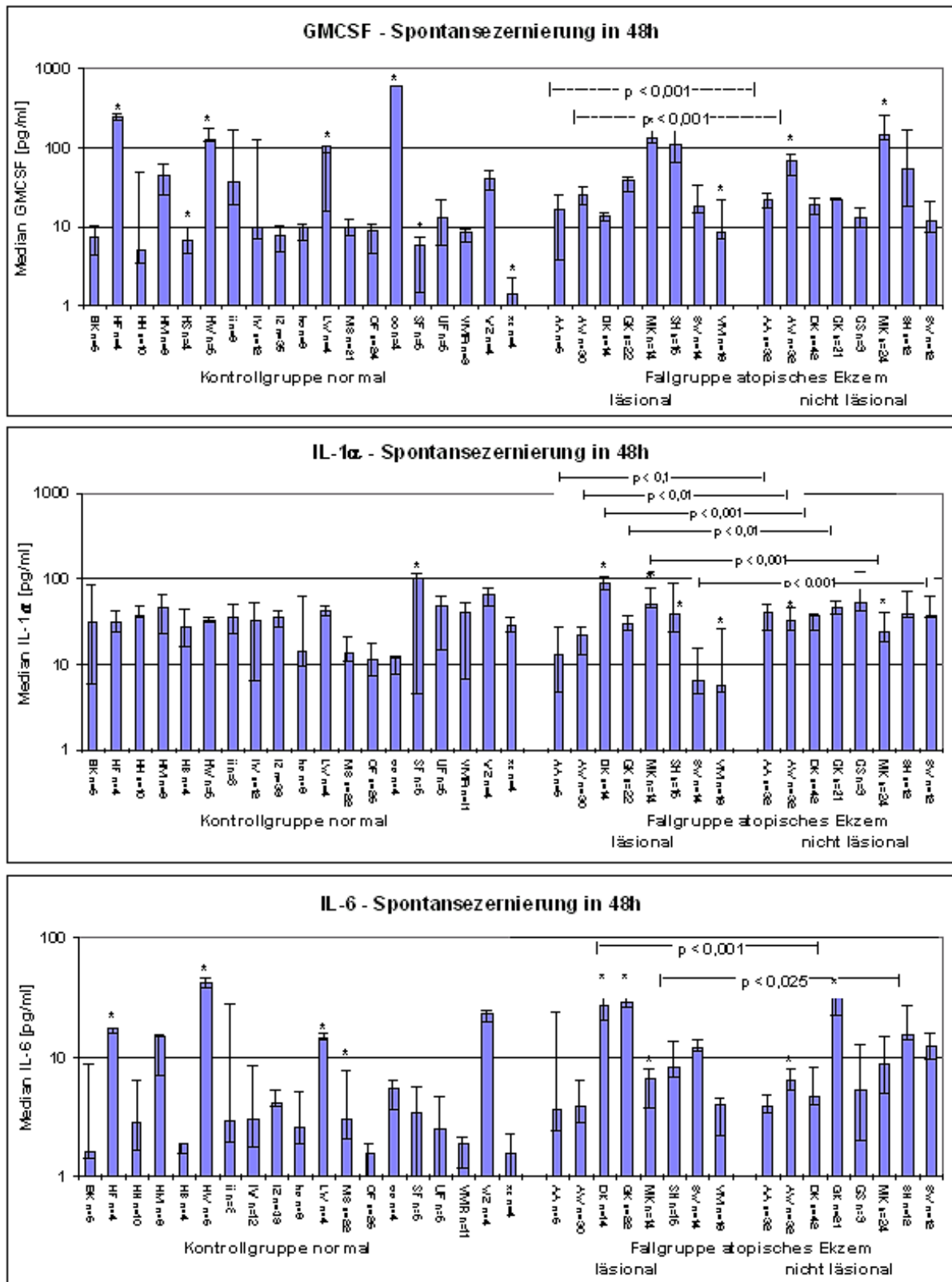


Abbildung 35: Spontansekretion der Zytokine GM-CSF, IL-1 α und IL-6 innerhalb 48 h nach der Keratinozytenaussaat unter individueller Auftrennung der Fallgruppen. Aufgetragen sind die Mediane mit dem 90 % Konfidenzintervall. Individuen mit in allen Messdaten auffällig erhöhten bzw. erniedrigten Zytokinkonzentrationen sind mit * gekennzeichnet, angegeben sind ferner intraindividuelle Signifikanzniveaus im Homogenitätstest innerhalb der Fallgruppe atopisches Ekzem (Tabelle 17).

Die Homogenität der Verteilung der individuellen Zytokinkonzentrationen innerhalb der Fallgruppen wurde mittels eines Chi Quadrat (χ^2) Homogenitätstests in Form einer Einweg-Varianzanalyse auf statistisch signifikante Individuenspezifitäten überprüft. Die Auswahl eines geeigneten statistischen Testverfahren wurde im Wesentlichen durch folgende Aspekte bestimmt:

Betrachtet man die Häufigkeitsverteilung der erhobenen Daten einzelner Zytokine für die einzelnen Fallgruppen ergeben sich rechtsschiefe, durch Ausreißerwerte weit gestreute, empirische Verteilungen (nicht gezeigt). Abbildung 36 zeigt exemplarisch die Häufigkeitsverteilung von spontanzerniertem Interleukin 1 α . Die logarithmische Transformation der Daten resultiert in unsymmetrischen, von einer logarithmischen Normalverteilung abweichenden, linksschiefen Verteilungen (vergleiche Histogrammdarstellung). Auch die rechte Plotdarstellung zeigt diese Abweichung: Bei vorliegender logarithmischer Normalverteilung würde man eine winkelhalbierende Gerade erwarten.

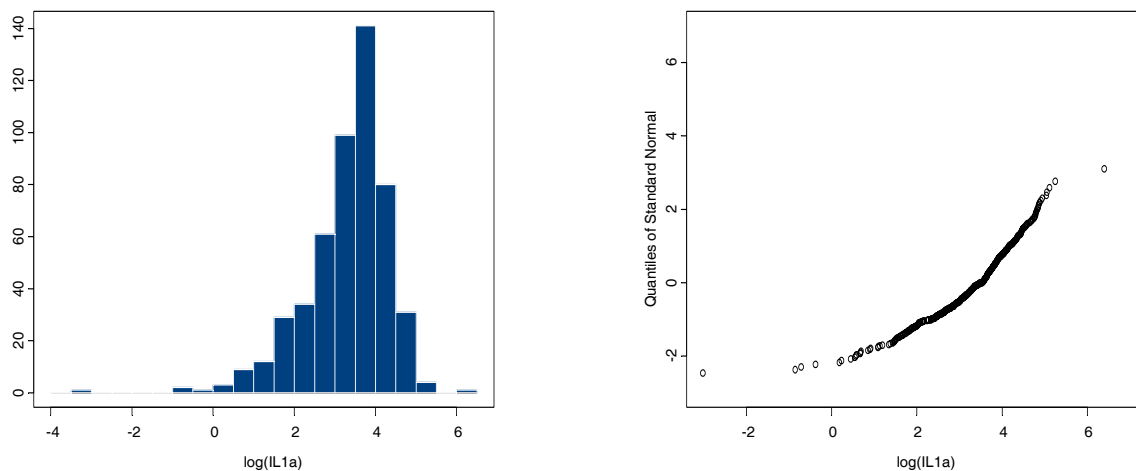


Abbildung 36: Häufigkeitsverteilung spontanzernierter Zytokinkonzentrationen von Interleukin 1 α aus humanen Primärkeratinozyten innerhalb 48 h Inkubation; links: Histogrammdarstellung der Häufigkeitsverteilung von IL-1 α in Konzentrationsklassen [$\log(\text{pg/ml})$], rechts: Plotdarstellung der logarithmisch transformierten IL-1 α -Konzentrationswerte

Da zudem die Zellkulturen einzelner Individuen unterschiedlich häufig in die Summe der Experimente einer Fallgruppe eingegangen waren, konnte aufgrund der in der Qualitätskontrolle beobachteten stark ausgeprägten, interindividuellen natürlichen Streuung der Zytokinkonzentrationen in der Auswertung nicht eindeutig auf die Verteilung der Grundgesamtheit geschlossen werden.

Zur Untersuchung der Homogenität der Daten ohne Verteilungsannahme wurde daher der Kruskal-Wallis Rangsummentest als nonparametrische χ^2 Statistik angewendet. Durch die Rangbildung wurden dabei, ähnlich wie bei einer logarithmischen Transformation, lineare Relationen in monotone Relationen überführt. Dies ermöglichte, dem geringeren Informationsgehalt qualitativer Konzentrationsdaten im Vergleich zu quantifizierbaren Konzentrationsdaten Rechnung zu tragen: Alle qualitativen Konzentrationsdaten unterhalb der Nachweisgrenze, unterhalb der Erfassungsgrenze bzw. unterhalb der Bestimmungsgrenze wurden jeweils gleichermaßen als Ränge 1, 2 bzw. 3 gewertet. Über die Kalibrierkurve extrapolierte Konzentrationswerte oberhalb der quantitativen Bestimmbarkeit wurden ebenfalls gleichbehandelt als der jeweils höchste Rang zusammengefasst. Ausreißerwerte erhielten durch die Rangbildung weniger „power“. Zusätzlich ermöglichte der Kruskal-Wallis Rangsummentest als Einweg-Varianzanalyse, die unterschiedlichen Wiederholhäufigkeiten der einzelnen Individuen der Fallgruppen zu berücksichtigen.

Tabelle 15: Überschreitungswahrscheinlichkeiten der Kruskal-Wallis χ^2 -Testgrößen zur Homogenität der Verteilung von individuellen, spontansezernierten Zytokin-konzentrationen innerhalb der Fallgruppen

Zytokin	Fallgruppe		
	Kontrolle normal	atopisches Ekzem läsional	atopisches Ekzem nicht läsional
GM-CSF	< 0,001	< 0,001	< 0,001
IL-1 α	< 0,001	< 0,001	< 0,2
IL-6	< 0,001	< 0,001	< 0,001

Die dem Versuchdesign zugrundeliegende Annahme, dass die Individuen zu homogenen Fallgruppen zusammengefasst werden können, bestätigte sich nicht: Mit Ausnahme der Gruppe nicht läsionales atopisches Ekzem in Bezug auf die Spontansekretion von IL-1 α wies die Kruskal-Wallis χ^2 Statistik für alle Fallgruppen und Zytokine mit hoher Signifikanz ($p < 0,001$) individuen-spezifische Zytokinkonzentrationen und somit eine heterogene, weit gestreute Verteilung innerhalb der Fallgruppen nach (vergleiche Tabelle 15). Die spontansezernierten Zytokinkonzentrationen der drei Fallgruppen streuten zudem in demselben Konzentrationsbereich, so dass sich große Teile der 90 %-Konfidenzintervalle überschneiden. Die über die Fallgruppen gemittelten Zytokinspontanseznierungen von Primärkeratinozyten aus gesunder Haut, aus läsionaler sowie nicht läsionaler

Haut von Probanden mit atopischem Ekzem unterschieden sich daher nicht signifikant voneinander (vergleiche Tabelle 16). Tendenziell sezernierten jedoch Keratinozyten aus den Fallgruppen atopisches Ekzem im Vergleich zur Kontrollgruppe höhere Zytokinkonzentrationen von GM-CSF und IL-6.

Tabelle 16: Fallgruppenspezifische Spontansekretionen pro Zytokin. Angegeben sind die Mediane der in Abbildung 35 aufgetragenen individuellen Zytokinkonzentrationen (d. h., die Individuen sind gleich stark repräsentiert) mit den 90 % Konfidenzintervallen (90 % CI).

Fallgruppe (n)	GM-CSF [pg/ml]		IL-1 α [pg/ml]		IL-6 [pg/ml]	
	Median	90% CI	Median	90% CI	Median	90% CI
Kontrolle gesund (192)	9,9	7,8-38,3	32,8	28,6-38,2	3,0	2,5-4,2
atopisch läsional (134)	21,9	13,3-111,0	25,9	6,2-49,0	7,3	3,9-26,7
atopisch nicht läsional (185)	22,1	12,8-69,2	38,9	32,1-45,5	7,4	4,6-15,4

Einzelne Individuen mit in allen Einzelmessungen auffällig höheren oder niedrigeren Zytokinkonzentrationen als bei homogener Verteilung innerhalb einer Fallgruppe zu erwarten wären, wurden im Histogramm mit Sternen markiert (vergleiche Abbildung 35). Unter diesen Individuen fanden sich zudem einige auffällige Korrelationen bezüglich des Spontansezernierungsverhaltens von unterschiedlichen Zytokinen: So setzten die Keratinozyten der Individuen HF, HW und LW aus der Fallgruppe normal gesunde Haut sowohl stark erhöhte Konzentrationen von GM-CSF als auch stark erhöhte IL-6-Konzentrationen frei, während Zellen der Individuen SF und xx auffällig niedrige Mengen GM-CSF sowie eher niedrige Mengen IL-6, SF dafür aber auffällig hohe Konzentrationen von IL-1 α freisetzten. Keratinozyten der Individuen MK und SH der Fallgruppe läsionale Ekzemhaut sezernierten dahingegen sowohl sehr hohe GM-CSF- als auch sehr hohe IL-1 α -Konzentrationen, während Zellen des Individuums VM auffällig niedrige Konzentrationen dieser beiden Zytokine sezernierten.

Mit Ausnahme des Individuums MK ging ein auffälliges Sezernierungsverhalten bezüglich eines Zytokins von Keratinozyten aus läsionaler Haut nicht mit auffällig erhöhter bzw. erniedrigter Sekretion desselben Zytokins von Zellen aus nicht läsionaler Haut (und umgekehrt) desselben Individuums einher. Vielmehr wurden intra-individuell signifikante Unterschiede in der Spontansekretion von unterschiedlichen Zytokinen durch Keratinozyten läsionalen und nicht läsionalen Ursprungs desselben

Probanden nachgewiesen (vergleiche Tabelle 17 sowie Abbildung 35): 6 von 7 Individuen zeigten signifikante Diskrepanzen bezüglich ihrer IL-1 α -Freisetzung, zwei davon (AA, AW) zusätzlich in Hinsicht auf GM-CSF mit jeweils stärkerer Zytokinsekretion in nicht läSIONaler Haut, eines (DK) zusätzlich in Hinsicht auf IL-6 mit jeweils stärkerer Zytokinsekretion in läSIONaler Haut. Das Individuum SH wies ausschließlich signifikant unterschiedliche IL-6-Freisetzung auf, wobei Keratinozyten aus läSIONaler Ekzemhaut weniger IL-6 sezernierten als Zellen aus nicht läSIONaler Atopikerhaut.

Tabelle 17: Überschreitungswahrscheinlichkeiten der Kruskal-Wallis χ^2 -Testgrößen zur Homogenität der Verteilung von Zytokinkonzentrationen innerhalb der Fallgruppe atopisches Ekzem. Verglichen wurde die Spontansekretion durch Keratinozyten aus läSIONaler und nicht läSIONaler Haut desselben Individuums.

Fallgruppe	Zytokin		
	GM-CSF	IL-1 α	IL-6
AA	< 0,01	< 0,1	< 0,2
AW	< 0,01	< 0,01	< 0,7
DK	< 0,3	< 0,001	< 0,001
GK	< 0,1	< 0,01	< 0,1
MK	< 0,7	< 0,001	< 0,2
SH	< 0,2	< 0,8	< 0,025
SW	< 0,2	< 0,001	< 0,1

5.7.5 VOC-Effekte auf die Zytokinfreisetzung aus humanen Keratinozyten

5.7.5.1 Auswahlkriterien für die statistischen Analysemethoden

Zur Untersuchung statistisch signifikanter VOC-Expositionseffekte auf die Zytokinfreisetzung primärer Keratinozyten wurden die im Anschluss an die VOC-Exposition innerhalb von 48 h Standardinkubation freigesetzten Zytokinkonzentrationen in Relation zur jeweiligen Spontansekretion - innerhalb 48 h Standardinkubation vor Exposition - desselben Zellkulturansatzes gesetzt. Die auf diese Weise normalisierten Konzentrationsquotienten einzelner VOC-Expositionsvariablen wurden sowohl untereinander als auch in Bezug auf entsprechend normalisierte Zytokinkonzentrationsquotienten der Kontrollexpositionen mit synthetischer Luft vergleichend analysiert. Die Wahl eines geeigneten statistischen Modells zur Auswertung der erhobenen Zytokinkonzentrationen richtete sich vor allem nach der Datenbeschaffenheit der Zielgröße Zytokinkonzentration, die oberhalb der Bestimmungsgrenze des Messsy-

stems, gemessen in pg/ml, ein quantitatives, stetiges Merkmal darstellt. Ferner waren zweiseitige Tests anzuwenden, da im Vorfeld der VOC-Expositionsversuche unbekannt war, ob statistisch signifikante Effekte in Form erhöhter oder reduzierter Zytokinkonzentrationen auftreten würden. Gleichzeitig musste eine große Anzahl von Einflussgrößen als Versuchsvariablen berücksichtigt und unterschieden werden: Es wurden drei Fallgruppen untersucht: normal gesunde Haut, atopisch läsionale Haut und atopisch nicht läsionale Haut. In Substanz und Konzentration der VOC sowie in Kontrollversuchen unterschieden sich 6 Expositionsarten: umweltrelevantes Konzentrationsgemisch aus Toluol und m-Xylol, 1 MAK Toluol, 3 MAK Toluol, 1 MAK m-Xylol sowie Exposition mit synthetischer Luft und Inkubatorkontrollinkubation. Pro Expositionsart differenzierten sich ferner vier Varianten der Expositionsdauer. Eine vergleichende Auswertung der Zytokinkonzentrationsdaten nach 5 h und 8 h bzw. nach 18 h und 24 h Expositionsdauer legte eine Blockbildung der Variablen zu Kurzzeit- (5 h und 8 h) und Langzeitexpositionen (18 h und 24 h) nahe.

Die Keratinozytenkulturen setzten z. T. nur sehr niedrige Zytokinmengen frei. Aufgrund der niedrigen Sensitivität des ELISA-Messsystems konnte eine Anzahl sehr niedriger Konzentrationswerte nur qualitativ ausgewertet werden. Statistisch zuverlässig quantifizierbare Konzentrationsdaten werden prinzipiell erst oberhalb der Bestimmungsgrenze erzielt, weshalb nur diese Werte für quantitative Aussagen sinnvoll nutzbar waren. Die Auswertung der Daten erfolgte daher nach drei Vorgehensweisen: Einerseits wurden die sicher quantifizierbaren Daten quantitativ in einer mehrfaktoriellen Varianzanalyse untersucht. Andererseits wurden in einer logistischen Regressionsanalyse alle veränderten Konzentrationsverhältnisse in qualitativer Form binär ausgewertet. Schließlich wurden alle erhobenen Konzentrationsdaten unter Aufschlüsselung der Fallzahlen und Individuenstärken pro Versuchsvariable vergleichend analysiert. Um diese komplexe statistische Analyse der ohnehin variablenreichen Versuchsansätze weitestgehend übersichtlich darzustellen, wurden die Ergebnisse in den Folgekapiteln getrennt nach den Analysemethoden erläutert. Auf diese Weise wurden Konzentrationsdaten mit vergleichbarer statistischer Zuverlässigkeit unter gleicher analytischer Fragestellung zusammengefasst dargestellt. Es folgt jeweils eine kurze Erläuterung der Analysemethoden und der Fragestellung. Anschließend folgen die Ergebnisdarstellungen getrennt nach Zytokinen und Expositionsvariablen, ferner Zusammenfassungen der wichtigsten Ergebnisse.

5.7.5.2 Mehrfaktorielle Varianzanalyse quantitativer Zytokinkonzentrationen

Die Konzentrationsverhältnisse aller Wertepaare mit sowohl vor als auch nach der Exposition durch das ELISA-Messsystem sicher quantifizierbaren Zytokinkonzentrationen wurden als Quotienten aus der Zytokinkonzentration nach Exposition dividiert durch die Zytokinkonzentration vor Exposition in einer Mehrweg-Varianzanalyse^{258,263} untersucht. Die Analysen wurden pro Zytokin und pro Fallgruppe mit den in 5.7.5.1 aufgeführten Variablen für die Expositionsarten und Expositionsdauer durchgeführt. Untersucht wurden die Homogenität der Mittelwerte zwischen den 6 Expositionsarten (1) sowie zwischen Kurzzeit- und Langzeitexposition (2), ferner eventuelle Interaktionen zwischen Expositionsart und Expositionsdauer (3). Der Einfluss der Individuen konnte aufgrund der Zunahme der Variablen bei gleichzeitig zu geringer Fallzahl pro Variable in der Berechnung nicht berücksichtigt werden. Die Individuenanzahl und Häufigkeit der Fälle pro Individuum pro Fallgruppe wurden daher gesondert analysiert (vergleiche 5.7.5.4) und nachträglich in die Ergebnisinterpretation der Varianzanalysen einbezogen.

GM-CSF

ad (1): Nach dem varianzanalytischen Modell zeigten die Mittelwerte der GM-CSF-Konzentrationsverhältnisse nach den unterschiedlichen Expositionsvariablen in den Fallgruppen der Keratinozyten aus normal gesunder sowie atopisch läsionaler Haut fallgruppenintern hoch signifikante Heterogenität ($p = 0,001$), während sich die Expositionseffekte auf Keratinozyten aus nicht läSIONalem, atopischen Ekzem nicht signifikant unterschieden ($p = 0,259$). D. h., dass die Keratinozyten aus normaler bzw. atopisch läSIONaler Haut hinsichtlich ihrer GM-CSF-Zytokinfreisetzung signifikant unterschiedlich auf verschiedene Expositionssituationen reagierten, die Keratinozyten aus nicht läSIONaler Haut jedoch nicht.

Abbildung 37 zeigt die gemittelten Konzentrationsquotienten pro Expositionsvariable. Ein Quotient größer eins entspricht dabei einem Konzentrationsanstieg, ein Quotient kleiner eins einer Reduktion der sekretierten Zytokinkonzentration nach erfolgter Exposition in Relation zur Spontansekretion. In der Fallgruppe gesunde Haut setzten die Keratinozyten sowohl nach Expositionen mit umweltrelevantem Toluol/m-Xylol-Gemisch wie auch mit 3 MAK Toluol deutlich verstärkt GM-CSF frei, während nach

Expositionen mit 1 MAK Toluol bzw. 1 MAK m-Xylol leicht verminderte GM-CSF-Freisetzungen beobachtet wurden. Dahingegen zeigte die Exposition mit dem niedrigkonzentrierten VOC-Gemisch gegenüber aus läSIONALEM atopischen Ekzem isolierten Keratinozytenkulturen einen die GM-CSF-Sekretion reduzierenden Effekt, wohingegen die Exposition gegenüber dem Prüfgas mit 3 MAK Toluol wiederum zu erhöhter Freisetzung führte. Die Prüfgase mit 1 MAK konzentrierten VOC hingegen zeigten keine deutlichen Effekte. Die Fallgruppe nicht läSIONALES atopisches Ekzem wies nach Exposition mit 3 MAK Toluol nur leicht erhöhte GM-CSF-Konzentrationen auf, eine signifikante Erhöhung erfolgte nach 1 MAK Toluol bzw. 1 MAK m-Xylol, während die Sekretion nach Exposition mit dem umweltrelevanten VOC-Gemisch unverändert blieb.

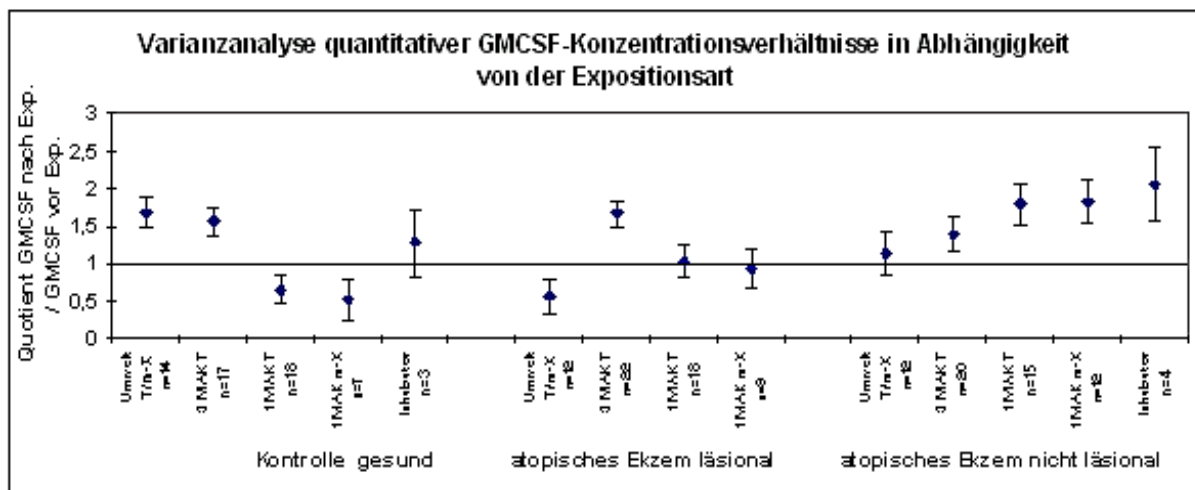


Abbildung 37: Mittlere GM-CSF-Konzentrationsquotienten der Expositionsvariablen nach dem Modell der Varianzanalyse. Aufgetragen sind die kleinsten quadratischen Mittelwert-Schätzer mit der 1σ Standardabweichung, angegeben ist ferner die Fallzahl der jeweiligen Expositionsvariablen. (Datentabelle siehe Anhang A3.9)

Die Fallgruppen vergleichend ließ sich folgendes feststellen: Während nach einer Exposition mit 3 MAK Toluol in allen drei Fallgruppen vermehrt GM-CSF sekretiert wurde, unterschieden sich die Effekte der anderen VOC-Expositionen wesentlich zwischen den Fallgruppen. Dabei induzierte die Exposition gegenüber dem umweltrelevanten VOC-Gemisch eine erhöhte GM-CSF-Sekretion aus Keratinozyten gesunder Haut; Zellen atopisch läSIONALEN Ekzems sezernierten dahingegen deutlich weniger GM-CSF als spontan, während die Freisetzung aus Keratinozyten nicht läSIONALER Atopikerhaut nach dieser Exposition unverändert blieb. In den Fallgruppen gesund und atopisch nicht läSIONAL zeigte die Exposition mit dem Umwelt-VOC-Gemisch eher einen der Exposition mit 3 MAK Toluol als einen den 1 MAK VOC-Expo-

sitionen vergleichbaren Effekt. Die 1 MAK-konzentrierten VOC-Expositionen zeigten fallgruppenspezifisch gegensätzliche Effekte. Fallgruppenintern unterschieden sie sich jedoch kaum.

Die Zuverlässigkeit der Aussagen wurde durch die relativ hohen Fallzahlen der einzelnen VOC-Expositionsvariablen bei überwiegend ausgeglichener Verteilung und Anzahl der Individuen pro Variable gesichert. Lediglich die Quotienten der Expositionsvariablen 3 MAK Toluol Kurzzeit der Fallgruppen normal und läsional sowie 1 MAK m-Xylol Kurzzeit der Fallgruppe nicht läsional wurden eventuell durch stark individuelle Effekte geprägt (vergleiche auch 5.7.5.4, Abbildung 48 sowie Tabelle 25). Ferner wurden die Expositionen gesunder Keratinozyten mit 1 MAK m-Xylol anhand quantitativer Daten durch je nur ein Individuum pro Expositionsdauer repräsentiert. Statistisch sicherere Aussagen ergaben sich diesbezüglich aus der qualitativen Regressionsanalyse (vergleiche 5.7.5.3).

In den Kontrollexpositionsversuchen mit synthetischer Luft wurden überwiegend sehr niedrige Zytokinkonzentrationen freigesetzt. So konnten für gesunde Keratinozyten *vor* und *nach* Exposition keine quantitativen Konzentrationswerte gemessen werden. Zellen aus läsionaler und nicht läsionaler atopischer Haut wiesen dagegen *vor* der Exposition deutlich höhere, quantifizierbare Konzentrationswerte sekretierter Zytokine auf. *Nach* der Kontrollexposition lagen diese jedoch unterhalb der Bestimmungsbzw. Erfassungsgrenze des ELISA-Messsystems, so dass kein zuverlässiger, quantitativer Quotient ermittelt werden konnte. Aus demselben Grund fehlt in der quantitativen Auswertung (Abbildung 37) die Inkubatorkontrolle für Keratinozyten aus läsionalem atopischen Ekzem. Die vorhandenen Aussagen der Inkubatorkontrollen aus den Fallgruppen gesunde und nicht läsional atopische Haut sind einerseits aufgrund der hohen Streuung um den Mittelwert ungenau, andererseits verzerrt, da die geringe Fallzahl jeweils nur ein Individuum pro Expositionsdauer repräsentierte. Statistisch zuverlässigere Aussagen über die GM-CSF-Sekretion unter VOC-freien Versuchsbedingungen ergab die qualitative Regressionsanalyse (5.7.5.3).

ad (2) und (3): In der Fallgruppe der Keratinozyten aus normal gesunder Haut wiesen die Mittelwerte der GM-CSF-Konzentrationsverhältnisse über alle Expositionsvariablen einen signifikanten Unterschied ($p = 0,025$) bezüglich der Expositionsdauer auf. D. h., dass - gemittelt über alle Expositionsversuche - eine Abhängigkeit der GM-CSF-Sekretion aus gesunden Primärkeratinozyten von der Expositionsdauer bestand. Die Mittelwerte der GM-CSF-Konzentrationsverhältnisse in der Fallgruppe atopisch läsionale Haut zeigten dagegen keine signifikante Heterogenität ($p = 0,123$): Sie waren expositionsdauerunabhängig. In beiden Fallgruppen waren keine signifikanten Interaktionseffekte zwischen einzelnen Expositionsvariablen und der Expositionsdauer zu verzeichnen ($p = 0,198$ bzw. $p = 0,195$).

Während sich die reinen Expositionseffekte, wie in (1) ausgeführt, auf Keratinozyten aus nicht läSIONalem, atopischen Ekzem nicht signifikant unterschieden ($p = 0,259$), waren bezüglich der Expositionsdauer über alle Expositionsvariablen ($p = 0,003$), wie auch in Interaktionseffekten zwischen der Expositionsdauer und einzelnen Expositionsvariablen ($p = 0,002$) signifikante Unterschiede der Mittelwerte feststellbar. Demnach war die durch unterschiedliche Expositionsvariablen induzierte Zytokin-freisetzung aus Keratinozyten aus nicht läSIONalem, atopischen Ekzem stark von der jeweiligen Expositionsdauer abhängig.

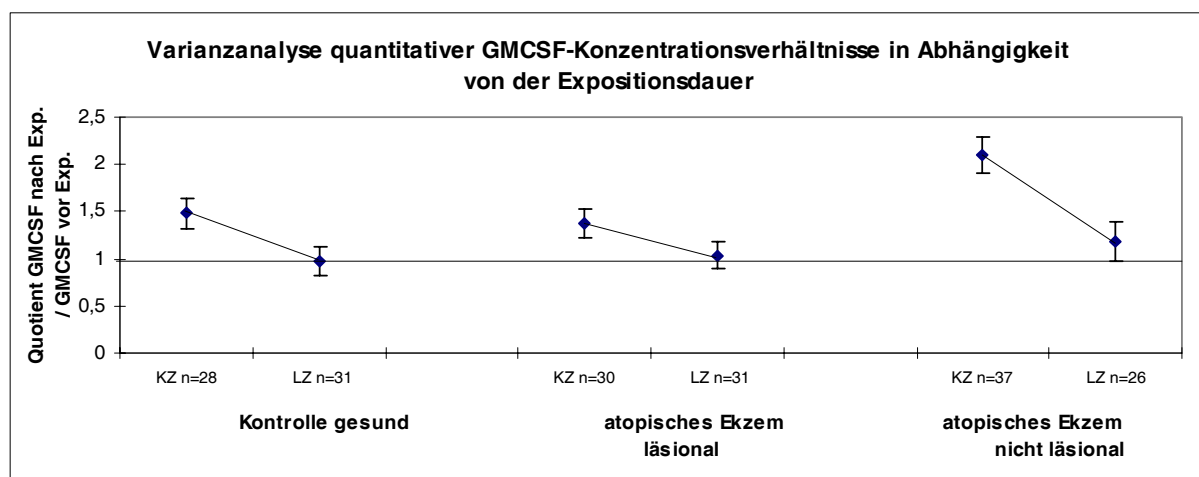


Abbildung 38: Mittlere GM-CSF-Konzentrationsquotienten in Abhängigkeit von der Expositionsdauer über alle Expositionsvariablen nach dem Modell der Varianzanalyse. Aufgetragen sind die kleinsten quadratischen Mittelwert-Schätzer mit der 1σ Standardabweichung, angegeben ist ferner die Fallzahl der jeweiligen Expositionsdauer (KZ: Kurzzeitexposition, LZ: Langzeitexposition). (Datentabelle siehe Anhang A3.10)

ad (2): Abbildung 38 zeigt die expositionsdauerabhängigen GM-CSF-Konzentrationsverhältnisse zusammengefasst über alle Expositionsvariablen. Im Mittel wurden in allen Fallgruppen im Vergleich zur Spontansekretion nach Kurzzeitexpositionen erhöhte, nach Langzeitexposition kaum veränderte GM-CSF-Konzentrationen im Zellkulturüberstand festgestellt. Dabei unterschieden sich – wie oben erläutert – die GM-CSF-Konzentrationen nach Kurzzeit- und Langzeitexposition in den Fallgruppen gesunde Haut und nicht läsionales Ekzem signifikant voneinander. Diese Expositionsdauereffekte zeigten sich über Expositionsvariablen und Fallgruppen intra- wie interindividuell reproduzierbar, wie Tabelle 18 exemplarisch verdeutlicht.

Tabelle 18: Inter- und intraindividuelle Effekte der Expositionsdauer auf die Sekretion von GM-CSF

Expositionsvariable	Individuum und Fallgruppe	Quotient: GM-CSF-Konz. nach Kurzzeitexp./ Spontansekretion vor Exp.	Quotient: GM-CSF-Konz. nach Langzeitexp./ Spontansekretion vor Exp.		
3 MAK Toluol	OF gesund	2,2	1,1 1,0		
		2,5 2,1 2,7 2,1 2,9 2,7	1,4 1,6 0,6 0,6		
	AW läsional	3,2 2,9 1,3 1,4 1,8 1,7	0,8 0,7 2,5 0,6 1,8 1,9		
		GK läsional	2,8 2,4 2,1 1,2	1,9 1,9	
			1 MAK Toluol	2,5 2,8	0,4 0,8
				1 MAK m-Xylol	3,4 3,0 3,4 3,3
MK nicht-läs.			2,2 2,2		0,5 0,6

Da nur wenige Daten aus Kontrollexpositionen in diese quantitative Datenanalyse einbezogen werden konnten, konnte nicht beurteilt werden, ob es sich bei diesem Expositionsdauereffekt um einen VOC-Expositionsdauer- oder einen reinen – z.B. durch Zellaalterung bzw. Zelldifferenzierung bedingten – Zeiteffekt handelt. Diese

Information musste daher den auch die Kontrollepositionen berücksichtigenden qualitativen Datenauswertungen entnommen werden (vergleiche 5.7.5.3).

ad (3): Die in der Fallgruppe nicht läasionales atopisches Ekzem als signifikant ermittelten Interaktionseffekte zwischen einzelnen Expositionsvariablen und Expositionsdauer werden in Abbildung 39 dargestellt. Nach allen Kurzzeite xpositionsversuchen – mit Ausnahme des niedrigkonzentrierten VOC-Gemischs – wurde in Relation zur Spontansekretion eine erhöhte GM-CSF-Sekretion nachgewiesen. Dahingegen zeigten sich nach Langzeite xposition mit dem niedrigkonzentrierten VOC-Gemisch eine schwach erhöhte, mit 3 MAK Toluol eine unveränderte, nach 1 MAK Toluol eine wie nach Kurzzeite xposition erhöhte Zytokinkonzentration. Ein signifikanter Interaktionseffekt ergab sich für die Expositionsvariable 1 MAK m-Xylo: Kurzzeite xpositionen induzierten eine stark erhöhte GM-CSF-Freisetzung ($n = 6$), wohingegen Langzeite xpositionsversuche eine gegenüber der Spontansekretion unveränderte Zytokinkonzentration aufwiesen ($n = 6$). Der im varianzanalytischen Modell ebenfalls als signifikant bewertete Effekt nach VOC-freier Inkubationskontrolle musste aufgrund der geringen Fallzahl ($n = 2$), der großen Varianz sowie der Repräsentation nur je eines Individuums pro Expositionsdauer mit Vorbehalt betrachtet werden.

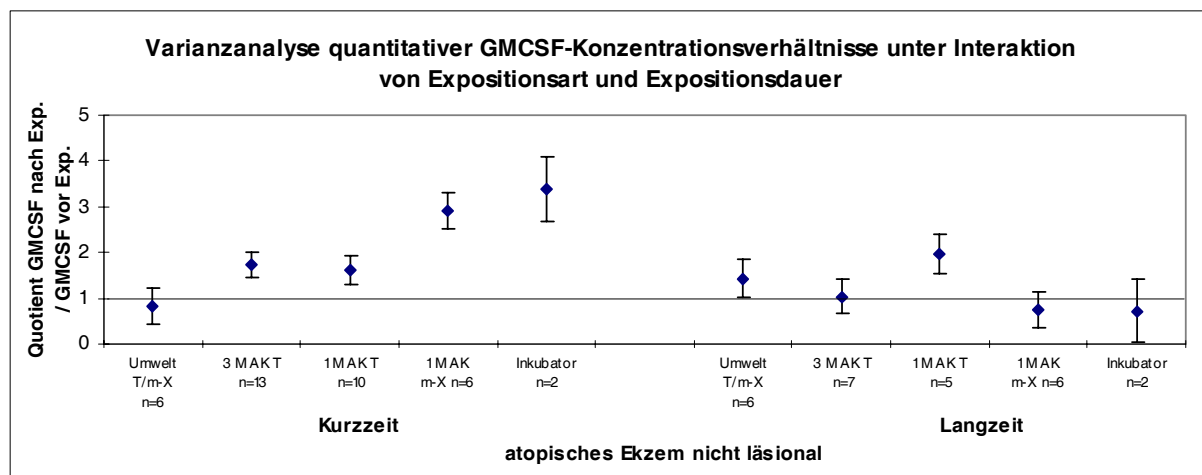


Abbildung 39: Mittlere GM-CSF-Konzentrationsquotienten der Fallgruppe nicht läSIONales atopisches Ekzem unter Interaktion einzelner Expositionsarten und Expositionsdauer nach dem Modell der Varianzanalyse. Aufgetragen sind die kleinsten quadratischen Mittelwert-Schätzer mit der 1σ Standardabweichung, angegeben ist ferner die Fallzahl der jeweiligen Expositionsvariablen. (Datentabelle siehe Anhang A3.11)

Interleukin 1 α und Interleukin 6

Sowohl spontan als auch - insbesondere für IL-1 α - nach Exposition wurden überwiegend sehr geringe Konzentrationen von Interleukin 1 α und Interleukin 6 freigesetzt. Für die quantitative Varianzanalyse standen daher für nur einzelne Expositionsvariablen nur äußerst geringe Fallzahlen von Wertepaaren zur Verfügung, deren Konzentrationen sowohl *vor* als auch *nach* der Exposition oberhalb der Bestimmungsgrenze des ELISA-Messsystems ermittelt wurden. Dies führte zu einer starken Reduktion der Freiheitsgrade im varianzanalytischen Modell und zur Angabe von Mittelwert-Schätzern mit Standardabweichung für Fallzahlen von $n = 1$ als Artefakt der Modellrechnung. Die in Abbildung 40 und Abbildung 41 der Vollständigkeit halber dargestellten Daten waren daher nicht zuverlässig auswertbar. Gleiches galt für die Analyse der geringen Fallzahlen unter weiterer Auftrennung nach der Expositionsdauer; auf die Darstellung dieser varianzanalytischen Ergebnisse wurde deshalb verzichtet. Trotz dieser eingeschränkten statistischen Zuverlässigkeit verdeutlicht Abbildung 40 eine in Relation zur Spontansekretion nach der Exposition generell – unabhängig von den Expositionsvariablen – niedrigere IL-1 α -Konzentration im Zellkulturüberstand. Dass die Kontrolleexpositionen gegenüber synthetischer Luft gleichermaßen betroffen waren, deutete auf einen VOC-unabhängigen Zeiteffekt hin.

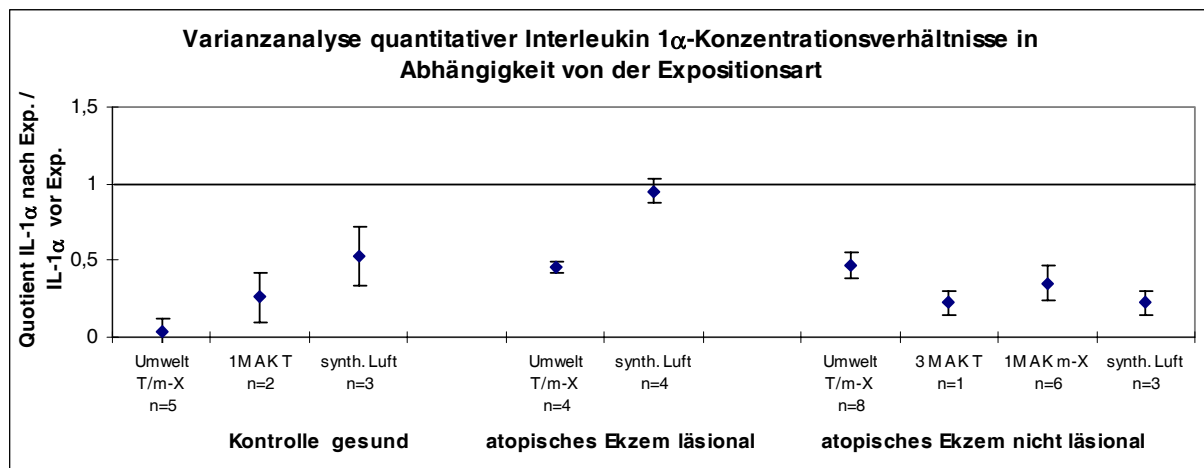


Abbildung 40: Mittlere Interleukin 1 α -Konzentrationsquotienten der Expositionsvariablen nach dem Modell der Varianzanalyse. Aufgetragen sind die kleinsten quadratischen Mittelwert-Schätzer mit der 1 σ Standardabweichung, angegeben ist ferner die Fallzahl der jeweiligen Expositionsvariablen. (Datentabelle siehe Anhang A3.12)

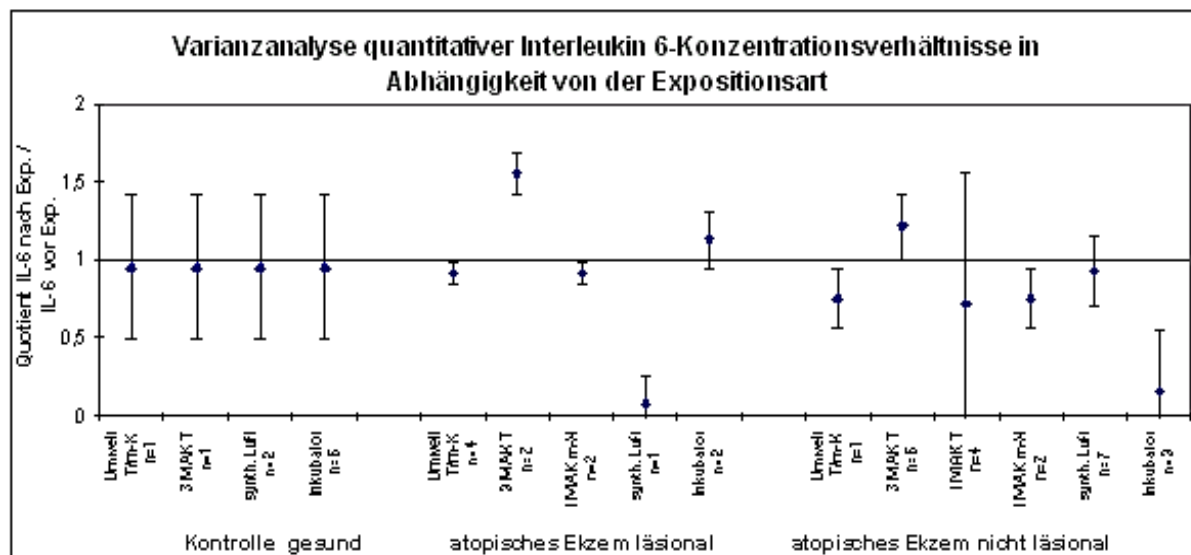


Abbildung 41: Mittlere Interleukin 6-Konzentrationsquotienten der Expositionsvariablen nach dem Modell der Varianzanalyse. Aufgetragen sind die kleinsten quadratischen Mittelwert-Schätzer mit der 1σ Standardabweichung, angegeben ist ferner die Fallzahl der jeweiligen Expositionsvariablen. (Datentabelle siehe Anhang A3.13)

5.7.5.3 Logistische Regressionsanalyse veränderter Konzentrationsverhältnisse

Im Rahmen der logistischen Regressionsanalyse²⁵⁸ wurde für alle erhobenen Datenpaare das Verhältnis der Zytokinkonzentration vor der Exposition zu der nach der Exposition qualitativ als Konzentrationsanstieg oder -reduzierung bzw. als unverändert beurteilt. Dabei wurden in Konzentrationsverhältnissen von Wertepaaren mit qualitativen Zytokinkonzentrationen vor und/oder nach Exposition diese gemäß ihrer Zuverlässigkeitsstufen (< NG: 1; < EG: 2; < BG: 3) gewertet. Dies war insofern möglich, da alle quantitativen (> BG), als Absolutwerte in den Quotienten eingehenden Zytokinkonzentrationen größer als 3 pg/ml waren. Konzentrationsverhältnisse der Wertepaare mit beiden Konzentrationsdaten oberhalb der Bestimmungsgrenze des ELISA-Messsystems wurden anhand der absoluten, quantitativen Konzentrationswerte ermittelt.

Die binären Daten aller *veränderten* Zytokinkonzentrationsverhältnisse wurden anschließend in logistischen regressionsanalytischen Modellansätzen auf Effekte der VOC-Exposition untersucht. Das Modell der logistischen Regression berechnet die Chancen („odds“) der Zielvariablen für beliebige Kombinationen vorgegebener Ein-

flussvariablen. Die Zielvariablen waren binär mit 0, gleichbedeutend mit einer reduzierten Zytokinkonzentration, bzw. 1, gleichbedeutend mit einer erhöhten Zytokinsekretion nach Exposition, kodiert. Für jede Einflussvariable wurde ein Koeffizient β ermittelt. Er ist gleich dem natürlichen Logarithmus des Chancenverhältnisses („odds ratio“ = e^β) für die Einflussvariable im Zustand 1 (vorhanden) zur Variable im Zustand 0 (nicht vorhanden), vorausgesetzt, alle anderen Einflussvariablen bleiben konstant. Dies wurde durch das Versuchsdesign der Studie garantiert: Denn pro Experiment wurde ausschließlich gegenüber einer Einflussvariable exponiert („dummy“ Variable). Eine aus einem positiven Koeffizienten β resultierende „odds ratio“ größer 1 steht daher für eine häufigere Erhöhung bzw. seltenere Reduktion der nach Exposition mit der Einflussvariable gemessenen sekretierten Zytokinkonzentration im Vergleich zur Basiskategorie Kontrollexposition mit synthetischer Luft („intercept“). Ein negatives β , resultierend in einer „odds ratio“ kleiner 1, ist gleichbedeutend mit einem im Verhältnis zur Kontrollexposition häufiger die Zytokinkonzentration reduzierenden bzw. seltener steigernden Effekt einer Expositionsvariable.

Eine erste Regressionsanalyse beurteilte die nach den Expositionsvarianten mit VOC-Prüfgasen sowie nach der Kontrollinkubation - unabhängig von der Expositionsdauer - beobachteten Effekte jeweils in Relation zur Kontrollexposition mit synthetischer Luft. Die Analyse wurde für jedes der drei Zytokine einerseits getrennt nach den drei Fallgruppen (1) sowie andererseits als jeweilige Zweigruppenvergleiche (2) über alle Expositionsvariablen durchgeführt. Eine weitere logistische Regression zur Analyse möglicher Interaktionen zwischen einzelnen Expositionsarten und der Expositionsdauer ergab aufgrund der hohen Anzahl von Variablen und daraus resultierenden großen Varianzen keine statistisch zuverlässigen Ergebnisse. Um dennoch einen möglichen Effekt der Expositionsdauer zu ermitteln, wurden zum einen in einem dritten logistischen Regressionsmodell die Auswirkungen oben genannter Expositionsvariablen auf die Zytokinfreisetzung getrennt für Kurzzeit- bzw. Langzeitexpositionen untersucht (3). Zum anderen beurteilte ein viertes Modell die Expositionsdauer ohne Interaktion als gleichrangige Einflussvariable neben den Expositionsvariablen. Auf diese Weise wurde der Einfluss eines über alle Expositionsvariablen gemittelten Expositionsdauereffekts auf die einzelnen Expositionsvariablen für Kurzzeit- und Langzeitexpositionen dargestellt (4). Der Vergleich der Ergebnisse aus den Analysen (3) und (4) ließ wiederum Rückschlüsse auf die Existenz von Interaktionen zwischen Expositionsdauer und einzelnen Expositionsvariablen zu. Als rela-

tive Basiskategorien dienten in diesen Modellen Kurzzeit- bzw. Langzeit-Kontroll-expositionen mit synthetischer Luft. Auf Individuen anstatt auf Fallgruppen basierende logistische Regressionsanalysen konnten wiederum aufgrund der hohen Variablenzahl und den daraus resultierenden großen Varianzen nicht sinnvoll beurteilt werden. Individuelle Effekte wurden daher gesondert untersucht (vergleiche 5.7.5.4) und nachträglich in die Auswertung einbezogen. Tabelle 19, Tabelle 22 und Tabelle 23 fassen die Ergebnisse der logistischen Regressionsanalysen (1) und (4) getrennt nach Zytokinen zusammen. Sie geben die Signifikanz der Schätzungen in Form von t-Werten an, wobei ein t-Wert größer 2 bzw. kleiner -2 – vorausgesetzt, es liegen mindestens 100 Freiheitsgrade vor – in etwa einem Signifikanzniveau von $p < 0,05$ entspricht. Tabelle 20 zeigt die Ergebnisse der Regressionsanalyse (3) für GM-CSF. Tabelle 21 und Tabelle 24 stellen die Ergebnisse des logistischen Regressionsmodells (2) zum Vergleich des Sezernierungsverhaltens von Fallgruppen über alle Expositionsvariablen ohne Interaktion dar. Das Signifikanzniveau der Schätzer wird hier durch die empirische Irrtumswahrscheinlichkeit $p > \chi^2$ für β und σ unter der Nullhypothese beschrieben. Abbildung 42 bis Abbildung 47 zeigen die in den Regressionsanalysen ermittelten „odds“ als prozentualen Anteil aller gegenüber einer Expositionsvariable exponierten Zellkulturen mit relativ zur Spontansekretion reduzierter bzw. erhöhter Zytokinkonzentration nach Exposition.

Es folgen die Ergebnisse der logistischen Regressionsanalysen getrennt nach Zytokinen und Fallgruppen sowie am Ende dieses Kapitels eine vergleichende Zusammenfassung der Ergebnisse aus Varianz- und Regressionsanalyse.

GM-CSF

Tabelle 19: Logistische Regressionsanalyse qualitativer Expositionseffekte auf die Freisetzung von GM-CSF aus humanen Keratinozyten (KZ: Kurzzeit-, LZ: Langzeitexpositionen)

GMCSF Expositions- variablen	logistische Regression (1) expositionsdauerunabhängig				logistische Regression (4) KZ vs. LZ ohne Interaktion			
	Koeff. log. Regr. β	Std.- Abw. σ	odds/ odds ratio	t-Wert	Koeff. log. Regr. β	Std.- Abw. σ	odds/ odds ratio	t-Wert
gesund								
Referenz s.Luft /+KZ	0,288	0,764	1,334	0,377	1,734	1,004	5,663	1,727
Umw. T/m-X /+KZ	1,179	0,888	3,251	1,327	1,282	0,915	3,604	1,401
3 MAK T /+KZ	1,760	0,930	5,812	1,892	1,953	0,959	7,050	2,035
1 MAK T /+KZ	-0,981	0,856	0,375	-1,145	-0,967	0,882	0,380	-1,096
1 MAK m-X /+KZ	-1,299	0,868	0,273	-1,150	-1,162	0,894	0,313	-1,299
Inkubator /+KZ	0,811	1,118	2,250	0,725	0,930	1,150	2,535	0,809
Exp.-Dauer: LZ					-1,002	0,428	0,367	-2,341
läsional								
Referenz s.Luft /+KZ	-8,202	18,328	0,000	-0,448	-6,286	28,011	0,002	-0,224
Umw. T/m-X /+KZ	6,257	18,239	5×10^2	0,341	7,668	28,013	2×10^3	0,274
3 MAK T /+KZ	8,749	18,332	6×10^3	0,477	10,352	28,010	3×10^4	0,370
1 MAK T /+KZ	8,944	18,332	8×10^3	0,488	10,479	28,010	4×10^4	0,374
1 MAK m-X /+KZ	7,797	18,334	2×10^3	0,425	9,283	28,011	1×10^4	0,331
Inkubator /+KZ	16,405	22,448	1×10^7	0,731	18,613	34,376	1×10^8	0,541
Exp.-Dauer: LZ					-2,179	0,519	0,113	-4,196
nicht läsional								
Referenz s.Luft /+KZ	-8,202	12,960	0,000	-0,633	-7,013	12,772	0,001	-0,549
Umw. T/m-X /+KZ	6,863	12,965	1×10^3	0,529	6,970	12,768	1×10^3	0,546
3 MAK T /+KZ	8,782	12,965	7×10^3	0,677	8,783	12,768	7×10^3	0,688
1 MAK T /+KZ	7,961	12,966	3×10^3	0,614	7,919	12,770	3×10^3	0,620
1 MAK m-X /+KZ	7,627	12,967	2×10^3	0,588	7,707	12,770	2×10^3	0,603
Inkubator /+KZ	8,490	12,983	5×10^3	0,654	8,494	12,787	5×10^3	0,664
Exp.-Dauer: LZ					-0,828	0,367	0,437	-2,258

Normal gesunde Haut

ad (1): In der Fallgruppe gesunde Haut ermittelte das logistische Regressionsmodell unabhängig von der Expositionsdauer in 57 % der Fälle („odds“ = 1,334:1) eine statistisch nicht signifikant erhöhte GM-CSF-Freisetzung nach Kontrollexposition mit synthetischer Luft. In Relation zu dieser Referenzexposition ließen sich die folgenden VOC-Expositionseffekte berechnen (vergleiche Abbildung 42): Nach Exposition mit dem umweltrelevanten VOC Gemisch wurden in 81 % („odds ratio“ = 3,251:1; „odds“ = $(3,251 \cdot 1,334):1 = 81\%$), nach Versuchen mit 3 MAK Toluol in 89 % („odds ratio“ = 5,812:1) aller exponierten Kulturen in Bezug auf die Spontansekretion erhöhte GM-CSF-Konzentrationen freigesetzt. Der Einfluss von 3 MAK Toluol war dabei

mit $t = 1,892$ annähernd signifikant. Hohe Signifikanz erzielte dieser Effekt im Zweigruppenvergleich (ad 2) mit $p > 0,0276$ und einer „odds ratio“ von 5,196:1 gegenüber Zellen aus läSIONALEM Ekzem bzw. $p > 0,0002$ und einer „odds ratio“ von 10,888:1 im Vergleich mit Zellen aus nicht läSIONALER Haut (vergl. Tabelle 21, Seite 159). Eine relativ zur Spontansekretion reduzierte Zytokinfreisetzung wurde hingegen nach Experimenten mit 1 MAK Toluol in 67 % („odds ratio“ = 0,375:1), mit 1 MAK m-Xylol in 73 % („odds ratio“ = 0,273:1) der exponierten Zellkulturen beobachtet. Die relative GM-CSF-Sekretion der Inkubatorkontrolle war zu 75 % („odds ratio“ = 2,250:1) erhöht, die hohe Standardabweichung sowie der niedrige t-Wert signalisierten jedoch die aufgrund niedriger Fallzahlen ($n = 10$) statistische Unsicherheit dieser Aussage.

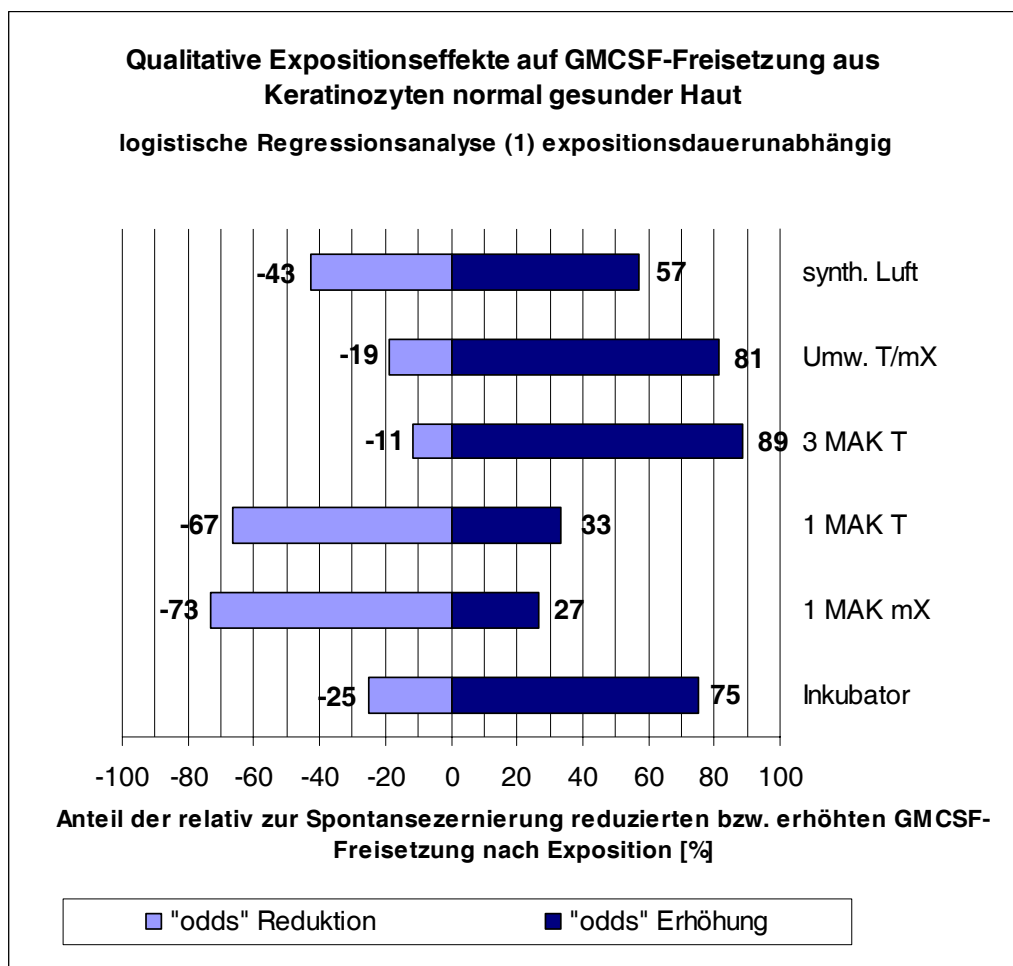


Abbildung 42: Qualitative, von der Expositionsdauer unabhängige Expositionseffekte auf die GM-CSF-Sekretion aus Keratinozyten normal gesunder Haut nach dem logistischen Regressionsmodell (1). Dargestellt ist der prozentuale Anteil aller exponierten Zellkulturen mit relativ zur Spontansekretion reduzierter (auf der negativen Skala aufgetragen) bzw. erhöhter Zytokinfreisetzung nach der Exposition.

Tabelle 20: Logistische Regressionsanalyse qualitativer Expositionseffekte auf die Freisetzung von GM-CSF aus humanen Keratinozyten getrennt nach Kurzzeit- (KZ) und Langzeitexpositionen (LZ)

GMCSF Expositions- variablen	logistische Regression (3) Kurzzeitexposition				logistische Regression (3) Langzeitexposition			
	Koeff. log. Regr. β	Std.- Abw. σ	odds/ odds ratio	$p > \chi^2$	Koeff. log. Regr. β	Std.- Abw. σ	odds/ odds ratio	$p > \chi^2$
gesund								
Referenz s.Luft	-4×10^{-17}	1,000	1,000	1,000	0,693	1,225	2,000	0,571
Umw. T/m-X	2,015	1,252	7,501	0,107	0,319	1,357	1,376	0,814
3 MAK T	1,946	1,254	7,001	0,121	1,447	1,435	4,250	0,313
1 MAK T	-0,134	1,126	0,875	0,906	-2,079	1,384	0,125	0,133
1 MAK m-X	0,560	1,180	1,751	0,635	-3,526	1,600	0,029	0,028
Inkubator	-4×10^{-15}	1,414	1,000	1,000	12,511	368,3	999,0	0,973

ad (3) und (4): Tabelle 19 und Tabelle 20 zeigen die Ergebnisse der logistischen Regressionsanalysen zum Einfluss der Expositionsdauer auf die Auswirkungen von den Expositionsvariablen. Für Expositionsvariablen mit überwiegend die Zytokinkonzentration reduzierendem Effekt führte das logistische Regressionsmodell (3) aufgrund des niedrigen Informationsgehaltes im Modell (Reduktion codiert mit 0) zu relativ hohen Standardabweichungen und daher niedrigen p-Werten (Tabelle 20). Die ermittelten „odds ratio“-Schätzer entsprachen aber den Verhältnissen von Reduktion und Zunahme der GM-CSF-Sekretion, die direkt, ohne statistisches Modell, aus den Konzentrationsdaten der einzelnen Expositionsvariablen berechnet wurden (vergleiche 5.7.5.4). Die linke Histogrammdarstellung in Abbildung 43 verdeutlicht die unterschiedliche Wirkung der Expositionsvariablen in Abhängigkeit von der Expositionsdauer nach Modell (3). Im Anschluss an Kontrollexpositionen gegenüber synthetischer Luft war die GM-CSF-Konzentration etwa ebenso häufig erhöht wie erniedrigt. Kurzzeitexpositionen gegenüber dem VOC-Gemisch sowie gegenüber 3 MAK Toluol zeigten hingegen zu 88 % bzw. 87 % eine sezernierungssteigernde ($\beta_{T/m-X} = 2,015$ bzw. $\beta_{3Toluol} = 1,946$), aber nicht signifikante Wirkung. Dieser Effekt war auch nach Langzeitexpositionen zu verzeichnen. In Expositionen gegenüber 1 MAK Toluol und 1 MAK m-Xylol zeigte die Langzeitexpositionsdauer hingegen einen bemerkenswerten, im Fall von 1 MAK m-Xylol signifikanten ($p = 0,028$), überwiegend reduzierenden ($\beta_{1Toluol} = -2,079$ bzw. $\beta_{1m-Xylol} = -3,526$) Einfluss auf die GM-CSF-Konzentration, während dieselben Prüfgase nach Kurzzeitexpositionen im Mittel annähernd unveränderte Sekretion induzierten. Die Ergebnisse zu den Inkubatorkontrollen waren aufgrund der niedrigen Fallzahl von $n = 4$ nicht statistisch zuverlässig auswertbar.

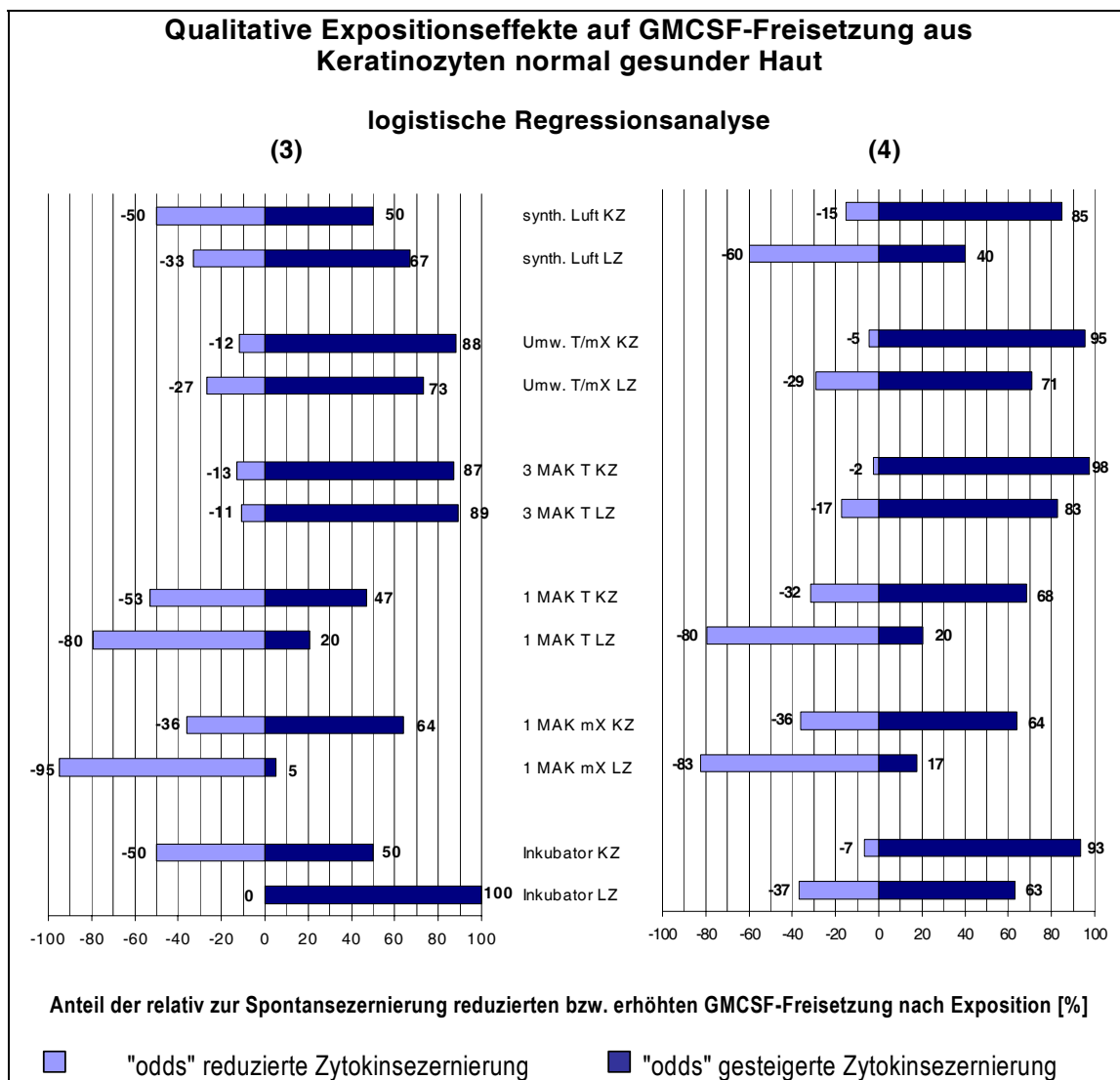


Abbildung 43: Qualitative Effekte auf die GM-CSF-Sekretion aus Keratinozyten normal gesunder Haut für einzelne Expositionsvariablen getrennt nach der Expositionsdauer (3) bzw. unter Aufschlüsselung der Expositionsdauer über alle Expositionsvariablen (4). Dargestellt ist der prozentuale Anteil aller exponierten Zellkulturen mit relativ zur Spontansekretion reduzierter (negative Skala) bzw. erhöhter Zytokinfreisetzung nach der Exposition. (KZ: Kurzzeit-, LZ: Langzeitexpositionen)

Bezogen auf die Basiskategorien Kontrollexposition mit synthetischer Luft und Kurzzeitexpositionen bewies das logistische Regressionsmodell (4) – analog zu den varianzanalytischen Ergebnissen quantitativer Konzentrationsverhältnisse (vergleiche 5.7.5.2 ad (2)) – unabhängig von einzelnen Expositionsvariablen eine signifikant ($t = -2,341$) häufigere Reduktion der GM-CSF-Sekretion nach Langzeitexpositionen (vergleiche Tabelle 19): Die Chance auf erhöhte Zytokinfreisetzung war unter Langzeitexposition um circa ein Drittel niedriger („odds ratio“ = 0,367:1) als nach Kurzzeitexposition. Starken Einfluss zeigte die Expositionsdauer in diesem Modell auf die Zytokinfreisetzungsmodulation nach Kurzzeitexpositionen mit synthetischer Luft

(„odds ratio“ = 5,663:1). Unter Langzeitexposition reduzierte sich diese Chance auf eine erhöhte GM-CSF-Freisetzung von 85 % auf 40 %. Diese Aussage stand im Widerspruch zu dem experimentell beobachteten und in Modell (3) analysierten Effekt. Dahingegen zeigte sich übereinstimmend mit Modell (3) ein signifikant sezernierungssteigernder Effekt von Kurzzeitexpositionen gegenüber 3 MAK Toluol („odds ratio“ = 7,050:1). D. h., auch unter der Voraussetzung eines von einzelnen Expositionsvariablen unabhängigen Expositionsdauereffekts war die Chance auf vermehrte Zytokinexpression nach Kurzzeitexposition mit 3 MAK Toluol gegenüber der Kontrollexposition um den Faktor 7 signifikant ($t = 2,035$) erhöht. Abbildung 43 rechts zeigt den Einfluss des über alle Expositionsvariablen gemittelten Expositionsdauereffekts auf die einzelnen Variablen für Kurz- und Langzeiteffekte unter der Annahme nicht bestehender Interaktionen (4). Die hier modulierten Verhältnisse von Reduktions- und Steigerungseffekten zeigten z. T. große Diskrepanzen zu den experimentell nachgewiesenen, in Modell (3) getrennt nach Kurz- bzw. Langzeitexpositionen analysierten Effekten (Abbildung 43 links): Generell wurden die Kurzzeiteffekte in Richtung verstärkender Zytokinfreisetzung verändert, während Langzeitexpositionen insbesondere von 1 MAK m-Xylol bzw. 1 MAK Toluol geringere Reduktionseffekte bewirkten. Der Vergleich der logistischen Regressionsmodelle (3) und (4) ließ daher auf vorhandene Interaktionseffekte insbesondere zwischen den Expositionsvariablen 1 MAK m-Xylol bzw. 1 MAK Toluol und der Expositionsdauer rückschließen.

Atopisches Ekzem

Die nach dem logistischen Regressionsmodell berechneten Schätzer für die Wahrscheinlichkeit von expositionsdauerunabhängigen Effekten einzelner Expositionsvariablen (ad 1) auf die Freisetzung von GM-CSF aus Keratinozyten *atopisch läsionaler Haut* wiesen hohe Varianzen auf und waren daher nicht interpretierbar (vergleiche Tabelle 19). Aufgrund der höheren Anzahl von Variablen verstärkte sich diese statistische Unsicherheit in Bezug auf einzelne Expositionsvariablen und Expositionsdauer in den Modellen (3) (Daten nicht gezeigt) und (4). Für den über alle Expositionsvariablen gemittelten Einfluss der Expositionsdauer ergab sich jedoch mit $\beta = -2,179$ und $t = -4,196$ ein hochsignifikanter Reduktionseffekt für Langzeit- in Bezug auf Kurzzeitexpositionen (vergleiche Tabelle 19). D. h., unabhängig von der Expositionsvariable setzten die Primärkeratinozyten atopisch läsionaler Haut nach Experimenten von 18 h bzw. 24 h Dauer im Mittel signifikant häufiger niedrigere bzw. seltener erhöhte GM-CSF-Konzentrationen frei als nach Expositionen von 5 h oder 8 h Dauer.

Ein ähnliches Bild ergab sich für die Fallgruppe *atopisch nicht läSIONALE Haut*. Auch hier waren in den Analysemodellen (1), (3) und (4) die β -Koeffizienten einzelner Expositionsvariablen bei hohen Standardabweichungen nicht statistisch zuverlässig interpretierbar. Bezüglich der Expositionsdauer wurde jedoch für Langzeitexpositionen gegenüber den nachgewiesenen Kurzzeitexpositionseffekten im Mittel über alle Einflussvariablen ein statistisch signifikant ($t = -2,258$) reduzierender Effekt („odds ratio“ = 0,437:1) auf die Freisetzung von GM-CSF aus Keratinozyten nicht läSIONALER Haut festgestellt (vergleiche Tabelle 19). Derselbe Sachverhalt nachgewiesener Kurzzeit- und nicht vorhandener Langzeitexpositionseffekte wurde bereits in der Varianzanalyse quantitativer Konzentrationsverhältnisse deutlich (vergleiche 5.7.5.2, Abbildung 38).

Tabelle 21: Vergleich des GM-CSF-Sezernierungsverhaltens von Fallgruppen nach dem logistischen Regressionsmodell (2) in Form von Zweigruppenvergleichen über alle Expositionsvariablen ohne Interaktion

GMCSF Expositions- variablen	logistische Regression (2) gesund - atop. läSIONAL				logistische Regression (2) gesund - atop. nicht läSIONAL			
	Koeff. log. Regr. β	Std.- Abw. σ	odds/ odds ratio	$p > \chi^2$	Koeff. log. Regr. β	Std.- Abw. σ	odds/ odds ratio	$p > \chi^2$
Referenz s.Luft	0,538	0,757	1,713	0,477	-0,243	0,633	0,784	0,701
Umw. T/m-X	0,431	0,731	1,538	0,556	0,994	0,625	2,702	0,112
3 MAK T	1,648	0,748	5,196	0,028	2,388	0,646	10,888	0,0002
1 MAK T	0,278	0,731	1,321	0,704	0,943	0,643	2,323	0,190
1 MAK m-X	-0,446	0,747	0,640	0,551	0,350	0,652	1,419	0,591
Inkubator	1,938	1,024	6,941	0,610	2,301	0,790	9,983	0,040
Fallgruppe atop. Ekz.	-0,627	0,284	0,534	0,027	-0,454	0,127	0,635	0,0004

Fallgruppenvergleich

ad (2): Der Fallgruppenvergleich ohne Annahme einer Interaktion mit einzelnen Expositionsvariablen wies ein unter Schadstoffexposition signifikant unterschiedliches GM-CSF-Sezernierungsverhalten von Keratinozyten aus normal gesunder Haut und solchen aus Atopikerhaut nach (vergleiche Tabelle 21). Dabei setzten Keratinozyten aus läSIONALEM Ekzem mit $p > 0,027$ und einer „odds ratio“ von 0,534:1 signifikant häufiger reduzierte bzw. seltener erhöhte GM-CSF-Konzentrationen frei als Zellen aus gesunder Haut. Die GM-CSF-Sekretion aus Keratinozyten nicht läSIONALEN Ursprungs unterschied sich sogar hoch signifikant von der aus gesunden Zellen („odds ratio“ = 0,635:1; $p > 0,0004$). Die aus diesem interaktionsfreien Modell rückgeschlossenen Expositionseffekte zeigten für einzelne Variablen wesentliche Diskre-

panzen im Vergleich zu den experimentell und in der Einzelgruppenanalyse (1) festgestellten Expositionseffekten (vergleiche Abbildung 44 und Abbildung 42). Das bedeutete, dass entgegen der Modellannahme starke Interaktionseffekte zwischen den Fallgruppen und einzelnen Expositionsvariablen vorlagen, die aber aufgrund der bekannten Struktur der Untersuchungsdaten nicht analysiert werden konnten. Der Fallgruppenvergleich zwischen atopisch läSIONaler und nicht läSIONaler Haut ergab keine statistisch zuverlässig auswertbaren Ergebnisse.

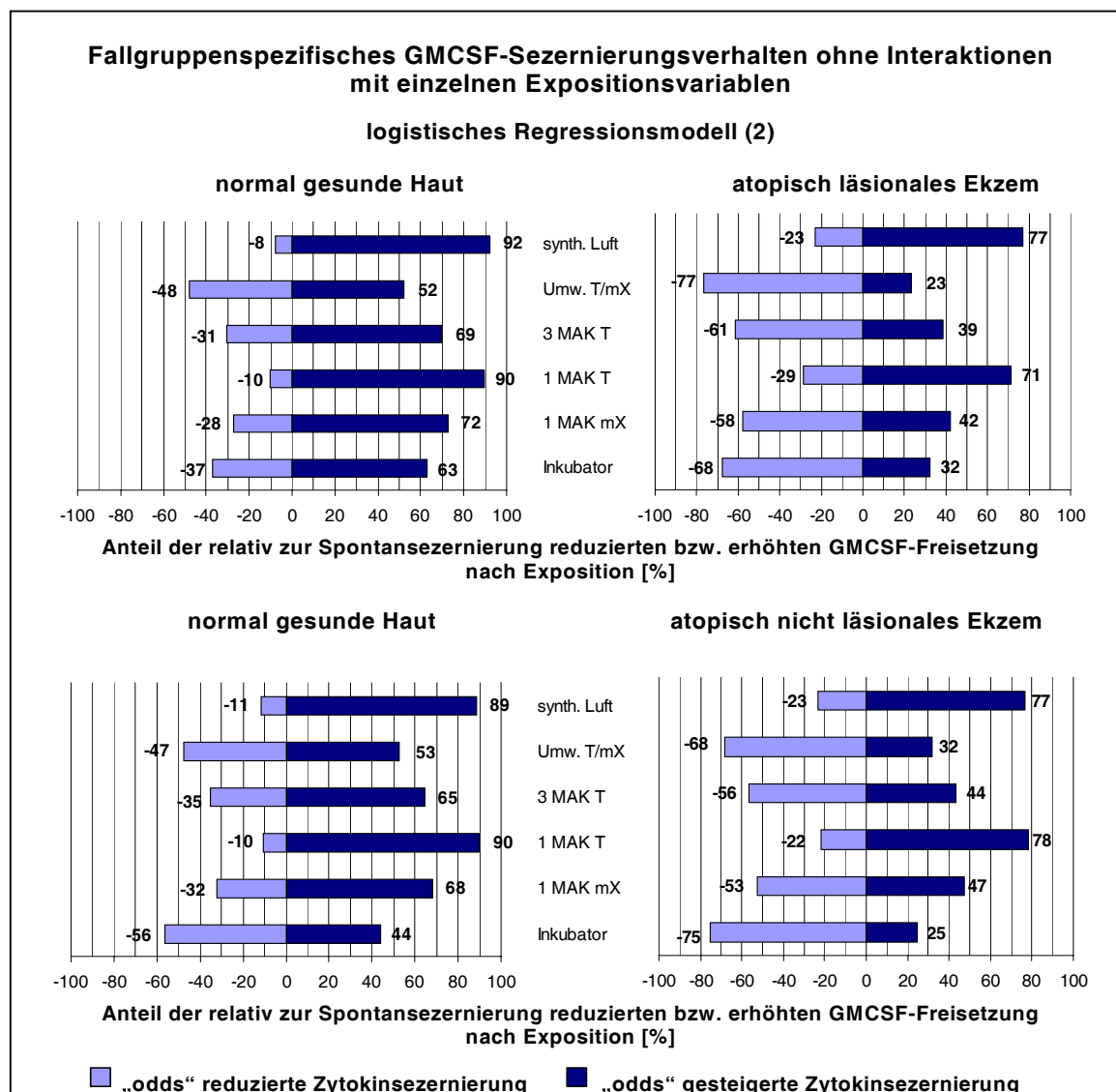


Abbildung 44: Fallgruppenspezifisches GM-CSF-Sezernierungsverhalten ohne Interaktion mit einzelnen Expositionsvariablen nach dem log. Regressionsmodell (2)

Interleukin 1 α Tabelle 22: Logistische Regressionsanalyse qualitativer Expositionseffekte auf die Freisetzung von Interleukin 1 α aus humanen Keratinozyten (KZ: Kurzzeit-, LZ: Langzeitexpositionen)

IL-1a Expositions- variablen	logistische Regression (1) expositionsdauerunabhängig				logistische Regression (4) KZ vs. LZ ohne Interaktion			
	Koeff. log. Regr. β	Std.- Abw. σ	odds/ odds/ ratio	t-Wert	Koeff. log. Regr. β	Std.- Abw. σ	odds/ odds/ ratio	t-Wert
gesund								
Referenz s.Luft /+KZ	-1,099	0,816	0,333	-1,346	-2,235	1,250	0,107	-0,788
Umw. T/m-X /+KZ	0,234	0,919	1,264	0,254	0,172	0,931	1,188	0,185
3 MAK T /+KZ	-2,015	1,090	0,133	-1,848	-2,122	1,103	0,120	-1,923
1 MAK T /+KZ	-1,170	1,017	0,310	-1,150	-1,190	1,028	0,304	-1,158
1 MAK m-X /+KZ	-1,735	1,094	0,176	-1,586	-1,863	1,107	0,155	-1,659
Inkubator /+KZ	-8,104	19,127	0,000	-0,424	-8,189	18,981	0,000	-0,431
Exp.-Dauer: LZ					0,735	0,589	2,085	1,248
läsional								
Referenz s.Luft /+KZ	-1,946	1,069	0,143	-1,820	-0,191	1,453	0,826	-1,131
Umw. T/m-X /+KZ	-9,257	31,061	0,000	-0,298	-9,077	30,341	0,000	-0,299
3 MAK T /+KZ	-0,047	1,234	0,954	-0,038	0,026	1,258	1,026	0,021
1 MAK T /+KZ	0,388	1,202	1,474	0,323	0,547	1,232	1,728	0,444
1 MAK m-X /+KZ	-9,257	35,861	0,000	-0,258	-9,168	35,036	0,000	-0,262
Inkubator /+KZ	1,658	1,314	5,249	1,262	1,497	1,347	4,468	1,112
Exp.-Dauer: LZ					-1,268	0,756	0,281	-1,678
nicht läsional								
Referenz s.Luft /+KZ	-9,203	21,366	1,000	0,000	-9,317	21,387	0,000	-0,436
Umw. T/m-X /+KZ	5,871	21,378	0,000	0,000	5,859	21,376	4×10^2	0,274
3 MAK T /+KZ	5,706	21,390	4×10^2	0,000	5,706	21,388	3×10^2	0,267
1 MAK T /+KZ	7,166	21,374	3×10^2	0,000	7,175	21,373	1×10^3	0,336
1 MAK m-X /+KZ	7,411	21,371	1×10^3	0,000	7,406	21,369	2×10^3	0,347
Inkubator /+KZ	0,000	31,276	1,000	0,000	0,005	31,273	1,005	0,000
Exp.-Dauer: LZ					0,076	0,653	1,079	0,116

Normal gesunde Haut

ad (1): Die Exposition mit synthetischer Luft führte bei 75 % der exponierten Kulturen relativ zur Spontansekretion zu einer Reduktion der gemessenen sekretierten Interleukin 1 α -Konzentration aus Keratinozyten pathologisch unauffälliger Haut (vergleiche Tabelle 22 und Abbildung 45 ad (1)). Weiter induzierten Expositionen mit 1 MAK Toluol mit einer Chance von 91 %, Expositionen mit 1 MAK m-Xylol mit einer Chance von 94 % und Expositionen mit 3 MAK Toluol mit einer Chance von 96 % eine häufigere Reduktion der IL-1 α -Sekretion. Die Effekte erlangten jedoch maximal grenzwertige Signifikanz ($t_{3 \text{ MAK Toluol}} = -1,848$). Expositionen mit dem niedrigkonzentrierten VOC-Gemisch führten in nur 70 % aller Zellkulturen ebenfalls zu niedrigerer

IL-1 α -Freisetzung. Für die Inkubatorkontrolle mit in 10 Fällen ausschließlich reduzierten Zytokinverhältnissen konstatierte das logistische Regressionsmodell aufgrund des geringen Informationsgehaltes (Reduktion codiert als Variable 0) keine sinnvoll interpretierbaren Koeffizienten.

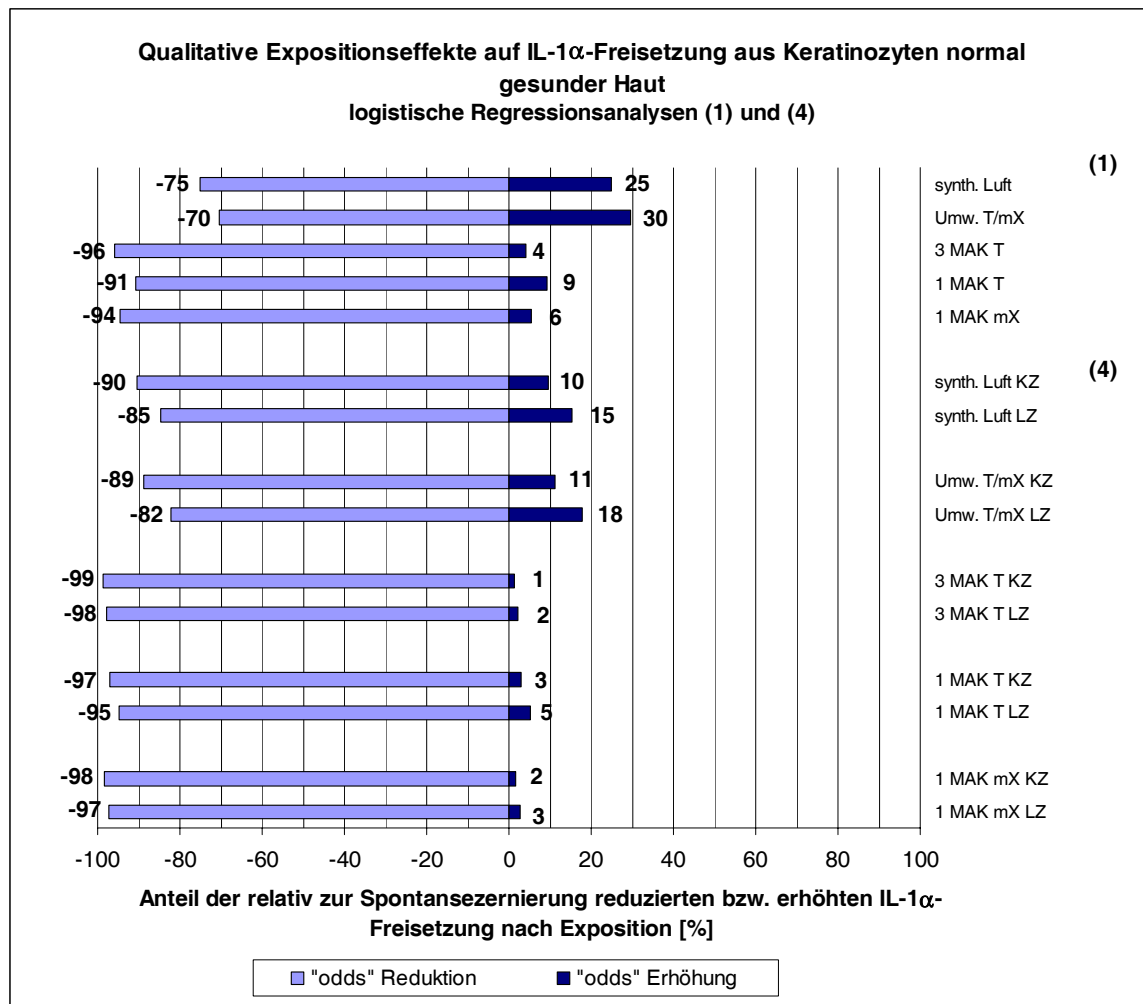


Abbildung 45: Qualitative Expositionseffekte auf die IL-1 α -Sekretion aus Keratinozyten normal gesunder Haut: (1) expositionsdauerunabhängige logistische Regressionsanalyse; (4) log. Regressionsanalyse: Kurzzeit- (KZ) versus Langzeitexposition (LZ) ohne Interaktion. Dargestellt ist der prozentuale Anteil aller exponierten Zellkulturen mit relativ zur Spontansekretion reduzierter (auf der negativen Skala aufgetragen) bzw. erhöhter Zytokinfreisetzung nach der Exposition.

ad (3) und (4): Aufgrund der hohen Anzahl von Variablen bei gleichzeitig geringem Informationsgehalt der überwiegenden Reduktionseffekte im logistischen Modell waren die Regressionsdaten für die einzelnen Expositionsvariablen getrennt nach der Expositionsdauer (3) nicht statistisch zuverlässig auswertbar (Daten nicht gezeigt). Unter der Annahme interaktionsfreier Effekte von Expositionsvariablen und Exposi-

tionsdauer (4) zeigte sich für alle Expositionsvariablen nach Kurzzeitexpositionen eine im Vergleich zur expositionsdauerunabhängigen Analyse häufiger reduzierte Zytokinfreisetzung (vergleiche Tabelle 22 und Abbildung 45 ad (4)). Der Einfluss durch das Prüfgas 3 MAK Toluol erreichte unter diesen Bedingungen eine grenzwertige Signifikanz ($t = -1,923$). Langzeitexpositionen induzierten weniger Fälle mit reduzierter Sekretion als Kurzzeitexpositionen, jedoch ebenfalls mehr als experimentell und unter expositionunabhängiger Analyse (1) konstatiert wurden. Der Modellvergleich wies daher die Hypothese fehlender Interaktionen zwischen Expositionsvariablen und Expositionsdauer hinsichtlich deren Einfluss auf die Interleukin-1 α -Sekretion aus normal gesunden Keratinozyten als nicht zutreffend zurück.

Atopisches Ekzem

Expositionsdauerunabhängig wurde in der Fallgruppe *läsionales atopisches Ekzem* bereits nach Kontrollexpositionen mit synthetischer Luft eine häufige („odds ratio“ = 0,431:1), grenzwertig signifikante ($t = -1,820$) Sekretionsreduktion ermittelt (87 % aller exponierten Kulturen). Mit Ausnahme von Experimenten mit 1 MAK Toluol verstärkten alle VOC-Prüfgasexpositionen diesen Reduktionseffekt (vergleiche Tabelle 22, ad (1)). Getrennt nach der Expositionsdauer erhöhte sich die Chance von 55 % auf eine im Vergleich zur Spontansekretion verminderte IL-1 α -Konzentration nach Kurzzeitkontrollexposition auf 84 % nach Langzeitexposition mit synthetischer Luft (4). Generell war, gemittelt über alle Expositionsvariablen, ein häufiger, reduzierender ($\beta = -1,268$; „odds ratio“ = 0,281:1), mit $t = -1,678$ jedoch nicht signifikanter Langzeitexpositionseffekt auf Keratinozyten aus läsionaler Haut festzustellen (vergleiche Tabelle 22, ad (4)). Da sowohl Kontroll- als auch VOC-Expositionen dieselben Effekte zeigten, deuteten diese Ergebnisse auf einen reinen Zeiteffekt hin. Das heißt, dass die Keratinozyten aus läsionalem atopischem Ekzem mit zunehmendem Alter und Zelldifferenzierung weniger Interleukin 1 α sezernierten. Bezüglich der Fallgruppe *nicht läsionales atopisches Ekzem* konnten aus den logistischen Regressionsanalysen – aufgrund von, aus bereits erläuterten, modellbedingten Informationsmangel resultierenden, hohen Varianzen – keine statistisch zuverlässige Aussagen über Auswirkungen der Expositionsarten auf die Freisetzung von IL-1 α geschlossen werden.

Fallgruppenvergleich

ad 2: Der Fallgruppenvergleich über alle Expositionsvariablen wies für Keratinozyten aus normal gesunder Haut gegenüber solchen aus läsionaler bzw. nicht läsionaler Haut von Probanden mit atopischem Ekzem kein signifikant unterschiedliches IL-1 α -Sezernierungsverhalten unter Schadstoffexposition nach (Regressionsanalysedaten nicht gezeigt). Auch die Varianzanalyse quantitativer Konzentrationsverhältnisse zeigte für alle drei Fallgruppen eine gegenüber der Spontansekretion gleichermaßen reduzierte IL-1 α -Konzentration (vergleiche 5.7.5.2 Abbildung 40).

Interleukin 6

Tabelle 23: Logistische Regressionsanalyse qualitativer Expositionseffekte auf die Freisetzung von IL-6 aus humanen Keratinozyten (KZ: Kurzzeit-, LZ: Langzeitexp.)

IL-6 Expositions- variablen	logistische Regression (1) expositionsdauerunabhängig				logistische Regression (4) KZ vs. LZ ohne Interaktion			
	Koeff. log. Regr. β	Std.- Abw. σ	odds/ odds ratio	t-Wert	Koeff. log. Regr. β	Std.- Abw. σ	odds/ odds ratio	t-Wert
gesund								
Referenz s.Luft /+KZ	0,288	0,764	1,334	0,377	2,984	1,501	19,767	1,988
Umw. T/m-X /+KZ	-0,288	0,957	0,750	-0,300	-0,018	1,033	0,982	-0,017
3 MAK T /+KZ	1,253	0,994	3,501	1,260	1,244	1,061	3,469	1,172
1 MAK T /+KZ	-9,490	16,778	0,000	-0,566	-9,283	16,249	0,000	-0,571
1 MAK m-X /+KZ	-0,442	0,945	0,643	-0,468	-0,295	1,020	0,745	-0,289
Inkubator /+KZ	-0,981	1,155	0,375	-0,849	-0,327	1,224	0,721	-0,267
Exp.-Dauer: LZ					-1,675	0,756	0,187	-2,215
läsional								
Referenz s.Luft /+KZ	-1,386	1,118	0,250	-1,240	3,408	1,499	30,205	2,273
Umw. T/m-X /+KZ	-7,816	14,288	0,000	-0,547	-7,724	20,124	0,000	-0,384
3 MAK T /+KZ	0,827	1,203	2,286	0,687	2,463	1,461	11,740	1,686
1 MAK T /+KZ	1,281	1,209	3,600	1,060	2,720	1,474	15,180	1,845
1 MAK m-X /+KZ	0,575	1,269	1,777	0,453	2,321	1,585	10,186	1,464
Inkubator /+KZ	2,996	1,565	20,005	-1,914	4,955	1,961	1 x 10²	2,527
Exp.-Dauer: LZ					-4,125	0,858	0,016	-4,806
nicht läsional								
Referenz s.Luft /+KZ	-0,511	0,730	1,000	-0,699	1,609	1,046	4,998	1,538
Umw. T/m-X /+KZ	-1,238	0,905	0,600	-1,367	-1,217	0,956	0,296	-1,273
3 MAK T /+KZ	-0,108	0,868	0,290	-0,125	-0,272	0,921	0,762	-0,295
1 MAK T /+KZ	-0,742	0,924	0,898	-0,803	-1,045	0,977	0,352	-1,070
1 MAK m-X /+KZ	0,511	0,829	0,476	0,616	0,458	0,881	1,581	0,520
Inkubator /+KZ	0,105	1,169	1,111	0,090	0,279	1,245	1,322	0,224
Exp.-Dauer: LZ					-1,459	0,501	0,232	-2,912

Normal gesunde Haut

ad (1): Aufgrund der geringen Fallzahl mit nach Exposition veränderter IL-6-Freisetzung aus Keratinozyten normal gesunder Haut ermittelte das logistische Regressionsmodell überwiegend Schätzer mit relativ hohen Standardabweichungen und niedriger Signifikanz. Die in Abbildung 46 dargestellten, im Modell ermittelten prozentualen Chancen stimmten aber mit den ohne statistisches Modell ermittelten Verhältnissen reduzierender bzw. verstärkender Effekte überein (vergleiche Kapitel 5.7.5.4).

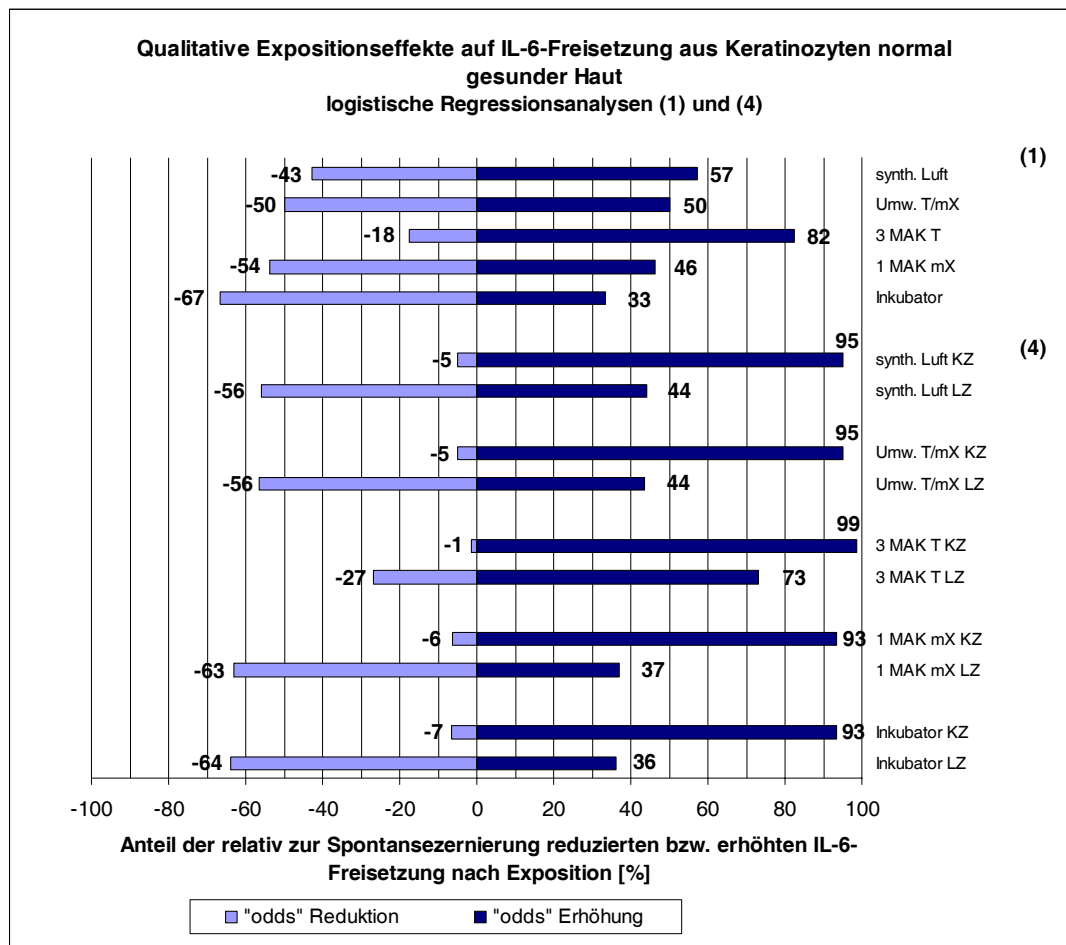


Abbildung 46: Qualitative Expositionseffekte auf die IL-6-Sekretion aus Keratinozyten normal gesunder Haut: (1) expositionsdauerunabhängige logistische Regressionsanalyse; (4) log. Regressionsanalyse: Kurzzeit- (KZ) versus Langzeitexposition (LZ) ohne Interaktion. Dargestellt ist der prozentuale Anteil aller exponierten Zellkulturen mit relativ zur Spontansekretion reduzierter (negative Skala) bzw. erhöhter Zytokin-freisetzung nach der Exposition.

Für das Prüfgas 1 MAK Toluol mit in 13 Fällen ausschließlich reduzierter IL-6-Freisetzung nach Exposition konstatierte das logistische Regressionsmodell aufgrund des geringen Informationsgehaltes (Reduktion = Variable 0) keine interpretierbaren

Koeffizienten. Allein die nach Exposition mit 3 MAK Toluol festgestellten, überwiegend erhöhten IL-6 Konzentrationen (82 %) waren dem Modell nach sinnvoll interpretierbar. Dieser einzig auffällige Effekt war jedoch statistisch nicht signifikant.

ad (3) und (4): Die Regressionsdaten für die einzelnen Expositionsvariablen getrennt nach der Expositionsdauer (3) waren wiederum aufgrund der hohen Variablenzahl bei gleichzeitig geringem Informationsgehalt im logistischen Modell und zusätzlich niedriger Fallzahlen mit veränderten IL-6-Konzentrationsverhältnissen nicht statistisch zuverlässig auswertbar (Daten nicht gezeigt). Für die Expositionsdauer wurden im Modell (4) statistisch signifikante Auswirkungen beobachtet: Nach Kurzzeitexposition mit synthetischer Luft bestand eine Chance von 20:1 auf erhöhte IL-6-Freisetzung ($\beta = 2,984$; $t = 1,988$), während nach Langzeitexpositionen die Chance im Mittel auf weniger als 1/25 („odds“ = 1:1,27 mit $\beta = -1,675$ und $t = -2,215$) verkleinert wurde (vergleiche Tabelle 23 und Abbildung 46). Aufgrund der niedrigen Fallzahlen veränderter IL-6-Konzentrationsverhältnisse ließen sich jedoch keine sicheren Rückschlüsse auf die Abhängigkeit (Interaktion) der Expositionsdauer von einzelnen Expositionsvariablen in Bezug auf deren Einfluss auf die IL-6-Freisetzung aus Keratinozyten gesunder Haut ziehen.

Atopisches Ekzem

In Hinsicht auf die IL-6-Sekretion aus Zellen der *Fallgruppe läSIONALES atopisches Ekzem* wies die expositionsdauerunabhängige Regressionsanalyse überwiegend nur geringfügig modulierende Expositionseffekte nach (vergleiche Tabelle 23, ad (1)). Lediglich nach Inkubatorkontrollexperimenten wurde eine annähernd signifikant häufige Sekretionserhöhung nachgewiesen ($\beta = 2,996$; $t = 1,914$). Die Expositionsdauer zeigte hingegen deutliche Effekte (vergleiche Tabelle 23, ad (4)): Kurzzeitkontrollexpositionen gegenüber synthetischer Luft führten bereits mit einer Chance von 30:1 zu signifikant häufig erhöhter IL-6-Freisetzung ($\beta = 3,408$; $t = 2,273$). Relativ dazu induzierten Kurzzeitexpositionen gegenüber reinen VOC-Prüfgasen noch deutlich häufiger verstärkte Zytokinfreisetzung („odds ratios“ zwischen 10 und 15). Die Effekte erreichten jedoch maximal grenzwertige Signifikanz ($t_{1\text{MAK T}} = 1,845$). Die Regressionsdaten zum VOC-Gemisch konnten aufgrund hoher Standardabweichungen nicht zuverlässig beurteilt werden. Standardinkubationen führten mit einem Chancenverhältnis von 100:1 zu einem signifikanten IL-6 Anstieg ($\beta = 4,955$;

t = 2,527). Nach Langzeitexpositionen reduzierte sich im Vergleich zu Kurzzeitexpositionen die Chance auf erhöhte IL-6-Freisetzung, gemittelt über alle Expositionsvariablen, signifikant um den Faktor 0,3 ($\beta = -4,125$; „odds“ = 0,326; t = -4,806). D. h., unabhängig von der Expositionsvariable setzten Primärkeratinozyten läSIONALER Haut nach Kurzzeitexperimenten von 5 h oder 8 h Dauer im Mittel signifikant häufiger erhöhte bzw. seltener niedrigere IL-6-Konzentrationen frei als nach Langzeitexpositionen von 18 h oder 24 h Dauer.

Ein seltenerer, die IL-6-Sekretion jedoch gegenüber Kurzzeitexpositionsversuchen signifikant reduzierender Langzeitexpositionseffekt wurde auch in der Fallgruppe *nicht läSIONALES atopisches Ekzem* nachgewiesen ($\beta = -1,459$; „odds“ = 0,537; t = -2,912). Doch zeigten auch Kurzzeitexpositionen nur geringfügig die IL-6-Freisetzung modulierende, nicht signifikante Effekte auf Keratinozyten dieser Fallgruppe im Vergleich zu solchen aus läSIONALEM Ekzem.

Tabelle 24: Vergleich des IL-6-Sezernierungsverhaltens von Fallgruppen nach dem logistischen Regressionsmodell (2) in Form von Zweigruppenvergleichen über alle Expositionsvariablen ohne Interaktion

IL-6 Expositions- variablen	logistische Regression (2) gesund - atop. läSIONAL			
	Koeff. log. Regr. β	Std.- Abw. σ	odds/ odds ratio	$p > \chi^2$
Referenz s.Luft	0,822	0,820	2,275	0,316
Umw. T/m-X	-0,879	0,831	0,415	0,290
3 MAK T	0,743	0,773	2,103	0,336
1 MAK T	-0,706	0,816	0,494	0,387
1 MAK m-X	-0,017	0,802	0,984	0,984
Inkubator	0,254	0,990	1,289	0,798
Fallgruppe atop. Ekz.	-0,865	0,384	0,421	0,0240

Fallgruppenvergleich

ad (2): Der Fallgruppenvergleich über alle Expositionsvariablen wies ein unter Schadstoffexposition signifikant unterschiedliches IL-6-Sezernierungsverhalten von Keratinozyten aus normal gesunder Haut und Zellen aus läSIONALEM Ekzem nach. Dabei setzten Keratinozyten aus läSIONALEM Ekzem mit $p > 0,024$ und einer „odds ratio“ von 0,421:1 signifikant häufiger reduzierte bzw. seltener erhöhte IL-6-Konzentrationen frei als Zellen aus gesunder Haut (vergleiche Tabelle 24). Die aus diesem

interaktionsfreien Modell für einzelne Variablen rückgeschlossenen Expositionseffekte unterschieden sich deutlich von den experimentell und in der Einzelgruppenanalyse (1) festgestellten Expositionseffekten (vergleiche Abbildung 47 und Abbildung 46). Wie im Fallgruppenvergleich zur GM-CSF-Freisetzung wies dieser Unterschied auf zusätzliche Interaktionseffekte zwischen den Fallgruppen und einzelnen Expositionsvariablen hin, die aber aufgrund der Struktur des Studiendatensatzes nicht gezielt untersucht werden konnten.

Zwischen den Fallgruppen normal gesunde Haut und atopisch nicht läsionale Haut bzw. zwischen den Fallgruppen atopisch läsionale und nicht läsionale Haut wurden keine statistisch signifikanten Unterschiede in Bezug auf die Sekretion von IL-6 festgestellt (Daten nicht gezeigt).

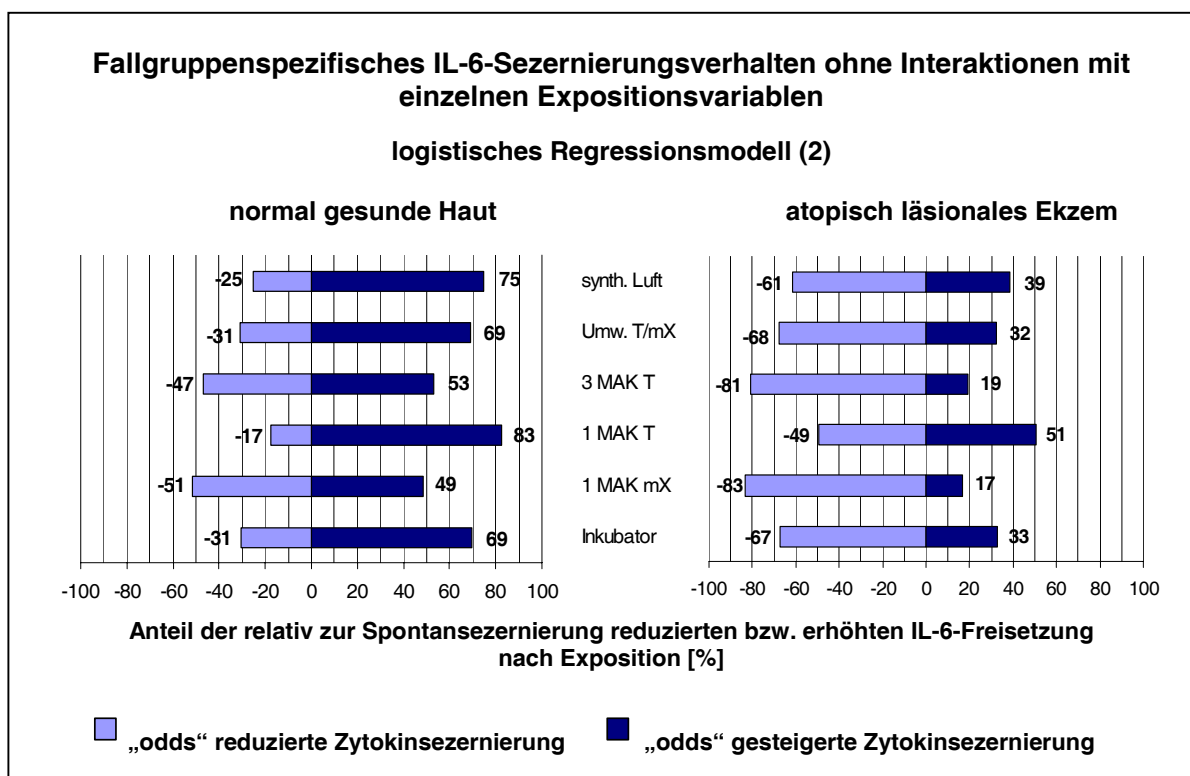


Abbildung 47: Fallgruppenspezifisches IL-6-Sezernierungsverhalten ohne Interaktion mit einzelnen Expositionsvariablen nach dem logistischen Regressionsmodell (2)

Zusammenfassung der statistischen Analyseergebnisse

1. Effekte der VOC-Expositionsvariablen

- ◆ Expositionen gegenüber 3 MAK Toluol veränderten die Zytokinfreisetzung im Verhältnis zur Kontrollexposition am häufigsten. Zudem war die Stärke der Effekte besonders hoch. Beides galt unabhängig vom Zytokin und von der Effektrichtung (verstärkte oder reduzierte Sekretion).
- ◆ Die Zytokinfreisetzung folgte jedoch keiner konsequenten Dosis-Wirkungsabhängigkeit in Bezug auf die VOC-Konzentrationen. Expositionen gegenüber dem niedrig konzentrierten Umwelt-VOC-Gemisch zeigten in der Fallgruppe gesunde Haut zwar am seltensten die IL-1 α -Freisetzung reduzierende Effekte. Allerdings waren diese quantitativ besonders stark. Die in Keratinozytenkulturen pathologisch unauffälliger Haut induzierte, erhöhte GM-CSF-Freisetzung entsprach quantitativ wie qualitativ eher der von um 2-3 Größenordnungen höher konzentrierten 3 MAK Toluol-Exposition als der nach 1 MAK VOC-Expositionen. Hier ergaben sich erste Hinweise auf einen Kombinationseffekt des Umwelt-VOC-Gemischs.
- ◆ Keratinozyten aus atopischer Haut sezernierten nach Expositionen gegenüber dem Umwelt-VOC-Gemisch seltener und weniger erhöhte GM-CSF-Konzentrationen als Zellen aus gesunder Haut. Dabei unterschieden sich die quantitativen Konzentrationsdaten der Fallgruppen gesunde und atopisch läsionale Haut signifikant (vergleiche Abbildung 37).
- ◆ Sowohl Kontroll- als auch VOC-Expositionen führten in den Keratinozytenkulturen gesunder Haut sowie aus läSIONALEM Ekzem ausnahmslos zur Reduktion der IL-1 α -Sekretion. Auch diese Beobachtung wurde für alle drei Fallgruppen in der Regressionsanalyse qualitativer wie auch in der Varianzanalyse quantitativer Zytokinkonzentrationsdaten deutlich.
- ◆ Dahingegen zeigten - unabhängig von der Expositionsdauer - nur wenige Zellkulturen gesunden sowie atopischen Ursprungs eine im Vergleich zur Spontansekretion veränderte IL-6-Freisetzung. Unter diesen Kulturen fanden sich - mit Ausnahme der gegenüber 3 MAK Toluol exponierten - in etwa gleich viele Kulturen mit verstärkter und reduzierter Zytokinfreisetzung.

2. Expositionsdauereffekte

- ◆ Im Mittel über alle Expositionsvariablen wies die Varianzanalyse in allen drei Fallgruppen nach Kurzzeitexpositionen erhöhte, nach Langzeitexpositionen unveränderte GM-CSF-Konzentrationen nach. Dabei unterschieden sich die Expositionsdauereffekte auf Keratinozyten aus gesunder und atopisch nicht läsionaler Haut signifikant. In der qualitativen Analyse wurden in allen Fallgruppen im Vergleich zu Kurzzeitexpositionen nach Langzeitexpositionen signifikant häufiger niedrigere bzw. seltener erhöhte GM-CSF- und IL-6-Konzentrationen freigesetzt. Für beide Zytokine erwies sich eine jeweils hochsignifikante, gegenüber Kurzzeitexpositionen noch häufigere Reduktion der Sekretion aus Keratinozyten der Fallgruppe läasionales, atopisches Ekzem. Bezogen auf die Spontansekretion bedeutete das, gemittelt über alle Expositionsvariablen wurden in allen drei Fallgruppen häufige Effekte nach Kurzzeitexpositionen dokumentiert, während kaum dauerhafte oder verzögerte Reaktionen nach Langzeitexpositionen festgestellt wurden.
- ◆ Auf die Freisetzung von IL-1 α zeigte die Expositionsdauer hingegen keine signifikant unterschiedlichen Effekte. Sowohl Kurzzeit- als auch Langzeitexpositionen führten zur Freisetzung von ausschließlich sehr niedrigen IL-1 α -Konzentrationen. Eine Tendenz zum zusätzlich reduzierend wirkenden Langzeiteffekt zeigte sich jedoch auch hier in der Fallgruppe läasionales, atopisches Ekzem.

3. Interaktionseffekte von Expositionsvariablen und Expositionsdauer

- ◆ Hinsichtlich der Sekretion von GM-CSF sowie IL-1 α aus normal gesunden Keratinozyten ergaben sich Widersprüche zwischen den experimentell beobachteten und in den Regressionsmodellen (1) und (3) berechneten sowie den im Modell (4) simulierten, gemittelten Effekten. Letztere wurden durch starke variablenspezifische Interaktionseffekte geprägt. Die Hypothese interaktionsfreier Effekte von Expositionsvariablen und Expositionsdauer wurde für diese Zytokine klar abgelehnt.
- ◆ Besonders ausgeprägte Interaktionseffekte ermittelte das logistische Regressionsmodell (3) in der Fallgruppe normal gesunde Haut: Nach Versuchen mit dem niedrigkonzentrierten Umwelt-VOC-Gemisch sowie mit 3 MAK Toluol wurden häufige, die GM-CSF-Sekretion verstärkende Kurzzeit- und Lang-

zeitexpositionseffekte nachgewiesen. Nach Expositionen gegenüber 1 MAK-konzentrierten VOC wurden hingegen kaum Kurzzeiteffekte, aber häufig niedrigere GM-CSF-Konzentrationen nach Langzeitexpositionen festgestellt.

- ◆ Weitere Interaktionseffekte zwischen Expositionsvariablen und Expositionsdauer verdeutlichte das Modell (3) der Varianzanalyse für die GM-CSF-Freisetzung in der Fallgruppe nicht läSIONALES atopisches Ekzem. Der Effekt von 1 MAK m-Xylol unterschied sich signifikant.

4. Fallgruppenspezifisches Zytokinsezernierungsverhalten

Die Zweigruppenvergleiche wiesen ein zum Teil hochsignifikant unterschiedliches Zytokinsezernierungsverhalten für Keratinozyten verschiedener Fallgruppen nach:

- ◆ Keratinozyten aus läSIONALEM, atopischem Ekzem setzten signifikant häufiger reduzierte/seltener erhöhte GM-CSF- bzw. IL-6-Konzentrationen frei als Zellen aus normal gesunder Haut ($p_{\text{GM-CSF}} > 0,027$; $p_{\text{IL-6}} > 0,024$).
- ◆ Die GM-CSF-Freisetzung von Zellen aus nicht läSIONALEM Ekzem war gegenüber denen aus pathologisch unauffälliger Haut sogar hochsignifikant häufiger reduziert/seltener erhöht ($p > 0,0004$).
- ◆ Für IL-1 α ergab sich hingegen kein fallgruppenspezifisch unterschiedliches Zytokinsezernierungsverhalten.
- ◆ Auch das Sezernierungsverhalten der Fallgruppen läSIONALES und nicht läSIONALES atopisches Ekzem unterschied sich nicht signifikant.

5.7.5.4 Datenanalyse aller Konzentrationsdaten anhand der Differenzierung von Fallzahlen und Individuenstärken

Abschließend wurden *alle* erhobenen Konzentrationsdaten qualitativ unter Aufschlüsselung der Fallzahlen vergleichend analysiert (1). In dieser Analyse wurden erstmals auch die Experimente mit unveränderten Konzentrationsverhältnissen berücksichtigt. Zusätzlich wurden die Fallgruppen anhand der Individuenstärken pro Versuchsvariable hinsichtlich eventueller individueller Dominanzen untersucht (2).

ad (1): Abbildung 48 bis Abbildung 50 zeigen getrennt nach Zytokinen die Effekte der Expositionsdauer unter Differenzierung der Konzentrationsverhältnisse nach erhöhter bzw. reduzierter sowie unveränderter Zytokinfreisetzung pro Expositionsvariable.

Die Balkenhöhe beschreibt den relativen Anteil dieser drei Gruppen in [%], am Balkenkopf ist zudem die absolute Fallzahl aufgetragen.

GM-CSF

Normal gesunde Haut

In den GM-CSF-Konzentrationsverhältnissen (vergleiche Abbildung 48) in der Fallgruppe normal gesund dominierte nach Kurz- und Langzeitexpositionen mit dem umweltrelevanten VOC-Gemisch mit 83 % bzw. 69 % der Fälle eine erhöhte Zytokin-freisetzung. Nach Langzeitexposition stieg die Fallzahl reduzierter Sekretion von 11 % auf 25 %, während der Anteil unveränderter Konzentrationen vergleichbar blieb. Eine entsprechende Dominanz erhöhter Zytokinkonzentration (70 % bzw. 74 %) zeigte sich nach Exposition mit 3 MAK Toluol. Die Expositions-dauer blieb hier ohne verändernden Effekt.

Für die Prüfgaskonzentration 1 MAK Toluol dominierte hingegen nach Kurzzeitexposition der Anteil reduzierter Konzentration mit 50 % leicht gegenüber dem erhöhter Konzentration mit 44 %. Eine deutliche Dominanz zeigte sich jedoch nach Langzeitexposition mit respektive 75 % gegenüber 19 %. Auch nach 1 MAK m-Xylol war eine starke Abnahme erhöhter GM-CSF-Freisetzung von 44 % auf 4 % bei gleichzeitiger Zunahme reduzierten GM-CSFs von 25 % auf 68 % von Kurzzeit- zu Langzeitexpositionen festzustellen. Der Anteil unveränderter Zytokinkonzentrationen blieb bei allen VOC-Expositionsvariablen von der Expositions-dauer unbeeinflusst.

Die Ergebnisse der Kontrollexpositionen mit synthetischer Luft sowie der Kontrollinkubationen zeigten ein vergleichbares Bild: Nach kurzer Exposition traten gleich viele Erhöhungen wie Reduzierungen und keine gleichbleibenden Konzentrationen auf, während nach längerer Zeitdauer sowohl Fälle unveränderter Zytokinkonzentration, als auch vermehrt erhöhte und weniger reduzierte GM-CSF-Freisetzung nachgewiesen wurden. Bezüglich der Aussagekraft dieser letzteren Ergebnisse sind jedoch die niedrigen Fallzahlen zu berücksichtigen.

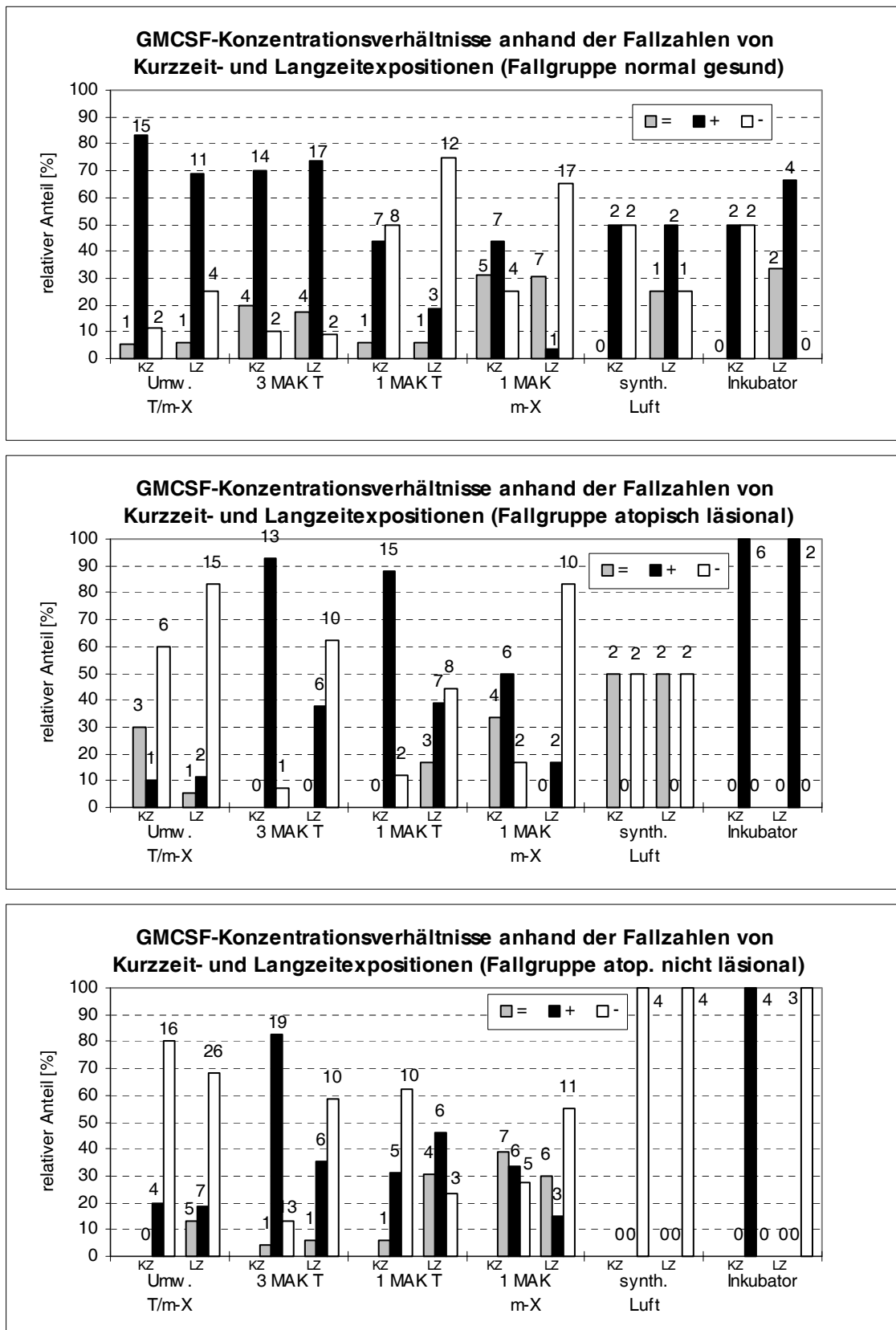


Abbildung 48: Vergleich der Fallzahlen von erhöhten (+) bzw. reduzierten (-) sowie unveränderten (=) GM-CSF-Konzentrationsverhältnissen nach Kurzzeit (KZ)- und Langzeitexpositionen (LZ) pro Expositionsvariable und Fallgruppe. Die Balkenhöhe beschreibt den relativen Anteil in [%], am Balkenkopf ist die absolute Fallzahl n aufgetragen. (Datentabelle siehe Anhang A3.14)

Atopisches Ekzem und Fallgruppenvergleich

Im Gegensatz zur Fallgruppe normal gesunde Haut dominierte bei den GM-CSF-Konzentrationen in der Fallgruppe atopisch läsionale Haut nach Kurzzeitexposition mit dem niedrigkonzentrierten VOC-Gemisch der Anteil reduzierter Konzentrationen (60 %), was sich nach Langzeitexposition noch verstärkte (83 %). Ebenfalls unterschiedlich zur normal gesunden Fallgruppe traten nach kurzer Exposition mit 3 MAK Toluol zu 93 % erhöhte GM-CSF-Freisetzung auf, nach längerer Exposition waren jedoch nurmehr 38 % Erhöhung und 62 % GM-CSF-Reduktion zu verzeichnen. Ein leicht abgeschwächtes, aber vergleichbares Ergebnis ergab sich nach der niedriger konzentrierten 1 MAK Toluol-Exposition. Ähnlich wie bei normal gesunden Keratinozyten sezernierten auch Keratinozyten aus läSIONalem Ekzem nach 1 MAK m-Xylol-Langzeitexposition deutlich weniger GM-CSF als nach Kurzzeitexposition. Während synthetische Luft unabhängig von der Versuchsdauer gleichermaßen erniedrigte wie unveränderte Konzentrationsverhältnisse induzierte, waren bereits nach kurzer, wie auch nach längerer Inkubation der Zellen unter Standardbedingungen im Brutschrank stark erhöhte GM-CSF-Konzentrationen nachweisbar.

Im Vergleich zwischen läSIONalem und nicht läSIONalem atopischen Ekzem verursachte vor allem die Expositionsvariable 1 MAK Toluol anteilig leicht veränderte Konzentrationsverhältnisse. So wurden nach Kurzzeitexposition in 10 von 16 Fällen im Vergleich zur Spontansekretion reduzierte Zytokinkonzentrationen aus Zellen nicht läSIONaler Haut festgestellt, in 5 von 16 Fällen waren diese erhöht, in einem Fall unverändert. Nach Langzeitexposition dominierten mit 55 % eine erhöhte Konzentration gegenüber 30 % unveränderter und 15% reduzierter GM-CSF-Freisetzung. Synthetische Luft induzierte unabhängig von der Versuchsdauer reduzierte Zytokinfreisetzung aus Zellen nicht läSIONaler Haut, während im Vergleich zur Spontansekretion nach kurzer Inkubation höhere GM-CSF-Konzentrationen, nach langer Inkubation jedoch niedrigere Konzentrationen gemessen wurden.

Interleukin 1 α

Interleukin 1 α wurde mit nur wenigen Ausnahmen in allen drei Fallgruppen und allen Expositions- sowie Expositions-dauervariablen in Relation zur Spontansekretion in deutlich niedrigeren Konzentrationen freigesetzt (vergleiche Abbildung 49). Eine Ausnahme bildete die Kontrollexposition mit synthetischer Luft, die nach Kurzzeitexposition sowohl erhöhte als auch reduzierte Zytokinfreisetzung aus Keratinozyten

normal gesunder Haut induzierte. Eine weitere Ausnahme bildete die Kurzzeitinkubation von Keratinozyten aus läSIONalem atopischen Ekzem. Hier wurde eine im Vergleich zur Spontansekretion überwiegend verstärkte IL-1 α -Freisetzung konstatiert, die jedoch bei weiterer Inkubation unter die spontan freigesetzte Konzentration sank. Wie im Fall von GM-CSF war auch hier die Aussagekraft der Kontrollversuche aufgrund der geringen Fallzahlen eingeschränkt.

Einzig die Ergebnisse nach Expositionen normal gesunder Keratinozyten gegenüber umweltrelevantem VOC-Prüfgasgemisch zeigten statistisch zuverlässig neben reduzierten auch erhöhte (nach Langzeit) bzw. unveränderte (nach Kurzzeit) Konzentrationen. Insbesondere die in 7 von 16 exponierten Keratinozytenkulturen erhöhten IL-1 α -Konzentrationen nach Langzeitexpositionsbedingungen waren bemerkenswert, da mit längerer Versuchsdauer üblicherweise eine zusätzliche Reduktion der IL-1 α -Freisetzung einherging. Die freigesetzten IL-1 α -Konzentrationen nach Umwelt-VOC-Gemisch-Expositionen aus Keratinozyten aus den atopischen Fallgruppen waren hingegen zu 96 % bzw. 100 % reduziert. Die Auswirkungen von 3 MAK Toluol waren in allen drei Fallgruppen vergleichbar. Langzeitexpositionen induzierten eine jeweils weitere Reduktion der IL-1 α -Freisetzung. Ein in den Fallgruppen leicht unterschiedliches Bild wurde nach Exposition mit 1 MAK Toluol nachgewiesen: Die IL-1 α -Freisetzung aus gesunden Keratinozyten war zu 94 % bzw. 88 % reduziert. Nach Kurzzeitexposition der Zellen aus läSIONalem Ekzem zeigten sich zu je 40 % unveränderte und reduzierte Konzentrationen, während alle 16 Zellkulturen aus nicht läSIONalem Ekzem nach kurzer Exposition weniger IL-1 α freisetzten, nach Langzeitexposition aber sowohl unveränderte (29 %) wie verstärkte (21 %) und verminderte (50 %) IL-1 α -Konzentrationen nachgewiesen wurden.

In den Fallgruppen pathologisch unauffällige und atopisch läSIONale Haut wurden nach Exposition mit 1 MAK m-Xylol vornehmlich reduzierte Konzentrationsquotienten beobachtet. Für atopisch nicht läSIONale Haut war das Verhältnis der Konzentrationsquotienten in 58 % kleiner, in 26 % größer bzw. in 16 % gleich 1. Die Expositionsdauer führte wiederum ausschließlich zu niedrigerer IL-1 α -Freisetzung.

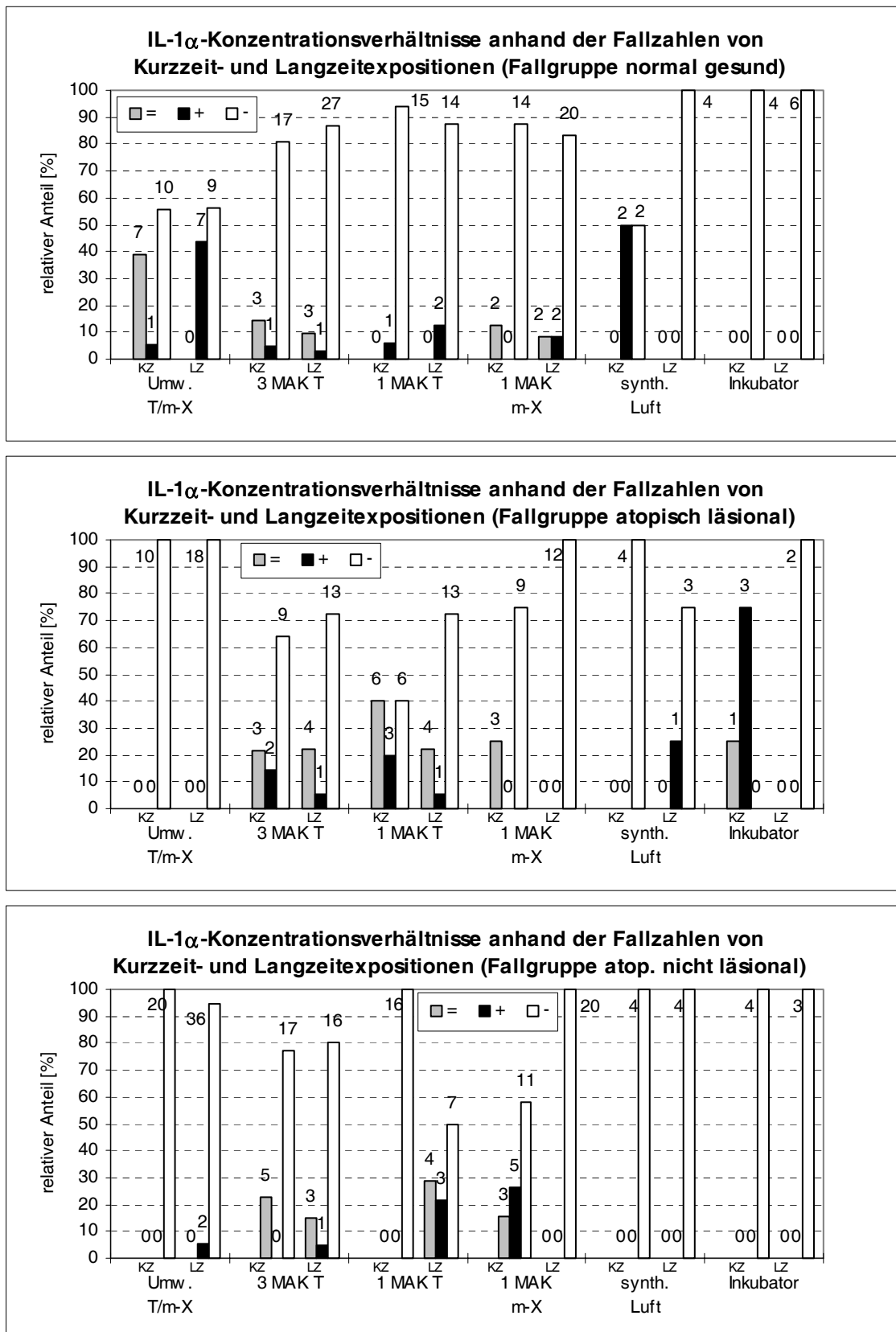


Abbildung 49: Vergleich der Fallzahlen von erhöhten (+) bzw. reduzierten (-) sowie unveränderten (=) IL-1 α -Konzentrationsverhältnissen nach Kurzzeit (KZ)- und Langzeitexpositionen (LZ) pro Expositionsvariable und Fallgruppe. Die Balkenhöhe beschreibt den relativen Anteil in [%], am Balkenkopf ist die absolute Fallzahl n aufgetragen. (Datentabelle siehe Anhang A3.15)

Interleukin 6

Normal gesunde Haut

In der Fallgruppe pathologisch unauffällige Haut dominierten unveränderte Konzentrationsverhältnisse von IL-6 (vergleiche Abbildung 50). Im Fall der VOC-Expositionsvariablen verschob sich das anteilige Verhältnis von Kurz- zu Langzeitexpositionen generell zugunsten einer niedrigeren IL-6-Freisetzung, wobei mit Ausnahme von 1 MAK Toluol weiterhin der Anteil unveränderter Freisetzung dominierte. Unter Berücksichtigung der niedrigen Fallzahlen ließen die Ergebnisse auf eine ähnliche Freisetzung in den Kontrollversuchen schließen.

Atopisches Ekzem

In der Fallgruppe läasionales Ekzem wurden nach kurzen Expositionen - außer im Fall des VOC-Gemischs - neben unveränderten auch erhöhte Konzentrationen zu relevanten Anteilen konstatiert. Im Fall der Inkubationskontrolle dominierten diese sogar. Nach Langzeitexpositionen fand sich jedoch vielfach in überwiegendem Anteil eine verminderte Freisetzung von IL-6. Diese Beobachtungen galten sowohl für die VOC-Expositionsvariablen als auch für die Kontrollversuche.

Auch Keratinozyten aus nicht läsionaler Haut zeigten nach umweltrelevanter VOC-Exposition vor allem unveränderte oder erniedrigte IL-6-Freisetzung. Unabhängig von der Expositionsdauer dominierten nach Exposition mit 3 MAK Toluol die unveränderten Konzentrationsverhältnisse, nach Langzeitexpositionen nahm die Zytokin-konzentration insgesamt betrachtet ab. Anders als die läsionalen Ursprungs setzten die Keratinozyten nicht läsionaler Haut nach Kurzzeitexposition mit 1 MAK Toluol überwiegend weniger IL-6 als bei Spontansekretion, nach Langzeitexposition überwiegend gleiche Konzentrationen von IL-6 frei. Auffallend war ferner der konzentrationssteigernde Effekt von kurzen Expositionen mit 1 MAK m-Xylol. Auch die Kontrollversuche zeigten bei niedriger Fallzahl sowohl positive wie auch negative, bzw. keine Effekte. Längere Versuchsdauer führte zur Freisetzung niedrigerer IL-6-Konzentrationen.

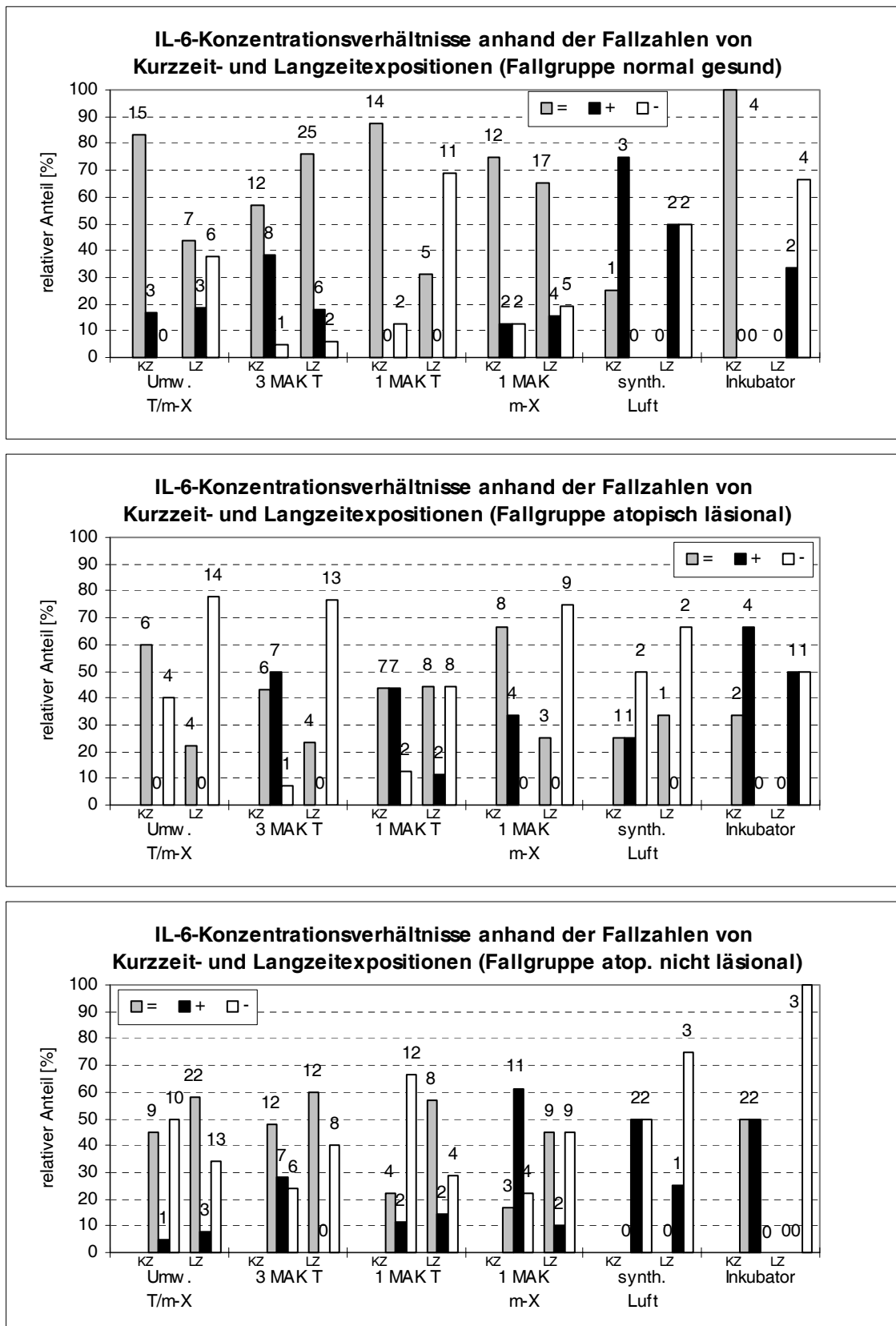


Abbildung 50: Vergleich der Fallzahlen von erhöhten (+) bzw. reduzierten (-) sowie unveränderten (=) IL-6-Konzentrationsverhältnissen nach Kurzzeit (KZ)- und Langzeitexpositionen (LZ) pro Expositionsvariable und Fallgruppe. Die Balkenhöhe beschreibt den relativen Anteil in [%], am Balkenkopf ist die absolute Fallzahl n aufgetragen. (Datentabelle siehe Anhang A3.16)

Fallgruppenvergleich

Ein Vergleich der VOC-Effekte zwischen den Fallgruppen zeigte nach Exposition mit dem umweltrelevanten VOC-Gemisch überwiegend unveränderte sowie erhöhte IL-6-Konzentrationen aus gesunden Keratinozyten und vergleichsweise häufiger reduzierte Konzentrationen aus Keratinozyten atopischer Haut. Kurzzeitexpositionen mit 3 MAK Toluol induzierten hingegen in allen drei Fallgruppen unveränderte sowie erhöhte IL-6-Konzentrationen, ebenso nach Langzeitexposition in der Fallgruppe gesunde Haut, allein in den atopischen Fallgruppen dominierte hier eine reduzierte IL-6-Freisetzung. 1 MAK Toluol- bzw. 1 MAK m-Xylol-Expositionen zeigten uneinheitliche, scheinbar regellose Effekte. Ein konzentrationsabhängiger Zusammenhang der IL-6-Sekretion innerhalb der Fallgruppen bestand nicht.

ad (2): Tabelle 25 bis Tabelle 27 zeigen getrennt nach Zytokinen eine Differenzierung der Fallgruppen nach Individuen sowie nach Fallzahlen der Konzentrationsverhältnisse nach den einzelnen Expositionsvariablen. Da die Fallgruppen in der Versuchsplanung als Einheit galten, wurden die Individuen einer Fallgruppe zum Teil unterschiedlich häufig unter gleichen Versuchsbedingungen wiederholt exponiert. Abhängig von der Verteilung der Konzentrationsverhältnisse wurden deshalb bei gleichzeitig niedriger Anzahl unterschiedlicher Individuen oder niedriger Fallzahl pro Konzentrationsverhältnis die Ergebnisse einzelner Expositionsvariablen stark durch einzelne Individuen geprägt.

GM-CSF

Im Fall des Zytokins GM-CSF (vergleiche Tabelle 25) dominierte insbesondere das Individuum 9 (IZ) mit 21 von 29 Fällen gesteigerter GM-CSF-Konzentration das Ergebnis nach 3 MAK Toluol-Exposition. Eine leichte Dominanz zeigten ferner das Individuum 12 (MS) nach der Exposition mit dem VOC-Gemisch sowie Individuum 4 (HM) nach 1 MAK m-Xylol. In beiden Fällen wurde aber das Gesamtergebnis durch eine Reihe weiterer Individuen unterstützt. Dasselbe galt für die Individuen 21 (AW) und 23 (GK) nach 3 MAK Toluol bzw. dem VOC-Gemisch sowie Individuum 29 (AW) und 30 (DK) nach dem VOC-Gemisch. Ferner wurde die Anzahl unveränderter Konzentrationen nach 1 MAK m-Xylol durch das Individuum 30 (DK) geprägt.

Tabelle 25: Individuelle Differenzierung der Fallgruppen nach Expositionsvariablen und GM-CSF-Konzentrationsverhältnissen

GMCSF gesund	Expositionsvariablen und Fallzahlen pro Konzentrationsverhältnis n/v																					
	Umw. T/m-X			3 MAK T			1 MAK T			1 MAK m-X			synth. Luft			Inkubator			Exp. gesamt			
	=	+	-	=	+	-	=	+	-	=	+	-	=	+	-	=	+	-	=	+	-	
BK 1		4														2				6		
HF 2									2							2						4
HH 3							1	1	2	3	2	1								4	3	3
HM 4												8										8
HS 5								2							2							4
HW 6									6													6
ii 7										2		6								2		6
IW 8	1	5	2						4											1	5	6
IZ 9				6	21	2														6	21	2
ko 10										3	2	3								3	2	3
LW 11									4													4
MS 12		8		1	2					2			1	2	1	2	2		4	14	3	3
OF 13		2		1	4	1	1	5		2			2	2	2				2	15	3	3
oo 14												4										4
SF 15	1	5																		1	5	
UF 16								2	2	2									2	2	2	2
VMR 17				4	1															4	1	
WZ 18			4																			4
xx 19		2								2										2	2	
Fallzahl	2	26	6	8	29	6	2	10	20	12	8	22	1	4	3	2	6	2				
gesamt:	6%	76%	18%	19%	67%	14%	6%	31%	63%	29%	19%	51%	13%	50%	38%	20%	60%	20%				
läsional	Expositionsvariablen und Fallzahlen pro Konzentrationsverhältnis n/v																					
	Umwelt T/X			3 MAK T			1 MAK T			1 MAK m-X			synth. Luft			Inkubator			Exp. gesamt			
	=	+	-	=	+	-	=	+	-	=	+	-	=	+	-	=	+	-	=	+	-	
AA 20							2						2		2				4		2	
AW 21	1	1			9	3		4	2	2	1	3				2			3	17	8	
DK 22	3	2	3				1	1			2	2							4	5	5	
GK 23			10		6				2			4								6	16	
MK 24			4		1	3		4	2											5	9	
SH 25			4			4		2	4			2								2	14	
SW 26					2			6			4					2				14		
VM 27					1	1		4		2	1	1	2		2		4		4	10	4	
Fallzahl	4	3	21	0	19	11	3	21	10	4	8	12	4	0	4	0	8	0				
gesamt:	14%	11%	75%	0%	63%	37%	9%	62%	29%	17%	33%	50%	50%	0%	50%	0%	100%	0%				
nicht läsional	Expositionsvariablen und Fallzahlen pro Konzentrationsverhältnis n/v																					
	Umwelt T/X			3 MAK T			1 MAK T			1 MAK m-X			synth. Luft			Inkubator			Exp. gesamt			
	=	+	-	=	+	-	=	+	-	=	+	-	=	+	-	=	+	-	=	+	-	
AA 28	4	2	8		6	2	1	1				6				2			5	11	16	
AW 29			10		5	3		2	2		4	4				2				13	19	
DK 30		3	9		5	1	1		5	9	1	2			4		2	10	9	23		
GK 31		2	6				2		4	1		1			4		1	3	2	16		
GS 32					1	3	3												1	3	3	
MK 33		3	3		1	6	1		6		2	2							1	17	6	
SH 34			2			4		2	2		2									4	8	
SW 35	1	1	4				1		1	3		1							5	1	6	
Fallzahl	5	11	42	2	25	14	5	11	14	13	9	16	0	0	8	0	4	3				
gesamt:	9%	19%	72%	5%	61%	34%	17%	37%	47%	34%	24%	42%	0%	0%	100%	0%	57%	43%				

Neben einerseits eindeutigen, individuenübergreifenden Trends bezüglich der Freisetzung von GM-CSF nach vergleichbarer Expositionsvariable zeigten sich andererseits auch gegensätzliche, deutlich individuenspezifische Reaktionsmuster.

Einzelne Individuen wiesen unabhängig von der Expositionsvariable ausschließlich bzw. überwiegend positive (Individuum 26 (SW) bzw. Individuum 13 (OF)) oder überwiegend negative (Individuum 25 (SH)) Konzentrationsveränderungen auf, während die meisten Individuen unterschiedliche Reaktionen auf unterschiedliche Prüfgase und/oder Prüfgaskonzentrationen zeigten. Eine Reihe Individuen reagierte außerdem uneinheitlich bei wiederholter gleicher Exposition, wobei zu berücksichtigen ist, dass in dieser Tabelle Kurz- und Langzeitexpositionen zusammengefasst wurden.

Interessant waren ferner Vergleiche der Keratinozyten aus läsionaler und nicht läsionaler Haut identischer Individuen. So fand sich stark unterschiedliches Sezernierungsverhalten bei Keratinozyten der Individuen DK (22 und 30) und AW (21 und 29), ähnliches Verhalten hingegen bei SH (25 und 34).

Interleukin 1 α

Wie im Fall von GM-CSF wurde auch das Ergebnis der Freisetzung von Interleukin 1 α (vergleiche Tabelle 26) nach Exposition mit 3 MAK Toluol stark durch das Individuum 9 (IZ) geprägt. Während die Exposition auf die GM-CSF-Sekretion jedoch verstärkend wirkte, wurde im Vergleich zur Spontansekretion weniger Interleukin 1 α freigesetzt. Schwächere Einflüsse wurden durch die Individuen 4 (HM), 7 (ii) sowie 29 (AW) und 30 (DK) auf die Ergebnisse nach 1 MAK m-Xylol-Exposition ausgeübt, wie auch durch die Individuen 22 (DK), 23 (GK), 28, (AA), 29 (AW) und 30 (DK) auf die Ergebnisse nach Exposition mit dem VOC-Prüfgasgemisch. Diese häufiger vertretenen Individuen wurden aber in allen Fällen durch eine Reihe anderer Individuen mit gleicher Reaktion unterstützt.

Generell lag eine auffallende, von der Expositionsvariable unabhängige Tendenz aller Individuen zu verminderter IL-1 α -Sekretion vor. In der Fallgruppe pathologisch unauffällige Haut zeigten nur die Individuen 1, 8, 10, 12, 15, 16 und 17 nach unterschiedlichen Expositionsvariablen zu mindestens 30 % auch erhöhte und/oder unveränderte Konzentrationen. In den Fallgruppen atopisches Ekzem traten diese vor allem nach Toluolexpositionen auf. Keratinozyten läsionalen Ursprungs der Individuen AW, SW und VM sowie DK- und MK-Zellen nicht läsionaler Haut sind hier zu nennen.

Die IL-1 α -Sekretion von Keratinozyten aus läsionaler und nicht läsionaler Haut identischer Individuen nach gleicher Exposition war im Wesentlichen einheitlich.

Tabelle 26: Individuelle Differenzierung der Fallgruppen nach Expositionsvariablen und IL-1 α -Konzentrationsverhältnissen

IL-1a gesund	Expositionsvariablen und Fallzahlen pro Konzentrationsverhältnis n/v																		Exp. gesamt		
	Umwelt T/X			3 MAK T			1 MAK T			1 MAK m-X			synth. Luft			Inkubator					
	Individuum	=	+	-	=	+	-	=	+	-	=	+	-	=	+	-	=	+	-	=	+
BK 1	2		2															2	2		4
HF 2							1	1										2		1	3
HH 3									4			5									9
HM 4												8									8
HS 5									2									2			4
HW 6									6												6
ii 7												8									8
IW 8	2	3	3						4										2	3	7
IZ 9				2	1	31													2	1	31
ko 10										1	2	4							1	2	4
LW 11									4												4
MS 12	2	4	2		1	3						2		2	2			4	2	7	13
OF 13			2	1		7			6	2					4				3		19
oo 14										1		3							1		3
SF 15	1	1	4																1	1	4
UF 16								2	2			2								2	4
VMR 17				3		4													3		4
WZ 18			4																		4
xx 19			2									2									4
Fallzahl gesamt:	7	8	19	6	2	45	0	3	29	4	2	34	0	2	6	0	0	10			
	21%	24%	56%	11%	4%	85%	0%	9%	91%	10%	5%	85%	0%	25%	75%	0%	0%	100%			
läsional	Expositionsvariablen und Fallzahlen pro Konzentrationsverhältnis n/v																		Exp. gesamt		
	Umwelt T/X			3 MAK T			1 MAK T			1 MAK m-X			synth. Luft			Inkubator					
	Individuum	=	+	-	=	+	-	=	+	-	=	+	-	=	+	-	=	+	-	=	+
AA 20							1		1						4				1		5
AW 21			2	5		9	2		4			4	2			1		1	10		20
DK 22			8						2			4									14
GK 23			10			6	1		1			4							1		21
MK 24			4			4			6												14
SH 25			4		1	3	1	1	4			2							1	2	13
SW 26				1	1		3	2	1			3	1				2		5	5	4
VM 27				1	1		2	1				4		1	3		1	3	3	4	10
Fallzahl gesamt:	0	0	28	7	3	22	9	4	19	0	0	21	3	1	7	1	3	4			
	0%	0%	100%	22%	9%	69%	28%	13%	59%	0%	0%	100%	27%	9%	64%	13%	38%	50%			
nicht läsional	Expositionsvariablen und Fallzahlen pro Konzentrationsverhältnis n/v																		Exp. gesamt		
	Umwelt T/X			3 MAK T			1 MAK T			1 MAK m-X			synth. Luft			Inkubator					
	Individuum	=	+	-	=	+	-	=	+	-	=	+	-	=	+	-	=	+	-	=	+
AA 28			14	1		6			2	3	1	2						2	4	1	26
AW 29			10	2		5			4			8						2	2		29
DK 30			2	10		6		1	5			4			4			2		7	35
GK 31			8				1		5			2			4			1	1		20
GS 32				3		7													3		7
MK 33			6	2	1	5	1	1	4			4							3	2	19
SH 34			2			4		1	3			2								1	11
SW 35			6				2					4							2		10
Fallzahl gesamt:	0	2	56	7	1	33	4	3	23	0	5	30	0	0	8	0	0	7			
	0%	3%	97%	17%	2%	80%	13%	10%	77%	0%	14%	86%	0%	0%	100%	0%	0%	100%			

Interleukin 6

Wie schon bei GM-CSF und IL-1 α wurde auch das Ergebnis zur Freisetzung von Interleukin 6, hier bezüglich unveränderter und erhöhter Zytokinfreisetzung (vergleiche Tabelle 27), nach Exposition mit 3 MAK Toluol extrem durch das Individuum 9 (IZ) geprägt. Eine weitere Dominanz durch die zwei Individuen 22 (DK) und 23 (GK) fand sich nach Exposition mit niedrigkonzentriertem Toluol/m-Xylol. Weitere individuell dominierte Ergebnisse wurden durch jeweils mehrere andere Individuen der Fallgruppe bestätigt.

Die Zytokinfreisetzung von IL-6 zeigte sich nach den Expositionsversuchen auffallend häufig unverändert. Nur wenige Individuen wiesen insgesamt anteilig mehr Fälle reduzierter (6, 11, 22, 23, 31, 34, 35) oder erhöhter (25, 26, 34) IL-6-Konzentrationen auf.

Im Vergleich von Zellkulturen läsionalen und nicht läsionalen Ursprungs eines Individuums zeigten sich bezüglich der IL-6-Freisetzung einerseits deutliche Unterschiede in der Antwort auf gleiche Expositionsvariablen (Individuum AW (21, 29) nach 3 bzw. 1 MAK Toluol, Individuum DK (22, 30) nach Umwelt T/m-X und 1 MAK m-Xylol), andererseits vergleichbares Verhalten im Fall der Individuen GK (23, 31), MK (24, 33).

Korrelierte Zytokinfreisetzung

Die häufig eingesetzten Individuen 9 (IZ), 12 (MS) und 13 (OF) zeigten für alle drei untersuchten Zytokine eine ähnliche Gesamtverteilung der Konzentrationsverhältnisse pro Zytokin: Während bezüglich des Zytokins GM-CSF eine allgemeine Konzentrationssteigerung deutlich dominierte, wurde die IL-1 α -Konzentration ebenso deutlich reduziert. Der IL-6-Gehalt blieb hingegen unverändert. Ein ähnliches Verhalten fand sich auch bei den Zellen läsionaler Haut von Individuum 21 (AW) bzw. Zellen nicht läsionaler Haut von Individuum 33 (MK). Während sich die Gesamtergebnisse der Individuen 12, 13, 21 und 33 aus allen Expositionsvariablen zusammensetzten, wurde Individuum 9 dabei ausschließlich Expositionen mit 3 MAK Toluol unterzogen. Eine Verallgemeinerung der diesbezüglichen Korrelation war daher mit größerer Unsicherheit behaftet.

Weiteres vergleichbares Sezernierungsverhalten in Bezug auf alle drei Zytokine bzw. Korrelationen zwischen den Zytokinen, die weitere Gruppierungen von Individuen erlaubten, wurden darüber hinaus nicht festgestellt.

Tabelle 27: Individuelle Differenzierung der Fallgruppen nach Expositionsvariablen und IL-6-Konzentrationsverhältnissen

IL-6 gesund	Expositionsvariablen und Fallzahlen pro Konzentrationsverhältnis n/v															Exp. gesamt						
	Umwelt T/X			3 MAK T			1 MAK T			1 MAK X			synth. Luft						Inkubator			
	Individuum	=	+	-	=	+	-	=	+	-	=	+	-	=	+	-	=	+	-	=	+	-
BK 1	3	1															2			3	3	
HF 2								2									2			4		
HH 3								4			5		1							9		1
HM 4											4		4							4		4
HS 5								2									2			4		
HW 6										6												6
ii 7											6		2							6		2
IW 8	8							1		3										9		3
IZ 9				21	14															21	14	
ko 10											4	4								4	4	
LW 11									4													4
MS 12	3	5		3		1					2				3	1			4	8	8	6
OF 13	2			7		1	6				2			1	1	2				18	1	3
oo 14											2	2								5	2	
SF 15	4		2																	2		2
UF 16								4			2									6		
VMR 17				6		1														6		1
WZ 18			4																	4		4
xx 19		2									2									2	2	
Fallzahl gesamt:	20	6	6	37	14	3	19	0	13	29	6	7	1	4	3	4	2	4				
	63%	19%	19%	69%	26%	6%	59%	0%	41%	69%	14%	17%	13%	50%	38%	40%	20%	40%				
läsional																Exp. gesamt						
Individuum	=	+	-	=	+	-	=	+	-	=	+	-	=	+	-	=	+	-	=	+	-	
AA 20							2						1	2					3		2	
AW 21	2			5	2	7	4	1	1	6						2			19	3	8	
DK 22			8						2			4									14	
GK 23			10	3	2	1			2			4							3	2	17	
MK 24	4			1		3	5		1			1							10		5	
SH 25	4				1	3	1	2	3	1	4								6	7	6	
SW 26					2		1	4	1							2			1	8	1	
VM 27				1	1		2	2		4			1	1	2		3	1	8	7	3	
Fallzahl gesamt:	10	0	18	10	8	14	15	9	10	11	4	9	2	1	4	2	5	1				
	36%	0%	64%	31%	25%	44%	44%	26%	29%	46%	17%	38%	29%	14%	57%	25%	63%	13%				
nicht läsional																Exp. gesamt						
Individuum	=	+	-	=	+	-	=	+	-	=	+	-	=	+	-	=	+	-	=	+	-	
AA 28	7	3	4	5	3		2			3	2	1				2			19	8	5	
AW 29	8		2	4	2	2	1	2	1	4	4					2			17	10	5	
DK 30	11	1		4		2	2		4	5	5	2		1	3			2	22	7	13	
GK 31			8				2		4			2		2	2			1	2	2	17	
GS 32				8		2													8		2	
MK 33	4		2	3	2	3	4		2			4							11	2	11	
SH 34			2			4		2	2		2								0	4	8	
SW 35	1		5				1		1			4							2		10	
Fallzahl gesamt:	31	4	23	24	7	13	12	4	14	12	13	13	0	3	5	2	2	3				
	53%	7%	40%	55%	16%	30%	40%	13%	47%	32%	34%	34%	0%	38%	63%	29%	29%	43%				

Zusammenfassung im Kontext der statistischen Analyseergebnisse

Die nach Fallzahlen differenzierte Datenanalyse aller Expositionsexperimente bestätigte und ergänzte die Ergebnisse der Varianzanalyse quantitativer und der Regressionsanalyse qualitativer Zytokinkonzentrationsdaten:

- ◆ Wie auch in der Varianzanalyse wurden gegensätzliche Effekte auf das GM-CSF-Sezernierungsverhalten zwischen den Fallgruppen normal gesund (erhöhte Konzentrationen) und atopisch läsional bzw. nicht läsional (niedrigere Konzentrationen) nach Expositionen gegenüber dem Umwelt-VOC-Gemisch festgestellt. Die Tendenz zu schwächerer Zytokinsekretion aus Keratinozytenkulturen aus atopischer Haut im Vergleich zur Fallgruppe normal gesunde Haut nach Exposition gegenüber dem VOC-Gemisch zeigte sich nun auch für die Zytokine IL-1 α und IL-6.
- ◆ Auch auf hochkonzentrierte Einzelsubstanz-Prüfgase reagierten die Keratinozytenkulturen nur vereinzelt mit einem im Vergleich zur Fallgruppe gesunde Haut positiven Sekretionseffekt. Ein signifikant höherer 1 MAK m-Xylol-Kurzzeiteffekt auf die GM-CSF-Sekretion wurde in der quantitativen Datenanalyse für die Fallgruppe nicht läsionales Ekzem beobachtet. Die qualitative Auswertung ergab außerdem ausschließlich für Kurzzeitexpositionen gegenüber 1 bzw. 3 MAK Toluol höhere Zytokinfreisetzung in der Fallgruppe läsionales, für 3 MAK auch in der Fallgruppe nicht läsionales Ekzem. Die IL-1 α -Konzentrationen waren nach 1 bzw. 3 MAK Toluol (läsionales Ekzem) bzw. 1 MAK Toluol und m-Xylol (nicht läsionales Ekzem) Einzelsubstanz-Expositionen geringfügig höher oder unverändert, ausschließlich nach Kurzzeitexpositionen ebenso die IL-6-Konzentrationen. Eine systematische Substanz-Fallgruppen-Wirkungsbeziehung ergab sich hieraus nicht.
- ◆ Die Auftrennung nach Kurz- bzw. Langzeitexpositionsdauer im Vergleich der Fallzahlen von erhöhten, reduzierten sowie unveränderten IL-1 α -Konzentrationsverhältnissen zeigte mit 44 % einen auffallend hohen Anteil unveränderter (Kurzzeitexposition) bzw. erhöhter IL-1 α -Freisetzung aus Keratinozytenkulturen gesunder Haut nach Langzeitexpositionen gegenüber dem Umwelt-VOC-Gemisch. Dieses Ergebnis bildete die einzige Ausnahme im üblicherweise reduzierten IL-1 α -Freisetzungverhalten nach VOC-Expositionen. Aus der Varianz- und Regressions-

analyse ging diese detaillierte Beobachtung nicht hervor. Sie bekräftigte jedoch den im Regressionsmodell dokumentierten Interaktionseffekt.

- ◆ Ferner wurden die in der Varianzanalyse wie der logistischen Regression konstatierten Interaktionseffekte zwischen Expositionsdauer und VOC-Expositionsvariablen auf die GM-CSF-Freisetzung aus Keratinozytenkulturen der Fallgruppe normal gesunde Haut bestätigt. Auch der sonst generell reduzierend wirkende Langzeitexpositionseffekt wurde erneut festgestellt.
- ◆ Im Übrigen wurde die Beobachtung sowohl nach Kurzzeit- als auch nach Langzeitexpositionsversuchen überwiegend reduzierter Interleukin 1α -Konzentrationen bestätigt.
- ◆ Die meisten Keratinozytenkulturen sezernierten nach VOC-Experimenten im Vergleich zur Spontansekretion unveränderte IL-6-Konzentrationen. Dennoch führte das Umwelt-VOC-Gemisch zu einer häufigeren IL-6-Sezernierungserhöhung von normal gesunden Keratinozyten als Expositionsversuche gegenüber 1 MAK Toluol bzw. 1 MAK m-Xylol, wenn auch nicht so häufig wie 3 MAK Toluol-Expositionen. Anders in Keratinozytenkulturen aus atopischem Ekzem: Dort wurden nach 1 bzw. 3 MAK Einzelsubstanz-Expositionen wesentlich häufiger erhöhte IL-6-Konzentrationen freigesetzt als nach Exposition gegenüber dem VOC-Gemisch. Im Fallgruppenvergleich induzierte das Toluol/m-Xylol-Gemisch außerdem seltener erhöhte und häufiger reduzierte IL-6-Freisetzung in den Fallgruppen atopisches Ekzem als in der Fallgruppe pathologisch unauffällige Haut

Die Untersuchung des individuellen Zytokinfreisetzungsverhaltens unter Berücksichtigung der Individuenstärken pro Expositionsvariable deckte einzelne durch Einzelindividuen beeinflusste Versuchsgruppen auf. Mit einer Ausnahme konnten jedoch alle aus den vorangegangenen Datenanalysen geschlossenen Effekte als von Einzelindividuen unabhängig bestätigt werden.

- ◆ Die Expositionsversuche gegenüber 3 MAK Toluol wurden wesentlich durch das Individuum 9 (Fallgruppe gesund) und das Individuum 21 (Fallgruppe atopisch lässional) beeinflusst. Trotz der Unterstützung durch weitere unabhängige Individuen in einigen Versuchsgruppen musste dies berücksichtigt werden: Die in der statistischen Analyseauswertung hervorgehobenen signifikant häufigen, starken Effekte auf die Zytokinfreisetzung nach 3 MAK Toluol-Expositionen wurden durch Ein-

zelindividuen geprägt. Die Ergebnisse stellten daher möglicherweise nicht das typische Verhalten der gesamten Fallgruppe dar.

- ◆ Alle weiteren in den statistischen Datenanalysen ermittelten VOC-Effekte wurden hingegen durch eine Anzahl unabhängiger Individuen repräsentiert, so dass eine individuenbedingte Verfälschung der Ergebnisse ausgeschlossen werden konnte.
- ◆ Zusätzlich ergab die individuenbezogene Datenauswertung ein über mehrere Individuen für alle drei Zytokine korreliertes Sezernierungsverhalten der Keratinozyten, das die Beobachtungen allgemein erhöhter GM-CSF-, reduzierter IL-1 α - sowie überwiegend unveränderter IL-6-Konzentrationen der vorangegangenen Analysemethoden unterstütze.

6 Diskussion

6.1 Isolierung und Kultivierung humaner Primärzellen aus gesunder Haut und aus atopischem Ekzem

6.1.1 Antibiotika-Antimycotika-Behandlung für sterile, in *in vitro* Experimenten vergleichbare, vitale Primärkulturen

Die mikrobielle Flora der Haut stellt ein gravierendes Problem in der Primärkultur humaner Hautzellen dar, das häufig zu Kulturverlust führt oder bei unerkannter, unterschwelliger Kontamination das zelluläre Wachstums- und Expressionsverhalten massiv verändert. Das Ziel, reproduzierbar vergleichbare, vitale Primärkulturen für *in vitro* Experimente zu gewinnen, forderte daher eine standardisierte, ein breites Infektionsspektrum umfassende, antimikrobielle Behandlung. Eine Reihe in der Literatur beschriebener Methoden²⁶⁴⁻²⁶⁶ erwies sich entweder als nicht ausreichend dekontaminierend oder führte aufgrund ihrer Zytotoxizität zu einem Zellverlust von bis zu 60 %. Einzig eine hochkonzentrierte Antibiotikum-Antimycotikum-Kombination aus dem Methodenprotokoll des *Centre Charles Zviak, L'ORÉAL, Clichy*²⁶⁷ zeigte sich als wirksam gegen die Hautkeime gesunder Probanden: Penicillin G (gram (+) Bakterien), Streptomycinsulfat (gram (+) und gram (-) Bakterien), Gentamicin (gram (+) und gram (-) Bakterien, darunter eine Reihe Penicillin/Streptomycin-resistente, sowie Mycoplasmen), Amphotericin B als Fungizone[®] (Pilze und Hefen). Kurze Inkubationsintervalle von je 20 Minuten reduzierten bei intensiver antimikrobieller Wirkung die zytotoxischen und proliferationsinhibierenden Effekte der hochkonzentrierten Wirkstoffe auf die äußeren Zellschichten der Hautproben. Durch das Erneuern der Lösung wurden Mikroorganismen und ihre Stoffwechselprodukte entfernt und so ein exponentielles Wachstum resistenter Keime unterbunden. Drei Inkubationszyklen mit abgestufter Wirkstoffkonzentration und -zusammensetzung ermöglichten die Isolierung steriler, vitaler und proliferierender Zellen aus gesunden Hautproben, so dass in der Zellkultur neben den üblichen 100 U/ml Penicillin/Streptomycin keine zusätzlichen Antibiotika eingesetzt werden mussten. Periodische Unterbrechungen des Antibiotika-Einsatzes stellten sicher, dass weder antibiotikaresistente Organismen entstanden noch unterdrückte mikrobielle Kontaminationen vorlagen, die durch den

Antibiotikagebrauch verdeckt wurden. Regelmäßige Mycoplasmentests bestätigten die Kontaminationsfreiheit der Kulturen.

6.1.2 *Staphylococcus aureus*-spezifische Antibiotikabehandlung – Einsatz von Flucloxacillin in der Zellkultur

Bakterielle Kontaminationen und die damit verbundenen Kulturverluste sind aufgrund der natürlichen Hautflora generell ein großes Problem in der Keratinozytenprimärkultur, insbesondere aber bei Probanden mit atopischem Ekzem: Mehr als 95 % der läsionalen und 75 % der nicht läsionalen Hautareale dieser Patienten weisen pro cm² Haut bis zu 10⁷ grampositive *Staphylococcus aureus*-Kolonien auf^{281,282}. 70 % der in der vorliegenden Arbeit exzidierten Atopikerhautproben waren kontaminiert. Die Kolonisierung gesunder Haut beträgt allgemein nur 2-25 %²⁸¹. Die hier untersuchten, gesunden Hautproben wiesen keinen *S. aureus*-Befall auf. Die meisten *Staphylococcus aureus* Stämme sind multiresistent gegen Antibiotika (u. a. Penicillin, Erythromycin und Methicillin), darunter auch die üblicherweise in der Zellkultur eingesetzten wie Penicillin G oder Aminoglycoside wie Streptomycin und Gentamicin. Die in dieser Arbeit bei Hautproben gesunder Probanden erfolgreich eingesetzte Antibiotika-Antimycotika-Behandlung erwies sich daher als nicht effizient gegenüber *S. aureus*. Auch die empfohlene, mehrtägige lokale Behandlung mit 0,3 % Gentianaviolettlösung vor Probenahme der Biopsie²⁶⁸ reduzierte zwar die Koloniezahl, verhinderte aber nicht die Kontamination der Zellkulturen. Gegen jüngere Antibiotika wie penicillinaseresistente Isoaxylpenicilline oder Fusidylsäure zeigen sich einige gram-positive Streptokokken- und Staphylokokkenstämme dagegen noch sensitiv^{283,284,285}. Im Rahmen der vorliegenden Arbeit wurde deshalb erstmals der in der systemischen *in vivo*-Therapie übliche Einsatz des semi-synthetischen Isoaxylpenicillins Flucloxacillin²⁸⁶ in die Zellkultur übertragen und als erfolgreiche Methode etabliert. Das lyophilisierte Antibiotikum-Präparat *Staphylex* (1 g Flucloxacillin und 2,2 mmol Natrium) ermöglichte den Einsatz von reinem Flucloxacillinnatrium ohne weitere die Zellkultur zytotoxisch oder pH-Wert-verändernd beeinflussende Zusatzstoffe. Mit 1 % Flucloxacillin wurde die höchste, in Zytotoxizitätsstudien bei einer Reaktionsdauer von 1 h weder Adhärenz- noch Vitalitätsverlust verursachende Konzentration eingesetzt. Die Antibiotikallösung wurde – analog zur Antibiotika-Antimycotika-Routinebehandlung – alle 20 Minuten erneuert. Der intensive, hochkonzentrierte Einsatz hatte wiederum den

Vorteil, dass sowohl tote Mikroorganismen und ihre zytotoxischen Stoffwechselprodukte entfernt als auch ein exponentielles Wachstum resistenter Stämme verhindert wurden. 70 % der kontaminierten Hautproben waren bereits nach einer 20-minütigen Inkubation mit 1 % Flucloxacillin dekontaminiert. Nach maximal sechs Behandlungszyklen waren selbst alle in Provokationsstudien gezielt mit *S. aureus* kontaminierten Zellkulturen bei einer Vitalität von 80-85 % erfolgreich und dauerhaft dekontaminiert. Die Vitalität unbehandelter Zellen von 90-95 % erreichten sie innerhalb der folgenden 12-24 h Inkubation mit standardsupplementiertem Zellkulturmedium zurück. Mit dieser neu entwickelten Methode konnten somit erstmals auch Keratinozytenkulturen ohne Vitalitätsverlust dekontaminiert werden. Diese anti-*Staphylococcus aureus*-spezifische Dekontaminationsmethode war die wesentliche Voraussetzung dafür, dass erstmals Primärkeratinozytenkulturen aus läSIONalem atopischen Ekzem *in vitro* kultiviert werden konnten. Der Routineeinsatz dieser Antibiotikabehandlung verbesserte den Anteil erfolgreicher Isolierung und Kultivierung von vitalen und proliferierenden Keratinozyten aus atopischem Ekzem von 30 % auf 90 %. Das entsprach der Isolierungsrate von Keratinozyten aus gesunder Haut.

6.1.3 Kombination und sukzessiver Einsatz verschiedener Zellisolierungsmethoden

Die Dissoziation von Gewebe- und Zellverbänden kann durch mechanische Scherkräfte (Einsatz von Skalpell, Mörsern, Kunststoffschabern und Zellsieben), chemische (Chelatbindung divalenter Kationen durch z. B. EDTA, EGTA) und enzymatische Methoden (Proteasen wie z. B. Kollagenase, Thermolysin, Dispase, Trypsin, Elastase, Hyaluronidase) erreicht werden^{Übersicht in 287}. Abhängig vom weiteren Verwendungszweck des dissoziierten Materials ist neben der Dissoziationseffizienz die zu erwartende gewebe- oder zellschädigende Wirkung entscheidend für die Methodenauswahl. Je mehr Zelltypen aus kleinen Biopäten gesunder oder kranker Haut isoliert werden sollen, umso wichtiger werden effektive, zellschonende Isolierungstechniken.

Da in der vorliegenden Arbeit vitale Primärkulturen sowohl von Fibroblasten als auch von Keratinozyten aus Biopäten von nur 4,0 mm Durchmesser gewonnen werden sollten, wurde eine enzymatische, dermal-epidermale Trennung mit dem Enzym Dispase (2 U/ml) durchgeführt. Das Enzym, eine neutrale Metalloprotease aus *Bacillus*

polymyxa, ermöglichte eine gezielte, im Gegensatz zur Trypsinierung keratinozytenschonende Trennung von Dermis und Epidermis. – Übereinstimmend mit diesen Ergebnissen gibt auch die Literatur gegenüber Trypsin- doppelt so hohe Keratinozytenausbeuten nach Dispase- oder Thermolysinverdau an²⁷³. – Dabei werden Fibronectin, Kollagen IV und weniger aktiv Kollagen I, nicht aber Kollagen V und Laminin, der extrazellulären Matrix gespalten²⁸⁸. Dispase vermag so die Basalmembran zu trennen sowie Fibroblasten zu dissoziieren, die Zellmembranen epidermaler Zellen werden jedoch nicht angegriffen. Eine Schädigung der Fibroblasten und Zerkleinerung der extrazellulären Matrix der Dermis wurde durch Kombination möglichst kurzer Reaktionszeit (1-2 h) mit Erhöhung der Reaktionstemperatur auf 37°C bei gleichbleibender dermal-epidermaler Dissoziationseffizienz maximal reduziert. Kleine Hautproben und eine dünne Dermis erzielten aufgrund der kürzeren Diffusionswege zusätzlich verkürzte Reaktionszeiten. Nach der dermal-epidermalen Trennung wurde der enzymatische Prozess durch Überführen der Dermis in 20 % FKS-haltiges Kulturmedium gestoppt, so dass aus 90 % der Hautproben vitale, proliferationsfähige Fibroblasten gewonnen werden konnten.

Die intakte Epidermis wurde mit Pinzetten vorsichtig von der Dermis abgezogen. Wiederholtes Abstreifen noch auf der Dermis lose haftender Basalkeratinozyten erhöhte die Gesamtausbeute an proliferationsfähigen Keratinozyten um 15-20 %. Dadurch wurde erstens eine entsprechend höhere Keratinozytenaussaatdichte, zweitens eine um 2-3 Tage frühere Subkonfluenz erreicht. Die Keratinozytenisolierung aus der Epidermis erfolgte gezielt in einer enzymatisch-chemischen Behandlung mit zunächst 0,05 % Trypsin/0,02 % EDTA, wobei der Chelatbildner die Dissoziationseffektivität im Vergleich zur rein enzymatischen Methode verdoppelte. Das hatte den Vorteil einer kürzeren Reaktionszeit (5-7 Min anstatt 10 Min), 50 % niedrigeren Enzymkonzentration und damit verbundenen niedrigeren Zytotoxizität (25-30 % anstatt 50-65 %). Die Dissoziation der Zellen wurde durch mechanische Scherkräfte mittels Pipettierens forciert²⁶⁴. Die auf diese Weise aus einer 4,0 mm-Biopsie bis zu $1 \cdot 10^6$ gewonnenen epidermalen Zellen (Keratinozyten, Melanozyten, Langerhanszellen) entsprachen zwar bereits der doppelten Anzahl von der in der Literatur²⁷³ für vergleichbare Methoden angegebenen Ausbeute von $2,3 \cdot 10^6$ Zellen/cm² Haut. Allerdings wurde nur in zwei von drei Isolierungskulturen die minimale Aussaatdichte von $6,25 \cdot 10^4$ - $1,25 \cdot 10^5$ Zellen/cm² erreicht.

Die drei- bis vierfache Zellausbeute wurde, bei gleichbleibend hoher Vitalität von 70-75 %, durch Etablierung einer neuen, sukzessiven und durch Scherkräfte unterstützten Behandlung der epidermalen Keratinozyten mit zehnfach konzentrierter Trypsin/EDTA-Lösung (0,5 % Trypsin/0,2 % EDTA) auf dem Magnetrührer erzielt. Durch die hohe Konzentration einerseits und die ständige Durchmischung und zusätzlichen mechanischen Scherkräfte andererseits wurde bereits nach einer Inkubationsdauer von nur 4-5 min eine große Anzahl Keratinozyten gelöst. Sie wurden sofort in mit 20 % FKS supplementiertem Medium aufgenommen, so dass einmal gelöste, isolierte Keratinozyten nicht länger der zytotoxischen Wirkung des aktiven Trypsins ausgesetzt waren. Die verbleibende Epidermis wurde erneut mit frischer Enzymlösung inkubiert und so sukzessiv alle proliferationsfähigen Keratinozyten isoliert. Durch diese Methode wurde die trypsinvermittelte Hydrolyse von Zelloberflächenproteinen, die in der anschließenden Kultur zu verminderter Adhärenz und Interzellularkontakten führt, weitestgehend verhindert.

Nach dem gleichen Prinzip wurde auch die Dissoziation adhärent wachsender Zellen mit zehnfach konzentrierter Trypsin/EDTA-Lösung (0,5 % Trypsin/0,2 % EDTA) durch den Einsatz eines Taumelschüttlers mechanisch unterstützt und beschleunigt, wodurch eine höhere Subkultureffizienz – erhöhte Vitalität und Adhärenzrate der subkultivierten Keratinozyten – erreicht wurde.

6.1.4 Selektive Reinkulturen, Proliferations- und Differenzierungsbedingungen durch gezielte Mediensupplementierung und Einsatz von Biomatrices

Serumhaltige und serumfreie Kulturmedien

Die Trennung von Dermis und Epidermis vor der Isolierung einzelner Zelltypen hatte u. a. den Vorteil, dass sich nur wenige Fibroblasten im basalzellreichen epidermalen Zellisolat befanden. Zusätzlich wurde ein Überwachsen der Keratinozytenkultur durch stärker proliferierende Fibroblasten mit Hilfe gezielt supplementierter Nährmedien verhindert. Wesentlicher Faktor zur gezielten Unterstützung des Keratinozyten- bzw. des Fibroblastenwachstums war der Einsatz von serumfreien bzw. serumhaltigen Medien. So begünstigte ein mit 20 % FKS stark serumhaltiges Medium (DMEM), via erhöhte Expression von Fibroblastenwachstumsfaktoren (FGF), gezielt die Migration und Proliferation von Fibroblasten aus den Dermisexplantaten, so dass andere

dermale sowie epidermale Zellen spätestens nach zweifachem Passagieren aus der Kultur verdrängt waren. Aus 90 % aller Dermisexplantatkulturen wurden mit dieser Methode Reinkulturen humaner Primärfibroblasten mit einem über mindestens 10 Passagen stabilen Proliferationsverhalten (Verdopplungszeit von 36 h) kultiviert. Sie wurden in autologen, submersen und luftexponierten Fibroblasten-Keratinozyten-Kokulturen eingesetzt.

Die Keratinozytenkultur wurde hingegen durch serumfreie Kulturmedien unterstützt. Grundvoraussetzungen für proliferative Keratinozytenkulturen sind die Adhärenz und das „spreading“ der isolierten Zellen sowie eine hohe Aussaatdichte generativer Basalkeratinozyten. Dabei variieren die Dauer und die Effizienz der Adhärenz mit der Serum- und Calciumionenkonzentration im Kulturmedium und dem Differenzierungsstatus der ausgesäten Zellen²⁸⁹: Bereits niedrige Serumkonzentrationen von 0,3 % führen, durch den Calciumgehalt dosisabhängig unterstützt, zu verstärkter Keratinozytendifferenzierung. Gleichzeitig nimmt die Proliferationsrate ab, da die Anzahl proliferativer Basalzellen sinkt²⁹⁰. In serumhaltigen Keratinozytenmedien wie FAD₂/Greens und F7 oder serumfreiem, aber hochsupplementierten K-SFM wurde deshalb eine nur schwache Adhärenz und kein „spreading“ der Keratinozyten erzielt.

Da, übereinstimmend mit der Literatur²⁷⁵, nur bis zu 10 % der epidermalen Zellsuspension proliferative Basalkeratinozyten darstellten, musste durch eine spezifische Supplementierung von Zellkulturmedien gezielt eine hohe Adhärenz- und Proliferationsrate unterstützt und eine frühzeitige Differenzierung verhindert werden. Rinderhypophysenextrakt²⁶⁶ und Cholera toxin vermögen in serumhaltigen Medien den serumunterstützten Differenzierungsprozess teilweise zu inhibieren²⁹⁰, aber auch den Serumeinsatz im Kulturmedium vollständig zu ersetzen^{291,292,293,294}. Bevorzugt wurden deshalb serumfreie Kulturmedien wie K-SFM und KGM eingesetzt. Zusätzlich zu Rinderhypophysenextrakt und Cholera toxin wird beiden Medien humaner epidermaler Wachstumsfaktor (EGF) zugesetzt. Analog zu Cholera toxin (aktiviert die Adenylatcyclase und führt so zur AMP-Synthese)^{295,296} wirken auch Wachstumsfaktoren mitogen auf die DNA-Synthese und die Zellteilung. Via Aktivierung des Phospholipase C-vermittelten Phosphatidylinositolmetabolismus, Synthese der „second messenger“ Inositoltriphosphat und Diacylglycerin und letztlich Aktivierung der Proteinkinase C^{297,314} steigert der Zusatz von EGF die Keratinozytenproliferation um ca. 20 %²⁹⁸. Während die EGF-induzierte Tyrosinphosphorylierung der Phospholipase C- γ 1 zur

Proliferationsstimulation führt, induziert die Ca^{2+} -vermittelte Phospholipase-C-Aktivierung Differenzierungsprozesse³¹⁴.

Extrazelluläre Calciumkonzentration

Essentieller Faktor im Gleichgewicht zwischen Keratinozytenproliferation und -differenzierung war jedoch die Calciumkonzentration. Keratinozyten reagieren bereits auf geringste Schwankungen der Calciumkonzentration äußerst sensitiv^{299,308}: Keratinozyten in Kulturmedien mit $< 0,1 \text{ mM Ca}^{2+}$ zeigen eine für epidermale Basalzellen typische Adhäsion²⁸⁹, Koloniebildung, Proliferationsrate, Morphologie und Involucrinexpression²⁹⁹. Die Proliferation ist maximal erhöht, eine Differenzierung findet nicht statt. Medien mit $> 0,1 \text{ mM Ca}^{2+}$ führen hingegen zu differenzierten Keratinozytenkulturen mit suprabasalem Phänotyp³⁰⁰. Ein entsprechend sensitiv calciumabhängiges Verhalten wurde auch in der vorliegenden Arbeit beobachtet: In K-SFM mit $< 0,1 \text{ mM Ca}^{2+}$ kultivierte Primärkeratinozyten zeigten über die Passagen 0-4 bei serieller Subkultur ab 70-80 % Subkonfluenz eine gleichmäßige Aussaat-effizienz von 80-90 % sowie ein stabiles Proliferationsverhalten (Verdopplungszeit von 24-26 h) bei unveränderter Morphologie und Vitalität von 90-95 %. Der proliferative Basalzellcharakter bestätigte sich zusätzlich durch den Nachweis einer ausgeprägten Zytokeratin 14-Expression und das Fehlen von für Suprabasalzellen typischem Zytokeratin 10³⁰¹. Eine erhöhte Teilungsrate bei jüngeren Zellen und damit die beobachtete Abhängigkeit der Proliferationsrate vom Alter der Probanden wird durch Literaturdaten unterstützt²⁶⁴. Bei älteren Keratinozyten ist die Sensitivität und Reaktion auf mitogene Faktoren reduziert³⁰².

Das ebenfalls serumfreie KGM mit nur geringfügig höherer Calciumkonzentration von $0,15 \text{ mmol Ca}^{2+}$ zeigte zwar annähernd vergleichbare Kulturraten, führte aber bereits ab Passage 2 zu einer zunehmenden Differenzierung der Keratinozyten in Form von einem flächigen „spreading“ der Zellen mit breitem Plasmasaum sowie einem vom Zentrum der Kolonien ausgehenden, mehrschichtigen Wachstum mit zunehmender Abflachung, Keratinisierung und schließlich Desquamation der oberen Zellschichten. Der keratinisierte Zellverband ließ sich durch Trypsin/EDTA nur schwer vom Kulturflaschenboden lösen und nicht dissoziieren. Die KGM-induzierte Ausbildung des „cornified envelope“ (CE) war dabei vergleichbar mit der von in serumhaltigem F3-Medium kultivierten submersen Keratinozyten. Sowohl die für die Proteinvernetzung verantwortliche Transglutaminaseaktivität, vor allem der keratinozytären Transgluta-

minase K³⁰³, als auch die Expression und -Synthese des wichtigsten CE-Proteins Loricrin³⁰⁴ sind stark Ca²⁺-abhängig. Loricrin wird erst ab einer Konzentration von > 0,1 mM Ca²⁺ exprimiert^{304,310}, unterstützt durch Serumkomponenten oder durch die Konfluenz der Kultur²⁹⁰. Letztere Faktoren waren in der vorliegenden Arbeit ausgeschlossen: Um die bekanntermaßen auch bei submers kultivierten Keratinozyten bei Konfluenz einsetzende Stratifizierung^{291,305} zu vermeiden, wurden die Kulturen stets bei 70-80 % Subkonfluenz passagiert. Die Ausbildung des vernetzten „cornified envelope“ betonte somit verstärkt die Calciumabhängigkeit der beobachteten Differenzierungsprozesse. Diese waren umso stärker zu bewerten, da KGM im Gegensatz zu K-SFM zusätzlich die die Keratinozytenproliferation unterstützenden Supplemente Hydrocortison²⁷⁵ und Insulin²⁹³ enthielt. Niedrige Konzentrationen (0,4 µg/ml) Hydrocortison wirken proliferationsstimulierend und bewirken eine regelmäßige Koloniebildung, während es in Konzentrationen > 10 µg/ml Differenzierungsprozesse induziert²⁷⁵. Das Pankreashormon Insulin stimuliert die Keratinozytenproliferation über die Aktivierung der Na⁺/K⁺-Pumpe und der Proteinkinase C³⁰⁶.

Analog zur beobachteten *in vitro* Calciumabhängigkeit findet sich auch in der Epidermis *in vivo* ein Calciumkonzentrationsgradient. Dabei ist die Ca²⁺-Konzentration im S. basale deutlich niedriger als die im Serum, die im S. granulosum wiederum ausgesprochen hoch³⁰⁷. Die Calciumkonzentration ist ein wesentlicher Regulator für die Expression epidermaler Differenzierungsmarker: Die Synthese desmosomaler Proteine ist calciumunabhängig. Allerdings vermögen Keratinozyten diese *in vitro* unter Mediumkonzentrationen von < 0,1 mM Ca²⁺ nicht zu Desmosomen zu assoziieren^{352,308}. Sie formieren sich jedoch innerhalb weniger Minuten nach Erhöhung der extrazellulären Calciumkonzentration³⁰⁸. Innerhalb von Stunden steigen auch die Proteinkonzentrationen von Transglutaminase K³⁰⁹, Involucrin³⁰⁹ (beide > 1,2 mM Ca²⁺) und Loricrin (> 0,1 mM Ca²⁺)^{304,310}. Die Differenzierungsmarker Keratin 1 und 10 werden hingegen nur im Bereich 0,1-0,16 mM extrazelluläres Ca²⁺ exprimiert und synthetisiert³¹¹. Die Signaltransduktion dieser Prozesse ist im wesentlichen über die Proteinkinase C vermittelt³¹²: Ein hoher extrazellulärer Calciumgehalt führt über den Einstrom durch unspezifische Kationenkanäle zu einer entsprechend erhöhten intrazellulären Calciumkonzentration. Diese wird durch Calciumrezeptoren registriert³⁰⁰. Sie aktiviert den Phosphatidylinositolmetabolismus sowie die Phospholipase C^{313,314}. Der daraus folgende Anstieg von Inositolphosphat und Diacylglycerol aktiviert wieder-

rum die Proteinkinase C, die, u. a. über p21WAF1-Expression³¹⁵, weiterhin den epidermalen Differenzierungsprozess einleitet^{307,314}.

Substrate und Biomatrices

Der Substrattyp ist – neben der Serum- und Calciumionenkonzentration im Medium und dem Differenzierungsstatus der ausgesäten Zellen – ein weiterer die Keratinozytenadhärenz und das „spreading“ beeinflussender Faktor²⁸⁹. Dabei bestimmt einerseits das Material der anorganischen Membranen (Al(OH)₃, PC, PET), andererseits deren Beschichtung mit organischen Proteinen der extrazellulären Matrix (Kollagen, Fibronectin, Laminin, Matrigel®) die zelluläre Adhärenzrate. Unterschiedliche Porengrößen und -dichten entscheiden über die Medienversorgung der Zellkulturen. In der vorliegenden Arbeit erwies sich der Substrattyp jedoch als sekundäres Adhärenzkriterium. Entscheidend war vielmehr die Mediensupplementierung: Zwar erreichten in FAD₂/Green kultivierte, primäre Keratinozyten gleichermaßen auf allen beschichteten Matrices, unabhängig von Material und Porengröße, eine höhere Adhärenz- und Proliferationsrate als auf unbeschichteten Membranen und in Kunststoffkultur-schalen. In Kulturen mit K-SFM konnten jedoch zwischen den unterschiedlich beschichteten und unbeschichteten Membranen keine Unterschiede in Adhärenz, „spreading“ und Proliferation nachgewiesen werden. Daraus lässt sich schließen, dass das Kultursubstrat nur bei suboptimaler Mediumzusammensetzung einen relevanten Einfluss auf Adhärenz und „spreading“ hat. Dahingegen tritt der Faktor Substrat in den Hintergrund sobald optimale Bedingungen durch das Kulturmedium gewährleistet sind. *Woodley et al.* beschreiben analoge Beobachtungen zum „spreading“ und zur Keratinozytenproliferation in Medium mit bzw. ohne EGF und Rinderhypophysenextrakt auf Kollagen und Fibronectin³¹⁶.

Erste Fortschritte in der Adhärenz von Keratinozytenkulturen in serumfreiem Medium wurden von *Rheinwald* und *Green* durch Kokulturen auf proliferationsarretierten Fibroblasten erreicht^{275,276}. Eine Gammastrahlen- oder Mitomycin C-Behandlung inhibiert die Microtubulibildung, ohne jedoch die Vitalität der Fibroblasten zu beeinträchtigen^{317,265,277}. Es resultieren daher vitale, aber proliferationsinhibierte Zellen, die eine interzelluläre Kommunikation in der Kokultur ermöglichen. So stimuliert ein doppelt parakriner Mechanismus die Keratinozytenproliferation via erhöhte IL-1-Expression in Keratinozyten und verstärkte Keratinozytenwachstumsfaktor (KGF)-Freisetzung

aus postmitotischen Fibroblasten^{318,319,320}. Der direkte Zellkontakt von Keratinozyten und Fibroblasten vermittelt zudem eine Stimulation der GM-CSF-, IL-1-, IL-6-, IL-8-Expression in Fibroblasten sowie Laminexpression in beiden Zellarten^{108,321,322}. *In vivo* wird so die Epithelbildung in der Wundheilung induziert. *In vitro* unterstützt der „feeder layer“ auf diese Weise die Keratinozytenadhärenz und -proliferation und verhindert ein Überwachsen durch vitale Fibroblasten^{275,276}. Ein weiterer Vorteil des „feeder layer“ ist die erhöhte Zelldichte bei Aussaat der Kultur. Dies ist aber zugleich auch ein kritischer Aspekt: Die Aussaatdichte des „feeder layer“ muss einerseits ein volles „spreading“ der durch die Mitomycin C-Behandlung stark vergrößerten Fibroblasten ermöglichen, andererseits genügend Platz für die Keratinozyten gewährleisten, die ausschließlich zwischen den Fibroblasten direkt auf dem Kulturschalenboden adhären und proliferieren²⁷⁷. Eine Aussaatdichte von 4000 Mitomycin C-Fibroblasten/cm² hat sich diesbezüglich als optimal erwiesen²⁶⁵. Sie gewährt sowohl den „feeder layer“-Effekt als auch genug Wachstumsfläche für Keratinozyten.

In der vorliegenden Arbeit wurden die Kokulturbedingungen auf dieser Biomatrix u. a. unter Einsatz von Medien untersucht, die später auch zur gezielten Proliferation bzw. Differenzierung in Hautorganoidkulturen eingesetzt werden sollten. Unter Kokulturbedingungen mussten im Vergleich zu Reinkulturen Kompromisse in der Medienzusammensetzung eingegangen werden, um das Wachstum aller beteiligten Zellarten zu ermöglichen. Außerdem musste die auto-, und parakrine Interzellulärkommunikation berücksichtigt werden: So vermag Serum in Kokulturen, unterstützt durch keratinozytäres IL-1, über eine verstärkte KGF-Expression und Freisetzung aus Fibroblasten die Keratinozytenproliferation zu stimulieren^{323,324}. Zusätzlich wurde eine FKS-Charge mit niedriger Calciumkonzentration (3,3 mmol/l) eingesetzt, um die Keratinozytenproliferation in dem serumhaltigen FAD₂/Greens- oder F7-Medium zu ermöglichen. Beide Medien basierten auf dem FAD-Rezept: HAMS F12 (33,29 mg/ml CaCl₂·2H₂O, 0,715 mg/ml Ca-Panthothenat), Adenin und DMEM (264mg/ml CaCl₂·2H₂O)²⁶⁵ und wurden mit Hydrocortison, Insulin, EGF und Trijodthyronin supplementiert. Das F7-Proliferationsmedium enthielt zusätzlich Isoprotenerol und Transferin²⁹³, FAD₂/Greens dagegen Cholera toxin und L-Ascorbinsäure (Vitamin C)²⁶⁵, um das mitogene Potential zu verstärken. Beispielsweise bindet Transferrin freies Eisen und verhindert dessen unter aeroben Kulturbedingungen proliferationsinhibierenden Effekt³²⁵. Cholera toxin stimuliert in Kokulturen die Expression des keratinozytenproli-

ferationsfördernden Hepatozytenwachstumsfaktor (HGF) in Fibroblasten³¹⁸. Ascorbat ist als Donor reduzierter Cu- und Fe-Ionen der Kofaktor für diverse Enzymsysteme (Mono- und Dioxygenasen). Die Ascorbinsäure hat eine antioxidative Funktion als freier Radikalfänger. Sie regeneriert α -Tocopherol (Vitamin E) in die reduzierte Form, steigert die Vitamin E-vermittelte Inhibition der freien Radikalbildung und stimuliert die Lipidperoxidase³²⁶. Darüber hinaus ist Vitamin C in mehrfacher Hinsicht für die Kollagenbiosynthese essentiell: Es erhöht die Transkriptionsrate, stabilisiert die Prokollagen-mRNA und beeinflusst die Hydroxylierung von Lysin und Prolin in der Prokollagen-Kollagenumsetzung. In Fibroblastenkulturen stimuliert Ascorbinsäure daher die Synthese und Deposition von extrazellulären Matrixkomponenten wie Kollagen, Laminin, Hyaluronsäure und Glycosaminoglycan^{124,327,328}.

Hinsichtlich ihrer mitogenen Eigenschaften erwies sich die Zusammensetzung von FAD₂/Greens und dem Proliferationsmedium F7 als geeignet: In Übereinstimmung mit der Literatur³²⁹ erzielten in FAD₂/Greens kultivierte Keratinozyten in Kokultur mit proliferationsarretierten Fibroblasten eine höhere Proliferationsrate als in Monokulturen auf unbeschichteter Kunststoffoberfläche. Von Vorteil war hier die durch den „feeder layer“ verursachte Zelldichte. Sie beeinflusst das „spreading“ sowie die Cluster-Bildung und Proliferation der adhärennten Zellen, aber nicht die Adhäsion³³⁰. Sowohl die initiale als auch die Aussaat-effizienz von Subkulturen betrug, ebenfalls in Übereinstimmung mit der Literatur³³¹, nur 50-60 %. Demgegenüber waren – analog zur Verwendung von Kunststoffmembranen als Substrat – auch in „feeder layer“-Kokulturen sowohl die Adhärenz als auch die Proliferation der Keratinozytenkulturen unter Einsatz von serumfreien Medien mit niedriger Ca²⁺-Konzentration wesentlich höher als unter Serumeinsatz. Sowohl die initiale als auch die Aussaat-effizienz von Subkulturen wurde auf 80 % und 90 % erhöht. Bezüglich der Adhärenz erwies sich das mitogene FAD₂/Greens-Medium demnach als zu hoch supplementiert. Dies wurde vermutlich durch Kokultureffekte zusätzlich verstärkt: Unter keratinozytärer IL-1-Stimulation synthetisieren Fibroblasten Prostaglandin E2 (PG-E2) via Cyclooxygenase 2 (Cox-2)-Expression. PG-E2 verstärkt seinerseits die Keratinozytenproliferation, unter entsprechenden Konditionen aber auch die Ca²⁺-induzierte Keratinozytendifferenzierung³³².

Als „feeder layer“-Zellen wurden sowohl 3T3-Mausfibroblasten als auch humane Fibroblasten eingesetzt. Die Wirkung muriner oder humaner Fibroblasten auf die Keratinozytenkulturen unterschied sich nicht. Auch autologe humane Fibroblasten zeigten keine verbesserte Adhärenz- oder Proliferationswirkung auf die Keratinozyten. Die Zelllinie bietet generell den Vorteil einer standardisierten und reproduzierbaren Biomatrix für *in vitro* Testsysteme. Homologe bzw. autologe humane Fibroblasten simulieren hingegen die physiologische *in vivo* Situation und ermöglichen so die Untersuchung der interzellulären Kommunikation zwischen humanen mesenchymatischen und epithelialen Zellen. Autologe Kokulturen eignen sich zudem zur Transplantation^{277,337}.

Medienkomponenten im *in vitro* Expositionsversuch

Serumhaltige Kulturmedien versorgen die Zellen mit Vitaminen, Hormonen, Lipiden, Adhärenzfaktoren, Mineralstoffen und Spurenelementen in undefinierter und veränderlicher Konzentration und Zusammensetzung²⁹⁰. Demgegenüber ermöglichen serumfreie Basismedien die gezielte Zugabe definierter Supplemente³³³. Dadurch können einerseits z. B. Proliferations- und Differenzierungsverhalten der Kultur gezielt beeinflusst werden, andererseits können die Auswirkungen von Zytokinen, Medikamenten oder Schadstoffen auf die Vitalität, den Metabolismus und die Proteinexpression von z. B. inflammatorischen, Proliferations- oder Differenzierungsmarker untersucht werden, die durch Serum möglicherweise maskiert, gebunden, aktiviert oder inaktiviert und damit verändert würden^{141,142}. Ein weiterer Vorteil definierter Kulturmedien sind reproduzierbare Versuchskonditionen. Abhängig von den Analyseparametern der *in vitro*-Experimente muss jedoch auch bei gezielter Supplementierung von serumfreien Kulturmedien die Wirkweise der einzelnen Medienkomponenten beachtet werden. So ist beispielsweise bei der Exposition gegenüber Ozon und Stickstoffdioxid die antioxidative Schutzfunktion von Vitamin C und E auf die Lipidperoxidation zu berücksichtigen³³⁴. In den Expositionsexperimenten der vorliegenden Arbeit wurden neben dem Einsatz von Serum insbesondere der von Hydrocortison vermieden, da sonst eine reduzierte Expression und Freisetzung sowohl von GM-CSF^{335,367} als auch von IL-1 α zu erwarten war: Hydrocortison reduziert sowohl die Expression als auch die konstitutive und UV-induzierte Freisetzung von GM-CSF, IL-1 α und TGF α aus Keratinozyten. Auf diesem Effekt basiert vermutlich die anti-inflammatorische Wirkung von Glucocorticosteroiden auf Erkrankungen der Haut^{336,388}.

6.1.5 Fazit und Ausblick

Die in dieser Arbeit mit 4,0 mm Durchmesser besonders kleinen Hautproben verlangten höchst effektive, zellverlustfreie Isolierungs- und Kultivierungsmethoden.

Fasst man die Methodenentwicklungen zusammen, ergab sich ein Erfolgskonzept aus erstens der Kombination von Wirkstoffen und Methoden, zweitens dem Einsatz hoher und damit intensiver Wirkstoffkonzentrationen bei zugleich kurzen Inkubations- bzw. Reaktionszeiten sowie drittens sukzessiven Behandlungszyklen.

Die Ergebnisse zeigten deutlich, dass die zytotoxische Wirkung von Antibiotika wie auch von Enzymen stärker durch eine lange Wirkungsdauer als durch hohe Konzentrationen vermittelt wird. Die sukzessive Behandlung der Hautproben mit hochkonzentrierten Wirkstofflösungen hatte eine intensive Wirksamkeit bei kurzer Zeitdauer sowie eine hohe Vitalität aufgrund der zellschonenden Methode zur Folge: So erwies sich z. B. die Kombination enzymatischer, chemischer und mechanischer Isolierungsmethoden in mehrfacher Hinsicht als vorteilhaft: Die zellschonende Trennung von Dermis und Epidermis einerseits, die hochkonzentrierte, durch mechanische Scherkräfte beschleunigte, sukzessive enzymatisch/chemische Keratinozytenisolierung andererseits führten insgesamt zu einer 3-4fach größeren Anzahl vitalerer Zellen, die dadurch zu besserer Adhärenz und schnellerer Konfluenz gelangten. Insbesondere die mechanische Nachbehandlung der Dermis führte zu 15-20 % mehr proliferativen Basalzellen. So wurde eine deutlich kürzere, effektivere Isolierungskulturzeit erzielt.

Selektive Zellkulturmedien unterstützten schließlich zusätzlich die Bildung von Reinkulturen. Sowohl der niedrige Calciumgehalt²⁸⁹, der Verzicht auf Serum²⁹⁰ als auch der Hydrocortisoneinsatz²⁷⁵ favorisierten die keratinozytäre Proliferation und vermieden somit erfolgreich ein Überwachsen der Keratinozytenkultur durch Fibroblasten. Die verkürzte Kulturzeit und die fibroblastenfreie Kultur sind insbesondere auch für die Anzucht autologer Keratinozyten für Transplantationen auf Brandwunden von Vorteil³³⁷.

Die Lokalisation der Hautproben wurde, limitiert durch die Lokalisation von Ekzemen, möglichst vergleichbar gewählt: Bevorzugt wurden Beugeneckzeme beprobt, deren kaum UV-exponierte und eher dünne Haut mit der oberhalb vom Gesäß gesunder Probanden vergleichbar war. Zelluläre Veränderungen und Artefaktbildung durch

spezifische Behandlungsverfahren wie die Flucloxacillinbehandlung konnten ausgeschlossen werden.

Das Differenzierungs- und Zytokinsezernierungsverhalten von Keratinozytenkulturen aus läSIONALEM Ekzem und ekzemfreier Haut von Probanden mit atopischem Ekzem unterschied sich signifikant. Das war ein klarer Hinweis darauf, dass tatsächlich Keratinozyten läSIONALEN UrsprUNGS kultiviert wurden. Die Kulturen bilden somit die Grundlage für eine zukünftige Transformation von atopisch läSIONALEN und nicht-läSIONALEN Keratinozyten zu Zelllinien, die für den dauerhaften Einsatz vergleichbarer Keratinozytenkulturen in *in vitro* Experimenten zur Pathogenese des atopischen Ekzems geeignet wären.

Auf diese Weise wurden auch nach Cryokonservierung vitale, stabil reproduzierbare und somit vergleichbare Kulturen aus Biopäten von Hautgesunden und Probanden mit atopischem Ekzem und erstmals auch aus läSIONALEM atopischen Ekzem gewonnen. Die Primärzellkulturen standen in einer Zellbank für die weiteren *in vitro* Experimente der vorliegenden Arbeit zur Verfügung.

6.2 Methodenentwicklung zum Aufbau organähnlicher Gewebekulturen: submerse und luftexponierte Mono- und Kokulturen

Langfristig ist die Entwicklung eines vollfunktionellen, dreidimensionalen, humanen *in vitro*-Modells für das atopische Ekzem geplant. Die erste grundlegende Voraussetzung hierfür – die Isolierung und Kultivierung humaner Primärkeratinozyten und -fibroblasten aus läSIONALEM atopischen Ekzem – wurde im Rahmen dieser Arbeit geschaffen. Zum Aufbau organähnlicher Gewebekulturen aus unterschiedlichen Zell-spezies mussten nun vor allem deren Kokulturansprüche sowie die Differenzierungsbedingungen berücksichtigt werden. Hierfür wurden organrekonstruierende Methoden evaluiert.

Ein wesentlicher Fortschritt in der Entwicklung von „monolayer“-Monokulturen über „multilayer“-Kokultursysteme^{275,346} bis hin zu differenzierten und stratifizierten *in vitro*-Organrekonstrukten^{122,338,339} wurde ab Ende der 70er Jahre durch die Luftexposition der Kulturen erzielt^{340,341,348}. Die Kultivierung an der Luft-Medium-Grenze („air-liquid interface“), simulierte dabei die physiologische *in vivo*-Situation des Hautorgans, ver-

mittelte die räumliche Orientierung³⁴⁰ und wirkte als Differenzierungsauslöser. Die Ausbildung einer differenzierten und stratifizierten Epidermis oberhalb des Mediumspiegels ermöglichte erstmals *in vitro* Untersuchungen zur Penetration und Metabolisierung topisch applizierter Substanzen wie therapeutische Wirkstoffe oder Irritantien^{123,342,343,344}. Ein solches luftexponiertes Kulturmodell eignet sich daher auch für die direkte Exposition gegenüber gasförmigen Substanzen in der im Rahmen der vorliegenden Arbeit entwickelten Expositionsapparatur.

Die durch Luftexposition induzierte Differenzierung musste durch Zellkulturmedien und Biomatrices unterstützt werden. Analog zur Medienauswahl in Keratinozyten-Fibroblasten-Kokulturen mussten zudem die Anforderungen der beteiligten Zellspesies und deren Interzellulärkommunikation berücksichtigt werden. Als ein typisches Kulturmodell wurden in der vorliegenden Arbeit proliferationsarretierte Fibroblasten in Kollagengelen³⁴⁵⁻³⁴⁹ als Biomatrix für luftexponierte Keratinozytenkulturen eingesetzt. Die beobachtete Gelkontraktion nach Integration der Fibroblasten in das Kollagengel beruhte auf einer Reorganisation der Fibroblasten, die eine kompaktere Anordnung der Kollagenfasern zur Folge hat³⁴⁶. Der Vorgang entspricht der physiologischen Wundkontraktion. Er ist abhängig von der Zell- sowie Ca^{2+} - und Serumkonzentration³⁴⁷. Ferner spielen Glycosaminoglycane, Fibronectin und $\beta 1$ -Integrin-Kollagenrezeptoren eine Rolle³⁴⁶.

Vergleichbar mit den Ergebnissen der „feeder layer“-Kokulturen wurden auch auf Fibroblasten-Kollagengelen nach *Fusenig*³⁴⁹ mit $\text{FAD}_2/\text{Greens}$ nur eine äußerst heterogene, basale Adhärenz und hier infolgedessen auch keine homogene, proliferierende Basalzellschicht erreicht. Die Morphologie zum Teil abgekugelter Zellen ließ zudem auf mangelnde Vitalität schließen. Hierfür gab es zwei mögliche Ursachen: Zum einen wirkte sich der nur schwer titrierbare pH-Wert des Kollagengels negativ auf die Fibroblastenvitalität aus. Zusätzlich wurde die Kollagengelkontraktion vermutlich durch die Ascorbinsäure im $\text{FAD}_2/\text{Greens}$ -Medium inhibiert³²⁸. Zum anderen reduzierte auch der direkte Mediumwechsel von den Isolierungsmonokulturen zur Kokultur die Vitalität vor allem der Keratinozyten.

Eine deutlich höhere Adhärenzrate, basale Zelldichte und Vitalität wurde durch die Methode des *Centre Charles Zviak, L'ORÉAL* erzielt: Die Fibroblasten-Kollagengelösung zeigte eine stärkere Pufferwirkung im neutralen pH-Bereich. In F7-Proliferationsmedium wurde das Kollagengel zudem um den Faktor 2 stärker kontrahiert und bildete so eine feste Matrix für die Keratinozytenaussaat. Hier wirkten sich vermutlich

die fehlende Ascorbinsäure sowie der Zusatz nicht essentieller Aminosäuren positiv auf Gelkontraktion und Kollagenbiosynthese der Fibroblasten aus³²⁸. Die Aminosäuresupplementierung verhinderte außerdem die Proliferationsreduktion bei Erreichen der Konfluenz^{290,291}. Die Keratinozytenvitalität und damit die Adhärenzrate und Proliferation wurde zusätzlich wesentlich durch die Einführung einer sukzessiven Medienumstellung ab 60 % Subkonfluenz der Monokulturen verbessert.

Im Vergleich zur Luftexposition 24 h nach Zellaussaat erzielte zudem eine der Luftexposition vorangehende siebentägige submerse Proliferationsphase eine homogenere basale Keratinozytenbesiedelung der Fibroblasten-Kollagenmatrix. Dies war insofern von großer Relevanz, als dass ein inhomogener, subkonfluenter Keratinozyten-„monolayer“ nicht differenzieren und somit auch nicht stratifizieren kann. *Poumay & Pittelkow* zeigten, dass subkonfluente Keratinozytenkulturen unabhängig vom extrazellulären Calciumgehalt keine Keratine 1 und 10 exprimieren³⁰⁵. Dies ist von physiologischer Relevanz: Suprabasale Keratine werden nur von post-mitotischen, differenzierenden Keratinozyten exprimiert, und nur eine intakte Epidermis soll auch differenzieren. Ist die Epidermis verletzt, und somit der Zell-„layer“ nicht konfluent, wird statt dessen die Proliferation zur Reepithelisierung aktiviert³⁰⁵. Aufgrund der zu geringen Zelldichte wurde in dieser Arbeit auf synthetischen Membranen^{124,348} keine Keratinozytendifferenzierung erreicht: Die Monokulturen waren stark subkonfluent, die konfluenten Kokulturen vermutlich vor allem durch Fibroblasten dominiert.

Die submerse Proliferationsphase ermöglichte zusätzlich eine schrittweise, submerse Umkonditionierung von F7-Proliferations- auf F3-Differenzierungsmedium. So wurde ein Vitalitätsverlust durch plötzlichen Entzug der mitogenen F7-Mediumkomponenten Isoprotenerol, Humantransferrin und Trijodthyronin vermieden.

Die rasterelektronenmikroskopischen Aufnahmen von für 14 Tage unter Differenzierungsbedingungen luftexponierten Kulturen zeigten schließlich ein dreidimensionales, mehrschichtiges Wachstum mit ausgeprägten Interzellulärkontakten. Das mehrschichtige Wachstum ließ zunächst auf die Ausbildung von Desmosomen schließen, ohne die eine Stratifizierung nicht möglich ist³⁵². Demgegenüber offenbarte die lichtmikroskopische Auswertung histologischer Paraffinpräparate zwar eine konfluente und hohe basale Zelldichte, suprabasal dominierte jedoch das histologische Bild einer Hyperproliferation. Dyskeratotische Keratinozyten zeugten von spontaner, ungerichteter Verhornung. Eine stratifizierte Differenzierung fand nicht statt.

Eine Hyperproliferation wird in Fibroblasten-Keratinocyten-Kokulturmodellen häufig beobachtet^{124,321,349}: Darin induzieren Keratinocyten die Freisetzung von Wachstumsfaktoren und Zytokinen wie KGF, IL-6, GM-CSF, die stimulierend auf die Keratinocytenproliferation zurückwirken. Dieser Kokulturfaktor könnte auch im vorliegenden Modell eine Ursache der beobachteten Hyperproliferation sein. Denkbar wäre auch, dass im F3-Medium mit Hydrocortison, EGF und Insulin noch zu viele proliferationsaktivierende Supplemente enthalten sind. Es ist bekannt, dass EGF via Inhibition der Differenzierung und Keratin 1/10-Synthese hyperproliferative Zustände induziert (z. B. ist EGF auch in Psoriasis erhöht)³⁰⁵.

Dieser Effekt machte sich insbesondere nach der Aufkonzentrierung von Medienkomponenten durch eine erhöhte Verdunstung bemerkbar, weshalb in der vorliegenden Arbeit in in trockener Atmosphäre¹²⁸ (50-60 % anstatt 80-90 % relative Luftfeuchte) luftexponierten Kulturen keine verbesserten Differenzierungsergebnisse erreicht wurden.

Der im Rahmen dieser Arbeit ebenfalls als Biomatrix eingesetzte Fibroblasten-Kollagenschwamm³⁵⁰ bot Vor- und Nachteile gegenüber der Kollagengelmethode. Die Kokultureffekte der in das Gel integrierten Fibroblasten konnten die Adhäsion und Proliferation der Primärkeratinocyten vermutlich besser unterstützen als im Kollagengel, da zusätzlich ein direkter Zell-Zellkontakt zwischen Fibroblasten und Keratinocyten möglich war. Ferner entfiel die Kollagengelherstellung und somit das Problem der pH-Wert-Einstellung. Allerdings findet auch keine Kontraktion der Matrix und des Keratinocytenaussaatereals statt. Fibroblasten und Keratinocyten zeigten eine homogene Verteilung und hohe Integration in das Kollagengeflecht. Zudem fand eine starke Proliferation im Kollagengeflecht statt, die Keratinocyten erreichten dabei aber nicht die luftexponierte Oberfläche. Währenddessen zeigten die konfluenten submersen Keratinocyten auf dem Kulturschalenboden desselben Kollagenschwammkulturansatzes eine mit der F3-Kulturdauer zunehmende Differenzierung, Stratifizierung und schließlich die Desquamation keratinisierter Schichten. Dieses Verhalten ließ eine mangelnde Konfluenz der Keratinocyten im Kollagengeflecht als Ursache der fehlenden Differenzierung vermuten. Möglicherweise benötigen die Kulturen auf Kollagenschwammbasis eine längere Proliferations- und luftexponierte Differenzierungskulturdauer, um eine konfluente Basalschicht als Ausgangsbasis zur Differenzierung auszubilden, als Kulturen mit homogenerer Matrixoberfläche. Alter-

nativ kann die Penetration der Keratinozyten durch Lamininbeschichtung der Matrix verhindert werden³⁵¹.

Prinzipiell ist demnach abhängig vom Substrat eine Differenzierung, Stratifizierung und sogar Desquamation unter F3-Kulturbedingungen möglich. Wie *in vivo* lässt dabei die Adhärenzaffinität zum Substrat sowie zu anderen Keratinozyten unter Differenzierung nach. Die Herabregulation der Expression von Basalmembrankomponenten und deren Rezeptoren bildet die molekulare Basis für die Reduktion der Zell-Substrat-Adhäsion^{352,353}. Diese wird u. a. durch Ca^{2+} induziert, weshalb initial nicht differenzierende Kulturkonditionen für die Adhäsion und die „monolayer“-Ausbildung essentiell sind³⁵².

Auch im Hautorganoidmodell wurde schließlich unter Einsatz von humaner Dermis als Biomatrix eine zumindest partielle Stratifizierung und Desquamation erzielt. Bis zu 42 Tage auf dem Dermis substrat kultivierten Keratinozytenkulturen zeigten bei allerdings heterogener Morphologie Zonen dichten, mehrschichtigen Keratinozytenwachstums, stark abgeflachte, keratinisierte Zellen sowie die Desquamation von keratinisierten Zellschichten. Die Ergebnisse wiesen auf eine partielle abgeschlossene Stratifizierung hin. Dieses Ergebnis war ein wesentlicher Fortschritt zur Ausbildung einer stratifizierten Epidermis *in vitro*, denn insbesondere die Desquamation findet in vielen *in vitro*-Hautmodellen nicht statt¹²⁵. Die entepidermisierte und proliferationsarretierte humane Dermis bietet gegenüber anderen Matrices den Vorteil einer physiologischen Basalmembran mit intakten Kollagenfibrillen und vollständiger Lamina densa, so dass die Keratinozyten Hemidesmosomen entlang der Basalmembran ausbilden können³⁵⁴. Die Ergebnisse dieser Arbeit legten daher nahe, die Aktivitäten zum Aufbau eines reproduzierbar homogen stratifizierten *in vitro*-Hautorganoids auf der Basis von humaner Dermis weiterzuführen. Zumal dieses Modell auch im Hinblick auf das Krankheitsmodell zum atopischen Ekzem den zusätzlichen Vorteil einer Kulturmatrix aus der Haut eines Probanden mit atopischem Ekzem bietet.

Der hier entwickelte methodische Modellansatz wurde daher in der Klinischen Kooperationsgruppe für Umweltdermatologie und Allergologie GSF/TUM fortgeführt. Vorläufige Ergebnisse zeigten, dass eine zunehmend reproduzierbare und homogener differenzierte und stratifizierte Epidermis gewonnen werden kann³⁵⁵.

6.3 Funktionsprinzipien und Funktionsfähigkeit der Expositionsapparatur

Im Rahmen dieser Arbeit wurde eine gasdichte Expositionsapparatur in Form eines offenen, kontinuierlich gasdurchströmten Systems entwickelt. Im folgenden werden zum einen die technischen Lösungen der dabei auftretenden Probleme diskutiert. Zum anderen werden die Kenngrößen und optimalen Betriebsparameter dieser Apparatur hinsichtlich ihrer praktischen Anwendung anhand von Chancen und Grenzen der Apparatur sowie im Vergleich zu physikalisch-technischen Kenndaten anderer Expositionsapparaturen diskutiert.

6.3.1 Beurteilung von Gasdichtigkeit und Wandadsorption

Die Verwendung von ausschließlich chemisch inerten Materialien für sämtliche Komponenten der Apparatur konnte Substanzverluste sowie eine Verunreinigung nachfolgender Proben durch Wandadsorption („memory“ Effekte) erfolgreich verhindern. Zusätzlich könnte auch die eingesetzte relative Luftfeuchte adsorptive Verluste vermindert haben, da H_2O aktive Stellen an den Wänden zu blockieren vermag³⁵⁶. Die gaschromatographischen Kontrollmessungen der in der Expositions-kammer entnommenen Proben lieferten sowohl den Nachweis reiner Analyten nach Experimenten mit unterschiedlichen VOC-Prüfgasen als auch konstanter Konzentrationswerte nach vergleichbaren, voneinander unabhängigen Expositionsversuchen. In Relation zu externen Kalibrierlösungen wurden die von den Gasflussreglern eingestellten Konzentrationen mit einer Genauigkeit von 89 % +/- 10 % erreicht, was bei einer relativen Messungengenauigkeit der gaschromatographischen Methode von 5,5 % einen nur geringen Substanzverlust bedeutete. Dieses Ergebnis sprach erstens für die genaue Einstellung der Prüfgasvolumenströme durch die elektronischen Gasflussregler (vergleiche 6.3.5), zweitens für eine ausgezeichnete Gasdichtigkeit der Apparatur. Bei Einsatz von Kunststoffzellkulturflaschen als Expositionseinheiten wurde diese laut *Mückter* hingegen nicht erreicht¹⁵⁴. Die Gasdichtigkeit des Systems wurde zusätzlich durch das geringe Totvolumen der Expositionsapparatur bewiesen: Mit 22,5 l bis 25 l entsprach es einem nur 2,5fachen Expositions-kammervolumen und bestätigte zusätzlich eine geringe Wandadsorption. Die hohe Gasdichtigkeit und geringe Wandadsorption führten dazu, dass sich innerhalb kurzer Adaptionszeit von 45 bis 55 Minuten homogene Expositions-konditionen in der Expositions-kammer einstellten. Um

Expositionsexperimente durch Angabe der eingestellten Gaskonzentration charakterisieren und Experimente unterschiedlicher Expositionsdauer vergleichen zu können, muss die Gesamtexpositionsdauer diese Einstellzeit um ein Vielfaches übersteigen. Konsequenterweise wurde für die VOC-Expositionsversuche eine minimale Expositionsdauer von fünf Stunden gewählt. Alternativ kann ein größerer Volumenstrom als 500 ml/min während der Äquilibrierungsphase¹⁵⁰ die Einstellzeit im Vorfeld von Kurzzeitexpositionen von weniger als fünf Stunden Dauer beliebig verkürzen. Die anschließende Exposition sollte wiederum unter den günstigen Strömungskonditionen bei 500 ml/min Gesamtvolumenstrom erfolgen.

Der Aspekt der Laborkontamination bleibt bei vielen *in vitro* Expositionssystemen – insbesondere bei Einsatz von Standardinkubatoren als Expositionskammer – unberücksichtigt¹⁴⁰. Nur wenige Systeme verfügen über Aktivkohlefilter am Systemausgang¹⁵⁴. Die Dichtigkeit der in dieser Arbeit entwickelten Apparatur und deren Installation in einem geschlossenen Abzug verhinderte zuverlässig eine Kontamination des Labors und Exposition des Experimentators. Zusätzlich ist ein Austausch der Expositionsatmosphäre vor dem Öffnen der Expositionskammer möglich. Das Expositionssystem eignet sich daher für den Einsatz hochtoxischer Substanzen.

6.3.2 Konstruktionsbedingte Funktionsweise der Expositionskammer – Konstanz der Expositionskonditionen

Die Konstruktion der Expositionskammer erlaubte, bis zu 6 luftexponierte oder bis zu 12 submerse Zellkulturen simultan im zentralen Gasfluss zu exponieren. Die gaschromatographischen Untersuchungen der Zellkulturmedien zeigten unabhängig von deren Position in der Zellkulturplatte und in der Expositionskammer vergleichbare VOC-Konzentrationen. Die Kammer wies demnach ein geeignetes Strömungsprofil auf, das Verwirbelungen im Gasvolumenstrom verhinderte und eine homogene Exposition der Zellkulturen gewährleistete. Mit Hilfe der temperierbaren Edelstahlplatte war zudem eine homogene Temperierung der Zellkulturen möglich. Dies führte zu vergleichbaren Verdunstungsraten, so dass eine gleichermaßen starke Aufkonzentrierung von z. B. Zytokinen in allen Zellkulturmedien stattfand. Damit war die Vergleichbarkeit der simultan exponierten Zellkulturen gegeben. So konnten sowohl Mehrfachansätze gleicher Zellkulturen als auch unterschiedliche Kulturen parallel exponiert werden, wodurch gleichzeitig ein hoher Probendurchsatz ermöglicht wurde.

Dank des Schnellspannrings und der stützenden Funktion des Postaments konnte das Einsetzen der Zellkulturschalen in die Kammer sehr einfach und schnell erfolgen. Auch nach der Exposition war so eine unverzügliche, rasche Probenahme ohne Substanzverlust der VOC-haltigen Zellkulturmedien möglich. Dies war eine wesentliche Voraussetzung für die „headspace“ gaschromatographische Analyse der Zellkulturmedien. Als besonders vorteilhaft erwiesen sich diese schnelle Bedienbarkeit sowie die Vermeidung poröser Materialien außerdem in Hinsicht auf die Sterilität der Zellkulturen. Die Expositionskammer aus Duranglas ist zudem autoklavierbar. So konnten die Zellen – wie häufig in der Literatur gefordert^{140,146,154,357} – auch im Anschluss an den Expositionsversuch weiterhin kontaminationsfrei inkubiert werden. Dies ermöglicht generell, Spätreaktionen zu untersuchen. In der vorliegenden Studie war dies insofern wichtig, als zur Anreicherung messbarer Parameter im Zellkulturmedium eine Mindestkulturzeit von 48 h benötigt wurde.

In vielen in der Literatur beschriebenen *in vitro* Expositionssystemen werden Gasdruck und Stoffkonzentrationen ausschließlich im Gasgenerator bzw. vor und/oder ausschließlich nach der zellulären Exposition gemessen^{u. a. 162,154,164}. Nur wenige Modelle bestimmen die effektive Expositionskonzentration am Expositionsort^{145,146,158}. Der Probenahmeport in der hier vorgestellten Expositionskammer ermöglichte jederzeit „online“ Probenahmen aus der Expositionsatmosphäre sowie Direktmessungen der Medien- und Lufttemperatur und der relativen Luftfeuchte. Dadurch konnten Experimente unter permanenter „online“ Kontrolle der Expositionsbedingungen am Expositionsort durchgeführt werden. So ließen sich zum einen konstante Expositionsbedingungen überwachen. Zum anderen hätte jederzeit ohne Zeitverzögerung auf eventuelle Abweichungen reagiert werden können.

6.3.3 Konstanz der physikalischen Parameter

Aufgrund der gegenseitigen Abhängigkeiten bildeten die Parameter Luftfeuchte, Temperatur und Verdunstungsrate der Zellkulturmedien ein komplexes Regulationssystem. Dank der voneinander unabhängig regulierbaren Temperiersysteme konnten über die gesamte Expositionsdauer und für alle Expositionsvarianten konstante Bedingungen erzielt werden. Innerhalb von 15 bis 20 Minuten wurde eine auf +/- 2 K konstante Temperatur erreicht. Bedingt durch das Totvolumen der Apparatur stellte sich bei einem Gesamtvolumenstrom von 0,5 l/min nach 45 bis 55 Minuten der im

Rahmen von +/- 1,5 % konstante Wert für die Luftfeuchte ein. Unabhängig von VOC-Art und -Konzentration wurde eine relative Luftfeuchte von ca. 50-60 % im Gesamtvolumenstrom eingestellt. Damit konnten erfolgreich umweltrelevante Bedingungen simuliert werden. Dagegen führten Luftfeuchten größer als 70 % zu Kondensations-effekten an den Glaskammerwänden. Bei Luftfeuchten kleiner als ca. 30 % stieg die Verdunstungsrate der Zellkulturmedien auf über 50 % (bezogen auf die Gesamtexpositionszeit). In vielen Systemen findet eine Befeuchtung der Testatmosphäre gar nicht oder erst während der Exposition in der Expositionskammer statt^{145,146,154}. Die alternativ praktizierte Leitung von Testgasen durch eine temperierte, wassergefüllte Waschflasche kann zur Hydrolyse der Expositionsstoffe führen^{154,163}. Im vorliegenden System wurde daher ausschließlich das Trägergas synthetische Luft auf diese Weise befeuchtet und vor dem Eintritt in die Expositionskammer mit den Testgasen gemischt.

Der in allen Experimenten konstante Gesamtvolumenstrom garantierte unabhängig von der Expositionsvariante eine konstante Zeit zur Überwindung des Totvolumens und somit zur Einstellung konstanter Expositionsbedingungen. So wurde eine konstante Prüfgaskonzentration generell nach 45 bis 55 Minuten in der Expositionskammer erreicht. Die Größe des gewählten Gesamtvolumenstroms von 0,5 l/min trug zur geringen Wandadsorption bei und induzierte eine tolerierbare, mittels der Temperiersysteme regulierbare Verdunstungsrate. Die Ergebnisse der manuellen „headspace“ Gaschromatographie bewiesen zudem ein gutes Diffusionsverhalten der VOC, was bedeutet, dass der gewählte Gesamtvolumenstrom die Entstehung von Diffusionsbarrieren in Form stehender Luftgrenzschichten verhindern konnte. Auch im Hinblick auf die „online“ durchgeführten Analytprobenahmen erwies sich der gewählte Gesamtvolumenstrom als sinnvoll: Direkt aufeinanderfolgende Probenahmen gleicher Volumina zeigten, dass das Konzentrations- und Gasflusssystem durch die Beprobung nicht gestört wurde.

6.3.4 Konstanz der zellphysiologischen Parameter

Zur Aufrechterhaltung des pH-Wertes im Zellkulturmedium war, analog zu Standardzellkulturbedingungen, ein konstanter CO₂-Gehalt von 5 % notwendig. Die Simulation umweltrelevanter Bedingungen erforderte eigentlich einen kleineren Anteil von 1 %. Da eine Interaktion des polaren CO₂ mit den apolaren VOC-Prüfgasen nicht zu

erwarten war, spielte dieser Unterschied jedoch keine Rolle. Unabhängig von Substanz und Konzentration des Prüfgases wurde ein mit Standardinkubationsbedingungen vergleichbarer und zudem konstanter pH-Wert von pH 7,28 +/- 0,02 erreicht. Dieser Wert war optimal im Hinblick auf den zellphysiologischen pH-Bereich für eine maximale Zellvitalität. Gleichzeitig konnte dieser Wert dank der Gasdichtigkeit der Apparatur ohne weiteren Aufwand über die gesamte Expositionsdauer von bis zu 24 h in einem Bereich von +/- 0,02 konstant gehalten werden. Der Einsatz von Expositionsapparaturen, die keine pH-Wertkonstanz gewährleisten, ist dagegen auf Kurzzeitexpositionen beschränkt¹⁶⁵.

Dank der konstanten, zelladäquaten Werte für die Parameter Temperatur und pH-Wert wurde unabhängig von Art und Dauer der Exposition sowie unabhängig von der Fallgruppe eine Vitalität der exponierten Keratinozyten von im Mittel 87,4 % +/- 11,7 % absoluter Streuung erreicht. Dieser Wert lag nur geringfügig unter der nach Standardinkubation üblichen Vitalität von 90-95 %. Die Streuung verteilte sich zudem homogen über alle Expositionsansätze wie auch Kontrollversuche, so dass unter den gegebenen Expositionsbedingungen eine schadstoffbedingte Toxizität ausgeschlossen werden konnte.

6.3.5 Einstellung von Prüfgaskonzentrationen

Eine präzise Einstellung der Prüfgaskonzentrationen war essentiell für die Validität der Untersuchungen. Mit dem Einsatz statischer Prüfgaskonzentrationen von 500 ppm sowie 1000 ppm Toluol bzw. 500 ppm m-Xylol sowie einem Prüfgasgemisch von 0,7 ppm Toluol und 0,4 ppm m-Xylol ließen sich Expositionsbedingungen von 0,1, 1 und 3 MAK Toluol, 0,1 und 1 MAK m-Xylol sowie von einem umweltrelevanten Verhältnis von 0,08 mg/m³ Toluol und 0,053 mg/m³ m-Xylol realisieren. Das heißt, mit der Apparatur konnten Expositionen im gesamten Konzentrationsbereich von umweltrelevanten bis arbeitsplatzrelevanten Konzentrationen durchgeführt werden. Die gaschromatographischen Analysen von Probenvolumina aus der Expositions-kammer ergaben zudem über diesen gesamten Konzentrationsbereich Ist-Konzentrationen von 89 % +/- 10 % des eingestellten Sollwertes und bestätigten damit eine konstant gute Regulierbarkeit der Gasvolumenströme durch die elektronischen Gasflussregler. Für den zukünftigen Routinebetrieb der Apparatur bedeutet dies, dass eine Überprüfung der Ist-Konzentration stichprobenartig in größeren Zeit-

abständen, aber mindestens einmal pro Expositionsexperiment, erfolgen kann. Eine häufigere Kontrolle erscheint dagegen nicht erforderlich.

6.3.6 Analyse von VOC-Konzentrationen in der Gasphase

Eine wesentliche Voraussetzung für die Probenahme definierter Gasvolumina aus der Expositionskammer war die Regulierbarkeit eines niedrigen Volumenstroms, um die Expositionsatmosphäre nicht störend zu beeinflussen. Im Arbeitskonzentrationsbereich erwiesen sich die Vorteile einer aktiven Probenahme auf Aktivkohleröhrchen: Innerhalb relativ kurzer Probenahmezeiten von maximal 30 Minuten konnten bei einem niedrigen Volumenstrom von nur 100 ml/min ausreichend große Probenvolumina erzielt werden. Dadurch war zum einen eine häufige, regelmäßige Probenahme und damit die Überprüfung konstanter Expositionsbedingungen möglich. Zum anderen wurden durch eine Anreicherung des Analyten auf ~500 µg pro Aktivkohleröhrchen relativ niedrige Nachweisgrenzen erzielt. So konnten Analytkonzentrationen im MAK-Bereich von 19 mg/m³, 190 mg/m³ und 570 mg/m³ Toluol (0,1, 1 bzw. 3 MAK entsprechend) und von 44 mg/m³ bis 440 mg/m³ m-Xylol (0,1 bzw. 1 MAK m-Xylol entsprechend) problemlos beprobt und anschließend reproduzierbar analysiert werden (zur Genauigkeit der gaschromatographischen Analyse, siehe unten). Für BTX und ähnliche Analyten zeigt Aktivkohle mit Abstand die besten Sorbenseigenschaften^{248,359}. Ein Substanzverlust oder eine Kontamination der auf der Aktivkohle adsorbierten VOC konnte durch Negativkontrollen ausgeschlossen werden. Die sorbierten Analytkonzentrationen waren zudem über mindestens vier Wochen Lagerung stabil.

Eine ausreichende Aufkonzentrierung des um 2-3 Größenordnungen niedriger konzentrierten, umweltrelevanten VOC-Gemischs von 0,08 mg/m³ Toluol und 0,05 mg/m³ m-Xylol war mit dieser Methode nicht möglich, da hierzu ein Probenvolumen von 6250 l erforderlich gewesen wäre. Durch die Entnahme eines solch hohen Volumens wären jedoch die Expositionsbedingungen wesentlich beeinflusst worden. Um in Folgeexperimenten den niedrigkonzentrierten VOC-Umweltkonzentrationsbereich quantitativ erfassen zu können, muss eine Probenahme- und Probenaufbereitungsmethode eingesetzt werden, die trotz des limitierten Probenvolumens und Volumestroms eine stärkere Aufkonzentration der Gasvolumina erlaubt^{358,360}. Hierfür gibt es Thermodesorptionssysteme, z. B. ATD 400 der Firma *Perkin Elmer*, die diese

Anforderungen erfüllen. Auch hier erfolgt zuvor eine Aktivprobenahme. Während Aktivkohle generell für BTX und ähnliche Stoffe die besten Sorbenseigenschaften aufweist, ist sie jedoch aufgrund ihrer leichten Oxidierbarkeit für das Thermodesorptionsverfahren vollkommen ungeeignet. Hier werden deshalb Sorbentien wie Tenax verwendet^{358,359,361}. Es folgen die gerätgesteuerte Thermodesorption mit anschließender thermischer Fokussierung („cryo trapping“) und Verdampfung der aufkonzentrierten Probe zur Injektion in den angeschlossenen GC. Nach dieser Probenanreicherung wäre ebenfalls eine Analyse mit der in dieser Arbeit verwendeten, konventionellen Gaschromatographie mit nachfolgender Flammenionisationsdetektion angezeigt. Für die VOC-Expositionsexperimente im Rahmen der vorliegenden Dissertation stand kein Thermodesorptionssystem zur Verfügung. Die Etablierung und Optimierung der Methode hätte zudem eine den Rahmen der Arbeit übersteigende Zeit erfordert.

Die Wahl von Benzylalkohol als Desorptionsmittel hat sich in mehrfacher Hinsicht als geeignet erwiesen: Erstens verfügte es im Gegensatz zu Schwefelkohlenstoff über deutlich längere Lagerstabilität. In der vorliegenden Arbeit wurde eine Lagerstabilität von mindestens vier Wochen nachgewiesen, so dass die Möglichkeit wiederholter gaschromatographischer Analysen bestand. Zweitens wurde mit 96,8 % eine sehr hohe mittlere Desorptionsrate erreicht. Diese hohe Ausbeute lässt auf die Richtigkeit („accuracy“) und eine hohe Validität der Analyseergebnisse schließen. Drittens erfolgte die Elution von Benzylalkohol in der Gaschromatographie deutlich getrennt von den Analyten, so dass durch das Desorptionsmittel keine Störsignale die Analyse beeinträchtigten.

Die konventionelle Gaschromatographie mit nachfolgender Flammenionisationsdetektion zeichnete sich durch eine zuverlässige und effiziente Trennung der VOC-Einzelkomponenten Toluol und m-Xylol mit stabilen Retentionszeiten aus. Die Analyse der Reproduzierbarkeit von Mehrfachmessungen ergab eine niedrige, relative Messungenauigkeit der GC-Methode von 5,5 %. Für vergleichbare Analysen werden auch in der Literatur mittlere Standardabweichungen zwischen 5 % und 10 % angegeben³⁶⁰.

Gemessen am Kalibrationssystem, wurden die über die Gasflussregler eingestellten VOC-Konzentrationen zu einem hohen Prozentsatz von im Mittel 89 % +/- 10 % in

der Expositions-kammer nachgewiesen, wobei die Abweichung, neben den 5,5 % GC-Messfehler, wesentlich auf dem Probenahme-fehler der manuellen Pumpe (ca. 4,5 %) beruhte. Diese Ergebnisse sprechen für eine sehr genaue Konzentrationseinstellung durch die Gasflussregler, eine geringe Wandadsorption in der Apparatur sowie eine sehr gute Dichtigkeit des Systems.

6.3.7 Analyse von VOC-Konzentrationen im Zellkulturmedium

Eine direkte Injektion der im wässrigen Zellkulturmedium enthaltenen Analytproben war aufgrund der hohen Solvationsaktivität von H₂O auf die apolare stationäre Phase der Säule nicht möglich. Um die VOC-Konzentrationen im Zellkulturmedium zu bestimmen, wurde daher eine auf dem Prinzip der „headspace“ Gaschromatographie basierende, manuelle Methode angewendet. Nach Optimierung und Standardisierung dieser Methode wurden im Arbeitskonzentrationsbereich (19-570 mg/m³, Toluol bzw. 44-440 mg/m³ m-Xylol) in Wiederholmessungen Standardabweichungen von weniger als 10 % erreicht, was eine gute, niedrige Messungengenauigkeit dieser manuellen „headspace“-Methode darstellte²⁵². Vergleichbare Variationskoeffizienten (5-10 %) werden für konventionelle „headspace“-GC-Analysen von VOC in Blutproben angegeben^{249,250,251}. Durch standardisiertes Vorkonditionieren der Spritze vor jeder Probenahme konnte ferner eine Substanzverschleppung durch Wandadsorption von VOC in der Spritze auch bei hohen VOC-Konzentrationen auf unter 1 % reduziert werden, so dass nach Kontrollexpositionen mit synthetischer Luft keinerlei Spuren von VOC nachgewiesen wurden.

Obwohl die Gaschromatographie eine äußerst sensitive Nachweismethode darstellt – denkbare Alternativmethoden der VOC-Analyse wie HPLC oder HPLC/MS sind um den Faktor 5-10 unempfindlicher – war der Nachweis von VOC im um 2-3 Größenordnungen niedrigeren Umweltkonzentrationsbereich (0,08 mg/m³ Toluol sowie 0,05 mg/m³ m-Xylol) mit der gewählten manuellen, statischen „headspace“-Methode ohne Probenanreicherung nicht möglich: In mit dem umweltrelevanten VOC-Gemisch exponierten Zellkulturmedien wurden lediglich kleine Peakflächen um 1000 µV·s ermittelt, die nicht statistisch zuverlässig ausgewertet werden konnten. Die eingesetzte Methode ist hier an der Nachweisgrenze. Auch unter Verwendung der konventionellen „headspace“-Technik - die im Rahmen der Arbeit aber nicht zur Verfügung stand - ließe sich unter Optimierung der Temperatur zur Phasengleichge-

wichtseinstellung maximal eine Sensitivitätssteigerung um etwa Faktor fünf erzielen. Der eingesetzte Flammenionisationsdetektor gilt mit einer niedrigen Nachweisgrenze von 10^{-9} g/s bis 10^{-12} g/s als Standarddetektor für den Nachweis von VOC und sollte daher nicht gewechselt werden. Pekari und Mitarbeiter erzielten zwar für den Nachweis von Toluol und Benzol in Blut mittels eines Photoionisationsdetektors (PID) (5 nmol/l) eine um den Faktor 10 niedrigere Nachweisgrenze als mit dem FID (50 nmol/l)²⁴⁹. Doch ist dies Ergebnis stark matrixabhängig: So ist der FID deutlich unempfindlicher gegen Störkomponenten, was im vorliegenden Fall der Matrix Zellkulturmedium ein wesentliches Auswahlkriterium darstellte. Außerdem ist das absolute PID-Signal nicht so stabil wie das des FID. Um den Niedrigkonzentrationsbereich zukünftig zuverlässig zu analysieren, müssen vielmehr andere Probenaufgaben- (1) und/oder Probenanreicherungs- (2)^{361,362}, aufgrund des limitierten Probenvolumens aber vor allem Probenaufbereitungstechniken (3) verwendet werden. Als Beispiele seien hier ad (1) die „on column“-Injektionstechnik sowie ad (2) vor allem Thermodesorptionsverfahren und ad (3) organische Extraktionsverfahren genannt.

ad (1): Während in der manuellen „headspace“-Technik bei einem Splitverhältnis von 1:20 aus 1000 µl Desorptionsvolumen nur wenige µl der Probe auf die Säule gelangten, würde bei einer „on column“ Injektion das gesamte Probenvolumen auf die GC-Säule aufgetragen.

ad (2): Zu einer weiteren Probenanreicherung würde eine mit Thermodesorption gekoppelte, dynamische „headspace“ Analyse, das sogenannte „purge and trap“-Verfahren führen³⁶³. Dabei wird ein Gasstrom zunächst durch die Probe (Gasextraktion, „purging“) und anschließend durch eine Kühlfalle („cold trapping“) geleitet, in der sich die Analyten aufkonzentrieren. Vor der gaschromatographischen Analyse werden diese thermisch desorbiert³⁶⁴. Im Vergleich zur statischen „headspace“ Analyse lässt sich mit der dynamischen „purge and trap“ Methode eine um den Faktor 100 bis 1000 höhere Empfindlichkeit erreichen.

Diese geeigneteren Verfahren standen jedoch für die Expositionsversuche der vorliegenden Arbeit nicht zur Verfügung. Zudem muss für die Methodenevaluation der „on column“-Injektionstechnik oder des Thermodesorptionsverfahrens ein Zeitraum von circa 3 bis 6 Monaten einkalkuliert werden. In Bezug auf den Stellenwert der in der vorliegenden Arbeit durchgeführten VOC-Expositionsversuche als Pilotstudie überstieg dieser Aufwand den Zeitrahmen der vorliegenden Dissertation.

ad (3): Aufgrund des im vorliegenden Fall stark limitierten Probenvolumens wäre zur Probenaufbereitung z.B. eine Probenextraktion mit organischen Lösungsmitteln und eine anschließende Aufkonzentration des Extraktes angezeigt. Aufgrund des nur schwer standardisierbaren Vorgangs des Einengens würde die vorherige Zugabe eines internen Standards analytähnlicher Substanz notwendig. Da das Phasengleichgewicht der auftretenden Medienkomponenten generell nicht stabil genug und die Signale somit nicht in genügendem Maße reproduzierbar waren, könnten diese nicht als interner Standard verwendet werden. Sowohl in Bezug auf die Probenextraktion als auch hinsichtlich der Einführung eines internen Standards würde jedoch erneut das Problem der Mischbarkeit des Kulturmediums mit organischen, hydrophoben Stoffen auftreten (siehe unten), so dass für die Methodenentwicklung einer organischen Probenextraktion eine Zeit von circa $\frac{1}{4}$ bis $\frac{1}{2}$ Jahr einkalkuliert werden muss. Im Hinblick auf den Charakter der vorliegenden Untersuchungen als Pilotstudie war dieser Zeitaufwand nicht gerechtfertigt.

Die Verwendung eines internen Standards ist nur bei heterogener Probenaufbereitung sinnvoll. Generell ist ein externes Kalibrationssystem anhand der eigentlichen Analyten geeigneter. Im vorliegenden Fall wurde jedoch die Herstellung von externen Flüssig-VOC-Kalibrierlösungen nicht nur aufgrund der hohen Flüchtigkeit der Substanzen erschwert. Als ein wesentliches Problem erwies sich vor allem die niedrige Löslichkeit von flüssigem Toluol und m-Xylol im wässrigen Lösungsmittel. Infolgedessen war es nicht möglich, stabil homogene Kalibrierlösungen herzustellen. Die im Zellkulturmedium gelöste VOC-Konzentration konnte daher nicht anhand absoluter Kalibrationsdaten quantifiziert werden. Statt dessen war jedoch eine qualitative, kalibrationsunabhängige Beurteilung möglich: Erstens verhielten sich die Peakflächen zu den eingesetzten VOC-Konzentrationen proportional. Zweitens zeigten, wie oben erwähnt, die statistischen Kenndaten zur kalibrationsunabhängigen Genauigkeit der manuellen, gaschromatographischen „headspace“-Analysemethode zudem mit weniger als 10 % Standardabweichung eine konstant einzuhaltende, für diese Methode hohe Reproduzierbarkeit identischer Proben. Unabhängig von der Lokalisation der Kulturen in der Zellkulturplatte und in der Expositionskammer wiesen die jeweils zwölf im identischen Expositionsversuch exponierten Proben, gemessen an dem methodischen Messfehler von 10 %, eine nur unwesentlich höhere Streuung der Peakflächen von 14,4 % auf, was wiederum für eine homogene Gasverteilung und

ein ungestörtes Strömungsprofil in der Expositions-kammer spricht. Die mit 13,5 % für 1 MAK m-Xylol, 13,9 % für 1 MAK Toluol und 22,2 % für 3 MAK Toluol ebenfalls relativ niedrigen Streuungen über alle analysierten Proben derselben Expositions-variante zeigten, dass bezüglich der gasförmigen VOC-Konzentrationen gleiche Expositionsbedingungen zuverlässig konstant in vergleichbaren Medium-VOC-Konzentrationen und somit vergleichbaren, zellulären Expositionsbedingungen resultierten. Für die im Zellkulturmedium gelösten VOC-Konzentrationen wurde keine Abhängigkeit von der zwischen 5 und 24 Stunden variierenden Expositionsdauer festgestellt. Das Phasengleichgewicht wurde also in allen Expositionszeitvarianten gleichermaßen erreicht. Zusammengefasst lassen diese Ergebnisse den Schluss zu, dass die realen, im Zellkulturmedium gelösten VOC-Konzentrationen annähernd mit den theoretischen, im Phasengleichgewicht unter idealen Bedingungen erreichbaren Konzentrationswerten übereinstimmten.

6.3.8 Zusammenfassung

Zusammenfassend lässt sich feststellen, dass es gelungen ist, eine in Bezug auf die stabile und reproduzierbare Funktionsweise sämtlicher Betriebsparameter optimierte, zuverlässig funktionsfähige Apparatur zur kontrollierten Exposition von unterschiedlichen Zellkultursystemen zu entwickeln. Die Konstruktion der Expositions-kammer erlaubte eine simultane Exposition von bis zu 6 luftexponierten bzw. bis zu 12 submer-sen Zellkulturen im zentralen Gasfluss. Ein geeignetes Strömungsprofil garantierte homogene Expositions-konditionen und somit eine gute Vergleichbarkeit der simultan exponierten Kulturen. Beide Aspekte ermöglichten wiederum einen hohen Proben-durchsatz. Die exakte Regulierbarkeit der Prüfgasvolumenströme, die hohe Gasdich-tigkeit der Apparatur sowie die niedrige Wandadsorption trugen ebenfalls zu reprodu-zierbar homogenen Expositions-konditionen nach einer mit 45-55 Minuten relativ kur-zen Adaptionzeit bei. So ließen sich zuverlässig konstante VOC-Gaskonzentratio-nen von 0,08 mg/m³ bis 570 mg/m³ Toluol bzw. 0,05 mg/m³ bis 440 mg/m³ m-Xylol in einem vier Größenordnungen umfassenden Konzentrationsbereich einstellen. Die Apparaturdichtigkeit und Vermeidung poröser Materialien sowie ein schnell mög-licher Wechsel der Zellkulturplatten gewährleistete zudem, die Kulturen kontamina-tionsfrei zu halten. Durch das einfache und schnelle Öffnen der Kammer konnten außerdem unverzüglich Medienprobenahmen ohne nennbaren VOC-Verlust erfol-

gen. Die „online“ Probenahmen aus der Expositionsatmosphäre sowie „online“ Direktmessungen von Medien- und Lufttemperatur oder relativer Luftfeuchte durch den Probenahmeport in der Expositions-kammer ermöglichten eine permanente Kontrolle der Expositions-konditionen, ohne störend auf diese einzuwirken. Dank der zwei voneinander unabhängig einstellbaren Temperiersysteme konnten - unter Abstimmung des komplexen Regulationssystems aus Luftfeuchte, Temperatur und Verdunstungsrate auf die eingesetzten Zellkultursysteme - konstante Expositionsbedingungen für alle Expositionsvariablen und über beliebige Expositions-dauer erzielt werden: Nach 15-20 Minuten wurde eine Temperaturkonstanz von ± 2 K erreicht. Die relative Luftfeuchte blieb nach einer Adaptionszeit von 45-55 Minuten im Rahmen von $\pm 1,5$ % konstant. Der für alle Expositionsvariablen konstante Gesamtvolumenstrom von 500 ml/min garantierte diese von der Expositionsvariante unabhängige, konstante Adaptionszeit zur Einstellung stabiler Expositionsbedingungen. Bei Kurzzeitexpositionen kommt die Einstellzeit homogener Expositions-konditionen von 45-55 Minuten jedoch stärker zum Tragen als bei Langzeitexpositionen. Dies muss bei der Berechnung der Expositions-dosis berücksichtigt werden. Um Effekte unterschiedlicher Expositions-dauer zu vergleichen, sollten daher alle Gesamtexpositionszeiten die Adaptionszeit um ein Vielfaches übersteigen. Als Konsequenz wurde in den VOC-Expositionsversuchen der vorliegenden Arbeit eine Mindestexpositionszeit von fünf Stunden gewählt. Der Gesamtvolumenstrom gewährleistete ferner bei zugleich niedriger Verdunstungsrate der Zellkulturmedien und geringer Wandadsorption von VOC die rasche Einstellung des Phasengleichgewichts durch ein günstiges Diffusionsverhalten der VOC, so dass aus den VOC-Konzentrationen in der Gasphase zuverlässig maximale VOC-Konzentrationen im Zellkulturmedium resultierten. Die durch einen konstanten CO_2 -Gehalt von 5 % erzielte pH-Wert-Konstanz im zellphysiologischen Bereich von pH 7,28 \pm 0,02 trug – wie auch die stabile Medientemperatur – schließlich zu einer mit 87,4 % \pm 11,7 % hohen Zellvitalität unter Expositionsbedingungen bei. Die in Kapitel 5.5.3 formulierten Anforderungen an die Expositionsapparatur wurden damit gänzlich erfüllt.

Das im Inkubatorversuch aufgetretene Problem des VOC-Verlustes aus dem Zellkulturmedium durch den Konzentrationsausgleich an der Phasengrenze flüssig-gasförmig wurden in der Apparatur in umgekehrter Weise vorteilhaft genutzt: Die Phasengleichgewichtseinstellung per Diffusion führte dabei erstens zu reproduzierbar homogenen VOC-Konzentrationen im Zellkulturmedium. Zweitens erübrigte sich auf diese

Weise der Einsatz eines Lösungsvermittlers im Zellkulturmedium. Das in der Apparatur angewendete Prinzip der Exposition gegenüber Stoffen aus der Gasphase ermöglichte zusätzlich der *in vivo* Situation entsprechende Expositionen gegenüber luftexponierten Zellkultursystemen z. B. der Haut oder der Atemwege. Im Gegensatz zum Inkubator gewährleistete das kontrolliert offene, kontinuierlich gasdurchströmte - gleichzeitig gegenüber unkontrolliertem Analytverlust gasdichte - System der Apparatur eine dauerhaft homogen konzentrierte und permanent kontrollierbare Expositionsatmosphäre mit gleichbleibendem Analyt-, O₂- und CO₂-Gehalt für die Zellkultursysteme. Während in anderen Apparaturen, z. B. in den in der Einleitung erwähnten Apparaturen nach *Abé et al.*¹⁶⁴, *Behnke et al.*^{162,165} und *Mückter et al.*¹⁵⁴, physikalisch-chemische Expositionsparameter ausschließlich im Prüfgasgenerator oder der Exposition nachgeschaltet am Apparaturausgang überprüft werden können, ermöglichte die in dieser Arbeit entwickelte Expositionsapparatur sämtliche Prüfparameter direkt aus der Expositionsatmosphäre in der Expositions-kammer zu bestimmen.

Ein Problem, dem man bei Folgeexperimenten erhöhte Aufmerksamkeit zukommen lassen muss, ist jedoch die physikalisch-chemische Analytik im Niedrigkonzentrationsbereich. Um zukünftig sichere Aussagen über biologische Effekte durch umweltrelevante Schadstoffkonzentrationen machen zu können, muss zunächst das Nachweisproblem dieser Stoffe auf physikalischer Ebene gelöst werden. Die Messtechnik für umweltrelevante Konzentrationen muss sowohl im Hinblick auf die Probenahme als auch auf geeignete Nachweismethoden optimiert werden. In den Kapiteln 6.3.6 und 6.3.7 wurden diesbezügliche Lösungsvorschläge erläutert.

6.4 Einsatz der Expositionsapparatur zur Untersuchung von allergotoxikologischen Fragestellungen

6.4.1 Intention der VOC-Expositionsversuche

Nachdem in Vorversuchen durch gründliche Analyse der physikalisch-chemischen Parameter die zuverlässige und reproduzierbare Funktionsfähigkeit der Expositionsapparatur erwiesen war, sollte ihr Einsatz in VOC-Expositionsversuchen erste qualitative und quantitative Erkenntnisse (prinzipielles Auftreten, Größenordnung, Richtung sowie natürliche Variabilität) über durch Schadgase induzierte, biologische Auswirkungen liefern. Hierbei wurde Gewicht auf eine Vielzahl unterschiedlicher sowie

kombinierter Expositionsvarianten gelegt. So konnten ein breites Konzentrationspektrum, ferner unterschiedliche Substanzen und die Auswirkungen unterschiedlicher Expositionsdauer untersucht werden, um einen ersten Überblick über potentielle Effekte zu erhalten. Außerdem konnten im Hinblick auf Besonderheiten des verwendeten biologischen Systems (z. B. bezüglich der natürlichen Streuung der Zielvariablen, deren Quantifizierbarkeit und damit der Quantifizierbarkeit möglicher Effekte) geeignete Versuchsbedingungen evaluiert und ferner – basierend auf den erzielten Daten – eine „power“-Analyse durchgeführt werden (siehe Kapitel 6.4.6), um in der Pilotstudie aufgetretene, interessante Aspekte zukünftig in Folgestudien gezielt unter optimiertem Versuchsdesign, mit adäquater Versuchsanzahl und größerer statistischer Sicherheit untersuchen zu können.

6.4.2 Qualitätskontrolle von ELISA-Messsystem und Messergebnissen

6.4.2.1 Sensitivität des ELISA-Messsystems und Quantifizierbarkeit der Zielvariablen

Als Zielvariablen zum Nachweis immunmodulatorischer Aktivität wurden im Vergleich zur Spontansekretion die von den Primärkeratinozyten nach VOC-Exposition in das umgebende Milieu sekretierten Zytokinkonzentrationen bestimmt. Die einzige etablierte Nachweismethode für von adhärent wachsenden Zellen freigesetzte, extrazelluläre Zytokine war zum Zeitpunkt der experimentellen Untersuchungen eine auf dem ELISA-System basierende Methode. Angewendet wurden kommerzielle, von der Firma Endogen entwickelte, u. a. explizit für die Bestimmung von Zytokinen im Zellkulturüberstand ausgewiesene und seit 1995 für Forschungszwecke angebotene, etablierte Zytokin-ELISA-Kits. Die vom Hersteller für die einzelnen Assays ausgewiesenen Kenndaten ließen diese als geeignet erscheinen (vergleiche Tabelle 28).

Tabelle 28: Kenndaten der Zytokin-Assays laut Hersteller Endogen

	IL-1 α	IL-6	GM-CSF	TNF α
Sensitivität	< 2 pg/ml	< 1 pg/ml	< 2 pg/ml	< 5 pg/ml
Reproduzierbarkeit: Variationskoeffizient für „intraassay“	< 10 %	< 10 %	< 10 %	< 10 %
für „interassay“	< 10 %	< 10 %	< 10 %	< 10 %
Kalibrierbereich	10-400 pg/ml	10-400 pg/ml	15-600 pg/ml	25-1000 pg/ml

Besondere Sorgfalt wurde auf die Qualitätskontrolle dieser analytischen Methode verwendet. Die vom Hersteller angegebenen Sensitivitätsgrenzen lagen weit unterhalb des jeweils vorgeschlagenen Kalibrierbereichs, so dass für die Analyse niedriger Konzentrationen weit über die Kalibriergerade hinaus hätte extrapoliert werden müssen. Um niedrige Zytokinkonzentrationen mit größerer Genauigkeit bestimmen zu können, wurde der Kalibrierbereich daher bis zur Sensitivitätsgrenze erweitert. Die für Einfachproben geltende Nachweis-, Erfassung-, und Bestimmungsgrenze jeder ELISA-Platte wurde nach dem linearen Kalibrierkurvenverfahren nach DIN 32645 ermittelt^{257,258} (vergleiche Tabelle 11, Kapitel 5.7.3.1). Dabei wiesen die Kalibrierlösungen einen niedrigen Variationskoeffizienten der Einzelwerte von kleiner 10 %, die 5- bzw. 6-Punktkalibrierkurven einen mittleren Korrelationskoeffizienten von 0,997 auf. Das bedeutete, dass die Probenkonzentrationen mit hoher Genauigkeit bestimmt werden konnten. Trotz dieser großen Genauigkeit im bis zur Sensitivitätsgrenze erweiterten Kalibrationsbereich wurde die seitens des Herstellers angegebene Sensitivität – die, im englischen Sprachgebrauch als „sensitivity or lower limit of detection“ bezeichnet, mit dem DIN-Terminus Erfassungsgrenze gleichzusetzen ist – in allen vier Zytokinassays bei weitem nicht erreicht. Die Herstellerangaben von < 2 pg/ml GM-CSF bzw. IL-1 α , < 1pg/ml IL-6 und < 5 pg/ml TNF α waren hier zu optimistisch. Die ermittelten mittleren Nachweisgrenzen lagen bereits um den Faktor 2 bis 6, die mittleren Erfassungsgrenzen um den Faktor 4 bis 12 höher: Erst oberhalb der Bestimmungsgrenzen von im Mittel 27,4 pg/ml IL-1 α , 22,8 pg/ml IL-6, 17,7 pg/ml GM-CSF und 48,2 pg/ml TNF α waren die Zytokinkonzentrationen statistisch zuverlässig quantifizierbar.

Dies hatte massive Auswirkungen auf die Quantifizierbarkeit der freigesetzten Zytokine und damit auf die zur Effektdarstellung bestimmten Zielgrößen: Mehr als 90 % der in Vorversuchen nach 24 h-Inkubation in Zellkulturüberständen ermittelten Zytokinkonzentrationen lagen im Fall von IL-6 und TNF α unterhalb der Nachweisgrenze, im Fall von IL-1 α und GM-CSF unterhalb der Bestimmungsgrenze und waren somit allenfalls qualitativ zu beurteilen. Als Konsequenz wurde unter maximaler Volumenreduktion des Nährmediums die Inkubationszeit *vor der Exposition* auf 48 h erhöht, um höchstmögliche Zytokinkonzentration im Zellkulturüberstand zu erreichen, ohne durch Nährstoffmangel bedingte metabolische Artefakte zu riskieren. Wie in Tabelle 12 (Kapitel 5.7.3.1) dargestellt, konnten nun zumindest 50 % der für GM-CSF und Interleukin 1 α erhobenen Konzentrationswerte quantitativ bestimmt werden. Das in

nur niedrigen Konzentrationen freigesetzte Zytokin Interleukin 6 war jedoch zum Großteil nur qualitativ analysierbar. Die Konzentrationen von $\text{TNF}\alpha$ blieben ausnahmslos deutlich unterhalb der Nachweisgrenze.

Da die Primärkeratinozyten nur sehr niedrige Zytokinkonzentrationen sezernierten, trat das Problem ihrer Quantifizierbarkeit erneut bei den direkt im Anschluss an die maximal 24 h dauernden Expositionen gesammelten Zellkulturüberständen auf. Ein direkter Expositionseffekt nach Expositionsende war mit dieser Methode daher nicht messbar. Die in der Expositionsapparatur gewährleistete Sterilität der Zellkulturen erlaubte jedoch, diese *im Anschluss an die Exposition* weitere 48 h kontaminationsfrei zu inkubieren und so die Zytokinfreisetzung nach der Exposition zu bestimmen und diese direkt mit der Spontansekretion innerhalb der 48 h vor Exposition zu vergleichen: Für GM-CSF und IL-6 ergab sich gemittelt über alle Fallgruppen und Expositionsvarianten ein kaum verändertes Bild der relativen Quantifizierbarkeit der Konzentrationsdaten vor und nach Exposition, während für $\text{IL-1}\alpha$ bereits hier eine deutliche Reduzierung der Zytokinkonzentrationen nach Exposition erkennbar war, gleichbedeutend mit einer größeren Anzahl nur qualitativer Konzentrationsbestimmungen (vergleiche Tabelle 12, Kapitel 5.7.3.1). Eine messbare Freisetzung von $\text{TNF}\alpha$ war auch nach der Exposition nicht nachweisbar. Die $\text{TNF}\alpha$ -Konzentrationen lagen mit 0,0-0,5 pg/ml weit unterhalb der Nachweisgrenze von 10,5 +/- 5,2 pg/ml des eingesetzten ELISA Nachweissystems.

Schlussfolgerungen

1. Ausschluss des Zielparameters $\text{TNF}\alpha$

In Übereinstimmung mit der Literatur^{115,120,365} wurde den Erwartungen entsprechend keine Spontanfreisetzung von $\text{TNF}\alpha$ durch die Primärkeratinozyten nachgewiesen. Allerdings erfolgte auch nach VOC-Exposition unabhängig von der Expositionsart und -dauer sowie fallgruppenunabhängig keine messbare Freisetzung von $\text{TNF}\alpha$. Analoge Befunde lagen in der Literatur für Expositionen gegenüber Dieselrußpartikeln und Formaldehyd vor¹¹⁵, die wie offenbar die in den Vorstudien der vorliegenden Arbeit eingesetzten VOCs Toluol und m-Xylol ebenfalls keinen $\text{TNF}\alpha$ -induzierenden Stressfaktor für die Zellen darstellten. Der Parameter $\text{TNF}\alpha$ wurde in den VOC-Expositionsversuchen daher nicht weiter berücksichtigt.

2. Chancen und Grenzen des ELISA-Messsystems – Auswirkungen auf die statistische Datenanalyse

Die aus der unzureichenden Quantifizierbarkeit resultierende unterschiedliche statistische Zuverlässigkeit der ermittelten Konzentrationsdaten komplizierte insbesondere die Auswahl geeigneter, statistischer Analysemethoden und reduzierte entscheidend deren Aussagekraft im Hinblick auf eventuelle schadstoffinduzierte Effekte. Dennoch konnten mit der verwendeten Methode VOC-bedingte Effekte qualitativ nachgewiesen werden, da eine relative, auf die Spontansekretion bezogene Konzentrationsänderung beurteilt wurde. Dies war auch möglich, wenn nur einer der beiden Konzentrationswerte vor oder nach der Exposition zuverlässig quantifizierbar war.

Die der statistischen Zuverlässigkeit der Konzentrationswerte angepasste Datenanalyse erforderte im Wesentlichen die folgenden Einschränkungen:

1. Um eine zusätzliche, komplizierte Rangzuordnung bei getrennten Zuverlässigkeitsstufen der Einzelwerte des Doppelexperimentes zu vermeiden, wurden sowohl der Kruskal-Wallis-Rangsummentest als auch die qualitative logistische Regressionsanalyse auf den Einzelwerten der vergleichbaren Doppelexperimente basierend durchgeführt. In Konsequenz wurde deshalb auch die quantitative Varianzanalyse auf Einzelwerten basierend berechnet. Diese Vorgehensweise hatte zudem den Vorteil einer aufgrund der verdoppelten Fallzahl verbesserten, statistischen Auswertbarkeit. Die in der Qualitätskontrolle nachgewiesene statistische Bindung der Doppelwerte wurde dabei jedoch nicht berücksichtigt.
2. Für die quantitative wie die qualitative, statistische Auswertung der VOC-Effekte galt: Individuelle Effekte konnten nicht berücksichtigt werden, da die dabei entstehende, große Anzahl von Variablen bei gleichzeitiger Verringerung der Fallzahlen pro Variable zu großen Varianzen und somit zu hohen statistischen Unsicherheiten führte. Vorhandene Abhängigkeiten von mehrfachen Wiederholungsexperimenten mit Zellen desselben Individuums wurden dadurch rechnerisch als unabhängig behandelt und so eine scheinbar unabhängige, hohe Fallzahl pro Expositionsvariable der Fallgruppe erreicht.
3. Ferner wurden die aufgrund der nachgewiesenen Individuenspezifität und der unterschiedlichen Häufigkeit von Wiederholungsexperimenten unterschiedlich starken Effekte verschiedener Individuen in diesen Analysen nicht berücksichtigt, so dass die analysierten Signifikanzen der Expositionsvariable 3 MAK Toluol individuen-

spezifisch waren. Mögliche Individuendominanz und die Anzahl von Wiederholungsexperimenten wurden deshalb in einem dritten Auswertungsschritt aller Ergebnisse, differenziert nach Fallzahlen und Individuen pro Expositionsvariable, gezielt hinterfragt und in einer abschließenden, vergleichenden Auswertung der Ergebnisse aller drei Analysemethoden berücksichtigt.

3. Beurteilung von für Folgestudien geeigneten Zytokindetektionsmethoden

Die in der Qualitätskontrolle des Zytokin-ELISA-Analysesystems festgestellte niedrige Sensitivität des Messsystems und damit unzureichende Quantifizierbarkeit der Zielvariablen war im Vorfeld der Expositionsversuche und der Qualitätskontrolle nicht vorhersehbar. Nicht nur die Herstellerangaben waren irreführend. Auch in der Literatur finden sich vielfach mit unterschiedlichen Zytokin-ELISAssays ermittelte, als valide Daten publizierte Messdaten in Größenordnungen von 15 pg IL-1 α , 1,5 pg IL-6, 8 pg GM-CSF und 0,1-0,3 pg TNF α bezogen auf 10⁶ Keratinozyten-48 h^{115,365,366,367}. Hierfür gibt es zwei mögliche Erklärungen:

1. Einerseits werden in den genannten Publikationen keine Angaben zur Qualitätskontrolle bzw. zur Sensitivität der Messsysteme gemacht. Möglicherweise wurden also die Herstellerangaben zur Sensitivität ohne weitere Überprüfung übernommen. Auch die in den Expositionsversuchen der vorliegenden Arbeit nach 48 h Inkubation ermittelten Zytokinkonzentrationen lagen oberhalb der Herstellerangaben zur Sensitivität des ELISA-Messsystems und würden demnach ohne deren Überprüfung als valide und quantitativ beurteilt.

2. Andererseits variiert die Sensitivität von unterschiedlichen ELISAs aufgrund der Epitopspezifität der eingesetzten monoklonalen Antikörper und der gleichzeitig grossen Heterogenität der von unterschiedlichen Zellen freigesetzten Zytokine sehr stark^{368,369,370}.

ad 1.: Einzig Reilly und Mitarbeiter erwähnten in einer kürzlich publizierten Arbeit explizit die generell niedrigen Zytokinkonzentrationen in normal gesunder Haut und das damit einhergehende Detektionsproblem mit konventionellen „ELISA-Kits“⁴⁰⁵. Die überwiegend sehr niedrigen und infolgedessen nicht sicher quantifizierbaren Zytokinkonzentrationen stellen ein schwierig zu lösendes Problem dar. Eine generelle Erhöhung der Zytokinkonzentrationen wäre theoretisch durch eine Volumenreduktion des Zellkulturmediums oder durch verlängerte Inkubationsintervalle erreichbar. Letzteres

wurde bereits während der Vorstudien mit der Verdopplung der Inkubationszeit von 24 h auf 48 h angewendet. Auch das Volumen des Nährmediums wurde bereits möglichst gering gewählt, so dass sich eine weitere Reduzierung bei gleichbleibender Zellzahl nicht realisieren lässt, ohne durch Nährstoffmangel bedingte metabolische Artefakte zu riskieren. Aus dem gleichen Grund ist auch eine weitere Verlängerung der Inkubationszeit ohne zusätzliche Nährstoffe oder Nährmediumwechsel nicht möglich. Eine eventuelle Aufkonzentration der Proteine im Zellkulturüberstand durch Ultrafiltration oder Dialyse setzte eine gründliche Überprüfung der Stabilität und möglicher Degradation der Zytokine voraus. Um sichere, physiologische Standardbedingungen der Zellkulturen und gleichzeitig eine sichere Quantifizierbarkeit der Zytokine zu gewährleisten, ist daher der Einsatz bzw. die Entwicklung von sensitiveren Detektionssystemen angezeigt.

ad 2.: Das Problem der Inkomparabilität von mit unterschiedlichen „assays“ erhobenen Daten wird seit langem in Normierungsgremien diskutiert und die Wichtigkeit gründlicher „assay“-Validierung betont^{371,370}. In Folgestudien, in denen über die hier vorliegenden Pilotstudienresultate hinaus die Sekretion einzelner Zytokine gezielt und detailliert untersucht werden, sollten daher prinzipiell unterschiedliche, von einander unabhängige Methoden zur Zytokinbestimmung angewendet werden^{372,373}.

Der Zytokin-ELISA war zum Zeitpunkt der Studiendurchführung die einzige etablierte Methode, um extrazelluläre, aus adhären wachsenden Zellen freigesetzte Zytokine zu bestimmen. Die semi-quantitative ELISPOT-Technik^{373,374} war eher für Suspensionskulturen geeignet und stellte somit keine Alternative dar. Andere Zytokinnachweismethoden - wie z. B. Immunprints von aufgetrennten Zellextrakten, die durchflusszytometrische Zellanalyse durch fluoreszenzmarkierte Antikörper auf Proteinebene³⁷⁵ oder der Nachweis zytokinexprimierender m-RNA auf molekularer Ebene³⁷³ - wiesen ausschließlich intrazelluläre oder membranständige Zytokinexpression nach, nicht aber deren Freisetzung in das umgebende Zellmilieu. Erst diese Freisetzung sorgt jedoch *in vivo* für die lokale Reaktion im umgebenden Gewebe und war deshalb ein geeigneter Zielparameter zum Nachweis VOC-induzierter, immunmodulatorischer Aktivität. Für zukünftige Anwendung könnte die Sensitivität der ELISA-assays möglicherweise durch Integration des in der Immunhisto- und -zytologie üblichen Avidin-Biotin-Signalverstärkungssystems erhöht werden³⁷⁶. Dies erforderte aber eine gründliche KenngröBenevaluation der geänderten Methode. Zur metho-

disch unabhängigen Parallelbestimmung böte sich das neu entwickelte FlowMetrix System an: Es ermöglicht den durchflusszytometrischen Nachweis von antikörperdetektierten Zytokinen im Zellkulturüberstand im „multiplex“-Ansatz³⁷⁷.

Seit Frühjahr 2001 gibt es alternativ mit dem „trapping assay“ der Firma Hölzel Diagnostika eine im Vergleich zum ELISA deutlich sensitivere Methode, um extrazellulär freigesetzte Zytokine zu quantifizieren³⁷⁸. Dieser „particle immunoassay“ fängt mittels antikörperbeschichteter Magnetpartikel in der Zellkultur die sekretierten Zytokine in unmittelbarer Nähe der Zelloberfläche ab³⁷⁹. Auf diese Weise wird sowohl die Verdünnung der in das Medium diffundierenden Zytokine, als auch die mögliche Bindung an Zelloberflächenrezeptoren sowie ein möglicher proteolytischer Abbau im Zellkulturüberstand unterbunden. Während diese Aspekte im ELISA des zellfreien Kulturüberstandes zu starken Zytokinkonzentrationsverlusten führen, erfasst der „trapping assay“ das volle Sekretionspotential der Zelle. Die kokubierten Magnetpartikel werden anschließend von den Zellen getrennt, mit einem fluoreszenzmarkierten Sekundärantikörper markiert und mit einem internen Standard durchflusszytometrisch gemessen. Der Messbereich ist über 3-5 Größenordnungen linear, für $\text{TNF}\alpha$ im Bereich von 5 pg/ml bis 100000 pg/ml, für IL-6 von 50 pg/ml bis 100000 pg/ml³⁸⁰. Laut Herstellerangabe weist die direkt in der Zellkultur eingesetzte „trapping“-Methode gegenüber dem nachgeschalteten Zytokinnachweis im zellfreien Zellkulturmedium mittels „trapping assay“ oder ELISA je nach Zytokin um den Faktor 5-10 ($\text{TNF}\alpha$, Granzyme B) bis Faktor 100 ($\text{IFN}\gamma$) höhere Zytokinkonzentrationen nach. Zusätzlich kann die eingesetzte Partikelzahl variabel an Volumen und Zytokinkonzentration angepasst und so unter Erhöhung der spezifischen Partikelbeladung bei reduzierter Partikelzahl eine höhere Sensitivität erzielt werden^{378,380}. Dieser „trapping assay“ scheint daher für den Nachweis von in nur geringen Konzentrationen aus Keratinozyten freigesetzten Zytokinen prädestiniert, zumal dank unterschiedlich fluoreszenzmarkierter Sekundärantikörper auch „multiplex“-Messungen durchführbar sind. Die in dieser Arbeit durch die niedrige Sensitivität der ELISA-Methode aufgetretenen Probleme würden durch die Verwendung des „trapping assay“ gelöst, weshalb er in Folgestudien eingesetzt werden sollte.

6.4.2.2 Reproduzierbarkeit und Wiederfindungsrate der Zytokinkonzentrationen in VOC-haltigem Medium

In der weiteren Qualitätskontrolle des ELISA-Messsystems wurde die Reproduzierbarkeit von Zytokinkonzentrationen identischer Proben im „intra-“ (Analyse innerhalb derselben ELISA-Platte) und „interassay“ (Analyse auf voneinander unabhängigen ELISA-Platten) überprüft. Die Qualitätsdaten wurden zunächst anhand der 24 h-Zellkulturüberstände aus den Vorversuchen erhoben. Anschließend wurden die Ergebnisse auch mit Konzentrationsdaten von 48 h-Zellkulturüberständen bestätigt.

Die niedrigen Streuungen der Einzelwerte um den Mittelwert von Mehrfachbestimmungen von 5,9 %, 13,3 % bzw. 15,4 % bezeugten die Zuverlässigkeit der Daten für IL-1 α , IL-6 und GM-CSF im „intraassay“. Die Herstellerangabe von einem Variationskoeffizienten kleiner 10 % für die „intraassay“-Reproduzierbarkeit des ELISA (vergleiche Tabelle 28) wurde hier annähernd erreicht. In die Berechnung der IL-1 α Konzentrationsstreuung waren zum großen Teil Werte in der Größenordnung kleiner der Erfassungsgrenze eingegangen, worin die geringfügig höhere Standardabweichung (15,4 %) begründet lag.

Die Wiederfindungsrate definierter Zytokinkonzentrationen in mit unterschiedlichen Konzentrationen von Toluol/m-Xylol-angereichertem Medium von 95 % war gegenüber der Reproduzierbarkeit identischer Proben ohne VOC unverändert, so dass Toluol und m-Xylol als mögliche Störfaktoren für den ELISA ausgeschlossen werden konnten.

Wie zu erwarten war die relative Streuung der Zytokinkonzentrationen identischer Zellkulturüberstände im „interassay“ größer als im „intraassay“. Die Herstellerangabe von einem Variationskoeffizient von kleiner 10 % (vergleiche Tabelle 28) wurde um den Faktor 3 bis 4,5 nicht erreicht. Das Verhältnis der Zytokinkonzentrationen vor und nach Exposition jeweils innerhalb einer Platte blieb mit einem Variationskoeffizienten von 15 % hingegen auch im „interassay“ relativ konstant. Da die „interassay“-Daten an unterschiedlichen Tagen erhoben wurden, war zu beachten, dass zusätzlich die Lagerstabilität der Zytokine im Zellkulturmedium bei -80°C sowie deren mehrfaches Auftauen und Einfrieren als wesentlicher Faktor in den „interassay“ mit eingingen.

Im Vergleich zur „interassay“-Reproduzierbarkeit der Zytokinkonzentrationen identischer Proben war der zeitabhängige Effekt auf die photometrische Bestimmung der

Zytokinkonzentrationen - mit einer Streuung von im Mittel 4,1 % über vier mal drei Minuten - als gering einzuschätzen. Auch eine noch stärkere zeitliche Standardisierung in der Durchführung der ELISA-Auswertungen hätten also keine wesentlich geringeren „interassay“-Standardabweichungen erzielt.

Als Schlussfolgerung aus der Qualitätskontrolle bezüglich „intra“- und „interassay“-Reproduzierbarkeit der 24 h-Proben aus den Vorversuchen wurden alle abhängigen 48 h-Proben der VOC-Expositionsversuche, z. B. die identischer Zellkulturen vor und nach Exposition, ausschließlich innerhalb derselben ELISA-Platte bestimmt. Zusätzlich wurden die bei - 80°C gelagerten Proben generell nur einmal aufgetaut und alle Parameter direkt im Anschluss bestimmt. Unter diesen Voraussetzungen erwies sich der Zytokin-ELISA im Hinblick auf die Reproduzierbarkeit und Wiederfindungsrate von Zytokinkonzentrationen in VOC-haltigem Medium als geeignete und zuverlässige Nachweismethode.

6.4.2.3 Reproduzierbarkeit von Expositionsexperimenten und Zytokinfreisetzung

Weiterführende Untersuchungen zur Qualitätssicherung beurteilten zusätzlich zur Reproduzierbarkeit des Messsystems die Reproduzierbarkeit der Expositionsexperimente zum einen seitens der Expositionsapparatur, zum anderen bedingt durch biologische Aspekte, wie z. B. die individuelle natürliche Streuung der sekretierten Zytokinkonzentrationen. Hierfür wurden Wiederholmessungen von (1) Proben aus derselben Zellsuspension in identischem Expositionsversuch, (2) unabhängigen Zellsätzen desselben Individuums in vergleichbarem Expositionsversuch und (3) Proben aus vergleichbaren Expositionsversuchen unterschiedlicher Individuen derselben Fallgruppe durchgeführt. Zusammengefasst bewies die Reproduzierbarkeit der in den Wiederholungsversuchen freigesetzten Zytokinkonzentrationen einerseits reproduzierbar konstante und homogene Expositionsbedingungen sowie andererseits eine individuenspezifisch unterschiedlich große intraindividuelle und hohe interindividuelle natürliche Streuung:

ad (1): Die Streuung der vor und nach identischem Expositionsversuch gemessenen Zytokinkonzentrationen von Doppelansätzen derselben Zellsuspension stimmte mit der aus Mehrfachmessungen identischer Proben ermittelten Messungengenauigkeit des

ELISA-Analysesystems von 10-15 % überein. D. h.: 1. Die Streuung beruhte nahezu gänzlich auf dem methodischen Messfehler. 2. Vergleichbare Zellansätze setzten unter identischen Expositionsbedingungen gleiche Zytokinkonzentrationen frei. Diese hohe Reproduzierbarkeit sekretierter Zytokinkonzentrationen vergleichbarer Doppelansätze wurde sowohl für Spontansekretionen als auch unabhängig von der Expositionsart und -dauer und unabhängig von der Platzierung in der Zellkulturplatte erzielt. Dies bewies das Vorliegen konstanter, homogener Expositionsbedingungen in der gesamten Expositions-kammer wie auch eine vergleichbare Experimentdurchführung. Dieses Ergebnis konvenierte mit der in den Zellkulturmedien identischer Expositionsversuche – bei einer GC-methodischen Messungengenauigkeit von 10 % – ermittelten Streuung der VOC-Konzentrationen von 14,4 %. Schließlich führten die Doppelansätze zu einer größeren statistischen Genauigkeit der ermittelten Zytokinkonzentrationswerte.

ad (2): Im Vergleich zu den Doppelansätzen zeigten die unabhängigen intraindividuellen Wiederholungsexperimente *im Mittel* um den Faktor 3 (nach Exposition) bzw. 5 (vor Exposition) höhere relative Standardabweichungen um den Mittelwert, *individuell* waren jedoch stark unterschiedliche Schwankungen (von 8,8 % bis 133,4 %) feststellbar. Anteilig lagen diese vermutlich in zunächst geringfügig unterschiedlichen Zellzahlen der Ausgangszellsuspensionen begründet, die aufgrund der begrenzten Genauigkeit der Methode zur Zellzahlbestimmung unvermeidbar waren. Proliferationsbedingt vergrößerten sich diese Unterschiede anschließend exponentiell mit der Versuchsdauer, weshalb die aufgrund der Quantifizierbarkeit verlängerten Inkubationszeiten zu größeren Zellzahlschwankungen führten. Eine weitere denkbare Ursache, ein leicht abweichendes Proliferationsverhalten unterschiedlicher Passagen der Zellkulturen, war in der Studie berücksichtigt worden: Das Vorkommen unterschiedlich stark differenzierter Zellen repräsentierte zwar natürliche Bedingungen in der Haut, um jedoch weitestgehend vergleichbare Ergebnisse zu erzielen, wurden nur Zellen der Passagen 2-4 in den Expositionsexperimenten eingesetzt. Vorversuche hatten ein weitestgehend vergleichbares Proliferationsverhalten dieser Passagen ergeben (vergleiche Abbildung 6, Kapitel 5.1.4), so dass eine weitere Einschränkung des Einsatzbereichs von Zellpassagen keine wesentlich höhere Reproduzierbarkeit versprach. Darüber hinaus wies die beobachtete, extreme interindividuelle Streuung der intraindividuellen Reproduzierbarkeiten (ad 3) insbesondere auf eine unterschiedlich starke intraindividuelle natürliche Streuung der spontanen Zytokinfrei-

setzung zwischen unterschiedlichen Individuen hin. Diese individuenspezifische, intraindividuelle natürliche Streuung zeigte sich unabhängig von der Höhe der eingesetzten Zellpassagen. Sowohl nach Spontansekretion als auch nach der Exposition zeigten einzelne Individuen unabhängig von den durchgeführten Experimenten mit VOC oder Kontrollexpositionen mit synthetischer Luft auffällig hohe bzw. niedrige Zytokinkonzentrationen sowie unabhängig davon auffällig hohe bzw. niedrige intraindividuelle Standardabweichungen. Im Mittel waren die Standardabweichungen nach den Expositionsversuchen aber niedriger als in der Spontanexposition (30,3 % zu 50,6 %): Einerseits wurden in der Auswertung pro Expositionsvariable weniger Fallzahlen pro Individuum zusammengefasst, woraus eine zufällig niedrigere Streuung resultieren könnte. Andererseits könnte ein VOC-Expositionseffekt oder aber ein genereller Inkubationszeiteffekt zu vergleichbaren Zytokinkonzentrationen führen. Analoge Ergebnisse fanden sich bei *Pastore et al.*³⁶⁷: Die intraindividuelle GM-CSF-Spontansekretion von je drei Keratinozytenkulturen desselben Probanden streute interindividuell unterschiedlich stark. Nach Stimulation der Zytokinfreisetzung wiesen die GM-CSF-Konzentrationen pro Individuum jedoch vergleichbare, niedrigere relative Varianzen auf. Explizite Beschreibungen von ähnlich auffälligen, bzw. generell Angaben oder Diskussion von intraindividuellen Varianzen von Zytokinkonzentrationen in Wiederholungsexperimenten wurden in der Literatur nicht gefunden.

ad (3): Weitere Hinweise auf extreme Individuenspezifitäten bezüglich der Spontan- und Expositionsfolgefreisetzung von Zytokinen gaben die interindividuellen Wiederholungsexperimente innerhalb einer Fallgruppe. Denn die in Relation zur intraindividuellen Reproduzierbarkeit um den Faktor zwei höheren Varianzen konnten nicht ausschließlich mit Zellzahlschwankungen in der Zellaussaat und abweichendem Proliferationsverhalten der Keratinozyten unterschiedlicher Individuen erklärt werden. Auch hier waren unabhängig von den durchgeführten Experimenten im Mittel die Standardabweichungen nach den Expositionsversuchen niedriger als in der Spontanexposition (62,8 % zu 105,4 %), was ebenfalls in der geringeren Individuenanzahl pro Expositionsvariable bzw. in einer Auswirkung der Kulturdauer nach Zellaussaat auf die Zytokinfreisetzung begründet liegen kann. Eine vergleichbar hohe interindividuelle Streuung in der Sekretion von unterschiedlichen Zytokinen, u. a. von GM-CSF und IL-1 α , war auch anderen Publikationen zu entnehmen^{365,367} (vergleiche Kapitel 6.4.4, ad 1 und 2), wurde aber nirgends explizit diskutiert.

6.4.3 Individuenspezifität in der Spontansekretion – Auswirkungen auf die statistische Datenanalyse

6.4.3.1 Auswirkungen auf die statistische Analyse des Spontansezernierungsverhaltens humaner Keratinozyten

In der detaillierten Analyse der Spontansekretion von GM-CSF, IL-1 α und IL-6 wurden – um Ausreißer weniger stark zu gewichten und auch die qualitativen Konzentrationsdaten angemessen mit einbeziehen zu können – anstatt der arithmetischen Mittelwerte die intraindividuellen Mediane der Zytokinkonzentrationen verglichen. Dabei wurden die bereits in der Qualitätskontrolle zur Reproduzierbarkeit konstatierten extremen interindividuellen Unterschiede im Spontansezernierungsverhalten von Keratinozyten insbesondere für die Zytokine GM-CSF und IL-6 bestätigt. Während einzelne Individuen in allen Einzelmessungen auffällig hohe bzw. niedrige Zytokinkonzentrationen zeigten, wiesen andere hohe intraindividuelle Schwankungen auf. Um diese Beobachtung mittels einer Einweg-Varianzanalyse statistisch sicher beurteilen zu können, mussten das Studiendesign, die Häufigkeitsverteilung und die statistische Zuverlässigkeit der Konzentrationswerte berücksichtigt werden: Während der Planung der Expositionsexperimente war angenommen worden, dass trotz der zu erwartenden interindividuellen Variabilität (vergleiche Kapitel 6.4.4 ad 1 und 2)^{365,367} – die Literaturangaben bezogen sich auf 2 bis maximal 8 Individuen – die in der Expositionsstudie eingesetzten 9 bzw. 19 Individuen einer Fallgruppe weitestgehend homogene Einheiten bilden würden. Unter dieser Voraussetzung schien es legitim, aufgrund der schwierigeren Rekrutierung von Probanden mit atopischem Ekzem und deswegen selteneren Zellkulturen aus atopischer Haut verschieden starke Fallgruppen zu bilden. Folglich wurden die Individuen in den Expositionsversuchen unterschiedlich häufig eingesetzt. Die experimentellen Ergebnisse zeigten jedoch eine bezüglich der Zytokinfreisetzung extrem ausgeprägte Individuenspezifität. Unter diesen Bedingungen wurde die Häufigkeitsverteilung der Zytokinkonzentrationen durch die unterschiedlich häufig in die Verteilung eingehenden Individuen stark beeinflusst, so dass keine repräsentative Verteilung der Grundgesamtheit angenommen werden konnte. Weiterhin ausschlaggebend für die Wahl der nonparametrischen Datenauswertung in Form eines Kruskal-Wallis-Rangsummentests war die Möglichkeit, auch die qualitativen Daten ohne die Gefahr der Überinterpretation, ihrer Wertigkeit gemäß in die Auswertung mit einzubeziehen. Im Fallgruppenver-

gleich wurde schließlich durch Zusammenfassen der intraindividuellen Zytokinfreisetzungen der Einfluss aller Individuen auf die Fallgruppen normalisiert.

6.4.3.2 Auswirkungen auf die statistische Analyse von VOC-Effekten auf die Zytokinseznernierung von humanen Keratinozyten

Mit Ausnahme der Spontansekretion von IL-1 α durch Keratinozyten der Fallgruppe nicht läasionales, atopisches Ekzem wies die statistische Analyse für alle Zytokine und Fallgruppen statistisch hochsignifikant individualspezifische Zytokinkonzentrationen, gleichbedeutend mit einer weit gestreuten, heterogenen Verteilung innerhalb der Fallgruppen, nach. Eine Blockbildung von Individuen mit gleichermaßen auffällig hohen oder niedrigen Zytokinkonzentrationen innerhalb einer Fallgruppe war aufgrund der stark unterschiedlichen intraindividuellen Streuung (diskutiert in Kapitel 6.4.2.3 ad (2)) über einen insgesamt breiten Konzentrationsbereich nicht möglich. Diese ausgeprägten natürlichen Schwankungen wirkten sich wesentlich auf die Methodenauswahl der statistischen Datenanalyse aus: Das bei unterschiedlicher Individuenstärke pro Fallgruppe und Expositionsvariable mit je mindestens fünf Experimenten pro Expositionsvariable und Fallgruppe vollständig faktoriell geplante Studiendesign setzte die Bildung homogener Fallgruppen voraus. Durch die festgestellte, ausgeprägte Individualspezifität war dieses Studiendesign jedoch nicht mehr vollständig faktoriell und balanciert und somit nicht ausreichend informativ. Die erhobenen Studiendaten mussten nun individuenbezogen ausgewertet werden, was eine Variablenzunahme bei gleichzeitig reduzierter Fallzahl pro Variable zur Folge hatte. Aufgrund der unzureichenden Quantifizierbarkeit der vielfach niedrigen Zytokinkonzentrationen mussten zusätzlich qualitative und quantitative Daten getrennt analysiert werden, wodurch die Fallzahl pro Analyse weiter reduziert wurde. Aus diesen Gründen konnte der Gesamtdatensatz nicht in einer konventionellen Varianzanalyse (ANOVA) statistisch zuverlässig ausgewertet werden. Es resultierte ein enormer statistischer Aufwand. Doch wurde durch die Durchführung verschiedener, der Datenstruktur angepasster und einander ergänzender statistischer Analysemethoden schließlich eine bestmöglich detaillierte Auswertung der erhobenen Daten erzielt. Dennoch konnten einzelne Fragestellungen, u. a. expositionsbedingte Interaktionseffekte, nicht statistisch zuverlässig ausgewertet werden. Gleichzeitig waren potentiell VOC-induzierte Effekte nicht groß genug, um in nonparametrischer bzw. qualita-

tiver Auswertung deutlich zu werden. Abschließend wurden die Spontanfreisetzungsdaten der Pilotstudie zu einer Fallzahlabeschätzung („power analysis“) für ein sinnvolles Folgestudien-Versuchsdesign herangezogen (vergleiche Kapitel 6.4.6).

6.4.4 Individuenspezifität, Fallgruppenunterschiede und Korrelationen – Biologische Aspekte der Spontansekretion

Zum Spontansezernierungsverhalten der Keratinozyten ließen sich vier wesentliche Beobachtungen wie folgt zusammenfassen:

1. Innerhalb der Fallgruppen wurden einige hohe intraindividuelle, aber vor allem extreme interindividuelle Unterschiede im Hinblick auf die Spontanfreisetzung der Zytokine GM-CSF, IL-1 α – mit Ausnahme der Fallgruppe atopisch nicht läsional – und IL-6 festgestellt und erstmals explizit beschrieben.
2. Die Zytokinspontansezernierung von Primärkeratinozyten aus gesunder Haut sowie aus läsionaler bzw. nicht läsionaler Haut von Probanden mit atopischem Ekzem unterschied sich nicht signifikant voneinander. Tendenziell wurden jedoch erhöhte Sekretion von IL-6 und GM-CSF aus Keratinozyten aus läsionaler und nicht läsionaler Haut atopischen Ekzems im Vergleich zu Keratinozyten aus pathologisch unauffälliger Haut konstatiert. Die Freisetzung von IL-1 α war vergleichsweise unverändert. In der Literatur wurden bisher für Keratinozyten aus nicht läsionaler Haut von Probanden mit atopischem Ekzem erhöhte Spontanfreisetzungen u. a. von IL-1 α und GM-CSF beschrieben. Literatur zum Zytokinspontansezernierungsverhalten von Keratinozyten aus läsionaler Haut des atopischen Ekzems ist nicht bekannt. Auch die Freisetzung von IL-6 aus Keratinozyten aus atopischem Ekzem wurde erstmals in der vorliegenden Arbeit untersucht.
3. In intraindividuellen Vergleichen von Keratinozyten aus läsionaler und nicht läsionaler Haut desselben Individuums wurden signifikante Unterschiede hinsichtlich der Freisetzung insbesondere von IL-1 α , aber auch von GM-CSF und IL-6 nachgewiesen und erstmals beschrieben. D. h., die in dieser Arbeit erstmals aus läsionalem atopischem Ekzem isolierten Primärkeratinozyten unterschieden sich signifikant von aus nicht läsionaler Haut isolierten Zellen desselben Probanden.
4. Im Hinblick auf die Sekretion unterschiedlicher Zytokine wurden folgende Korrelationen festgestellt: Bei Keratinozyten nicht atopischer Probanden korrelierte die Freisetzung der Zytokine GM-CSF und IL-6, bei Keratinozyten aus atopisch läsiona-

ler Haut hingegen die der Zytokine GM-CSF und IL-1 α . Der wechselseitige Einfluss von IL-1 α , IL-6 und GM-CSF auf Keratinozyten sowie Verknüpfungen entsprechender Signaltransduktionswege im Zytokinnetzwerk waren bekannt und unterstützten die nachgewiesene korrelierte Zytokinfreisetzung. Unterschiedliche Korrelationen in Keratinozyten gesunder und atopisch läsionaler Haut wurden bislang in der Literatur nicht explizit beschrieben.

ad 1 und 2: Zytokinspontanfreisetzung von Keratinozyten aus atopischem Ekzem und pathologisch unauffälliger Haut

Im Fallgruppenvergleich wurde durch Zusammenfassen der intraindividuellen Zytokinfreisetzungen der Einfluss aller Individuen auf die Fallgruppen normalisiert. Die Streuungen der gemittelten spontansekretierten Zytokinkonzentrationen der drei Fallgruppen erstreckten sich weitgehend über denselben Konzentrationsbereich. Das Spontansezernierungsverhalten der Keratinozyten unterschied sich daher nicht signifikant fallgruppenspezifisch. Folgende tendenzielle Gruppenunterschiede wurden jedoch festgestellt: Die Keratinozyten der Fallgruppen atopisches Ekzem sezernierten höhere Konzentrationen von GM-CSF und IL-6 im Vergleich zu normalgesunder Haut (um den Faktor 2 bis 2,5 höherer Median). Die Spontanfreisetzung von IL-1 α war hingegen fallgruppenunabhängig.

GM-CSF

Der festgestellte Trend zu erhöhter GM-CSF-Sekretion aus Keratinozyten aus atopischem Ekzem wird durch eine Reihe von Literaturdaten bestätigt: Die Epidermis wie auch die Dermis läsionaler Ekzemhaut weist *in vivo* im Vergleich zu gesunder Haut bzw. nicht läsionaler Atopikerhaut eine höhere GM-CSF-Expression auf^{367,381}. *Pastore und Girolomoni* beschrieben wiederholt eine *in vivo* sowie *in vitro* erhöhte konstitutive GM-CSF-Freisetzung von Keratinozyten in bzw. aus atopischem Ekzem^{365,367,382}. *In vitro* vermögen Kulturüberstände von Keratinozyten aus nicht läsionaler Haut von Probanden mit atopischem Ekzem GM-CSF-vermittelt die Proliferation sowie, unter Zugabe von IL-4, die Reifung von Monozyten zu dendritischen Zellen zu stimulieren³⁶⁷. Daher wird postuliert, dass aus Keratinozyten freigesetztes GM-CSF wesentlich an der erhöhten Anzahl aktivierter und antigenpräsentierender epidermaler Langerhanszellen im atopischen Ekzem^{215,218,222}

und somit ursächlich an der Etablierung und Chronifizierung des läSIONalen atopischen Ekzems beteiligt ist³⁶⁷. Durch die Reduzierung der Spontanapoptoserate führt GM-CSF zudem zu einem verlängerten Überleben von Monozyten in der atopischen Epidermis³⁸¹. Eine erhöhte Freisetzung von GM-CSF erklärte somit auch die Zusammensetzung und Intensität von inflammatorischen Infiltraten in allergischen Erkrankungen³⁸¹.

Mit der hier vorliegenden Arbeit vergleichbare *in vitro*-Untersuchungen zur Freisetzung von GM-CSF aus Keratinozyten von Probanden mit atopischem Ekzem wurden ausschließlich von *Pastore* und Mitarbeitern durchgeführt und publiziert. Sie ermittelten – bezogen auf 10^6 Zellen und 48 h – GM-CSF-Spontansekretionen von kleiner 10 pg/ml bis 20 pg/ml in sechs Keratinozytenkulturen aus normal gesunder Haut. Demgegenüber setzten Keratinozytenkulturen aus nicht läSIONaler Haut von acht Probanden mit atopischem Ekzem individuenspezifisch GM-CSF-Konzentrationen zwischen kleiner 10 pg/ml und 360 pg/ml frei³⁶⁷. Dabei war die in der Fallgruppe atopisches Ekzem ermittelte interindividuelle Varianz der sekretierten Zytokinkonzentrationen den in der vorliegenden Arbeit nachgewiesenen Streuungen etwa vergleichbar. Trotz dieser hohen Streuungen führten bei *Pastore et al.* jedoch selbst die niedrigen Fallzahlen zu statistisch signifikanten Aussagen, da die großen Unterschiede im Zytokinsezernierungsverhalten der Keratinozyten zwischen den Fallgruppen eine ausreichende statistische „power“ gewährleisteten^{365,367}. In den vorliegenden Untersuchungen streute hingegen auch die Spontanfreisetzung aus Keratinozyten gesunder Haut über einen größeren Konzentrationsbereich, so dass sich keine statistisch signifikanten Fallgruppenunterschiede ergaben. Jedoch zeichnete sich auch hier ein Trend zu erhöhter GM-CSF-Freisetzung in Keratinozyten aus atopischem Ekzem ab: Der Median in der Fallgruppe normal gesunde Haut betrug 9,9 pg/ml freigesetztes GM-CSF gegenüber 21,9 pg/ml bzw. 22,1 pg/ml in den Fallgruppen läSIONale bzw. nicht läSIONale Haut. Die Ursachen der hier ermittelten, größeren interindividuellen Streuung im Zytokinsezernierungsverhalten normal gesunder Keratinozyten sind unklar. Gegen eine eventuelle unspezifische Stimulation durch die in der vorliegenden Studie gewählten *in vitro* Zellkulturbedingungen spricht, dass einige der normal gesunden Keratinozytenkulturen in derselben Studie unter identischen Kulturbedingungen ausschließlich sehr niedrige Zytokinkonzentrationen freisetzten. In der vorliegenden Arbeit wurde eine dreifach größere Fallzahl eingesetzt als in der zitierten Studie. Statistisch gesehen tragen kleine Stichproben prinzipiell ein größeres Bias-

Risiko. D. h., dass – vorausgesetzt die Probanden beider Studien wurden gleichermaßen zufällig und repräsentativ ausgewählt – die aus der in den VOC-Expositionsversuchen eingesetzten, größeren Stichprobe ermittelte, größere individuelle Streuung die zugrundeliegende Verteilung der Fallgruppe mit höherer statistischer Wahrscheinlichkeit präziser darstellte.

Interleukin 1 α

Interleukin 1 α wird in gesunden, humanen Keratinozyten *in vivo* wie *in vitro* konstitutiv exprimiert, sequestriert sowie sezerniert^{87,88,383,384}. Die in der Literatur publizierten *in vitro* Spontansekretionsdaten von IL-1 α aus humanen Keratinozyten unterscheiden sich wesentlich voneinander: *Pastore et al.* wiesen in Relation zu Keratinozyten sechs gesunder Probanden (15,9 +/- 7,4 pg/ml·10⁶ Zellen·48 h) eine individuell weit gestreute, im Mittel erhöhte Spontanfreisetzung von IL-1 α aus Keratinozyten nicht läsionaler Haut von sechs Probanden mit atopischem Ekzem (105,3 +/- 110,7 pg/ml·10⁶ Zellen·48 h) nach³⁶⁵. Dagegen ermittelten *Shinoda et al.* aus unstimulierten Keratinozyten gesunder Haut über 24 h eine weit höhere IL-1 α -Spontansekretion von im Mittel 45 pg/ml³⁸⁵. Die Streuung um den Mittelwert war hier nicht angegeben. Die in den VOC-Expositionsversuchen ermittelten Konzentrationen von spontan sekretiertem IL-1 α streuten in allen drei Fallgruppen in einem mittleren Konzentrationsbereich (Mediane 32,8 pg/ml, 25,9 pg/ml bzw. 38,9 pg/ml in 48 h, vergleiche Tabelle 16, Seite 141) und unterschieden sich daher nicht signifikant. Dabei wies die Fallgruppe atopisch nicht läsionale Haut eine auffallend homogene Struktur mit nur geringer interindividueller Streuung auf. Die statistische Analyse der arithmetischen Mittelwerte von je vier Zufallswerten ergab hingegen einen schwachen Trend zu erhöhter IL-1 α -Sekretion aus Keratinozyten der atopischen Fallgruppen, unterstützt durch den Nachweis einer signifikant erhöhten IL-1 α -Freisetzung der Fallgruppe atopisch nicht läsional gegenüber der Fallgruppe gesunde Haut (vergleiche Kapitel 6.4.6). Diese Beobachtung entsprach den Ergebnissen von *Pastore et al.*³⁶⁵. Für eine statistisch signifikante Aussage müssen jedoch Folgeexperimente mit einer größeren Probandenzahl durchgeführt werden (vergleiche Kapitel 6.4.6).

Das *in vitro*-Sezernierungsverhalten von Keratinozyten aus läsionalem atopischem Ekzem wurde im Rahmen dieser Arbeit erstmals untersucht: Im Vergleich der atopischen Fallgruppen ergab sich kein signifikanter Unterschied. Die IL-1 α -Freisetzung der Keratinozyten läsionalen und nicht läsionalen Ursprungs desselben Probanden

war hingegen bei sechs von sieben Individuen hoch signifikant divergent. Diese Divergenz zeigte jedoch keine bevorzugte Richtung: In je drei Fällen setzten die Zellen läsionalen Ekzems bzw. nicht läsionaler Haut signifikant erhöht IL-1 α frei. Ein assoziierter gemeinsamer, eventuell kausaler Phänotyp war nicht erkennbar. Auch um diese Beobachtung weiter zu untersuchen, bedarf es daher einer Folgestudie mit erweiterter Probandenzahl. Eine entsprechende Gegenüberstellung der *in vivo* IL-1 α -Expression in läsionalem Ekzem und in nicht läsionaler, atopischer Ekzemhaut wurde in der Literatur nicht gefunden.

Für die heterogenen *in vitro* Ergebnisse in unterschiedlichen Studien könnte neben dem oben erläuterten Bias aufgrund der jeweils untersuchten Stichprobengröße eine von den jeweiligen Zellkulturbedingungen abhängige, unspezifische Stimulation der IL-1 α -Sekretion sowie der Einsatz von auf unterschiedlichen Antikörpern basierenden Nachweissystemen verantwortlich sein. Eine weitere, wahrscheinliche Ursache ist die Abhängigkeit der IL-1 α - bzw. IL-1 α -Rezeptor (IL-1 α -R)-Produktion vom Differenzierungsstatus, d. h. Alter und Konfluenz, der jeweils eingesetzten Keratinozytenkulturen^{91,386}. In den VOC-Expositionsversuchen wurden proliferierende, subkonfluente Kulturen der Passagen 2-4 eingesetzt. In der zitierten Literatur fanden sich diesbezüglich keine Angaben. Die messbare IL-1 α -Freisetzung aus *in vitro* aktiv proliferierenden Keratinozyten ist deutlich höher als die konfluenter Zellen^{387,388}, wobei die niedrigeren IL-1 α -Konzentrationen im Zellkulturüberstand differenzierter Keratinozyten nicht nur auf einer niedrigeren Sekretionsrate sondern auch auf einer intensiven Sequestrierung des sekretierten IL-1 α an IL-1 α -Rezeptoren beruhen³⁸⁶. Dabei sind keratinozytenmembranständige, funktionelle TypI-IL-1 α -Rezeptoren von nicht funktionellen, potentiell abspaltbaren TypII-IL-1 α -Rezeptoren zu unterscheiden³⁸⁹: Letztere werden sowohl *in vivo* als auch *in vitro* häufig unter IL-1 α -induzierenden Bedingungen exprimiert³⁹⁰. IL-1 α -RII bindet freigesetztes IL-1 α ohne weitere Signaltransduktion und inhibiert auf diese Weise lokal IL-1 α -induzierte Mechanismen ohne eine systemische Auswirkung³⁸⁹. Die Expression der funktionellen IL-1 α -RI-Rezeptoren wird hingegen im Verlauf der Keratinozytendifferenzierung hochreguliert^{391,392}. Dies gilt auch für die intrazelluläre Expression des IL-1 α -Rezeptorantagonisten (IL-1RA), der kompetitiv an IL-1 α -Rezeptoren bindet, ohne diese jedoch zu aktivieren³⁸⁶. Hier liegt ein komplexer Regulationsmechanismus vor, der die Bioaktivität des konstitutiv exprimierten Interleukin 1 α über ein Agonist/Antagonisten-

Verhältnis steuert³⁹³. Dieses Gleichgewicht beeinflusst neben der Keratinozytenproliferation und -differenzierung³⁹¹ insbesondere das inflammatorische Potential von IL-1 α in der Haut^{394,395}. Im transgenen Mausmodell erwies sich der Expressionslevel von IL-1 α und dem funktionellen IL-1 α -RI als Kontrollpunkt in der physiologischen IL-1 α -vermittelten autokrinen Signaltransduktion: Ist dieser erhöht, kommt es zu erhöhter epidermaler GM-CSF-Freisetzung, dermaler Infiltration inflammatorischer Zellen sowie zur Ausbildung inflammatorischer Ekzeme mit epidermaler Hyperplasie³⁹⁶. Eine Reihe inflammatorischer Hauterkrankungen wie das atopische Ekzem, Psoriasisläsionen³⁹⁵ und Sonnenbrand werden durch ein erhöhtes epidermales IL-1RA zu IL-1 α -Verhältnis charakterisiert, wobei IL-1 α zumeist niedriger exprimiert wird als normal³⁹⁷. Andererseits beschreiben *Pastore et al.* - in Übereinstimmung mit den Erkenntnissen aus dem transgenen Mausmodell - signifikant erhöhte IL-1 α - und IL-1RA-Konzentrationen im Zellkulturüberstand nicht läsionaler Keratinozytenkulturen aus atopischem Ekzem bei gegenüber Keratinozyten gesunder Haut unverändertem IL-1RA/IL-1 α -Verhältnis³⁶⁵.

IL-1 α induziert u. a. die Expression und Freisetzung von GM-CSF und IL-6 aus Keratinozyten¹⁰⁰. Die Ergebnisse der in den VOC-Expositionsversuchen im Zellkulturüberstand ermittelten IL-1 α -Konzentrationen lassen vermuten, dass der im atopischen Ekzem nachgewiesenen IL-6- und GM-CSF-Erhöhung keine erhöhte IL-1 α -Freisetzung voraus ging. Mögliche Unterschiede im IL-1 α -Regulationsmechanismus wurden dabei jedoch nicht untersucht. Trotz vergleichbarer, im Zellkulturüberstand messbarer IL-1 α -Konzentrationen könnten diese aber durch heterogene Expression von funktionellen (IL-1 α -RI) und inaktiven Rezeptoren (IL-1 α -RII) bzw. Rezeptorantagonisten (IL-1RA) unterschiedlich auf gesunde und atopische Keratinozyten wirken. Um die Aktivität von Interleukin 1 α im atopischem Ekzem zuverlässig beurteilen zu können, sollten daher in Folgeexperimenten alle beteiligten Faktoren des IL-1 α -Regulationskomplexes untersucht werden.

Interleukin 6

Interleukin 6 wird von Keratinozyten pathologisch unauffälliger Haut konstitutiv kaum exprimiert³⁹⁸. Erst eine Verletzung der Haut oder Störung hautphysiologischer Prozesse durch z. B. UV-B Strahlung, Viren und Bakterien sowie lokale oder systemische (Auto-)Immunerkrankungen induzieren eine verstärkte IL-6-Expression in einer

Reihe unterschiedlicher Zelltypen der Dermis wie auch in den Keratinozyten der Epidermis³⁹⁹. In gesunder Haut zeigen ausschließlich proliferative Basalzellen, jedoch keine weiter differenzierten Keratinozyten, eine äußerst schwache konstitutive IL-6-Expression^{111,400,401}. Auch *in vitro* färben nur 40 % der im subkonfluenten Monolayer kultivierten Keratinozyten aus normalgesunder Haut immunzytologisch IL-6-positiv¹¹¹. Entsprechend niedrig ist die IL-6-Aktivität im Überstand unstimulierter Keratinozyten⁴⁰²: So beträgt die mittels ELISA über 24 h aus Keratinozyten gesunder Haut nachgewiesene mittlere IL-6-Spontansekrektion etwa 5 pg/ml³⁸⁵. Die in den VOC-Expositionsversuchen mit einem Median von 3,0 pg/ml bzw. einem arithmetischen Mittel von 8,7 pg/ml (vergleiche Kapitel 6.4.6) überwiegend sehr niedrigen, über 48 h Kulturzeit spontanssekretierten IL-6-Konzentrationen stimmten mit diesen Beobachtungen annähernd überein. Keratinozytenkulturen von 5 der 19 hautgesunden Probanden wiesen bei gleichzeitig niedriger intraindividuelle Varianz eine leicht erhöhte mittlere IL-6-Spontansekrektion von mehr als 10 pg/ml auf. Dies deutete, der Freisetzung von GM-CSF vergleichbar, auf ein individuumspezifisches Keratinozytensekernierungsverhalten hin, das für IL-6 in der Literatur bislang nicht explizit beschrieben wird. Dieselben Keratinozytenkulturen dieser Probanden zeigten zugleich eine überdurchschnittlich hohe GM-CSF-Spontanfreesetzung. Dies konnte jedoch nicht als Hinweis auf eine latente inflammatorische oder immunologische Reaktion in der Haut dieser als „hautgesund“ diagnostizierten Probanden interpretiert werden, da die IL-1 α -Spontansekernierung dieser Zellkulturen unauffällig war.

Zwar sind in der Literatur eine Reihe von Untersuchungen mit dem Ergebnis signifikant erhöhter IL-6-Sekretion aus T-Zellen und Monozyten (PBMC) von Probanden mit atopischem Ekzem beschrieben^{403,404}. Auch finden sich, aufgrund positiven IL-6-Nachweises *in situ*, immer wieder Hinweise auf die Bedeutung der IL-6-Freisetzung aus Keratinozyten im atopischen Ekzem^{405,406}. Der diesbezügliche Forschungsbedarf wird in der Literatur wiederholt betont, explizite *in vitro* Untersuchungen zur Sekretion von IL-6 aus Keratinozyten aus atopischem Ekzem wurden jedoch bislang nicht durchgeführt bzw. nicht veröffentlicht⁴⁰⁵. Die Ergebnisse der VOC-Expositionsversuche zeigten daher erstmals einen Trend zu erhöhter konstitutiver IL-6-Sekretion aus Keratinozyten aus atopischem Ekzem. Dies galt sowohl für die Zellen aus läSIONALEM Ekzem (Median 7,3 pg/ml) wie auch für solche aus nicht läSIONALER Haut (Median 7,4 pg/ml). Für letztere ergab sich in der statistischen Analyse der arithmetischen Mittel von je vier Zufallswerten gegenüber der Fallgruppe gesunde

Haut sogar statistisch signifikant ($p < 0,05$) sowie annähernd signifikant erhöhte IL-6-Freisetzung (vergleiche Kapitel 6.4.6). IL-6 führt zu Makrophagenaktivierung sowie, zusammen mit dem Stammzellofaktor/c-Kit-Ligand, zur Mastzellendifferenzierung⁴⁰⁷. Eine Überexpression und erhöhte Freisetzung von IL-6 in der Epidermis könnte somit zu Auslösung und Manifestation des atopischen Ekzems beitragen, zumal *in situ* in der Epidermis von Patienten mit atopischem Ekzem Mastzellen nachgewiesen und deren Beitrag zur Pathogenese des atopischen Ekzems postuliert wurden^{385,408,409}.

ad 3: Signifikante Unterschiede im Sezernierungsverhalten von Keratinozyten aus läSIONALEM Ekzem und aus nicht läSIONALER Haut desselben Probanden

In der vorliegenden Arbeit wurden erstmals Primärkeratinozyten aus läSIONALEM Ekzem *in vitro* kultiviert und untersucht. Vorrangige Fragen waren daher:

1. Repräsentierten die Keratinozytenkulturen aus läSIONALEM atopischen Ekzem tatsächlich läSIONALE Ekzemkeratinozyten, oder waren ausschließlich einige wenige nicht läSIONALE Zellen aus der Hautprobe zu der Kultur herangewachsen? Träfe letzteres zu, erwartete man den Zellkulturen aus nicht läSIONALER Haut vergleichbare Keratinozytenkulturen. Die Kulturen aus läSIONALER und nicht läSIONALER Haut derselben Probanden unterschieden sich jedoch signifikant in ihrem Zytokinfreisetzungsverhalten: Sechs von sieben Individuen zeigten ein signifikant unterschiedliches Sezernierungsverhalten von Keratinozyten aus läSIONALER und nicht läSIONALER Haut für IL-1 α , je zwei von sieben für IL-6 und GM-CSF. D. h., es wurden wirklich Keratinozyten läSIONALEN bzw. nicht läSIONALEN Ursprungs getrennt voneinander kultiviert.

2. Repräsentierten die *in vitro* Keratinozytenkulturen das *in vivo* bzw. *in situ*-Verhalten läSIONALER und nicht läSIONALER Epidermis? Die vorliegende Arbeit verglich erstmals die *in vitro* Zytokinsezernierung von Keratinozyten aus läSIONALER und nicht läSIONALER Haut desselben Probanden. *In vitro*-Referenzdaten hierzu existieren daher nicht. Bekannt war hingegen eine *in situ* erhöhte Zytokinexpression von GM-CSF in akutem sowie vor allem in chronisch läSIONALEM Ekzem im Vergleich zur nicht läSIONALEN Haut von Patienten mit atopischem Ekzem³⁶⁷. *In vitro* Untersuchungen an humanen Keratinozyten ergaben davon abweichende Ergebnisse: So wiesen *Pastore* und Mitarbeiter zwar *in situ* eine erhöhte zytoplasmatische GM-CSF-Reaktivität in den Keratinozyten vor allem chronisch läSIONALER Epidermis nach, während der Zytokingehalt in den Keratinozyten nicht läSIONALER Atopikerhaut, vergleichbar zu

dem normal gesunder Haut, nur schwach ausgeprägt war. Gleichzeitig ermittelten sie *in vitro* eine gegenüber den Keratinozyten aus normal gesunder Haut erhöhte GM-CSF-Spontansekretion aus Keratinozyten nicht läsionaler Haut von atopischen Ekzem-Probanden^{367,410}. Erklärt wurde diese *in situ* - *in vitro* Diskrepanz erstens durch die unterschiedliche Empfindlichkeit der verwendeten Zytokinnachweismethoden. Zweitens wurde eine möglicherweise höhere Empfindlichkeit der Atopikerkeratinozyten gegenüber unspezifischen Stimuli aus Zellkulturkonditionen postuliert, in der Annahme, dass Keratinozyten aus läSIONALEM Ekzem analog zum *in situ*-Ergebnis auch *in vitro* eine entsprechend höhere GM-CSF-Sekretion zeigen würden, wobei dieses experimentell nicht untersucht wurde. Die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit bestätigten diese Annahme nicht. Vielmehr sezernierten die Keratinozyten aus nicht läSIONALER Haut der zwei Individuen mit intraindividuell signifikant unterschiedlicher GM-CSF-Freisetzung mehr GM-CSF als die Keratinozyten aus läSIONALEM Ekzem. Sie repräsentierten somit nicht das aus der Literatur bekannte *in situ*-Zytokinprofil. Hieraus ließen sich jedoch keine allgemeingültigen Schlüsse ziehen, denn das in den VOC-Expositionsversuchen unterschiedliche Zytokinsezernierungsverhalten der Zellen aus läSIONALER bzw. nicht läSIONALER Haut zeigte eine ausgeprägte Individuenspezifität: Je drei der sechs Individuen setzten höhere IL-1 α -Konzentrationen aus den Zellen nicht läSIONALER Haut bzw. aus denen läSIONALER Haut frei. Zwei Individuen der ersten Gruppe setzten ebenfalls aus Zellen nicht läSIONALER Haut zudem verstärkt GM-CSF frei. Ein Individuum der zweiten Gruppe setzte ebenfalls aus Keratinozyten aus läSIONALEM Ekzem zusätzlich verstärkt IL-6 frei. Dahingegen sezernierten die Zellen aus läSIONALEM Ekzem eines Probanden mit ausschließlich signifikant unterschiedlicher IL-6-Freisetzung geringere Zytokinkonzentrationen als die Zellen aus nicht läSIONALER Haut desselben Probanden. Aufgrund dieser Individuenspezifität sollten in Folgeexperimenten die Untersuchungen an läSIONALER und nicht läSIONALER Epidermis *in situ* sowie an Keratinozytenkulturen aus läSIONALER und nicht läSIONALER Haut desselben Patienten wiederholt werden. Sollten sich die *in vivo/in vitro*-diskrepanten Ergebnisse intraindividuell bestätigen, wären die Ergebnisse von *in vitro*-Kulturen artifiziell und entsprechende *in vitro*-Versuche nicht geeignet, um Rückschlüsse auf die *in vivo*-Situation, Pathomechanismen bzw. mögliche Therapieansätze zu ziehen.

Der Zusammenhang des kombinierten Auftretens erhöhter Zytokinkonzentrationen von GM-CSF und IL-1 α bzw. von IL-6 und IL-1 α wird im folgenden Abschnitt diskutiert.

ad 4: Korrelierte Zytokinfreisetzung

Unter den Individuen mit auffällig hohen bzw. niedrigen Zytokinkonzentrationen in allen Einzelmessungen fanden sich einige auffällige Korrelationen bezüglich der Spontanfreisetzung von unterschiedlichen Zytokinen: So setzten die Keratinozyten dreier nicht atopischer Individuen stark erhöhte Konzentrationen sowohl von GM-CSF als auch von IL-6 frei, während Zellen zweier anderer Individuen von beiden Zytokinen auffällig niedrige Konzentrationen, eines davon aber zusätzlich auffällig hohe Konzentrationen von IL-1 α sezernierten. Keratinozyten aus läsionaler Ekzemhaut von zwei atopischen Individuen zeigten hingegen eine Korrelation auffallend hoher Konzentrationen von GM-CSF und IL-1 α sowie andererseits auffällig niedriger Konzentrationen beider Zytokine durch ein weiteres Individuum. Ferner hatten sich im intraindividuellen Vergleich läsionaler und nicht läsionaler Keratinozytenkulturen Korrelationen von IL-1 α und GM-CSF sowie von IL-1 α und IL-6 ergeben (vergleiche ad 3).

Diese Ergebnisse werden durch die Literatur unterstützt: Gene und Proteine von IL-6 und GM-CSF zeigen eine hohe Sequenzhomologie⁴¹¹. Auch ihre Rezeptorstrukturen aus bindender und Signaltransduktionskomponente sind einheitlich⁴¹¹. Das ließ auf gemeinsame Signaltransduktions- oder Aktivierungswege schließen³⁹⁹, die die aus Keratinozyten gesunder Haut beobachtete gemeinsame Freisetzung von GM-CSF und IL-6 erklärten. Sowohl GM-CSF als auch IL-6 werden durch IL-1 α induziert⁹⁹⁻¹⁰¹. Dabei zeigten mit IL-1 α stimulierte Keratinozyten aus atopischem Ekzem eine signifikant stärkere GM-CSF-Freisetzung als Keratinozyten gesunder Haut³⁶⁷. Dieser Zusammenhang stimmte mit der beobachteten, konvergenten Sekretion von IL-1 α und GM-CSF von Keratinozyten aus atopischem Ekzem überein. Auch in humaner und muriner Haut mit geschädigter Barrierefunktion, wie sie typischerweise auch insbesondere in läsionaler Haut des atopischen Ekzems vorkommt, wurde eine korrelierte, auffällig hohe Zytokinproduktion und -freisetzung von GM-CSF und IL-1 α nachgewiesen^{412,413,414}.

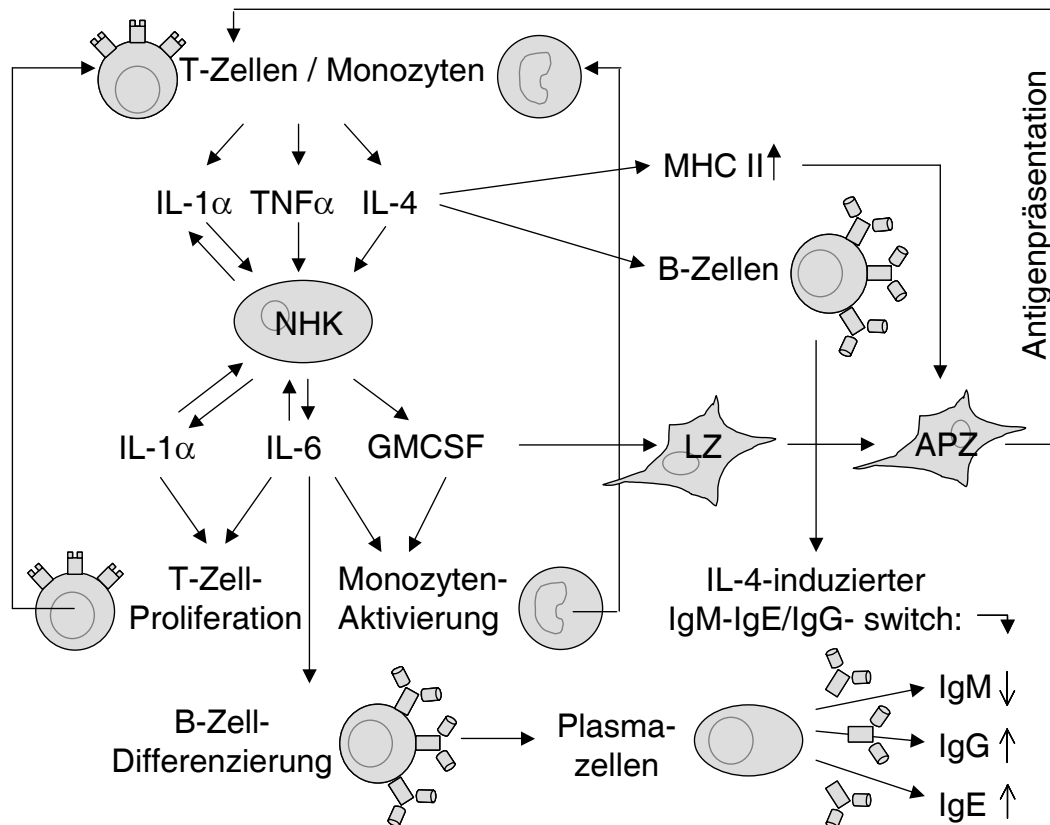


Abbildung 51: Ausschnitt aus dem immunologischen Zytokinnetzwerk mit Fokus auf keratinozytäres IL-1 α , IL-6 und GM-CSF⁴¹⁵. (NHK: normale humane Keratinozyten, LZ: Langerhanszellen, APZ: antigenpräsentierende Zellen)

Abbildung 51 verdeutlicht das Zusammenwirken und die Relevanz der drei untersuchten Zytokine im Zusammenhang mit der Entstehung und Aufrechterhaltung des atopischen Ekzems⁴¹⁵. Unter der Stimulation durch Zytokine wie IL-1 α , IL-4 und TNF α exprimieren und sekretieren Keratinozyten ihrerseits Zytokine, u. a. IL-1 α , IL-6¹¹¹ und GM-CSF¹⁰⁰, in das umgebende Gewebe, wobei die Keratinozytenstimulation via membranständige IL-1- und IL-6-Rezeptoren auf der Zelloberfläche autokrin aufrecht erhalten wird^{100,388}. IL-1 α und IL-6 führen u. a. zu T-Zellproliferation⁴⁰¹, IL-6 und GM-CSF zur Monozytenaktivierung¹⁰⁰. GM-CSF und IL-1 α induzieren zudem direkt die IL-6-Sekretion aus Monozyten⁴¹⁶. Sowohl T-Zellen als auch Monozyten setzen ihrerseits lokal Zytokine frei, wie z. B. IL-4, die erneut Keratinozyten zu erhöhter IL-6-Expression und -Sekretion stimulieren⁴¹⁷. IL-6 wiederum bewirkt die Differenzierung von B-Zellen zu immunglobulinproduzierenden Plasmazellen, während IL-4 außerdem zum Isotypenwechsel von IgM- zu vermehrter IgG- sowie IgE-Produktion führt²⁰⁹. IL-4 induziert ferner eine vermehrte Expression von MHCII. GM-CSF schließlich aktiviert Langerhanszellen⁴¹⁸, die in der Epidermis von Patienten

mit atopischem Ekzem gehäuft auftreten²²², und induziert, wiederum unterstützt durch IL-4, deren Reifung zu antigenpräsentierenden Zellen, die – zusammen mit MHC-Molekülen – Antigene an T-Zellen präsentieren^{367,419,420}. IL-1 α vermag die GM-CSF-induzierte Langerhanszellaktivierung zu verstärken. *Heufler et al.* wiesen diesbezüglich eine korrelierte Zytokinwirkung auf die Sensibilisierungsphase T-Zell-vermittelter Immunität nach⁴²¹.

Die in den VOC-Expositionsversuchen beobachtete Spontansezernierung der drei als Marker für kutane Entzündungsprozesse gewählten Zytokine fügte sich somit sinnvoll in das aus der Literatur bekannte, komplexe Zytokinnetzwerk ein. Die wechselseitigen - para- wie autokrinen - Einflüsse und zum Teil gemeinsamen Signaltransduktionswege erklärten außerdem die nachgewiesenen Korrelationen von unterschiedlichen Zytokinen in Primärkeratinozyten gesunder bzw. atopischer Haut.

6.4.5 VOC-Effekte auf die Zytokinsezernierung von humanen Keratinozyten

6.4.5.1 Effekte von VOC-Einzelsubstanzen

Unter Exposition gegenüber einfachen, maximalen Arbeitsplatzkonzentrationen (1 MAK) sollte prinzipiell keine gesundheitschädliche Wirkung erfolgen. Nivellierte man 1 MAK VOC-unspezifische Effekte wie generelle Langzeit- oder zeitabhängige IL-1 α -Effekte, bestätigten die Versuchsergebnisse diese Forderung: Bezogen auf Kontrollexperimente mit synthetischer Luft zeigten sich keine statistisch signifikanten 1 MAK Toluol bzw. 1 MAK m-Xylol-Effekte. Allerdings wurden für alle drei Zytokine tendenziell erhöhte Sekretion in der Fallgruppe läasionales atopisches Ekzem dokumentiert. Hier stellte sich daher die Frage, ob Keratinozyten aus atopisch läsionaler Haut aus ihrem proinflammatorischen Status heraus empfindlicher reagierten. Expositionen gegenüber 3 MAK Toluol induzierten hingegen annähernd signifikant erhöhte GM-CSF-Freisetzungen aus Zellen aus gesunder sowie atopisch läsionaler Haut. Eine schwächer erhöhte GM-CSF-Sekretion wurde in der Fallgruppe atopisch nicht läsionale Haut beobachtet. Die Konzentrationserhöhung von 1 auf 3 MAK Toluol machte sich hier also klar bemerkbar und ließ auf eine Konzentrationsabhängigkeit schließen. Dabei reagierten die Fallgruppen atopisches Ekzem vor allem nach Kurzzeitexpositionen tendenziell sensitiver als Keratinozyten aus gesunder Haut. So sich dieser Trend in kommenden Versuchen bestätigt, stützte er die These

der Allergotoxikologie, dass die vorgeschädigte Haut des atopischen Ekzems anfälliger für VOC-Schadgaseffekte ist. Die Freisetzung von IL-1 α wurde nicht signifikant von 3 MAK Toluol-Expositionen beeinflusst. Lediglich in der Fallgruppe läasionales Ekzem zeigte sich erneut eine mit dem Effekt von 1 MAK Toluol vergleichbare, tendenziell erhöhte Zytokinfreisetzung. Da hier keine Konzentrationsabhängigkeit vorlag, war eher von einem zufälligen Effekt auszugehen. Die logistische Regressionsanalyse ermittelte in der Fallgruppe pathologisch unauffällige Haut stark erhöhte, aber nicht signifikante IL-6-Konzentrationen. Bezog man die Versuche mit unveränderten IL-6-Konzentrationen mit ein, ergaben sich tendenzielle Effekte in den Fallgruppen läasionales und nicht läasionales atopisches Ekzem, die - wie schon nach 1 MAK Toluol-Expositionen - stärker waren als in der Fallgruppe gesunde Haut. Eine Konzentrationsabhängigkeit ergab sich dabei nur in der Fallgruppe nicht läasionales Ekzem. Diese Beobachtungen unterstützten wiederum die These von der VOC-sensitiveren atopischen Haut.

6.4.5.2 Kombinationseffekte des umweltrelevanten Schadstoffgemischs

Gesunde Haut

Das umweltrelevante VOC-Gemisch enthielt die Einzelkomponenten Toluol und m-Xylol in gegenüber MAK um 2-3 Größenordnungen niedrigeren Konzentrationen. Ausgehend von den Ergebnissen der MAK-Einzelsubstanzexpositionen waren daher keine messbaren Effekte zu erwarten. Tatsächlich ergaben sich aber erste Hinweise auf einen Kombinationseffekt des Toluol/m-Xylol-Gemischs in umweltrelevantem Konzentrationsverhältnis auf Keratinozyten aus gesunder Haut: Die IL-6-Sekretion war häufiger erhöht als nach Expositionsversuchen gegenüber 1 MAK VOC, wenn auch nicht so häufig wie nach 3 MAK Toluol-Expositionen. Die in Keratinozytenkulturen aus pathologisch unauffälliger Haut induzierte, erhöhte GM-CSF-Freisetzung entsprach quantitativ wie qualitativ sogar der von 3 MAK Toluol-Expositionen. Kurzzeitexpositionen bzw. Langzeitexpositionen gegenüber dem Umwelt-VOC-Gemisch induzierten schließlich neben der generell reduzierten einen auffallend hohen Anteil unveränderter respektive verstärkter IL-1 α -Freisetzung (44 % der exponierten Keratinozytenkulturen). Dies war insbesondere bemerkenswert, da die Versuchsdauer üblicherweise keine erhöhte Zytokinfreisetzung bewirkte. In der interaktionsfreien Regressionsanalyse wurde dieser Sachverhalt konkret daher nicht auffällig, die Inter-

aktionsfreiheit wurde aber klar abgelehnt. Deshalb sollte in Folgestudien in größerem Versuchsansatz gezielt untersucht werden, ob es sich hierbei um einen möglicherweise expositionsdauerabhängigen oder zeitverzögert wirkenden Kombinationseffekt von Toluol und m-Xylol handelt.

Die den Expositionsversuchen zugrundeliegende Hypothese möglicher additiver oder multiplikativer Kombinationseffekte von Toluol und m-Xylol wurde somit bestätigt. Die Wirkungsspektren von VOC-Einzelsubstanzen in maximalen Arbeitsplatzkonzentrationen ließen weder auf die Effektgröße noch die Effektrichtung des umweltrelevanten VOC-Prüfgasgemisches schließen. Die Ergebnisse unterstützten damit die einleitend ausgeführten Bedenken gegenüber extrapolierten Dosis-Wirkungsbeziehungen von Hochdosis- auf Niedrigkonzentrationsbereiche.

Die VOC-Expositionsversuche zeigten erstmals die synergistische, multiplikative Kombinationswirkung niedrigkonzentrierter, umweltrelevanter VOC auf die *in vitro* Zytokinfreisetzung aus humanen Primärkeratinozyten gesunder Haut. Die Ergebnisse bedeuteten ferner, dass bei der Beurteilung von umweltrelevanten Einflüssen auf Gesunde nicht ohne weiteres die MAK-Größen als Bewertungsmaßstab herangezogen werden können, da diese keine Kombinationseffekte berücksichtigen.

Folgeexperimente zur Reproduktion und statistischen Absicherung der hier erstmals gezeigten Kombinationswirkungen niedrigkonzentrierter, umweltrelevanter VOC auf die *in vitro* Zytokinfreisetzung aus humanen Primärkeratinozyten sind daher angeraten, um den bislang unzureichenden Kenntnisstand in Bezug auf synergistische, antagonistische sowie unabhängige Wirkungsverstärkungen oder -reduzierungen komplexer Luftschadstoffe zu erweitern.

Atopisches Ekzem

Im Unterschied zur Wirkung auf Keratinozyten aus gesunder Haut zeigte sich auf Zellen aus atopischem Ekzem keine stärkere Wirkung durch das Umwelt-VOC-Gemisch: Ein die Zytokinsekretion im Vergleich zu VOC-Einzelsubstanzen verstärkender VOC-Kombinationseffekt wurde hier nicht dokumentiert. Im Gegenteil, die GM-CSF-Sekretion war in den atopischen Fallgruppen stark reduziert. Die quantitative Analyse ergab einen signifikanten Unterschied zwischen den Fallgruppen gesund (Faktor 1,7) und atopisch läsional (Faktor 0,5). Auch erhöhte IL-6-Konzentrationen wurden nach Exposition gegenüber dem VOC-Gemisch seltener freigesetzt als nach 1 bzw. 3 MAK Einzelsubstanz-Expositionen. Außerdem wurden seltener erhöh-

te und häufiger reduzierte IL-6-Freisetzung in den Fallgruppen atopisches Ekzem als aus Zellen aus pathologisch unauffälliger Haut induziert. Für IL-1 α zeigte sich nach Exposition gegenüber dem VOC-Gemisch ebenfalls eine deutliche Tendenz zu schwächerer Zytokinsekretion von Keratinozytenkulturen aus atopischer Haut im Vergleich zur Fallgruppe gesunde Haut. Die allergotoxikologische These hinsichtlich potentieller Auswirkungen von umweltrelevanten VOC-Konzentrationen insbesondere auf Allergien bestätigte sich somit nicht.

Die eingangs gestellte Frage nach der Ursache der *in vivo* in nicht läSIONalem atopischen Ekzem nachgewiesenen, verstärkten Langerhanszellaktivierung durch mit umweltrelevantem VOC exponierte Pollen^{48,49} kann demnach wie folgt beantwortet werden: Der erhöhten Reaktivität liegt vermutlich eher eine schadstoffinduziert veränderte Allergenfreisetzung²⁴ denn ein direkt VOC-vermittelter, irritativer Effekt auf die Keratinozyten und ein damit assoziiertes, verändertes lokales Immunpotential der Haut zugrunde. Umweltschadstoffe tragen *in vivo* nachgewiesenermaßen zur Aufrechterhaltung des atopischen Ekzems bei^{50,51}. Die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit lassen jedoch vermuten, dass die Wirkung von umweltrelevant konzentrierten VOC im atopischen Ekzem vorzugsweise über veränderte Mediatorfreisetzung aus Granulozyten und Leukozyten vermittelt⁷⁴⁻⁷⁶ und außerdem durch weitere im *in vitro*-Modell nicht vorhandene Mediatoren wie Histamin unterstützt wird³⁸⁵. Der allgemeine Prävalenzanstieg des atopischen Ekzems ließ sich nach den Ergebnissen der vorliegenden Arbeit jedenfalls nicht mit der Wirkung des umweltrelevant konzentrierten TypII-Luftschadstoffs VOC auf Primärkeratinozyten begründen.

6.4.5.3 VOC-Effekte im Fallgruppenvergleich

gesund – atopisch

Gemittelt über alle Expositionsversuche zeigte sich im Vergleich gesund-atopisch ein (hoch-)signifikanter Reduktionseffekt: Keratinozyten aus läSIONalem atopischen Ekzem setzten nach Exposition signifikant seltener relativ zur Spontansekretion erhöhte bzw. häufiger reduzierte GM-CSF- und IL-6-Konzentrationen frei als Zellen aus gesunder Haut. Die GM-CSF-Freisetzung von Zellen aus nicht läSIONalem Ekzem war gegenüber denen aus pathologisch unauffälliger Haut sogar hochsignifikant seltener erhöht bzw. häufiger reduziert

Zusammengefasst hieß das, während Keratinozyten aus gesunder Haut bezogen auf die Spontansekretion nach VOC-Exposition eine verstärkte Freisetzung von GM-CSF und IL-6 zeigten, war die Zytokinfreisetzung aus Keratinozyten atopischer Herkunft bezogen auf die Spontansekretion vergleichsweise reduziert. D. h., die Keratinozyten aus gesunder und atopischer Haut zeigten zwar eine zum Teil signifikant andere Reaktivität auf VOC. Relativ zur Spontansekretion ergab sich aber im Mittel kein stärker erhöhender Effekt durch VOC auf Zellkulturen aus atopischem Ekzem. Im Hinblick auf die biologische Bedeutung der Zytokine im atopischen Ekzem waren diese Ergebnisse überraschend. Aufgrund der im atopischen Ekzem *in vivo* gestörten Barrierefunktion wurde ein direkter, irritativer Effekt auf die generativen Keratinozyten der Basalzellschicht postuliert, der ein proinflammatorisches Expressionsprofil induziert, das *in vivo* u.a. die Sensibilisierung unterstützt, pathophysiologische Prozesse einleitet und somit schließlich zur Manifestation, Persistenz und Chronifizierung des atopischen Ekzems beiträgt. Eine Reihe von Argumenten spricht dabei für eine erhöhte Zytokinseznernierung: So aktiviert IL-1 α beispielsweise die epidermale Proliferation und zeichnet bei Überexpression verantwortlich für Acanthosis und epidermale Hyperplasie durch hyperproliferative Keratinozyten in inflammatorischen Hauterkrankungen⁴²². IL-1 α wirkt zudem über den Arachidonsäuremetabolismus stimulierend auf die Prostaglandin-E2-Synthese exponierter Keratinozyten⁴²³ und bewirkt somit durch die Keratinozytenaktivierung eine lokale Abwehrreaktion⁴²⁴. Die Rekrutierung zirkulierender Leukozyten führt *in vivo* außerdem zu verstärkter Mediatorfreisetzung und zur Amplifikation der kutanen Entzündungsreaktion¹⁰⁷. Während IL-1 α *in vivo* vor allem im S. granulosum und S. spinosum normaler humaner Haut konstitutiv exprimiert wird, wird die IL-1 α -Expression z. B. unter UV-B Strahlung erhöht und die Lokalisation schließt die Basalzellschicht zusätzlich mit ein⁴²⁵. Im Rahmen einer IgE-vermittelten Spätphasereaktion nach kutaner Antigenprovokation im Mausmodell wurde eine erhöhte IL-6-Expression in der murinen Epidermis nachgewiesen⁴²⁶, während GM-CSF nachweislich zur Persistenz und Chronifizierung des atopischen Ekzems beiträgt, um nur einige biologische Aspekte anzuführen. D. h., zur Unterstützung dieser Prozesse war generell eine erhöhte Zytokinfreisetzung zu erwarten. Dies war *in vitro* nach VOC-Kontakt mit einem „monolayer“ proliferativer Keratinozyten als Modell der Basalzellschicht bezogen auf die Spontansekretion derselben Kultur nachgewiesenermaßen nicht der Fall. Die allergotoxikologische These wurde diesbezüglich widerlegt.

Es war jedoch nicht auszuschließen, dass die in den atopischen Fallgruppen freigesetzten, absoluten Zytokinkonzentrationen nach VOC-Exposition nicht trotzdem höher waren als die in der Fallgruppe gesunde Haut, da die Spontansekretion aus atopischen Ekzem-Keratinozyten teilweise deutlich höhere Absolutkonzentrationen aufwies als die pathologisch unauffälliger Zellen. Im Vergleich der arithmetischen Mittel aller Absolutkonzentrationen der Expositionsfolgefreisetzung ohne Unterscheidung ihrer statistischen Zuverlässigkeit (quantitativ / qualitativ) und ohne Normalisierung in Hinsicht auf Individuenspezifität und Relation zur Spontansekretion war dies sogar in 2/3 der Expositionsvarianten der Fall, u.a. auch nach Exposition mit dem umweltrelevanten VOC-Gemisch (vergleiche Tabelle 29). Eine korrekte und detaillierte Untersuchung dieses Aspekts setzte aber eine quantitative Studienauswertung sowie eine interindividuelle Homogenität voraus. Die Pilotstudienresultate fordern deshalb Folgeexperimente unter Einsatz einer sensitiveren Zytokin-nachweismethode und größerer Versuchsansätze, um die beobachteten VOC-Effekte mit höherer statistischer Genauigkeit zu analysieren.

Tabelle 29: Arithmetische Mittel aller Absolutkonzentrationen der Expositionsfolgefreisetzung – ohne Unterscheidung der statistischen Zuverlässigkeit (quantitativ / qualitativ) – differenziert nach Expositionsvariablen und Expositionsdauer (KZ: Kurz-, LZ: Langzeitexposition). Hervorgehoben sind die gegenüber der Fallgruppe gesunde Haut erhöhten absoluten Zytokinkonzentrationen der atopischen Fallgruppen.

Expositionsvariable und Expositionsdauer		mittlere Absolutkonzentrationen der Zytokinsekretion nach Exposition								
		GMCSF [pg/ml]			IL-1 α [pg/ml]			IL-6 [pg/ml]		
		gesund	atopisch läsional	atopisch nicht läsional	gesund	atopisch läsional	atopisch nicht läsional	gesund	atopisch läsional	atopisch nicht läsional
Umwelt T/m-X	KZ	10,1	33,0	14,8	2,7	7,3	8,4	4,5	7,7	7,6
	LZ	33,6	23,4	33,0	6,2	6,7	9,4	4,4	11,5	4,5
3 MAK Toluol	KZ	19,8	113,0	178,4	12,9	3,5	6,9	17,0	17,6	7,0
	LZ	14,3	40,3	56,5	39,7	15,8	22,0	6,3	3,9	10,1
1 MAK Toluol	KZ	42,0	40,4	73,1	4,8	6,8	5,3	4,7	20,0	24,2
	LZ	53,4	130,4	133,4	12,3	9,4	17,5	7,6	7,1	4,9
1 MAK m-Xylool	KZ	22,5	23,1	112,9	5,6	4,2	6,6	4,8	14,1	5,5
	LZ	48,8	22,0	26,4	11,7	10,1	9,2	6,0	9,1	7,9
synthetische Luft	KZ	8,9	6,0	17,4	11,4	5,6	4,0	11,9	7,8	287,3
	LZ	7,3	5,1	9,5	2,6	3,0	3,1	6,3	3,6	99,1
Inkubator	KZ	122,3	21,1	55,6	4,6	7,4	5,6	7,8	32,1	10,7
	LZ	15,0	16,5	13,0	0,7	1,6	1,5	15,9	12,8	47,6

Eine weitere Ursache der beobachteten niedrigeren Zytokinkonzentrationen im Kulturüberstand ist möglicherweise die erhöhte Zytokinrezeptordichte bzw. ein verändertes Rezeptorantagonist-Zytokin-Verhältnis von Keratinozyten aus atopischem Ekzem. So wiesen *Pastore et al.* gegenüber Zellen aus gesunder Haut

signifikant erhöhte IL-1 α - und IL-1RA-Konzentrationen im Zellkulturüberstand von Keratinozytenkulturen aus nicht läSIONalem atopischen Ekzem nach³⁶⁵. Laut *Terui et al.* werden inflammatorische Hauterkrankungen durch ein erhöhtes epidermales IL-1RA/IL-1 α -Verhältnis charakterisiert, das sich durch eine niedrigere IL-1 α -Expression auszeichnet³⁹⁷. Auch GM-CSF-Rezeptor α -mRNA wird in akuten und chronischen Läsionen signifikant höher exprimiert als in nicht läSIONaler und gesunder Haut und dabei in chronischen Läsionen signifikant stärker als in akuten Läsionen⁴²⁷. In der vorliegenden Arbeit wurden ausschließlich ungebundene Zytokine im Zellkulturüberstand nachgewiesen. Es ist daher nicht auszuschließen, dass Keratinozytenkulturen aus atopischem Ekzem gegenüber der Fallgruppe gesunde Haut vergleichbare oder erhöhte Zytokinkonzentrationen sezernierten, die durch ebenfalls verstärkt exprimierte Rezeptoren gebunden wurden und deshalb für das Messsystem nicht detektierbar waren. Um die Wirkweise von VOC auf das atopische Ekzem in Folgeexperimenten genauer zu untersuchen, sollten deshalb zusätzlich zur freigesetzten Zytokinkonzentration die zelluläre Rezeptorfrequenz und das Expressionsprofil der Zytokine und Rezeptoren analysiert werden.

atopisch: läSIONal – nicht läSIONal

Im Vergleich der Fallgruppen atopisch läSIONale und atopisch nicht läSIONale Haut unterschied sich die auf die Spontansekretion bezogene VOC-induzierte Freisetzung aller drei untersuchten Zytokine nicht signifikant. Einzig Kurzzeitexpositionsversuche gegenüber hochkonzentrierten VOCs zeigten eine Tendenz zu divergierender Zytokinfreisetzung (vergleiche 6.4.5.1).

In Vergleichen der Keratinozyten aus läSIONaler und nicht läSIONaler Haut identischer Individuen zeigten jedoch zwei von sieben Individuen sowohl für GM-CSF als auch für IL-6 ein auffallend unterschiedliches Sezernierungsverhalten in ihrer Reaktion auf gleiche Expositionsvariablen. Andere Individuen fielen wiederum durch ihre auffällig einheitlichen Reaktionen auf: eines in Bezug auf GM-CSF, zwei weitere hinsichtlich IL-6. Eine ausgeprägte Individuenspezifität hinsichtlich unterschiedlicher Auslöser des atopischen Ekzems ist bekannt. Möglicherweise weist also nur eine Gruppe von Patienten mit einer bestimmten Form des atopischen Ekzems eine erhöhte Sensitivität gegenüber Luftschadstoffen auf.

Um sicherere Aussagen über VOC-bedingte Effekte auf die Zytokinfreisetzung machen zu können, bedarf es daher Folgestudien mit wesentlich größeren Fallgruppen

und vollständig faktoriellem Versuchsdesign, wie im Kapitel 6.4.6 detailliert ausgeführt. Aufgrund der Individuenspezifität ist die Bildung von phänotypisch hochgradig übereinstimmenden „matched pairs“ zwischen Kontroll- und Fallgruppen angeraten.

6.4.5.4 Expositionsdauer- und zeitabhängige VOC-Effekte

Die Expositionsdauer hatte in allen Fallgruppen einen signifikanten Einfluss auf die Zytokinfreisetzung von GM-CSF und IL-6. In der Fallgruppe läasionales, atopisches Ekzem war dieser Unterschied sogar hochsignifikant. Dabei induzierten Kurzzeitexpositionen im Mittel über alle Expositionsvariablen eine signifikant häufiger und stärker erhöhte bzw. seltener und schwächer reduzierte Zytokinfreisetzung als Langzeitexpositionen. In Relation zur Spontansekretion bedeutete das, dass in allen drei Fallgruppen gemittelt über alle Expositionsvariablen deutliche Effekte nach Kurzzeitexpositionen von 5 h und 8 h Dauer, jedoch kaum anhaltende oder verzögerte Reaktionen nach Langzeitexpositionen von 18 h bzw. 24 h dokumentiert wurden. Einzige Ausnahme bildeten die starken Effekte nach Expositionen gegenüber 3 MAK Toluol bzw. dem Umwelt-VOC-Gemisch auf Keratinozyten gesunder Haut: Hier waren auch nach Langzeitexpositionen noch verstärkte GM-CSF-Freisetzungen messbar. Auf die Freisetzung von Interleukin 1α zeigte die Expositionsdauer hingegen keine signifikant unterschiedlichen Effekte. Die Sekretion von Interleukin 1α war bereits nach Kurzzeitexpositionen deutlich reduziert. Langzeitexpositionen veränderten dieses Sezernierungsverhalten nicht. Einzige Ausnahme: Expositionen gegenüber dem umweltrelevanten VOC-Prüfgasgemisch induzierten neben reduzierten auch einen relevanten Anteil erhöhter IL- 1α -Konzentrationen aus gesunden Keratinozyten (vergleiche 6.4.5.2). Vor dem Hintergrund der hier beobachteten allgemeinen zeitabhängigen Sekretionsreduktion gewann dieser Umwelt-VOC-Effekt besondere Bedeutung.

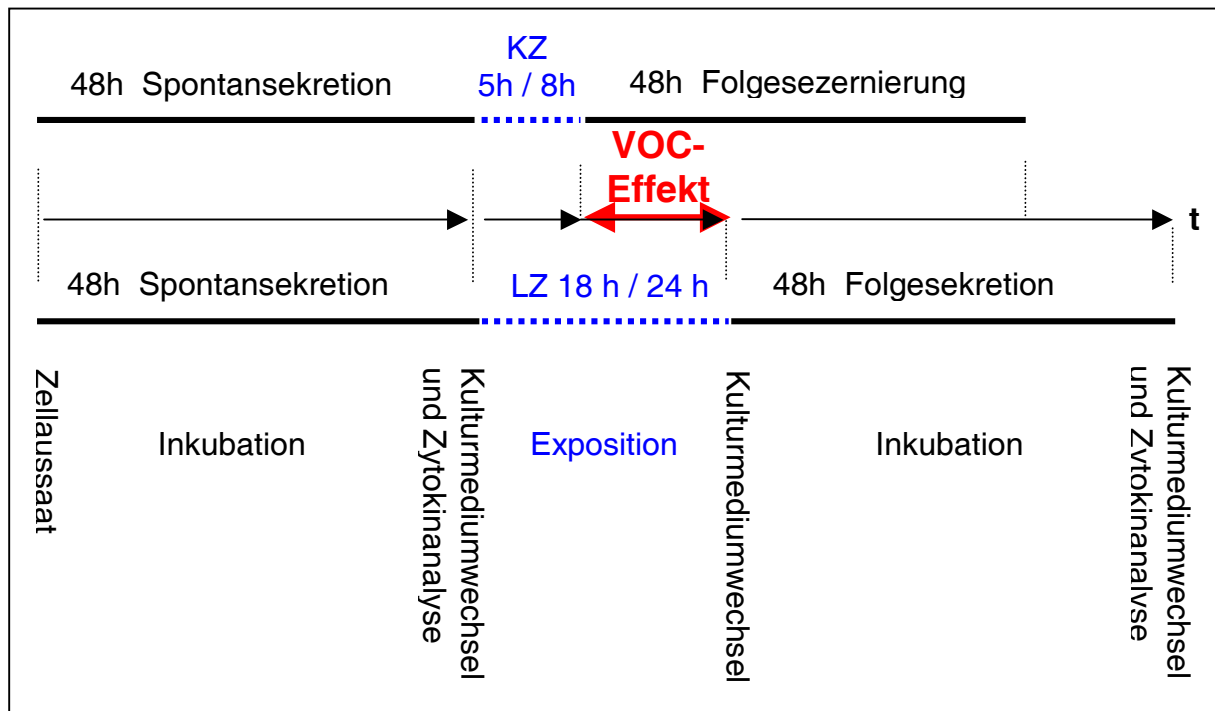


Abbildung 52: Graphische Darstellung des Zeitintervalls größter, nachweisbarer VOC-induzierter Zytokinfreisetzung im zeitlichen Studiendesign (KZ: Kurzzeit-, LZ: Langzeitexposition)

Aus diesen Ergebnissen ließ sich das Zeitintervall mit der stärksten, nachgewiesenen VOC-induzierten Zytokinfreisetzung ermitteln. Abbildung 52 stellt dieses Intervall auf der Experimentzeitachse graphisch dar. Der Kulturmedienwechsel am Expositionsende war die Voraussetzung für die Vergleichbarkeit der Folgesekretion nach Kurz- und Langzeitexpositionen. Da die innerhalb von 5 h bis 24 h freigesetzten Zytokinkonzentrationen nicht quantifiziert werden konnten, ging in Langzeitexperimenten ein wesentlicher Anteil der direkten, nach kurzer VOC-Exposition induzierten Zytokinsekretion durch den Mediumwechsel verloren. Ein Langzeitexpositionseffekt in Form einer länger andauernden oder zeitverzögerten Zytokinfreisetzung war im Vergleich von nur geringer Relevanz. Es ist daher sinnvoll, in Folgeexperimenten vorrangig Kurzeffekte genauer zu untersuchen. Ergänzend wäre die Quantifizierung der Expositionskulturüberstände unter Einsatz einer sensitiveren Nachweismethode interessant, um direkte Kurzeffekte im Zeitintervall von 0-5 h/8 h bzw. 0-18 h/24 h vergleichend zu analysieren.

Für die beobachtete, zeitabhängig reduzierte Zytokinfreisetzung gab es zwei mögliche Ursachen: 1. Es wurden keine dauerhaften oder zeitverzögerten Effekte

induziert. 2. Es lag unabhängig von der Exposition ein generell zeitabhängiger Effekt vor. Denn insbesondere auf die Freisetzung von IL-1 α wirkten Kontrollversuche und VOC-Expositionen gleichermaßen reduzierend. Denkbar wäre hier ein Einfluss auf die Zytokinfreisetzung durch die *in vitro* Zellalterung während der 104 h (KZ) bzw. 120 h (LZ) Experimentdauer. In der vorliegenden Arbeit wurde zwar ein proliferatives und stabiles Zytokeratinexpressionsverhalten der in den Experimenten eingesetzten Kulturpassagen 1-4 nachgewiesen. Aber einerseits beeinflussen alle drei sekretierten Zytokine selbst die Keratinozytenproliferation und -differenzierung. Andererseits sind ihre Expression und Sekretion wiederum abhängig von der Zelldichte und dem Differenzierungsstatus der Zellen:

GM-CSF wird nach stimulatorischen Langzeiteffekten bzw. durch autokrine Effekte über alle Keratinozytendifferenzierungsstadien freigesetzt¹⁰¹. Da GM-CSF vor allem zur Persistenz und Chronifizierung des atopischen Ekzems beiträgt, waren einerseits Langzeiteffekte auf die GM-CSF-Freisetzung aus Zellen aus atopischem Ekzem zu erwarten. Andererseits ist auch der GM-CSF-Rezeptor in akuten und vor allem chronischen Läsionen signifikant höher exprimiert als in nicht läsionaler und gesunder Haut⁴²⁷. Rezeptorgebundenes GM-CSF wurde jedoch durch das in der vorliegenden Arbeit eingesetzte ELISA-Messsystem nicht erfasst (vergleiche 6.4.5.3).

Ferner ist ein Zelldichteeffekt auf die GM-CSF-Produktion von Keratinozyten bekannt: In subkonfluenten Zellen sind mRNA-Synthese und Proteinseznierung stark erhöht, in konfluenten Zellen dichteabhängig erniedrigt⁴²⁸. Da sowohl GM-CSF^{429,430,431} als auch IL-6, als autokriner Faktor in regulärem Keratinozytenwachstum und in der Wundheilung^{111,398,400,402}, stark proliferationsstimulierend auf Keratinozyten wirken, ist eine durch die Zelldichte bedingte Sekretionsreduktion nach 104 h bzw. 120 h Kulturdauer durchaus vorstellbar. GM-CSF und IL-6 wirken *in vitro* wie *in vivo* keratinozytenmitogen und werden als autokrine Faktoren für Epidermis-hyperplasie in chronischem atopischen Ekzem bzw. Psoriasis postuliert^{432,367}. Eine Behandlung mit rekombinantem GM-CSF führt ebenfalls zu generalisierter Hautreaktion mit leichter Spongiose⁴³³. Andererseits zeigen transgene Mäuse mit epidermaler, konstitutiver GM-CSF-Überexpression eine normale Epidermisdicke und Zelldifferenzierung trotz erhöhter, mitotischer Aktivität. Die Homöostase wird hier durch gesteigerte Apoptoseregulation aufrecht erhalten¹¹⁰. Eine apoptotische Wirkung des verstärkt freigesetzten GM-CSF wurde in der vorliegenden Arbeit jedoch nicht festgestellt.

Die keratinozytäre IL-1 α -, IL-1 α -Rezeptor- und IL-1 α -Rezeptorantagonistsynthese ist schließlich sowohl vom Differenzierungsstatus als auch von der Konfluenz der Zellen abhängig^{91,386}. In den in der vorliegenden Arbeit eingesetzten Zellen wurden allerdings erste Differenzierungsanzeichen erst ab Kulturpassage 5 nachgewiesen. Das proliferationsstimulierende IL-6 wirkt zudem eher differenzierungsinhibierend. Zusammenfassend ließen die Zytokinwirkungen daher eher auf eine konfluenzabhängig als eine differenzierungsabhängig reduzierte Zytokinfreisetzung schließen.

6.4.5.5 Fazit

Ein Hautgesunder hat nach Exposition gegenüber 1 MAK Toluol oder 1 MAK m-Xylol keine gesundheitsschädigende Wirkung zu erwarten. Ein um 2-3 Größenordnungen niedriger konzentriertes VOC-Gemisch, wie es typischerweise in der straßenverkehrsbelasteten Umwelt vorkommt, löst hingegen Reaktionen aus, die der Schadwirkung einer bis zu dreifachen MAK-Exposition entsprechen. D. h., die gültigen MAK-Grenzwerte sind bei der Beurteilung umweltrelevanter Luftschadstoffe nicht geeignet.

Einige Patienten mit atopischem Ekzem weisen eine erhöhte Sensitivität vor allem erkrankter Hautpartien gegenüber hochkonzentrierten VOC auf, andere zeigen hingegen eine den Hautgesunden vergleichbare Reaktion. In der Gruppe der empfindlichen Atopiker ist daher eher eine Verschlechterung der läsionalen Ekzeme als eine Erkrankung weiterer, bislang nicht betroffener Hautpartien zu erwarten. Eine ekzemverstärkende Wirkung durch umweltrelevante VOC-Expositionen ist hingegen nicht zu befürchten.

Die beobachteten VOC-induzierten Effekte waren vor allem Sofortreaktionen: Expositionen von kurzer Dauer zeigten eine direkte, unmittelbare Auswirkung auf die Zytokinfreisetzung. Zeitverzögerte oder dauerhafte Effekte wurden kaum beobachtet.

6.4.6 „Power analysis“ – Fallzahlabeschätzungen für Folgestudien

Die aus der Literatur bekannte natürliche Variabilität der Zytokinfreisetzung aus humanen Keratinozyten zwischen 2 bis 8 Individuen sollte in der vorliegenden Studie durch Einsatz größerer Probandenzahlen pro Fallgruppe reduziert werden. Mit 9 bzw. 19 Probanden erwiesen sich diese jedoch als nicht ausreichend. Während der VOC-Expositionsversuche stellten sich unerwartet ausgeprägte interindividuelle Zytokinkonzentrationsunterschiede heraus, so dass die Individuen aller drei Fallgruppen nicht wie geplant zu homogenen Einheiten klassifiziert werden konnten. Das geplante, aufgrund der nur begrenzt zur Verfügung stehenden, geringen Zellzahlen pro Proband vereinfachte, aber mit mindestens fünf Beobachtungen pro Fallgruppe und Expositionsvariable vollständig faktorielle Versuchsdesign konnte daher nicht erreicht werden. In Folge der daraus resultierenden individuenbezogenen und zusätzlich getrennt qualitativ/quantitativen Auswertung ergab sich aufgrund zu vieler Variablen bei nun uneinheitlicher und teilweise zu kleiner Beobachtungszahl eine zu umfangreiche Fragestellung. Mangels statistischer Genauigkeit konnten daher eine Reihe Einzelfragen expositionsbedingter Effekte nicht verlässlich beantwortet werden. Gleichzeitig waren potentiell VOC-induzierte Effekte nicht groß genug, um in non-parametrischer bzw. qualitativer Auswertung deutlich zu werden.

Dennoch ergaben sich erste interessante Hinweise auf eine Diskrepanz im spontanen wie im VOC-induzierten Zytokinsezernierungsverhalten von Keratinozyten aus gesunder Haut, atopisch läSIONALEM und nicht läSIONALEM Ekzem (vergleiche 6.4.4 und 6.4.5.3). Zellen aus atopisch läSIONALEM Ekzem zeigten einen Trend zu möglicherweise erhöhter Sensitivität gegenüber hohen VOC-Konzentrationen (vergleiche 6.4.5.1). Außerdem wurde erstmals ein synergistischer, multiplikativer Kombinationseffekt des umweltrelevanten Toluol/m-Xylol-Gemischs auf gesunde Keratinozyten nachgewiesen (vergleiche 6.4.5.2). Ferner erwiesen sich die Ergebnisse von Kurzzeitexpositionen als aussagekräftiger als die von langer Experimentdauer. Somit offenbarten die Ergebnisse der VOC-Expositionsversuche eine Reihe interessanter Trends und (grenzwertig) signifikanter Effekte, die in Folgestudien mit geeigneten Analysesystemen und optimiertem Studiendesign gezielt untersucht werden sollten. Diesbezüglich dienen die Ergebnisse zusätzlich einer sinnvollen Versuchsplanung von Folgestudien: Aus der beobachteten, stark ausgeprägten Individuenspezifität resultiert zwingend, anstatt der Fallgruppen deren Individuen als Einheit in der

Versuchsdurchführung einzusetzen: Um ein ausgewogenes Versuchsdesign zu erreichen, müssen Zellkulturen jedes einzelnen Individuums wiederholt und in Mehrfachansätzen mit allen Kombinationen der Versuchsvariablen exponiert werden, so dass pro Versuchsart und -variable, wie auch pro Individuum und letztlich pro Fallgruppe die gleiche Anzahl Beobachtungen erhalten werden. Dies hat zur Folge, dass eine deutlich größere Zellzahl pro Proband benötigt wird, so dass diese zum einen stärker beprobt werden müssen und/oder zum anderen nur mehr Studien mit weniger Expositionsvariablen realisierbar sind. Gleichzeitig sollten größere und gleich starke, möglichst paarig ausgewählte Fall- und Kontrollgruppen eingesetzt werden. Auf diese Weise ist zusätzlich eine die Grundgesamtheit repräsentierende Verteilung zu erwarten. Für eine Fallzahlab-schätzung wurden die Ergebnisdaten für die Spontansekretion der Zytokine GM-CSF, IL-1 α und IL-6 aus Keratinozyten herangezogen, wobei durch die Wahl von je vier zufällig ausgewählten Werten pro Individuum eine gleich starke, individuelle „power“ simuliert wurde (wie exemplarisch in Tabelle 30 dargestellt). Die Verteilung der Konzentrationsdaten bei gleicher Individuenstärke in der Fallgruppe ließ auf eine Normalverteilung der Grundgesamtheit schließen. Anhand der arithmetischen Konzentrationsmittelwerte und Varianzen wurden (1.) statistische Tests auf signifikante Unterschiede zwischen den Fallgruppen durchgeführt und (2.) anhand der Variabilität die „power“ für je zwei Fallgruppen berechnet.

ad (1.): Die an den Auswahlen von je vier Zufallswerten durchgeführten statistischen Tests bestätigten die in der Gesamtbetrachtung nonparametrisch festgestellte intra- und interindividuelle Heterogenität der Fallgruppen: Sowohl parametrische wie nicht-parametrische Tests (t-Test, Wilcoxon, Kruskal-Wallis) wiesen für einzelne Zytokine und Fallgruppen übereinstimmend signifikante sowie grenzwertig signifikante Unterschiede zwischen Fallgruppe nach (fett markiert in Tabelle 30); diese wurden jedoch in anderen Auswahlen nicht konsequent bestätigt. Um stabil signifikante Ergebnisse zu erhalten, werden größere Fallzahlen pro Fallgruppe benötigt.

Tabelle 30: Arithmetische Mittelwerte und Standardabweichungen aller in den VOC-Expositionsversuchen ermittelten Zytokinspontanfreisetzungsdaten pro Fallgruppe (Individuen unterschiedlich stark repräsentiert) sowie exemplarisch von je vier zufällig ausgewählten Messungen pro Individuum der Fallgruppen. Zwischen den Fallgruppen signifikant unterschiedliche Zytokinkonzentrationen wurden fett markiert.

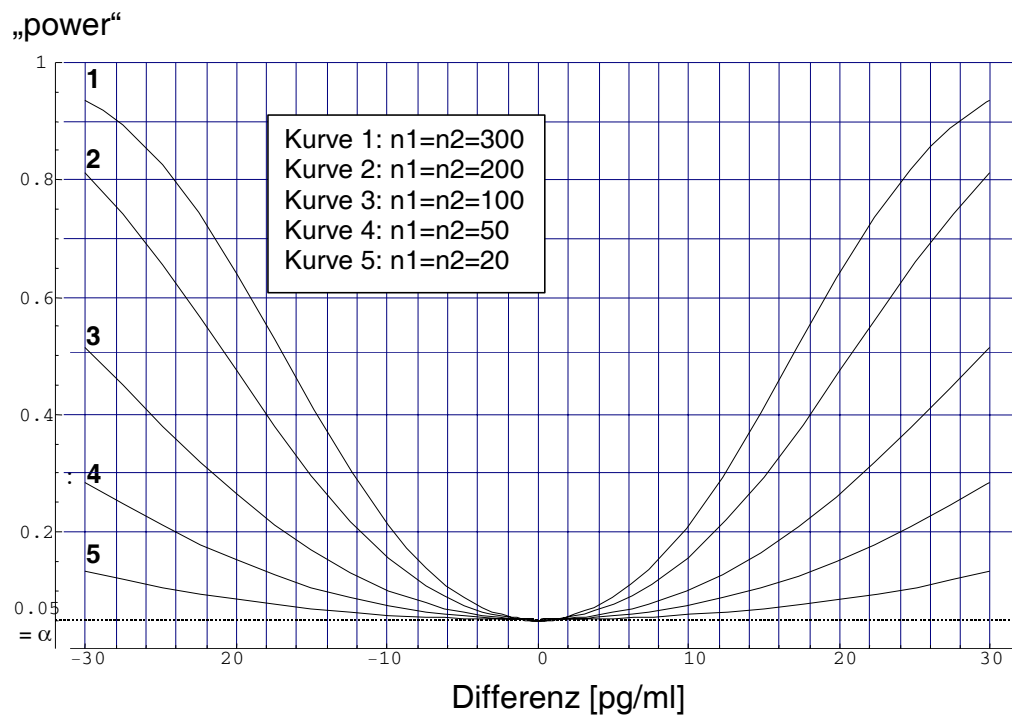
Mittelwerte und 1 σ Standardabweichungen aller Messungen pro Fallgruppe [pg/ml]						
Fallgruppe (n)	Mittelwerte			Standardabweichungen		
	GM-CSF	IL-1a	IL-6	GM-CSF	IL-1a	IL-6
Kontrolle (192)	42,8	37,7	8,7	97,5	49,4	18,8
atopisch läsional (134)	79,3	40,8	15,0	131,3	38,4	15,5
atopisch nicht läsional (185)	69,3	42,0	23,6	116,1	27,3	47,4
Mittelwerte und 1 σ Standardabweichungen pro Fallgruppe [pg/ml] (pro Proband je 4 Messwerte zufällig ausgewählt; exemplarisch 5 x)						
Fallgruppe (n)	Mittelwerte			Standardabweichungen		
	GM-CSF	IL-1a	IL-6	GM-CSF	IL-1a	IL-6
1. Kontrolle (76)	76,4	33,9	9,3	142,0	13,5	9,7
atopisch läsional (32)	67,7	37,6	15,1	47,5	24,7	14,0
atopisch nicht läsional (32)	73,6	50,2	21,5	82,8	27,4	15,2
2. Kontrolle (76)	70,6	34,9	8,5	138,0	18,6	9,7
atopisch läsional (32)	97,7	45,7	15,7	122,2	24,1	15,0
atopisch nicht läsional (32)	68,8	41,3	15,6	99,6	16,1	16,3
3. Kontrolle (76)	72,2	37,9	11,6	138,1	19,0	14,4
atopisch läsional (32)	87,1	48,7	15,7	94,0	31,5	10,0
atopisch nicht läsional (32)	62,2	44,3	26,1	77,2	17,7	24,6
4. Kontrolle (76)	69,9	37,4	8,9	138,4	17,5	10,0
atopisch läsional (32)	57,3	45,1	15,4	57,6	30,4	12,7
atopisch nicht läsional (32)	69,4	48,7	37,6	73,5	17,2	47,5
5. Kontrolle (76)	72,5	35,2	9,6	138,0	17,0	10,1
atopisch läsional (32)	78,3	44,1	16,3	86,0	37,9	12,2
atopisch nicht läsional (32)	90,1	41,9	19,3	105,6	18,8	21,6

ad (2.): Abbildung 53 a-d (Seiten 258-259) zeigt für unterschiedliche Fallzahlsituationen am Beispiel der ersten Zufallsauswahl die „power“ für je zwei Fallgruppen in Abhängigkeit von der jeweiligen Zytokinkonzentrationsdifferenz ($\alpha = 0,05$). Setzt man eine geforderte „power“ von 80 % voraus ($\beta = 0,2$), ergeben sich, abgelesen an den Fallzahlkurven, in gegenseitiger Abhängigkeit die in Tabelle 31 aufgeführten, als signifikant bewertbaren Konzentrationsunterschiede und die dafür notwendigen Mindestfallzahlen. Gemessen an den in den VOC-Expositionsversuchen beobachteten Zytokinkonzentrationsdifferenzen wäre für den Interleukinnachweis eine Fallzahl von 30 bis 40 Probanden pro Fallgruppe angeraten. Um Versuchsansätze mit aus diesem Design resultierender Fallzahl unter kontrollierten Bedingungen sinnvoll zu realisieren, können jedoch pro Studie nur wenige Expositionsvariablen gezielt untersucht werden. Um in Bezug auf die GM-CSF-Freisetzung signifikante Effekte zwischen den Fallgruppen nachweisen zu können, würden 300 Probanden benötigt. Die Analyse der GM-CSF-Spontansekretion ist daher aufgrund seiner geringen Variabilität bei gleichzeitig hoher interindividueller Varianz ein ungeeigneter Parameter zur Differenzierung von Fallgruppen. Die Versuchsergebnisse zeigten aber eine deutlich höhere, zum Teil signifikante Variabilität der GM-CSF-Freisetzung nach VOC-Expositionen. Basierend auf den vorliegenden Pilotstudien Daten müssen daher für gezielte Folgestudien für die jeweiligen Expositionsvariablen entsprechende „power“-Analysen durchgeführt werden.

Tabelle 31: Fallzahlabstschätzung für Folgestudien basierend auf der in den VOC-Expositionsversuchen festgestellten Variabilität unter Annahme einer Normalverteilung und einer „power“ von 80 % ($\alpha = 0,05$; $\beta = 0,2$)

Zytokin	signifikanter Konzentrationsunterschied Differenz [pg/ml]	Mindestfallzahl pro Fallgruppe
GM-CSF Kontrolle - atop. läs.	30	200
	24	300
Kontrolle - atop. nicht-läs.	26	300
IL-1 α Kontrolle - atop. Ekzem	18	30
	15	40
IL-6 Kontrolle - atop. Ekzem	17	10
	12	20
	9	30
	8	40

GM-CSF: Vergleich Kontrolle ($\sigma = 140$ pg/ml) – Fallgruppe atopisch läsional ($\sigma = 50$ pg/ml)



GM-CSF: Vergleich Kontrolle ($\sigma = 140$ pg/ml) – Fallgruppe atop. nicht läsional ($\sigma = 80$ pg/ml)

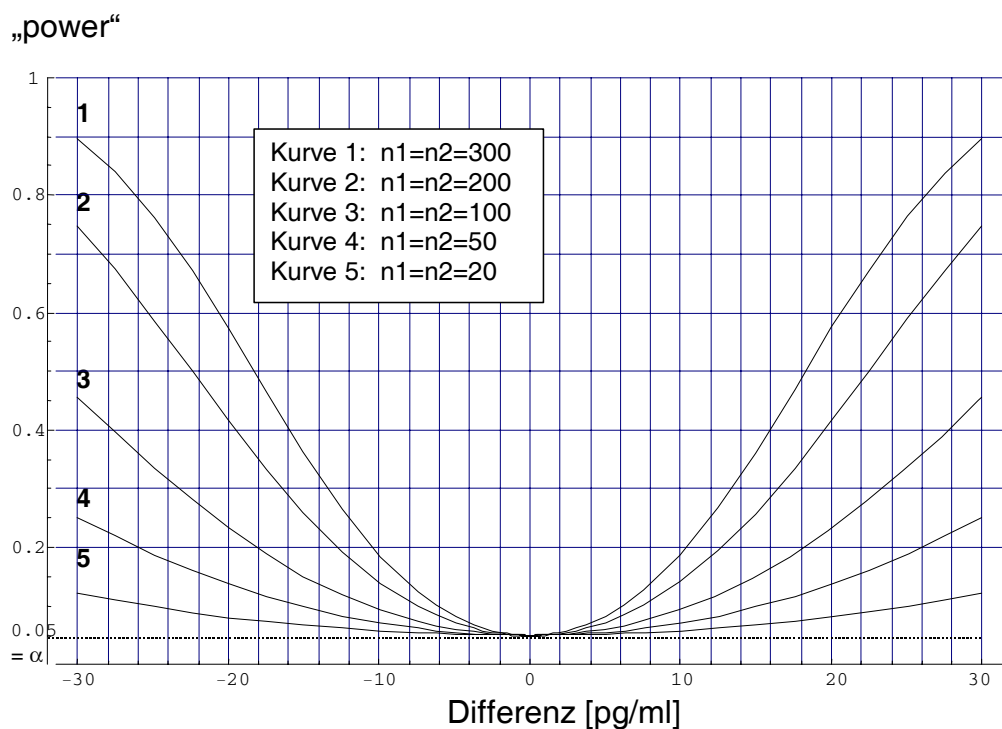
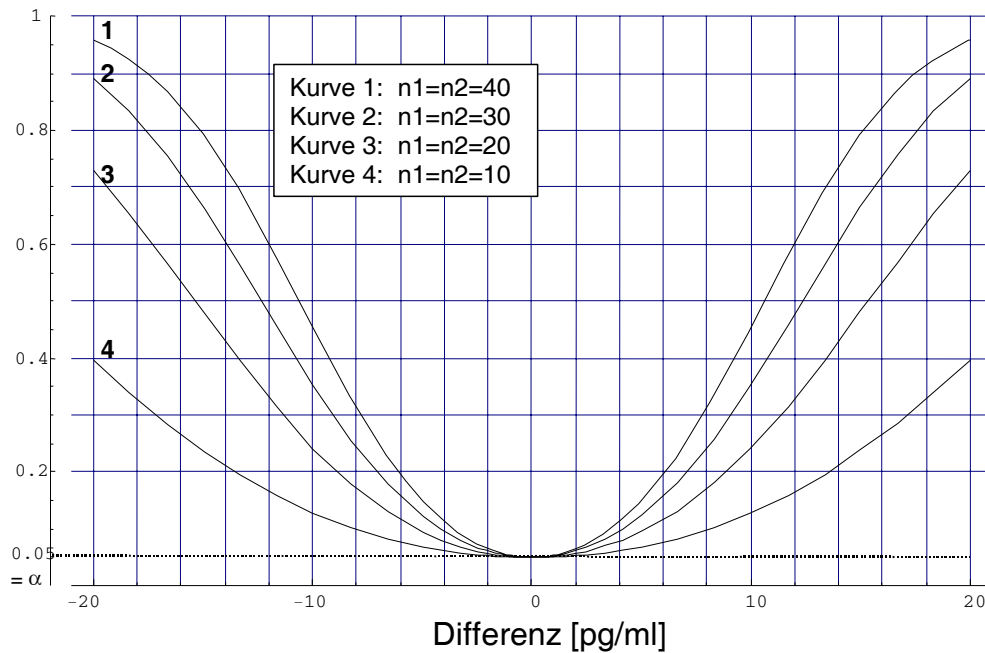


Abbildung 53 a, b: „power“ für das Zweistichprobenproblem: zweiseitig und ungleiche Varianzen ($\alpha = 0,05$) – Fallzahlab-schätzung zur Fallgruppendifferenzierung anhand von GM-CSF

IL-1 α : Vergleich Kontrollgruppe ($\sigma = 15$ pg/ml) – Fallgruppe atopisches Ekzem ($\sigma = 30$ pg/ml)

„power“



IL-6: Vergleich Kontrollgruppe ($\sigma = 10$ pg/ml) – Fallgruppe atopisches Ekzem ($\sigma = 15$ pg/ml)

„power“

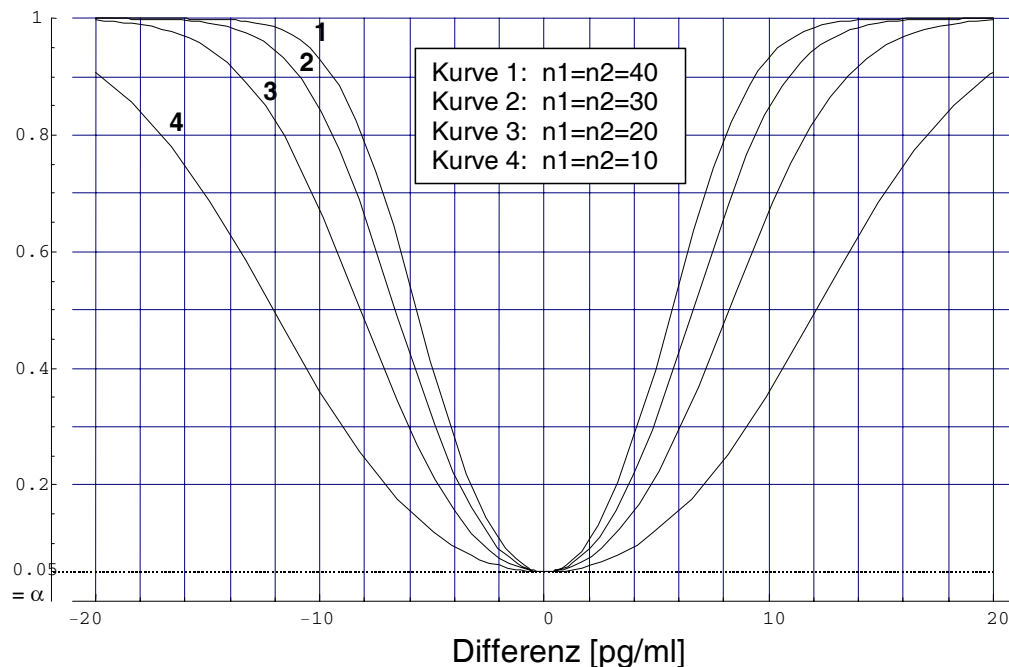


Abbildung 53 c, d: „power“ für das Zweistichprobenproblem: zweiseitig und ungleiche Varianzen ($\alpha = 0,05$) – Fallzahlabschätzung zur Fallgruppendifferenzierung anhand von IL-1 α und IL-6

6.4.7 Ausblick auf weitere Anwendungsgebiete der Expositionsapparatur

Für allergotoxikologische Fragestellungen in der vorgestellten Apparatur zur Exposition geeignete Zellkultursysteme sind einerseits submerse Zellsysteme aus Targetzellen der Initiator- und Mediatorphase von Allergien: Neben den hier verwendeten Keratinozyten als Epithelzellen der Haut sind dies Mono- oder Kokultursysteme von z. B. dendritischen Zellen, Lymphozyten, Mastzellen oder Granulozyten. Weiterhin geeignet sind luftexponierte Gewebezellkulturen als Zellsysteme der Effektororgane wie z. B. Bronchialepithel oder das in der vorliegenden Arbeit beschriebene Hautorganoid. Prinzipiell eignet sich die Expositionsapparatur aber auch für jede andere toxikologische Fragestellung. Da, wie in der Einleitung erwähnt, neben den gasförmigen Umweltschadstoffen viele luftgetragene Stoffe auch als eigenständige Partikel oder aber partikelassoziiert vorkommen, wäre ferner der Einsatz der Expositionsapparatur zur Untersuchung von Einflüssen solcher Stoffe auf die oben genannten Effektororgane oder deren Zellkomponenten interessant. Die experimentelle Erzeugung homogener Aerosole und die apparative Umsetzung der Expositionssituation ist jedoch deutlich komplexer als die Exposition gegenüber Gasen. Daher müsste die im Rahmen dieser Arbeit entwickelte und hier beschriebene Apparatur zur Exposition von Zellkultursystemen gegenüber gasförmigen Stoffen zunächst dahingehend modifiziert und erweitert werden. Technisch ist ein solcher Ausbau möglich.

Bei jeder neuen Anwendung der Apparatur müssen die apparativen Kenngrößen physikalisch-chemischer sowie biologischer Parameter in entsprechenden Pilotstudien erneut überprüft und evaluiert werden. Die grundsätzliche Methodik kann dabei der in dieser Arbeit angewendeten Vorgehensweise folgen. Dasselbe gilt für eine gründliche Validierung geeigneter Nachweismethoden für die jeweiligen analytischen Zielgrößen weiterer Studien. Die vorliegende Arbeit hat erneut gezeigt, dass insbesondere im Niedrigkonzentrationsbereich schnell physikalische Nachweisgrenzen erreicht sind. Auch *Rasmussen* wies in seinem Kriterienkatalog für *in vitro* Expositionssysteme (vergleiche Kapitel 1.2.5) auf diese Problematik hin und betonte die Wichtigkeit einer geeigneten Messgeräteausrüstung für Niedrigkonzentrationsmessungen sowie die Notwendigkeit interdisziplinärer Zusammenarbeit an dieser Problemstellung¹⁴⁰.

7 Zusammenfassung

Epidemiologische Studien zeigen weltweit eine steigende Häufigkeit und einen zunehmenden Schweregrad des atopischen Ekzems beim Menschen. Die Allergotoxikologie untersucht diesbezüglich die Frage der ursächlichen Beteiligung von umweltrelevanten Luftschadstoffen. Neben den partikulären Luftschadstoffen sind die flüchtigen organisch-chemischen Substanzen (VOC) Benzol, Toluol und m-Xylol typisch für straßenverkehrsbedingte Belastungssituationen. Der Kontakt der Haut mit diesen umweltrelevanten VOC findet in der Gasphase statt. *In vivo* Expositionen des Menschen ermöglichen keine differenzierte Beurteilung von durch Hautzellen, wie Keratinozyten und Fibroblasten, oder durch immunmodulatorische Zellen aus dem Blutkreislauf verursachte Reaktionen. Demgegenüber ermöglichen *in vitro* Testsysteme die Untersuchung der direkten Wirkung von VOC aus der Gasphase allein auf die Zellen der Haut. Grundlegende Voraussetzungen für *in vitro* Expositionsversuche sind geeignete Zellkulturen. Die Ziele der vorliegenden Arbeit waren daher:

1. die Entwicklung und Konstruktion einer Apparatur, die eine kontrollierte Exposition von Zellkulturen gegenüber Substanzen aus der Gasphase ermöglicht,
2. die Entwicklung und Etablierung verbesserter Zellisolierungs- und Kultivierungsmethoden, um sterile, homogene und proliferierende Primärkulturen aus humaner Haut von hautgesunden Probanden und Patienten mit atopischem Ekzem zu gewinnen,
3. der Einsatz der Expositionsapparatur, um erste Erkenntnisse über prinzipielles Auftreten, Größenordnung, Effektrichtung sowie natürliche Variabilität von VOC-induzierten Auswirkungen auf die Zytokinfreisetzung von humanen Keratinozyten aus atopischer und gesunder Haut zu gewinnen.

Die Expositionsapparatur wurde in Form eines offenen, kontinuierlich gasdurchströmten Systems konstruiert, das die simultane, homogene Exposition von bis zu 6 luftexponierten bzw. 12 submersen Zellkulturen gegenüber Substanzen aus der Gasphase ermöglicht. Eine „online“ Messung physikalischer Parameter sowie die Probenahme der Expositionsatmosphäre am Expositionsort wurden ohne Rückwirkung auf die Expositionsbedingungen vorgenommen. Die Verwendung von chemisch inerten Materialien verhinderte Substanzverluste sowie eine Verunreinigung der Expositionsatmosphäre nachfolgender Experimente durch Wandadsorption. Es ließen sich VOC-Gaskonzentrationen im umwelt- und arbeitsplatzrelevanten Bereich über vier

Größenordnungen von 0,08 mg/m³ bis 570 mg/m³ Toluol bzw. 0,05 mg/m³ bis 440 mg/m³ m-Xylol einstellen. Die VOC-Konzentrationen in der Gasphase ergaben entsprechend dem Phasengleichgewicht maximale VOC-Konzentrationen im Zellkulturmedium, die mittels manueller „headspace“-Gaschromatographie im Rahmen der Messunsicherheiten bestätigt wurden. Somit konnte auf den Einsatz von die Expositionsbedingungen verfremdenden Lösungsvermittlern im Zellkulturmedium verzichtet werden.

Die Langzeitstabilität der Betriebsparameter in der Apparatur (Schwankung innerhalb 24h: Luftfeuchte +/- 1,5 %, Medientemperatur +/- 0,2 K, zellphysiologischer Medien-pH +/- 0,02) erzielte eine hohe Zellvitalität von rund 87 % nach 24 h Exposition. Die Apparatur eignet sich daher auch für Langzeitexpositionen. Zudem konnten die Kulturen im Anschluss an die Exposition weiterhin kontaminationsfrei inkubiert und damit Spätreaktionen untersucht werden. Die Dichtigkeit der Apparatur und deren Installation in einem geschlossenen Abzug verhinderte eine Kontamination des Labors und Exposition des Experimentators. Zusätzlich ist ein Austausch der Expositionsatmosphäre vor dem Öffnen der Expositionskammer möglich, so dass die Apparatur auch für den Einsatz hochtoxischer Substanzen geeignet ist.

Als Basis der *in vitro* Versuche wurde eine Zellbank von humanen Primärkeratinozyten und -fibroblasten der Passagen 1 bis 3 von 38 Probanden mit normalgesunder Haut und 13 Individuen mit atopischem Ekzem aufgebaut, darunter Zellen aus läsionaler und ekzemfreier Haut desselben Spenders. Die mit 4,0 mm Durchmesser besonders kleinen Hautproben verlangten höchst effektive, zellverlustfreie Isolierungs- und Kultivierungsmethoden. Dabei zeigte sich, dass unter Einsatz hoher Konzentrationen von Antibiotika und Enzymen anstelle von längeren Einwirkzeiten aufgrund geringerer zytotoxischer Wirkung die 3-4fache Anzahl vitaler Zellen resultierte. Die Keratinozytenproliferation wurde durch ein serumfreies Medium mit niedrigem Calciumgehalt und Beigabe von Hydrocortison unterstützt, so dass eine Aussaat-effizienz von 80-90 % erreicht wurde. Gegen die im atopischen Ekzem häufige, multiresistente *Staphylococcus aureus* Infektion wurde eine Dekontaminationsmethode für Hautproben und Keratinozytenkulturen entwickelt. So verbesserte die Behandlung mit 1 % Flucloxacillin den Anteil erfolgreicher Isolierung und Kultivierung proliferierender Primärkeratinozyten aus atopischem Ekzem von 30 % auf ebenfalls 90 %. Das Differenzierungs- und Zytokinsezernierungsverhalten von Keratinozytenkulturen aus läsionaler und ekzemfreier Haut desselben Probanden mit atopischem Ekzem

unterschied sich signifikant. Das war ein klarer Hinweis darauf, dass tatsächlich erstmals Keratinozyten läsionalen Ursprungs kultiviert wurden.

Darüber hinaus wurden organrekonstruierende Methoden für die Entwicklung eines dreidimensionalen, humanen *in vitro*-Modells für das atopische Ekzem evaluiert. Unterschiedliche Biomatrices und Zellkulturmedien unterstützten die durch Luftexposition induzierte Keratinozytendifferenzierung und -stratifizierung im Wesentlichen durch ihren Einfluss auf die Faktoren Adhärenz und Proliferation. So erzielten organische Biomatrices und eine siebentägige submerse Proliferationsphase, im Vergleich zu synthetischen Membranen oder direkter Luftexposition, eine homogenere basale Keratinozytenbesiedelung und dadurch einen höheren Differenzierungsgrad, da nur ein konfluenter Zellrasen – der *in vivo* einem intakten S. basale entspricht – differenziert. Auch Kokulturen mit Fibroblasten führten zu erhöhter Keratinozytenadhäsion. Durch die Freisetzung von Wachstumsfaktoren wie KGF, GM-CSF und IL-6 kam es jedoch zu Hyperproliferation und dyskeratotischen Keratinozyten, die auf spontane, ungerichtete Differenzierung hinwiesen. Als geeignetste Biomatrix erwies sich daher humane tote Dermis: Die luftexponiert kultivierten Keratinozyten wiesen Zonen dichten, mehrschichtigen Keratinozytenwachstums, unterschiedliche Stratifizierungsstadien und die Desquamation flächig keratinisierter Zellschichten auf.

An den gewonnenen submersen Primärkeratinozytenkulturen wurden – als Simulation eines beim atopischen Ekzem durch die Barrierschädigung bedingten Eindringens von VOC in tiefere, generative Hautschichten – Einzelsubstanz- und Kombinationseffekte von Toluol und m-Xylol sowie Wirkungen von Kurzzeit- und Langzeitexpositionen untersucht. Als Zielparame-ter inflammatorischer und immunmodulatorischer Effekte wurden die Zytokine GM-CSF, IL-1 α , IL-6 und TNF α gewählt, da sie Schlüsselfunktionen in der Entwicklung und Aufrechterhaltung des atopischen Ekzems übernehmen. Die überwiegend niedrigen Zytokinkonzentrationen unterlagen einer individuenabhängigen, starken natürlichen Streuung. Die qualitative und quantitative Datenanalyse erfolgte daher mit verschiedenen, einander ergänzenden statistischen Methoden (non-parametrischer Kruskal-Wallis-Rangsummentest, ANOVA und logistische Regressionsanalyse).

Weder konstitutiv noch nach VOC-Exposition erfolgte eine messbare TNF α -Freisetzung, Toluol und m-Xylol stellen demnach keine TNF α -induzierenden Stressfaktoren für die Zellen dar.

Die konstitutive Freisetzung von GM-CSF, IL-1 α und IL-6 aus Zellen gesunder und atopischer Probanden unterschied sich zwar nicht statistisch signifikant, allerdings setzten Keratinozyten aus Atopikerhaut im Mittel doppelt so hohe GM-CSF- und IL-6-Konzentrationen frei wie die Zellen gesunder Probanden. Diese Ergebnisse sprechen dafür, dass die im atopischen Ekzem *in situ* nachgewiesenen erhöhten Zytokin-konzentrationen u. a. keratinozytären Ursprungs sind. Keratinozyten können also immunmodulatorisch via Freisetzung von GM-CSF und IL-6 zur Proliferation und Reifung dendritischer Zellen, zur Makrophagenaktivierung und Mastzell-differenzierung und somit zur Auslösung und Manifestation des atopischen Ekzems beitragen. Die konstitutive Zytokinfreisetzung gesunder und atopisch läsionaler Haut war unterschiedlich korreliert. Die hohe Sequenzhomologie von IL-6- und GM-CSF-Genen und -Proteinen sowie ihre einheitlichen Rezeptorstrukturen deuten auf gemeinsame Signaltransduktions- oder Aktivierungswege hin, welche die korrelierte Freisetzung von GM-CSF und IL-6 aus Keratinozyten gesunder Haut erklären. Bei Keratinozyten atopisch läsionaler Haut korrelierte hingegen verstärkt die Freisetzung von GM-CSF und IL-1 α . Hier ist eine IL-1 α -induzierte Stimulation der GM-CSF-Freisetzung denkbar. Der Fallgruppenvergleich gesund-atopisch zeigte, dass Keratinozyten gesunder Haut nach VOC-Exposition verglichen mit der konstitutiven Freisetzung vermehrt GM-CSF und IL-6 sezernierten. Bei Keratinozyten atopischer Haut wurde hingegen eine gegenüber der Spontansezernierung geringere Freisetzung beobachtet. Dieses Ergebnis lässt sich nach dem derzeitigen Verständnis der Bedeutung der Zytokine im atopischen Ekzem nicht erklären. Aufgrund der *in vivo* gestörten Barrierefunktion der Haut wird ein direkter, irritativer VOC-Effekt auf die generativen Keratinozyten der Basalzellschicht postuliert und eine erhöhte Zytokinfreisetzung erwartet. Allerdings waren die absoluten Zytokinkonzentrationen auch nach VOC-Exposition bei Atopikerzellen weiterhin höher als bei Zellen gesunder Probanden. Bei einigen atopischen Probanden wurde der gegenteilige Effekt beobachtet: Nach hochkonzentrierter VOC-Exposition sezernierten ihre Keratinozyten auch relativ zur Spontanfreisetzung höhere Zytokinkonzentrationen als Zellen gesunder Probanden. Die Ergebnisse wiesen darauf hin, dass vor allem Keratinozyten aus atopisch läsionaler Haut aus ihrem proinflammatorischen Status heraus empfindlicher auf VOC reagieren und unterstützten die allergotoxikologische These von der VOC-sensitiveren atopischen Haut. Da die Auslöser des atopischen Ekzems stark patientenabhängig sind, zeigte nur eine Untergruppe der Probanden eine erhöhte VOC-Empfindlichkeit.

Die konstitutive Zytokinfreisetzung von IL-1 α , IL-6 und GM-CSF aus Keratinozyten läsionaler und nicht läsionaler Haut desselben Probanden unterschied sich signifikant. Auch auf die VOC-Exposition reagierten diese Zellen mit auffallend heterogener GM-CSF- und IL-6-Freisetzung. Daraus folgt, dass in *in vitro* Untersuchungen zwischen Keratinozyten aus läsionaler und ekzempfreier Atopikerhaut unterschieden werden muss. Dieses Ergebnis erklärt Unstimmigkeiten anderer Arbeiten zwischen *in vitro* Untersuchungen von Keratinozyten aus nicht läsionaler Haut und *in situ* Ergebnissen aus atopischem Ekzem.

Die Ergebnisse dieser Arbeit deuten auf synergistische, multiplikative Kombinationswirkungen von niedrigkonzentrierten, umweltrelevanten VOC-Gemischen auf die *in vitro* Zytokinfreisetzung aus Keratinozyten gesunder Haut hin. So war die IL-6-Sekretion häufiger erhöht als nach Expositionen gegenüber 1 MAK VOC Einzelsubstanzen. Die verstärkte GM-CSF-Freisetzung entsprach der nach 3 MAK Toluol-Exposition. Langzeitexpositionen induzierten eine verstärkte IL-1 α -Freisetzung. Auf Zellen aus atopischem Ekzem zeigten sich keine Kombinationseffekte. Allerdings waren die absoluten Zytokinkonzentrationen bei Zellen von Atopikern wiederum häufig höher als bei Zellen gesunder Probanden. Das bedeutet einerseits, dass bei der Beurteilung von umweltrelevanten Einflüssen auf gesunde Haut die MAK-Größen nicht ohne weiteres als Bewertungsmaßstab herangezogen werden können, da diese keine Kombinationseffekte berücksichtigen. Andererseits lässt sich – nach den Ergebnissen des in der vorliegenden Arbeit angewendeten *in vitro* Expositionssystems – der epidemiologisch beobachtete Prävalenzanstieg des atopischen Ekzems nicht mit der Wirkung des umweltrelevant konzentrierten VOC-Gemischs insbesondere auf Primärkeratinozyten aus atopischem Ekzem begründen.

Die hier gewonnenen Erkenntnisse zur natürlichen Variabilität der Zytokinseznierung und zur typischen Größenordnung von Effekten und Messunsicherheiten ermöglichten eine statistisch begründete Versuchsplanung künftiger Experimente. Dazu wurden in einer „power“-Analyse exemplarisch die für Signifikanzniveaus von $\alpha=0,05$ und $\beta=0,8$ benötigte Probanden- und Versuchszahlen für die Zielvariablen GMCSF, IL-6 und IL-1 α festgelegt.

8 Literatur

- ¹**Eaton K.K.** (1982). The incidence of allergy - has it changed? *Clinical Allergy* 12: 107-110.
- ²**Wüthrich B.** (1989). Epidemiology of allergic diseases: are they really on the increase? *International Archives of Allergy and Applied Immunology* 90: 3-10.
- ³**Peat J.K., van den Berg R.H., Green W.F., Mellis C.M., Leeder S.R., Woolcock A.J.** (1994). Changing prevalence of asthma in Australian children. *British Medical Journal* 308: 1591-1596.
- ⁴**Burr M.L., Butland B.K., King S., Vaughan-Williams, E.** (1989). Changes in asthma prevalence: two surveys 15 years apart. *Archives of Disease in Childhood* 64: 1451-1456.
- ⁵**Haahtela T., Lindholm H., Björkstén F., Koskinen S., Laitinen L.A.** (1990). Prevalence of asthma in Finnish young man. *British Medical Journal* 301: 266-268.
- ⁶**Jarvis D., Burney P.** (1998). The epidemiology of allergic diseases. *British Medical Journal* 316: 607-609.
- ⁷**Woolcock A.J., Peat J.K., Trevillion L.M.** (1995). Is the increase in asthma prevalence linked to increase in allergen load? *Allergy* 50: 935-940.
- ⁸**Davies P.** (1989). Seasonal Rhinitis. in Mackay I., Rhinitis. Royal Society of Medicine Services Ltd., London: 97-116.
- ⁹**Rimpelä A.** (1995). Asthma and allergic rhinitis among Finnish adolescents in 1977-1991. *Scandinavian Journal of Social Medicine* 1: 60-65.
- ¹⁰**Ninan T., Russel G.** (1992). Respiratory symptoms and atopy in Aberdeen school children: evidence from two surveys 25 years apart. *British Medical Journal* 304: 873-875.
- ¹¹**Schäfer T., Krämer U., Behrendt H., Kunz B., Überla K., Vieluf D., Ring J.** (1997). Epidemiology of atopic eczema. in Ring J., Behrendt H., Vieluf D., *New Trends in Allergy IV*, Springer Verlag, Berlin, Heidelberg: 21-23.
- ¹²**Schultz-Larsen F., Holm N.V., Henningsen K.** (1986). Atopic dermatitis. A genetic-epidemiologic study in a population based twin sample. *Journal of the American Academy of Dermatology* 15: 487-494.
- ¹³**Schultz-Larsen F.** (1993). Atopic dermatitis. A genetic-epidemiologic study in a population based twin sample. *Journal of the American Academy of Dermatology* 28: 719-723.
- ¹⁴**von Mutius E., Martinez F.D., Fritzsche C., Nicolai T., Reitmeir P., Theimann H.H.** (1994). Skin test reactivity and number of siblings. *British Medical Journal* 308: 692-695.
- ¹⁵**Jarzab J.** (1999). Genetic background of atopy: the role of genes for cytokines. *Revue Francaise d`Allergologie et d`Immunologie Clinique, Numéro Spéciale*: 62-63.
- ¹⁶**Wjst M.** (2000). Gene für Asthma. *Medizinische Genetik* 4: 443-447.
- ¹⁷**Jantunen H.** (ed.) (1997). Air pollution epidemiology report series, Nr.8: Socioeconomic and cultural factors in air pollution epidemiology. Bruxelles: EU.
- ¹⁸**von Mutius E.** (2000). The environmental predictors of allergic disease. *Current Reviews of Allergy and Clinical Immunology* 105 (1): 9-19.
- ¹⁹**Larrick J.W., Buckley C.E., Machamer C.E., Schlagel G.D., Yost J.A., Blessing-Moore J., Jevy D.** (1983). Does hyperimmunoglobulinemia-E protect tropical populations from allergic diseases? *Journal of Allergy and Clinical Immunology* 71: 184-188.

- ²⁰**Ring J.** (1997). Allergy and Modern Society: Does „western life style“ promote the development of allergies? *International Archives of Allergy and Immunology* 113: 7-10.
- ²¹**Björkstén B.** (1995). Genetic and environmental interaction in children. *Progress in Allergy and Clinical Immunology* 3: 97-103.
- ²²**Rusnak C.** (1994). The impact of pollution on allergic disease. *Allergy* 49: 21-27.
- ²³**Takafuji S., Nakagawa T.** (2000). Air pollution and allergy. *Journal of Investigative Allergological and Clinical Immunology* 10: 5-10.
- ²⁴**Albright J.F., Goldstein R.A.** (1996). Airborne pollutants and the immune system. *Otolaryngology - Head & Neck Surgery* 114: 232-238.
- ²⁵**Wüthrich B., Schindler C., Leuenberger P., Ackermann-Liebrich U., SAPALDIA-Team** (1995). Prevalence of atopy and pollinosis in the adult population of Switzerland (SAPALDIA-study). *International Archives of Allergy and Applied Immunology* 106: 149-156.
- ²⁶**Andrae S., Axelson O., Björkstén B., Frederiksson N., Kjellman N.I.M.** (1988). Symptoms of bronchial hyperreactivity and asthma in relation to environmental factors. *Archives of Disease in Childhood* 63 (5): 473-478.
- ²⁷**Schäfer T., Vieluf D., Behrendt H., Krämer U., Ring J.** (1996). Atopic Eczema and other manifestations of atopy: results of a study in East and West Germany. *Allergy* 51: 532-539.
- ²⁸**Krämer U., Koch T., Ranft U., Ring J., Behrendt H.** (2000). Traffic-related air pollution is associated with atopy in children living in urban areas. *Epidemiology* 11: 64-70.
- ²⁹**Keil U., Weiland S.K., Duhme H., Chambless L.** (1996). The international study of asthma and allergies in childhood (ISAAC): objectives and methods; results from German ISAAC centres concerning traffic density and wheezing and allergic rhinitis. *Toxicology Letters* 86: 99-103.
- ³⁰**Wichmann H.E.** (1996). Possible explanation for the different trends of asthma and allergy in East and West Germany. *Clinical and Experimental Allergy* 26: 621-623.
- ³¹**Wichmann H.E.** (1997). Postwar increase of allergies in the West, but not in the East of Germany. in Ring J., Behrendt H., Vieluf D., *New Trends in Allergy IV*, Springer Verlag, Berlin, Heidelberg: 17-19.
- ³²**Magnussen H., Jörres R.** (1993). Effects of air pollution on the prevalence of asthma and allergy: lessons from the German reunification. *Thorax* 48: 879-881.
- ³³**von Mutius E., Martinez F.D., Fritzsch C., Nicolai T., Roell G., Thiemann H.H.** (1994). Prevalence of asthma and atopy in two areas of West and East Germany. *American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine* 149: 358-364.
- ³⁴**Nowak D., Heinrich J., Jörres R., Wassmer G., Berger J., Beck E., Boczor S., Claussen M., Wichmann H.E., Magnussen H.** (1996). Prevalence of respiratory symptoms, bronchial hyperresponsiveness and atopy among adults: West and East Germany. *European Respiratory Journal* 9: 2541-2552.
- ³⁵**Behrendt H., Friedrichs, K.H., Krämer U., Hitzfeld B., Becker W.M., Ring J.** (1995). The role of outdoor and indoor air pollution in allergic diseases. *Progress in Allergy and Clinical Immunology* 3: 83-89.
- ³⁶**Krämer U., Behrendt H., Dolgner R., Willer H., Schlipköter H.W.** (1997). Impact of SO₂ and TSP on allergic manifestations and non-allergic respiratory diseases - results from the study on school-beginners in East and West Germany 1991-1994. in Ring J., Behrendt H., Vieluf D., *New Trends in Allergy IV*, Springer Verlag, Berlin, Heidelberg: 45-47.

- ³⁷ **Wjst M., Reitmeir P., Dold S., Wulff A., Nicolai T., von Löffelholz-Colberg E., von Mutius E.** (1993). Road traffic and adverse effects on respiratory health in children. *British Medical Journal* 307: 596-400.
- ³⁸ **Krämer U., Behrendt H., Ring J.** (1997). Air pollution as risk factor for allergy: the East-West German experience. in Ring J., Behrendt H., Vieluf D., *New Trends in Allergy IV*, Springer Verlag, Berlin, Heidelberg: 25-35.
- ³⁹ **Krämer U., Behrendt H., Dolgner R., Ranft U., Ring J., Willer H., Schlipkötter H.W.** (1999). Airway disease and allergies in East and West German children during the first 5 years after reunification: time trends and the impact of sulfur dioxide and total suspended particles. *International Journal of Epidemiology* 28: 865-873.
- ⁴⁰ **von Mutius E., Weiland S.W., Fritzsche C., Duhme H., Keil U.** (1998). Increasing prevalence of hay fever and atopy among children in Leipzig, east Germany. *The Lancet* 351: 862-866.
- ⁴¹ **Schäfer, T., Krämer U., Dockery D., Vieluf D., Behrendt H., Ring J.** (1999). What makes a child allergic? Analysis of risk factors for allergic sensitization in preschool children from East and West Germany. *Allergy and Asthma Proceedings* 20 (1): 23-27.
- ⁴² **Ring J., Krämer U., Schäfer T., Abeck D., Vieluf D., Behrendt H.** (1999). Environmental risk factors for respiratory and skin atopy: results from epidemiological studies in former East and West Germany. *International Archives of Allergy and Immunology* 118: 403-407.
- ⁴³ **Behrendt H.** (1992). Allergotoxikologie: Ein Forschungskonzept zur Untersuchung des Einflusses von Umweltschadstoffen auf die Allergieentstehung. in Ring J., *Allergieforschung: Probleme, Strategien und klinische Relevanz*. MMV Medizin-Verlag, München: 123-130.
- ⁴⁴ **Behrendt H., Krämer U., Schäfer T., Kasche A., Eberlein-König B., Darsow U., Ring J.** (2001). Allergotoxicology – a research concept to study the role of environmental pollutants in allergy. *Allergy & Clinical Immunology International* 133: 122-128.
- ⁴⁵ **Behrendt H., Becker W.M., Friedrichs K.H., Darsow U., Tomingas R.** (1992). Interaction between aeroallergens and airborne particulate matter. *International Archives of Allergy and Immunology* 99: 425-428.
- ⁴⁶ **Behrendt H., Becker W.M., Darsow U., Friedrichs K.H.** (1993). Airborne particulates alter aeroallergen composition and release. *Journal of Allergy and Clinical Immunology* 91: 277.
- ⁴⁷ **Behrendt H., Becker W.M., Fritzsche C., Sliwa-Tomczok W., Tomczok J., Friedrichs K.H., Ring J.** (1997). Air pollution and allergy: experimental studies on modulation of allergen release from pollen by air pollutants. *International Archives of Allergy and Immunology* 113: 69-74.
- ⁴⁸ **Thomas P., Strube W., Przybilla, B.** (1997). Altered skin prick test reactivity and histamin release with extracts from pollen exposed to pollutants. *International Archives of Allergy and Immunology* 113: 264-265.
- ⁴⁹ **Risse U., Tomczok J., Huss-Marp J., Darsow U., Behrendt H.** (2000). Health-relevant interaction between airborne particulate matter and aeroallergens (pollen). *Journal of Aerosol Science* 31: S27-S28.
- ⁵⁰ **Kondo H., Ichikawa Y., Imokawa G.** (1998). Percutaneous sensitization with allergens through barrier-disrupted skin elicits a Th2-dominant cytokine response. *European Journal of Immunology* 28: 769-779.
- ⁵¹ **Ogawa H., Yoshiike T.** (1993). A speculative view of atopic dermatitis: barrier dysfunction in pathogenesis. *Journal of Dermatological Science* 5: 197-204.

- ⁵²**Devalia J.L., Rusznak C., Davies R.J.** (1994). Air pollution in the 1990s - cause of increased respiratory disease? *Respiratory Medicine* 88: 241-244.
- ⁵³**Devalia J.L., Rusznak C., Wang J., Khair O.A., Abdelaziz M.M., Caldéron M.A., Davies R.J.** (1996). Air pollutants and respiratory hypersensitivity. *Toxicology Letters* 86: 169-176.
- ⁵⁴**Magnussen H., Jörres R., Wagner H.M., von Nieding G.** (1990). Relationship between the airway response to inhaled sulfur dioxide, isocapnic hyperventilation, and histamine in asthmatic subject. *International Archives of Occupational and Environmental Health* 62: 485-491.
- ⁵⁵**Jörres R., Magnussen H.** (1990). Airway response of asthmatics after 30 min exposure, at resting ventilation, to 0,25 ppm NO₂ or 0,5 ppm SO₂. *European Respiratory Journal* 3: 132-137.
- ⁵⁶**Molfino A.T., Wright S.C., Katz I., Tarlo S., Silverman F., McClean P.A., Szalai J., Raizenne M., Slutsky A.S., Zamel N.** (1991). Effect of low concentrations of ozone on inhaled allergen responses in asthmatic subjects. *The Lancet* 338: 199-203.
- ⁵⁷**Wang J.H., Devalia J.L., Duddle J.M., Hamilton S.A. Davies R.J.** (1995). Effect of six-hour exposure to nitrogen dioxide on early-phase nasal response to allergen challenge in patients with a history of seasonal allergic rhinitis. *Journal of Allergy and Clinical Immunology* 96: 669-676.
- ⁵⁸**Tunnicliffe W.S., Burge P.S., Ayres J.G.** (1994). Effect of domestic concentrations of nitrogen dioxide on air way responses to inhaled allergen in asthmatic patients. *The Lancet* 344: 1733-1736.
- ⁵⁹**Devalia J.L., Rusznak C., Herdman M.J., Trigg C.J., Tarraf H., Davies R.J.** (1994). Effect of nitrogen dioxide and sulfur dioxide on airway response of mild asthmatic patients to allergen inhalation. *The Lancet* 344: 1668-1671.
- ⁶⁰**Blomberg A., Krishna M., Bocchino V., Biscione G.L., Shute J., Kelly F.J., Frew A.J., Holgate S.T., Sandström T.** (1997). The inflammatory effects of 2 ppm NO₂ on the airways of healthy subjects. *American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine* 156: 418-424.
- ⁶¹**Sandstrom T., Stjernberg N., Eklund A., Ledin M.C., Bjermer L., Kolmodin-Hedman B., Lindstrom K., Rosenhall L., Angstrom T.** (1991). Inflammatory cell response in bronchoalveolar lavage fluid after nitrogen dioxide exposure of healthy subjects: a dose-response study. *European Respiratory Journal* 4: 332-339.
- ⁶²**Diaz-Sanchez D., Tsien A., Casillas A., Dotson A.R., Saxon A.** (1996). Enhanced nasal cytokine production in human beings after in vivo challenge with diesel exhaust particles. *Journal of Allergy and Clinical Immunology* 98: 114-123.
- ⁶³**Otto D.A., Hudnell H.K., House D.E., Molhave L., Counts W.** (1992). Exposure of humans to a volatile organic mixture. I. Behavioral assessment. *Archives of Environmental Health* 47: 23-30.
- ⁶⁴**Hudnell H.K., Otto D.A., House D.E., Molhave L.** (1992). Exposure of humans to volatile organic mixture. II. Sensory. *Archives of Environmental Health* 47: 31-38.
- ⁶⁵**Harving H., Dahl R., Molhave L.** (1991). Lung function and bronchial reactivity in asthmatics during lung exposure to volatile organic compounds. *American Journal of Respiratory Disease* 143: 751-754.
- ⁶⁶**Molhave L., Pedersen O.F.** (1984). Measurements of alveolar concentrations of toluene. *International Archives of Occupational and Environmental Health* 54: 65-71.
- ⁶⁷**Andersen I., Lundqvist G.R. Molhave L., Pedersen O.F., Proctor D.F., Vaeth M., Wyon D.P.** (1983). Human response to controlled levels of toluene in six-hour

exposures. *Scandinavian Journal of Working and Environmental Health* 9 (5): 405-408.

⁶⁸**Koren H.S., Graham D.E., Devlin R.B.** (1992). Exposure of humans to a volatile organic mixture. III. Inflammatory response. *Archives of Environmental Health* 47: 39-44.

⁶⁹**Meggs W.J.** (1993). Neurogenic inflammation and sensitivity to environmental chemicals. *Environmental Health Perspectives* 101: 234-238.

⁷⁰**Rusznak C., Devalia J.L., Davies R.J.** (1994). The impact of pollution on allergic diseases. *Allergy* 49: 21-27.

⁷¹**Kienast K., Muller-Quernheim J., Knorst M., Lubjuhn S., Ferlinz R.** (1994). In vitro study of human alveolar macrophage and peripheral blood mononuclear cell reactive oxygen-intermediates release induced by sulfur dioxide at different concentrations. *Lung* 172: 335-345.

⁷²**Devalia J.L., Bayram H., Rusznak C., Calderon M., Snapsford R.J., Abdelaziz M.A., Wang J., Davies R.J.** (1997). Mechanisms of pollution-induced airway disease: in vitro studies in the upper and lower airways. *Allergy* 52 (Suppl.38):45-51, 57-58.

⁷³**Devalia J.L., Bayram H., Abdelaziz M.A., Snapsford R.J., Davies R.J.** (1999). Differences between cytokine release from bronchial epithelial cells of asthmatic patients and non-asthmatic subjects: effect of exposure to diesel exhaust particles. *International Archives of Allergy and Immunology* 118: 437-439.

⁷⁴**Hitzfeld B., Friedrichs K.H., Behrendt H.** (1992). In vitro interaction between human basophiles and polymorphnuclear granulocytes: effect of airborne particulate matter. *International Archives of Allergy and Immunology* 99: 390-393.

⁷⁵**Hitzfeld B., Friedrichs K.H., Ring J., Behrendt H.** (1997). Airborne particulate matter modulates the production of reactive oxygen species in human polymorphnuclear granulocytes. *Toxicology* 120: 185-195.

⁷⁶**Thomas P., Strube W., Przybilla B.** (1997). Exposure of pollen to SO₂, NO₂ or O₃: influence on protein release and histamine releasing capacity in vitro. in Ring J., Behrendt H., Vieluf D., *New Trends in Allergy IV*, Springer Verlag, Berlin, Heidelberg: 105-108.

⁷⁷**Idson B.** (1978). Hydration and perkutanous absorption. *Current Problems of Dermatology* 7: 132-141.

⁷⁸**Platts-Mills T., Chapman M., Mitchell B. et al.** (1991). Role of inhalant allergens in atopic eczema. in Ruzicka T., Ring J., Przybilla B., *Handbook of Atopic Eczema*. Springer-Verlag, Berlin, Heidelberg, New York: 192-203.

⁷⁹**Adinoff A., Tellez P., Clark R.** (1988). Atopic dermatitis and aeroallergen contact sensitivity. *Journal of Allergy and Clinical Immunology* 81: 736-742.

⁸⁰**Darsow U., Vieluf D., Ring J.** (1996). The atopy patch test: an increased rate of reactivity in patients who have an air-exposed pattern of atopic eczema. *British Journal of Dermatology* 135: 182-186.

⁸¹**Eberlein-König B., Przybilla B., Kühnl P., Pechak J., Gebefügi I., Kleinschmidt J., Ring J.** (1998). Influence of airborne nitrogen dioxide or formaldehyde on parameters of skin function and cellular activation in patients with atopic eczema and control subjects. *Journal of Allergy and Clinical Immunology* 101: 141-143.

⁸²**Kezic S., Monster A.C., Krüse J., Verbeck M.M.** (2000). Skin absorption of some vaporous solvents in volunteers. *International Archives of Occupational and Environmental Health* 73: 415-422.

- ⁸³**Brooke I., Cocker J., Delic J.I., Payne M., Jones K., Gregg N.C., Dyne D.** (1998). Dermal uptake of solvents from the vapour phase: an experimental study in humans. *Annales of Occupational Hygiene* 42 (8): 531-540.
- ⁸⁴**Riihimäki V., Pfäffli P.** (1978). Percutaneous absorption of solvent vapors in man. *Scandinavian Journal of Work Environment and Health* 4: 73-85.
- ⁸⁵**Engström K., Husman K., Riihimäki V.** (1977). Percutaneous absorption of m-Xylene in man. *International Archives of Occupational and Environmental Health* 39: 181-189.
- ⁸⁶**McKenzie R.C., Sauder D.N.** (1990). The role of keratinocyte cytokines in inflammation and immunity. *Journal of Investigative Dermatology* 95: 105S-107S.
- ⁸⁷**Kupper T.S.** (1990). The activated keratinocyte: a model for inducible cytokine production by non-bone marrow derived cells in cutaneous inflammatory and immune response. *Journal of Investigative Dermatology* 94: 146S-150S.
- ⁸⁸**Kupper T.S.** (1990). Immune and inflammatory processes in cutaneous tissues. mechanisms and speculations. *Journal of Clinical Investigation* 86: 1783-1789.
- ⁸⁹**Goodman R.E., Nestle F., Naidu Y.M., Green J.M., Thompson C.B., Nickoloff B.J., Turka L.A.** (1994). Keratinocyte-derived T cell costimulation induces preferential production of IL-2 and IL-4 but not IFN-gamma. *Journal of Immunology* 152: 5189-5198.
- ⁹⁰**Barker J.N.W.N., Mitra V.M., Griffith C.E.M., Dixit V.M., Nickoloff B.J.** (1991). Keratinocytes as initiators of inflammation. *The Lancet* 337: 211-214.
- ⁹¹**Ansel J., Perry P., Brown J., Damm D., Phan T., Hart C., Luger T., Hefeneider S.** (1990). Cytokine modulation of keratinocyte cytokines. *Journal of Investigative Dermatology* 94: 101S-107S.
- ⁹²**Matsue H., Cruz P., Bergstresser P.R., Takashima A.** (1992). Cytokine expression by epidermal cell subpopulations. *Journal of Investigative Dermatology* 99: 42S-54S.
- ⁹³**Kimber I.** (1994). Cytokines and regulation of allergic sensitization to chemicals. *Toxicology* 93: 1-11.
- ⁹⁴**Yawalkar N., Limat A., Brand C.U., Braathen L.R.** (1996). Constitutive expression of both subunits of interleukin-12 in human keratinocytes. *Journal of Investigative Dermatology* 106: 80-83.
- ⁹⁵**Howie S.E.M., Aldridge R.D., McVittie E., Forsy R.J., Sands C., Hunter J.A.A.** (1995). Epidermal keratinocyte production of interferon- γ immunoreactive protein and mRNA is an early event in allergic contact dermatitis. *British Journal of Dermatology* 132: 657.
- ⁹⁶**Dinarello C.A.** (1997). Role of pro- and anti-inflammatory cytokines during inflammation: experimental and clinical findings. *Journal of Biological Regulators and Homeostatic Agents* 11: 91-103.
- ⁹⁷**Corsini E., Bruccoleri A., Marinovich M., Galli C.L.** (1995). In vitro mechanism(s) of ultraviolet-induced tumor necrosis factor-alpha release in a human keratinocyte cell line. *Photodermatology, Photoimmunology & Photomedicine* 11: 112-118.
- ⁹⁸**Matsuura K., Otsuka F., Fujisawa H.** (1998). Effects of interferons on tumor necrosis factor alpha production from human keratinocytes. *Cytokine* 10: 500-505.
- ⁹⁹**Fujisawa H., Wang B., Sauder D.N., Kondo S.** (1997). Effects of interferons on the production of interleukin-6 and interleukin-8 in human keratinocytes. *Journal of Interferon Cytokine Research* 17: 347-353.
- ¹⁰⁰**Kupper T.S., Lee F., Birchall N., Clark S., Dower S.** (1988). Interleukin 1 binds to specific receptors on human keratinocytes and induces granulocyte macrophage

colony stimulating factor mRNA and protein: a potential autocrine role for interleukin in epidermis. *Journal of Clinical Investigation* 82: 1787-1792.

¹⁰¹**Owsianowski M., Busch F.W., Bonnekoh B., Orfanos C.E.** (1991). Long-term cultured adult human keratinocytes secrete granulocyte-macrophage colony-stimulating factor but not interleukin-3 after cytokine exposure in vivo. *Skin Pharmacology* 4: 158-164.

¹⁰²**Kutsch C.L., Norris D.A., Arend W.P.** (1993). Tumor necrosis factor-alpha induces interleukin-1alpha and interleukin-1alpha-receptor antagonist production by cultured human keratinocytes. *Journal of Investigative Dermatology* 101: 79-85.

¹⁰³**Li J., Farthing P.M., Ireland G.W., Thornhill M.H.** (1996). IL-1alpha and IL-6 production by oral and skin keratinocytes: similarities and differences in response to cytokine treatment in vitro. *Journal of Oral Pathology and Medicine* 25: 157-162.

¹⁰⁴**Kondo S., Kooshesh F., Sauder D.N.** (1997). Penetration of keratinocyte-derived cytokines into basement membrane. *Journal of Cell Physiology* 171: 190-195.

¹⁰⁵**Carlos T.M., Harlan J.M.** (1990). Membrane proteins involved in phagocyte adherence to endothelium. *Immunology Review* 114: 6-28.

¹⁰⁶**Singer K.H., Tuck D.T., Sampson H.A., Hall R.P.** (1989). Epidermal keratinocytes express the adhesion molecule intercellular adhesion molecule-1 in inflammatory dermatoses. *Journal of Investigative Dermatology* 93: 746-750.

¹⁰⁷**Sporn S.A., Eierman D.F., Johnson C.E., Morris J., Martin G., Ladner M., Haskill S.** (1990). Monocyte adherence results in selective induction of novel genes sharing homology with mediators of inflammation and tissue repair. *Journal of Immunology* 144: 4434-4441.

¹⁰⁸**Boxman I.L., Ruw Hof C., Boerman O.C., Lowik C.W., Ponc M.** (1996). Role of fibroblasts in the regulation of proinflammatory interleukin IL-1, IL-6 and IL-8 levels induced by keratinocyte-derived IL-1. *Archives of Dermatological Research* 288: 391-398.

¹⁰⁹**Larsen C.G., Anderson A.O., Oppenheim J.J., Matsushima K.** (1989). Production of interleukin-8 by human dermal fibroblasts and keratinocytes in response to interleukin-1 or tumor necrosis factor. *Immunology* 68: 31-36.

¹¹⁰**Breuhahn K., Mann A., Müller G., Wilhelmi A. Schirmacher P., Enk A., Blessing M.** (2000). Epidermal overexpression of granulocyte-macrophage colony-stimulating factor induces both keratinocyte proliferation and apoptosis. *Cell Growth and Differentiation* 11: 111-121.

¹¹¹**Grossman R.M., Krueger J., Yourish D., Granelli-Piperno A., Murphy D.P., May L.T., Kupper T.S., Sehgal P.B., Gottlieb A.B.** (1989). Interleukin 6 is expressed in high levels in psoriatic skin and stimulates proliferation of cultured human keratinocytes. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA* 86: 6367-6371.

¹¹²**Tuschil A., Lam C., Haslberger A., Lindley I.** (1992). Interleukin-8 stimulates calcium transients and promotes epidermal cell proliferation. *Journal of Investigative Dermatology* 99: 249-298.

¹¹³**Takematsu H., Tagami H.** (1993). Mode of release of interleukin-8 from proliferating human epidermal keratinocytes in vitro. *Experimental Dermatology* 2: 121-124.

¹¹⁴**Bock M., Meisel S., Erdinger L., Fried M., Deichmann M., Waldmann V., Jäckel A., Näher H.** (1999/2000). Einfluß von Luftschadstoffen auf die Freisetzung von Entzündungsmediatoren aus Keratinozyten. Vortrag 40. Jahrestagung DDG, Hamburg, 1999. Abstract 21.02.07, *Hautarzt* 50, Suppl. 1: S30 / in Plettenberg A.,

Meigel W.N., Moll I.: Dermatologie an der Schwelle zum neuen Jahrtausend; Springer-Verlag, Berlin, Heidelberg, New York: 239-241.

¹¹⁵**Ushio H., Nohara K., Fujimaki H.** (1999). Effect of environmental pollutants on the production of pro-inflammatory cytokines by normal human dermal keratinocytes. *Toxicology Letters* 105: 17-24.

¹¹⁶**Carroll S., Wood E.J.** (2000). Exposure of human keratinocytes and fibroblasts in vitro to nickel sulphate ions induces synthesis of stress proteins Hsp72 and Hsp90. *Acta Dermato-Venereologica* 80: 94-97.

¹¹⁷**Sainte-Marie I., Jumbou O., Tenaud I., Dreno B.** (1998). Comparative study of the in vitro inflammatory activity of three nickel salts on keratinocytes. *Acta Dermato-Venereologica* 78: 169-172.

¹¹⁸**Lisby S., Müller K.M., Jongeneel C.V., Saurat J.-H., Hause C.** (1995). Nickel and skin irritants up-regulate tumor necrosis factor- α mRNA in keratinocytes by different but potentially synergistic mechanisms. *International Immunology* 7: 343-352.

¹¹⁹**Piguet P.F., Grau G.E., Hauser C., Vassalli P.** (1991). Tumor necrosis factor is a critical mediator in hapten induced irritant and contact hypersensitivity reactions. *Journal of Experimental Medicine* 173: 673-679.

¹²⁰**Kock A., Schwarz T., Kirnbauer R., Urbanski A., Perry P., Ansel J.C., Luger T.A.** (1990). Human keratinocytes are a source for tumor necrosis factor alpha: evidence for synthesis and release upon stimulation with endotoxin or ultraviolet light. *Journal of Experimental Medicine* 172: 1609-1614.

¹²¹**Leverkus M., Yaar M., Eller M.S., Tang E.H., Gilchrest B.A.** (1998). Post-transcriptional regulation of UV induced TNF- α expression. *Journal of Investigative Dermatology* 110: 353-357.

¹²²**Regnier M., Asselineau D., Lenoir M.C.** (1990). Human epidermis reconstructed on dermal substrates in vitro: an alternative to animals in skin pharmacology. *Skin Pharmacology* 3: 70-85.

¹²³**Ponec M., Kempenaar J.** (1995). Use of human skin recombinants as an in vitro model for testing the irritation potential of cutaneous irritants. *Skin Pharmacology* 8: 49-59.

¹²⁴**van Dorp A.G.M., Verhoeven M.C.H., Koerten H.K., van Blitterswijk C.A., Ponec M.** (1999). Bilayered biodegradable poly(ethylene glycol)/poly(butylene terephthalate) copolymer (PolyactiveTM) as a substrate for human fibroblasts and keratinocytes. *Journal of Biomedical Materials Research* 47: 292-300.

¹²⁵**Vicanova J., Mommaas A.M., Mulder A.A., Koerten H.K., Ponec M.** (1996). Impaired desquamation in the in vitro reconstructed human epidermis. *Cell & Tissue Research* 286: 115-122.

¹²⁶**Ponec M., Boelsma E., Weerheim A., Mulder A., Bouwstra J., Mommaas M.** (2000). Lipid and ultrastructural characterization of reconstructed skin models. *International Journal of Pharmacology* 203: 211-225.

¹²⁷**Vicanova J., Boyce S.T., Harriger M.D., Weerheim A.M., Bouwstra J.A., Ponec M.** (1998). Stratum corneum lipid composition and structure in cultured skin substitutes is restored to normal after grafting onto athymic mice. *Journal of Investigative Dermatology Symposium Proceedings* 3: 114-120.

¹²⁸**Supp A.P., Wickett R.R., Swope V.B., Harriger M.D., Hoath S.B., Boyce S.T.** (1999). Incubation of cultured skin substitutes in reduced humidity promotes cornification in vitro and stable engraftment in athymic mice. *Wound Repair and Regeneration* 7: 226-237.

- ¹²⁹**Asbill C., Kim N., El-Kattan A., Creek K., Wertz P., Michniak B.** (2000). Evaluation of a human bio-engineered skin equivalent for drug permeation studies. *Pharmacological Research* 17: 1092-1097.
- ¹³⁰**Black A.F., Berthod F., L'Heureux N., Germain L., Auger F.A.** (1998). In vitro reconstruction of a human capillary-like network in a tissue-engineered skin equivalent. *FASEB Journal* 12: 1331-1340.
- ¹³¹**Cario-Andre M., Bessou S., Gontier E., Moresca V., Picardo M., Taieb A.** (1999). The reconstructed epidermis with melanocytes: a new tool to study pigmentation and photoprotection. *Cell Mol Biol (Noisy-le-grand)* 45: 931-942.
- ¹³²**Berking C, Herlyn M.** (2001). Human skin reconstruct models: a new application for studies of melanocyte and melanoma biology. *Histology and Histopathology* 16: 669-74.
- ¹³³**Regnier M., Staquet M.J., Schmitt D., Schmidt R.** (1997). Integration of Langerhans cells into a pigmented reconstructed human epidermis. *Journal of Investigative Dermatology* 109: 510-512.
- ¹³⁴**Regnier M., Patwardhan A., Scheynius A., Schmidt R.** (1998). Reconstructed human epidermis composed of keratinocytes, melanocytes and Langerhans cells. *Medical & Biological Engineering & Computing* 36: 821-824.
- ¹³⁵**O'Leary R., Arrowsmith M., Wood E.J.** (1997). The use of an in vitro wound healing model, the tri-layered skin equivalent, to study the effects of cytokines on the repopulation of the wound defect by fibroblasts and keratinocytes. *Biochemical Society Transactions* 25: 369S
- ¹³⁶**Korting H.C., Patzak U., Schaller M., Maibach H.I.** (1998). A model of human cutaneous candidosis based on reconstructed human epidermis for the light and electron microscopic study of pathogenesis and treatment. *Journal of Infection* 36: 259-267.
- ¹³⁷**Saiag P., Coulomb B., Lebreton C., Bell E., Dubertret L.** (1985). Psoriatic fibroblasts induce hyperproliferation of normal keratinocytes in a skin equivalent model in vitro. *Science* 230: 669-672.
- ¹³⁸**Bessou S., Gauthier Y., Surleve-Bazeille J.E., Pain C., Taieb A.** (1997). Epidermal reconstructs in vitiligo: an extrinsic factor is needed to trigger the disease. *British Journal of Dermatology* 137: 890-897.
- ¹³⁹**Amsellem C., Haftek M., Hoyo E., Thivolet J., Schmitt D.** (1993). Evidence of increased keratinocyte proliferation in air-liquid interface cultures of non-bullous congenital ichthyosiform erythroderma. *Acta Dermato-Venereologica* 73: 262-269.
- ¹⁴⁰**Rasmussen R.E.** (1984). In vitro systems for exposure of lung cells to NO₂ and O₃. *Journal of Toxicology and Environmental Health* 13: 397-411.
- ¹⁴¹**Pace D.M., Thompson J.R., Aftonomos B.T., Holck H.G.O.** (1961). The effects of NO₂ and salts of NO₂ upon established cell lines. *Canadian Journal of Biochemistry and Physiology* 39: 1247-1255.
- ¹⁴²**Pace D.M., Landolt P.A., Aftonomos B.T.** (1969). Effect of ozone of cells in vitro. *Archives of Environmental Health* 18: 165-170.
- ¹⁴³**Postlethwait E.M., Langford S.D., Bidani A.** (1991). Transfer of NO₂ through pulmonary epithelial lining fluid. *Toxicology and Applied Pharmacology* 109: 467-471.
- ¹⁴⁴**Pryor W.A.** (1992). How far does ozone penetrate into the pulmonary air/tissue boundary before it reacts? *Free Radical Biology & Medicine* 12: 83-88.
- ¹⁴⁵**Valentine R.** (1985). An in vitro system for exposure of lung cells to gases: effects of ozone on rat macrophages. *Journal of Toxicology and Environmental Health* 16: 115-126.

- ¹⁴⁶**Tu B, Wallin A., Moldéus P., Cotgreave I.A.** (1995). Cytotoxicity of NO₂ gas to cultured human and murine cells in an inverted monolayer exposure system. *Toxicology* 96: 7-18.
- ¹⁴⁷**Baker F.D., Tumasonis C.F.** (1971). Modified roller drum apparatus for analyzing effects of pollutant gases on tissue culture systems. *Atmospheric Environment* 5: 891-893.
- ¹⁴⁸**Bolton D.C., Tarkington B.K., Zee Y.C., Osebold J.W.** (1982). An in vitro system for studying the effects of ozone on mammalian cell cultures and viruses. *Environmental Research* 27: 466-475.
- ¹⁴⁹**Guerrero R.R., Rounds D.E., Booher J., Olson R.S., Hackney J.D.** (1979). Ozone sensitivity in aging WI-38 cells based on acid phosphatase content. *Archives of Environmental Health* 34: 407-412.
- ¹⁵⁰**Wenzel D.G., Wrobel W.J., Kotek J.J., Morgan D.L.** (1979). An ozone-generating system and chamber for testing injury to cultured cells. *Archives of Environmental Health* 34: 454-460.
- ¹⁵¹**Persinger R.L., Blay W.M., Heintz N.H., Hemenway D.R., Janssen-Heininger Y.M.W.** (2001). Nitrogen dioxide induces death in lung epithelial cells in a density-dependant manner. *American Journal of Respiratory Cell and Molecular Biology* 24: 583-590.
- ¹⁵²**Alink G.M., van der Hoeven J.C.M., Debets F.M.H., van de Ven W.S.M., Koeman J.H.** (1979). A new exposure model for an in vitro testing of effects of gaseous pollutants on mammalian cells by means of gas diffusion through plastic films. *Chemosphere* 2: 63-73.
- ¹⁵³**Konings A.W.T.** (1986). Mechanisms of ozone toxicity in cultured cells. I. Reduced clonogenic ability of polyunsaturated fatty acid-supplemented fibroblasts. Effect of vitamin E. *Journal of Toxicology and Environmental Health* 18: 491-497.
- ¹⁵⁴**Mückter H., Zwing M., Bäder S., Marx T., Doklea E., Liebl B., Fichtl B., Georgieff M.** (1998). A novel apparatus for the exposure of cultured cells to volatile agents. *Journal of Pharmacological and Toxicological Methods* 40: 63-69.
- ¹⁵⁵**Voisin C., Aerts C., Jakubczk E., Tonnel A.B.** (1977). La culture cellulaire en phase gazeuse. Un nouveau modèle expérimental d'étude in vitro des activités des macrophages alvéolaires. *Bulletin Européen de Physio-Pathologie Respiratoire* 13: 69-82.
- ¹⁵⁶**Aerts C., Tonnel A.B., Dutriez N., Voisin C.** (1979). Sensibilité in vitro des macrophages alvéolaires aux composants gazeux de la fumée de tabac. *Les Kolloques de L'INSERM* 84: 177-186.
- ¹⁵⁷**Mögel M., Krüger E., Krug H.F., Seidel A.** (1998). A new coculture-system of bronchial epithelial and endothelial cells as a model for studying ozone effects on airway tissue. *Toxicology Letters* 96, 97: 25-32.
- ¹⁵⁸**Kienast K., Müller-Quernheim J., Knorst M., Lubjuhn S., Ferlinz R.** (1994). In vitro study of human alveolar macrophage and peripheral blood mononuclear cell reactive oxygen-intermediates release induced by sulfur dioxide at different concentrations. *Lung* 172: 335-345.
- ¹⁵⁹**Wallaert B., Fahy O., Tsicopoulos A., Gosset Ph., Tonnel A.B.** (2000). Experimental systems for mechanistic studies of toxicant induced lung inflammation. *Toxicology Letters* 112-113.
- ¹⁶⁰**Arsalane K., Gosset P., Vanhee D., Voisin C., Hamid Q., Tonnel A.B., Wallaert B.** (1995). Ozone stimulates synthesis of inflammatory cytokines by alveolar macrophages in vitro. *American Journal of Respiratory Cell and Molecular Biology* 13: 60-68.

- ¹⁶¹**Samuelson G.S., Rasmussen R.E., Nair B.K., Crocker T.T.** (1978). Novel culture and exposure system for measurement of effects of airborne pollutants on mammalian cells. *Environmental Science and Technology* 12: 426-430.
- ¹⁶²**Behnke W., Holländer W., Koch W., Nolting F., Zetzsch C.** (1988). A smog chamber for studies of the photochemical degradation of chemicals in the presence of aerosols. *Atmosphere and Environment* 22: 1113.
- ¹⁶³**Tarkington B.K., Wu R., Sun W.M., Nikula K.J., Wilson D.W., Last J.A.** (1994). In vitro exposure of tracheobronchial epithelial cells and of tracheal explants to ozone. *Toxicology* 88: 51-68.
- ¹⁶⁴**Abe S., Takizawa H., Sugawara I., Kudoh S.** (2000). Diesel exhaust (DE)-induced cytokine expression in human bronchial epithelial cells: a study with a new cell exposure system to freshly generated DE *in vitro*. *American Journal of Respiratory Cell and Molecular Biology* 22: 296-303.
- ¹⁶⁵**Knebel J., Ritter D., Aufderheide M.** (1998). Development of an in vitro system for studying effects of native and photochemical transformed gaseous compounds using an air/liquid culture technique. *Toxicology Letters* 96, 97: 1-11.
- ¹⁶⁶**Campbell D.B.** (1996). Extrapolation from animals to man. The integration of pharmacokinetics and pharmacodynamics. *Annales of the New York Academy of Sciences* 801: 116-135.
- ¹⁶⁷**Doull J.** (1993). Extrapolation of animal results to man. *The Journal of Toxicological Sciences* 18: 69-71.
- ¹⁶⁸**Schiebler T.H.** (1996). Histologie: Zytologie, Histologie und mikroskopische Anatomie des Menschen unter Berücksichtigung der Histophysiologie. 4. Aufl, Springer-Verlag, Berlin, Heidelberg, New York.
- ¹⁶⁹**Ross M.H., Romrell L.J., Kaye G.I.** (1995). Histology - a text and atlas. 3. Aufl., Williams & Wilkins, Baltimore.
- ¹⁷⁰**Leonhardt H.** (1990). Histologie, Zytologie und Mikroanatomie des Menschen. 8. Aufl., (Taschenlehrbuch der gesamten Anatomie, Bd.3), Thieme Verlag, Stuttgart, New York.
- ¹⁷¹**Histonet 2000**, Präparat 01C: Fingerbeere, H.E, Vergrößerung 50x. <http://histonet.uni-ulm.de>
- ¹⁷²**Elias P.M.** (1983). Epidermal Lipids, Barrier function, and desquamation. *Journal of Investigative Dermatology* 80: 44s-49s.
- ¹⁷³**Elias P.M., Cooper E.R., Korc A., Brown B.E.** (1981). Percutaneous transport in relation to stratum corneum structure and lipid composition. *Journal of Investigative Dermatology* 76: 297-301.
- ¹⁷⁴**Idson B.** (1978). Hydration and percutaneous absorption. *Current Problems in Dermatology* 7: 132-141.
- ¹⁷⁵**Jüstel C., Traupe B., Bünger J., Drexler D., Mathes S., Meier C., Wolf F.**(2000). Die Bedeutung hauteigener Lipide für die Rolle der Haut als Abwehrorgan; in Plettenberg A., Meigel W.N., Moll I.: *Dermatologie an der Schwelle zum neuen Jahrtausend.*, Springer-Verlag, Berlin, Heidelberg, New York: 5-6.
- ¹⁷⁶**Ruzicka T., Ring J., Przybilla B.** (1991). *Handbook of atopic eczema.* Springer-Verlag, Berlin, Heidelberg, New York.
- ¹⁷⁷**Raijka G.** (1989). *Essential aspects of atopic dermatitis.* Springer Verlag, Berlin.
- ¹⁷⁸**Ring J., Behrendt H.** (1998). *Neurodermitis. Expertise zur gesundheitlichen Versorgung und Vorsorge bei Kindern mit atopischem Ekzem.* Studienreihe Allergie und Umwelt. Ecomed-Verlag, Landsberg.

- ¹⁷⁹Werner Y., Lindberg M. (1985). Transepidermal water loss in dry and clinical normal skin in patients with atopic dermatitis. *Acta Dermato-Venereologica* 65: 102-105.
- ¹⁸⁰Thune P. (1989). Evaluation of the hydration and the water-holding capacity of atopic skin and so-called dry skin. *Acta Dermato-Venereologica* 14: 133-137.
- ¹⁸¹Seguchi T., Chang-Yi C., Kusuda S., Takahashi M., Aisu K., Tezuka T. (1996). Decreased expression of filaggrin in atopic skin. *Archives of Dermatology Research* 288: 442-446.
- ¹⁸²Imokawa G., Abe A., Jin K., Higaki Y., Kawashima M., Hidano A. (1991). Decreased levels of ceramides in stratum corneum of atopic dermatitis: an etiological factor in atopic dry skin? *Journal of Investigative Dermatology* 96: 523-526.
- ¹⁸³Murata Y., Ogata J., Higaki Y., Kawashima M., Yada Y., Higuchi K., Tsuchiya T., Kawainami S., Imokawa G. (1996). Abnormal expression of sphingomyelin acylase in atopic dermatitis: an etiologic factor for ceramide deficiency? *Journal of Investigative Dermatology* 106: 1242-1249.
- ¹⁸⁴Hara J., Higuchi K., Okamoto R., Kawashima M., Imokawa G. (2000). High-expression of sphingomyelin deacylase is an important determinant of ceramide deficiency leading to barrier disruption in atopic dermatitis. *Journal of Investigative Dermatology* 115: 406-413.
- ¹⁸⁵Tupker R.A., Pinnagoda J. Coenrads P.J., Nater P.J. (1990). Susceptibility to irritants: role of barrier function, skin dryness and history of atopic dermatitis. *British Journal of Dermatology* 123: 199-205.
- ¹⁸⁶Pushkareva M., Obeid L.M., Hannun Y.A. (1995). Ceramide: an endogenous regulator of apoptosis and growth suppression. *Immunology Today* 16: 294-297.
- ¹⁸⁷Wakita H., Tokura Y., Yagi H., Nishimura K., Furukawa F., Takigawa M. (1994). Keratinocyte differentiation is induced by cell-permeant ceramides and its proliferation is promoted by sphingosine. *Archives of Dermatological Research* 286: 350-354.
- ¹⁸⁸Nassif A., Chan S.C., Storrs F.J., Hanifin J.M. (1994). Abnormal skin irritancy in atopic dermatitis and in atopy without dermatitis. *Archives of Dermatology* 130: 1402-1407.
- ¹⁸⁹Scholzen T., Armstrong C.A., Bunnett N.W., Luger T.A., Olerud J.E., Ansel J.C. (1998). Neuropeptides in the skin: interactions between the neuroendocrine and the immune systems. *Experimental Dermatology* 7: 81-96.
- ¹⁹⁰Lambert R.W., Granstein R.D. (1998). Neuropeptides and Langerhans cells. *Experimental Dermatology* 7: 73-80.
- ¹⁹¹Gloor M. (1991). Sebaceous gland activity in atopic eczema. in Ruzicka R., Ring J., Przybilla B. *Handbook of Atopic Eczema*. Springer-Verlag, Berlin, Heidelberg, New York: 287-295.
- ¹⁹²Abeck D., Mempel M. (1998). Staphylococcus aureus colonization in atopic dermatitis and its therapeutic implications. *British Journal of Dermatology* 139, S53: 13-16.
- ¹⁹³Ring J., Abeck D., Neuber K. (1992). Atopic eczema: role of microorganisms on the skin surface. *Allergy* 47: 265-269.
- ¹⁹⁴Campbell D.E., Kemp A.S. (1997). Proliferation and production of interferon-gamma (IFN- γ) and IL-4 in response to Staphylococcus aureus and Staphylococcal superantigen in childhood atopic dermatitis. *Clinical and Experimental Immunology* 107: 392-397.
- ¹⁹⁵Niermann H. (1964). *Zwillingsdermatologie*. Springer-Verlag, Berlin, Heidelberg, New York.

- ¹⁹⁶**Coleman R., Trembath R.C., Harper J.I.** (1997). Genetic studies of atopy and atopic dermatitis. *British Journal of Dermatology* 136: 1-5.
- ¹⁹⁷**Wollenberg A., Bieber T.** (2000). Atopic dermatitis: from the genes to skin lesions. *Allergy* 55: 205-213.
- ¹⁹⁸**Marsh D.G., Neely J.D., Breazeale D.R., Ghosh B., Freidhoff L.R., Ehrlich-Kautzky E., Schou C., Krishnaswamy G., Beaty T.H.** (1994). Linkage analysis of IL-4 and other chromosome 5q31.1 markers and total serum immunoglobulin E concentrations. *Science* 264: 1152-1156.
- ¹⁹⁹**Izuhara K., Shirakawa T.** (1999). Signal transduction via the interleukin-4 receptor and its correlation with atopy. Review. *International Journal of Molecular Medicine* 3: 3-10.
- ²⁰⁰**Deichmann K.A., Heinzmann A., Kühr J.** (2000). Genetik des atopischen Ekzems; in Plettenberg A., Meigel W.N., Moll I.: *Dermatologie an der Schwelle zum neuen Jahrtausend.*, Springer-Verlag, Berlin, Heidelberg, New York: 95-97.
- ²⁰¹**Lee Y.A., Wahn U., Kehrt R., Tarani L., Businco L., Gustafsson D., Andersson F., Oranje A.P., Wolkertstorfer A., Berg A.V., Hoffmann U., Kuster W., Wienker T., Ruschendorf F., Reis A.** (2000). A major susceptibility locus for atopic dermatitis maps to chromosome 3q21. *Nature Genetics* 26: 470-473.
- ²⁰²**Ginsburg I.H., Prystowsky J.H., Kornfeld D.S., Wolland H.** (1993). Role of emotional factors in adults with atopic eczema. *International Journal of Dermatology* 32: 656-660.
- ²⁰³**Szentivanyi A.** (1968). The beta adrenergic theory of the atopic abnormality in asthma. *Journal of Allergy* 42: 203.
- ²⁰⁴**Ring J.** (1979). Atopic dermatitis: a disease of general vasoactive mediator dysregulation. *International Archives of Allergy and Applied Immunology* 59: 233-239.
- ²⁰⁵**Wüthrich B.** (1989). Neurodermitis atopica. *Wiener Medizinische Wochenschrift* 139: 156-65.
- ²⁰⁶**Oppel T., Schuller E., Gunther S., Moderer M., Haberstock J., Bieber T., Wollenberg A.** (2000). Phenotyping of epidermal dendritic cells allows the differentiation between extrinsic and intrinsic forms of atopic dermatitis. *British Journal of Dermatology* 143: 1193-1198.
- ²⁰⁷**Ring J.** (1991). *Angewandte Allergologie.* MMV-Münchner Medizin Verlag Vieweg, München: 27.
- ²⁰⁸**Coca A., Cooke R.** (1923). On the classification of the phenomena of hypersensitivity. *Journal of Immunology* 8: 163-182.
- ²⁰⁹**Grewe M., Bruijnzeel-Koomen C.A.F.M., Schöpf E., Thepen T., Langeveld-Wildschut A.G., Ruzicka T., Krutmann J.** (1998). A role for Th1 and Th2 cells in the immunopathogenesis of atopic dermatitis. *Immunology Today* 19: 359-361.
- ²¹⁰**Renz H., Jujo K., Bradley K.L., Domenico L., Gelfand E.W., Leung D.Y.** (1992). Enhanced IL-4 production and IL-4 receptor expression in atopic dermatitis and their modulation by interferon-gamma. *Journal of Investigative Dermatology* 99: 403-408.
- ²¹¹**Hamid Q., Boguniewicz M., Leung D.Y.** (1994). Differential in situ cytokine gene expression in acute versus chronic atopic dermatitis. *Journal of Clinical Investigation* 94: 870-876.
- ²¹²**Jujo K., Renz H., Abe J., Gelfand E.W., Leung L.Y.** (1992). Decreased interferon gamma and increased interleukin-4 production in atopic dermatitis patients promotes IgE synthesis. *Journal of Allergy and Clinical Immunology* 90: 323-331.

- ²¹³ **van der Heijden F.L., Wierenga E.A., Bos J.D., Kapsenberg M.L.** (1991). High frequency of IL-4-producing CD4⁺ allergen-specific T lymphocytes in atopic dermatitis lesional skin. *Journal of Investigative Dermatology* 97: 389-394.
- ²¹⁴ **Bieber T., Rieger A., Neuchrist C., Prinz J.C., Rieber E.P., Boltz-Nitulescu G., Scheiner O., Kraft D., Ring J.** (1989). Induction of FcεRII/CD23 on human epidermal Langerhans cells by human recombination of Interleukin 4 and gamma-interferon. *Journal of Experimental Medicine* 170: 309-314.
- ²¹⁵ **Bruynzeel-Koomen C., Van Wichen D.F., Toonstra J., Berrens L., Bruynzeel P.L.B.** (1986). The presence of IgE molecules on epidermal Langerhans cells in patients with atopic dermatitis. *Archives of Dermatological Research* 278: 199-205.
- ²¹⁶ **Bieber T., de la Salle C., Wollenberg A., Chizzonite R., Hakimi J., Ring J., Hanau D., de la Salle H.** (1992). Human epidermal Langerhans cells express the high affinity receptor for IgE (FcεRI). *Journal of Experimental Medicine* 175: 1285-1290.
- ²¹⁷ **Gell P.G.H., Coombs R.R.A.** (1963). The classification of allergic reactions underlying disease. *Clinical Aspects of Immunology*. Blackwell Verlag, Oxford, Boston, Berlin: 317.
- ²¹⁸ **Bruijnzeel-Koomen C.A., Mudde G.C., Bruijnzeel P.L.** (1989). The presence of IgE molecules on epidermal Langerhans cells in atopic dermatitis and their significance for its pathogenesis. *Allergie et Immunologie* 21: 219-223.
- ²¹⁹ **Tang A., Amagai M., Granger L.G., Stanley J.R., Udey M.C.** (1993). Adhesion of epidermal Langerhans cells to keratinocytes mediated by E-cadherin. *Nature* 361: 82-85.
- ²²⁰ **Mudde G.C., Van-Reijssen F.C., Boland G.J., de-Gast G.C., Bruijnzeel P.L., Bruijnzeel-Koomen C.A.** (1990). Allergen presentation by epidermal Langerhans cells from patients with atopic dermatitis is mediated by IgE. *Immunology* 69: 335-341.
- ²²¹ **Jakob T., Udey M.C.** (1998). Regulation of E-cadherin-mediated adhesion in Langerhans cell-like dendritic cells by inflammatory mediators that mobilize Langerhans cells in vivo. *Journal of immunology* 160: 4067-4073.
- ²²² **Wollenberg A., Kraft S., Hanau D., Bieber T.** (1996). Immunomorphological and ultrastructural characterization of Langerhans cells and a novel, inflammatory dendritic epidermal cell (IDEC) population in lesional skin of atopic eczema. *Journal of Investigative Dermatology* 106: 446-453.
- ²²³ **Okada S., Maeda K., Tanaka Y., Anan S., Yoshida H.** (1996). Immunglobulins and their receptors on epidermal Langerhans cells in atopic dermatitis. *Journal of Dermatology* 23: 247-253.
- ²²⁴ **Maeda K., Yamamoto K., Tanaka Y., Anan S., Yoshida H.** (1992). House dust mite (HDM) antigen in naturally occurring lesions of atopic dermatitis (AD): the relationship between HDM antigen in the skin and HDM antigen-specific IgE antibody. *Journal of Dermatological Science* 3: 73-77.
- ²²⁵ **Gondo A., Saeki N., Tokuda Y.** (1986). Challenge reactions in atopic dermatitis after percutaneous entry of mite antigen. *British Journal of Dermatology* 115: 485-493.
- ²²⁶ **Tanaka Y., Tanaka M., Anan S., Yoshida H.** (1989). Immunohistochemical studies on dust mite antigen in positive reaction site of patch test. *Acta Dermato-Venereologica Supplement* 144: 93-96.
- ²²⁷ **Schäfer T., Heinrich J., Wjst M., Adam H., Ring J., Wichmann H.E.** (1999). Association between severity of atopic eczema and degree of sensitization to aeroallergens in schoolchildren. *Journal of Allergy and Clinical Immunology* 104,6: 1280-1284.

- ²²⁸**World Health Organization (WHO)** (1989). In door quality: organic pollutants. EURO Reports and Studies 111.
- ²²⁹**CORINAIR 90** (1996). Summary report nr. 2. Final draft january 1996. Report to the European Environment Agency from the European Topic Centre on Air Emissions.
- ²³⁰**Ministerium für Umwelt, Raumordnung und Landwirtschaft des Landes Nordrhein-Westfalen** (1999). Epidemiologische Untersuchungen zu gesundheitlichen Wirkungen verkehrsbedingter Immissionen auf Kinder (1995-1997).
- ²³¹**Ministerium für Umwelt, Raumordnung und Landwirtschaft des Landes Nordrhein-Westfalen** (1999). Luftreinhalteplanung in Nordrhein-Westfalen. Luftgüteüberwachung Wuppertal.
- ²³²**Marquardt H., Schäfer S.G.** (1994) Lehrbuch der Toxikologie. Bibliographisches Institut, Wissenschaftsverlag Mannheim, Leipzig, Wien, Zürich.
- ²³³**Preining O., Hauck H. et al.** (1996). „Flüchtige Kohlenwasserstoffe in der Atmosphäre - Entstehung, Verhalten und Wirkungen. Luftqualitätskriterien VOC.“ Österreichische Akademie der Wissenschaften, Kommission für Reinhaltung der Luft, Wien.
- ²³⁴**Dutkiewicz T, Tyras H.** (1968). Skin absorption of toluene, styrene, and xylene by man. British Journal of Industrial Medicine 25: 243.
- ²³⁵**Deutsche Forschungsgemeinschaft (DFG)** (1998). Toxikologisch-arbeitsmedizinische Begründungen von MAK-Werten (Maximale Arbeitsplatzkonzentrationen). Gesundheitsschädliche Arbeitsstoffe, Wiley-VCH Verlagsgesellschaft mbH, Weinheim.
- ²³⁶**Deutsche Forschungsgemeinschaft (DFG)** (1993). Toxikologisch-arbeitsmedizinische Begründungen von MAK-Werten (Maximale Arbeitsplatzkonzentrationen). Gesundheitsschädliche Arbeitsstoffe. Wiley-VCH Verlagsgesellschaft mbH, Weinheim.
- ²³⁷**Forth W.** (1990). Allgemeine und spezielle Pharmakologie und Toxikologie. Bibliographisches Institut, Wissenschaftsverlag Mannheim, Wien, Zürich.
- ²³⁸**Ghantous H., Dencker L., Gabrielsson J., Danielsson B.R.G., Bergman K.** (1990). Accumulation and turnover of metabolites of toluene and xylene in nasal mucosa and olfactory bulb in the mouse. Pharmacology and Toxicology 66: 78-92.
- ²³⁹**Deutsche Forschungsgemeinschaft (DFG)** (1985). Toxikologisch-arbeitsmedizinische Begründungen von MAK-Werten (Maximale Arbeitsplatzkonzentrationen). Gesundheitsschädliche Arbeitsstoffe. Wiley-VCH Verlagsgesellschaft mbH, Weinheim.
- ²⁴⁰**Geruchsemissions-Richtlinie** (1993). Entwurf, Stand 15.2.1993. Minister für Umwelt, Raumordnung und Landwirtschaft des Landes Nordrhein-Westfalen, Deutschland.
- ²⁴¹**Verschueren K.** (1983). Handbook of environmental data on organic chemicals. Van Nostrand Reinhold Company, New York.
- ²⁴²**World Health Organization (WHO)** (1996). Air quality guidelines for Europe. WHO - Regional Office for Europe, Kopenhagen.
- ²⁴³**Deutsche Forschungsgemeinschaft (DFG) Senatskommission zur Prüfung gesundheitsschädlicher Arbeitsstoffe** (2000). MAK- und BAT-Werte-Liste 2000. Maximale Arbeitskonzentrationen und Biologische Arbeitsstofftoleranzwerte. Wiley-VCH Verlagsgesellschaft mbH, Weinheim.
- ²⁴⁴**Hippeli S.C., Elstner E.F.** (1991). Oxygen radicals and air pollution. In Sies H., Oxidative Stress: Oxidants and Antioxidants. Academic Press Inc., London, San Diego: 3-55.

- ²⁴⁵ Persönliche Mitteilung von **Dr. Francesca Alessandrini**, Klinische Kooperationsgruppe für Umweltdermatologie und Allergologie GSF/TUM; ZAUM Zentrum für Allergie und Umwelt, München.
- ²⁴⁶ **Burck H.C.** (1988). *Histologische Technik*. 6. Aufl. Georg Thieme Verlag, Stuttgart, New York.
- ²⁴⁷ **Allen M., Millet P., Dawes E., Rushton N.** (1994). Lactate dehydrogenase activity as a rapid and sensitive test for the quantitation of cell numbers in vitro. *Clinical Materials* 16: 189-194.
- ²⁴⁸ **Brown R.H.** (1988). Determination of benzene, toluene and xylene in industrial air by charcoal tube, solvent desorption and gas chromatography. *IARC -International Agency of Research on Cancer Scientific Publications* 85: 225-233.
- ²⁴⁹ **Pekari K., Riekkola M-L., Aitio A.** (1989). Simultaneous determination of benzene and toluene in the blood using head-space gas chromatography. *Journal of Chromatography* 491: 309-320.
- ²⁵⁰ **Angerer J.** (1988). Determination of toluene in blood by head-space gas chromatography. *IARC -International Agency of Research on Cancer Scientific Publications* 85: 287-291.
- ²⁵¹ **Engström K., Riihimäki V.** (1988). Determination of xylenes in blood by head-space gas chromatography. *IARC -International Agency of Research on Cancer Scientific Publications* 85: 307-311.
- ²⁵² **Risse U.** (2000). Wechselwirkungen von flüchtigen organisch-chemischen sowie partikulären Luftinhaltsstoffen mit Allergenträgern und Allergenen als Auslöser IgE-vermittelter Überempfindlichkeitsreaktionen. Habilitationsschrift, Technische Universität München TUM.
- ²⁵³ **Atkins P.W.** (1990). *Physikalische Chemie*. 2. korr. Nachdr. d. 1. Aufl. VCH Verlagsgesellschaft mbH, Weinheim.
- ²⁵⁴ **Sander R.** (1999). Compilation of Henry`s law constants for inorganic and organic species of potential importance in environmental chemistry. Version 3: <http://www.mpch-mainz.mpg.de/sander/res/henry.html>.
- ²⁵⁵ **National Institute of Standard and Technology (NIST)** (2000). NIST Standard reference database 69 - february 2000 Release: NIST Chemistry WebBook: <http://webbook.nist.gov/cgi/cbook.cgi?ID=C108883&Units=SI&Mask=10> bzw. ... [ID=C108383&Units=SI&Mask=10](http://webbook.nist.gov/cgi/cbook.cgi?ID=C108383&Units=SI&Mask=10).
- ²⁵⁶ **Staudinger J., Roberts P.V.** (1996). A critical review of Henry`s law constants for environmental applications. *Critical Reviews in Environmental Science and Technology* 26, 205-297.
- ²⁵⁷ **Deutsches Institut für Normung e. V. (DIN) Arbeitsausschuß Chemische Terminologie (AChT)** (1994). *Chemische Analytik, Nachweis-, Erfassungs- und Bestimmungsgrenze. Ermittlung unter Wiederholbedingungen, Begriffe, Verfahren, Auswertungen*. Beuth Verlag GmbH, Berlin.
- ²⁵⁸ **Einax J.W., Zwanziger H.W., Geiß S.** (1997). *Chemometrics in environmental analysis*. Wiley-VCH Verlagsgesellschaft mbH, Weinheim: 64-69.
- ²⁵⁹ **Precht, M.** (1987). *Bio-Statistik*. 4. Auflage, R. Oldenbourg Verlag, München, Wien.
- ²⁶⁰ **Scherb H.** (2001). Determination of uniformly most powerful tests in discrete sample spaces. *Metrika* 53: 71-84.
- ²⁶¹ **Sachs L.** (1984). *Angewandte Statistik*. 6. Auflage. Springer Verlag, Berlin, Heidelberg, New York, Tokio: 246-249.
- ²⁶² **Lehmann E. L.** (1975). *Nonparametrics: Statistical methods*, California.

- ²⁶³**Ahrens H., Läuter J.** (1981). Mehrdimensionale Varianzanalyse. 2. Aufl., Akademie-Verlag, Berlin.
- ²⁶⁴**Barlow Y., Pye R.J.** (1990). Keratinocyte culture. in Pollarel J., Walker J. Animal Cell Culture - Methods in Molecular Biology, Vol. V. Humana Press, Clifton, New Jersey: 83-97.
- ²⁶⁵**Watt F.M.** (1994). Cultivation of human epidermal keratinocytes with a 3T3 feeder layer. in Celis J.E., Cell Biology: A Laboratory Handbook. Academic Press Inc., London, San Diego: 83-89.
- ²⁶⁶**Daley J.P., Donovan J.M.** (1994). Growth of human keratinocytes in serum-free medium. in Celis J.E., Cell Biology: A Laboratory Handbook. Academic Press Inc., London, San Diego: 90-95.
- ²⁶⁷**Régnier M., R. Schmidt** (1997). Standard Operating Procedure. Life Science Research. L'ORÉAL Recherche - Centre Charles Zviak, Clichy.
- ²⁶⁸**Brockow K., Grabenhorst P., Abeck D., Traupe B., Ring J., Hoppe U., Wolf F.** (1999). Effect of gentian violet, corticosteroid and tar preparations in Staphylococcus-aureus-colonized atopic eczema. *Dermatology* 199: 231-236.
- ²⁶⁹**Maas-Szabowski N., Fusenig N.** (1997). Workshop „Organotypische Kokulturen“ 5./6.11.1997, DKFZ, Heidelberg.
- ²⁷⁰**Germain L., Rouabhia M., Guignard R., Carrier L., Bouvard V., Auger F.A.** (1993). Improvement of human keratinocyte isolation and culture using thermolysin. *Burns* 19: 99-104.
- ²⁷¹**Kitano Y., Okada N.** (1983). Separation of the epidermal sheet by dispase. *British Journal of Dermatology* 108: 555-60.
- ²⁷²**Lam P.K., Chan E.S., Yen R.S., Lau H.C., King W.W.** (2000). A new system for the cultivation of keratinocytes on acellular human dermis with the use of fibrin glue and 3T3 feeder cells. *Journal of Burn Care & Rehabilitation* 21: 1-4.
- ²⁷³**Hybbinette S., Bostrom M., Lindberg K.** (1999). Enzymatic dissociation of keratinocytes from human skin biopsies for in vitro cell propagation. *Experimental Dermatology* 8: 30-38.
- ²⁷⁴**Normand J., Karasek M.A.** (1995). A method for the isolation and serial propagation of keratinocytes, endothelial cells, and fibroblasts from a single punch biopsy of human skin. *In Vitro Cellular and Developmental Biology - Animal* 31: 447-455.
- ²⁷⁵**Rheinwald J.G., Green H.** (1975). Serial cultivation of normal strains of human epidermal keratinocytes: the formation of keratinizing colonies from single cells. *Cell* 6: 331-344.
- ²⁷⁶**Rheinwald J.G.** (1989). Methods for clonal growth and serial cultivation of normal human epidermal keratinocytes and mesothelial cells. in Baserga R., Cell Growth and Division. A Practical Approach. IRL Press, Oxford: 81-94.
- ²⁷⁷**Limat A., Hunziker T., Boilat C., Bayreuther K., Noser F.** (1989). Post-mitotic human dermal fibroblasts efficiently support the growth of human follicular keratinocytes. *Journal of Investigative Dermatology* 92: 758-762.
- ²⁷⁸**Schierhorn K., Brunnee T., Paus R., Schultz K.D., Niehus J., Agha-Mir-Salim P., Kunkel G.** (1995). Gelatin sponge-supported histoculture of human nasal mucosa. *In Vitro Cellular and Developmental Biology - Animal* 31: 215-220.
- ²⁷⁹**Schierhorn K., Zhang M, Kacy M., Kunkel G.** (1997). Ozone-induced augmentation of eicosanoid metabolism in human nasal mucosa in vitro. *International Archives of Allergy and Immunology* 113: 312-315.

- ²⁸⁰**Carvalho L.H., Hafalla J.C., Zavala F.** (2001). ELISPOT assay to measure antigen-specific murine CD8(+) T cell responses. *Journal of Immunological Methods* 252: 207-218.
- ²⁸¹**Abeck D., Mempel M.** (1998). Staphylococcus aureus colonization in atopic dermatitis and its therapeutic implications. *British Journal of Dermatology* 139, S53:13-16.
- ²⁸²**Herz U., Bunikowski R., Mielke M. Renz H.** (1999). Contribution of bacterial superantigens in atopic dermatitis. *International Archives of Allergy and Immunology* 118: 240-241.
- ²⁸³**E-Doc** (1994). Flucloxacillin. [wysiwyg://52/http://www.edoc.co.za](http://www.edoc.co.za)
- ²⁸⁴**Pallen M.** (1998). The staphylococci. <http://www.medmicro.mds.qmw.ac.uk>
- ²⁸⁵**Wilkinson J.D.** (1998). Fusidic acid in dermatology. *British Journal of Dermatology* 139, S53:37-40.
- ²⁸⁶**Ewing C.I., Ashcroft C., Gibbs A.C., Jones G.A., Connor P.J., David T.J.** (1998). Flucloxacillin in the treatment of atopic dermatitis. *British Journal of Dermatology* 138: 1022-1029.
- ²⁸⁷**Boehringer Mannheim, Biochemica.** (1999). Cell Biology. Enzymes for tissue dissociation. *Boehringer Mannheim GmbH.*
- ²⁸⁸**Stenn, K.S., Link R., Moellmann G., Madri J., Kuklinska E.** (1989). Dispase, a neutral protease from *Bacillus polymyxa*, is a powerful fibronectinase and type IV collagenase. *Journal of Investigative Dermatology* 93: 287-290.
- ²⁸⁹**Holbrook K.A., Hennings H.** (1983). Phenotypic expression of epidermal cells in vitro: a review. *Journal of Investigative Dermatology* 81: 11s-24s.
- ²⁹⁰**Johnson E.W., Meunier S.F., Roy C.J., Parenteau N.L.** (1992). Serial cultivation of normal human keratinocytes: a defined system for studying the regulation of growth and differentiation. *In Vitro Cell Development and Biology* 28A:429-435.
- ²⁹¹**Eisinger M., Lee J.S., Hefton J.M., Darzynkiewicz Z., Chaio J.W., Deharven E.** (1979). Human epidermal cell cultures: growth and differentiation in the absence of dermal components or medium supplements. *Proceedings Natl.Acad. USA* 76: 5340-5344.
- ²⁹²**Boyce S., Ham R.G.** (1983). Calcium-regulated differentiation of normal human epidermal keratinocytes in chemically defined clonal culture and serum-free serial culture. *Journal of Investigative Dermatology* 81: 33S-40S
- ²⁹³**Tsao M.C., Walthall B.J., Ham R.G.** (1982). Clonal growth of normal human epidermal keratinocytes in a defined medium. *Journal of Cell Physiology* 110: 219-229.
- ²⁹⁴**Daley J.P., Hawley-Nelson P., Epstein D.A.** (1990). Growth of human epidermal keratinocytes in keratinocyte serum-free medium. *Focus* 12: 68-71.
- ²⁹⁵**Tamura T., Takahashi H., Iizuka H.** (1996). Protein kinase C-dependent modulation of stimulatory guanine nucleotide binding protein of fetal rat skin keratinocytes. *Archives of Dermatology Research* 288: 24-30.
- ²⁹⁶**Rahman S.A., Tsuyama S.** (1993). Immunohistochemical study of cell proliferation and differentiation in epidermis of mice after administration of cholera toxin. *Archives of Dermatology Research* 285: 27-31.
- ²⁹⁷**Moscat J., Molloy C.J., Fleming T.P., Aaronson S.A.** (1988). Epidermal growth factor activates phosphoinositide turnover and protein kinase C in BALB/MK keratinocytes. *Molecular Endocrinology* 2: 799-805.
- ²⁹⁸**Karasek M.A.** (1983). Culture of human keratinocytes in liquid medium. *Journal of Investigative Dermatology* 81: 24S-28S.

- ²⁹⁹**Daniels J.T., Harris I.R., Kearney J.N., Ingham E.** (1995). Calcium: a crucial consideration in serum-free keratinocyte culture. *Experimental Dermatology* 4: 183-191.
- ³⁰⁰**Bikle D.D., Ratnam A., Mauro T., Harris J., Pillai S.** (1996). Changes in calcium responsiveness and handling during keratinocyte differentiation. Potential role of the calcium receptor. *Journal of Clinical Investigation* 97: 1085-1093.
- ³⁰¹**Fuchs E.** (1995). Keratins and the skin. *Annual Review of Cell Development and Biology* 11: 123-153.
- ³⁰²**Tenchini M.L., Adams J.C., Gilberty C., Steel J., Hudson D.L., Malcovati M., Watt F.M.** (1993). Evidence against a major role for integrins in calcium-dependent intercellular adhesion of epidermal keratinocytes. *Cell Adhesion and Communication* 1: 55-66.
- ³⁰³**Thatcher S.M., Rice R.H.** (1985). Keratinocyte-specific transglutaminase of cultured human epidermal cells: relation to cross-linked envelope formation and terminal differentiation. *Cell* 40: 685-695.
- ³⁰⁴**Hohl D., Roop D.,** (1993). Loricrin. in Darmon M. (ed.), *Molecular Biology of the Skin. The Keratinocyte*. Academic Press, California:151-179.
- ³⁰⁵**Poumay Y., Pittelkow M.R.** (1995). Cell density and culture factors regulate keratinocyte commitment to differentiation and expression of suprabasal K1/K10 keratins. *Journal of Investigative Dermatology* 104: 271-276.
- ³⁰⁶**Shen S., Alt A., Wertheimer E., Gartsbein M., Kuroki T., Ohba M., Braiman L., Sampson S.R., Tennenbaum T.** (2001). PKCdelta activation: a divergence point in the signaling of insulin and IGF-1-induced proliferation of skin keratinocytes. *Diabetes* 50: 255-64.
- ³⁰⁷**Yuspa S.H., Hennings H., Tucker R.W., Jaken S., Kilkenny A.E., Roop D.R.** (1988). Signal transduction for proliferation and differentiation in keratinocytes. *Annales of the New York Academy of Sciences* 548: 191-6.
- ³⁰⁸**Hennings H., Michael D., Cheng C., Steinert P., Holbrook K., Yuspa S.H.** (1980). Calcium regulation of growth and differentiation of mouse epidermal cells in culture. *Cell* 19: 245-54.
- ³⁰⁹**Gibson D.F., Ratnam A.V., Bikle D.D.** (1996). Evidence for separate control mechanisms at the message, protein, and enzyme activation levels for transglutaminase during calcium-induced differentiation of normal and transformed human keratinocytes. *Journal of Investigative Dermatology* 106: 154-61.
- ³¹⁰**Hohl D., Lichti U., Breitreutz D., Steinert P.M., Roop D.R.** (1991). Transcription of the human loricrin gene in vitro is induced by calcium and cell density and suppressed by retinoic acid. *Journal of Investigative Dermatology* 96: 414-8.
- ³¹¹**Yuspa S.H., Kilkenny A.E., Steinert P.M., Roop D.R.** (1989). Expression of murine epidermal differentiation markers is tightly regulated by restricted extracellular calcium concentrations in vitro. *Journal of Cell Biology* 109: 1207-17.
- ³¹²**Dlugosz A.A., Yuspa S.H.** (1993). Coordinate changes in gene expression which mark the spinous to granular cell transition in epidermis are regulated by protein kinase C. *Journal of Cell Biology* 120: 217-25.
- ³¹³**Jaken S., Yuspa S.H.** (1988). Early signals for keratinocyte differentiation: role of Ca²⁺-mediated inositol lipid metabolism in normal and neoplastic epidermal cells. *Carcinogenesis* 9: 1033-8.
- ³¹⁴**Punnonen K., Denning M., Lee E., Li L., Rhee S.G., Yuspa S.H.** (1993). Keratinocyte differentiation is associated with changes in the expression and regulation of phospholipase C isoenzymes. *Journal of Investigative Dermatology* 101: 719-26.

- ³¹⁵**Todd C., Reynolds N.J.** (1998). Up-regulation of p21WAF1 by phorbol ester and calcium in human keratinocytes through a protein kinase C-dependent pathway. *American Journal of Pathology* 153: 39-45.
- ³¹⁶**Woodley D.T., Wynn K.C., O'Keefe E.J.** (1990). Type IV collagen and fibronectin enhance human keratinocyte thymidine incorporation and spreading in the absence of soluble growth factors. *Journal of Investigative Dermatology* 94: 139-43.
- ³¹⁷**Macpherson I., Bryden A.** (1971). Mitomycin C treated cells as feeders. *Experimental Cell Research* 69:240-241.
- ³¹⁸**Maas-Szabowski N., Fusenig N.E.** (1996). Interleukin-1-induced growth factor expression in postmitotic and resting fibroblasts. *Journal of Investigative Dermatology* 107: 849-855.
- ³¹⁹**Maas-Szabowski N., Shimotoyodome A., Fusenig N.E.** (1999). Keratinocyte growth regulation in fibroblast cocultures via a double paracrine mechanism. *Journal of Cell Science* 112: 1843-1853.
- ³²⁰**Maas-Szabowski N., Stark H.J., Fusenig N.E.** (2000). Keratinocyte growth in defined organotypic cultures through IL-1-induced keratinocyte growth factor expression in resting fibroblasts. *Journal of Investigative Dermatology* 114: 1075-1084.
- ³²¹**Smola H., Thiekötter G., Fusenig N.E.** (1993). Mutual induction of growth factor gene expression by epidermal-dermal cell interaction. *Journal of Cell Biology* 122: 417-429.
- ³²²**Monical P.L., Kefalides N.A.** (1994). Coculture modulates laminin synthesis and m-RNA levels in epidermal keratinocytes and dermal fibroblasts. *Experimental Cell Research* 210: 154-159.
- ³²³**Brauchle M., Angermeyer K., Hubner G., Werner S.** (1994). Large induction of keratinocyte growth factor expression by serum growth factors and pro-inflammatory cytokines in cultured fibroblasts. *Oncogene* 9: 3199-3204.
- ³²⁴**Le Panse R., Bouchard B., Lebreton C., Coulomb B.** (1996). Modulation of keratinocyte growth factor (KGF) mRNA expression in human dermal fibroblasts grown in monolayer or within a collagen matrix. *Experimental Dermatology* 5: 108-114.
- ³²⁵**Kan M., Yamane I.** (1984). Effects of ferrous iron and transferrin on cell proliferation of human diploid fibroblasts in serum-free culture. *In Vitro* 20: 89-94.
- ³²⁶**Murad S., Grove D., Lindberge K.A.** (1981). Regulation of collagen synthesis by ascorbic acid. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA* 78: 2879-2882.
- ³²⁷**Hata R., Senoo H.** (1989). L-ascorbic acid 2-phosphate stimulates collagen accumulation, cell proliferation, and formation of a three-dimensional tissuelike substance by skin fibroblasts. *Journal of Cell Physiology* 138: 8-16.
- ³²⁸**Bell E., Rosenberg M., Kemp P., Gay R., Green G.D., Muthukumaran N., Nolte C.** (1991). Recipes for reconstituting skin. *Journal of Biomechanical Engineering* 113: 113-119.
- ³²⁹**Dawson R.A., Goberdhan N.J., Freedlander E., MacNeil S.** (1996). Influence of extracellular matrix proteins on human keratinocyte attachment, proliferation and transfer to a dermal wound model. *Burns* 22: 93-100.
- ³³⁰**Malcovati M., Tenchini M.L.** (1991). Cell density affects spreading and clustering, but not attachment, of human keratinocytes in serum-free medium. *Journal of Cell Science* 99: 387-95.

- ³³¹**Dawson R.A., Goberdhan N.J., Freedlander E., MacNeil S.** (1996). Influence of extracellular matrix proteins on human keratinocyte attachment, proliferation and transfer to a dermal wound model. *Burns* 22: 93-100.
- ³³²**Sato T.,Kirimura Y., Mori Y.** (1997). The Co-culture of dermal fibroblasts with human epidermal keratinocytes induces increased prostaglandin E2 production and cyclooxygenase 2 activity in fibroblasts. *Journal of Investigative Dermatology* 109: 334-339.
- ³³³**Rosdy M., Pisani A., Ortonne J.P.** (1993). Production of basement membrane components by a reconstructed epidermis cultured in the absence of serum and dermal factors. *British Journal of Dermatology* 129: 227-234.
- ³³⁴**Menzel D.B.** (1994). The toxicity of air pollution in experimental animals and humans: the role of oxidative stress. *Toxicology Letters* 72: 269-277.
- ³³⁵**Albanesi C., Pastore S., Fanales-Belasio E., Girolomoni G.** (1998). Cetirizine and hydrocortisone differentially regulate ICAM-1 expression and chemokine release in cultured human keratinocytes. *Clinical and Experimental Allergy* 28: 101-109.
- ³³⁶**Kupper T.S., McGuire J.** (1986). Hydrocortisone reduces both constitutive and UV-elicited release of epidermal thymocyte activating factor (ETAF) by cultured keratinocytes. *Journal of Investigative Dermatology* 87: 570-573.
- ³³⁷**Braye F., Pascal P., Bertin-Maghit M., Colpart J.J., Tissot E., Damour O.** (2000). Advantages of using a bank of allogenic keratinocytes for the rapid coverage of extensive and deep second-degree burns. *Med Biol Eng Comput* 38: 248-252.
- ³³⁸**Boelsma E., Gibbs S., Faller C., Ponec M.** (2000). Characterization and comparison of reconstructed skin models: morphological and immunohistochemical evaluation. *Acta Dermato-Venereologica* 80: 82-88.
- ³³⁹**Régnier M., Darmon M.** (1991). 1,25-dihydroxyvitamin D₃ stimulates specifically the last steps of epidermal differentiation of cultured human keratinocytes. *Differentiation* 47: 173-188.
- ³⁴⁰**Lillie J.H., MacCallum D.K., Jepsen A.** (1980). Fine structure of subcultivated stratified squamous epithelium grown on collagen rafts. *Experimental Cell Research* 125: 153-165.
- ³⁴¹**Pruniéras M., Régnier M., Woodley D.** (1983). Methods for cultivation of keratinocytes with an air-liquid interface. *Journal of Investigative Dermatology* 81: 28s-33s
- ³⁴²**Ponec M.** (1994). The use of in vitro skin recombinants to evaluate cutaneous toxicity. in: *Alternative Methods in Toxicology, Vol. 10, In vitro Skin Toxicology. Irritation, Phototoxicity, Sensitization*, Mary Ann Liebert, Inc. Publishers, New York.
- ³⁴³**Fartasch M.** (1995). Human barrier formation and reaction to irritation. *Current Problems of Dermatology* 23: 95-103.
- ³⁴⁴**Whalen E., Donnelly T.A., Naughton G., Rheins L.A.** (1994). The development of three-dimensional in vitro human tissue models. *Human & Experimental Toxicology* 13: 853-859.
- ³⁴⁵**MacCallum D.K., Lillie J.H.** (1990). Evidence for autoregulation of cell division and cell transit in keratinocytes grown on collagen at an air-liquid interface. *Skin Pharmacology* 3: 86-96.
- ³⁴⁶**Bell E., Ivarsson B., Merrill C.** (1997). Production of a tissue-like structure by contraction of collagen lattices by human fibroblasts of different proliferative potential in vitro. *Proceedings of the national Academy of Sciences of the USA* 76: 1274-1278.
- ³⁴⁷**Guidry C.** (1993). Fibroblast contraction of collagen gels requires activation of protein kinase C. *Journal of Cell Physiology* 155: 358-367.

- ³⁴⁸**Rosdy M., Clauss L.C.** (1990). Terminal epidermal differentiation of human keratinocytes grown in chemically defined medium on inert filter substrates at the air-liquid interface. *Journal of Investigative Dermatology* 95: 409-414.
- ³⁴⁹**Stark H.J., Baur M., Breitreutz D., Mirancea N., Fusenig N.E.** (1999). Organotypic keratinocyte cocultures in defined medium with regular epidermal morphogenesis and differentiation. *Journal of Investigative Dermatology* 122: 681-691.
- ³⁵⁰**Maruguchi T., Maruguchi Y., Suzuki S., Matsude K., Toda K.-I., Isshiki N.** (1994). A new skin equivalent: keratinocytes proliferated and differentiated on collagen sponge containing fibroblasts. *Plastic and Reconstructive Surgery* 93: 537-546.
- ³⁵¹**Saintigny G., Bonnard M., Damour O., Kollombel C.** (1993). Reconstruction of epidermis on a chitosan cross-linked collagen-GAG lattice: effects of fibroblasts. *Acta Dermato-Venereologica (Stockhausen)* 73: 175-180.
- ³⁵²**Magee A.I., Lytton N.A., Watt F.M.** (1987). Calcium-induced changes in cytoskeleton and motility of cultured human keratinocytes. *Experimental Cell Research* 172: 43-53.
- ³⁵³**Watt F.M.** (1987). Influence of cell shape and adhesiveness on stratification and terminal differentiation of human keratinocytes in culture. *Journal of Cell Science Supplement* 8: 313-26.
- ³⁵⁴**Grinnell F., Toda K., Lamke-Seymour C.** (1987). Reconstitution of human epidermis in vitro is accompanied by transient activation of basal keratinocyte spreading. *Experimental Cell Research* 172: 439-449.
- ³⁵⁵Persönliche Mitteilung von **Dr. Markus Braun-Falco**, Klinische Kooperationsgruppe für Umweltdermatologie und Allergologie GSF/TUM; ZAUM Zentrum für Allergie und Umwelt, München.
- ³⁵⁶**McLenny W.A., Pleil J.D., Evans G.F., Oliver K.D., Holdren M.W., Winberry W.D.** (1991). Canister based method for monitoring toxic VOCs in ambient air. *Journal of Air Waste Management Association* 41: 1308-1318.
- ³⁵⁷**Lang D.S., Jörres R.A., Mücke M., Siegfrie M., Magnussen H.** (1998). Interactions between human bronchoepithelial cells and lung fibroblasts after ozone exposure in vitro. *Toxicology Letters* 96, 97: 13-24.
- ³⁵⁸**Peng C.Y., Batterman S.** (2000). Performance evaluation of a sorbent tube sampling method using short path thermal desorption for volatile organic compounds. *Journal of Environmental Monitoring* 2: 313-324.
- ³⁵⁹**Harper M.** (2000). Sorbent trapping of volatile organic compounds from air. *Journal of Chromatography A* 885: 129-151.
- ³⁶⁰**Hanika G.** (1988). Die gaschromatographische Messung des Benzens/Toluens in der atmosphärischen Luft mittels adsorptiver Probenahme und thermischer Desorption. *Zentralblatt für Gesamte Hygiene* 34: 46-48.
- ³⁶¹**Brown H.R., Purnell C.J.** (1979). Collection and analysis of trace organic vapor pollutants in ambient atmospheres. *Journal of Chromatography* 178: 79-90.
- ³⁶²**Grob K., Habich A.** (1985). Headspace gas analysis: the role and the design of concentration traps specifically suitable for capillary gas chromatography. *Journal of Chromatography* 321: 45-58.
- ³⁶³**Werkhoff P., Breitschneider W.** (1987). Dynamic headspace gas chromatography: concentration of volatile components after thermal desorption by intermediate cryofocussing in a cold trap. *Journal of Chromatography* 405: 87-98.
- ³⁶⁴**Oliver K.D., Adams J.R., Hunter Daughtrey E., McClenny W.A., Yoong M.J., Pardee M., Almasi E.B., Kirshen N.** (1996). Technique for monitoring toxic VOCs in

air: sorbent preconcentration, closed cycle cooler cryofocussing, and GC/MS analysis. *Environmental Science and Technology* 30: 1939-1945

³⁶⁵**Pastore S., Corinti S., La Placa M., Didona B., Girolomonti G.** (1998). Interferon- γ promotes exaggerated cytokine production in keratinocytes cultured from patients with atopic dermatitis. *Journal of Allergy and Clinical Immunology* 101(4), 538-544.

³⁶⁶**Arroyo C.M., Schäfer R.J., Kurt E.M., Broomfield C.A., Carmichael A.J.** (1999). Response of normal human keratinocytes to sulfur mustard (HD): cytokine release using a non-enzymatic detachment procedure. *Human Experimental Toxicology* 18: 1-11.

³⁶⁷**Pastore S., Fanales-Belasio E., Albanesi C., Chinni L.M., Gianetti A., Girolomoni G.** (1997). Granulocyte macrophage colony-stimulating factor is overproduced by keratinocytes in atopic dermatitis. Implications for sustained dendritic cell activation in the skin. *Journal of Clinical Investigation* 99: 3009-3017.

³⁶⁸**Krakauer T.** (1998). Variability in the sensitivity of nine enzyme-linked immunosorbent assays (ELISAs) in the measurement of human interleukin 6. *Journal of Immunological Methods* 219: 161-167.

³⁶⁹**Kopp W., Reynolds C., Ruscetti F.** (1999). The immunoassay of cytokines and growth factors in biological fluids. *Developments in Biological Standardization* 97: 29-37.

³⁷⁰**Tsang M.L., Weatherbee J.A.** (1996). Cytokine assays and their limitations. *Alimentary Pharmacology & Therapeutics* 10 S2: 55-62.

³⁷¹**Whicher J., Ingham E.** (1990). Cytokine measurements in body fluids. *European Cytokine Network* 1: 239-243.

³⁷²**Bienvenu J., Monneret G., Fabien N., Revillard J.P.** (2000). The clinical usefulness of the measurement of cytokines. *Clinical Chemistry and Laboratory Medicine* 38: 267-285.

³⁷³**Favre N., Bordmann G., Rudin W.** (1997). Comparison of cytokine measurements using ELISA, ELISPOT and semi-quantitative RT-PCR. *Journal of Immunological Methods* 204: 57-66.

³⁷⁴**Gessner A., Moskophidis D., Lehmann-Grube F.** (1989). Enumeration of single IFN- γ -producing cells in mice during viral and bacterial infection. *Journal of Immunology* 142: 1293-1298.

³⁷⁵**Jung T., Schauer U., Heusser C., Neumann C., Rieger C.** (1993). Detection of intracellular cytokines by flow cytometry. *Journal of Immunological Methods* 159: 197-207.

³⁷⁶**Ida N., Sakurai S., Hosaka T., Hosoi K., Kunimoto T., Matsuura Y., Kohase M.** (1990). An enzyme-linked immunosorbent assay for the measurement of human interleukin-6. *Journal of Immunological Methods* 133: 279-284.

³⁷⁷**Carson R.T., Vignali D.A.** (1999). Simultaneous quantitation of 15 cytokines using a multiplexed flow cytometric assay. *Journal of Immunological Methods* 227: 41-52.

³⁷⁸**Beiderbeck H., Stark S., Hölzel V.** (2001). Partikel-basierte Immunoassays – vielseitige Werkzeuge zum Monitoring der Zell-Zell-Kommunikation. *Immunologie Aktuell* 1: 128-130.

³⁷⁹**Akdis A.C., Towbin H., Libsig P., Motz J., Alkan S.S.** (1995). Cytokine immunotrapping: an assay to study the kinetics of production and consumption or degradation of human interferon-gamma. *Journal of Immunological Methods* 9: 251-261.

³⁸⁰Persönlicher Schriftwechsel mit **Dr. Veit Hölzel**, Hölzel Diagnostika.

- ³⁸¹**Bratton D.L., Hamid Q., Boguniewicz M., Doherty D.E., Kailey J.M., Leung D.Y.** (1995). Granulocyte macrophage colony-stimulating factor contributes to enhanced monocyte survival in chronic atopic dermatitis. *Journal of Clinical Investigation* 95: 211-218.
- ³⁸²**Girolomoni G., Pastore S.** (2001). The role of keratinocytes in the pathogenesis of atopic dermatitis. *Journal of the American Academy of Dermatology* 45: S25-S28.
- ³⁸³**Gahring L.C., Buckley A., Daynes R.A.** (1985). The presence of ETAF/IL-1 in normal human stratum corneum. *Journal of Clinical Investigation* 76: 1585-1594.
- ³⁸⁴**Hauser C., Saurat J., Schmidt A., Jaunin F., Dayer J.M.** (1986). Interleukin 1 is present in normal human epidermis. *Journal of Immunology* 136: 3317-3321.
- ³⁸⁵**Shinoda S., Kameyoshi Y., Hide M., Morita E., Yamamoto S.** (1998). Histamine enhances UVB-induced IL-6 production by human keratinocytes. *Archives of Dermatological Research* 290: 429-434.
- ³⁸⁶**Corradi A., Franzl A.T., Rubarteli A.** (1995). Synthesis and secretion of interleukin-1 α and interleukin-1 receptor antagonist during differentiation of cultured keratinocytes. *Experimental Cell Research* 217: 355-362.
- ³⁸⁷**Kragballe K., Marcelo C.L., Vorhees J.J., Sauder D.N.** (1987). Formation of epidermal cell thymocyte-activating factor (ETAF) from cultured human keratinocytes from normal and uninvolved psoriatic skin. *Journal of Investigative Dermatology* 88: 8-10.
- ³⁸⁸**Lee S.W., Morhenn V.B., Ilnicka M., Eugui E.M., Allison A.C.** (1991). Autocrine stimulation of interleukin-1 alpha and transforming growth factor alpha production in human keratinocytes and its antagonism by glucocorticoids. *Journal of Investigative Dermatology* 97: 106-10.
- ³⁸⁹**Rauschmayr T., Groves R.W., Kupper T.S.** (1997). Keratinocyte expression of the type 2 interleukin 1 receptor mediates local and specific inhibition of interleukin 1-mediated inflammation. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA* 94: 5814-5819.
- ³⁹⁰**Groves R.W., Sherman L., Mizutani H., Dower S.K., Kupper T.S.** (1994). Detection of interleukin-1 receptors in human epidermis. Induction of the type II receptor after organ culture and in psoriasis. *American Journal of Pathology* 145: 1048-1056.
- ³⁹¹**Eller M.S., Yaar M., Ostrom K., Harkness D.D., Gilchrist B.A.** (1995). A role for interleukin-1 in epidermal differentiation: regulation by expression of functional versus decoy receptors. *Journal of Cell Science* 108: 2741-2746.
- ³⁹²**Blanton R.A., Kupper T.S., McDougall J.K., Dower S.** (1989). Regulation of interleukin 1 and its receptor in human keratinocytes. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA* 86: 1273-1277.
- ³⁹³**Gruaz-Chatellard D., Baumberger C., Saurat J.H., Dayer J.M.** (1991). Interleukin 1 receptor antagonist in human epidermis and cultured keratinocytes. *FEBS Letters* 294: 137-40.
- ³⁹⁴**Hammerberg C., Arend W.P., Fisher G.J., Chan L.S., Berger A.E., Haskill J.S., Voorhees J.J., Cooper K.D.** (1992). Interleukin-1 receptor antagonist in normal and psoriatic epidermis. *Journal of Clinical Investigation* 90: 571-83.
- ³⁹⁵**Bigler C.F., Norris D.A., Weston W.L., Arend W.P.** (1992). Interleukin-1 receptor antagonist production by human keratinocytes. *Journal of Investigative Dermatology* 98: 38-44.
- ³⁹⁶**Groves R.W., Rauschmayr T., Nakamura K., Sarkar S., Williams I.R., Kupper T.S.** (1996). Inflammatory and hyperproliferative skin disease in mice that express elevated levels of the IL-1 receptor (type I) on epidermal keratinocytes. Evidence that

IL-1-inducible secondary cytokines produced by keratinocytes in vivo can cause skin disease. *Journal of Clinical Investigation* 98: 336-344.

³⁹⁷**Terui T., Hirao T., Sato Y., Uesugi T., Honda M., Iguchi M., Matsumura N., Kudoh K., Aiba S., Tagami H.** (1998). An increased ratio of interleukin-1 receptor antagonist to interleukin-1alpha in inflammatory skin diseases. *Experimental Dermatology* 7: 327-334.

³⁹⁸**Ohta Y., Nishiyama S., Nishioka K.** (1994). In situ expression of interleukin-6 in psoriatic epidermis during treatment. *Journal of Dermatology* 21: 301-307.

³⁹⁹**Kishimoto T., Akira S., Taga T.** (1992). Interleukin-6 and its receptor: a paradigm for cytokines. *Science* 258: 593-597.

⁴⁰⁰**Krüger J., Ray A., Tamm I., Sehgal P.B.** (1991). Expression and function of interleukin-6 in epithelial cells. *Journal of Cell Biochemistry* 45: 327-334.

⁴⁰¹**Luger T.A., Schwarz T., Krutmann J., Kirnbauer R., Neuener P., Köck A., Urbanski A., Borth W., Schauer E.** (1989). Interleukin-6 is produced by epidermal cells and plays an important role in the activation of human T-lymphocytes and natural killer cells. *Annals New York Academy of Sciences* 557: 405-414.

⁴⁰²**Yoshizaki K., Nishimoto N., Matsumoto K., Tagoh H., Taga T., Deguchi Y., Kuritani T., Hirano T., Hashimoto K., Okada N., Hishimoto T.** (1990). Interleukin 6 and expression of its receptor on epidermal keratinocytes. *Cytokine* 2: 381-387.

⁴⁰³**Toshitani A., Ansel J.C., Chan S.C., Li S.H., Hanifin J.M.** (1993). Increased interleukin 6 production by T cells derived from patients with atopic dermatitis. *Journal of Investigative Dermatology* 100: 299-304.

⁴⁰⁴**Bunikowski R., Gerhold K., Brautigam M., Hamelmann E., Renz H., Wahn U.** (2001). Effect of low-dose cyclosporin a microemulsion on disease severity, interleukin-6, interleukin-8 and tumor necrosis factor alpha production in severe pediatric atopic dermatitis. *International Archives of Allergy and Immunology* 125: 344-348.

⁴⁰⁵**Reilly D.M., Parslew R., Sharpe G.R., Powell S., Green M.R.** (2000). Inflammatory mediators in normal, sensitive and diseased skin types. *Acta Dermato-Venereologica* 80: 171-174.

⁴⁰⁶**Yamada N., Wakugawa M., Kuwata S., Nakagawa H., Tamaki K.** (1996). Changes in eosinophil and leukocyte infiltration and expression of IL-6 and IL-7 messenger RNA in mite allergen patch test reactions in atopic dermatitis. *Journal of Allergy and Clinical Immunology* 98: S201-206.

⁴⁰⁷**Saito H., Ebisawa M., Tachimoto H., Shichijo M., Fukugawa K., Matsumoto K., Iikura Y., Awaji T., Tsujimoto G., Yanagida M., Uzumaki H., Takahashi G., Tsuji K., Nakahata T.** (1996). Selective growth of human mast cells induced by Steel factor, IL-6, and prostaglandin E2 from cord blood mononuclear cells. *Journal of Immunology* 157: 343-350.

⁴⁰⁸**Imayama S., Shibata Y., Hori Y.** (1995). Epidermal mast cells in atopic dermatitis. *Lancet* 346: 1559.

⁴⁰⁹**Sigiura H., Uehara M.** (1993). Mitosis of mast cells in skin lesions of atopic dermatitis. *Acta Dermato Venereol* 73: 296-299.

⁴¹⁰**Taha R.A., Leung D.Y., Ghaffar O., Boguniewicz M., Hamid Q.** (1998). In vivo expression of cytokine receptor mRNA in atopic dermatitis. *Journal of Allergy and Clinical Immunology* 102: 245-250.

⁴¹¹**Gauldie J., Richards C., Harnish D., Lansdorp P., Baumann H.** (1987). Interferon β_2 /B-cell stimulatory factor type 2 shares identity with monocyte-derived hepatocyte-stimulating factor and regulates the major acute phase protein response

in liver cells. Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA 84: 7251-7255.

⁴¹²**Wood L.C., Jackson S.M., Elias P.M., Grunfeld C., Feingold K.R.** (1992). Kutanous barrier perturbation stimulates cytokine production in the epidermis of mice. Journal of Clinical Investigation 90: 482-487.

⁴¹³**Wood L.C., Elias P.M., Calhoun C., Tsai J.C., Grunfeld C., Feingold K.R.** (1996). Barrier disruption stimulates interleukin-1 α expression and release from a preformed pool in murine epidermis. Journal of Investigative Dermatology 106: 397-403.

⁴¹⁴**Nickoloff B.J., Naidu Y.** (1994). Perturbation of epidermal barrier function correlates with initiation of cytokine cascade in human skin. Journal of the American Academy of Dermatology 30: 535-546.

⁴¹⁵**Kupper T.S., Min K., Sehgal P., Mizutani H., Birchall N., Ray A., May L.** (1989). Production of IL-6 by keratinocytes. Implications for epidermal inflammation and immunity. Annals New York Academy of Sciences 557: 454-464.

⁴¹⁶**Navarro S., Debili N., Bernaudin J.F., Vainchenker W., Doly J.** (1989). Regulation of the expression of IL-6 in human monocytes. Journal of Immunology 142: 4339-4345.

⁴¹⁷**Derocq J.M., Segui M., Poinot-Chazel C., Minty A., Caput D., Ferrara P., Casellas P.** (1994). Interleukin-13 stimulates interleukin-6 production by human keratinocytes. Similarity with interleukin-4. FEBS Letters 343: 32-36.

⁴¹⁸**Witmer-Pack M.D., Olivier W., Valinsky J., Schuler G., Steinman R.M.** (1987). Granulocyte/macrophage colony-stimulating factor is essential for the viability and function of cultured murine epidermal Langerhans cells. Journal of Experimental Medicine 166: 1484-1498.

⁴¹⁹**Taylor R.S., Baadsgaard O., Hammerberg C., Cooper K.D.** (1991). Hyperstimulatory CD1a⁺ CD1b⁺ CD36⁺ Langerhans cells are responsible for increased autologous T lymphocyte reactivity to lesional epidermal cells of patients with atopic dermatitis. Journal of Immunology 147: 3794-3802.

⁴²⁰**Sallusto F., Lanzavecchia A.** (1994). Efficient presentation of soluble antigen by cultured human dendritic cells is maintained by granulocyte/macrophage colony-stimulating factor plus interleukin 4 and downregulated by tumor necrosis factor α . Journal of experimental Medicine 179: 1109-1118.

⁴²¹**Heufler C., Koch F., Schuler G.** (1988). Granulocyte/macrophage colony-stimulating factor and interleukin 1 mediate the maturation of murine epidermal Langerhans cells into potent immunostimulatory dendritic cells. Journal of Experimental Medicine 167: 700-705.

⁴²²**Ristow H.J.** (1987). A major factor contributing to epidermal proliferation in inflammatory skin diseases appears to be interleukin 1 or a related protein. Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA 84:1940-1944.

⁴²³**Pentland A.P., Mahoney M.G.** (1990). Keratinocyte prostaglandin synthesis is enhanced by IL-1. Journal of Investigative Dermatology 94: 43-46.

⁴²⁴**Gueniche A., Viac J., Charveron M., Schmitt D.** (1994). Effect of gamma-interferon on IL-1 alpha, beta and receptor antagonist production by normal human keratinocytes. Experimental Dermatology 3: 113-118.

⁴²⁵**Oxholm A., Oxholm P., Staberg B., Bendtzen K.** (1988). Immunohistological detection of interleukin-1-like molecules and tumour necrosis factor in human epidermis before and after UVB-irradiation in vivo. British Journal of Dermatology 118: 369-376.

- ⁴²⁶**Nagai H., Abe T., Yamaguchi I., Mito K., Tsunematsu M., Kimata M., Inagaki N.** (2000). Role of mast cells in the onset of IgE-mediated late-phase kutaneous response in mice. *Journal of Allergy and Clinical Immunology* 106: S91-S98.
- ⁴²⁷**Taha R.A., Leung D.Y., Ghaffar O., Boguniewicz M., Hamid Q.** (1998). In vivo expression of cytokine receptor mRNA in atopic dermatitis. *Journal of Allergy and Clinical Immunology* 102: 245-250.
- ⁴²⁸**Park K.C., Kim D.S., Kim H.J., Seo K.I., Kim K.H., Chung J.H., Eun H.C., Jung H.C.** (2001). Growth related secretion and production of GM-CSF by epizhelial cell line. *Journal of Dermatological Science* 25: 53-58.
- ⁴²⁹**Kawada A., Hiruma M., Noguchi H., Ishibashi A., Motoyoshi K., Kawada I.** (1997). Granulocyte and macrophage colony-stimulating factors stimulate proliferation of human keratinocytes. *Archives of Dermatology Research* 189: 600-602.
- ⁴³⁰**Kaplan G., Walsh G., Guido L.S., Meyn P., Burckhardt R.A., Abalos R.M., Barker J., Frindt P.A., Fajardo T.T., Celona R.** (1992). Novel responses of human skin to intradermal recombinant granulocyte/macrophage-colony-stimulating factor: Langerhans cell recruitment, keratinocyte growth, and enhanced wound healing. *Journal of Experimental Medicine* 175: 1717-1728.
- ⁴³¹**Tanaka M., Dykes P.J., Marks R.** (1997). Keratinocyte growth stimulation by granulocyte-macrophage colony-stimulating factor (GM-CSF). *The Keio Journal of Medicine* 46: 184-187.
- ⁴³²**Braunstein S., Kaplan G., Gottlieb A.B., Schwartz M., Walsh G., Abalos R.M., Fajardo T.T., Guido L.S., Krueger J.G.** (1994). GM-CSF activates regenerative epidermal growth and stimulates keratinocyte proliferation in human skin. *Journal of Investigative Dermatology* 103: 601-604.
- ⁴³³**Glass L.F., Fotopoulos T., Messina J.L.** (1996). A generalized kutaneous reaction induced by granulocyte colony-stimulating factor. *Journal of the American Academy of dermatology* 34: 455-459.
- ⁴³⁴**Nilsson G., Kjellén L., Butterfield J.H., Sundström C., Nilsson K., Hellman L.** (1994). Phenotypic characterization of human mast-cell line HMC-1. *Scandinavian Journal of Immunology* 39: 489-498.
- ⁴³⁵**Bochner B.S., Sterbinsky S.A., Saini S.A., Columbo M., MacGlashan D.W.** (1997). Studies of cell adhesion and flow cytometric analyses of degranulation, surface phenotype, and viability using human eosinophils, basophils, and mast cells. *METHODS: A Companion to Methods in Enzymology* 13: 61-68.
- ⁴³⁶**Benyon R.C., Lowman M.A., Church M.K.** (1987). Human skin mast cells: their dispersion, purification and secretory characterization. *Journal of Immunology* 138: 861-867.
- ⁴³⁷**Lawrence I.D., Warner J.A., Cohan V.L., Hubbard W.C., Kagey-Sobotka A., Lichtenstein L.M.** (1987). Purification and characterization of human skin mast cells. Evidence for human mast cell heterogeneity. *Journal of Immunology* 139: 3062-3069.
- ⁴³⁸Persönliche Mitteilung von **Dr. Knut Brockow**, Klinische Kooperationsgruppe für Umweltdermatologie und Allergologie GSF/TUM; ZAUM Zentrum für Allergie und Umwelt, München.

Anhang

A 1 ÜBERSICHT: EXPERIMENTVARIABLEN DER VOC- EXPOSITIONS- VERSUCHE	I
A 2 METHODE DER SELEKTIVEN MASTZELLKULTUR AUS HUMANEN DERMISEXPLANTATKULTUREN	III
A 3 DATENTABELLEN	V
A 4 DANKSAGUNG	LV
A 5 ERKLÄRUNG	LVII
A 6 LEBENSLAUF	LIX
A 7 PUBLIKATIONSVERZEICHNIS	LXI

A 1 Übersicht: Experimentvariablen der VOC-Expositionsversuche

1. Fallgruppen

- ◆ pathologisch unauffällige, normal gesunde Haut
- ◆ läasionales atopisches Ekzem
- ◆ nicht läasionale Haut von Probanden mit atopischem Ekzem

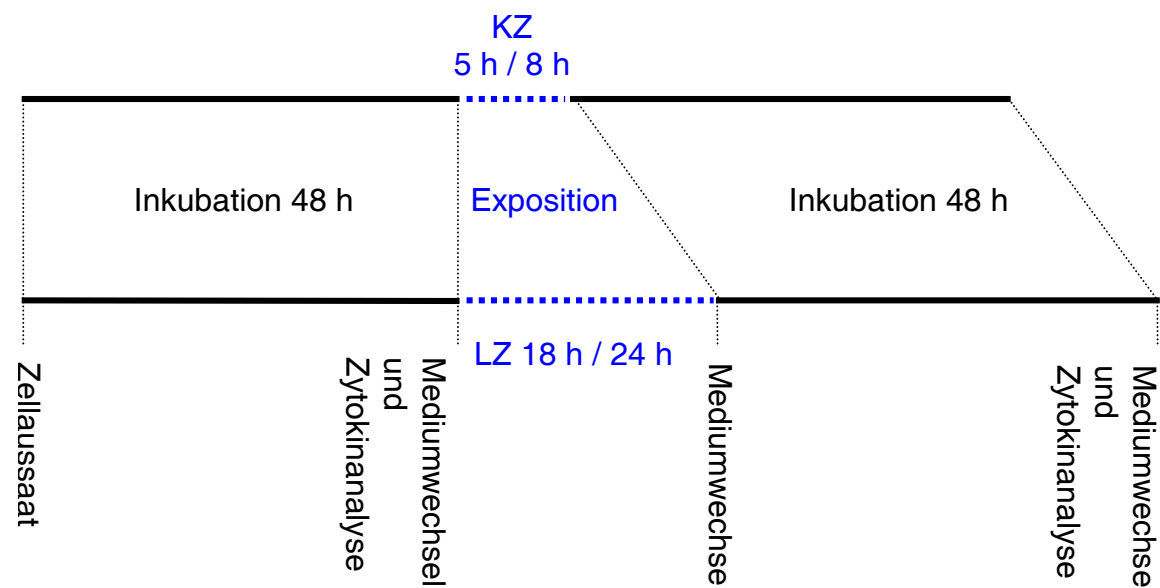
2. Expositionsvariablen

- ◆ 3 MAK Toluol (570 mg/m³ bzw. 150 ppm)
- ◆ 1 MAK Toluol (190 mg/m³ bzw. 50 ppm)
- ◆ 1 MAK m-Xylol (440 mg/m³ bzw. 100 ppm)
- ◆ umweltrelevantes VOC-Gemisch (0,08 mg/m³ bzw. 0,021 ppm Toluol
0,053 mg/m³ bzw. 0,012 ppm m-Xylol)
- ◆ Kontrollexposition synthetische Luft
- ◆ Kontrollinkubation unter Zellkultur-Standardbedingungen (37°C, 5 % CO₂,
95 % relative Luftfeuchte)

3. Expositionsdauer

- ◆ Kurzzeitexpositionen (KZ): 5 h bzw. 8 h
- ◆ Langzeitexpositionen (LZ): 18 h bzw. 24 h

4. Zeitschema der Experimente



A 2 Methode der selektiven Mastzellkultur aus humanen Dermisexplantatkulturen

Der Einsatz zellspezifisch supplementierter Kulturmedien ermöglichte eine zellschonende, selektive Isolierung und Kultivierung von vitalen Mastzellen aus der Dermisexplantatkultur einer an Mastozytose erkrankten Patientin. Nur 5 Tage nach Aufsetzen der Dermis in DMEM mit 20 % FKS migrierten stark granuliert und teils degranulierende Mastzellen aus dem Dermisexplantat. Ein Mediumwechsel auf das üblicherweise für HMC-1-Mastzellsuspensionskulturen verwendete Iscove's Medium (mit 10 % FKS, 2 mM Glutamin, 1,2 mM Monothioglycerol^{274,434}) führte zu schwach adhären Mastzellclustern und proliferierenden Kolonien, die durch Abklopfen leicht von den adhären Fibroblasten separiert werden konnten. (Eine Einrichtung zur mikroskopischen Photodokumentation stand zum Zeitpunkt der Versuchsdurchführung nicht zur Verfügung.) Unter zusätzlicher Mediensupplementierung mit 25-50 µg/ml Stammzellefaktor/c-Kit-Ligand ließen sich die Mastzellen wahlweise als Suspensionskultur in konventionellen Zellkulturflaschen oder als adhärenter „monolayer“ auf lamininbeschichteten Membraneinsätzen subkultivieren.

Damit wird erstmals eine Methode der selektiven Isolierung vitaler, proliferationsfähiger Mastzellkulturen aus humanen Explantatkulturen beschrieben. *In vitro* Kulturen gewebestämmiger Mastzellen werden erst seit Mitte der 80er Jahre gewonnen⁴³⁵. Dabei werden Hautproben enzymatisch (Kollagenase, Hyaluronidase) aufgeschlossen. Anschließend werden die Mastzellen mittels Dichtegradientenzentrifugation aufkonzentriert und von der Gewebezellsuspension separiert^{436,437}. Demgegenüber ist die hier beschriebene Methode per Migration gewonnener Mastzellkulturen wesentlich weniger invasiv und zellschonender. Da sie die Mastzellen weniger stresst, induziert die Isolierung an sich keine Degranulation. Auf diese Weise gewonnene Mastzellkulturen liefern daher möglicherweise exaktere Aussagen über das Stimulations- und inflammatorische Potential von Mastzellen aus gesunder und erkrankter Haut, z. B. von den im atopischem Ekzem verstärkt vorkommenden Mastzellen^{408,409}. Die Methode wird deshalb derzeit mit kleineren Hautexplantaten (kürzere Migrationsstrecken) und mastzellspezifischem Medium ab dem ersten Kulturtag dahingehend weiterentwickelt, auch aus – im Vergleich zur Mastozytose – weniger mastzellreichem Gewebe vitale Kulturen zu gewinnen⁴³⁸.

⁴³⁴**Nilsson G., Kjellén L., Butterfield J.H., Sundström C., Nilsson K., Hellman L.** (1994). Phenotypic characterization of human mast-cell line HMC-1. *Scandinavian Journal of Immunology* 39: 489-498.

⁴³⁵**Bochner B.S., Sterbinsky S.A., Saini S.A., Columbo M., MacGlashan D.W.** (1997). Studies of cell adhesion and flow cytometric analyses of degranulation, surface phenotype, and viability using human eosinophils, basophils, and mast cells. *METHODS: A Companion to Methods in Enzymology* 13: 61-68.

⁴³⁶**Benyon R.C., Lowman M.A., Church M.K.** (1987). Human skin mast cells: their dispersion, purification and secretory characterization. *Journal of Immunology* 138: 861-867.

⁴³⁷**Lawrence I.D., Warner J.A., Cohan V.L., Hubbard W.C., Kagey-Sobotka A., Lichtenstein L.M.** (1987). Purification and characterization of human skin mast cells. Evidence for human mast cell heterogeneity. *Journal of Immunology* 139: 3062-3069.

⁴³⁸ Persönliche Mitteilung von **Dr. Knut Brockow**, Klinische Kooperationsgruppe für Umweltdermatologie und Allergologie GSF/TUM; ZAUM Zentrum für Allergie und Umwelt, München.

A 3 Datentabellen

A3.1 Datentabelle zu Abbildung 6: Proliferationsverhalten seriell kultivierter Primärkeratinozyten

I.	Passage 1		Passage 2		Passage 3		Passage 4	
	Inkubationszeit [h]	Mittelwert aus n=4	Stdabw. 1 σ	Mittelwert aus n=4	Stdabw. 1 σ	Mittelwert aus n=4	Stdabw. 1 σ	Mittelwert aus n=4
0	$1 \cdot 10^5$	0	$1 \cdot 10^5$	0	$1 \cdot 10^5$	0	$1 \cdot 10^5$	0
24	$1,75 \cdot 10^5$	$0,21 \cdot 10^5$	$1,70 \cdot 10^5$	0	$1,83 \cdot 10^5$	$0,67 \cdot 10^5$	$1,30 \cdot 10^5$	$0,07 \cdot 10^5$
48	$3,28 \cdot 10^5$	$0,11 \cdot 10^5$	$4,38 \cdot 10^5$	$0,53 \cdot 10^5$	$3,90 \cdot 10^5$	$0,57 \cdot 10^5$	$2,75 \cdot 10^5$	$0,07 \cdot 10^5$
72	$7,23 \cdot 10^5$	$0,11 \cdot 10^5$	$11,05 \cdot 10^5$	$1,63 \cdot 10^5$	$5,80 \cdot 10^5$	$1,56 \cdot 10^5$	$6,70 \cdot 10^5$	$1,91 \cdot 10^5$
96	$16,05 \cdot 10^5$	$1,56 \cdot 10^5$	$12,23 \cdot 10^5$	$0,96 \cdot 10^5$	$10,38 \cdot 10^5$	$1,10 \cdot 10^5$	$11,35 \cdot 10^5$	$0,21 \cdot 10^5$

II.	Passage 5	Passage 6	Passage 7
Inkubationszeit [h]	Mittelwert aus n=4	Mittelwert aus n=4	Mittelwert aus n=4
0	$0,93 \cdot 10^5$	$1 \cdot 10^5$	$1 \cdot 10^5$
24	$2,32 \cdot 10^5$		
48	$2,70 \cdot 10^5$	$2,08 \cdot 10^5$	$1,25 \cdot 10^5$
96	$3,65 \cdot 10^5$	$4,93 \cdot 10^5$	$1,28 \cdot 10^5$
168	$14,50 \cdot 10^5$	$9,50 \cdot 10^5$	$3,50 \cdot 10^5$

A3.2 Datentabelle zu Abbildung 10: MTT-Vitalitätstest: Primärkeratinozyten wurden 2,5 h mit 14 Konzentrationen von 0 g/ml bis 1,0 g/ml Flucloxacillin inkubiert. Angegeben sind 1 σ -Standardabweichungen (n = 3 bzw. n = 4). (abgelesene Rohdaten)

Flucloxacillin [g/ml]	O.D. 595 nm Mittelwerte aus n=3 bzw. n=4	1 σ -Standardabweichung Fehlerbalken untere Grenze obere Grenze	
0,670	0,000	0,010	0,005
0,330	0,028	0,001	0,002
0,160	0,034	0,000	0,000
0,083	0,050	0,000	0,000
0,030	0,110	0,004	0,006
0,028	0,119	0,002	0,002
0,017	0,108	0,017	0,009
0,008	0,132	0,011	0,013
0,003	0,139	0,009	0,013
0,001	0,151	0,002	0,003
$1,70 \cdot 10^{-4}$	0,136	0,012	0,016
$8,30 \cdot 10^{-7}$	0,120	0,005	0,003
$4,17 \cdot 10^{-9}$	0,148	0,008	0,006
$1,00 \cdot 10^{-10}$	0,140	0,021	0,017

A3.3 Datentabelle zu Abbildung 24: Zeitabhängiger Verlust der Toluol-Konzentration im Zellkulturmedium

Inkubationszeit [h]	Peakfläche [μ Vs] (abgelesene GC-Rohdaten)				
	Nullkontrolle	Toluol Konz. 1	Toluol Konz. 2	Toluol Konz. 3	Toluol Konz. 4
0	0,00	212316,00	137408,00	114297,00	87827,00
1	19883,07	74914,38	53036,09	46927,50	32566,41
2	7528,56	4529,86	7577,68	9182,46	3290,66
5	1000,00	1162,47	1032,80	1061,48	1000,00

A3.4 Datentabelle zu Abbildung 30: Verlauf der Parameter relative Luftfeuchte und Temperatur bei der Exposition von submersen Zellkultursystemen

Zeit [Min]	rel. Feuchte [%]	Temp. [$^{\circ}$ C]
1,5	56,0	28,1
2,0	57,0	28,1
2,5	59,0	28,1
2,8	60,8	28,1
3,0	64,5	28,1
4,0	66,0	28,1
6,0	67,8	28,1
7,0	68,1	28,1
9,0	68,1	28,1
12,0	67,3	28,0
14,0	66,4	28,0
15,0	65,5	28,0
17,0	63,4	28,0
19,0	62,2	28,0
23,0	60,8	28,0
25,0	60,2	28,0
29,0	58,5	28,0
33,0	57,0	28,1
38,0	55,9	28,1
46,0	54,3	28,1
52,0	53,7	28,1
57,0	53,8	28,1
62,0	53,4	28,1
67,0	53,2	28,1
72,0	53,2	28,2
80,0	52,9	28,2
88,0	52,7	28,2

A3.5 Datentabelle zu Abbildung 31: Bestimmung des apparaturbedingten Totzeitvolumens anhand der relativen Luftfeuchte (Datentabelle siehe Anhang A3.5)

Zeit [Min]	rel. Feuchte [%]	Temp. [°C]
0,0		27,2
3,0		
4,0		27,2
4,7		
5,0		27,2
6,0	-0,1	
7,0	1,5	27,3
8,0	2,8	
9,5	4,7	27,3
10,0	5,4	
11,0	6,4	27,4
12,0	7,4	
13,0	8,3	27,4
14,0	9,2	
15,0	9,9	27,4
16,0	10,6	
17,0	11,3	27,5
18,0	11,8	
19,0	12,3	27,5
20,0	12,8	
21,0	13,2	27,6
22,0	13,7	
23,0	14,1	27,6
24,0	14,4	
25,0	14,7	27,6
26,25	15,0	
27,0	15,2	27,7
29,0	15,6	
34,0	16,4	27,7
37,0	16,9	
45,0	17,5	27,8
50,0	17,7	
59,0	17,8	27,8
63,0	17,8	
65,0	17,8	27,8
72,0	17,9	
76,0	17,8	
77,0	17,7	27,9

A3.6 Datentabelle zu Tabelle 8: Nachweis-, Erfassungs- und Bestimmungsgrenze der Analyten Toluol und m-Xylol durch konventionelle Gaschromatographie

ELISA Platten ID	Zytokin Assay	höchster		niedrigster		lineares Kalibrierkurvenverfahren nach DIN 32645		
		Kalibrierstd. (n=2)		Kalibrierstd. (n=2)		Nachweis- grenze [pg/ml]	Erfassungs- grenze [pg/ml]	Bestimmungs- grenze [pg/ml]
		OD	[pg/ml]	OD	[pg/ml]			
3	GMCSF	0,578	96	0,102	0,000	7,1	14,1	31,6
a	GMCSF	1,920	240	0,258	2,458	9,1	18,1	32,5
d	GMCSF	1,948	240	0,210	2,458	8,9	17,9	32,1
g	GMCSF	2,080	240	0,276	2,458	5,3	10,5	19,3
h	GMCSF	1,886	240	0,213	2,458	4,3	8,7	16,1
l	GMCSF	2,053	240	0,195	2,458	5,1	10,2	18,7
j	GMCSF	2,039	240	0,249	2,458	2,6	5,1	9,7
k	GMCSF	1,904	240	0,240	2,458	5,4	10,7	19,6
n	GMCSF	1,896	240	0,209	2,458	5,5	11,1	20,2
w	GMCSF	1,355	240	0,078	2,458	1,5	3,1	5,9
x	GMCSF	1,261	240	0,054	2,458	3,0	6,0	11,2
y	GMCSF	1,282	240	0,073	2,458	5,8	11,5	21,0
z	GMCSF	1,534	240	0,205	2,458	9,9	19,8	37,5
dd	GMCSF	1,074	96	0,067	0,983	2,1	4,3	7,8
ee	GMCSF	0,605	96	0,045	0,983	3,3	6,6	12,6
ff	GMCSF	1,239	96	0,104	0,983	1,7	3,4	6,2
ii	GMCSF	0,862	96	0,089	0,983	2,0	4,0	7,3
ww	GMCSF	1,973	240	0,234	2,158	5,7	11,4	20,8
ppp	GMCSF	0,474	96	0,035	0,983	2,5	4,9	9,4
qqq	GMCSF	0,465	96	0,041	0,983	2,5	5,0	9,5
rrr	GMCSF	0,400	96	0,034	0,983	5,8	11,6	21,6
1	IL-1 α	0,423	64	0,020	0,000	6,5	12,9	33,0
b	IL-1 α	0,794	160	0,057	1,638	4,5	8,9	16,2
e	IL-1 α	1,028	160	0,028	1,638	3,8	7,6	13,8
l	IL-1 α	0,855	160	0,028	1,638	0,9	1,8	3,4
o	IL-1 α	0,875	160	0,038	1,638	4,2	8,5	15,3
p	IL-1 α	1,080	160	0,072	1,638	5,7	11,3	20,3
q	IL-1 α	1,917	160	0,057	1,638	3,5	7,1	12,9
r	IL-1 α	0,918	160	0,034	1,638	10,1	20,2	37,7
aa	IL-1 α	1,706	64	0,077	0,655	1,9	3,7	6,7
kk	IL-1 α	0,433	160	0,139	1,638	32,1	64,2	252,6
mm	IL-1 α	0,791	160	0,048	1,638	6,0	11,9	21,4
oo	IL-1 α	1,250	160	0,064	1,638	17,1	34,2	91,1
qq	IL-1 α	0,793	160	0,025	1,638	8,1	16,2	26,6
ss	IL-1 α	1,061	160	0,028	1,638	6,4	12,8	24,2
uu	IL-1 α	1,099	160	0,105	1,638	7,1	14,2	26,7
yy	IL-1 α	0,967	160	0,048	4,096	12,0	23,9	44,5
vvv	IL-1 α	0,163	64	0,031	0,655	10,1	20,1	75,9
www	IL-1 α	1,365	64	0,078	0,655	2,5	5,0	8,9
xxx	IL-1 α	1,514	64	0,089	0,655	1,8	2,5	6,4
yyy	IL-1 α	1,537	64	0,123	0,655	9,0	18,0	61,0
zzz	IL-1 α	1,841	64	0,063	0,655	0,6	1,3	2,4
2	IL-6	1,038	64	0,118	0,000	3,8	7,7	14,8
c6110303	IL-6	0,263	64	0,016	0,655	3,1	6,2	11,4
c	IL-6	1,510	160	0,050	1,638	9,5	19,0	36,8
f	IL-6	2,093	160	0,084	1,638	6,3	12,5	22,5
m	IL-6	2,033	160	0,037	1,638	2,5	5,1	9,4

ELISA Platten ID	Zytokin Assay	höchster		niedrigster		lineares Kalibrierkurvenverfahren nach DIN 32645		
		Kalibrierstd. (n=2)		Kalibrierstd. (n=2)		Nachweis- grenze [pg/ml]	Erfassungs- grenze [pg/ml]	Bestimmungs- grenze [pg/ml]
		OD	[pg/ml]	OD	[pg/ml]			
s	IL-6	1,742	160	0,073	1,638	9,8	19,7	37,9
t	IL-6	2,088	160	0,070	1,638	2,1	4,3	8,3
u	IL-6	2,012	160	0,068	1,638	5,5	11,0	19,8
v	IL-6	0,842	160	0,021	1,638	3,2	6,4	12,5
bb	IL-6	1,739	64	0,076	0,655	1,5	3,1	5,6
cc	IL-6	1,962	64	0,174	0,655	2,5	4,9	8,8
jj	IL-6	1,624	64	0,102	0,655	1,3	2,7	4,9
ll	IL-6	1,600	160	0,041	1,638	8,9	17,9	33,4
nn	IL-6	2,035	160	0,046	1,638	5,9	11,8	21,2
pp	IL-6	1,518	160	0,034	1,638	21,5	43,0	85,0
rr	IL-6	1,711	160	0,039	1,638	7,7	15,5	29,0
tt	IL-6	1,263	160	0,035	1,638	6,4	12,9	23,2
vv	IL-6	2,230	160	0,046	1,638	5,3	10,6	20,2
zz	IL-6	2,092	160	0,076	1,638	5,9	11,7	21,0
nnn	IL-6	0,314	64	0,023	0,655	6,1	12,3	30,2
ooo	IL-6	0,285	64	0,025	0,665	4,9	9,7	22,5
4	TNF α	0,257	160	0,022	0,000	17,0	34,0	90,4
gg	TNF α	1,259	160	0,049	1,638	14,2	28,3	65,9
hh	TNF α	1,338	160	0,084	1,638	4,6	9,2	17,6
xx	TNF α	1,884	400	0,044	4,096	5,7	11,4	22,2
sss	TNF α	0,197	160	0,014	4,096	36,2	72,3	395,0
ttt	TNF α	0,191	160	0,014	1,638	14,2	28,5	66,5
uuu	TNF α	0,289	160	0,018	1,638	7,4	14,7	26,7

A3.7 Rohdaten der VOC-Expositionsversuche

Proben-ID	Probanden-ID			Zytokinspontanzernierung														
	Fallgruppen			GMCSF				IL-1 α				IL-6				TNF α		
	Kontrolle normal gesund	atopisches Ekzem läsional	atopisches Ekzem nicht läsional	GMCSF [pg/ml]	1:<NG 2:<EG 3:<BG	ELISA Platten- ID	IL-1 α [pg/ml]	1:<NG 2:<EG 3:<BG	ELISA Platten- ID	IL-6 [pg/ml]	1:<NG 2:<EG 3:<BG	ELISA Platten- ID	TNF α [pg/ml]	1:<NG 2:<EG 3:<BG	ELISA Platten- ID			
633	BK			11,389		x	86,899		p	10,680	t							
636	BK			10,402	3	x	86,925		p	8,817	t							
599	BK			4,399	3	w	28,716		o	1,671	1	s						
602	BK			2,180	2	w	32,587		o	1,396	1	s						
605	BK			6,593		w	3,108	1	o	1,157	1	s						
608	BK			8,044		w	5,885	2	o	1,529	1	s						
670	HF			221,503		y	23,156		q	16,935	3	u						
673	HF			256,915		y	23,101		q	18,459	3	u						
664	HF			269,151		y	38,456		q	17,453	3	u						
667	HF			234,188		y	43,156		q	16,152	3	u						
267	HH			4,848	1	k	13,097	2	qq	1,743	1	rr						
270	HH			5,010	1	k	13,105	2	qq	1,644	1	rr						
279	HH			119,933		h	48,399		qq	29,931		rr						
282	HH			7,507	2	h	82,205		qq	13,637	2	rr						
391	HH			3,393	1	a	37,180	3	yy	0,655	1	zz						
394	HH			4,919	1	a	37,798	3	yy	0,714	1	zz						
325	HH			47,590		i	44,556		ss	5,245	1	tt						
328	HH			48,537		i	49,071		ss	6,208	1	tt						
343	HH			1,140	1	i	38,637		ss	3,052	1	tt						
346	HH			2,924	1	i	35,919		ss	2,691	1	tt						
260	HM			68,769		k	42,940		qq	14,804	2	rr						
263	HM			57,176		k	46,161		qq	15,205	2	rr						
265	HM			62,202		k	50,975		qq	15,682	3	rr						
268	HM			62,511		k	44,639		qq	15,123	2	rr						
272	HM			25,707		h	16,736	3	qq	6,997	1	rr						
275	HM			33,462		h	22,373	3	qq	11,347	2	rr						
277	HM			29,291		h	64,724		qq	5,680	1	rr						
280	HM			12,674	3	h	80,812		qq	14,569	2	rr						
676	HS			5,599	1	y	20,615		q	2,008	1	u						
679	HS			4,719	1	y	16,032		q	1,815	1	u						
662	HS			9,942	2	y	44,138		q	1,554	1	u						
663	HS			7,801	2	y	35,106		q	1,944	1	u						

Proben-ID	Probanden-ID			Zytokinspontanzernierung											
	Fallgruppen			GMCSF			IL-1α			IL-6			TNFα		
	Kontrolle normal gesund	atopisches Ekzem läsional	atopisches Ekzem nicht läsional	GMCSF [pg/ml]	1:<NG 2:<EG 3:<BG	ELISA Platten-ID	IL-1α [pg/ml]	1:<NG 2:<EG 3:<BG	ELISA Platten-ID	IL-6 [pg/ml]	1:<NG 2:<EG 3:<BG	ELISA Platten-ID	TNFα [pg/ml]	1:<NG 2:<EG 3:<BG	ELISA Platten-ID
671	HW			194,738		y	34,662		q	37,760		u			
674	HW			174,230		y	31,440		q	42,610		u			
537	HW			118,768		w	30,739		o	36,477	3	s			
540	HW			130,302		w	34,245		o	45,344		s			
543	HW			132,711		w	35,920		o	46,422		s			
546	HW			100,067		w	25,110		o	41,081		s			
259	ii			19,275	3	k	63,973		qq	3,712	1	rr			
262	ii			18,182	3	k	47,541		qq	4,940	1	rr			
248	ii			39,102		h	22,776	3	qq	2,047	1	rr			
251	ii			52,939		h	27,869		qq	2,129	1	rr			
254	ii			36,214		h	23,777	3	qq	1,589	1	rr			
257	ii			37,423		h	22,423	3	qq	1,938	1	rr			
271	ii			168,900		h	49,907		qq	29,567		rr			
274	ii			188,920		h	41,299		qq	27,536	3	rr			
535	IW			126,935		w	72,001		o	8,363	1	s			
538	IW			135,805		w	69,564		o	11,136	2	s			
541	IW			130,529		w	66,237		o	10,674	2	s			
544	IW			138,721		w	51,768		o	11,283	2	s			
597	IW			13,955		w	36,418		o	2,866	1	s			
600	IW			10,510		w	40,002		o	3,120	1	s			
604	IW			5,775	3	w	1,976	1	o	0,717	1	s			
607	IW			4,069	3	w	2,511	1	o	0,908	1	s			
512	IW			6,198	2	ww	21,831	3	uu	1,753	1	vv	0,220	1	
515	IW			7,170	2	ww	6,007	1	uu	1,805	1	vv	0,000	1	
518	IW			9,263	2	ww	6,344	1	uu	1,662	1	vv	0,000	1	
521	IW			7,810	2	ww	27,027		uu	3,687	1	vv	0,000	1	
213	IZ			4,239	1	k	49,685	3	oo	6,238	1	pp			
216	IZ			0,471	1	k	39,811	3	oo	5,354	1	pp			
219	IZ			12,388	3	k	49,117	3	oo	5,526	1	pp			
222	IZ			1,009	1	k	34,981	3	oo	5,523	1	pp			
187	IZ			20,593		j	28,219		mm	5,861	1	nn			
190	IZ			23,144		j	27,059		mm	5,508	1	nn			

Proben-ID	Probanden-ID			Zytokinspontanzernierung																	
	Fallgruppen			GMCSF					IL-1 α					IL-6					TNF α		
	Kontrolle normal gesund	atopisches Ekzem läsional	atopisches Ekzem nicht läsional	GMCSF [pg/ml]	1:<NG 2:<EG 3:<BG	ELISA Platten-ID	IL-1 α [pg/ml]	1:<NG 2:<EG 3:<BG	ELISA Platten-ID	IL-6 [pg/ml]	1:<NG 2:<EG 3:<BG	ELISA Platten-ID	IL-6 [pg/ml]	1:<NG 2:<EG 3:<BG	ELISA Platten-ID	TNF α [pg/ml]	1:<NG 2:<EG 3:<BG	ELISA Platten-ID			
199	IZ			10,867		j	14,690	3	mm	3,755	1	nn									
200	IZ			10,913		j	14,537	3	mm	4,154	1	nn									
201	IZ			10,444		j	14,150	3	mm	3,477	1	nn									
202	IZ			11,490		j	16,597	3	mm	3,836	1	nn									
203	IZ			17,250		j	18,370	3	mm	3,573	1	nn									
204	IZ			10,364		j	16,588	3	mm	3,770	1	nn									
223	IZ			1,912	1	k	45,627	3	oo	16,584	1	pp									
226	IZ					k	72,770	3	oo	15,867	1	pp									
229	IZ			3,528	1	k	42,077	3	oo	4,310	1	pp									
232	IZ			5,255	1	k	51,965	3	oo	17,138	1	pp									
165	IZ			10,613		ii	9,401	1	kk	1,520	1	ll									
168	IZ			2,671	2	ii	41,809	2	kk	1,699	1	ll									
171	IZ			13,531		ii	97,086	3	kk	1,675	1	ll									
174	IZ			2,270	2	ii	157,238	3	kk	2,181	1	ll									
177	IZ			24,475		ii	32,280	2	kk	3,513	1	ll									
180	IZ			8,776		ii	1436,810		kk	4,691	1	ll									
193	IZ			20,539		j	20,905	3	mm	5,652	1	nn									
196	IZ			25,704		j	30,103		mm	5,446	1	nn									
205	IZ			8,548	3	j	17,753	3	mm	3,930	1	nn									
206	IZ			7,494	2	k	18,740	3	mm	4,265	1	nn									
207	IZ			7,833	2	k	18,048		mm	4,134	1	nn									
208	IZ			7,299	2	k	18,474		mm	4,117	1	nn									
209	IZ			10,147	2	k	22,899	2	oo	3,111	1	pp									
210	IZ			7,413	2	k	22,175	2	oo	2,679	1	pp									
235	IZ					k			oo			pp									
238	IZ						75,908	3	oo	13,765	1	pp									
241	IZ						37,950	3	oo	6,517	1	pp									
244	IZ						41,753	3	oo	16,717	1	pp									
181	IZ			0,197	1	j	28,017		mm	2,557	1	nn									
182	IZ			3,897	2	j	58,447		mm	4,141	1	nn									
183	IZ			2,286	1	j	117,208		mm	5,297	1	nn									
184	IZ			3,241	2	j	39,419		mm	2,936	1	nn									

Proben-ID	Probanden-ID		Zytokinspontanzemierung																			
	Fallgruppen		GMCSF				IL-1 α				IL-6				TNF α							
	Kontrolle normal gesund	atopisches Ekzem läsional	atopisches Ekzem nicht läsional	GMCSF [pg/ml]	1:<NG	2:<EG	3:<BG	ELISA Platten-ID	IL-1 α [pg/ml]	1:<NG	2:<EG	3:<BG	ELISA Platten-ID	IL-6 [pg/ml]	1:<NG	2:<EG	3:<BG	TNF α [pg/ml]	1:<NG	2:<EG	3:<BG	ELISA Platten-ID
185	IZ			4,045	2		j	58,403				mm	3,686	1			nn					
186	IZ			4,883	2		j	128,114				mm	5,492	1			nn					
261	ko			6,896	2		k	62,474				qq	6,953	1			rr					
264	ko			6,843	2		k	62,991				qq	5,188	1			rr					
249	ko			10,148	3		h	14,131	2			qq	2,200	1			rr					
252	ko			9,693	3		h	11,491	2			qq	1,717	1			rr					
255	ko			10,382	3		h	8,409	2			qq	2,598	1			rr					
258	ko			13,672	3		h	9,593	2			qq	2,836	1			rr					
273	ko			9,071	3		h	13,732	2			qq	2,551	1			rr					
276	ko			10,898	3		h	14,275	2			qq	1,871	1			rr					
536	LW			89,687			w	38,675				o	13,792	2			s					
539	LW			115,941			w	46,420				o	15,951	2			s					
542	LW			103,730			w	37,052				o	14,188	2			s					
545	LW			109,363			w	48,575				o	14,174	2			s					
266	MS			8,435	2		k	15,673	2			qq	3,732	1			rr					
269	MS			6,162	2		k	17,755				qq	4,961	1			rr					
278	MS						h					qq					rr					
281	MS						h					qq					rr					
224	MS			26,772			k	21,166	2			oo	1,873	1			pp					
227	MS			23,777			k	23,845	2			oo	1,801	1			pp					
242	MS							58,435	3			oo	7,385	1			pp					
245	MS			12,320	3		h	45,321				qq	8,528	2			rr					
627	MS			6,553	3		x	5,750	2			p	21,619				t					
630	MS			10,875	3		x	17,618	3			p	95,926				t					
632	MS			10,746	3		x	54,328				p	34,365				t					
635	MS			6,512	3		x	40,364				p	27,540				t					
585	MS			7,065	2		n	10,488				l	13,083				m					
588	MS			9,827	2		n	10,755				l	15,046				m					
573	MS			7,700	2		n	4,884				l	1,351				m					
576	MS			7,984	2		n	6,959				l	7,687	3			m					
598	MS			2,951	2		w	10,533	3			o	1,468	1			s					
601	MS			2,388	2		w	20,773				o	2,362	1			s					

Proben-ID	Probanden-ID		Zytokinspontanseznierung																			
	Fallgruppen		GMCSF				IL-1α				IL-6				TNFα							
	Kontrolle normal gesund	atopisches Ekzem läsional	atopisches Ekzem nicht läsional	GMCSF [pg/ml]	1:<NG	2:<EG	3:<BG	ELISA Platten-ID	IL-1α [pg/ml]	1:<NG	2:<EG	3:<BG	ELISA Platten-ID	IL-6 [pg/ml]	1:<NG	2:<EG	3:<BG	TNFα [pg/ml]	1:<NG	2:<EG	3:<BG	ELISA Platten-ID
603	MS			9,014			w	8,462	2	o	1,974	s										
606	MS			11,561			w	7,759	2	o	1,973	s										
511	MS			48,224			ww	7,639	2	uu	2,060	v v					0,000	1				xx
514	MS			48,539			ww	23,075	3	uu	2,292	v v					0,000	1				xx
517	MS			48,237			ww	9,814	2	uu	2,076	v v					0,000	1				xx
520	MS			54,204			ww	11,502	2	uu	2,041	v v					0,000	1				xx
211	OF			7,928	2		k	46,784	3	oo	0,715	pp										
214	OF			12,147	3		k	42,861	3	oo	0,952	pp										
217	OF			12,330	3		k	51,148	3	oo	0,184	pp										
220	OF			13,931	3		k	35,708	3	oo	0,600	pp										
706	OF			5,399	1		z	4,464	1	r	2,038	v										
708	OF			3,766	1		z	6,555	1	r	0,547	v										
615	OF			3,188	2		x	11,732	3	p	0,544	t										
618	OF			3,663	2		x	14,345	3	p	1,210	t										
621	OF			4,576	2		x	17,943	3	p	1,563	t										
624	OF			3,875	2		x	16,979	3	p	3,353	t										
677	OF			8,727	2		y	11,058	3	q	1,549	u										
680	OF			11,685	3		y	8,653	3	q	1,763	u										
188	OF			9,829			j	5,590	1	mm	1,844	nn										
191	OF			8,973	3		j	6,012	2	mm	1,838	nn										
230	OF			9,968	2		k	34,962	3	oo	7,948	pp										
233	OF			11,397	3		k	36,460	3	oo	10,639	pp										
194	OF			11,743			j	6,563	2	mm	0,080	nn										
197	OF			10,981			j	7,391	2	mm	1,807	nn										
236	OF							25,779	2	oo	1,488	pp										
239	OF							51,953	3	oo	1,015	pp										
579	OF			17,185	3		n	6,631		l	1,889	m										
582	OF			13,603	3		n	6,202		l	5,553	m										
567	OF			3,868	1		n	14,381		l	7,123	m										
570	OF			0,779	1		n	7,010		l	6,871	m										
591	OF			4,640	3		w	7,735	3	o	0,805	s										
594	OF			2,400	2		w	10,302	3	o	0,970	s										

Proben-ID	Probanden-ID		Zytokinspontanseznierung																			
	Fallgruppen		GMCSF			IL-1α			IL-6			TNFα										
	Kontrolle normal gesund	atopisches Ekzem läsional	atopisches Ekzem nicht läsional	GMCSF [pg/ml]	1:<NG	2:<EG	3:<BG	IL-1α [pg/ml]	1:<NG	2:<EG	3:<BG	ELISA Platten-ID	IL-6 [pg/ml]	1:<NG	2:<EG	3:<BG	ELISA Platten-ID	TNFα [pg/ml]	1:<NG	2:<EG	3:<BG	ELISA Platten-ID
247	oo			600,000				11,449	2		qq	6,195	1			rr						
250	oo			600,000				7,780	1		qq	6,071	1			rr						
253	oo			600,000				12,308	2		qq	3,553	1			rr						
256	oo			600,000				12,599	2		qq	4,926	1			rr						
592	SF			1,479		1		4,218	1		o	0,738	1			s						
595	SF			1,435		1		4,547	2		o	0,820	1			s						
523	SF			4,168		1		109,562			i	2,880	2			m						
526	SF			7,732		2		95,135			i	6,937	3			m						
529	SF			7,264				115,809			o	5,645	1			s						
532	SF			7,384				124,291			o	3,802	1			s						
397	UF			0,000		1		63,218			yy	0,966	1			zz						
400	UF			5,925		1		83,572			yy	4,009	1			zz						
319	UF			15,431		3		47,983			ss	4,566	1			tt						
322	UF			21,731				46,461			ss	5,147	1			tt						
349	UF			22,572				14,777	1		kk	0,000	1			ll						
352	UF			10,666		3		0,000	1		kk	0,000	1			ll						
212	VMR			14,588		3		52,757	3		oo	1,172	1			pp						
215	VMR			6,546		2		40,139	3		oo	1,163	1			pp						
218	VMR			8,063		2		54,877	3		oo	0,713	1			pp						
221	VMR			4,341		1		35,986	3		oo	1,153	1			pp						
189	VMR			6,059		3		6,593	2		mm	2,187	1			nn						
192	VMR			8,333		3		5,137	1		mm	2,127	1			nn						
231	VMR			40,797				128,209			oo	218,089				pp						
234	VMR										oo					pp						
195	VMR			9,530		3		5,361	1		mm	2,081	1			nn						
198	VMR			9,002		3		7,557	2		mm	2,074	1			nn						
237	VMR							43,296	3		oo	0,900	1			pp						
240	VMR							53,638	3		oo	1,859	1			pp						
524	WZ			28,587				48,183			i	23,177				m						
527	WZ			31,385				57,616			i	19,233				m						
530	WZ			52,682				71,887			o	24,326	3			s						
533	WZ			51,492				76,549			o	23,396	3			s						

Proben-ID	Probanden-ID		Zytokinspontanseznierung																			
	Fallgruppen		GMCSF				IL-1 α				IL-6				TNF α							
	Kontrolle normal gesund	atopisches Ekzem läsional	atopisches Ekzem nicht läsional	GMCSF [pg/ml]	1:<NG	2:<EG	3:<BG	ELISA Platten-ID	IL-1 α [pg/ml]	1:<NG	2:<EG	3:<BG	ELISA Platten-ID	IL-6 [pg/ml]	1:<NG	2:<EG	3:<BG	TNF α [pg/ml]	1:<NG	2:<EG	3:<BG	ELISA Platten-ID
707	xx			0,843	1	z	z	28,449	3	r	r	r	1,152	1	v	v						
709	xx			1,923	1	z	z	34,350	3	r	r	r	0,928	1	v	v						
593	xx			0,000	1	w	w	24,493		o	o	o	1,890	1	s	s						
596	xx			2,205	2	w	w	28,822		o	o	o	2,296	1	s	s						
379		AA		27,200	3	a	a	11,334	1	yy	yy	yy	1,734	1	zz	zz						
382		AA		25,677	3	a	a	14,542	2	yy	yy	yy	2,373	1	zz	zz						
568		AA		17,204	3	n	n	27,266		i	i	i	3,498	2	m	m						
571		AA		15,554	3	n	n	34,123		i	i	i	3,537	2	m	m						
580		AA		2,563	1	n	n	4,600		i	i	i	25,055		m	m						
583		AA		3,984	1	n	n	4,255		i	i	i	23,419		m	m						
393		AW		56,003		a	a	29,369	3	yy	yy	yy	3,467	1	zz	zz						
396		AW		38,496		a	a	36,437	3	yy	yy	yy	3,403	1	zz	zz						
375		AW		399,830		a	a	29,929	3	yy	yy	yy	6,888	2	zz	zz						
378		AW		247,685		a	a	21,625	2	yy	yy	yy	4,965	1	zz	zz						
164		AW		21,064		ii	ii	44,298	2	kk	kk	kk	2,859	1	ll	ll						
167		AW		22,957		ii	ii	25,349	1	kk	kk	kk	14,020	2	ll	ll						
170		AW		19,295		ii	ii	166,353	3	kk	kk	kk	13,766	2	ll	ll						
173		AW		27,758		ii	ii	132,205	3	kk	kk	kk	13,529	2	ll	ll						
175		AW		24,073		ii	ii	155,117	3	kk	kk	kk	26,412	3	ll	ll						
178		AW		36,678		ii	ii	19,150	1	kk	kk	kk	23,357	3	ll	ll						
313		AW		27,256		i	i	27,237		ss	ss	ss	11,228	2	tt	tt						
316		AW		23,089		i	i	26,727		ss	ss	ss	9,339	2	tt	tt						
611		AW		9,488		w	w	61,245		o	o	o	7,733	1	s	s						
614		AW		8,678	3	x	x	59,885		p	p	p	6,806	3	t	t						
682		AW		4,888	1	y	y	1,805	1	q	q	q	1,293	1	u	u						
685		AW		3,829	1	y	y	41,412		q	q	q	1,678	1	u	u						
333		AW		110,814		i	i	10,364	2	ss	ss	ss	5,633	1	tt	tt						
336		AW		118,100		i	i	13,144	3	ss	ss	ss	6,189	1	tt	tt						
644		AW		44,814		x	x	2,367	1	p	p	p	2,162	2	t	t						
647		AW		54,283		x	x	7,755	2	p	p	p	2,682	2	t	t						
688		AW		8,842	2	y	y	3,996	2	q	q	q	1,377	1	u	u						
691		AW		7,541	2	y	y	0,049	1	q	q	q	1,365	1	u	u						

Proben-ID	Probanden-ID		Zytokinspontanzernierung																					
	Fallgruppen		GMCSF					IL-1 α					IL-6					TNF α						
	Kontrolle normal gesund	atopisches Ekzem läsional	atopisches Ekzem nicht läsional	GMCSF [pg/ml]	1:<NG	2:<EG	3:<BG	ELISA Platten-ID	IL-1 α [pg/ml]	1:<NG	2:<EG	3:<BG	ELISA Platten-ID	IL-6 [pg/ml]	1:<NG	2:<EG	3:<BG	ELISA Platten-ID	TNF α [pg/ml]	1:<NG	2:<EG	3:<BG	ELISA Platten-ID	TNF α
694		AW		7,049	2		y	1,262	1		q	1,283	1				u							
697		AW		6,511	2		y	7,102	3		q	1,373	1				u							
656		AW		28,829			y	20,436			q	3,444	1				u							
659		AW		31,564			y	22,577			q	4,605	1				u							
700		AW		1,113	1		z	2,995	1		r	0,675	1				v							
703		AW		3,629	1		z	1,777	1		r	0,076	1				v							
295		AW		30,417			h	20,684	3		ss	3,248	1				tt							
298		AW		46,640			i	23,220			ss	4,316	1				tt							
368		DK		15,600	3		ww	86,073			uu	5,719	2				vv			0,000	1		xx	
371		DK		14,031	3		ww	22,212	3		uu	7,873	2				vv			0,000	1		xx	
422		DK		6,899	1		d	130,152			b	23,104	3				c							
425		DK		15,641	2		d	84,562			b	20,675	3				c							
410		DK		6,163	1		a	120,597			yy	17,504	3				zz							
413		DK		6,846	1		a	118,164			yy	19,241	3				zz							
488		DK		160,930			g	74,270			e	29,312					f							
491		DK		159,202			g	69,553			e	31,943					f							
458		DK		12,562	3		g	103,430			e	36,953					f							
461		DK		6,484	2		g	97,157			e	35,407					f							
470		DK		11,943	3		g	106,280			e	37,468					f							
473		DK		12,376	3		g	119,588			e	48,407					f							
476		DK		110,692			g	64,337			e	25,555					f							
479		DK		129,364			g	74,415			e	27,860					f							
399		GK		70,712			a	78,830			yy	54,195					zz							
402		GK		84,552			a	77,921			yy	55,193					zz							
415		GK		27,160	3		d	27,653			b	28,914	3				c							
418		GK		21,758	3		d	28,239			b	27,016	3				c							
307		GK		39,107			i	20,807	3		ss	3,501	1				tt							
310		GK		42,101			i	20,348	3		ss	3,486	1				tt							
403		GK		20,714	3		a	31,079	3		yy	26,073					zz							
406		GK		17,636	2		a	27,681	3		yy	20,444	3				zz							
525		GK		28,468			n	38,390			l	47,153					m							
528		GK		45,033			w	46,328			o	59,854					s							

Proben-ID	Probanden-ID			Zytokinspontanseznierung													
	Fallgruppen			GMCSF				IL-1 α				IL-6				TNF α	
	Kontrolle normal gesund	atopisches Ekzem läsional	atopisches Ekzem nicht läsional	GMCSF [pg/ml]	1:<NG 2:<EG 3:<BG	ELISA Platten-ID	IL-1 α [pg/ml]	1:<NG 2:<EG 3:<BG	ELISA Platten-ID	IL-6 [pg/ml]	1:<NG 2:<EG 3:<BG	ELISA Platten-ID	TNF α [pg/ml]	1:<NG 2:<EG 3:<BG	ELISA Platten-ID		
531		GK		42,480		w	45,497		o	57,144		s					
534		GK		37,042		w	43,289		o	64,212		s					
427		GK		14,502	2	d	24,191		b	37,480		c					
430		GK		18,413	3	d	25,880		b	32,432	3	c					
380		GK		208,310		a	19,708	2	yy	26,153		zz					
383		GK		202,876		a	20,658	2	yy	29,232		zz					
439		GK		40,334		d	35,915		b	56,847		c					
442		GK		39,586		d	38,714		b	54,116		c					
332		GK		53,450		i	24,647		ss	12,386	2	tt					
335		GK		65,388		i	16,302	3	ss	12,859	2	tt					
301		GK		26,156		i	38,009		ss	10,106	2	tt					
304		GK		27,364		i	31,535		ss	10,917	2	tt					
367		MK		136,766		ww	27,410		uu	9,788	2	vv	0,000	1	xx		
370		MK		115,131		ww	78,592		uu	30,377		vv	0,000	1	xx		
283		MK		81,485		h	94,979		qq	6,046	1	rr					
286		MK		127,266		h	86,237		ss	7,586	2	tt					
289		MK		14,880	3	h	85,164		ss	7,851	2	tt					
292		MK		116,491		h	93,727		ss	7,024	2	tt					
435		MK		143,709		d	50,005		b	2,662	1	c					
438		MK		171,318		d	45,729		b	3,266	1	c					
447		MK		600,000		d	48,566		b	3,792	1	c					
450		MK		600,000		d	46,567		b	3,808	1	c					
344		MK		188,872		i	39,650		ss	8,374	2	tt					
347		MK		305,456		i	49,338		ss	9,186	2	tt					
326		MK		92,596		i	35,878		ss	3,407	1	tt					
329		MK		115,130		i	41,188		ss	3,261	1	tt					
284		SH		600,000		h	39,115		qq	11,933	2	rr					
287		SH		600,000		h	56,441		ss	13,309	3	tt					
290		SH		600,000		h	7,633	2	ss	3,448	1	tt					
293		SH		600,000		h	59,181		ss	9,101	2	tt					
387		SH		208,379		a	20,302	2	yy	8,134	2	zz					
390		SH		252,054		a	24,676	3	yy	7,943	2	zz					

Proben-ID	Probanden-ID			Zytokinspontanzermierung																			
	Fallgruppen			GMCSF					IL-1α					IL-6									
	Kontrolle normal gesund	atopisches Ekzem läsional	atopisches Ekzem nicht läsional	GMCSF [pg/ml]	1:<NG	2:<EG	3:<BG	ELISA Platten-ID	IL-1α [pg/ml]	1:<NG	2:<EG	3:<BG	ELISA Platten-ID	IL-6 [pg/ml]	1:<NG	2:<EG	3:<BG	ELISA Platten-ID	TNFα [pg/ml]	1:<NG	2:<EG	3:<BG	ELISA Platten-ID
487		SH		112,207				g	136,467				e	24,001				f					
490		SH		89,951				g	111,489				e	21,387	3			f					
350		SH		52,516				i	0,000	1		kk	1,790	1			ll						
353		SH		64,158				i	88,540	3		kk	1,205	1			ll						
475		SH		63,788				g	140,594			e	18,247	3			f						
478		SH		69,543				g	106,520			e	17,770	3			f						
610		SH		30,375				w	19,176			o	6,268	1			s						
613		SH		30,307				w	25,916			o	7,208	1			s						
320		SH		109,712				i	31,700			ss	6,890	2			tt						
323		SH		205,752				i	38,270			ss	7,838	2			tt						
386		SW		103,833				a	28,537	3		yy	12,631	3			zz						
389		SW		74,784				a	21,476	2		yy	11,024	2			zz						
683		SW		15,757	3			y	1,205	1		q	11,360	3			u						
686		SW		15,141	3			y	6,355	2		q	12,408	3			u						
645		SW		50,206				x	1,969	1		p	41,058				t						
648		SW		65,127				x	4,715	1		p	47,286				t						
689		SW		10,867	2			y	4,457	2		q	8,971	2			u						
692		SW		17,904	3			y	1,566	1		q	11,741	3			u						
695		SW		18,315	3			y	1,728	1		q	14,003	3			u						
698		SW		9,687	1			z	7,215	1		r	5,806	2			v						
657		SW		34,296				y	26,883			q	45,067				u						
660		SW		28,281				y	24,780			q	38,086				u						
701		SW		2,509	1			z	6,290	1		r	6,242	2			v						
704		SW		9,093	1			z	15,271	2		r	4,917	2			v						
634		VM		10,787	3			x	111,407			p	13,076				t						
637		VM		9,594	3			x	78,330			p	12,496				t						
574		VM		7,708	2			n	5,064			l	30,927				m						
577		VM		7,126	2			n	5,602			l	25,102				m						
586		VM		36,288				n	30,544			l	4,193	2			m						
589		VM		32,309				n	26,677			l	3,690	2			m						
684		VM		4,505	1			y	4,917	2		q	2,032	1			u						
687		VM		7,230	2			y	5,398	2		q	2,229	1			u						

Proben-ID	Probanden-ID		Zytokinspontanzernierung											
	Fallgruppen		GMCSF			IL-1 α			IL-6			TNF α		
	Kontrolle normal gesund	atopisches Ekzem läsional	atopisches Ekzem nicht läsional	GMCSF [pg/ml]	1:<NG 2:<EG 3:<BG	ELISA Platten-ID	IL-1 α [pg/ml]	1:<NG 2:<EG 3:<BG	ELISA Platten-ID	IL-6 [pg/ml]	1:<NG 2:<EG 3:<BG	ELISA Platten-ID	TNF α [pg/ml]	1:<NG 2:<EG 3:<BG
646		VM		40,674		x	4,371	1	p	4,452	3	t		
649		VM		42,910		x	4,390	1	p	4,226	3	t		
690		VM		8,769	2	y	3,311	1	q	2,169	1	u		
693		VM		8,269	2	y	3,848	2	q	2,221	1	u		
696		VM		6,851	2	y	2,460	1	q	1,895	1	u		
699		VM		0,610	1	z	5,783	1	r	1,486	1	v		
658		VM		23,541		y	69,168		q	5,450	1	u		
661		VM		21,372		y	54,624		q	4,256	1	u		
702		VM		0,000	1	z	16,899	2	r	2,340	1	v		
705		VM		1,711	1	z	12,215	2	r	1,232	1	v		
308			AA	30,510		i	19,745	3	ss	3,308	1	tt		
311			AA	33,606		i	19,712	3	ss	3,376	1	tt		
434			AA	9,906	2	d	42,520		b	3,223	1	c		
437			AA	8,299	1	d	64,341		b	3,403	1	c		
494			AA	31,212		g	53,359		e	6,955	2	f		
497			AA	30,273		g	47,713		e	5,076	1	f		
446			AA	19,890	3	d	38,367		b	4,426	1	c		
449			AA	22,628	3	d	32,528		b	3,760	1	c		
451			AA	11,873	2	d	64,487		b	8,012	1	c		
454			AA	16,491	2	d	76,253		b	7,304	1	c		
457			AA	23,417		g	56,887		e	29,944		f		
460			AA	20,677		g	53,646		e	29,502		f		
463			AA	20,244		g	80,786		e	8,017	2	f		
466			AA	14,348	3	g	88,564		e	8,924	2	f		
469			AA	22,159		g	58,481		e	40,411		f		
472			AA	27,354		g	59,119		e	39,589		f		
482			AA	19,013	3	g	46,608		e	5,085	1	f		
485			AA	24,764		g	49,544		e	4,733	1	f		
665			AA	10,070	2	y	25,945		q	1,719	1	u		
668			AA	17,772	3	y	18,152		q	1,801	1	u		
338			AA	17,419	3	i	37,404		ss	3,902	1	tt		
341			AA	26,646		i	43,399		ss	4,550	1	tt		

Proben-ID	Probanden-ID			Zytokinspontanseznierung															
	Fallgruppen			GMCSF				IL-1 α				IL-6				TNF α			
	Kontrolle normal gesund	atopisches Ekzem läsional	atopisches Ekzem nicht läsional	GMCSF [pg/ml]	1:<NG 2:<EG 3:<BG	ELISA Platten-ID	IL-1 α [pg/ml]	1:<NG 2:<EG 3:<BG	ELISA Platten-ID	IL-6 [pg/ml]	1:<NG 2:<EG 3:<BG	ELISA Platten-ID	TNF α [pg/ml]	1:<NG 2:<EG 3:<BG	ELISA Platten-ID				
640			AA	28,369		x	0,688	1	p	1,353	1	t							
643			AA	37,873		x	61,816		p	3,245	2	t							
672			AA	15,862	3	y	12,629	3	q	3,238	1	u							
675			AA	15,787	3	y	15,694		q	3,139	1	u							
499			AA	27,867		ww	25,230	3	uu	3,378	1	vv	0,000	1	xx				
502			AA	26,203		ww	19,076	3	uu	4,012	1	vv	0,000	1	xx				
505			AA	31,886		ww	12,021	2	uu	3,143	1	vv	0,000	1	xx				
508			AA	26,038		ww	26,092	3	uu	3,769	1	vv	0,000	1	xx				
302			AA	2,243	1	i	8,011	2	ss	3,510	1	tt							
305			AA	2,851	1	i	8,761	2	ss	3,276	1	tt							
398			AW	43,195		a	36,524	3	yy	3,744	1	zz							
401			AW	43,896		a	56,039		yy	2,433	1	zz							
374			AW	141,030		a	26,772	3	yy	6,037	2	zz							
377			AW	160,563		a	23,564	2	yy	4,776	1	zz							
416			AW	168,609		d	24,963		b	11,781	2	c							
419			AW	173,406		d	28,408		b	8,502	1	c							
314			AW	5,009	1	i	7,439	2	ss	3,364	1	tt							
317			AW	5,855	2	i	7,503	2	ss	3,411	1	tt							
404			AW	61,474		a	36,889	3	yy	5,238	1	zz							
407			AW	74,903		a	35,846	3	yy	5,521	1	zz							
428			AW	66,575		d	43,107		b	6,486	1	c							
431			AW	71,743		d	53,057		b	7,069	1	c							
440			AW	83,081		d	46,364		b	9,980	2	c							
443			AW	96,868		d	50,254		b	8,607	1	c							
453			AW	33,621		d	54,900		b	7,894	1	c							
456			AW	38,137		d	61,128		b	8,791	1	c							
465			AW	59,451		g	75,571		e	8,796	2	f							
468			AW	63,248		g	84,887		e	9,858	2	f							
666			AW	22,218		y	21,007		q	3,751	1	u							
669			AW	25,103		y	11,632	3	q	3,420	1	u							
331			AW	126,027		i	27,707		ss	7,716	2	tt							
334			AW	97,192		i	26,806		ss	6,729	2	tt							

Proben-ID	Probanden-ID		Zytokinspontansezernierung																									
	Fallgruppen		GMCSF					IL-1 α			IL-6			TNF α														
	Kontrolle normal gesund	atopisches Ekzem läsional	atopisches Ekzem nicht läsional	GMCSF [pg/ml]	1:<NG	2:<EG	3:<BG	ELISA Platten-ID	IL-1 α [pg/ml]	1:<NG	2:<EG	3:<BG	ELISA Platten-ID	IL-6 [pg/ml]	1:<NG	2:<EG	3:<BG	TNF α [pg/ml]	1:<NG	2:<EG	3:<BG	ELISA Platten-ID	TNF α [pg/ml]	1:<NG	2:<EG	3:<BG	ELISA Platten-ID	
639			AW	233,730			x	0,427	1	p	9,779	t																
642			AW	243,632			x	0,491	1	p	11,656	t																
678			AW	27,543			y	15,532		q	4,208	u	1															
681			AW	22,862			y	8,160		q	3,697	u	1															
651			AW	98,772			x	50,773		p	7,756	t	3															
652			AW	83,685			x	45,282		p	5,467	t	3															
654			AW	96,631			x	48,852		p	7,973	t	3															
655			AW	85,495			x	47,593		p	5,811	t	3															
296			AW	19,579			h	18,256	3	ss	3,146	tt	1															
299			AW	22,293			i	25,592		ss	3,265	tt	1															
369			DK	10,105	2		ww	12,156	2	uu	2,439	vv	1					0,000	1									xx
372			DK	10,915	2		ww	26,122	3	uu	2,803	vv	1					0,000	1									xx
309			DK	202,108			i	16,683	3	ss	8,021	tt	2															
312			DK	174,960			i	13,193	3	ss	8,730	tt	2															
429			DK	23,301	3		d	78,866		b	2,550	c	1															
432			DK	33,538			d	99,053		b	3,085	c	1															
628			DK	20,206			x	59,256		p	78,481	t																
631			DK	20,823			x	87,176		p	119,635	t																
569			DK	18,863	3		n	20,709		l	98,626	m																
572			DK	26,411			n	23,414		l	147,111	m																
489			DK	44,335			g	47,263		e	2,120	f	1															
492			DK	33,008			g	42,003		e	2,655	f	1															
495			DK	14,049	3		g	36,928		e	10,457	f	2															
498			DK	12,753	3		g	39,690		e	11,206	f	2															
441			DK	39,867			d	90,663		b	3,461	c	1															
444			DK	45,548			d	119,483		b	3,978	c	1															
513			DK	27,409			ww	13,810	2	uu	3,389	vv	1					0,000	1									xx
516			DK	24,903			ww	24,226	3	uu	3,802	vv	1					0,000	1									xx
519			DK	26,255			ww	5,294	1	uu	2,916	vv	1					0,000	1									xx
522			DK	33,690			ww	72,771		uu	3,242	vv	1					0,000	1									xx
477			DK	18,478	3		g	42,258		e	1,847	f	1															
480			DK	21,244			g	38,454		e	2,144	f	1															

Proben-ID	Probanden-ID		Zytokinspontanzermiierung														
	Fallgruppen		GMCSF					IL-1 α					IL-6				
	Kontrolle normal gesund	atopisches Ekzem läsional	atopisches Ekzem nicht läsional	GMCSF [pg/ml]	1:<NG 2:<EG 3:<BG	ELISA Platten-ID	IL-1 α [pg/ml]	1:<NG 2:<EG 3:<BG	ELISA Platten-ID	IL-6 [pg/ml]	1:<NG 2:<EG 3:<BG	ELISA Platten-ID	TNF α [pg/ml]	1:<NG 2:<EG 3:<BG	TNF α Platten-ID		
483			DK	14,411	3	g	38,812		e	8,794	2	f					
486			DK	6,777	2	g	39,456		e	8,746	2	f					
581			DK	41,117		n	38,168		l	181,057		m					
584			DK	43,833		n	44,213		l	193,746		m					
339			DK	11,977	3	i	25,212		ss	3,904	1	tt					
342			DK	9,218	2	i	20,096	3	ss	4,422	1	tt					
617			DK	14,055		x	88,326		p	8,431		t					
620			DK	24,846		x	98,180		p	11,846		t					
623			DK	14,123		x	77,709		p	13,049		t					
626			DK	15,837		x	70,661		p	11,476		t					
500			DK	16,886	3	ww	32,009		uu	9,453	2	vv	0,000	1 xx			
501			DK	24,148		ww	21,712	3	uu	4,010	1	vv	0,000	1 xx			
503			DK	17,324	3	ww	24,423	3	uu	4,591	1	vv	0,000	1 xx			
504			DK	14,401	3	ww	37,967		uu	4,697	1	vv	0,000	1 xx			
506			DK	14,805	3	ww	32,228		uu	5,643	2	vv	0,000	1 xx			
507			DK	12,776	3	ww	20,946	3	uu	3,896	1	vv	0,000	1 xx			
509			DK	14,978	3	ww	25,741	3	uu	4,294	1	vv	0,000	1 xx			
510			DK	14,669	3	ww	37,714		uu	4,786	1	vv	0,000	1 xx			
303			DK	3,788	1	i	18,253	3	ss	4,997	1	tt					
306			DK	5,209	2	i	15,116	3	ss	3,969	1	tt					
629			GK	79,443		x	67,843		p	600,000		t					
381			GK	25,367	3	a	11,630	1	yy	3,304	1	zz					
384			GK	25,866	3	a	13,389	2	yy	3,354	1	zz					
575			GK	22,685		n	40,076		l	107,953		m					
578			GK	27,039		n	38,797		l	123,867		m					
493			GK	21,927		g	61,824		e	37,067		f					
496			GK	15,151	3	g	57,038		e	34,993		f					
459			GK	23,684		g	50,081		e	14,839	3	f					
462			GK	23,259		g	54,939		e	19,116	3	f					
471			GK	43,808		g	40,816		e	19,759	3	f					
474			GK	42,449		g	38,343		e	21,355	3	f					
481			GK	20,909		g	62,121		e	32,616		f					

Proben-ID	Probanden-ID			Zytokinspontanzermierung																			
	Fallgruppen			GMCSF					IL-1 α					IL-6									
	Kontrolle normal gesund	atopisches Ekzem läsional	atopisches Ekzem nicht läsional	GMCSF [pg/ml]	1:<NG	2:<EG	3:<BG	ELISA Platten-ID	IL-1 α [pg/ml]	1:<NG	2:<EG	3:<BG	ELISA Platten-ID	IL-6 [pg/ml]	1:<NG	2:<EG	3:<BG	ELISA Platten-ID	TNF α [pg/ml]	1:<NG	2:<EG	3:<BG	ELISA Platten-ID
484			GK	13,212	3		g	62,773				e	35,587				f						
609			GK	8,967			w	59,571				o	25,982	3			s						
612			GK	9,251			w	56,230				o	22,119	3			s						
587			GK	35,915			n	26,165				l	257,438				m						
590			GK	38,861			n	28,837				l	328,649				m						
616			GK	19,692			x	41,602				p	105,071				t						
619			GK	22,769			x	48,315				p	120,984				t						
622			GK	22,149			x	45,490				p	101,787				t						
625			GK	22,601			x	38,734				p	127,062				t						
163			GS	11,222			ii	123,038	3			kk	8,616	1			ll						
166			GS	10,067			ii	43,802	2			kk	5,851	1			ll						
169			GS	4,051	3		ii	32,996	2			kk	4,770	1			ll						
172			GS	8,392			ii	125,675	3			kk	4,385	1			ll						
176			GS	12,821			ii	44,896	2			kk	1,203	1			ll						
179			GS	17,753			ii	21,932	1			kk	12,567	2			ll						
243			GS					120,492				oo	200,641				pp						
246			GS	42,009			h	190,470				qq	168,589				rr						
225			GS	17,830	3		k	41,741	3			oo	1,968	1			pp						
228			GS	13,363	3		k	57,610	3			oo	1,648	1			pp						
373			MK	451,473			a	24,523	3			yy	18,596	3			zz						
376			MK	458,727			a	43,743	3			yy	16,624	3			zz						
423			MK	600,000			d	51,432				b	54,628				c						
426			MK	600,000			d	44,198				b	57,815				c						
315			MK	3,866	1		i	12,392	2			ss	4,970	1			tt						
318			MK	5,427	2		i	13,649	3			ss	4,574	1			tt						
411			MK	152,402			a	63,653				yy	41,671				zz						
414			MK	167,780			a	65,754				yy	40,139				zz						
433			MK	58,363			d	27,798				b	1,523	1			c						
436			MK	69,991			d	22,987				b	0,697	1			c						
445			MK	261,587			d	40,605				b	2,775	1			c						
448			MK	225,139			d	20,030				b	2,274	1			c						
345			MK	30,221			i	16,243	3			ss	3,521	1			tt						

Proben-ID	Probanden-ID			Zytokinspontanzernierung																								
	Fallgruppen			GMCSF					IL-1 α					IL-6					TNF α									
	Kontrolle normal gesund	atopisches Ekzem läsional	atopisches Ekzem nicht läsional	GMCSF [pg/ml]	1:<NG	2:<EG	3:<BG	ELISA Platten-ID	IL-1 α [pg/ml]	1:<NG	2:<EG	3:<BG	ELISA Platten-ID	IL-6 [pg/ml]	1:<NG	2:<EG	3:<BG	ELISA Platten-ID	TNF α [pg/ml]	1:<NG	2:<EG	3:<BG	ELISA Platten-ID	TNF α [pg/ml]	1:<NG	2:<EG	3:<BG	ELISA Platten-ID
348			MK	41,666				i	17,762	3	3	ss	ss	3,722	1			tt					tt					
337			MK	514,558				i	15,246	3	3	ss	ss	14,572	3			tt					tt					
340			MK	369,145				i	19,802			ss	ss	18,698	3			tt					tt					
638			MK	335,943				x	2,985	1	1	p	p	8,483				t					t					
641			MK	251,861				x	2,006	1	1	p	p	22,694				t					t					
327			MK	127,263				i	49,985			ss	ss	5,799	1			tt					tt					
330			MK	125,756				i	49,552			ss	ss	4,605	1			tt					tt					
650			MK	127,934				x	34,816			p	p	8,691				t					t					
653			MK	133,872				x	43,637			p	p	9,960				t					t					
297			MK	144,952				h	18,661	3	3	ss	ss	8,849	2			tt					tt					
300			MK	134,576				i	17,773	3	3	ss	ss	7,934	2			tt					tt					
421			SH	18,452			3	d	74,093			b	b	43,026				c					c					
424			SH	44,006				d	79,396			b	b	42,507				c					c					
285			SH	600,000				h	29,402			h	h	15,377	2			rr					rr					
288			SH	165,321				h	40,517			h	h	182,131				tt					tt					
291			SH	600,000				h	39,307			h	h	15,447	3			tt					tt					
294			SH	349,169				h	35,975			h	h	14,950	3			tt					tt					
409			SH	9,087			2	a	70,620			a	a	26,207				zz					zz					
412			SH	21,267			3	a	71,242			a	a	25,373				zz					zz					
351			SH	11,830			3	i	37,166	2	2	kk	kk	1,528	1			ll					ll					
354			SH	12,209			3	i	0,000	1	1	kk	kk	1,665	1			ll					ll					
321			SH	66,069				i	31,062			ss	ss	13,665	3			tt					tt					
324			SH	85,000				i	47,496			ss	ss	14,003	3			tt					tt					
392			SW	6,645			1	a	38,400	3	3	yy	yy	12,974	3			zz					zz					
395			SW	5,876			1	a	35,140	3	3	yy	yy	12,642	3			zz					zz					
417			SW	20,531			3	d	36,333			b	b	11,804	2			c					c					
420			SW	17,553			2	d	30,107			b	b	11,274	2			c					c					
405			SW	10,731			2	a	35,294	3	3	yy	yy	9,465	2			zz					zz					
408			SW	9,680			2	a	41,102	3	3	yy	yy	9,467	2			zz					zz					
385			SW	29,602			3	a	17,051	2	2	yy	yy	5,439	1			zz					zz					
388			SW	43,481				a	14,233	2	2	yy	yy	5,550	2			zz					zz					
452			SW	7,169			1	d	62,621			b	b	16,158	2			c					c					

Proben-ID	Probanden-ID		Zytokinspontanzernierung													
	Fallgruppen		GMCSF				IL-1 α				IL-6				TNF α	
	Kontrolle normal gesund	atopisches Ekzem läsional	atopisches Ekzem nicht läsional	GMCSF [pg/ml]	1:<NG 2:<EG 3:<BG	ELISA Platten-ID	IL-1 α [pg/ml]	1:<NG 2:<EG 3:<BG	ELISA Platten-ID	IL-6 [pg/ml]	1:<NG 2:<EG 3:<BG	ELISA Platten-ID	TNF α [pg/ml]	1:<NG 2:<EG 3:<BG	ELISA Platten-ID	
455			SW	8,499	1	d	67,024		b	16,466	2	c				
464			SW	20,280		g	85,164		e	16,731	3	f				
467			SW	12,961	3	g	90,489		e	16,307	3	f				

Proben-ID	Probanden-ID	Expositionskonditionen		Zytokinseznierung nach Exposition															
				GMCSF				IL-1 α				IL-6				TNF α			
				Expositionsvariable	Expositionsdauer [h] [KZ: Kurzeitexposition LZ: Langzeitexposition]	GMCSF [pg/ml]	1:<NG 2:<EG 3:<BG	ELISA Platten-ID	IL-1 α [pg/ml]	1:<NG 2:<EG 3:<BG	ELISA Platten-ID	IL-6 [pg/ml]	1:<NG 2:<EG 3:<BG	ELISA Platten-ID	TNF α [pg/ml]	1:<NG 2:<EG 3:<BG	ELISA Platten-ID		
633	BK	Ink.Kontr.	23	LZ	19,123	x	1,450	1	p	14,791	t								
636	BK	Ink.Kontr.	23	LZ	24,653	x	2,955	1	p	11,597	t								
599	BK	Umw TX	8	KZ	10,899	w	1,488	1	o	4,948	s								
602	BK	Umw TX	8	KZ	13,174	w	3,229	1	o	3,879	s								
605	BK	Umw TX	8	KZ	25,230	w	2,567	1	o	9,879	s								
608	BK	Umw TX	8	KZ	27,287	w	4,547	2	o	8,169	s								
670	HF	1 T	8	KZ	130,406	y	1,005	1	q	11,989	3	u							
673	HF	1 T	8	KZ	188,373	y	25,345		q	13,902	3	u							
664	HF	Ink.Kontr.	8	KZ	228,788	y	7,073	2	q	13,734	3	u							
667	HF	Ink.Kontr.	8	KZ	208,376	y	3,194	1	q	14,503	3	u							
267	HH	1 mX	8	KZ	4,145	1	3,438	1	qq	1,454	1	rr							
270	HH	1 mX	8	KZ	6,049	2	3,535	1	qq	1,751	1	rr							
279	HH	1 mX	27	LZ	12,180	3	11,558	2	qq	11,958	2	rr							
282	HH	1 mX	27	LZ	10,494	3	14,035	2	qq	12,891	2	rr							
391	HH	1 mX	23	LZ	3,188	1	7,099	1	yv	1,296	1	zz							
394	HH	1 mX	23	LZ	2,602	1	25,046	3	yv	0,878	1	zz							
325	HH	1 T	8	KZ	10,197	2	26,472	3	uu	1,933	1	vv	0,000	1 xx					
328	HH	1 T	8	KZ	24,345	ww	0,000	1	uu	1,282	1	vv	0,000	1 xx					
343	HH	1 T	18	LZ	8,406	2	17,865	3	uu	1,516	1	vv	0,000	1 xx					
346	HH	1 T	18	LZ	2,852	1	33,803		uu	1,592	1	vv	0,000	1 xx					
260	HM	1 mX	8	KZ	47,489	k	9,834	2	qq	6,306	1	rr							
263	HM	1 mX	8	KZ	53,447	k	17,392	3	qq	9,393	2	rr							
265	HM	1 mX	8	KZ	49,174	k	11,259	2	qq	5,958	1	rr							
268	HM	1 mX	8	KZ	49,541	k	11,817	2	qq	9,187	2	rr							
272	HM	1 mX	27	LZ	4,496	2	7,498	1	qq	5,573	1	rr							
275	HM	1 mX	27	LZ	8,104	2	5,705	1	qq	4,866	1	rr							
277	HM	1 mX	27	LZ	6,486	2	6,146	1	qq	5,373	1	rr							
280	HM	1 mX	27	LZ	6,291	2	6,149	1	qq	4,921	1	rr							
676	HS	1 T	8	KZ	9,591	2	2,233	1	q	3,189	1	u							
679	HS	1 T	8	KZ	14,053	3	2,342	1	q	2,270	1	u							
662	HS	Ink.Kontr.	8	KZ	26,345	y	4,281	2	q	1,349	1	u							
663	HS	Ink.Kontr.	8	KZ	25,533	y	3,684	2	q	1,556	1	u							

Proben-ID	Probanden-ID	Expositionskonditionen		Zytokinsezernung nach Exposition												
				GMCSF				IL-1 α			IL-6			TNF α		
				Expositionsvariable	Expositionsdauer [h] [KZ: Kurzzeitexposition LZ: Langzeitexposition]	GMCSF [pg/ml]	1:<NG 2:<EG 3:<BG	ELISA Platten-ID	IL-1 α [pg/ml]	1:<NG 2:<EG 3:<BG	ELISA Platten-ID	IL-6 [pg/ml]	1:<NG 2:<EG 3:<BG	ELISA Platten-ID	TNF α [pg/ml]	1:<NG 2:<EG 3:<BG
671	HW	1 T	8	KZ	96,106			y	1,530	1	q	13,843	3	u		
674	HW	1 T	8	KZ	91,838			y	6,342	2	q	12,512	3	u		
537	HW	1 T	24	LZ	48,913			w	3,291	1	o	12,343	2	s		
540	HW	1 T	24	LZ	54,700			w	3,864	1	o	14,110	2	s		
543	HW	1 T	24	LZ	68,902			w	3,273	2	o	18,139	2	s		
546	HW	1 T	24	LZ	55,316			w	1,996	1	o	19,966	3	s		
259	ii	1 mX	8	KZ	12,567	3		k	5,025	1	qq	3,412	1	rr		
262	ii	1 mX	8	KZ	10,986	3		k	3,950	1	qq	3,477	1	rr		
248	ii	1 mX	24	LZ	11,085	3		h	7,457	1	qq	6,092	1	rr		
251	ii	1 mX	24	LZ	23,442			h	12,101	2	qq	6,899	1	rr		
254	ii	1 mX	24	LZ	14,150	3		h	10,132	2	qq	6,835	1	rr		
257	ii	1 mX	24	LZ	13,179	3		h	11,474	2	qq	7,387	1	rr		
271	ii	1 mX	27	LZ	21,086			h	7,570	1	qq	5,512	1	rr		
274	ii	1 mX	27	LZ	17,522			h	7,296	1	qq	5,611	1	rr		
535	IW	1 T	24	LZ	69,322			w	7,559	2	o	4,993	1	s		
538	IW	1 T	24	LZ	79,082			w	4,621	2	o	4,722	1	s		
541	IW	1 T	24	LZ	65,690			w	8,932	3	o	5,182	1	s		
544	IW	1 T	24	LZ	56,550			w	3,830	1	o	4,340	1	s		
597	IW	Umw TX	8	KZ	9,317			w	3,447	1	o	3,838	1	s		
600	IW	Umw TX	8	KZ	8,997			w	1,432	1	o	4,568	1	s		
604	IW	Umw TX	8	KZ	6,550			w	0,000	1	o	2,870	1	s		
607	IW	Umw TX	8	KZ	5,851	3		w	0,045	1	o	2,331	1	s		
512	IW	Umw TX	18	LZ	11,197	3		n	4,229		l	2,104	1	m		
515	IW	Umw TX	18	LZ	19,151	3		n	5,286		l	0,000	1	m		
518	IW	Umw TX	18	LZ	21,408			n	3,208	3	l	1,463	1	m		
521	IW	Umw TX	18	LZ	15,131	3		n	4,018		l	2,133	1	m		
213	IZ	0,1 mX	24	LZ	3,158	1		k	0,000	1	oo	11,217	1	pp		
216	IZ	0,1 mX	24	LZ	2,077	1		k	4,837	1	oo	9,431	1	pp		
219	IZ	0,1 mX	24	LZ	1,833	1		k	8,788	1	oo	10,597	1	pp		
222	IZ	0,1 mX	24	LZ	1,260	1		k	4,894	1	oo	12,687	1	pp		
187	IZ	3 T	8	KZ	24,929			j	0,990	1	mm	7,156	2	nn		
190	IZ	3 T	8	KZ	32,084			j	11,759	2	mm	7,787	2	nn		

Proben-ID	Probanden-ID	Expositionskonditionen		Zytokinsezerrierung nach Exposition															
				GMCSF				IL-1α				IL-6				TNFα			
				1:<NG	2:<EG	3:<BG	ELISA Platten-ID	IL-1α [pg/ml]	1:<NG	2:<EG	3:<BG	ELISA Platten-ID	IL-6 [pg/ml]	1:<NG	2:<EG	3:<BG	TNFα [pg/ml]	1:<NG	2:<EG
199	IZ	3 T	8	KZ	29,132		j	3,246	1	mm	6,178	2	nn						
200	IZ	3 T	8	KZ	32,041		j	1,945	1	mm	6,337	2	nn						
201	IZ	3 T	8	KZ	21,964		j	1,992	1	mm	6,327	2	nn						
202	IZ	3 T	8	KZ	31,037		j	1,632	1	mm	6,036	2	nn						
203	IZ	3 T	8	KZ	36,585		j	2,157	1	mm	6,463	2	nn						
204	IZ	3 T	8	KZ	25,493		j	2,301	1	mm	6,727	2	nn						
223	IZ	3 T	8	KZ	3,689		k	1,584	1	oo	14,497	1	pp						
226	IZ	3 T	8	KZ			k	83,043	3	oo	10,224	1	pp						
229	IZ	3 T	8	KZ	2,943		k	25,146	2	oo	6,390	1	pp						
232	IZ	3 T	8	KZ	5,095		k	10,752	1	oo	16,151	1	pp						
165	IZ	3 T	24	LZ	15,305		ii	0,000	1	kk	1,600	1	ll						
168	IZ	3 T	24	LZ	3,888		ii	468,464		kk	5,134	1	ll						
171	IZ	3 T	24	LZ	21,548		ii	63,787	2	kk	2,239	1	ll						
174	IZ	3 T	24	LZ	5,398		ii	57,860	2	kk	1,096	1	ll						
177	IZ	3 T	24	LZ				0,000	1	kk	2,545	1	ll						
180	IZ	3 T	24	LZ				540,844		kk	4,683	1	ll						
193	IZ	3 T	24	LZ	13,048		j	0,465	1	mm	11,280	2	nn						
196	IZ	3 T	24	LZ	16,641		j	2,518	1	mm	8,738	2	nn						
205	IZ	3 T	24	LZ	20,626		j	2,184	1	mm	11,893	3	nn						
206	IZ	3 T	24	LZ	18,147		k	4,092	1	mm	17,266	3	nn						
207	IZ	3 T	24	LZ	13,639		k	3,946	1	mm	11,463	2	nn						
208	IZ	3 T	24	LZ	14,828		k	5,500	1	mm	12,990	3	nn						
209	IZ	3 T	24	LZ	26,804		k	9,312	1	oo	18,438	1	pp						
210	IZ	3 T	24	LZ	18,005		k	0,000	1	oo	15,307	1	pp						
235	IZ	3 T	24	LZ				4,945	1	oo	8,877	1	pp						
238	IZ	3 T	24	LZ				16,638	1	oo	7,643	1	pp						
241	IZ	3 T	24	LZ				17,183	2	oo	6,014	1	pp						
244	IZ	3 T	24	LZ				0,000	1	oo	10,179	1	pp						
181	IZ	3 T	24	LZ	7,103		j	3,587	1	mm	2,779	1	nn						
182	IZ	3 T	24	LZ	10,574		j	5,338	1	mm	3,162	1	nn						
183	IZ	3 T	24	LZ	0,000		j	7,461	2	mm	2,538	1	nn						
184	IZ	3 T	24	LZ	8,549		j	4,315	1	mm	2,913	1	nn						

Proben-ID	Probanden-ID	Expositionskonditionen		Zytokinseznierung nach Exposition											
		Expositionsvariable	Expositionsdauer [h] [KZ: Kurzzeitexposition LZ: Langzeitexposition]	GMCSF			IL-1 α			IL-6			TNF α		
	Fallgruppe Kontrolle normal gesund			GMCSF [pg/ml]	1:<NG 2:<EG 3:<BG	ELISA Platten- ID	IL-1 α [pg/ml]	1:<NG 2:<EG 3:<BG	ELISA Platten- ID	IL-6 [pg/ml]	1:<NG 2:<EG 3:<BG	ELISA Platten- ID	TNF α [pg/ml]	1:<NG 2:<EG 3:<BG	ELISA Platten- ID
185	IZ	3 T	24	LZ	11,152	j	6,304	2	mm	3,015	1	nn			
186	IZ	3 T	24	LZ	3,881	j	6,630	2	mm	2,070	1	nn			
261	ko	1 mX	8	KZ	14,300	k	7,046	1	qq	11,726	2	rr			
264	ko	1 mX	8	KZ	12,831	k	5,846	1	qq	10,168	2	rr			
249	ko	1 mX	24	LZ	16,034	h	40,952	3	qq	9,062	2	rr			
252	ko	1 mX	24	LZ	8,483	h	9,502	2	qq	4,676	1	rr			
255	ko	1 mX	24	LZ	11,153	h	14,988	2	qq	8,237	2	rr			
258	ko	1 mX	24	LZ	15,551	h	27,323	3	qq	6,594	1	rr			
273	ko	1 mX	27	LZ	2,964	h	7,328	1	qq	1,544	1	rr			
276	ko	1 mX	27	LZ	3,584	h	1,913	1	qq	1,030	1	rr			
536	LW	1 T	24	LZ	59,361	w	13,694	3	o	7,855	1	s			
539	LW	1 T	24	LZ	65,361	w	10,333	3	o	8,012	1	s			
542	LW	1 T	24	LZ	56,949	w	8,128	2	o	6,695	1	s			
545	LW	1 T	24	LZ	53,586	w	14,391	3	o	6,734	1	s			
266	MS	1 mX	8	KZ	21,653	k	4,125	1	qq	2,943	1	rr			
269	MS	1 mX	8	KZ	19,427	k	3,395	1	qq	4,156	1	rr			
278	MS	1 mX	27	LZ	17,730	h	7,833	1	qq	5,947	1	rr			
281	MS	1 mX	27	LZ	19,295	h	8,093	1	qq	6,497	1	rr			
224	MS	3 T	8	KZ	28,448	k	1,593	1	oo	1,672	1	pp			
227	MS	3 T	8	KZ	33,065	k	58,303	3	oo	1,028	1	pp			
242	MS	3 T	24	LZ			31,301	2	oo	0,749	1	pp			
245	MS	3 T	24	LZ	9,877	h	17,249	3	qq	4,193	1	rr			
627	MS	Ink.Kontr.	23	LZ	11,402	x	0,000	1	p	19,019		t			
630	MS	Ink.Kontr.	23	LZ	13,168	x	0,000	1	p	15,143		t			
632	MS	Ink.Kontr.	23	LZ	10,810	x	0,000	1	p	19,736		t			
635	MS	Ink.Kontr.	23	LZ	10,880	x	0,000	1	p	15,400		t			
585	MS	s.Luft App.	8	KZ	12,340	n	23,171	3	l	14,686		m			
588	MS	s.Luft App.	8	KZ	11,662	n	18,745	3	l	20,254		m			
573	MS	s.Luft App.	19	LZ	5,430	n	3,176	3	l	8,147	3	m			
576	MS	s.Luft App.	19	LZ	6,707	n	4,180	2	l	10,291		m			
598	MS	Umw TX	8	KZ	9,409	w	0,000	1	o	1,872	1	s			
601	MS	Umw TX	8	KZ	3,526	w	0,871	1	o	2,594	1	s			

Proben-ID	Probanden-ID	Expositionskonditionen		Zytokinsezerrierung nach Exposition												
		Expositionsvariable	Expositionsdauer [h] [KZ: Kurzeitexposition LZ: Langzeitexposition]	GMCSF			IL-1α			IL-6			TNFα			
				GMCSF [pg/ml]	1:<NG 2:<EG 3:<BG	ELISA Platten-ID	IL-1α [pg/ml]	1:<NG 2:<EG 3:<BG	ELISA Platten-ID	IL-6 [pg/ml]	1:<NG 2:<EG 3:<BG	ELISA Platten-ID	TNFα [pg/ml]	1:<NG 2:<EG 3:<BG	ELISA Platten-ID	
603	MS	Umw TX	8	KZ	13,219		w	6,485	2	o	13,224	2	s			
606	MS	Umw TX	8	KZ	13,977		w	5,363	2	o	14,178	2	s			
511	MS	Umw TX	18	LZ	91,106		n	7,732		l	5,320	3	m			
514	MS	Umw TX	18	LZ	99,043		n	7,963		l	1,960	1	m			
517	MS	Umw TX	18	LZ	96,406		n	7,139		l	4,472	2	m			
520	MS	Umw TX	18	LZ	96,307		n	6,423		l	5,127	3	m			
211	OF	0,1 mX	24	LZ	9,975	2	k	0,000	1	oo	0,722	1	pp			
214	OF	0,1 mX	24	LZ	6,084	2	k	1,714	1	oo	1,056	1	pp			
217	OF	0,1 mX	24	LZ	7,161	2	k	8,955	1	oo	0,000	1	pp			
220	OF	0,1 mX	24	LZ	5,417	2	k	9,309	1	oo	0,705	1	pp			
706	OF	1 mX	8	KZ	24,955	3	z	0,811	1	r	2,384	1	v			
708	OF	1 mX	8	KZ	19,728	2	z	0,000	1	r	1,696	1	v			
615	OF	1 T	8	KZ	7,014	3	x	0,000	1	p	1,814	1	t			
618	OF	1 T	8	KZ	5,803	2	x	0,000	1	p	0,978	1	t			
621	OF	1 T	8	KZ	7,913	3	x	0,000	1	p	1,568	1	t			
624	OF	1 T	8	KZ	6,537	3	x	0,000	1	p	2,487	2	t			
677	OF	1 T	8	KZ	33,776		y	1,011	1	q	1,903	1	u			
680	OF	1 T	8	KZ	30,277		y	0,263	1	q	1,943	1	u			
188	OF	3 T	8	KZ	21,789		j	0,391	1	mm	2,712	1	nn			
191	OF	3 T	8	KZ	19,668		j	0,791	1	mm	2,023	1	nn			
230	OF	3 T	8	KZ	7,595	2	k	26,040	2	oo	3,124	1	pp			
233	OF	3 T	8	KZ	8,480	2	k	12,957	1	oo	4,332	1	pp			
194	OF	3 T	24	LZ	13,294		j	0,467	1	mm	2,571	1	nn			
197	OF	3 T	24	LZ	11,443		j	1,216	1	mm	2,644	1	nn			
236	OF	3 T	24	LZ				0,000	1	oo	4,624	1	pp			
239	OF	3 T	24	LZ				12,289	1	oo	1,859	1	pp			
579	OF	s.Luft App.	8	KZ	5,079	1	n	1,258	2	l	2,446	1	m			
582	OF	s.Luft App.	8	KZ	6,389	2	n	2,620	3	l	10,087		m			
567	OF	s.Luft App.	19	LZ	7,987	2	n	1,961	3	l	1,811	1	m			
570	OF	s.Luft App.	19	LZ	9,020	2	n	1,165	2	l	4,975	2	m			
591	OF	Umw TX	8	KZ	10,465		w	2,731	1	o	1,149	1	s			
594	OF	Umw TX	8	KZ	10,608		w	1,009	1	o	1,646	1	s			

Proben-ID	Probanden-ID	Expositionskonditionen		Zytokinsezerrierung nach Exposition																					
				GMCSF				IL-1α				IL-6				TNFα									
				1:<NG	2:<EG	3:<BG	ELISA Platten-ID	IL-1α [pg/ml]	1:<NG	2:<EG	3:<BG	ELISA Platten-ID	IL-6 [pg/ml]	1:<NG	2:<EG	3:<BG	ELISA Platten-ID	IL-6 [pg/ml]	1:<NG	2:<EG	3:<BG	ELISA Platten-ID			
				Expositionsvariable	Expositionsdauer [h] [KZ: Kurzzeitexposition LZ: Langzeitexposition]	GMCSF [pg/ml]	1:<NG	2:<EG	3:<BG	ELISA Platten-ID	IL-1α [pg/ml]	1:<NG	2:<EG	3:<BG	ELISA Platten-ID	IL-6 [pg/ml]	1:<NG	2:<EG	3:<BG	ELISA Platten-ID	IL-6 [pg/ml]	1:<NG	2:<EG	3:<BG	ELISA Platten-ID
247	oo	1 mX	24	LZ	600,000	h	1	7,504	1	qq	13,119	2	rr												
250	oo	1 mX	24	LZ	241,060	h	1	4,242	1	qq	9,153	2	rr												
253	oo	1 mX	24	LZ	135,928	h	1	7,802	1	qq	5,480	1	rr												
256	oo	1 mX	24	LZ	124,801	h	1	6,402	1	qq	5,152	1	rr												
592	SF	Umw TX	8	KZ	2,129	w	2	4,795	2	o	1,472	1	s												
595	SF	Umw TX	8	KZ	4,316	w	3	4,580	2	o	1,518	1	s												
523	SF	Umw TX	24	LZ	15,878	n	3	4,525		l	0,713	1	m												
526	SF	Umw TX	24	LZ	10,359	n	2	4,822		l	2,781	2	m												
529	SF	Umw TX	24	LZ	13,349	w		6,471	2	o	2,014	1	s												
532	SF	Umw TX	24	LZ	12,106	w		2,898	1	o	3,685	1	s												
397	UF	1 mX	23	LZ	6,610	a	1	22,366	2	yy	3,287	1	zz												
400	UF	1 mX	23	LZ	8,582	a	1	22,999	2	yy	3,408	1	zz												
319	UF	1 T	8	KZ	6,654	ww	2	8,141	2	uu	1,540	1	vv	0,000	1	xx									
322	UF	1 T	8	KZ	8,350	ww	2	2,266	1	uu	2,276	1	vv	0,000	1	xx									
349	UF	1 T	18	LZ	75,364	ww		7,687	2	uu	2,726	1	vv	0,000	1	xx									
352	UF	1 T	18	LZ	34,672	ww		54,264		uu	2,546	1	vv	0,000	1	xx									
212	VMR	0,1 mX	24	LZ	19,028	k	3	0,000	1	oo	0,370	1	pp												
215	VMR	0,1 mX	24	LZ	23,118	k		0,964	1	oo	0,294	1	pp												
218	VMR	0,1 mX	24	LZ	18,515	k	3	9,384	1	oo	1,149	1	pp												
221	VMR	0,1 mX	24	LZ	26,309	k		14,581	1	oo	0,849	1	pp												
189	VMR	3 T	8	KZ	14,385	j		1,615	1	mm	1,992	1	nn												
192	VMR	3 T	8	KZ	13,045	j		1,080	1	mm	2,021	1	nn												
231	VMR	3 T	8	KZ	10,916	k	3	19,558	2	oo	129,491		pp												
234	VMR	3 T	8	KZ	12,553	k	3	14,303	1	oo	126,173		pp												
195	VMR	3 T	24	LZ	42,197	j		5,218	1	mm	2,631	1	nn												
198	VMR	3 T	24	LZ	23,538	j		2,135	1	mm	2,423	1	nn												
237	VMR	3 T	24	LZ				39,803	3	oo	18,009	1	pp												
240	VMR	3 T	24	LZ				9,024	1	oo	0,668	1	pp												
524	WZ	Umw TX	24	LZ	8,388	n	2	6,989		l	10,824		m												
527	WZ	Umw TX	24	LZ	4,206	n	1	7,694		l	8,137	3	m												
530	WZ	Umw TX	24	LZ	13,825	w		12,099	3	o	10,433	2	s												
533	WZ	Umw TX	24	LZ	9,100	w		6,917	2	o	8,658	1	s												

Proben-ID	Probanden-ID	Expositionskonditionen		Zytokinseznierung nach Exposition															
				GMCSF				IL-1α				IL-6				TNFα			
				Expositionsvariable	Expositionsdauer [h] [KZ: Kurzzeitexposition LZ: Langzeitexposition]	GMCSF [pg/ml]	ELISA Platten-ID	1:<NG 2:<EG 3:<BG	IL-1α [pg/ml]	ELISA Platten-ID	1:<NG 2:<EG 3:<BG	IL-6 [pg/ml]	ELISA Platten-ID	1:<NG 2:<EG 3:<BG	TNFα [pg/ml]	ELISA Platten-ID	1:<NG 2:<EG 3:<BG		
707	xx	1 mX	8	6,250	z	1,211	r	1	1,530	v	1								
709	xx	1 mX	8	7,893	z	1,143	r	1	1,064	v	1								
593	xx	Umw TX	8	1,939	w	3,554	o	2	1,223	s	1								
596	xx	Umw TX	8	4,457	w	2,255	o	3	1,179	s	1								
ifd.																			
Proben-ID	Probanden-ID	Expositionskonditionen		Zytokinseznierung nach Exposition															
				GMCSF				IL-1α				IL-6				TNFα			
		Expositionsvariable	Expositionsdauer [h] [KZ: Kurzzeitexposition LZ: Langzeitexposition]	GMCSF [pg/ml]	ELISA Platten-ID	1:<NG 2:<EG 3:<BG	IL-1α [pg/ml]	ELISA Platten-ID	1:<NG 2:<EG 3:<BG	IL-6 [pg/ml]	ELISA Platten-ID	1:<NG 2:<EG 3:<BG	TNFα [pg/ml]	ELISA Platten-ID	1:<NG 2:<EG 3:<BG				
379	AA	1 T	23	14,884	a	3	6,667	yy	1	1,009	yy	1							
382	AA	1 T	23	19,747	a	3	7,278	yy	1	1,976	yy	1							
568	AA	s.Luft App.	19	0,000	n	1	0,477	i	1	4,166	i	2							
571	AA	s.Luft App.	19	0,977	n	1	0,504	i	1	3,854	i	2							
580	AA	s.Luft App.	8	2,483	n	1	1,615	i	2	12,424	i								
583	AA	s.Luft App.	8	0,676	n	1	0,436	i	1	8,783	i	3							
393	AW	1 mX	23	5,310	a	1	10,812	yy	1	0,785	yy	1							
396	AW	1 mX	23	3,784	a	1	11,490	yy	1	0,864	yy	1							
375	AW	1 T	24	71,066	a	1	7,494	yy	1	1,653	yy	1							
378	AW	1 T	24	42,470	a	1	6,848	yy	1	1,348	yy	1							
164	AW	3 T	24	15,990	ii	1	15,050	kk	1	1,808	kk	1							
167	AW	3 T	24	16,219	ii	1	0,000	kk	1	4,955	kk	1							
170	AW	3 T	24	48,844	ii	3	77,561	kk	3	4,102	kk	1							
173	AW	3 T	24	17,325	ii	3	71,049	kk	3	4,266	kk	1							
175	AW	3 T	24			2	17,200	kk	2	7,290	kk	1							
178	AW	3 T	24			1	3,971	kk	1	6,902	kk	1							
313	AW	3 T	24	49,847	ww	1	1,789	uu	1	1,983	uu	1	0,302	1	xx				
316	AW	3 T	24	44,971	ww	1	0,000	uu	1	4,639	uu	1	0,000	1	xx				
611	AW	Umw TX	8	10,607	w		4,750	o	2	3,258	o	1	s						
614	AW	Umw TX	8	9,589	x	3	2,986	p	1	4,673	p	3	t						
682	AW	Ink.Kontr.	8	14,491	y	3	0,969	q	1	2,970	q	1	u						

Proben-ID	Probanden-ID	Expositionskonditionen		Zytokinsezerrierung nach Exposition												
		Expositionsvariable	Expositionsdauer [h] [KZ: Kurzezeitexposition LZ: Langezeitexposition]	GMCSF			IL-1α			IL-6			TNFα			
	Fallgruppe atop. Ekzem läsional			GMCSF [pg/ml]	1:<NG 2:<EG 3:<BG	ELISA Platten- ID	IL-1α [pg/ml]	1:<NG 2:<EG 3:<BG	ELISA Platten- ID	IL-6 [pg/ml]	1:<NG 2:<EG 3:<BG	ELISA Platten- ID	TNFα [pg/ml]	1:<NG 2:<EG 3:<BG	ELISA Platten- ID	
329	MK	1 T	8	KZ	126,577		ww	23,281	3	uu	0,978	1	v v	0,000	1	xx
284	SH	3 T	24	LZ	49,389		h	5,273	1	qq	3,292	1	rr			
287	SH	3 T	24	LZ	66,378		h	9,973	2	ss	3,991	1	tt			
290	SH	3 T	24	LZ	30,367		h	49,230		ss	10,884	2	tt			
293	SH	3 T	24	LZ	36,324		h	7,662	2	ss	3,116	1	tt			
387	SH	1 T	23	LZ	137,060		a	15,614	2	yy	7,962	2	zz			
390	SH	1 T	23	LZ	123,512		a	9,264	1	yy	5,270	1	zz			
487	SH	1 mX	18	LZ	43,704		g	10,265	3	e	14,415	3	f			
490	SH	1 mX	18	LZ	47,235		g	10,892	3	e	16,134	3	f			
350	SH	1 T	18	LZ	145,915		ww	28,861		uu	11,987	3	v v	0,000	1	xx
353	SH	1 T	18	LZ	238,567		ww	1,127	1	uu	14,257	3	v v	0,000	1	xx
475	SH	Umw TX	8	KZ	43,448		g	9,929	3	e	15,541	3	f			
478	SH	Umw TX	8	KZ	51,656		g	9,295	3	e	17,399	3	f			
610	SH	Umw TX	8	KZ	27,193		w	3,495	1	o	2,993	1	s			
613	SH	Umw TX	8	KZ	26,290		w	2,254	1	o	2,552	1	s			
320	SH	1 T	8	KZ	50,394		ww	6,801	1	uu	3,228	1	v v	0,114	1	xx
323	SH	1 T	8	KZ	40,987		ww	24,971	3	uu	3,100	1	v v	0,000	1	xx
386	SW	1 T	23	LZ	106,818		a	22,461	2	yy	7,403	2	zz			
389	SW	1 T	23	LZ	97,082		a	18,211	2	yy	6,830	2	zz			
683	SW	Ink.Kontr.	8	KZ	34,616		y	5,251	2	q	83,283		u			
686	SW	Ink.Kontr.	8	KZ	37,049		y	23,133		q	91,016		u			
645	SW	3 T	8	KZ	74,635		x	5,283	1	p	80,089		t			
648	SW	3 T	8	KZ	69,372		x	9,359	2	p	75,768		t			
689	SW	1 T	8	KZ	36,534		y	5,288	2	q	55,476		u			
692	SW	1 T	8	KZ	39,523		y	4,416	2	q	68,008		u			
695	SW	1 T	8	KZ	44,556		y	3,945	2	q	79,146		u			
698	SW	1 T	8	KZ	30,388		z	4,935	1	r	44,698		v			
657	SW	1 mX	8	KZ	60,001		y	5,746	2	q	49,808		u			
660	SW	1 mX	8	KZ	62,703		y	5,711	2	q	45,143		u			
701	SW	1 mX	8	KZ	20,919		z	0,000	1	r	21,461		v			
704	SW	1 mX	8	KZ	15,144		z	1,527	1	r	19,079		v			
634	VM	Ink.Kontr.	23	LZ	14,803		x	0,000	1	p	13,513		t			

Proben-ID	Probanden-ID	Expositionskonditionen		Zytokinseznierung nach Exposition											
				GMCSF				IL-1α				IL-6			
	Fallgruppe atop. Ekzem läsional	Expositionsvariable	Expositionsdauer [h] [KZ: Kurzzeitexposition LZ: Langzeitexposition]	GMCSF [pg/ml]	1:<NG 2:<EG 3:<BG	ELISA Platten-ID	IL-1α [pg/ml]	1:<NG 2:<EG 3:<BG	ELISA Platten-ID	IL-6 [pg/ml]	1:<NG 2:<EG 3:<BG	ELISA Platten-ID	TNFα [pg/ml]	1:<NG 2:<EG 3:<BG	ELISA Platten-ID
637	VM	Ink.Kontr.	23	18,175	x	x	3,201	1	p	12,125	t	t			
574	VM	s.Luft.App.	19	9,935	2	n	5,741		l	2,327	2	m			
577	VM	s.Luft.App.	19	9,336	2	n	5,391		l	4,213	2	m			
586	VM	s.Luft.App.	8	10,462	2	n	8,904		l	4,227	2	m			
589	VM	s.Luft.App.	8	10,219	2	n	11,404		l	5,582	3	m			
684	VM	Ink.Kontr.	8	12,872	3	y	2,399	1	q	5,598	2	u			
687	VM	Ink.Kontr.	8	15,759	3	y	7,756	3	q	6,882	2	u			
646	VM	3 T	8	41,706		x	3,158	1	p	8,810		t			
649	VM	3 T	8	32,971		x	8,211	2	p	7,328	3	t			
690	VM	1 T	8	14,665	3	y	3,652	2	q	4,728	1	u			
693	VM	1 T	8	17,955	3	y	4,383	2	q	6,048	2	u			
696	VM	1 T	8	12,731	3	y	2,171	1	q	4,768	1	u			
699	VM	1 T	8	12,823	2	z	3,104	1	r	4,711	2	v			
658	VM	1 mX	8	20,419	3	y	5,262	2	q	3,685	1	u			
661	VM	1 mX	8	25,195		y	11,809	3	q	5,136	1	u			
702	VM	1 mX	8	3,842	1	z	7,422	1	r	1,588	1	v			
705	VM	1 mX	8	4,428	1	z	4,031	1	r	2,833	1	v			
ifd.															
Proben-ID	Probanden-ID	Expositionskonditionen		Zytokinseznierung nach Exposition											
	Fallgruppe atop. Ekzem nicht läsional			Expositionsvariable	Expositionsdauer [h] [KZ: Kurzzeitexposition LZ: Langzeitexposition]	GMCSF [pg/ml]	1:<NG 2:<EG 3:<BG	ELISA Platten-ID	IL-1α [pg/ml]	1:<NG 2:<EG 3:<BG	ELISA Platten-ID	IL-6 [pg/ml]	1:<NG 2:<EG 3:<BG	ELISA Platten-ID	TNFα [pg/ml]
308	AA	3 T	24	17,385	3	www	0,000	1	uu	1,088	1	v v	0,000	1	xx
311	AA	3 T	24	32,236		www	0,000	1	uu	1,054	1	v v	0,000	1	xx
434	AA	Umw TX	23	9,805	2	d	1,924	1	b	1,370	1	c			
437	AA	Umw TX	23	11,878	2	d	17,575		b	1,107	1	c			
494	AA	1 mX	18	12,106	3	g	6,202	2	e	3,298	1	f			
497	AA	1 mX	18	17,881	3	g	6,224	3	e	3,124	1	f			
446	AA	Umw TX	18	8,822	1	d	4,169	1	b	1,643	1	c			
449	AA	Umw TX	18	20,294	3	d	4,864	2	b	2,393	1	c			

Proben-ID	Probanden-ID	Expositionskonditionen		Zytokinseznierung nach Exposition												
				GMCSF				IL-1 α			IL-6			TNF α		
				GMCSF [pg/ml]	1:<NG 2:<EG 3:<BG	ELISA Platten-ID	IL-1 α [pg/ml]	1:<NG 2:<EG 3:<BG	ELISA Platten-ID	IL-6 [pg/ml]	1:<NG 2:<EG 3:<BG	ELISA Platten-ID	TNF α [pg/ml]	1:<NG 2:<EG 3:<BG	ELISA Platten-ID	
451	AA	Umw TX	18	LZ	10,809	2	d	6,006	2	b	11,934	2	c			
454	AA	Umw TX	18	LZ	10,163	2	d	7,159	2	b	11,413	2	c			
457	AA	Umw TX	18	LZ	4,362	1	g	6,115	2	e	3,983	1	f			
460	AA	Umw TX	18	LZ	6,381	2	g	7,803	3	e	4,356	1	f			
463	AA	Umw TX	8	KZ	13,374	3	g	9,494	3	e	12,772	3	f			
466	AA	Umw TX	8	KZ	9,489	2	g	8,423	3	e	12,389	2	f			
469	AA	Umw TX	8	KZ	7,511	2	g	6,427	2	e	4,484	1	f			
472	AA	Umw TX	8	KZ	6,004	2	g	6,929	2	e	3,942	1	f			
482	AA	Umw TX	8	KZ	19,740		g	5,922	2	e	3,821	1	f			
485	AA	Umw TX	8	KZ	19,299		g	7,080	2	e	3,736	1	f			
665	AA	Ink.Kontr.	8	KZ	31,204		y	7,137	3	q	1,961	1	u			
668	AA	Ink.Kontr.	8	KZ	31,436		y	3,556	2	q	2,037	1	u			
338	AA	3 T	8	KZ	74,965		ww	0,000	1	uu	5,769	2	vv	0,000	1	xx
341	AA	3 T	8	KZ	115,951		ww	30,975		uu	2,371	1	vv	0,000	1	xx
640	AA	3 T	8	KZ	30,351		x	0,000	1	p	3,954	2	t			
643	AA	3 T	8	KZ	51,363		x	5,781	2	p	8,546		t			
672	AA	1 T	8	KZ	18,733	3	y	3,678	2	q	2,467	1	u			
675	AA	1 T	8	KZ	21,996		y	6,376	2	q	2,735	1	u			
499	AA	1 mX	8	KZ	7,399	2	n	3,227	3	l	0,614	1	m			
502	AA	1 mX	8	KZ	7,973	2	n	3,172	3	l	2,676	2	m			
505	AA	1 mX	8	KZ	5,960	2	n	2,048	3	l	2,717	2	m			
508	AA	1 mX	8	KZ	6,907	2	n	2,367	3	l	0,000	1	m			
302	AA	3 T	5	KZ	11,152	3	i	6,470	2	ss	3,149	1	tt			
305	AA	3 T	5	KZ	12,012	3	i	5,580	1	ss	3,370	1	tt			
398	AW	1 mX	23	LZ	12,658	2	a	12,009	2	yy	1,110	1	zz			
401	AW	1 mX	23	LZ	20,275	3	a	11,467	1	yy	0,785	1	zz			
374	AW	1 T	24	LZ	55,905		a	8,595	1	yy	2,010	1	zz			
377	AW	1 T	24	LZ	128,496		a	8,423	1	yy	1,835	1	zz			
416	AW	Umw TX	24	LZ	13,237	2	d	1,981	1	b	2,675	1	c			
419	AW	Umw TX	24	LZ	16,692	2	d	1,295	1	b	2,072	1	c			
314	AW	3 T	24	LZ	21,157		ww	1,357	1	uu	1,310	1	vv	0,000	1	xx
317	AW	3 T	24	LZ	22,904		ww	7,672	2	uu	0,761	1	vv	0,000	1	xx

Proben-ID	Probanden-ID	Expositionskonditionen		Zytokinseznerrierung nach Exposition											
		Expositionsvariable	Expositionsdauer [h] [KZ: Kurzezeitexposition LZ: Langzeitexposition]	GMCSF			IL-1 α			IL-6			TNF α		
	Fallgruppe atop. Ekzem nicht (ä)sional			GMCSF [pg/ml]	1:<NG 2:<EG 3:<BG	ELISA Platten- ID	IL-1 α [pg/ml]	1:<NG 2:<EG 3:<BG	ELISA Platten- ID	IL-6 [pg/ml]	1:<NG 2:<EG 3:<BG	ELISA Platten- ID	TNF α [pg/ml]	1:<NG 2:<EG 3:<BG	ELISA Platten- ID
404	AW	1 mX	24	38,182		a	4,029	1	yy	5,277	1	zz			
407	AW	1 mX	24	59,551		a	6,676	1	yy	4,401	1	zz			
428	AW	Umw TX	23	10,062	2	d	2,349	1	b	2,934	1	c			
431	AW	Umw TX	23	11,878	2	d	1,696	1	b	2,672	1	c			
440	AW	Umw TX	18	7,258	1	d	0,617	1	b	3,349	1	c			
443	AW	Umw TX	18	5,228	1	d	1,974	1	b	2,211	1	c			
453	AW	Umw TX	18	18,591	3	d	5,289	2	b	7,856	1	c			
456	AW	Umw TX	18	23,975	3	d	1,794	1	b	9,135	1	c			
465	AW	Umw TX	8	22,429		g	5,504	2	e	6,637	2	f			
468	AW	Umw TX	8	11,072	3	g	5,216	2	e	6,266	2	f			
666	AW	Ink.Kontr.	8	81,036		y	8,698	3	q	20,878		u			
669	AW	Ink.Kontr.	8	78,555		y	3,044	1	q	17,912	3	u			
331	AW	3 T	8	58,545		ww	9,164	2	uu	1,361	1	vv	0,000	1	xx
334	AW	3 T	8	82,347		ww	0,000	1	uu	1,731	1	vv	0,000	1	xx
639	AW	3 T	8	237,365		x	1,283	1	p	19,836		t			
642	AW	3 T	8	296,587		x	0,575	1	p	26,762		t			
678	AW	1 T	8	70,045		y	1,115	1	q	14,456	3	u			
681	AW	1 T	8	63,573		y	1,644	1	q	12,697	3	u			
651	AW	1 mX	8	335,244		x	18,616	3	p	15,750		t			
652	AW	1 mX	8	248,724		x	13,134	3	p	11,359		t			
654	AW	1 mX	8	332,162		x	0,000	1	p	17,236		t			
655	AW	1 mX	8	280,549		x	0,000	1	p	12,749		t			
296	AW	3 T	5	26,270		h	2,364	1	ss	2,743	1	tt			
299	AW	3 T	5	19,343		i	3,024	1	ss	4,516	1	tt			
369	DK	1 T	24	5,838	2	ww	0,000	1	uu	1,077	1	vv	0,000	1	xx
372	DK	1 T	24	5,357	1	ww	23,584		uu	1,180	1	vv	0,000	1	xx
309	DK	3 T	24	371,366		ww	2,948	1	uu	2,625	1	vv	0,000	1	xx
312	DK	3 T	24	346,183		ww	0,000	1	uu	2,425	1	vv	0,000	1	xx
429	DK	Umw TX	23	10,547	2	d	22,709		b	3,126	1	c			
432	DK	Umw TX	23	14,420	2	d	38,557		b	3,532	1	c			
628	DK	Ink.Kontr.	23	13,554		x	0,000	1	p	53,803		t			
631	DK	Ink.Kontr.	23	16,212		x	4,485	1	p	35,801		t			

Proben-ID	Probanden-ID	Expositionskonditionen		Zytokinsezerrierung nach Exposition															
				GMCSF				IL-1α				IL-6				TNFα			
				1:<NG	2:<EG	3:<BG	ELISA Platten-ID	IL-1α [pg/ml]	1:<NG	2:<EG	3:<BG	ELISA Platten-ID	IL-6 [pg/ml]	1:<NG	2:<EG	3:<BG	TNFα [pg/ml]	1:<NG	2:<EG
569	DK	s.Luft App.	19	LZ	10,601	2	n	2,041	3	l	61,927								
572	DK	s.Luft App.	19	LZ	9,464	2	n	3,048	3	l	96,973								
489	DK	1 mX	18	LZ	32,961		g	18,513		e	1,987	1							
492	DK	1 mX	18	LZ	39,646		g	16,296		e	2,735	1							
495	DK	1 mX	18	LZ	12,063	3	g	8,379	3	e	8,583	2							
498	DK	1 mX	18	LZ	10,540	3	g	7,826	3	e	9,450	2							
441	DK	Umw TX	18	LZ	11,704	2	d	10,362	3	b	2,304	1							
444	DK	Umw TX	18	LZ	8,644	1	d	12,937	3	b	2,297	1							
513	DK	Umw TX	18	LZ	7,660	2	n	3,184	3	l	0,173	1							
516	DK	Umw TX	18	LZ	9,522	2	n	0,961	1	l	0,858	1							
519	DK	Umw TX	18	LZ	1,626	1	n	3,171	3	l	2,225	1							
522	DK	Umw TX	18	LZ	8,214	2	n	4,337		l	3,083	2							
477	DK	Umw TX	8	KZ	33,341		g	15,967		e	1,886	1							
480	DK	Umw TX	8	KZ	39,967		g	16,129		e	1,522	1							
483	DK	Umw TX	8	KZ	10,508	2	g	8,105	3	e	7,718	2							
486	DK	Umw TX	8	KZ	10,922	3	g	10,849	3	e	10,017	2							
581	DK	s.Luft App.	8	KZ	15,730	3	n	4,246		l	197,646								
584	DK	s.Luft App.	8	KZ	15,907	3	n	2,963	3	l	157,668								
339	DK	3 T	8	KZ	29,335		www	3,063	1	uu	1,162	1							xx
342	DK	3 T	8	KZ	22,226		www	0,000	1	uu	1,477	1							xx
617	DK	1 T	8	KZ	9,274	3	x	5,330	1	p	5,214	3							
620	DK	1 T	8	KZ	10,037	3	x	9,031	2	p	5,386	3							
623	DK	1 T	8	KZ	9,956	3	x	6,155	2	p	5,939	3							
626	DK	1 T	8	KZ	9,489	3	x	2,041	1	p	6,300	3							
500	DK	1 mX	8	KZ	13,075	3	n	5,304		l	0,000	1							
501	DK	1 mX	8	KZ	14,392	3	n	7,012		l	3,492	2							
503	DK	1 mX	8	KZ	17,429	3	n	5,452		l	3,893	2							
504	DK	1 mX	8	KZ	16,811	3	n	6,946		l	3,213	2							
506	DK	1 mX	8	KZ	16,497	3	n	6,328		l	0,000	1							
507	DK	1 mX	8	KZ	14,536	3	n	7,386		l	2,187	1							
509	DK	1 mX	8	KZ	19,171	3	n	7,889		l	4,496	2							
510	DK	1 mX	8	KZ	14,392	3	n	5,922		l	4,064	2							

Proben-ID	Probanden-ID	Expositionskonditionen		Zytokinseznierung nach Exposition															
				GMCSF				IL-1 α				IL-6				TNF α			
				GMCSF [pg/ml]	1:<NG 2:<EG 3:<BG	ELISA Platten-ID	IL-1 α [pg/ml]	1:<NG 2:<EG 3:<BG	ELISA Platten-ID	IL-6 [pg/ml]	1:<NG 2:<EG 3:<BG	ELISA Platten-ID	TNF α [pg/ml]	1:<NG 2:<EG 3:<BG	ELISA Platten-ID				
303	DK	3 T	5	KZ	6,562	2	i	5,509	1	ss	3,273	1	tt						
306	DK	3 T	5	KZ	0,000	1	i	0,421	1	ss	2,831	1	tt						
629	GK	Ink.Kontr.	23	LZ	9,171	3	x	0,000	1	p	53,332		t						
381	GK	1 T	23	LZ	25,219	3	a	6,211	1	yy	5,273	1	zz						
384	GK	1 T	23	LZ	30,216	3	a	11,382	1	yy	5,741	1	zz						
575	GK	s.Luft.App.	19	LZ	8,898	2	n	1,147	2		92,403		m						
578	GK	s.Luft.App.	19	LZ	9,186	2	n	6,251			144,998		m						
493	GK	1 mX	18	LZ	12,819	3	g	6,793	2	e	18,562	3	f						
496	GK	1 mX	18	LZ	12,949	3	g	8,816	3	e	22,124	3	f						
459	GK	Umw TX	18	LZ	34,295		g	10,285	3	e	1,663	1	f						
462	GK	Umw TX	18	LZ	31,749		g	11,018	3	e	1,647	1	f						
471	GK	Umw TX	8	KZ	25,349		g	9,948	3	e	1,905	1	f						
474	GK	Umw TX	8	KZ	25,719		g	9,037	3	e	1,916	1	f						
481	GK	Umw TX	8	KZ	11,664	3	g	6,945	2	e	23,168		f						
484	GK	Umw TX	8	KZ	10,130	2	g	6,778	2	e	21,670	3	f						
609	GK	Umw TX	8	KZ	6,959		w	2,947	1	o	7,526	1	s						
612	GK	Umw TX	8	KZ	4,676	3	w	2,046	1	o	7,911	1	s						
587	GK	s.Luft.App.	8	KZ	18,373	3	n	3,393	3	i	193,853		m						
590	GK	s.Luft.App.	8	KZ	19,693	3	n	5,411			600,000		m						
616	GK	1 T	8	KZ	18,290		x	0,000	1	p	74,073		t						
619	GK	1 T	8	KZ	18,437		x	0,000	1	p	84,792		t						
622	GK	1 T	8	KZ	19,148		x	0,000	1	p	68,336		t						
625	GK	1 T	8	KZ	20,281		x	0,000	1	p	82,156		t						
163	GS	3 T	24	LZ	2,573	2	ii	33,681	2	kk	4,415	1	ll						
166	GS	3 T	24	LZ	11,985		ii	0,000	1	kk	5,778	1	ll						
169	GS	3 T	24	LZ	3,727	2	ii	8,747	1	kk	3,746	1	ll						
172	GS	3 T	24	LZ	8,527		ii	68,166	3	kk	3,015	1	ll						
176	GS	3 T	24	LZ				7,786	1	kk	1,052	1	ll						
179	GS	3 T	24	LZ				0,000	1	kk	15,132	2	ll						
243	GS	3 T	24	LZ				9,227	1	oo	78,730		pp						
246	GS	3 T	24	LZ	10,546	3	h	4,650	1	qq	48,256		rr						
225	GS	3 T	8	KZ	25,044		k	7,529	1	oo	1,412	1	pp						

Proben-ID	Probanden-ID	Expositionskonditionen		Zytokinsezerrierung nach Exposition															
				GMCSF				IL-1α				IL-6				TNFα			
				GMCSF [pg/ml]	1:<NG 2:<EG 3:<BG	ELISA Platten-ID	Expositionsdauer [h] [KZ: Kurzzeitexposition LZ: Langzeitexposition]	IL-1α [pg/ml]	1:<NG 2:<EG 3:<BG	ELISA Platten-ID	IL-6 [pg/ml]	1:<NG 2:<EG 3:<BG	ELISA Platten-ID	TNFα [pg/ml]	1:<NG 2:<EG 3:<BG	ELISA Platten-ID			
228	GS	3 T	8	KZ	12,830	3	k	64,586	3	oo	0,384	1	pp						
373	MK	1 T	24	LZ	600,000		a	10,677	1	yy	10,205	2	zz						
376	MK	1 T	24	LZ	600,000		a	14,224	2	yy	10,927	2	zz						
423	MK	Umw TX	24	LZ	85,578		d	28,196		b	3,100	1	c						
426	MK	Umw TX	24	LZ	72,399		d	6,271	2	b	2,722	1	c						
315	MK	3 T	24	LZ	3,255	1	ww	0,000	1	uu	0,906	1	vv	0,000	1	xx			
318	MK	3 T	24	LZ	4,727	1	ww	271,759		uu	1,151	1	vv	0,000	1	xx			
411	MK	1 mX	24	LZ	83,180		a	7,922	1	yy	3,696	1	zz						
414	MK	1 mX	24	LZ	92,352		a	5,907	1	yy	3,992	1	zz						
433	MK	Umw TX	23	LZ	120,024		d	6,962	2	b	1,027	1	c						
436	MK	Umw TX	23	LZ	131,220		d	14,064	3	b	1,378	1	c						
445	MK	Umw TX	18	LZ	203,511		d	7,258	2	b	2,965	1	c						
448	MK	Umw TX	18	LZ	240,220		d	6,702	2	b	3,123	1	c						
345	MK	1 T	18	LZ	120,053		ww	15,585	3	uu	3,363	1	vv	0,000	1	xx			
348	MK	1 T	18	LZ	162,547		ww	30,555		uu	2,793	1	vv	0,000	1	xx			
337	MK	3 T	8	KZ	600,000		ww	7,610	2	uu	6,630	2	vv	0,000	1	xx			
340	MK	3 T	8	KZ	600,000		ww	0,000	1	uu	7,211	2	vv	0,060	1	xx			
638	MK	3 T	8	KZ	528,752		x	1,297	1	p	19,936		t						
641	MK	3 T	8	KZ	513,065		x	0,003	1	p	24,644		t						
327	MK	1 T	8	KZ	379,358		ww	17,587	3	uu	2,102	1	vv	0,000	1	xx			
330	MK	1 T	8	KZ	432,419		ww	1,748	1	uu	1,949	1	vv	0,000	1	xx			
650	MK	1 mX	8	KZ	282,770		x	14,236	3	p	4,813	3	t						
653	MK	1 mX	8	KZ	292,459		x	6,058	2	p	5,164	3	t						
297	MK	3 T	5	KZ	600,000		h	5,469	1	ss	4,659	1	tt						
300	MK	3 T	5	KZ	328,616		i	4,220	1	ss	9,820	2	tt						
421	SH	Umw TX	24	LZ	16,305	2	d	62,086		b	19,128	2	c						
424	SH	Umw TX	24	LZ	22,782	3	d	11,868	3	b	21,558	3	c						
285	SH	3 T	24	LZ	27,029		h	5,662	1	qq	7,688	1	rr						
288	SH	3 T	24	LZ	27,214		h	5,105	1	ss	7,909	2	tt						
291	SH	3 T	24	LZ	27,799		h	7,494	2	ss	7,967	2	tt						
294	SH	3 T	24	LZ	22,710		h	5,160	1	ss	6,976	2	tt						
409	SH	1 mX	24	LZ	20,167	3	a	16,514	2	yy	29,921		zz						

Proben-ID	Expositionskonditionen		Zytokinsezerrierung nach Exposition														
			GMCSF				IL-1 α			IL-6			TNF α				
			1:<NG	2:<EG	3:<BG	ELISA Platten-ID	IL-1 α [pg/ml]	1:<NG	2:<EG	3:<BG	ELISA Platten-ID	IL-6 [pg/ml]	1:<NG	2:<EG	3:<BG	ELISA Platten-ID	
412	SH	1 mX	24	LZ	26,902		a	16,960	2	yy	27,802		zz				
351	SH	1 T	18	LZ	37,236		ww	5,404	1	uu	8,451	2	vv	0,000	1		xx
354	SH	1 T	18	LZ	41,977		ww	74,715		uu	6,894	2	vv	0,000	1		xx
321	SH	1 T	8	KZ	24,174		ww	19,526	3	uu	8,062	2	vv	0,000	1		xx
324	SH	1 T	8	KZ	44,437		ww	10,601	2	uu	9,899	2	vv	0,000	1		xx
392	SW	1 mX	23	LZ	4,105	1	a	3,534	1	yy	1,729	1	zz				
395	SW	1 mX	23	LZ	0,884	1	a	10,980	1	yy	1,864	1	zz				
417	SW	Umw TX	24	LZ	3,679	1	d	0,000	1	b	2,520	1	c				
420	SW	Umw TX	24	LZ	4,119	1	d	1,214	1	b	2,461	1	c				
405	SW	1 mX	24	LZ	11,588	2	a	2,695	1	yy	3,648	1	zz				
408	SW	1 mX	24	LZ	7,618	1	a	5,454	1	yy	3,553	1	zz				
385	SW	1 T	23	LZ	21,558	3	a	12,842	2	yy	3,794	1	zz				
388	SW	1 T	23	LZ	32,884		a	23,172	2	yy	4,481	1	zz				
452	SW	Umw TX	18	LZ	8,513	1	d	12,048	3	b	9,313	1	c				
455	SW	Umw TX	18	LZ	17,345	2	d	11,829	3	b	9,777	2	c				
464	SW	Umw TX	8	KZ	4,499	1	g	12,922	3	e	5,979	1	f				
467	SW	Umw TX	8	KZ	2,621	1	g	12,170	3	e	6,722	2	f				

A3.8 Datentabelle zu Abbildung 35: Spontansekretion der Zytokine GM-CSF, IL-1 α und IL-6 innerhalb 48 h nach der Keratinozytenaussaat unter individueller Auftrennung der Fallgruppen. Aufgetragen sind die Mediane mit dem 90 % Konfidenzintervall. Individuen mit in allen Messdaten auffällig erhöhten bzw. erniedrigten Zytokinkonzentrationen sind mit * gekennzeichnet, angegeben sind ferner intraindividuelle Signifikanzniveaus im Homogenitätstest innerhalb der Fallgruppe atopisches Ekzem (Tabelle 17).

Fallgruppe Probanden-ID Fallzahl	GMCSF Median [pg/ml]	90 % Konfidenzintervall [pg/ml]	
Kontrolle gesund			
BK n=6	7,3	4,4	10,4
HF n=4	245,6	221,5	269,2
HH n=10	5,0	3,4	47,6
HM n=8	45,3	25,7	62,5
HS n=4	6,7	4,7	9,9
HW n=6	131,5	118,8	174,2
ii n=8	38,3	19,3	168,9
IW n=12	9,9	7,2	126,9
IZ n=35	7,8	4,9	10,4
ko n=8	9,9	6,9	10,9
LW n=4	106,5	89,7	15,9
MS n=21	9,8	7,7	12,3
OF n=24	8,9	4,6	11,0
oo n=4	600,0	600,0	600,0
SF n=6	5,7	1,5	7,4
UF n=6	13,0	5,9	21,7
VMR n=9	8,3	6,5	9,5
WZ n=4	41,4	28,6	52,7
xx n=4	1,4	0,0	2,2
atop. Ekzem läsional			
AA n=6	16,4	4,0	25,7
AW n=30	25,7	19,3	31,6
DK n=14	13,3	11,9	15,6
GK n=22	39,3	27,4	42,5
MK n=14	132,0	115,1	171,3
SH n=16	111,0	64,2	252,1
SW n=14	18,1	15,1	34,3
VM n=18	8,5	7,1	21,4
atop. Ekzem nicht läsional			
AA n=32	21,4	17,8	26,2
AW n=32	69,2	43,9	85,5
DK n=42	18,7	14,8	23,3
GK n=21	22,8	21,9	23,3
GS n=9	12,8	10,1	17,8
MK n=24	148,7	127,9	251,7
SH n=12	55,0	18,5	165,3
SW n=12	11,8	8,5	20,3

Fallgruppe Probanden-ID Fallzahl	IL-1 α Median [pg/ml]	90 % Konfidenzintervall [pg/ml]	
Kontrolle gesund			
BK n=6	30,7	5,9	86,9
HF n=4	30,8	23,1	43,2
HH n=10	38,2	35,9	48,4
HM n=8	45,4	22,4	64,7
HS n=4	27,9	16,0	44,1
HW n=6	32,8	30,7	34,7
ii n=8	34,6	22,8	49,9
IW n=12	31,7	6,3	51,8
IZ n=39	35,0	27,1	41,8
ko n=8	13,9	9,6	62,5
LW n=4	42,5	37,1	48,6
MS n=22	13,6	10,5	20,8
OF n=26	11,4	7,4	17,9
oo n=4	11,9	7,8	12,6
SF n=6	102,3	4,5	115,8
UF n=6	47,2	14,8	63,2
VMR n=11	40,1	6,6	53,6
WZ n=4	64,8	48,2	76,5
xx n=4	28,6	24,5	34,4
atop. Ekzem läsional			
AA n=6	12,9	4,6	27,3
AW n=30	22,1	13,1	27,2
DK n=14	91,6	74,4	106,3
GK n=22	29,7	25,9	38,0
MK n=14	49,0	45,7	78,6
SH n=16	38,7	24,7	88,5
SW n=14	6,3	4,5	15,3
VM n=18	5,7	4,9	26,7
atop. Ekzem nicht läsional			
AA n=32	40,4	25,9	49,5
AW n=32	32,1	25,6	45,3
DK n=42	37,8	25,7	39,7
GK n=21	45,5	38,8	56,2
GS n=9	51,3	41,7	123,0
MK n=24	23,8	18,7	40,6
SH n=12	39,9	36,0	70,6
SW n=12	37,4	35,1	62,6

Fallgruppe Probanden-ID Fallzahl	IL-6 Median [pg/ml]	90 % Konfidenzintervall [pg/ml]	
Kontrolle gesund			
BK n=6	1,6	1,4	8,8
HF n=4	17,2	16,2	18,5
HH n=10	2,9	1,6	6,2
HM n=8	14,7	7,0	15,2
HS n=4	1,9	1,6	2,0
HW n=6	41,8	37,8	45,3
ii n=8	2,9	1,9	27,5
IW n=12	3,0	1,8	8,4
IZ n=39	4,2	3,8	5,4
ko n=8	2,6	1,9	5,2
LW n=4	14,2	13,8	16,0
MS n=22	3,0	2,1	7,7
OF n=26	1,6	1,0	1,8
oo n=4	5,5	3,6	6,2
SF n=6	3,3	0,8	5,6
UF n=6	2,5	0,0	4,6
VMR n=11	1,9	1,2	2,1
WZ n=4	23,3	19,2	24,3
xx n=4	1,5	0,9	2,3
atop. Ekzem läsional			
AA n=6	3,5	2,4	23,4
AW n=30	3,9	2,9	6,2
DK n=14	26,7	20,7	31,9
GK n=22	29,1	26,1	47,2
MK n=14	6,5	3,8	7,9
SH n=16	8,0	6,9	13,3
SW n=14	12,1	11,0	14,0
VM n=18	3,9	2,2	4,5
atop. Ekzem nicht läsional			
AA n=32	3,8	3,4	4,7
AW n=32	6,3	5,2	7,8
DK n=42	4,6	4,0	8,0
GK n=21	35,6	22,1	108,0
GS n=9	5,3	2,0	12,6
MK n=24	8,6	5,0	14,6
SH n=12	15,4	14,0	26,2
SW n=12	12,2	9,5	16,2

A3.9 Datentabelle zu Abbildung 37: Mittlere GM-CSF-Konzentrationsquotienten der Expositionsvariablen nach dem Modell der Varianzanalyse. Aufgetragen sind die kleinsten quadratischen Mittelwert-Schätzer mit der 1σ Standardabweichung, angegeben ist ferner die Fallzahl der jeweiligen Expositionsvariablen.

Fallgruppe Expositionsvariable (Versuchszahl)	quadratischer Mittelwert- Schätzer [pg/ml]	Standard- abw. 1σ [pg/ml]
Kontrolle		
Umwelt T/m-X (n=14)	1,678	0,197
3 MAK T (n=17)	1,553	0,185
1 MAK T (n=18)	0,652	0,192
1 MAK m-X (n=7)	0,511	0,279
Inkubator (n=3)	1,274	0,447
atop. Ekzem läsional		
Umwelt T/m-X (n=12)	0,552	0,217
3 MAK T (n=22)	1,661	0,165
1 MAK T (n=18)	1,036	0,211
1 MAK m-X (n=9)	0,920	0,249
atop. Ekzem nicht läsional		
Umwelt T/m-X (n=12)	1,132	0,284
3 MAK T (n=20)	1,389	0,231
1 MAK T (n=15)	1,789	0,269
1 MAK m-X (n=12)	1,828	0,284
Inkubator (n=4)	2,056	0,492

A3.10 Datentabelle zu Abbildung 38: Mittlere GM-CSF-Konzentrationsquotienten in Abhängigkeit von der Expositionsdauer über alle Expositionsvariablen nach dem Modell der Varianzanalyse. Aufgetragen sind die kleinsten quadratischen Mittelwert-Schätzer mit der 1σ Standardabweichung, angegeben ist ferner die Fallzahl der jeweiligen Expositionsdauer (KZ: Kurzzeitexposition, LZ: Langzeitexposition).

Fallgruppe Expositionsdauervariable (Versuchszahl)	kleinster quadratischer Mittelwert- Schätzer [pg/ml]	Standard- abw. 1σ [pg/ml]
Kontrolle		
Kurzzeit (n=28)	1,481	0,162
Langzeit (n=31)	0,968	0,154
atop. Ekzem läsional		
Kurzzeit (n=30)	1,378	0,154
Langzeit (n=31)	1,040	0,151
atop. Ekzem nicht läsional		
Kurzzeit (n=37)	2,099	0,198
Langzeit (n=26)	1,179	0,213

A3.11 Datentabelle zu Abbildung 39: Mittlere GM-CSF-Konzentrationsquotienten der Fallgruppe nicht läSIONALES atopisches Ekzem unter Interaktion einzelner Expositionsarten und Expositionsdauer nach dem Modell der Varianzanalyse. Aufgetragen sind die kleinsten quadratischen Mittelwert-Schätzer mit der 1σ Standardabweichung, angegeben ist ferner die Fallzahl der jeweiligen Expositionsvariablen.

Expositionsdauer Expositionsvariable (Versuchszahl)	kleinster quadratischer Mittelwert- Schätzer [pg/ml]	Standard- abw. 1σ [pg/ml]
Kurzzeit		
Umwelt T/m-X (n=6)	0,833	0,402
3 MAK T (n=13)	1,748	0,273
1 MAK T (n=10)	1,613	0,311
1 MAK m-X (n=6)	2,913	0,402
Inkubator (n=2)	3,388	0,696
Langzeit		
Umwelt T/m-X (n=6)	1,432	0,402
3 MAK T (n=7)	1,030	0,372
1 MAK T (n=5)	1,965	0,440
1 MAK m-X (n=6)	0,743	0,402
Inkubator (n=2)	0,725	0,696

A3.12 Datentabelle zu Abbildung 40: Mittlere Interleukin 1 α -Konzentrationsquotienten der Expositionsvariablen nach dem Modell der Varianzanalyse. Aufgetragen sind die kleinsten quadratischen Mittelwert-Schätzer mit der 1 σ Standardabweichung, angegeben ist ferner die Fallzahl der jeweiligen Expositionsvariablen.

Fallgruppe Expositionsvariable (Versuchszahl)	kleinster quadratischer Mittelwert- Schätzer [pg/ml]	Standard- abw. 1 σ [pg/ml]
Kontrolle		
Umwelt T/m-X (n=5)	0,032	0,092
1 MAK T (n=2)	0,260	0,163
synth. Luft (n=3)	0,529	0,187
atop. Ekzem läSIONAL		
Umwelt T/m-X (n=4)	0,458	0,035
synth. Luft (n=4)	0,950	0,078
atop. Ekzem nicht läSIONAL		
Umwelt T/m-X (n=8)	0,467	0,082
3 MAK T (n=1)	0,223	0,081
1 MAK m-X (n=6)	0,351	0,116
synth. Luft (n=3)	0,223	0,081

A3.13 Datentabelle zu Abbildung 41: Mittlere Interleukin 6-Konzentrationsquotienten der Expositionsvariablen nach dem Modell der Varianzanalyse. Aufgetragen sind die kleinsten quadratischen Mittelwert-Schätzer mit der 1σ Standardabweichung, angegeben ist ferner die Fallzahl der jeweiligen Expositionsvariablen.

Fallgruppe Expositionsvariable (Versuchszahl)	kleinster quadratischer Mittelwert- Schätzer [pg/ml]	Standard- abw. 1σ [pg/ml]
Kontrolle		
Umwelt T/m-X (n=1)	0,951	0,462
3 MAK T (n=1)	0,951	0,462
synth. Luft (n=2)	0,951	0,462
Inkubator (n=6)	0,951	0,462
atop. Ekzem läSIONAL		
Umwelt T/m-X (n=1)	0,918	0,066
3 MAK T (n=2)	1,549	0,134
1 MAK m-X (n=2)	0,918	0,066
synth. Luft (n=1)	0,077	0,170
Inkubator (n=2)	1,128	0,178
atop. Ekzem nicht läSIONAL		
Umwelt T/m-X (n=1)	0,753	0,190
3 MAK T (n=6)	1,212	0,209
1 MAK T (n=4)	0,722	0,832
1 MAK m-X (n=2)	0,753	0,190
synth. Luft (n=7)	0,929	0,218
Inkubator (n=3)	0,151	0,400

A3.14 Datentabelle zu Abbildung 48: Vergleich der Fallzahlen von erhöhten (+) bzw. reduzierten (-) sowie unveränderten (=) GM-CSF-Konzentrationsverhältnissen nach Kurzzeit (KZ)- und Langzeitexpositionen (LZ) pro Expositionsvariable und Fallgruppe. Die Balkenhöhe beschreibt den relativen Anteil in [%], am Balkenkopf ist die absolute Fallzahl n aufgetragen.

GMCSF Expositions- variablen	Kurzzeitexposition						Langzeitexposition					
	Anzahl "="		Anzahl "+"		Anzahl "-"		Anzahl "="		Anzahl "+"		Anzahl "-"	
	n	%	n	%	n	%	n	%	n	%	n	%
gesund												
gesamt	11	=	47	+	20	-	16	=	38	+	36	-
Umw. T/m-X	1	5,6	15	83,3	2	11,1	1	6,3	11	68,8	4	25,0
3 MAK T	4	20,0	14	70,0	2	10,0	4	17,4	17	73,9	2	8,7
1 MAK T	1	6,3	7	43,8	8	50,0	1	6,3	3	18,8	12	75,0
1 MAK m-X	5	31,3	7	43,8	4	25,0	7	28,0	1	4,0	17	68,0
synth. Luft	0	0,0	2	50,0	2	50,0	1	25,0	2	50,0	1	25,0
Inkubator	0	0,0	2	50,0	2	50,0	2	33,3	4	66,7	0	0,0
läsional												
gesamt	9	=	41	+	13	-	6	=	19	+	45	-
Umw. T/m-X	3	30,0	1	10,0	6	60,0	1	5,6	2	11,1	15	83,3
3 MAK T	0	0,0	13	92,9	1	7,1	0	0,0	6	37,5	10	62,5
1 MAK T	0	0,0	15	88,2	2	11,8	3	16,7	7	38,9	8	44,4
1 MAK m-X	4	33,3	6	50,0	2	16,7	0	0,0	2	16,7	10	83,3
synth. Luft	2	50,0	0	0,0	2	50,0	2	50,0	0	0,0	2	50,0
Inkubator	0	0,0	6	100,0	0	0,0	0	0,0	2	100,0	0	0,0
nicht läsional												
gesamt	9	=	38	+	38	-	16	=	22	+	57	-
Umw. T/m-X	0	0,0	4	20,0	16	80,0	5	13,2	7	18,4	26	68,4
3 MAK T	1	4,3	19	82,6	3	13,0	1	5,9	6	35,3	10	58,8
1 MAK T	1	6,3	5	31,3	10	62,5	4	30,8	6	46,2	3	23,1
1 MAK m-X	7	38,9	6	33,3	5	27,8	6	30,0	3	15,0	11	55,0
synth. Luft	0	0,0	0	0,0	4	100,0	0	0,0	0	0,0	4	100,0
Inkubator	0	0,0	4	100,0	0	0,0	0	0,0	0	0,0	3	100,0

A3.15 Datentabelle zu Abbildung 49: Vergleich der Fallzahlen von erhöhten (+) bzw. reduzierten (-) sowie unveränderten (=) IL-1 α -Konzentrationsverhältnissen nach Kurzzeit (KZ)- und Langzeitexpositionen (LZ) pro Expositionsvariable und Fallgruppe. Die Balkenhöhe beschreibt den relativen Anteil in [%], am Balkenkopf ist die absolute Fallzahl n aufgetragen.

IL-1 α Expositions- variablen	Kurzzeitexposition						Langzeitexposition					
	Anzahl "="		Anzahl "+"		Anzahl "-"		Anzahl "="		Anzahl "+"		Anzahl "-"	
	n	%	n	%	n	%	n	%	n	%	n	%
gesund												
gesamt	12	=	5	+	62	-	5	=	12	+	80	-
Umw. T/m-X	7	38,9	1	5,6	10	55,6	0	0,0	7	43,8	9	56,3
3 MAK T	3	14,3	1	4,8	17	81,0	3	9,7	1	3,2	27	87,1
1 MAK T	0	0,0	1	6,3	15	93,8	0	0,0	2	12,5	14	87,5
1 MAK m-X	2	12,5	0	0,0	14	87,5	2	8,3	2	8,3	20	83,3
synth. Luft	0	0,0	2	50,0	2	50,0	0	0,0	0	0,0	4	100,0
Inkubator	0	0,0	0	0,0	4	100,0	0	0,0	0	0,0	6	100,0
läsional												
gesamt	13	=	8	+	38	-	8	=	3	+	61	-
Umw. T/m-X	0	0,0	0	0,0	10	100,0	0	0,0	0	0,0	18	100,0
3 MAK T	3	21,4	2	14,3	9	64,3	4	22,2	1	5,6	13	72,2
1 MAK T	6	40,0	3	20,0	6	40,0	4	22,2	1	5,6	13	72,2
1 MAK m-X	3	25,0	0	0,0	9	75,0	0	0,0	0	0,0	12	100,0
synth. Luft	0	0,0	0	0,0	4	100,0	0	0,0	1	25,0	3	75,0
Inkubator	1	25,0	3	75,0	0	0,0	0	0,0	0	0,0	2	100,0
nicht läsional												
gesamt	8	=	5	+	72	-	7	=	6	+	86	-
Umw. T/m-X	0	0,0	0	0,0	20	100,0	0	0,0	2	5,3	36	94,7
3 MAK T	5	22,7	0	0,0	17	77,3	3	15,0	1	5,0	16	80,0
1 MAK T	0	0,0	0	0,0	16	100,0	4	28,6	3	21,4	7	50,0
1 MAK m-X	3	15,8	5	26,3	11	57,9	0	0,0	0	0,0	20	100,0
synth. Luft	0	0,0	0	0,0	4	100,0	0	0,0	0	0,0	4	100,0
Inkubator	0	0,0	0	0,0	4	100,0	0	0,0	0	0,0	3	100,0

A3.16 Datentabelle zu Abbildung 50: Vergleich der Fallzahlen von erhöhten (+) bzw. reduzierten (-) sowie unveränderten (=) IL-6-Konzentrationsverhältnissen nach Kurzzeit (KZ)- und Langzeitexpositionen (LZ) pro Expositionsvariable und Fallgruppe. Die Balkenhöhe beschreibt den relativen Anteil in [%], am Balkenkopf ist die absolute Fallzahl n aufgetragen.

IL-6 Expositions- variablen	Kurzzeitexposition						Langzeitexposition					
	Anzahl "="		Anzahl "+"		Anzahl "-"		Anzahl "="		Anzahl "+"		Anzahl "-"	
	n	%	n	%	n	%	n	%	n	%	n	%
gesund												
gesamt	58	=	16	+	5	-	54	=	17	+	30	-
Umw. T/m-X	15	83,3	3	16,7	0	0,0	7	43,8	3	18,8	6	37,5
3 MAK T	12	57,1	8	38,1	1	4,8	25	75,8	6	18,2	2	6,1
1 MAK T	14	87,5	0	0,0	2	12,5	5	31,3	0	0,0	11	68,8
1 MAK m-X	12	75,0	2	12,5	2	12,5	17	65,4	4	15,4	5	19,2
synth. Luft	1	25,0	3	75,0	0	0,0	0	0,0	2	50,0	2	50,0
Inkubator	4	100,0	0	0,0	0	0,0	0	0,0	2	33,3	4	66,7
läsional												
gesamt	30	=	23	+	9	-	20	=	3	+	47	-
Umw. T/m-X	6	60,0	0	0,0	4	40,0	4	22,2	0	0,0	14	77,8
3 MAK T	6	42,9	7	50,0	1	7,1	4	23,5	0	0,0	13	76,5
1 MAK T	7	43,8	7	43,8	2	12,5	8	44,4	2	11,1	8	44,4
1 MAK m-X	8	66,7	4	33,3	0	0,0	3	25,0	0	0,0	9	75,0
synth. Luft	1	25,0	1	25,0	2	50,0	1	33,3	0	0,0	2	66,7
Inkubator	2	33,3	4	66,7	0	0,0	0	0,0	1	50,0	1	50,0
nicht läsional												
gesamt	30	=	25	+	34	-	51	=	8	+	40	-
Umw. T/m-X	9	45,0	1	5,0	10	50,0	22	57,9	3	7,9	13	34,2
3 MAK T	12	48,0	7	28,0	6	24,0	12	60,0	0	0,0	8	40,0
1 MAK T	4	22,2	2	11,1	12	66,7	8	57,1	2	14,3	4	28,6
1 MAK m-X	3	16,7	11	61,1	4	22,2	9	45,0	2	10,0	9	45,0
synth. Luft	0	0,0	2	50,0	2	50,0	0	0,0	1	25,0	3	75,0
Inkubator	2	50,0	2	50,0	0	0,0	0	0,0	0	0,0	3	100,0

A 4 Danksagung

All jenen, die mich bei der Entstehung dieser Dissertation durch ihre Diskussionsbereitschaft, tatkräftige Hilfe und freundschaftlichen Aufmunterungen unterstützt haben, danke ich hier von Herzen!

Dabei danke ich besonders:

- ◆ Herrn Prof. Dr. Erich F. Elstner für die Übernahme des Referats, aber vor allem für seine offene Unterstützung und Hilfe.
- ◆ Frau Prof. Dr. Heidrun Behrendt und Herrn Prof. Dr. Dr. Johannes Ring für die Aufnahme in die Klinische Kooperationsgruppe Umweltdermatologie und Allergologie sowie für das Überlassen und die Betreuung dieses interessanten und spannenden Themas.
- ◆ der Wissenschaftlich-Technischen Abteilung und der Personalabteilung der GSF, hier insbesondere Frau Dr. Angelika Hartmann für ihre persönliche Unterstützung.
- ◆ allen Mitarbeitern der KKG, hier besonders meinen Mitstreitern in der GSF für ihre Hilfsbereitschaft und die nette, gut gelaunte Arbeitsatmosphäre.
- ◆ Dr. Uwe Risse für viel Rat und Tat bei der Entwicklung der Expositionsapparatur, die Einführung in die Schadstoffanalytik und vor allem seine große Diskussionsbereitschaft!
- ◆ Dr. Wanda Sliva-Tomczok, Dr. Janusz Tomczok und Ina Dosch für ihre Hilfe bezüglich methodischer Instruktionen und elektronenmikroskopischer Aufnahmen.
- ◆ allen freiwilligen Probanden, ohne deren Mitwirken diese Arbeit nicht möglich gewesen wäre!
- ◆ den OP-Schwestern sowie den Ärzten der Klinik und Poliklinik für Dermatologie und Allergologie der TUM am Biederstein für ihre Unterstützung bei der Akquirierung und Probenahme der Hautbiopsate.
- ◆ Frau Dr. Christine Hohenadl aus dem Institut für Molekulare Virologie der GSF für das zur Verfügung stellen der NHEK-Keratinozytenzelllinie.
- ◆ dem Institut für Pathologie der GSF dafür, dass ich ihre Geräte zur Herstellung histologischer Paraffinpräparate benutzen durfte.
- ◆ der Abteilung für Histologie der Klinik und Poliklinik für Dermatologie und Allergologie der TUM am Biederstein für die Herstellung weiterer histologischer Paraffinpräparate.
- ◆ Herrn Günther Goddeng von der Photostelle der GSF für seine hilfreichen Tipps zur photographischen Ergebnisdokumentation.
- ◆ Herrn Dr. Gerhard Welzl und Frau Theresa Faus-Keßler sowie Herrn Dr. Hagen Scherb vom Institut für Biomathematik und Biostatistik der GSF für ihre ausführliche Beratung, Hilfe und Mühe bei der statistischen Datenauswertung. Unsere „Werkstatt der Wissenschaft“ hat wahres Interesse und Spaß an der Biostatistik in mir geweckt, Danke dafür!
- ◆ nicht zuletzt meinen unverdrossenen Korrekturlesern dieser Arbeit: Dr. Clemens Herrmann, Sabine Jyrch und Dr. Andreas Krins. Eure Hilfe und Kritik, vor allem Eure Geduld und Freundschaft waren Gold wert!
- ◆ Mein ganz besonderer Dank gilt meinen Eltern, die mich während meiner gesamten Ausbildung in jeglicher Hinsicht großartig unterstützt haben, für Ihre Freundschaft und dass sie mir diesen Weg ermöglichten.

A 5 Erklärung

Ich erkläre an Eides statt, dass ich die der Fakultät Wissenschaftszentrum Weihenstephan für Ernährung, Landnutzung und Umwelt der Technischen Universität München zur Promotionsprüfung vorgelegte Arbeit mit dem Titel:

„Methoden- und Geräteentwicklung zur *in vitro* Exposition humaner Keratinozyten aus atopischem Ekzem gegenüber Schadstoffen in der Gasphase“

in der Klinischen Kooperationsgruppe Umweltdermatologie und Allergologie GSF/TUM, GSF-Forschungszentrum für Umwelt und Gesundheit, Neuherberg unter der Anleitung und Betreuung durch Herrn Prof. Dr. rer. nat. Erich F. Elstner und Frau Prof. Dr. med. Heidrun Behrendt ohne sonstige Hilfe erstellt und bei der Abfassung nur die gemäß § 4 Absatz 5 angegebenen Hilfsmittel benutzt habe.

Ich habe die Dissertation in keinem anderen Prüfungsverfahren als Prüfungsleistung vorgelegt.

Ich habe den angestrebten Doktorgrad noch nicht erworben und ich bin nicht in einem früheren Promotionsverfahren für den angestrebten Doktorgrad endgültig gescheitert.

Die Promotionsordnung der Technischen Universität München ist mir bekannt.

München, den 01.08.2000

Caren Vollmert

A 6 Lebenslauf

Name:	Caren Vollmert
geboren:	21.09.1970 in Hamburg, Deutschland
Schulbildung:	
1977-1981	Wolfgang-Borchert-Schule, Hamburg
1981-1990	Humanistisches Wilhelm-Gymnasium, Hamburg (Abitur)
Hochschulbildung:	
10. 1990 - 09. 1996	Studium der Biologie (Diplom), Universität Hamburg
1994	Diplomvorprüfung in den Fächern Botanik, Zoologie, Chemie und Physik
1995	Wissenschaftlicher Mitarbeiter als Student am Institut für Biochemie und Lebensmittelchemie, Abteilung Biochemie und Molekularbiologie, Universität Hamburg Projektstudie zur „Charakterisierung der direkten IgM-vermittelten Zytolyse humaner Neuroblastomzellen -- Apoptose oder Nekrose?“
10. 1995	Diplomhauptprüfungen mit den Schwerpunkten Biochemie, Genetik und Molekularbiologie, Hydrobiologie und Fischereiwissenschaften
11. 1995 - 09. 1996	Wissenschaftlicher Mitarbeiter als Diplomand am Institut für Biochemie und Lebensmittelchemie, Abteilung Biochemie und Molekularbiologie, Universität Hamburg Diplomarbeit zur „Analyse und Charakterisierung der Signaltransduktion IgM-vermittelter Apoptose an humanen Neuroblastomzellen <i>in vivo</i> und <i>in vitro</i> .“
Berufliche Tätigkeit:	
12. 1996 - 12. 2000	Wissenschaftlicher Mitarbeiter als Doktorand in der Klinischen Kooperationsgruppe Umweltdermatologie und Allergologie, GSF/TUM des GSF-Forschungszentrums für Umwelt und Gesundheit, Neuherberg
seit 02. 2001	Wissenschaftlicher Mitarbeiter im Institut für Epidemiologie, Arbeitsgruppe Molekulare Epidemiologie/Bioprobe in der Genetischen Epidemiologie, des GSF-Forschungszentrums für Umwelt und Gesundheit, Neuherberg

A 7 Publikationsverzeichnis

Originalarbeiten:

David K., Ollert M.W., Juhl H., Vollmert C., Erttmann R., Vogel C.W., Bredehorst R. (1996). Growth arrest of large solid human neuroblastoma xenografts in nude rats by natural IgM from healthy humans. *Nature Medicine* 2 (6), 686-689.

Vollmert C. (1996). Analyse und Charakterisierung der Signaltransduktion IgM-vermittelter Apoptose an humanen Neuroblastomzellen *in vivo* und *in vitro*. Diplomarbeit, Institut für Biochemie und Lebensmittelchemie, Abteilung Biochemie und Molekularbiologie, Universität Hamburg.

Ollert M.W., David K., Vollmert C., Juhl H., Erttmann R., Bredehorst R., Vogel C.W. (1997). Mechanisms of *in vivo* antineuroblastoma activity of human natural IgM. *European Journal of Cancer* 33 (12), 1942-1948.

David K., Ollert M.W., Vollmert C., Erttmann R., Bredehorst R., Vogel C.W. (1999). Human natural immunoglobulin M antibodies induce apoptosis of human neuroblastoma cells via binding to a M_r 260 antigen. *Cancer Research* 59 (15), 3768-3775.

Zwaka T.P., Torzewski J., Rothenbacher D., Froehlich M., Illig T., Vollmert C., Löwel H., Hombach V., Koenig W. (2002). Homozygous 494A-Allele of *FCGR2A* may protect from coronary heart disease. *Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology*. (subm.)

Vollmert C., Illig T., Altmüller J., Klugbauer S., Loesgen S., Wjst M. (2002). Single nucleotide polymorphism screening and association analysis – Exclusion of *ITGB7* and *VDR* (Chromosome 12q) as candidate genes for asthma. *Journal of Allergy and Clinical Immunology* (subm.)

Präsentationen und publizierte Abstracts:

Vorträge:

Ollert M.W., David K., Vollmert C., Bredehorst R., Vogel C.W. (1996). Human natural IgM antibodies induce apoptosis of human neuroblastoma cells both *in vivo* and *in vitro*. 21. Jahrestagung der Deutschen Gesellschaft für Zellbiologie (DGZ), Hamburg, März 1996. *European Journal of Cell Biology* 69, Suppl.42, 1996.

Ollert M.W., David K., Vollmert C., Juhl H., Erttmann R., Bredehorst R., Vogel C.W. (1996). *In vivo* anti-neuroblastoma activity of human natural IgM is mediated by induction of apoptosis and type III inflammatory reaction. *Advances in Neuroblastoma Research -1996*, Philadelphia, Mai 1996.

David K., Ollert M.W., Vollmert C., Erttmann R., Vogel C.W., Bredehorst R. (1996). Human natural IgM antibodies mediate anti-neuroblastoma activity by complement activation and induction of apoptosis *in vitro* and *in vivo*. IX. Jahrestagung der Kind-Philipp-Stiftung für Leukämieforschung, Wilsede, Juni 1996. *Klinische Pädiatrie* 208, 259, 1996.

Vollmert C. (1996). Analyse und Charakterisierung der Signaltransduktion IgM-vermittelter Apoptose an humanen Neuroblastomzellen *in vivo* und *in vitro*. *Wissenschaftskolloquium* Institut für Biochemie und Lebensmittelchemie, Universität Hamburg, September 1996.

Vollmert C. (1997). Einführung in die Mechanismen und die Signaltransduktion der Apoptose am Beispiel des durch natürliche Antikörper induzierten Zelltodes im humanen Neuroblastom. *Lungen-, -Zellbiologie & -Immunologie (LUZI)*, GSF-Forschungszentrum für Umwelt und Gesundheit, Neuherberg, August 1997.

Vollmert C., Risse U., Behrendt H. (2000). Expositionsapparatur für umweltrelevante Gase in Zellkultursystemen. *Doktorandenkolloquium, 40 Jahre GSF-Forschungszentrum für Umwelt und Gesundheit*, Neuherberg, Juli 2000.

Vollmert C., Holle R. (2002). Molekularbiologische Untersuchungen zum Einfluß der Cysteinprotease Calpain-10 auf gestörte Glukoseintoleranz (IGT), Diabetes und diabetische Nephropathie. *Vortragsreihe Methoden und Ergebnisse bevölkerungsbezogener Gesundheitsforschung*. GSF-Forschungszentrum für Umwelt und Gesundheit, Neuherberg, Juni 2002.

Poster:

Ollert M.W., David K., Vollmert C., Bredehorst R., Vogel C.W. (1996). Human natural IgM antibodies induce apoptosis of human neuroblastoma cells both *in vivo* and *in vitro*. *21. Jahrestagung der Deutschen Gesellschaft für Zellbiologie (DGZ)*, Hamburg, März 1996.

David K., Ollert M.W., Juhl H., Vollmert C., Erttmann R., Bredehorst R., Vogel C.W. (1996). Growth arrest of large solid human neuroblastoma xenografts in nude rats by natural IgM from healthy humans. *Annual Meeting 1996 - American Association for Cancer Research (AACR)*, Washington, April 1996.

David K., Ollert M.W., Vollmert C., Erttmann R., Bredehorst R., Vogel C.W. (1997). CD95-independent apoptosis mediated by natural human anti-neuroblastoma antibodies. *28. Jahrestagung der Deutschen Gesellschaft für Immunologie*, Universität Würzburg, September 1997.

David K., Ollert M.W., Vollmert C., Bredehorst R., Vogel C.W. (1997). Human natural IgM antibodies induce apoptosis of human neuroblastoma cells both *in vivo* and *in vitro*. *Biomedicine`97*, Washington, DC, April 1997.

Vollmert C., Risse U., Behrendt H. (1999). Expositionsapparatur für umweltrelevante Gase in Zellkultursystemen. *Eröffnungssymposium Zentrum für Allergie und Umwelt München, ZAUM*, München, Dezember 1999.

Vollmert C., Behrendt H. (1999). *In vitro* Hautorganoid: ein dreidimensionales, humanes Zellkultursystem. *Eröffnungssymposium Zentrum für Allergie und Umwelt München, ZAUM*, München, Dezember 1999.

Vollmert C., Risse U., Behrendt H. (2000). Expositionsapparatur für umweltrelevante Gase in Zellkultursystemen. *Doktorandenkolloquium, 40 Jahre GSF-Forschungszentrum für Umwelt und Gesundheit*, Neuherberg, Juli 2000.

Vollmert C., Behrendt H. (2000). *In vitro* Hautorganoid: ein dreidimensionales, humanes ZellKokultursystem. *Doktorandenkolloquium, 40 Jahre GSF-Forschungszentrum für Umwelt und Gesundheit*, Neuherberg, Juli 2000.

Vollmert C., Illig T., Altmüller J., Klugbauer S., Loesgen S., Wjst M. (2002). Single nucleotide polymorphism detection and association results - exclusion of *ITGβ7* and *VDR* (chromosome 12q) as candidate genes for asthma. *European Human Genetics Conference, European Society of Human Genetics (ESHG)*, Straßburg, Mai 2002. *European Journal of Human Genetics* 10, Suppl.1, 2002.

Vollmert C., Stubanus M., Holle R., Schöpfer A., Böger C., Haak T., Kolz M., Wichmann H.-E., Illig T., Krämer B.K. (2002). High throughput genotyping of single nucleotide polymorphisms (SNPs) in the human gene encoding Calpain-10 (*CAPN10*): No associations with type 2 diabetes mellitus and diabetic nephropathy in a German case-control approach. *Nationales Genom-Forschungsnetz (NGFN)-Konferenz: Genomics of Chronic Inflammatory Disorders*, Kiel, Juli 2002.

Illig T.* , Vollmert C.* , Altmüller J., Klugbauer S., Loesgen S., Wjst M. (2002). Asthma and the chromosome 12 genes *ITGβ7* and *VDR*: No evidence of association by single nucleotide polymorphism screening and detection in a Caucasian family study. *Nationales Genom-Forschungsnetz (NGFN)-Konferenz: Genomics of Chronic Inflammatory Disorders*, Kiel, Juli 2002. *contributed equally

Kolz M., Schöpfer A., Vollmert C., Loesgen S., Rathmann W., Wichmann H.-E., Illig T. (2002). Analysis of SNPs in type 2 diabetes candidate genes. *Nationales Genom-Forschungsnetz (NGFN)-Konferenz: Genomics of Chronic Inflammatory Disorders*, Kiel, Juli 2002.

Illig T., Klopp N., Vollmert C., Schöpfer A., Holle R., Wichmann H.-E. (2002). The KORA cohort as control population for genetic studies in the NGFN. *Nationales Genom-Forschungsnetz (NGFN)-Konferenz: Genomics of Chronic Inflammatory Disorders*, Kiel, Juli 2002.

Illig T.* , Vollmert C.* , Stubanus M.* , Holle R., Schöpfer A., Böger C., Haak T., Kolz M., Wichmann H.-E., Krämer B.K. (2002). Lack of association between common variants (SNPs) in the human gene encoding Calpain-10 (*CAPN10*) and diabetic nephropathy in a German case-control study. *Conference of Genetics, Genetic Variation in Man and Functional Implications, Gesellschaft für Genetik (GfG)*, Weimar, September, 2002. *contributed equally (acc.)

Illig T., Schöpfer A., Kolz M., Vollmert C., Holle R., Kolb H., Wichmann H.-E. (2002). Lack of genetic association between genes involved in the inflammatory process and type 2 diabetes or impaired glucose tolerance. *Human Origins & Disease*, Cold Spring Harbor, USA, October 2002. (acc.)

