

Aus der Abteilung für Laboratoriumsmedizin und Pathobiochemie,  
Molekulare Diagnostik  
Universitätsklinikum Marburg und Gießen  
Fachbereich Humanmedizin der Philipps-Universität in Marburg  
Geschäftsführender Direktor: Prof. Dr. med. Harald Renz

## **Dissertation**

### **Vergleich der Wirkung der Weichmacher DEHP, DINP und DINCH auf die Lungenfunktion im Mausmodell**

**Zur Erlangung des Doktorgrades der Humanmedizin  
(Dr. med.)**

Vorgelegt dem Fachbereich Humanmedizin  
der Philipps-Universität

von

**Katrin Andersch  
aus Warstein**

**Kirchhain 2022**

**Angenommen vom Fachbereich Medizin der Philipps-Universität Marburg  
am: 25.05.2022**

**Gedruckt mit Genehmigung des Fachbereichs Medizin**

**Dekanin: Prof. Dr. Denise Hilfiker-Kleiner**

**Referent: PD Dr. Dr. Hans-Günther Wahl**

**1. Korreferent: Prof. Dr. Dominik Oliver**

# Inhaltsverzeichnis

INHALTSVERZEICHNIS .....	- 3 -
ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS.....	- 5 -
ABBILDUNGSVERZEICHNIS .....	- 7 -
<b>1 EINLEITUNG .....</b>	<b>- 8 -</b>
1.1 KUNSTSTOFFE UND WEICHMACHER .....	- 8 -
1.1.1 Phthalate in Polyvinylchlorid (PVC).....	- 9 -
1.1.2 1,2-Cyclohexandicarbonsäurediisonylester (DINCH) .....	- 16 -
1.2 ERKRANKUNGEN MIT MÖGLICHEM ZUSAMMENHANG MIT PHTHALATEN.....	- 20 -
1.2.1 Immunologische Veränderungen.....	- 21 -
1.2.2 Asthma bronchiale.....	- 25 -
1.2.3 Allergische Reaktion .....	- 28 -
1.2.4 Pseudoallergie .....	- 30 -
1.2.5 Phthalate als inhalative Noxen .....	- 31 -
1.3 FRAGESTELLUNG .....	- 33 -
<b>2 MATERIAL UND METHODEN .....</b>	<b>- 34 -</b>
2.1 VERSUCHSTIERE UND VERSUCHSTIERHALTUNG .....	- 34 -
2.2 INDUKTION EINER ATEMWEGSREAKTION DURCH LANGZEITEXPOSITION MIT DEHP, DINP, DINCH UND PBS...-	- 34 -
2.3 LUNGENFUNKTIONSMESSUNG.....	- 35 -
2.4 GEWINNUNG VON PROBENMATERIAL.....	- 37 -
2.4.1 Gewinnung von Serumproben .....	- 37 -
2.4.2 Bronchoalveoläre Lavage .....	- 37 -
2.5 ZELLZÄHLUNG UND DIFFERENZIERUNG VON LEUKOZYTENPOPULATIONEN DER BAL .....	- 38 -
2.6 LUNGENHISTOLOGIE .....	- 38 -
2.6.1 HE Färbung .....	- 38 -
2.6.2 PAS Färbung.....	- 39 -
2.7 KONZENTRATIONSBESTIMMUNG VON IMMUNGLOBULINEN MITTELS ENZYME-LINKED-IMMUNO-SORBENT-ASSAY (ELISA).....	- 39 -
2.8 BESTIMMUNG VON LEUKOTRIEN B4 AUS SERUM MITTELS ENZYM-IMMUNO-ASSAY (EIA) .....	- 40 -
2.9 STATISTISCHE METHODEN.....	- 40 -
2.9.1 Einfaktorielle Varianzanalyse und ANOVA.....	- 41 -
2.9.2 T-Test.....	- 41 -
2.9.3 Bonferroni-Korrektur .....	- 42 -
<b>3 ERGEBNISSE.....</b>	<b>- 42 -</b>
3.1 ERGEBNISSE DER LUNGENFUNKTIONSMESSUNG.....	- 42 -
3.2 SERUMPROBEN .....	- 43 -
3.2.1 IgE-gesamt.....	- 44 -
3.2.2 Leukotrien B4 (LT-B4).....	- 45 -
3.2.3 Nerve Growth Factor (NGF) .....	- 47 -
3.3 PROBEN DER BRONCHOALVEOLÄREN LAVAGE.....	- 48 -
3.3.1 Interleukin-4 (IL-4) .....	- 48 -
3.3.2 Interleukin-5 (IL-5) .....	- 50 -
3.3.3 Interleukin-10 (IL-10) .....	- 51 -
3.3.4 Interferon- $\gamma$ (IFN- $\gamma$ ) .....	- 52 -
3.4 ERGEBNISSE DER ZELLZÄHLUNG, BRONCHOALVEOLÄRE LAVAGE.....	- 55 -
3.5 ERGEBNISSE DER LUNGENHISTOLOGIE.....	- 56 -
<b>4 DISKUSSION.....</b>	<b>- 57 -</b>
<b>5 ZUSAMMENFASSUNG.....</b>	<b>- 65 -</b>
<b>7 LITERATURVERZEICHNIS .....</b>	<b>- 68 -</b>
<b>8 ANHANG.....</b>	<b>- 78 -</b>

8.1	LEBENS LAUF.....	<b>FEHLER! TEXTMARKE NICHT DEFINIERT.</b>
8.2	AKADEMISCHE LEHRER .....	- 79 -
8.3	DANKSAGUNG .....	- 80 -
8.4	EHRENWÖRTLICHE ERKLÄRUNG.....	- 81 -

## **Abkürzungsverzeichnis**

BAL	Bronchoalveoläre Lavage
BALB/c	Albino-Laborstamm der Hausmaus
BfR	Bundesinstitut für Risikobewertung
Cx-MINCH	Cyclohexan-1,2-dicarboxylat-mono(7-coarboxylat-4methyl)-heptylester
DEHP	Di(2- Ethylhexyl)phthalat
DINCH	1,2-Cyclohexandicarbonsäurediisonylester
DINP	Di-isononyl-phthalat
EFSA	Europäische Behörde für Lebensmittelsicherheit
ELISA	Enzyme-linked-Immuno-Sorbent-Assay
EPA	Enviromental Protection Agency
HBM I	Human Biomonitoring I; Menge an Stoff, die tolerabel ist
HBM II	Human Biomonitoring II; Menge an Stoff, die gerade noch tolerabel ist
HE	Hämatoxilin- und Eosinfärbung
IFN- $\gamma$	Interferon- $\gamma$
Ig	Immunglobulin
IL	Interleukin
LD50	Letale Dosis
LTB4	Leukotrien B4
MCh	Metacholin
MEHP	Mono(2-ethylhexyl)phthalat
MINCH	Cyclohexan-1,2-dicarboxylate-mono-4-methylocytester
NGF	Nerve Growth Factor
NK-Zellen	Natürliche Killerzellen
NOAEL	No Observed Adverse Effects Level
OH-MINCH	Cyclohexan-1,2dicarboxylat-mono-(7-hydroxy-4-methyl)-octylester
oxo-MINCH	Cyclohexan-1,2-dicarboxylat-mono(oxo-isononyl)-ester
PAS	Perjodsäure-Schiff-Reaktion
PBT-Stoff	persistenter, bioakkumulativer, toxischer Stoff
REACH	Registration, Evaluation, Authorisation and Restriction of Chemicals

TDI Tolerable Daily Intake  
vPvB-Stoff persistenter, bioakkumulativer Stoff

## **Abbildungsverzeichnis**

Abb. 1	Struktur des Phthalats DEHP .....	- 10 -
Abb. 2	Struktur des Phthalats DINP (Alkoholkomponente ist ein Gemisch aus C9-Isomeren).....	- 15 -
Abb. 3	1,2-Cyclohexandicarbonsäurediisonylester (DINCH) .....	- 16 -
Abb. 4	Schema Allergie und Pseudoallergie.....	- 30 -
Abb. 5	Schäden durch inhalative Noxen am Respirationstrakt .....	- 32 -
Abb. 6	Zeitplan des Versuchs .....	- 34 -
Abb. 7	Schema Expositionskammer .....	- 37 -
Abb. 8	Ergebnisse Atemwegshyperreagibilität unter Metacholininhalation.....	- 43 -
Abb. 9	Ergebnisse IgE-Gesamt, Serumproben.....	- 45 -
Abb. 10	Ergebnisse der Serumproben, LTB4 .....	- 46 -
Abb. 11	Ergebnisse NGF-Gruppe, Serumproben .....	- 48 -
Abb. 12	Ergebnisse der BAL-Proben, Interleukin-4 .....	- 49 -
Abb. 13	Ergebnisse der BAL-Proben, Interleukin-5 .....	- 51 -
Abb. 14	Ergebnisse der BAL-Proben, Interleukin-10 .....	- 52 -
Abb. 15	Ergebnisse der BAL-Proben, Interferon- $\gamma$ .....	- 54 -
Abb. 16	Zellzahlen, Bronchoalveoläre Lavage.....	- 55 -
Abb. 17	Lungenhistologie, HE .....	- 56 -
Abb. 18	Lungenhistologie, PAS .....	- 56 -

# 1 Einleitung

## 1.1 *Kunststoffe und Weichmacher*

Weichmacher werden als patentierte Stoffe seit Ende des vorletzten Jahrhunderts als Zusatz zu Substanzen gemischt, um deren Stabilität und Weichheit zu erhöhen und um diese Substanzen besser verarbeiten zu können, oder damit sie bestimmte Gebrauchseigenschaften erlangen.

In der heutigen Zeit sind Weichmacher in vielen Gegenständen des Alltags wie in Kunststoffen, Lacken, Bodenbelägen, Klebstoffen, Kinderspielzeugen, und Medizinprodukten zu finden. Auch die Textilindustrie verwendet Weichmacher, um Stoffe geschmeidiger zu machen oder deren taktile Eigenschaften zu verbessern.

Es wurden bereits über 30.000 Stoffe auf ihre Eignung als Weichmacher untersucht, davon werden momentan über 50 kommerziell genutzt [33], darunter sind Substanzen wie Weichharze, Campher, Rizinusöl oder Zitate. Unter all diesen verschiedenen Stoffen überwiegen mengenmäßig Phthalsäureester mit ihren Hauptvertretern DEHP und DINP. In den letzten Jahren wurde viel über die Verträglichkeit dieser Weichmacher beim Menschen berichtet. Mit zunehmender Produktionsmenge mehrten sich auch die Negativschlagzeilen zu diesen Substanzen (s.u.). Daher entwickelte die Industrie neuere Verbindungen wie

1, 2 - Cyclohexandicarbonsäurediisonylester (DINCH), das chemisch der Gruppe der Cyclohexandicarbonsäureester zugeordnet wird.

Aufgrund des breiten Vorkommens und der Tatsache, dass sich die Weichmacher aus den Materialien, denen sie zugesetzt sind, lösen können, sind sie mittlerweile ubiquitär vorhanden und bereits in Nabelschnurblut nachzuweisen [62].

Die Belastung der Luft mit Weichmachern ist in geschlossenen Räumen, in denen mit Weichmachern versetzte Materialien verbaut wurden, wesentlich höher als in der freien Umweltluft [65] [121] [29].

Auch in Lebensmitteln sind Weichmacher zu finden, sie gelten sogar als größere Belastungsquelle als die der Luft [29] [40], sie treten zum Beispiel aus

Verpackungsfolien aus und vor allem in sehr fetten Lebensmitteln findet man relativ hohe Dosen der Substanzen [86] [87] [119]. Bei kleinen Kindern kommt noch die Belastung durch Kauen an Kunststoffspielzeug hinzu [23].

Mittlerweile ist im Grunde jeder Mensch täglich Weichmachern ausgesetzt, kommt mit ihnen in Berührung und inkorporiert sie. Dies ist auf verschiedene Weise möglich. Sie können mit der Nahrung aufgenommen werden, als kurzkettige Phthalester transdermal absorbiert und vor allem auch inhaliert werden [123].

### **1.1.1 Phthalate in Polyvinylchlorid (PVC)**

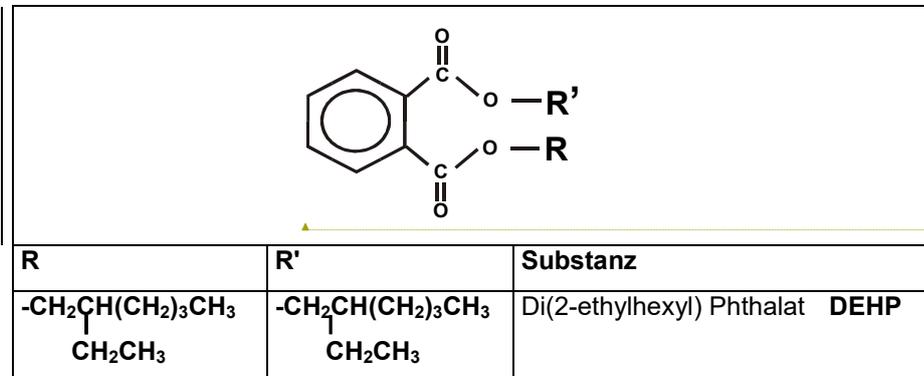
Phthalate wurden ab den 1920er Jahren produziert und mit der Markteinführung von PVC in den 1950er Jahren auch in großen Mengen hergestellt. PVC entwickelte sich seitdem zu dem am häufigsten verwendeten Kunststoff für alltägliche Utensilien wie Kabel, Fußbodenbeläge, Tapeten, Lacke, Folien oder Sport- und Freizeitartikel sowie Spielzeuge und vieles mehr.

Seit mehr als sechzig Jahren werden Weichmacher nun vor allem in PVC eingesetzt. Sie können dabei als Additiv einen Mengenanteil von bis zu 60% einnehmen. Zusätzliche Additive sind Füllstoffe, Gleitmittel und Pigmente.

Und PVC nimmt unter den Medizinprodukten eine besondere Stellung ein, denn allein in diesem Sektor werden pro Jahr 30.000 Tonnen verbraucht [92].

Für medizinische Produkte wird es bevorzugt verwendet, weil es viele vorteilhafte Eigenschaften miteinander vereint. Es ist sterilisierbar, so dass Produkte mehrfach verwendet werden können, es weist ein gutes Rückstellvermögen auf und ist auch in Kälte elastisch. Dieser Vorteil wird zum Beispiel bei Blutkonserven genutzt, die unter Kühlung gelagert werden müssen. Außerdem ist PVC transparent, wodurch es möglich wird, Koagelbildungen in Erythrozytenkonserven oder Verklumpungen bei Thrombozytenkonserven sofort zu erkennen. Um diese vorteilhaften Eigenschaften zu vervollkommen, werden Weichmacher eingesetzt, und hier vor allem immer noch DEHP.

### 1.1.1.1 Di (2- Ethylhexyl) Phthalat, DEHP



Formatiert: Schriftart: Arial

Abb. 1 Struktur des Phthalats DEHP

DEHP ist als Zusatz zum PVC in medizinischen Produkten außer in Blutkonserven zum Beispiel in Infusionsbestecken, Sammelbeuteln oder Beatmungsschläuchen zu finden. Betroffen von DEHP-Kontakt sind analog dazu zum Beispiel intensivpflichtige Frühgeborene, oder Dialysepatienten. Bei dieser Gruppe ist die Belastung besonders hoch. So weist das Bundesamt für Arzneimittel und Medizinprodukte darauf hin, dass durch den Kontakt mit DEHP versetzten, medizinischen Materialien eine deutlich erhöhte Belastung vor allem von Neonaten mit intensivmedizinischer Behandlung auftritt und nennt diese Exposition „besorgniserregend“ [7].

Nach Informationen des Bundesamtes für Risikobewertung Stand 13/2013, 07.05.2013 besteht in der Regel bei der Durchschnittsbevölkerung wegen geringer Aufnahme kein erhöhtes Gesundheitsrisiko, es werden aber Kleinkinder als gefährdeter genannt, da sie DEHP vermehrt über den Hausstaub oder über Bodenbeläge aufnehmen, außerdem nehmen sie oft Gegenstände in den Mund, aus denen DEHP migrieren kann. Seit 1999 ist DEHP zwar in Spielzeugen und Kinderartikeln verboten, wird aber dennoch laut Meldungen des europäischen Schnellwarnsystems RAPEX immer noch in einigen Spielzeugen nachgewiesen, außerdem enthält auch älteres Spielzeug, das vor dem Verbot produziert wurde, weiterhin emissionsfähiges DEHP [94].

Daher kommen Kinder auch ohne intensivmedizinische Behandlung früh in Kontakt mit Phthalaten.

Laut Untersuchungen des Umweltbundesamtes im Rahmen der Studie des Kinder-Umwelt-Surveys wurde zwischen 2003-2006 in nahezu allen Urinproben von Kindern Phthalate detektiert, bei 1,5% der Kinder waren die Werte derart hoch, dass man eine gesundheitliche Beeinträchtigung nicht mehr sicher ausschließen konnte. Diese Ergebnisse wurden 2012 anhand Expositionsschätzungen des Bundesinstituts für Risikobewertung (BfR) bestätigt [13].

Meist gelangen die gelösten Phthalate via naturalis durch Verschlucken oder Inhalieren in den Körper. Dort angelangt, können sie verschiedene Effekte ausüben. Im Vordergrund dieser Studie steht zum Beispiel der Einfluss auf die Lungenfunktion, der bei DEHP in verschiedenen Studien nachgewiesen werden konnte [52].

Die Europäische Behörde für Lebensmittelsicherheit (EFSA) hat für DEHP eine TDI (Tolerable Daily Intake) von 50 µg/kgKG festgelegt, wobei laut dieser Behörde Jugendliche und Erwachsene in Deutschland ca. 13-21 µg/kgKG aufnehmen und Kinder 15-44 µg/kgKG. Noch höhere Dosen werden von etwa 1% der Verbraucher aufgenommen, da sie den oben genannten Risikogruppen angehören.

Die jährliche DEHP-Produktion betrug in der EU 2007 291.000 t [9]. Die Emission in die Umwelt erfolgt durch die Produktion, den Gebrauch und der Entsorgung der DEHP enthaltenden Produkte. Nur bei geeigneter Temperatur verbrennt DEHP zu CO<sub>2</sub> und H<sub>2</sub>O, bei normaler Umgebungstemperatur unterliegt es einer Halbwertszeit von 100 Jahren. Bei Lagerung auf Deponien gelangt es ins Sickerwasser und in die Luft, so kontaminiert es den Regen und gelangt zusätzlich ins Grundwasser. Dank neuerer Abwassertechniken konnte zumindest die Ablagerung in Sedimenten reduziert werden [117].

Es wird geschätzt, dass 10.000 bis 15.000 t also 1-5% der produzierten DEHP Menge pro Jahr direkt in die Umwelt gelangen [39].

Das so entstandene ubiquitäre Vorkommen dieser Substanz erklärt die Belastung der Bevölkerung mit DEHP [118].

Anhand der ansteigenden Bedenken bei der Nutzung dieser Substanz, erwartet man einen starken Rückgang der Phthalat-Weichmacher und dabei insbesondere von DEHP [20].

In den neuen Industrieanlagen in Westeuropa werden mittlerweile fast ausschließlich phthalatfreie Weichmacher produziert, die Firma BASF AG in Ludwigshafen hat die Produktion von DEHP 2005 eingestellt [122].

Trotzdem wurden 2007 weiterhin ca. 230.000 t/a in polymeren Produkten wie Kabel, Folien und Belägen verwendet, dies macht 87% der Gesamt DEHP Produktion aus [115].

Außerdem muss man bedenken, dass es im Außen- und Innenbereich immer noch „Altlasten“ von DEHP gibt. So entstehen Emissionsquellen innen durch das Wischen von Bodenbelägen und Wandbeschichtungen; diese sind mengenmäßig erwartungsgemäß hoch, dabei ist zu berücksichtigen, dass Bodenbeläge oftmals mehr als 15 Jahre verwendet werden [116].

Von der Environmental Protection Agency (EPA) wurde DEHP als „B2, wahrscheinlich kanzerogen für Menschen“ eingestuft. Deswegen haben Spielzeughersteller in den USA den DEHP-Weichmacheranteil für betroffene Spielzeuge auf unter 3% gesenkt. In anderen Ländern findet man weiterhin bis zu 34% Weichmacheranteil [78] [67].

Am 05. Juli 2005 gab das Europäische Parlament einen Richtlinienentwurf heraus, der sich mit dem Verbot für DEHP und DINP in Kinderspielzeug beschäftigt [14].

### ***Toxizität von DEHP***

Im Laufe der letzten 30 Jahre wurden viele Arbeiten zum Thema Toxizität von DEHP veröffentlicht [36] [63] [84] [82] [81] [89] [103] [104] [106] [118] [67]. Im Vordergrund stand dabei der Versuch die Gefährlichkeit für den Menschen zu erforschen. Erste Veröffentlichungen aus den Jahren 1972 und 1973 befassten sich mit dem Vorkommen von DEHP in menschlichem Gewebe von Patienten nach Transfusionen [46] [78] [129].

Einen Vergleich von Belastungen von Patienten mit und ohne Transfusionen nahm ein Jahr später Wallin et al vor. Man stellte fest, dass die Organe mit guter Durchblutung wie Niere, Herz, Hirn und Lunge die höchsten Konzentrationen aufwiesen und ferner keine Probe mehr frei von DEHP war und dies unabhängig davon, ob der Patient zuvor eine Transfusion erhalten hatte, oder nicht [129].

Man vermutete daraufhin schon damals eine allgemeine Exposition von DEHP. Spätere Studien konnten die zu diesem Zeitpunkt gemessene Belastung bestätigen, wobei man keinen signifikanten Unterschied der Weichmacherkonzentrationen von Menschen und Tieren erkennen konnte [113].

Die akute Toxizität von Phthalaten, die mit zunehmendem Molekulargewicht abnimmt, ist gering [55] [43].

Je nach Art der untersuchten Spezies und nach Art der Zufuhr von DEHP ergab sich eine letale Dosis LD50 von 26 g - 38 g DEHP/kg Körpergewicht. Es zeigte sich allerdings ein deutlicher Unterschied der letalen Dosis nach Art der Zufuhr. So führte die intraperitoneale Gabe bei Ratten zu einer LD50 von 31 und > 51 g DEHP/kg Körpergewicht, bei intravenöser Zufuhr lag sie bei 200 - 250 mg/kg Körpergewicht [58] [90].

DEHP ist nicht allein toxisch. Eine wichtige Bedeutung haben seine Abbauprodukte, hier allen voran das Mono(2-ethylhexyl) Phthalat (MEHP). Der Metabolismus von DEHP ist altersabhängig; Frühgeborene zeigen im Vergleich zu termingerecht geborenen Neugeborenen nach Bluttransfusionen signifikant höhere Plasmaspiegel von MEHP [107] [108] [51] [88]. Man vermutet, dass diese Unterschiede die Empfindlichkeit des Organismus gegenüber der Toxizität des DEHPs erhöhen.

Die schädigende Wirkung des DEHPs betrifft mehrere Organe. Es beeinflusst die Reproduktionsfähigkeit von Ratten und Mäusen indem es bei männlichen Tieren zu einer Verminderung bzw. vollständigen Verlust der Spermatogenese führt und bei weiblichen Ratten die Funktion von östrogenproduzierenden Granulosazellen hemmt. Zusätzlich zeigten sich Entwicklungsstörungen von in utero exponierten Nachkommen der Nagetiere [106] [83] [84] [82] [27] [1] [2].

Die Wirkung von DEHP auf den Hoden ist schon längere Zeit bekannt. Der Weichmacher führt zur Verkleinerung, Abnahme der Anzahl und Qualität der Spermien bis hin zu Tumoren der Hoden. Hierbei zeigte sich, dass die Wirkung vor allem durch MEHP hervorgerufen wird [106]. 2010 wurde DEHP wegen reproduktionstoxischer Eigenschaften in die REACH Liste (Registration, Evaluation, Authorisation & Restriction of Chemicals) des Umweltbundesamtes aufgenommen, die besonders besorgniserregende Stoffe festlegt. Nach dem

Anhang XVII darf DEHP nicht in Konzentrationen über 0,1(Gewichts)% in Spielzeugen und Babyartikeln vorhanden sein. Es ist gemäß Verordnung EG 1272/2008 in die Reproduktionskategorie 1B eingestuft und gemäß der EU-Richtlinie 67/548/EWG bzw. 1999/45/EG ist es als beeinträchtigend auf die Fortpflanzungsfähigkeit und schädigend für das Kind im Mutterleib eingestuft. Seit dem 21.02.2015 darf DEHP innerhalb der EU nicht ohne Zulassung verwendet werden.

Bereits 1982 konnte gezeigt werden, dass DEHP in der Nahrung zu einer höheren Inzidenz von hepatozellulären Carcinomen in Mäusen und Ratten führt [106]. Eine Veränderung der Immunsystemantwort durch DEHP wurde 2001 von Larsen et al. im Tierversuch beschrieben [60] [106] und durch mehrere Studien bestätigt [35] [73]. Man beobachtete einen besonders hohen Histaminausstoß durch Phthalate.

Eine wichtige Inkorporationsart bei Menschen stellt die Inhalation von DEHP dar. Dies erscheint logisch, mit dem Hintergrund, dass viele Innenräume mit PVC ausgelegt sind, welches mit DEHP versetzt ist. Schulz et al. konnte bereits 1975 einen Todesfall aufgrund akuter Lungentoxizität nach DEHP- Inhalation nachweisen [99]. 1988 berichtete Roth et al von drei Frühgeborenen, die nach künstlicher Beatmung mittels mit DEHP versetzten Beatmungsschläuchen ungewöhnliche Lungenreaktionen aufwiesen [96]. Eines der Kinder verstarb, die klinische Situation der anderen beiden verbesserte sich, als die Beatmungsschläuche gegen DEHP-freie Materialien ausgetauscht wurden. Im Tierexperiment bei Ratten konnte mit einer Inhalationsdosis von 230 mg/kgKG/d eine Gewichtszunahme der Lungen mit einer Verdickung der Alveolarsepten und erhöhter Proliferation von Schaumzellen beobachtet werden [53].

Jungclas et al. konnte einen direkten Zusammenhang zwischen einer aerosolen Exposition von DEHP und der Entwicklung einer Atemwegsreaktion herstellen [52].

### 1.1.1.2 Di-isononyl-phthalat, DINP

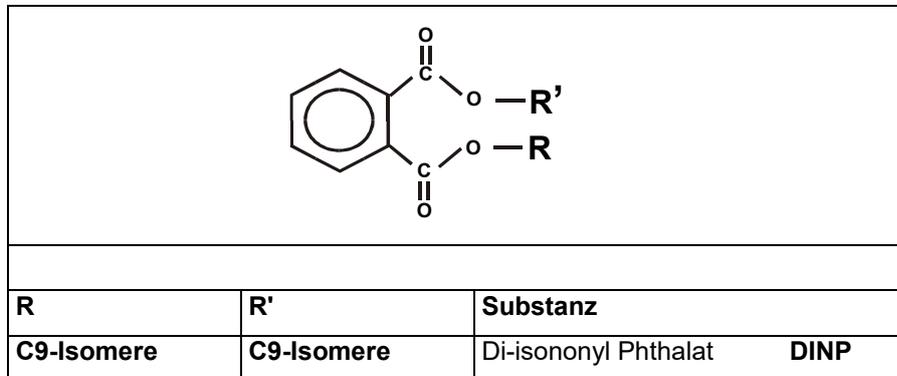


Abb. 2 Struktur des Phthalats DINP (Alkoholkomponente ist ein Gemisch aus C9-Isomeren)

DINP zählt neben DEHP zu den häufig verwendeten Phthalaten. Es handelt sich um eine farblose, klare Flüssigkeit mit kaum wahrnehmbarem Geruch, die sich schlecht in Wasser löst.

Ähnlich dem DEHP wird DINP in PVC verwendet. Es kommt ubiquitär vor, die Belastung der Bevölkerung mit dieser Substanz erreicht jedoch nicht die hohen Werte von DEHP, was wohl vor allem darauf zurückzuführen ist, dass die Produktionsmenge deutlich niedriger ist als die von DEHP [19] [77] [37]

Wie DEHP, emigriert DINP aus dem Material, dem es zugesetzt ist, dies geschieht zum Beispiel durch Kauen oder Saugen an Spielzeugen durch Kleinkinder [71] [131].

Zur Gefährlichkeit dieser Substanz gibt es kontroverse Aussagen. Es ist bekannt, dass DINP in Nagetieren Nieren- und Leberkrebs verursachen kann [17].

Es gibt jedoch in der Studie auch Hinweise darauf, dass die Mechanismen, die den Nierenkrebs bei Nagern unter DINP Exposition auslösen für den Menschen nicht relevant sind. Insgesamt ist die Toxizität des DINP nicht so exakt bewiesen wie bei DEHP. DINP zeigt zwar ähnliche toxische Eigenschaften, aber diese unter wesentlich höheren Dosen. Es verursacht Fehlbildungen des Urogenitaltrakts sowie des Skeletts [101]. Das "American Council of Science and Health" schlussfolgert in seinem "Koop- Report", dass es unwahrscheinlich ist, dass DINP ein Gesundheitsrisiko für Kinder

darstellt. Fiala et al. empfahl aber bereits 1998 auf den Verzicht von DINP in Kinderspielzeug, da die Exposition groß genug sei, Krankheiten auszulösen [56] [111].

DINP ist laut Sicherheitsdatenblatt gemäß der Verordnung (EG) Nr. 1907/2006 (REACH) nicht akut toxisch und erfüllt nicht die Kriterien zur Einstufung zum PBT- oder vPvB-Stoff, da es leicht biologisch abbaubar ist und nicht kumuliert.

(PBT = persistent, bioakkumulativ, toxisch; vPvB = persistent, bioakkumulativ: hierunter fallen Stoffe, die als besorgniserregend angesehen werden, da sie sich auch in abgelegenen Ökosystemen anreichern und schwer abbaubar sind. Langzeiteffekte dieser Stoffe sind schwer vorauszusehen)

Insbesondere ist DINP nach dem Sicherheitsdatenblatt nicht als Inhalations- oder Hautallergen einzustufen.

Eine Kennzeichnungspflicht besteht bei DINP nach obiger Verordnung ebenfalls nicht. Allerdings ist es wie DEHP auch in REACH im Anhang XVII gelistet und darf somit nicht mehr als 0,1 Gewichts-% in Materialien verwendet werden, aus denen Kinderspielzeug oder Babyartikel hergestellt werden, da es als Stoff mit endokriner Wirkung gilt.

### 1.1.2 1,2-Cyclohexandicarbonsäurediisonylester (DINCH)

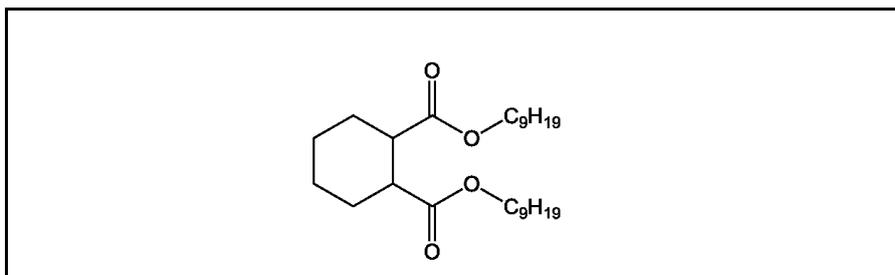


Abb. 3 1, 2 - Cyclohexandicarbonsäurediisonylester (DINCH)

Mit zunehmenden Hinweisen auf die Toxizität der klassischen Phthalatweichmacher wurde nach anderen Substanzklassen mit geringerem Risikopotenzial gesucht. 2002 führte die Firma BASF 1,2-Cyclohexandicarbonsäurediisononylester (DINCH) als Weichmacher für PVC und andere polare Polymere auf dem Markt unter dem Handelsnamen

Hexamoll® DINCH ein. Die Substanz ist farblos, klar, annähernd geruchlos, praktisch wasserfrei und wasserunlöslich. Sie lässt sich in den üblichen organischen Lösungsmitteln lösen und wie DEHP zur Weichmachung von PVC nutzen.

Technisch sind die Eigenschaften von DINCH mit denen von Phthalaten vergleichbar, es gilt aber im Gegensatz zu DEHP als sichererer Weichmacher für Kinderspielzeug und für Medizinprodukte. So besteht seit Oktober 2006 der positive Bescheid der EFSA [30].

2007 kam es zur Aufnahme in den Anhang III der Richtlinie 2002/72/EG über Materialien und Gegenstände aus Kunststoff, die dazu bestimmt sind, mit Lebensmitteln in Berührung zu kommen. Diese Richtlinie wurde dann durch die europäische Verordnung 10/2011 ersetzt [31].

Die dort vorgeschriebenen Prüfbedingungen gelten ab dem 01. Januar 2016 uneingeschränkt, so auch die zulässige maximale Gesamtmigration von 60 mg/kg.

Der Hersteller BASF wirbt in seinem Internetauftritt damit, dass sich gerade dieser Weichmacher für den Einsatz in so genannten sensiblen Bereichen wie Lebensmittelverpackungen, Medizinprodukten, Bodenbelägen und Tapeten eignet und verweist auf die Zulassung nach DIN EN ISO 10993, nach deren Grundlage auf biologische Unbedenklichkeit von Medizinprodukten geprüft wird. Außerdem wird auf die Eignung zur Spielzeugherstellung nach Richtlinie 2009/48/EG hingewiesen [93].

Nach dem Sicherheitsdatenblatt besteht für DINCH keine Kennzeichnungspflicht.

Mit den ersten positiven Studienergebnissen bezüglich der Toxizität des neuen Weichmachers sowie dessen geringeres Migrationsverhalten stieg die Produktion von DINCH enorm an (Welle et al zum Beispiel zeigten, dass die Migration von DINCH im Vergleich zu DEHP um den Faktor 8 niedriger ist [131]). Wurden bei Inbetriebnahme der Anlage der Firma BASF 2002 zunächst 25.000 t Jahreskapazität zu Grunde gelegt, betrug die Kapazitätserweiterung 2014 bereits 200.000 t pro Jahr [5] Der humane Metabolismus für DINCH beginnt nach Abspaltung des Esterrests primär mit der Entstehung von

Cyclohexan-1,2-dicarboxylate-mono-4-methylcyteter (MINCH), dann kommt es zur Bildung von Cyclohexan-1,2dicarboxylat-mono-(7-hydroxy-4-methyl)octylester (OH-MINCH) und parallel zur Bildung von Cyclohexan-1,2-dicarboxylat-mono(oxo-isononyl)-ester (oxo-MINCH) und Cyclohexan-1,2-dicarboxylat-mono(7-coarboxylat-4methyl)heptylester (Cx-MINCH) [132].

Entsprechend der Produktionssteigerung konnte eine zunehmende Belastung der Allgemeinbevölkerung mit DINCH nachgewiesen werden. Konnten bis 2003 noch keine Metabolite in humanen Urinproben gemessen werden, waren 2013 bereits 98,3% der Proben von amerikanischen Schwangeren positiv auf OH-DINCH und Cx-DINCH [132]. Um eine Aussage darüber treffen zu können, ob aufgenommene Stoffmengen gesundheitsbedenklich sind, werden von verschiedenen Behörden (Bundesamt für Risikobewertung, EFSA, Kommission Humanes Biomonitoring des Umweltbundesamtes) Grenzwerte angegeben bzw. Dosen einer Substanz, die als unbedenklich gelten.

So definiert das Umweltbundesamt den HBM I Wert, als die Menge an Substanz die tolerabel ist und als HBM II Wert die Menge an Substanz, die gerade noch tolerabel ist.

Des Weiteren benutzt die EFSA den Begriff des TDI (Daily tolerable intake), der maximalen täglichen tolerablen Menge einer Substanz. Hier wird zunächst die NOAEL (No Observed Adverse Effects Level) anhand von Tierversuchen bestimmt und dann mit dem Sicherheitsfaktor 100 dividiert. Sie entspricht also einem geschätzten Wert.

Nach mehreren Studien vor allem bezüglich der Nephrotoxizität, der Wirkung auf die Schilddrüse und möglicher östrogenen Effekte legte die 2002 gegründete europäische Behörde EFSA (European Food Safety Authority) 2006 die TDI für DINCH auf 1 mg/kgKG/d fest. Nach den Bewertungen des Bundesamts für Risikobewertung gilt der HBM I Wert für Kinder bei 3000 µg/l Urin und für Erwachsene bei 4500 µg/l Urin.

2012 wurde anhand von Urinkonzentrationen des spezifischen Hexamoll/DINCH Metaboliten OH-DINCH eine durchschnittliche Aufnahme der Bevölkerung von 0,14 µg/kg x KG/d bei einer 95. Perzentile von 1,07 µg/kg x KG/d berechnet [100]. Dies liegt somit deutlich unterhalb des TDI Wertes der EFSA.

Zu ähnlichen Ergebnissen kam die Forschungsgruppe um Fromme et al. Sie untersuchten Urinproben von Kindern aus Kindertageseinrichtungen auf ihren DINCH-Metabolitengehalt. Auch hier lagen die Ergebnisse unterhalb des HBM I Wert [34].

Parallel dazu stellte das Team um Shu et al fest, dass von 2007 - 2010 die Belastung von schwedischen Schwangeren mit DINCH Metaboliten anstieg (und parallel die Belastung mit DEHP Metaboliten abfiel) [105].

In den ersten durchgeführten Studien zum Thema Toxizität von DINCH, zeigte sich bis 2015 mehrfach im Tierversuch kein Hinweis auf Beeinflussung der Leber- und Hodenfunktion oder des Verhaltens der Tiere, auch in einer 2-Generations Studie wurde kein nachteiliger Effekt nachgewiesen [26] [8].

Es findet sich im DINCH-Sicherheitsdatenblatt der Hinweis, dass weder eine akute Toxizität bei dem Produkt besteht noch mutagene, karzinogene oder teratogene Effekte zu befürchten sind, ebenfalls konnten anhand dieser Quelle keine Beeinträchtigung der Fertilität bei den Versuchstieren festgestellt werden [6].

In einigen Publikationen wird DINCH als Nachfolger für den klassischen Weichmacher DEHP in Behältern von Blutkonserven vorgeschlagen, da es ein ähnliches Potenzial hat, die Hämolyse der roten Blutkörperchen zu verhindern und dabei eine geringere Toxizität aufweist [72].

Die Unbedenklichkeit des Stoffes wird trotzdem in einigen Studien in Frage gestellt. So wiesen Engel et al 2018 im Tierversuch nach, dass die DINCH selbst keine Effekte aufwies, wohl aber dessen Metabolite. In hohen Dosen führten sie zu einer Aktivitätsänderung einiger Rezeptoren wie zum Beispiel PPAR-alpha und PPAR-gamma, die einen wesentlichen Anteil an der Regulation des Fett- und Zuckerstoffwechsels haben und auch antiinflammatorische Eigenschaften zeigen. Allerdings waren diese Effekte nur bei 3-fach überschrittenen HBM-I Wert nachweisbar [32].

Die Wirkung von DINCH Metaboliten auf die Expression von PPAR-alpha in der Leber konnte 2019 durch Campioli et al bestätigt werden. Die Gruppe kam zu dem Schluss, dass DINCH letztendlich nicht biologisch inert ist und die Leber ein Zielorgan von DINCH zu sein scheint [18].

## **1.2 Erkrankungen mit möglichem Zusammenhang mit Phthalaten**

Ab etwa Mitte des letzten Jahrhunderts fanden sich zunehmend Hinweise auf die mögliche Toxizität der Phthalate. Mittlerweile werden Zusammenhänge zwischen der Exposition und verminderter Reproduktionsfähigkeit, verminderter Spermatogenese, Frühgeburtlichkeit, Hypospadien, Pubertas praecox bei Mädchen, Brustkrebs und Veränderungen der Schilddrüse gesehen [70] [24] [112] [21] [42].

Besonderes Augenmerk wurde auf die Beeinflussung der Lungenfunktion gelenkt. 1973 beschrieben Sokol und Aelony et al. das Phänomen des „Meat-Wrapper's-Asthma“ und kamen in dieser Studie zu dem Schluss, dass es einen Zusammenhang zwischen der Exposition von Dämpfen aus Heißdrahtschneidemaschinen für PVC oder thermoaktivierten Preisschildern und asthmatischen Beschwerden gibt [109].

Eine Untersuchung an Feuerwehrmännern zehn Jahre später zeigte, dass es unter Exposition von PVC-Dämpfen öfter zu schweren pulmonalen Symptomen kam, als bei Feuerwehrmännern ohne derartigen Kontakt [68].

Aber auch ohne Verbrennung und damit entstandener Gase kommt es zu gesundheitlichen Problemen. Es wurde mehrfach gezeigt, dass Innenräume mit feuchten Betonbodenkonstruktionen oder Bodenbelägen die beinhaltenden Phthalate vermehrt in die Umgebungsluft abgeben und dies bei Inhalation mit zunehmenden asthmatischen Beschwerden korreliert [74] [120].

Ähnliche Korrelationen konnten auch im Zusammenhang von Asthma und der Exposition von Dämpfen aus Tapeten, Wandbelägen oder PVC-Böden gefunden werden, wobei auch Kinder von diesen Beschwerden betroffen sind [44] [45].

Welche genaue Ursache die Einschränkung der Lungenfunktion unter Phthalatexposition hat, ist bis heute ungeklärt. Mehrere Ansätze kommen als Erklärung in Frage.

### **1.2.1 Immunologische Veränderungen**

Seit 2001 ist durch Larsen et al. bekannt, dass die Exposition von Phthalaten zu einer Immunantwort im Tierversuch führen kann [60]. Dieser Effekt konnte mittlerweile durch die Stimulation von Allergieeffektorzellen bestätigt werden [35] [73]. Hierbei zeigten besonders DEHP und MEHP (das Abbauprodukt von DEHP), eine besonders hohe Histaminantwort. Allerdings wurde bis jetzt noch kein immunologisches Krankheitsbild beschrieben, die Effekte beziehen sich auf eine Veränderung einzelner immunologischer Parameter. In den meisten Studien wurden BALB/c Mäuse, die anfällig für IgE vermittelte Reaktionen sind, verwendet. Dabei wurde im Laufe der verschiedenen Studien klar, dass die Art der Inkorporation der Substanzen eine Rolle bei der Antwort des Organismus spielt. Subkutane und intraperitoneale Gaben erzeugten eine Erhöhung von IgG1, aber nicht von IgE.

Da dies aber einen eher unwahrscheinlichen Weg der Inkorporation darstellt, wurden bald realistischere Modelle entwickelt, wie die der dermalen Applikation und der Inhalation.

Auch hier fiel auf, dass es bei topischer Anwendung nicht zu einer IgE Erhöhung kommt, ähnliche Ergebnisse lieferten Inhalationsversuche: in hohen Dosen konnte DEHP dort aber eine erhöhte Anzahl von Eosinophilen, Lymphozyten und Neutrophilen in der bronchoalveolären Lavage hervorrufen. Der Effekt war ausgeprägter bei direkter Inhalation mit MEHP [59].

Jungclas et al konnten in ihren DEHP- Inhalations-Versuchen an Mäusen zeigen, dass unter Exposition die Lungenfunktion eingeschränkt wird [52].

### **Immunsystem**

Das Immunsystem kann nach Kontakt mit einer potenziellen Noxe auf unterschiedliche Arten reagieren. Hieran sind verschiedene Zellen und deren Mediatoren beteiligt. Bei höher entwickelten Lebewesen spielt neben der unspezifischen und angeborenen Abwehr die adaptive, erworbene Abwehr eine wichtige Rolle, da sie gezielter auf Eindringlinge reagieren kann. So ist dieser Teil des Immunsystems in der Lage, Teile der Angreifer als Antigen zu erkennen um dann gezielt Antikörper zu bilden. Die zellulären Bestandteile kommunizieren in komplexen Regelkreisen miteinander und können sich gegenseitig verstärken oder hemmen.

Zur erworbenen, spezifischen Immunabwehr zählen antigenpräsentierende Zellen wie dendritische Zellen, T-Lymphozyten zur zellvermittelten Abwehr und B-Lymphozyten als humorale Abwehr zur Produktion von Antikörpern.

Diese Immunzellen wandern ins Gewebe oder zirkulieren im Blut oder der Lymphe und sind in der Lage nach Antigenkontakt weitere Zellen via Botenstoffe an den Ort des Geschehens zu locken.

Zellulärer Bestandteil des Immunsystems sind Granulozyten, Makrophagen, die sich aus Monozyten entwickeln, Natürliche Killerzellen (NK-Zellen), Dendritische Zellen sowie T-Lymphozyten.

Unterstützend spielt das Komplementsystem eine wichtige Rolle bei der Immunabwehr. Es besteht aus einer Vielzahl von verschiedenen Plasmaproteinen, die größtenteils primär inaktive Proteasen sind und in der Leber produziert werden. Bei Antigenkontakt setzen sie eine Reaktionskaskade in Gang. Einerseits stimuliert das Komplementsystem proinflammatorische Reaktionen und andererseits fördert es die Phagozytose durch Bildung eines Membranangriffkomplexes der zu einer Porenbildung in der Fremdzelle führt.

### **Interleukine**

Der Name Interleukin setzt sich aus den griechischen Begriffen inter= zwischen und leukos= weiß zusammen. Es handelt sich um körpereigene Peptidhormone des Immunsystems die zur Gruppe der Zytokine gehören.

Nach dem Zeitpunkt ihrer Entdeckung sind die Interleukine durchnummeriert und damit benannt.

Interleukine stellen einen essenziellen Bestandteil der körperinternen Immunkommunikation von Leukozyten und auch Makrophagen dar. Je nach Art des Interleukins können sie die Effektorzellen zum Wachstum oder zur Reifung anregen und deren Aktivität steigern oder das genaue Gegenteil bewirken. So entstehen positive und negative Rückkopplungen und Regelkreise, die ein wichtiger Bestandteil der immunologischen Homöostase sind.

#### **Interleukin 4 (IL-4)**

IL-4 wird hauptsächlich von Th2-Zellen aber auch von eosinophilen Granulozyten, Mastzellen und NK-Zellen sezerniert. Es regt das Wachstum von B-Zellen an und fördert so die Synthese von IgE und IgG. Parallel hemmt es die

Produktion von Th1-Zellen sowie Makrophagen und die Sekretion von INF- $\gamma$  und IL-12.

Die Ausschüttung von IL-4 aus Th2-Zellen führt zu einer positiven Rückkopplung und damit zu einer vermehrten Differenzierung von Th-2 Zellen aus naiven T-Zellen. Insgesamt fördert es die humorale Abwehr und supprimiert die zelluläre Antwort.

#### Interleukin 5 (IL-5)

IL-5 wird ebenfalls von Th2-Zellen und Mastzellen ausgeschüttet. Es steigert die Synthese und Sekretion von Ig A aus Plasmazellen, wirkt positiv chemotaktisch auf eosinophile Granulozyten und stimuliert deren Produktion und Aktivierung.

#### Interleukin-10 (IL-10)

Wie IL-4 und IL-5 wird IL-10 aus Th2-Zellen ausgeschüttet. Insgesamt ist es ein antiinflammatorisch wirkendes Interleukin, dass die Makrophagenfunktion hemmt und die Produktion von INF- $\gamma$  supprimiert.

#### **Leukotrien B4 (LTB4)**

Es handelt sich hierbei um ein inflammatorisches Leukotrien das in neutrophilen Granulozyten, Makrophagen und Mastzellen als Eicosanoid aus der Arachidonsäure gebildet wird. Es wirkt chemotaktisch, chemokinetisch, proaggregatorisch und degranulierend auf verschiedene Leukozyten.

Insgesamt gibt es 3 Rezeptorbindungsstellen für dieses Leukotrien, wobei die LeukotrienB4/LeukotrienB4-Rezeptor-1-Bindung (LTB4/BLT1) im Entstehen verschiedener allergischer Reaktionen in den letzten Jahren in den Fokus der Forschungen rückte. Es stellte sich heraus, dass dieser Reaktionsweg wichtig für die Pathogenese von schwerem Asthma, Aspirin-verursachtem Asthma, Anstrengungsasthma, allergischer Rhinitis und atopischer Dermatitis ist. Die LTB4/BTL1 Bindung aktiviert verschiedene Entzündungszellen wie neutrophile und eosinophile Granulozyten, Monozyten und Makrophagen, Mastzellen und dendritische Zellen.

Bei Asthmapatienten scheint es eine interessante Rolle zu spielen. Es stellte sich heraus, dass im Metacholinprovokationstest nur Patienten mit Asthma, nicht aber gesunde Probanden erhöhte LTB4-Werte aufwiesen [75].

Weitere Studien zeigten, dass auch bei akuten Anfällen erhöhte Werte im Blut gefunden wurden [102].

Man geht mittlerweile davon aus, dass eine Hochregulierung des LTB4 Mechanismus mit Asthma assoziiert ist [85].

Des Weiteren konnte man auch bei Patienten mit Aspirin-induziertem Asthma und bei Patienten mit Anstrengungsasthma eine erhöhte Produktion von LTB4 nachweisen werden [50] [3].

### **Nerve Growth Factor (NGF)**

NGF ist ein Neuropeptid, das in den 1950er Jahren von Rita Levi-Montalcini entdeckt wurde und für dessen Entdeckung sie 1986 den Nobelpreis erhielt.

Die Funktionen dieses Peptids sind vielfältig. NGF ist involviert in das Wachstum und Überleben von Neuronen vor allem des sympathischen und sensorischen Nervensystems. Seine Präsenz induziert in inflammatorischen Bereichen eine axonale Aussprossung von Nozizeptoren, es resultiert eine Hyperalgesie [79].

Außerdem stimuliert NGF die Degranulation von Mastzellen, wirkt chemotaktisch auf neutrophile Granulozyten, beeinflusst die Differenzierung von eosinophilen und basophilen Granulozyten und stimuliert die Differenzierung von B- und T-Lymphozyten [110].

Es wird ferner auch von diesen immunologisch wirkenden Zellen produziert, namentlich Th2-Helferzellen, Mastzellen und Eosinophilen.

Im Bereich von pulmonalen Erkrankungen und Reaktionen beeinflusst es allergische und asthmatische Reaktionen. Man fand heraus, dass Patienten mit Asthma erhöhte Level von NGF auswiesen. In einem murinen Modell konnte gezeigt werden, dass NGF zu einer ausgeprägteren Hyperreaktion der Bronchien führt, während eine Blockung von NGF diese verhindert [10] [49].

### **Interferon- $\gamma$ (INF- $\gamma$ )**

Interferon- $\gamma$  ist ein Glykoprotein und gehört zur Klasse der Interferone. Hierzu zählen zwei Klassen. Zu den Klasse I Interferonen (INF) zählen IFN- $\alpha$  und

IFN- $\beta$ , sie spielen eine wichtige Rolle bei der Abwehr von viralen Infektionen. IFN-  $\gamma$  zählt zur zweiten Klasse. Dieses Zytokin hat eine immunmodulatorische Wirkung. Die kodierenden Gene sind bei Mäusen und Menschen ähnlich. Produziert wird IFN- $\gamma$  von NK-Zellen, CD4+-Th1-Helfer Zellen, CD8+ T-zytotoxischen Zellen, Makrophagen, Dendritischen Zellen, naiven T-Zellen und B-Zellen. Auslöser für die Produktion ist der Kontakt dieser Zellen mit aktivierten, antigenpräsentierenden Makrophagen. Die Aufgaben von IFN-  $\gamma$  beinhalten einerseits die Aktivierung von Makrophagen und somit die Unterstützung und Stimulation der zellulären Abwehr und andererseits die Supprimierung der Th2-Antwort des Immunsystems. Da die Entstehung allergischer Reaktionen und auch von Asthma eng mit der Th2-Antwort in Verbindung steht und IFN- $\gamma$  als leitendes Zytokin der Th-1-Antwort diese Reaktion unterdrückt, geht man mittlerweile davon aus, dass es entscheidend für die Aufhebung von allergischen Reaktionen im Körper zuständig ist. Denn es gibt Hinweise, dass eine Veränderung des Zytokinprofils der Th-2 Antwort durch das Induzieren einer Th-1 Antwort, vor Th-2 assoziierten Erkrankungen wie Asthma oder Allergien schützt. Andersherum korreliert ein „IFN- $\gamma$ -Mangel“ mit dem Auftreten von schwerem Asthma [114].

Des Weiteren führt IFN-  $\gamma$  zu einer Hemmung der IgE-Bildung [66].

Bei Asthmapatienten fanden sich erniedrigte Werte von INF-  $\gamma$ , was zu einer verminderten Fähigkeit IgE zu inhibieren führte [22].

### **1.2.2 Asthma bronchiale**

Asthma bronchiale nimmt mit seiner zunehmenden Prävalenz in den westlichen Industrieländern eine immer größere, volkswirtschaftliche Rolle ein. Es handelt sich bei der Erkrankung um eine chronisch entzündliche Veränderung der Atemwege die einhergeht mit rezidivierenden Atemnotanfällen und Husten, bedingt durch reversible Obstruktionen der glatten Lungenmuskulatur, vermehrter Schleimproduktion der Becherzellen sowie einer Entzündungsreaktion.

Man unterscheidet zwischen nicht allergischem (intrinsischem) und allergischem (extrinsischem) Asthma. Etwa 85% der Erkrankungen lassen sich auf allergische Ursachen zurückführen [95]

Beim allergischen Asthma, dem eine komplexe Ätiologie zugrunde liegt, stellen genetische Prädispositionen einen wichtigen Teil dar. Es sind bereits viele Genloci beschrieben worden, die mit dem allergischen Asthma in Zusammenhang gebracht wurden. Von besonderem Interesse sind die Genregionen auf Chromosom 5, die für die Zytokine IL-3, IL-4, IL-5, IL-9, und IL-13 kodieren [97] [25] [69]. Produziert werden diese Interleukine von Th2-Zellen und haben einen wichtigen Anteil an der Pathogenese von Asthma. Weitere Genorte für die Asthmaentwicklung liegen auf den Chromosomen 11, 12 und 16. Hier sind unter anderem Gene für die Kodierung des hochaffinen IgE-Rezeptors (FcεRI) lokalisiert [41], sowie für Interferon-γ (INF-γ) [4].

Allerdings reicht für die Erklärung der ansteigenden Prävalenz die genetische Prädisponierung nicht aus. Zusätzlich nehmen noch Faktoren des sozialen Umfeldes [57] [127], der Ernährungsgewohnheiten [126] und der Allergenexposition [128] einen wichtigen Platz bei der Entstehung der Erkrankung ein.

Das allergische Asthma als Überempfindlichkeitsreaktion vom Typ I wird nach Antigeninhalation durch Mastzellenaktivierung der unteren Atemwege verursacht und lässt sich in eine Frühphase- und eine Spätphasereaktion unterteilen.

Die erste ist IgE vermittelt und tritt direkt nach Inhalation von Antigenen auf, auf die der Körper sensibilisiert ist. Es kommt zu einer schnellen Aktivierung der Mastzellen und Makrophagen, welche pro-inflammatorische Mediatoren wie Histamin, Eicosanoide und reaktive Sauerstoffprodukte freisetzen. Das Lungengewebe reagiert darauf mit einer Kontraktion der glatten Atemwegsmuskulatur sowie einer gesteigerten Schleimproduktion und einer Vasodilatation. Es resultiert Atemnot und Husten mit Auswurf von zähem, glasigem Schleim.

Zusätzlich induzieren die inflammatorischen Mediatoren eine massive Plasma-Exsudation in die Atemwege [11]. Mit dem Ausstrom gelangen auch Akutphase Proteine in das Gewebe und es resultiert durch dessen Anschwellung eine Verengung des Atemwegskalibers.

Die Spätphasereaktion manifestiert sich ca. 6 - 9 Stunden nach dem eigentlichen Allergenkontakt. Es kommt zu einer Infiltration und Aktivierung von CD4+ T-Lymphozyten, Makrophagen, eosinophiler und basophile Granulozyten

[125]. Die Spätreaktion ist klinisch weniger ausgeprägt als die Frühphasereaktion geht aber trotzdem mit einer weiteren Kontraktion der glatten Muskulatur einher.

Bei Patienten mit dieser chronischen Entzündung der Atemwege findet man eine ständig erhöhte Konzentration von TH2-Leukozyten, Eosinophilen, Basophilen und anderen Leukozyten [48].

Erschwerend kommt zu dieser Situation hinzu, dass bei den Patienten nach längerer Zeit eine generelle Empfindlichkeit der Atemwege gegenüber chemischen Reizen resultiert, so dass auch bei Abwesenheit des ursprünglichen Antigens Asthmaanfälle auftreten können, zum Beispiel bei Inhalation von Zigarettenrauch. Die chronische Entzündung bleibt auch ohne weiteren Antigenkontakt erhalten [12].

Interleukin B4 scheint gerade bei bereits vorbestehendem Asthma in der Spätphase der allergischen Reaktion eine erhebliche Rolle zu spielen. So konnte Waseda im Mausversuch durch Blocken des Interleukin B4 Rezeptors die Spätphase der Reaktion unterdrücken [130].

Leukotrien B4 scheint eine interessante Rolle zu spielen. Es stellte sich, wie bereits erwähnt, heraus, dass im Metacholinprovokationstest nur Patienten mit Asthma, nicht aber gesunde Probanden erhöhte LTB4-Werte aufwiesen [75].

Weitere Studien zeigten, dass auch bei akuten Anfällen erhöhte Werte im Blut gefunden wurden [102].

Man geht mittlerweile davon aus, dass eine Hochregulierung des LTB4 Mechanismus mit Asthma assoziiert ist [85].

Des Weiteren konnte man auch bei Patienten mit Aspirin-induziertem Asthma und bei Patienten mit Anstrengungsasthma eine erhöhte Produktion von LTB4 nachweisen [50] [3].

Histologisch weisen sehr viele Asthmapatienten einen vermehrten Anteil von kollagenen Fasern in der Atemwegswand auf, sowie die Degranulation von Mastzellen mit einer Infiltration von Lymphozyten und eosinophilen Granulozyten.

Die auslösenden Allergene sind vielfältig. Geläufig sind Pflanzenpollen die auch den gemeinen „Heuschnupfen“, also die allergische Rhinitis auslösen. Allerdings existieren auch chemische Allergene.

### 1.2.3 Allergische Reaktion

Eine Allergie ist eine Krankheit, die durch eine Immunreaktion gegenüber einem ansonsten harmlosen Antigen ausgelöst wird. Das Immunsystem schädigt somit den eigenen Körper, nachdem dieser mit einer Substanz konfrontiert wurde, von der selbst kein schädigendes Potenzial ausgeht.

Man unterscheidet nach Coombs und Gell 4 verschiedene Allergietypen.

Die Allergietypen I-III werden durch Antikörper vermittelt, unterschiedlich sind hier die Antikörperklassen und die auslösenden Antigene. Typ I ist verbunden mit einer IgE Produktion was eine Aktivierung von Mastzellen hervorruft, bei Typ II-III kommt es zu einer IgG-Bildung, die für komplementvermittelte und phagozytische Effektormechanismen sorgen. Bei Typ II lösen Matrix- und Zelloberflächenantigene die Reaktion aus, bei Typ III sind es lösliche Antigene, die die Kaskade initiieren, es kommt zu Immunkomplexbildungen.

Die T-zellvermittelte Typ IV Reaktion besteht aus drei Untergruppen. Bei der ersten kommt es zur Makrophagenaktivierung durch Th1-Zellen, es resultiert eine Entzündung. Die Entzündungsreaktion der zweiten Untergruppe ist Th2-Zell-vermittelt, federführend sind hier eosinophile Zellen. Beide dieser Untergruppen werden durch lösliche Antigene ausgelöst. Bei der dritten Typ IV Reaktion resultiert die Schädigung direkt durch zytotoxische T-Zellen, wobei zellassoziierte Antigene hier das Immunsystem aktivieren.

Häufig wird der Typ I, die Hypersensitivitätsreaktion vom Soforttyp, mit dem Begriff der Allergie gleichgesetzt. Die Symptomatik tritt erst auf, nachdem das Individuum nach Kontakt mit einem Antigen IgE Antikörper gebildet hat und erneut mit diesem in Berührung kommt. Die allergische Reaktion entsteht als Reaktion auf eigentliche harmlose, kleine Antigene wie zum Beispiel Pollen, Proteine, Nahrungsmittel oder Hausstaub durch die Produktion von IgE-Antikörpern. Das Antigen löst dabei, sobald es in den Organismus gelangt, eine Th2-Antwort aus. Das Interleukin IL-4 spielt hierbei eine wichtige Rolle, es begünstigt die Umwandlung von allergenspezifischen Zellen zu TH2-Zellen. Die so entstandenen allergenspezifischen TH2-Zellen erzeugen ihrerseits wieder IL-4 und IL-13, die allergenspezifische B-Zellen dazu veranlassen, IgE zu

erzeugen. Dieses IgE bindet seinerseits an den IgE- Rezeptor auf Mastzellen, basophilen und aktivierten eosinophilen Zellen. Es kommt zu einer Mastzelldegranulation und damit zu einer Histaminausschüttung [47]

Die Mechanismen der allergischen Immunreaktion in der Lunge sind mittlerweile relativ detailliert bekannt.

Wenn ein Allergen in der Lage ist die natürliche Barriere der Lunge soweit zu durchbrechen, dass es auf die Differenzierungsebene gelangt, dann bestehen für das Immunsystem zwei mögliche Wege, eine Reaktion ablaufen zu lassen. Die T-Zellen können sich entweder in TH1- oder in TH2-Zellen differenzieren. Hierzu sind verschiedene Substanzen nötig. IL-4 löst eine Antwort in Richtung Th2 Reaktion aus, INF- $\gamma$  zeigt den Weg in Richtung Th1-Reaktion. Die so entstandenen Th1 oder Th2 Zellen können sich auch gegenseitig beeinflussen, namentlich unter INF $\gamma$ -, IL-4 und/oder IL-10 Präsenz. Die so geebneten Wege führen nun in Richtung verschiedener Immunreaktionen. Die Th2- Richtung führt mittels IgE in die Sofort-Typ-Reaktion, mit letztlich Histaminausstoß und zum Beispiel einer Bronchokonstriktion. Die Th-1 Richtung weist den Weg eher in die Typ II bis Typ IV Reaktion. Diese Reaktionen spielen zum Beispiel bei Medikamentenallergien oder bei der exogen-allergischen Alveolitis eine wichtige Rolle.

Kommentar [hgw1]:

Bei der Th2-Antwort kann man noch einmal in zwei Reaktionen einteilen, die auch zusammen ablaufen können. Zum einen existiert eine frühe Typ I Reaktion und zum anderen eine späte Form.

Bei der frühen Form führt IL-4 via IgE zu einer Mastzelldegranulation und IL-4 bis IL-6 zu einer vermehrten IgE-Produktion der B-Zellen.

Bei der späten Reaktion des Typ I kommt es via IL-4 und IL-13 zum Ausstoß von Entzündungssubstanzen aus eosinophilen Granulozyten; diese Reaktion wird ebenfalls zusätzlich von IgE aus B-Zellen unterstützt. Zusammenfassend kann man sagen, dass die Soforttypreaktion eine Th2-Reaktion darstellt, deren Marker einerseits IgE und andererseits Zytokine (z.B.: IL-4 und IL-5) sind. Die Effektorzellen sind hier Mastzellen und Eosinophile. Marker der Th1 Antwort stellt zum Beispiel Interferon- $\gamma$  dar [38].

## 1.2.4 Pseudoallergie

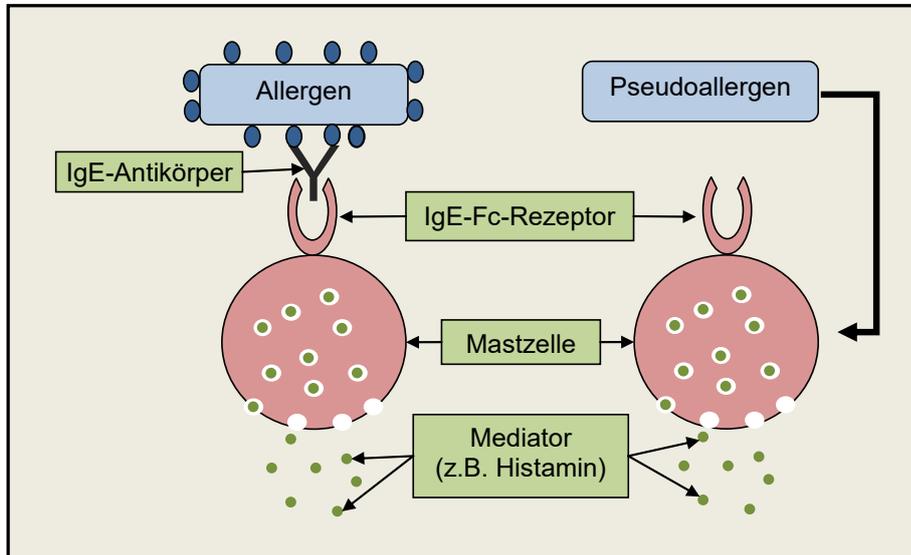


Abb. 4 Schema Allergie und Pseudoallergie

Die pseudoallergische Reaktion zeigt gleiche Symptome wie die echte allergische Reaktion, beide werden durch Histaminfreisetzung aus Gewebsmastzellen ausgelöst.

Der Unterschied besteht in der Genese der Reaktion. Während bei einer Allergie die Degranulation der Mastzellen auf einer IgE-Antikörperreaktion beruht, löst bei der Pseudoallergie ein Stoff die Mastzelldegranulation direkt aus, sie entsteht also antikörperunabhängig. Deswegen entsteht diese Reaktion schon bei erstem Kontakt mit dem auslösenden Agens; also nicht erst, wie bei der echten Allergie nach Sensibilisierung. Eine Ursache kann ein Mangel an dem histaminabbauenden Enzym Diaminoxidase sein. Es können hierbei Beschwerden auftreten, sobald Histaminliberatoren in den Organismus treten. Aber auch vasoaktive biogene Amine, in Sauerkraut, Käse, Fleisch, Rotwein u.a. können diese Reaktion auslösen. Ein bekanntes Beispiel ist das Chinarestaurant-Syndrom, welches durch den Genuss von natriumglutamathaltigen Speisen ausgelöst wird. Pseudoallergische Reaktionen können aber auch durch Lebensmittelzusätze wie Tartrazin oder Benzoesäure entstehen. Einige Zentren verstehen unter dem Begriff „Pseudoallergie“ eine

Reaktion auf ein Xenobiotikum, andere Autoren beschreiben sie als Intoleranz. Es existiert also keine einheitliche Definition der Pseudoallergie.

Einig ist man sich über die Tatsache, dass bei Pseudoallergien Hinweise auf eine Beteiligung des Immunsystems wie eine IgE Erhöhung fehlen, die Effektorsysteme aber ähnlich sind. So zeigt die häufigste Form der Pseudoallergie Symptome einer Immunreaktion vom Soforttyp und manifestiert sich meist am Respirationstrakt [91]. Eine häufige Form der Pseudoallergie ist die Reaktion auf Acetylsalicylsäure, deren Ursache noch unklar ist. Busse konnte bei dieser Reaktion einen Zusammenhang der asthmatischen Reaktion und der Produktion von Leukotrien B<sub>4</sub> nachweisen [15]. Eine mögliche Erklärung wäre die durch Cyclooxygenase-2-Hemmer verursachte Blockung der Cyclooxygenase. Durch die Blockierung des Enzyms wird das Substrat Arachidonsäure nicht mehr weiter verstoffwechselt und es steht somit vermehrt zur Leukotrienproduktion zur Verfügung, es resultiert eine erhöhte Konzentration von z.B. LT-B<sub>4</sub> welches ein hohes bronchokonstriktorisches Potenzial aufweist. Letztlich sind noch viele Fragen zu diesem Thema offen und bedürfen weiterer Klärung.

### **1.2.5 Phthalate als inhalative Noxen**

Mit dem zunehmenden Grad der Industrialisierung kamen und kommen vor allem die dort berufstätigen Menschen mit einer Vielzahl von chemischen Verbindungen in Berührung. Bei geeigneter Beschaffenheit können diese Substanzen inhaliert werden und sind in der Lage verschiedene Effekte am Respirationstrakt hervorzurufen. Dazu gibt es verschiedene Voraussetzungen, die den Schweregrad der Schädigung und ihren Wirkort beeinflussen. Zum einen bestimmt der Aggregatzustand im Wesentlichen den Sedimentationsort. Je kleiner der Partikel ist, desto tiefer kann er inhaliert werden. Die Wasserlöslichkeit beeinflusst ebenfalls den Ort der Schädigung, wasserlösliche Gase wirken eher am oberen, wasserunlösliche eher am unteren Atemtrakt. Allerdings können auch hohe Dosen einer gut wasserlöslichen Substanz bis in die unteren Atemwege gelangen [76]. Insgesamt haben Nowak und Angerer die Schädigungsmechanismen in sechs Gruppen unterteilt:

Schädigung nach Inhalation	Noxe und Art der Schädigung
Akute toxische Bronchitis	neutrophile Granulozyten Entzündungsmediatoren (Histamin, Leukotriene, Prostaglandine etc.) Häufig gesteigerte Reaktionsbereitschaft der Irritant-Rezeptoren gegenüber unspezifischen Noxen wie kalter Luft etc.
Akute toxische Tracheitis	
Bronchokonstriktion	„Reactive Airways Dysfunction Syndrome“ [12] gesteigerte unspezifische Atemwegempfindlichkeit
Bronchiolitis obliterans	restriktive Ventilationsstörung fibrinöses Exsudat der Bronchiolen mit Fibroblastenwachstum
Schäden im Alveolarbereich	bei schlecht wasserlöslichen Gasen intraalveoläres Ödem, Schädigung der Alveolarmakrophagen: geschwächte Immunabwehr
Lungenödem	bei lipophilen Noxen Lungenparenchymschäden mit gesteigerter vaskulärer Permeabilität Übergang in Bronchiolitis obliterans möglich

Abb. 5 Schäden durch inhalative Noxen am Respirationstrakt

Im Bereich der Arbeitsmedizin werden Phthalsäureanhydride als inhalative Reizstoffgifte angesehen; sie kommen zum Beispiel in der Kunststoffindustrie und in lackverarbeitenden Betrieben vor [28].

Es ist bekannt, dass sie rhinitische Beschwerden und asthmatische Zustände hervorrufen können. Wohl aus diesen Gründen gelten sie als Gefährdung für eine Berufskrankheit nach Bk 4302. Also „durch chemisch-irritativ oder toxisch wirkende Stoffe verursachte obstruktive Atemwegserkrankungen, die zur Unterlassung aller Tätigkeiten gezwungen haben, die für die Entstehung, die Verschlimmerung oder das Wiederaufleben der Krankheit ursächlich waren oder sein können“ (Seite 219). Ursächlich kann teilweise laut Nowak und Angerer bei Exposition ein allergischer Pathomechanismus zu Grunde gelegt werden, der einer Typ-1 Reaktion entspricht.

### **1.3 Fragestellung**

Jungclas et al konnte in seinen Versuchen im Mausmodell beweisen, dass DEHP die Lungenfunktion beeinträchtigt. DEHP als Phthalat stand zu diesem Zeitpunkt schon längere Zeit unter Verdacht, toxische Einflüsse auf verschiedene Organsysteme zu haben. Auch aus diesem Grund entwickelte BASF den neuen Weichmacher Hexamoll® DINCH. Es stellt sich nun die Frage, ob auch dieser neue Weichmacher, der nicht zur Gruppe der Phthalate, sondern zu der der Cyclohexanen gehört, Auswirkungen auf die Lungenfunktion aufweist. Hierzu wurde der Versuchsaufbau den Jungclas et al in seinen Experimenten genutzt hat, aufgegriffen und die Versuchsreihe noch einmal mit DEHP und zusätzlich mit DINCH und DINP durchgeführt [51] [52]

Ziel war es, im Tierversuch mit weiblichen BALB/c Mäusen herauszufinden, ob unter Langzeitexposition des neuen Weichmachers DINCH ähnliche Beeinträchtigungen der Lungenfunktion, insbesondere der methacholin-induzierten Atemwegsreagibilität zu finden sind, ähnlich derer die man bei DEHP sehen kann.[53] Dazu wurden die Weichmacherdosen aus toxikologischen Vorversuchen übernommen, die bereits an dem zu untersuchenden Mäusestamm vorgenommen worden waren [61]

## 2 Material und Methoden

### 2.1 *Versuchstiere und Versuchstierhaltung*

Für diese in-vivo Studie wurden weibliche BALB/c- Mäuse (Harlan Winkelmann, Borchel, D) im Alter von 6 - 8 Wochen verwendet.

Die Tierhaltung erfolgte unter keimarmen Bedingungen bei einer Raumtemperatur von 20°C und konstanter Luftfeuchtigkeit in einzeln belüfteten Käfigen mit maximal jeweils 4 Tieren pro Käfig. Das Futter der Tiere bestand aus ovalbuminfreiem Wasser und Futter ad libidum. Die hier beschriebenen Tierexperimentellen Untersuchungen wurden durch das Regierungspräsidium Gießen durch Antrag V54-19 c 20/15 (1) MR 20/13 Nr. 55/2004 „Mögliche Auswirkungen von Phthalaten und Phthalatmetaboliten auf den Organismus“ genehmigt. Anhand der von Scharmann und Teutsch formulierten Richtlinien [148] erfolgte die ethische Abwägung.

### 2.2 *Induktion einer Atemwegsreaktion durch Langzeitexposition mit DEHP, DINP, DINCH und PBS*

Die Mäuse wurden in vier Gruppen unterteilt. 5 Tiere konnten der PBS-Gruppe zugeteilt werden. Die DEHP Gruppe enthielt 6, die Gruppen für DINCH und DINP jeweils 7 Tiere. Die Haltung in den Käfigen erfolgte nach dieser Gruppenzugehörigkeit.

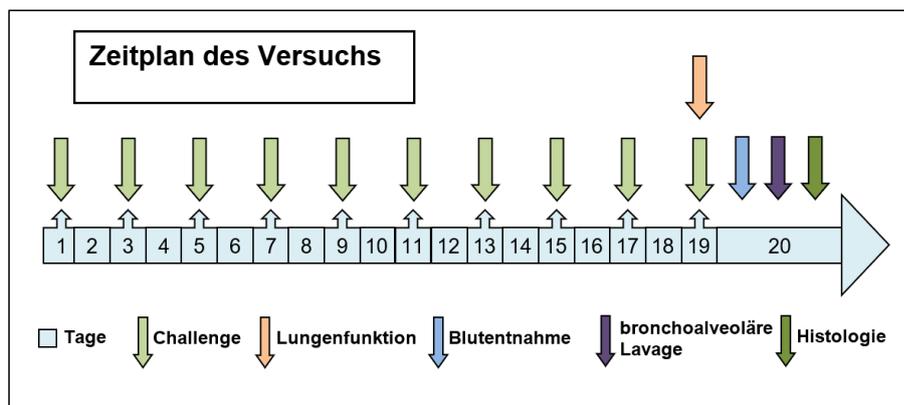


Abb. 6 Zeitplan des Versuchs

Im Abstand von zwei Tagen inhalierten die Mäuse analog ihrer Gruppenzugehörigkeit jeweils 20 Minuten lang mit der jeweiligen Substanz, also DEHP, DINCH, DINP oder PBS.

Hierzu wurden die Tiere in einen verschließbaren Plexiglaskasten verbracht, der über eine Anschlussvorrichtung für das Einleiten des jeweiligen Inhalationsgemisches verfügte. Der Ansatz bestand aus 5 ml PBS mit jeweils 10 µl (=10mg) des zugehörigen Weichmachers bzw. PBS. Dieses Substanzgemisch wurde mittels eines Generators (PARI® Master, Pari, Starnberg, D) vernebelt und in die Käfige geleitet [106].

Die Tiere inhalierten für 20 Tage, jeweils alle 48 Stunden. Nach der letzten Inhalation erfolgte nach 24 Stunden die Lungenfunktionsmessung, 6 h später eine weitere Inhalation und eine Blutabnahme. Nach weiteren 24 Stunden wurden die Tiere getötet und die Lungen zur weiteren Untersuchung seziiert.

### **2.3 Lungenfunktionsmessung**

Die Lungenfunktion der Tiere wurde mittels Head-out-Body-Plethysmographie untersucht [106].

Bei diesem Untersuchungsaufbau befindet sich die Maus mit ihrem Körper im Plethysmographen, der mit einem Ableitungsrohr versehen ist, während ihr Kopf durch eine luftdicht verschlossene Halskrause heraus in das Lumen einer 2,5 Liter großen Gasexpositions-kammer herausragt. Die Halskrause erhält ihre Luftdichte durch die Benutzung von Latex-Kofferdam. Mit dieser Apparatur ist es möglich, vier Tiere gleichzeitig zu messen, da es vier Einführungsöffnungen für die Plethysmographen in die Expositions-kammer gibt. Die Expositions-kammer kann mittels eines Eingangs belüftet und mit verschiedenen Aerosolen bestückt werden. Die Mäuse atmen dieses Gemisch ein und die jeweilige Wirkung auf die Lungenfunktion kann direkt gemessen werden. Die Abluft wird unter einem kontinuierlichen Luftstrom mit einer Membran-Vakuum-Pumpe abgesaugt.

Während der Atmung des Tieres wird durch die Bewegung des Brustkorbes die Luft in der Kammer komprimiert (Expiration) oder gedehnt (Inspiration).

Dadurch entsteht in dem Ableitungsrohr des Plethysmographen ein Luftstrom, welcher von einem angeschlossenen Pneumotachographen (PTM 378/1.2. Hugo Sachs Elektronik, March Hugstetten) registriert und von einem Differenzdruckwandler abgeleitet wird. Der Druck in der Kammer entspricht den Fluktuationen am Tachographen und ist der Atemstromstärke proportional.

Das vom Tier ausgehende so gemessene Atemflusssignal wird von einem Potentiometer verstärkt und simultan an ein Oszilloskop sowie an einen PC zur Datenanalyse weitergeleitet.

Die weitere Analyse und Speicherung der Daten erfolgt unter Zuhilfenahme einer NOTOCORD hem 3.5 Software (Notocord, Paris, F).

Zu Beginn der jeweiligen Messung wird für 15 Minuten die Baseline  $X \pm SD$  für den EF50 ermittelt. Man ermittelt also unter Ruhebedingungen und ohne Exposition der später benutzten Provokationslösung. Die Daten, die in diesen 15 Minuten ermittelt werden, werden gemittelt und als Wert 100 festgelegt. Die so entstandenen Kontrolldaten werden bei der eigentlichen Messung als Baseline mit den Werten verglichen, die unter Exposition mit der Provokationslösung auftreten. Die Erfassung der Abweichung erfolgt prozentual.

Nach Bestimmung der Baseline erfolgt die Exposition mit MCh-Lösung ( $\beta$ -Methyl-Acetylcholin, Sigma, Stainheim, D) für jeweils 70 Sekunden alle 5 Minuten in den aufsteigenden Dosierungen 0 mg/ml, 12,5 mg/ml, 25 mg/ml, 50mg/ml, 75 mg/ml, 100 mg/ml und 125 mg/ml in PBS. Die Lösung wird in aerosoler Form in die Expositionskammer geleitet. Dabei werden die Lungenfunktionsparameter kontinuierlich weiter ermittelt.

Der Untersuchungsgang wird für jede einzelne Maus vor abgelaufener Zeit dann abgebrochen, wenn die Lungenfunktion des Tieres unter 50% der Baseline fällt.

Die Konzentration bei der eine 50%ige Verminderung zum Wert der Baseline führt, wurde für jedes einzelne Tier notiert. Sie gilt als direktes Maß der Hyperreagibilität der Atemwegsmuskulatur.

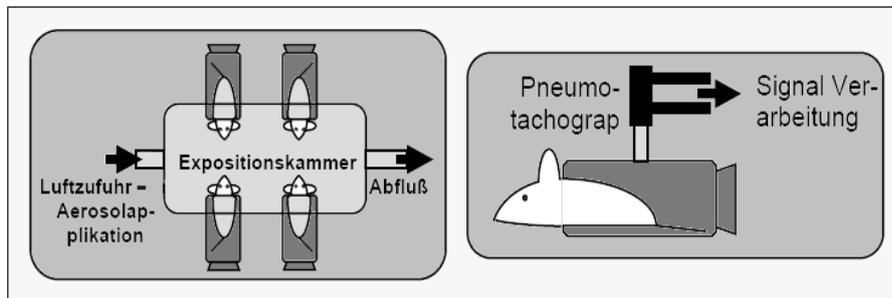


Abb. 7 Schema Expositions-kammer [52]

## 2.4 Gewinnung von Probenmaterial

### 2.4.1 Gewinnung von Serumproben

Vor der Blutentnahme werden die betreffenden Tiere für ca. 10 Minuten in einen Wärmeinkubator bei 60°C verbracht. Unter diesen Bedingungen kommt es zu einer Gefäßdilata-tion vor allem der Schwanzvene, so dass die Gefäßdurchblutung der Peripherie bei den Tieren zunimmt.

Nach Rücknahme aus dem Inkubator wird nun die Schwanzvene mithilfe eines sterilen Einmalskalpells angeritzt und maximal 0,5 ml Blut entnommen.

Anschließend inkubiert man die Proben bei Raumtemperatur für 3 Stunden bis zum völligen Gerinnen des Blutes. Danach schließt sich die Zentrifugation für 20 Min bei 2000 U/min an, um anschließend den Serumüberstand abzupipettieren. Die Lagerung des so gewonnenen Serums erfolgt bis zur Analyse bei -20°C.

### 2.4.2 Bronchoalveoläre Lavage

Die bronchoalveoläre Lavage (BAL) ist ein Verfahren zur Gewinnung von Zellen und Proteinen, die sich im bronchoalveolären Lumen befinden.

Zunächst wurden die Tiere mittels Zervikaldislokation getötet und anschließend die Trachea freipräpariert. Es erfolgte eine Tracheotomie mit Einführung einer Spritzennadel. Über diese wurde ein Proteaseinhibitor (Inhibitor complete TM Mini, Roche, Mannheim, D) eingespritzt und wieder abgesaugt, die so gewonnene Suspension wird im Anschluss für 5 Minuten bei 500 g und 4°C

zentrifugiert. Der Überstand wird abgenommen und bis zur weiteren Analyse bei -20°C gelagert.

## **2.5 Zellzählung und Differenzierung von Leukozytenpopulationen der BAL**

Die Zellzahlbestimmung der BAL erfolgte mittels CASY® TT Zellzählssystem (Schärfe System, Reutlingen, D). Vor der eigentlichen Messung erfolgte eine Verdünnung der Probe von 1:2000 mit CASY®ton-Lösung (Schärfe System, Reutlingen),

Zur Differenzierung der Leukozyten in der BAL wurde eine 50 µl Probe zunächst auf 150 µl PBS verdünnt und anschließend eine Zytozentrifugation für 5 Minuten bei 320 g durchgeführt (Zytozentrifuge Cytospin 3, Shandon, Frankfurt, D). Die in der Probe befindlichen Zellen wurden dabei auf einen Objektträger (76 mm x 25 mm, Mattrand, Marienfeld, D) zentrifugiert. Nach der anschließenden Trocknung von 30 Minuten erfolgte die Färbung der Präparate mit Diff-Quik®-Lösung (Dade-Behring, Marburg, D). Bei 400-facher Vergrößerung wurden anschließend die Zellen nach morphologischen Kriterien differenziert. Wobei zweimal je 100 Zellen ausgezählt wurde.

## **2.6 Lungenhistologie**

Zur Präparation der Lungen wurden diese über die Trachea mit 4% Formaldehyd in situ fixiert. Danach erfolgte die Entfernung der Lunge, welche anschließend in 4% Formaldehyd gelagert wurde. Die so fixierten Organe wurden dann in Paraffin eingelegt und mittels eines Mikrotoms (Accu-Cut® SRM™ 200 Rotary Microtome, Sakura, J) in 5 µm starke Dünnschnitte geschnitten.

### **2.6.1 HE Färbung**

Die Schnitte wurden mit Hämatoxilin (hämatoxilin II nach Gill, Merck, Darmstadt, D) und Eosin (Eosin G, Merck, Darmstadt, D) gefärbt, um einen

Gesamtüberblick über den histologischen Aufbau und eventuelle pathologische Veränderungen zu bekommen.

### **2.6.2 PAS Färbung**

Zusätzlich wurden, um eine vermehrte Mukusproduktion nachweisen zu können, die Schnitte auch einer Perjodsäure-Schiff-Färbung (PAS-Färbekit, Merck, Darmstadt, D) unterzogen. Die Mukusbestandteile färben sich in dieser Methode leuchtendrot an. Die Gegenfärbung dieser Schnitte erfolgt mit Hämatoxilin.

### **2.7 Konzentrationsbestimmung von Immunglobulinen mittels Enzyme-linked-Immuno-Sorbent-Assay (ELISA)**

Die Serumkonzentration der Immunglobuline der Subklassen IgE gesamt wurden mittels direktem Sandwich-ELISA gemessen. Hierzu wurde zunächst eine Flachbodenmikrotiterplatte (NUNC Immuno Maxisorp Module, Cat.Nr.: 469264 Michael S. 32) mit dem Primären Fang-Antikörper Anti-Maus-IgE beschichtet (Anti-Maus-IgE, Binding site, Cat.Nr.PCF284.U) und über Nacht bei 4°C inkubiert.

Um die Proben zu inkubieren, wurde am darauffolgenden Tag die beschichtete Platte mehrmals nach Verwerfen der Lösung mit einem Waschpuffer (PBS-Tween 0,1%, Merck, Darmstadt, D) gewaschen um dann die Platte mit einem Blocking-Puffer (3% Bovines Serum Albumin, Sigma, Stainheim, D) zu bestücken. Diese Inkubation fand bei Raumtemperatur für zwei Stunden statt. Als nächstes erfolgte die Verdünnung der Serumproben 1:100. Danach wurden jeweils 50 µl der Verdünnung und der IgE-Standards (Purified Mouse IgE, Pharmingen, Hamburg, D) auf die Platte aufgetragen. Die Konzentration der Standards lag bei 250 ng/ml; 125 ng/ml; 62,5 ng/ml; 31,25 ng/ml; 15,63 ng/ml; 7,81 ng/ml; 3,91 ng/ml; 1,95 ng/ml, 0,98 ng/ml; und 0,49 ng/ml. Die ebenfalls aufgetragenen Leerproben „Blanks“ enthielten lediglich PBS-Tween 0,1%.

Im Anschluss daran wurde die Platte erneut für zwei Stunden inkubiert. Danach erfolgte ein dreimaliger PBS-Tween-Waschvorgang mit anschließender Bestückung der Platte mit jeweils 50 µl biotinyliertem anti-Maus IgE (Biotin rat

anti-mouse IgE, Pharmigen, Hamburg, D) das nach Verdünnung mit PBS-Tween eine Konzentration von 2,5 µg/ml aufwies. Nach erneuter 2-stündiger Inkubation wurde die Platte wieder dreimal gewaschen um dann mit 50 µl verdünnter Streptavidin-Peroxidase-Lösung (1:1000 in PBS, Sigma, Steinheim, D) bestückt zu werden. Es folgte eine 30 min. Inkubationszeit im Dunkeln, um die Platte anschließend wieder mit PBS-Tween 0,1% zu waschen. Anschließend wurde pro Vertiefung jeweils 150 µl auf Raumtemperatur erwärmte Substratlösung (BM Blue POD Substrate, Roche, Mannheim, D) zugegeben. Nach weiterer Inkubationszeit im Dunkeln wurde der beobachtete Farbumschlag mittels 50 µl 2 M H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> abgestoppt. Das Ergebnis wurde direkt anschließend mittels photometrischer Messung in einem Absorptionsphotometer (Messfilter 450 nm, Tecan Sunrise, Salzburg, A) bestimmt. Die Auswertung der gewonnenen Daten erfolgte mit der Photometersoftware Magellan 2 (Tecan, Salzburg, A).

## **2.8 Bestimmung von Leukotrien B4 aus Serum mittels Enzym-Immuno-Assay (EIA)**

Die Leukotrien B4 Bestimmung erfolgt mittels des Enzym-Immuno-Assay-Kits der Firma Cayman Chemical Company (Ann Arbor, Michigan, USA) nach den Angaben des Herstellers. Die Durchführung erfolgt ähnlich eines ELISAs. Die einzelnen Kavitäten der EIA-Platte werden mit 50 µl Probe bzw. Standard, 50 µl Leukotrien B4, AChE Tracer und 50 µl Leukotrien B4 Antiserum befüllt und bei 4°C über Nacht inkubiert. Die Farbreaktion wird nach dem Waschen der Platte mittels je 200 µl Ellman's pro Kavität ausgelöst. Bei 2 Stunden Inkubationszeit unter Lichtausschluss kann anschließend die Platte bei 405 nm am ELISA-Photometer ausgelesen werden.

## **2.9 Statistische Methoden**

In der vorliegenden Arbeit wurde ein Zwei-Stichproben T-Test verwendet um die Kontroll- mit der Weichmacherguppe vergleichen zu können. Ferner erfolgte nach der einfaktoriellen Varianzanalyse die Anwendung der ANOVA

(s.u.) gefolgt von einem multiplen T-Test-Vergleich unter Berücksichtigung der Korrektur nach Bonferroni.

### **2.9.1 Einfaktorielle Varianzanalyse und ANOVA**

Der Begriff ANOVA steht für Analysis of Variance, es handelt sich dabei um ein statistisches Verfahren zur Untersuchung, ob sich die Mittelwerte von verschiedenen Untersuchungsgruppen unterscheiden. Bei einer ANOVA ist es möglich, mehrere Gruppen auf statistische Signifikanzen zu prüfen. Dazu ist es primär erforderlich, festzustellen, ob die Verschiedenheit der einzelnen Ergebnisse in den Gruppen abgesehen von der immer bestehenden Fehlervarianz, zusätzlich eine Effektvarianz aufweist. Ist dies der Fall, liegt eine tatsächliche Ungleichheit der Mittelwerte vor. Zur Berechnung der Schätzer- und Fehlervarianz ist eine einfaktorielle Varianzanalyse notwendig, hiermit kann man feststellen, ob eine Varianzhomogenität vorliegt. Diese ist die Voraussetzung für die weitere Berechnung. Man führt einen Test auf Abweichung von Varianzhomogenität durch, ist er nicht signifikant, kann man von einer homogenen Verteilung ausgehen. Nun kann man mit dem F-Test berechnen, ob eine tatsächliche Mittelwertabweichung vorliegt. Hierbei wird die Summe der Schätzer-Fehlervarianz und der Effektvarianz durch die Schätzer-Fehlervarianz dividiert. Das Ergebnis ergibt den berechneten F-Wert. Dieser wird nun mit dem kritischen F-Wert (der aus einer Tabelle anhand des Signifikanzniveaus und den Freiheitsgraden abgelesen wird) verglichen. Ist der berechnete F-Wert  $\geq$  kritischer F-Wert, liegt eine Signifikanz vor.

### **2.9.2 T-Test**

Zum Erkennen eines wesentlichen Mittelwertunterschieds bei verschiedenen Versuchsgruppen wird der T-Test angewendet.

Im vorliegenden Versuch wurde der unabhängige, Zweistichproben T-Test durchgeführt, der die Mittelwerte von zwei Versuchsreihen auf Mittelwertunterschiede vergleicht. Unter der Voraussetzung einer gleichen Varianz erfolgten dann multiple T-Tests der einzelnen Gruppen.

### **2.9.3 Bonferroni-Korrektur**

Die Bonferroni- Korrektur dient der Anpassung des Alpha-Niveaus von statistischen Tests zur Minimierung eines Fehlers 1. Ordnung, also zur Vermeidung von einer hohen Anzahl falsch positiver Ergebnisse. Im Grunde werden die gleichzeitig durchzuführenden statistischen Tests durch das ursprüngliche Alphaniveau dividiert. Bei z.B. 3 Tests und  $p = 0,05$  sind dies dann  $0,01667$ , bei vier Tests  $0,0125$ . Es gilt dann nunmehr, dass man die Nullhypothese nur bei  $p < 0,01667$  bei 3 Tests bzw  $p < 0,0125$  bei 4 Tests verwerfen kann.

## **3 Ergebnisse**

### **3.1 *Ergebnisse der Lungenfunktionsmessung***

Bei der Lungenfunktionsmessung wurde die Menge an Metacholin (MCh) gemessen, bei der die Versuchstiere eine 50%tige Verminderung des Expirationsflusses zeigten.

Zunächst wurden die Messergebnisse einer einfaktoriellen Varianzanalyse unterzogen, da der T-Test mit  $0,042$  wesentlich war, erfolgten die weiteren Berechnungen

Die PBS-Kontrollgruppe zeigte bei einem Mittelwert von  $137 \text{ mg/ml}$  MCh eine Reduzierung von 50% des Expirationsflusses bei einer Standardabweichung von  $14 \text{ mg/ml}$  und einem SEM-Wert von  $5 \text{ mg/ml}$ .

Bei den Versuchstieren der DINCH-Gruppe lag der Mittelwert bei  $132 \text{ mg/ml}$  MCh, mit einer Standardabweichung von  $29 \text{ mg/ml}$  und einem SEM-Wert von  $12 \text{ mg/ml}$ . Das T-Test-Ergebnis lag dementsprechend bei  $0,78$ .

Der Mittelwert der Versuchstiere der DINP-Gruppe zeigte eine Höhe von  $102 \text{ mg/ml}$  MCh zur Reduktion des Atemflusses auf 50%. Die Standardabweichung lag bei diesen Tieren bei  $27 \text{ mg/ml}$  mit einem SEM-Wert von  $11 \text{ mg/ml}$ . Der T-Test ergab einen Wert von  $0,046$ .

Die Tiere in der DEHP-Gruppe erlitten im Mittel bei  $80 \text{ mg/ml}$  MCh die angestrebten Einschränkungen der Expirationskapazität. Die Standardabweichung für diese Gruppe betrug  $28 \text{ mg/ml}$  und der SEM-Wert

berechnete sich auf 10 mg/ml. Der T-Test in Bezug auf die Kontrollgruppe ergab den signifikanten Wert von 0,004.

Im direkten Vergleich der DEHP- und DINCH-Weichmachergruppe betrug der T-Test 0,007; bei DEHP und DINP 0,17 und bei DINCH gegen DINP 0,09. Die multiplen Mittelwertvergleiche zeigten zusammenfassend folgende T-Test-Ergebnisse:

<u>PBS vs. DINCH:</u>	p 0,78	<u>DINCH gegen DINP:</u>	p 0,09
<u>PBS vs. DINP:</u>	p 0,046	<u>DINCH vs. DEHP:</u>	p 0,007
<u>PBS vs. DEHP:</u>	p 0,0043	<u>DINP vs. DEHP:</u>	p 0,17

*Ergebnisse: Lungenfunktionsmessung, multipler T-Test-Vergleich*

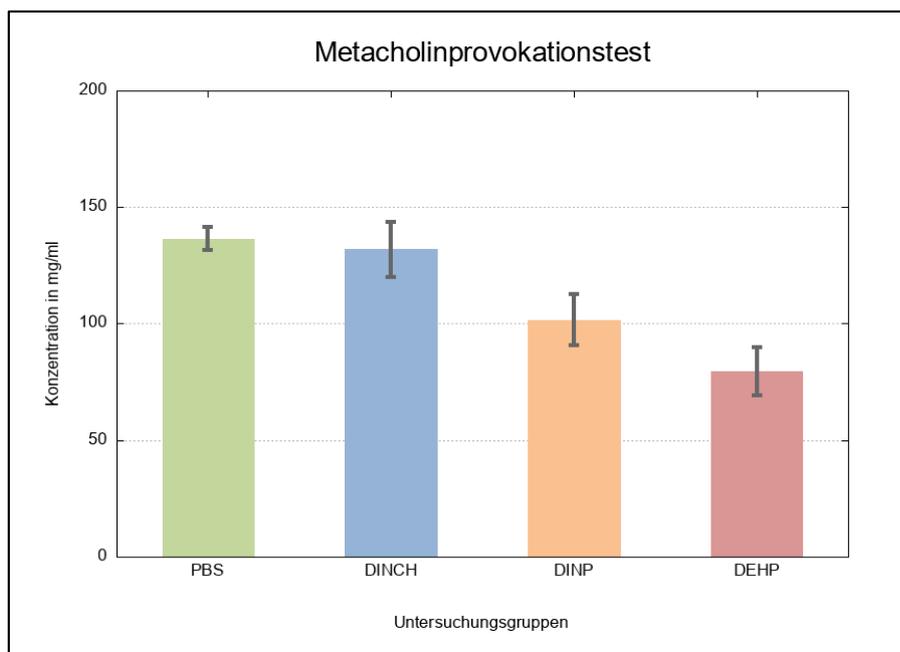


Abb. 8 Ergebnisse Atemwegshyperreagibilität unter Metacholininhalation

### 3.2 Serumproben

### 3.2.1 IgE-gesamt

Es wurden die IgE- gesamt- Werte von Serumproben der DEHP- Gruppe, der DINCH- Gruppe und der DINP- Gruppe ermittelt und jeweils mit den Ergebnissen der PBS- Gruppe verglichen.

In der einfaktoriellen Varianzanalyse stellte sich  $p = 0,11$  dar. Die T-Teste in den einzelnen Kontroll-Weichmachergruppen-Vergleichen ergaben folgende Werte:

Bei der PBS-Gruppe betrug der Mittelwert 490 ng/ml, die Standardabweichung 256 ng/ml und der SEM-Wert 128 ng/ml.

Die DINCH- Gruppe zeigte einen Mittelwert von 688 ng/ml. Die Standardabweichung der Gruppe betrug dementsprechend 259 ng/ml, der SEM- Wert belief sich auf 108 ng/ml. Das Ergebnis des T-Tests viel auf 0,27.

Die DINP- Gruppe hatte einen Mittelwert von 378 ng/ml bei einer Standardabweichung von 84 ng/ml, einem SEM- Wert von 34 ng/ml und einem dementsprechenden T-Test von 0,34.

Bei der DEHP- Gruppe ergab sich ein Mittelwert von 579 ng/ml, eine Standardabweichung von 211 ng/ml und ein SEM- Wert von 86 ng/ml. Der T-Test bezogen auf die Ergebnisse der PBS- Gruppe lag bei 0,56.

Beim Vergleich DINCH gegen DINP bot sich ein Wert von 0,019, DINCH zu DEHP 0,44 und letztlich DINP zu DEHP 0,05

<u>PBS vs. DINCH:</u>	p 0,0,27	<u>DINCH gegen DINP:</u>	p 0,019
<u>PBS vs. DINP:</u>	p 0,34	<u>DINCH vs. DEHP:</u>	p 0,44
<u>PBS vs. DEHP:</u>	p 0,56	<u>DINP vs. DEHP:</u>	p 0,054

*Ergebnisse: IgE-gesamt, multipler T-Test-Vergleich*

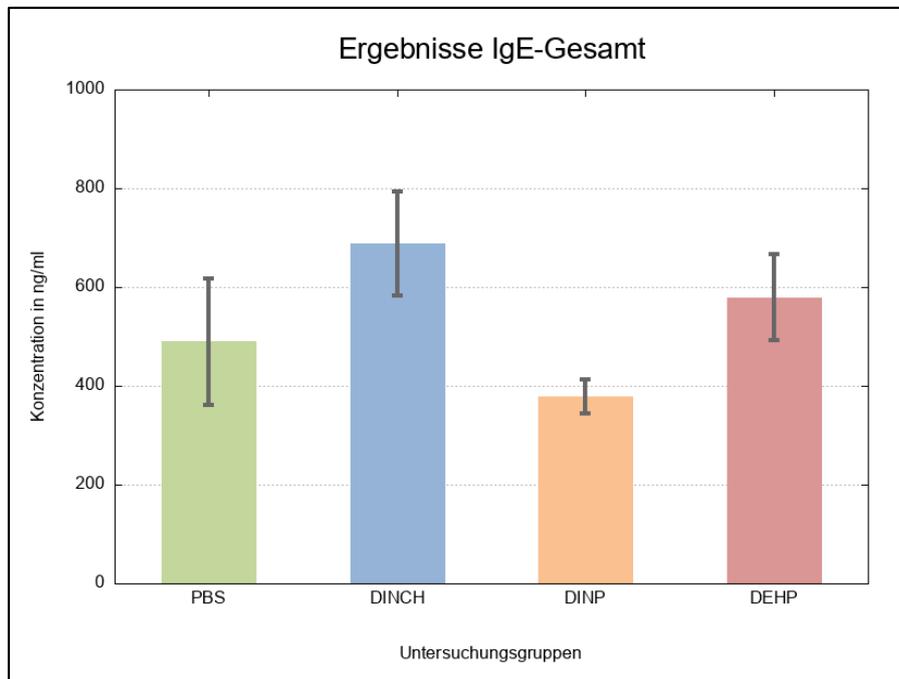


Abb. 9 Ergebnisse IgE- Gesamt, Serumproben

### 3.2.2 Leukotrien B4 (LT-B4)

Die Serumproben der Kontrollgruppe PBS im Vergleich mit denen der Weichmacher Gruppen DEHP, DINCH und DINP lieferten folgende Werte:

Der mittlere LT-B4 Spiegel der PBS-Gruppe betrug 52 pg/ml bei einer Standardabweichung von 27 pg/ml. Der SEM-Wert berechnete sich demnach auf 15,6 pg/ml.

Bei der DINCH-Gruppe zeigte sich ein Mittelwert von 21 pg/ml /ml mit einer Standardabweichung von 9 pg/ml und einem SEM-Wert bei 5,4 pg/ml. Bezogen auf die PBS-Gruppe zeigte sich ein T-Testergebnis von 0,13.

Der Mittelwert der DINP-Gruppe berechnete sich auf 100 pg/ml und eine Standardabweichung von 64 pg/ml. Daraus ergab sich ein SEM-Wert, welcher bei 32 pg/ml lag. Der T-Test bezogen auf die Kontrollgruppe lag somit bei 0,29.

Die Vergleichsgruppe der DEHP-Tiere enthielt im Mittel 120 pg/ml LTB4, bei einer Standardabweichung von 45 pg/ml und einem SEM-Wert in Höhe von 17. Diese Daten ergaben einen T-Test-Wert von 0,045.

Bei der einfaktoriellen Varianzanalyse zeigte sich der T-Test  $p = 0,029$ , in den multiplen Mittelwertvergleichen konnten in der DEHP gegen DINCH Gruppe mit 0,007, DEHP gegen DINP 0,59 und DINP gegen DINCH 0,09 dargestellt werden.

<u>PBS vs. DINCH:</u>	p 0,13	<u>DINCH gegen DINP:</u>	p 0,09
<u>PBS vs. DINP:</u>	p 0,29	<u>DINCH vs. DEHP:</u>	p 0,0067
<u>PBS vs. DEHP:</u>	p 0,046	<u>DINP vs. DEHP:</u>	p 0,58

Ergebnisse: Leukotrien B4, multipler T-Test-Vergleich

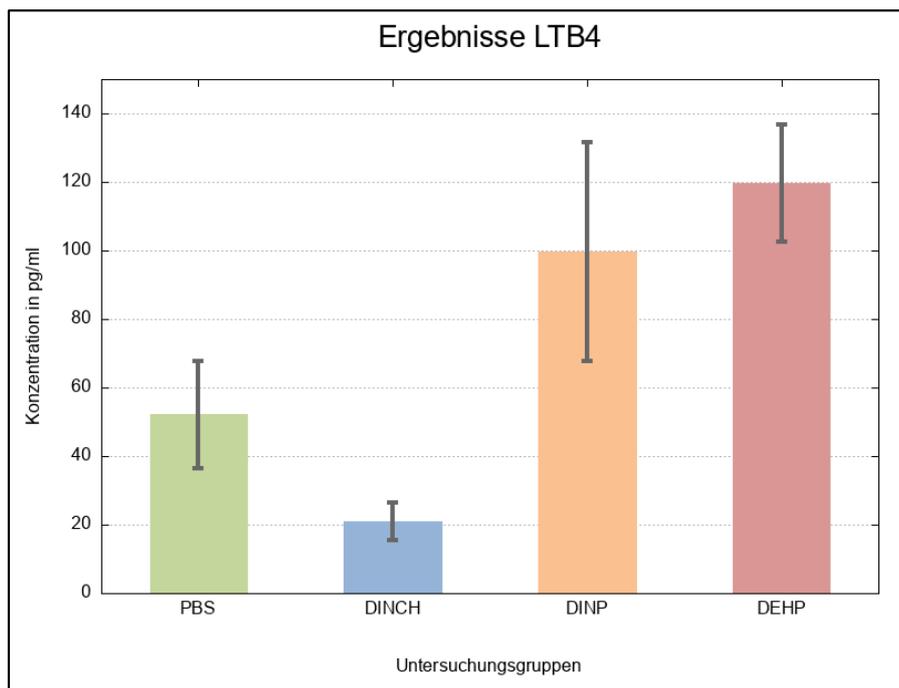


Abb. 10 Ergebnisse der Serumproben, LTB4

### 3.2.3 Nerve Growth Factor (NGF)

Die NGF- Serenwerte der Gruppen DEHP, DINCH, DINP wurden ebenfalls mit denen der PBS- Kontrollgruppe verglichen.

Die PBS- Gruppe zeigte einen Mittelwert von 1445 pg/ml, eine Standardabweichung von 1064 pg/ml und einen SEM- Wert in Höhe von 476 pg/ml.

Bei der DINCH- Gruppe zeigte sich ein Mittelwert von 1175 pg/ml, mit einer Standardabweichung von 832 pg/ml und einem SEM- Wert von 314 pg/ml. Bei der Berechnung fiel der T-Test in Höhe von 0,7 aus.

Die Messung der DINP- Gruppe ergab einen Mittelwert von 1931 pg/ml mit einer Standardabweichung von 1592 pg/ml und einem SEM- Wert von 650 pg/ml. Auch hier zeigte der T-Test keine signifikanten Werte, er betrug 0,5.

Der Mittelwert der DEHP- Gruppe war 1463 pg/ml, die Standardabweichung erlangte den Wert 813 pg/ml und der SEM- Wert belief sich auf 332 pg/ml, was somit zu einem T-Testergebnis von 0,98 bezogen auf die PBS- Gruppe führte.

Die direkten Gruppenvergleichen lieferten bei DINCH gegen DINP ein Ergebnis von 0,29, DINCH gegen DEHP 0,54 und DINP gegen DEHP 0,53

<u>PBS vs. DINCH:</u>	p 0,56	<u>DINCH gegen DINP:</u>	p 0,29
<u>PBS vs. DINP:</u>	p 0,5	<u>DINCH vs. DEHP:</u>	p 0,54
<u>PBS vs. DEHP:</u>	p 0,97	<u>DINP vs. DEHP:</u>	p 0,53

*Ergebnisse: NGF, multipler T-Test-Vergleich*

Dementsprechend erbrachte die einfaktorielle Varianzanalyse der kompletten Gruppen ein p 0,68.

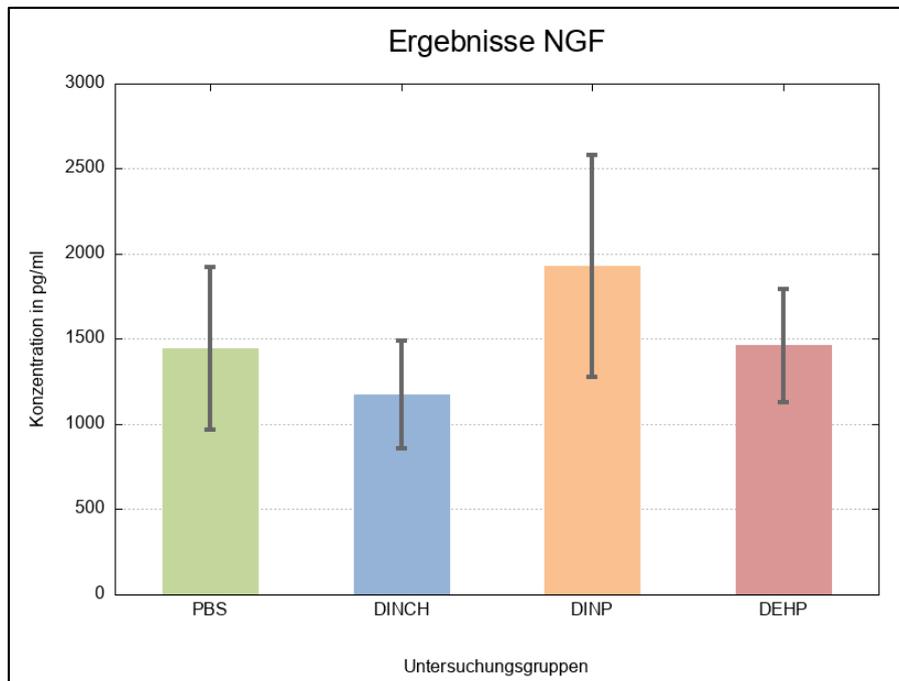


Abb. 11 Ergebnisse NGF-Gruppe, Serumproben

### 3.3 Proben der bronchoalveolären Lavage

#### 3.3.1 Interleukin-4 (IL-4)

Der Vergleich der PBS- Gruppe mit den DEHP-, DINCH- und DINP- Gruppen lieferte folgende Ergebnisse:

Der Mittelwert der Gruppe PBS betrug 19,1 pg/ml, die Standardabweichung zeigte einen Betrag von 17,4 pg/ml bei einem SEM-Wert in Höhe von 7,8 pg/ml. Bei den Daten der DINCH-Tiere ergab sich ein Mittelwert von 33,4 pg/ml und eine Standardabweichung von 23,7 pg/ml mit einem SEM-Wert von 8,9 pg/ml. Bezogen auf die PBS- Gruppe errechnete sich ein T-Test-Ergebnis von 0,28. Die DINP-Gruppe lieferte einen Mittelwert bei 23,6 pg/ml mit einer

Standardabweichung in Höhe von 15,3 pg/ml und einem SEM-Wert bei 5,8 pg/ml. In Bezug auf die Kontrollgruppe zeigte sich ein T-Test von 0,64.

Die Ergebnisse der DEHP Gruppe zeigten einen Mittelwert von 18,1 pg/ml, bei einer Standardabweichung im Vergleich zu den PBS-Tieren von 7,4 pg/ml und einem SEM- Wert in Höhe von 3,3 pg/ml. Dies ergab ein T-Test-Ergebnis von 0,91.

Die direkten Gruppenvergleiche boten bei DINCH gegen DINP 0,5, DINCH gegen DEHP 0,25 und DINP gegen DEHP 0,47.

<u>PBS vs. DINCH:</u>	p 0,28	<u>DINCH gegen DINP:</u>	p 0,5
<u>PBS vs. DINP:</u>	p 0,64	<u>DINCH vs. DEHP:</u>	p 0,25
<u>PBS vs. DEHP:</u>	p 0,91	<u>DINP vs. DEHP:</u>	p 0,47

*Ergebnisse: Interleukin 4, mutipler T-Test-Vergleich*

Die einfaktorielle Varianzanalyse ergab p 0,42.

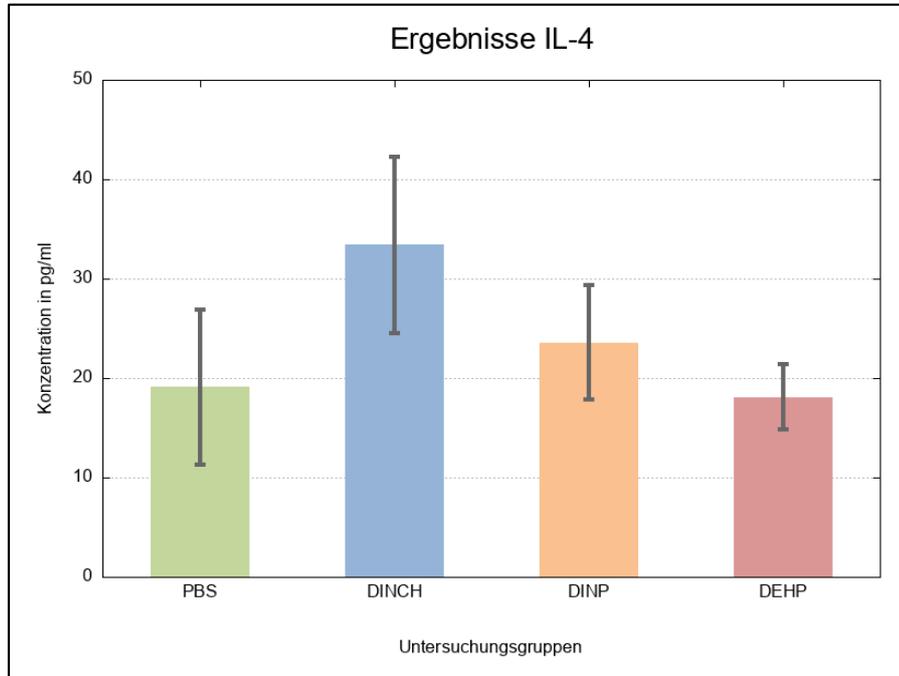


Abb. 12 *Ergebnisse der Interleukin-4 BAL-Proben*

### 3.3.2 Interleukin-5 (IL-5)

Auch hier wurden die Ergebnisse der DEHP-, der DINCH- und der DINP-Gruppe mit denen der Kontrollgruppe verglichen.

Die Kontrollgruppe hatte einen Mittelwert von 5,4 pg/ml, bei einer Standardabweichung in Höhe von 3,0 pg/ml. Der SEM-Wert lag nach diesen Ergebnissen bei 1,4 pg/ml.

Die BAL-Proben der DINCH-Gruppe ergaben einen Mittelwert von 5,1 pg/ml, mit einer Standardabweichung von 1,3 pg/ml und einem SEM-Wert bei 0,59 pg/ml. Der auf die Kontrollgruppe bezogene T-Test berechnete sich hierbei auf 0,82.

Der Mittelwert der DINP- Gruppe belief sich auf 4,6 pg/ml, bei einer Standardabweichung von 0,51 pg/ml und einem SEM- Wert von 0,26. pg/ml Der T-Test in Bezug auf die PBS-Gruppe ergab somit 0,63.

Bei der DEHP- Gruppe ergab sich ein Mittelwert von 5,6 pg/ml und eine Standardabweichung von 2,8 pg/ml. Der SEM- Wert berechnete sich auf 1,3 pg/ml. Im Vergleich zur PBS- Kontrollgruppe zeigte sich ein T-Test-Ergebnis von 0,91.

<u>PBS vs. DINCH:</u>	p 0,82	<u>DINCH gegen DINP:</u>	p 0,6
<u>PBS vs. DINP:</u>	p 0,64	<u>DINCH vs. DEHP:</u>	p 0,7
<u>PBS vs. DEHP:</u>	p 0,9	<u>DINP vs. DEHP:</u>	p 0,51

Ergebnisse: IL-5, multipler T-Test-Vergleich

In der einfaktoriellen Varianzanalyse ergab p 0,91.

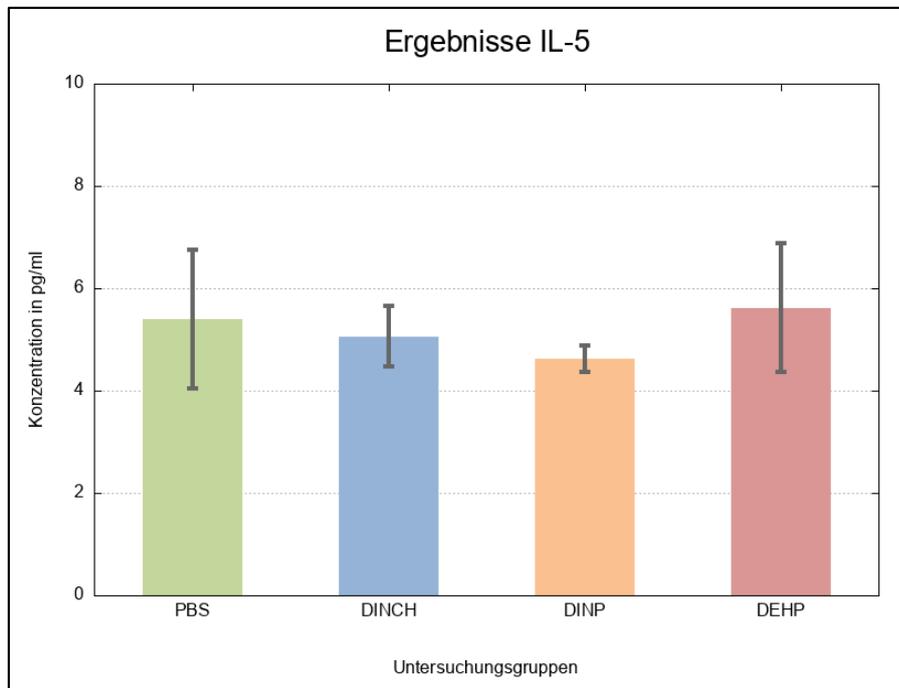


Abb. 13 Ergebnisse der BAL-Proben, Interleukin-5

### 3.3.3 Interleukin-10 (IL-10)

Der Vergleich der Daten der drei Weichmachergruppen in Bezug auf die Kontrollgruppe lieferte folgende Ergebnisse:

Die Kontrollgruppendaten ergaben einen Mittelwert von 18 pg/ml, bei einer Standardabweichung von 9,2 pg/ml und einem SEM- Wert in Höhe von 4,1 pg/ml.

Bei den DINCH- Proben lag der Mittelwert an IL-10 bei 53,3 pg/ml mit einer Standardabweichung von 28,6 pg/ml und einem SEM- Wert von 11,7 pg/ml. Damit errechnete sich ein T-Test-Ergebnis von 0,03 in Bezug auf die PBS- Gruppe.

Die DINP- Gruppe enthielt im Mittel 31,9 pg/ml IL-10, mit einer Standardabweichung von 7,2 pg/ml. Der SEM- Wert lag somit bei 2,7 pg/ml. Dies ergab ein T-Test-Ergebnis von 0,015.

Die Proben der DEHP- Gruppe enthielten im Mittelwert 32,6 pg/ml IL-10, bei einer Standardabweichung von 12,8 pg/ml und einem SEM- Wert in Höhe von 5,7 pg/ml. Der T-Test zeigte dabei ein Ergebnis von 0,07.

<u>PBS vs. DINCH:</u>	p 0,023	<u>DINCH gegen DINP:</u>	p 0,03
<u>PBS vs. DINP:</u>	p 0,015	<u>DINCH vs. DEHP:</u>	p 0,079
<u>PBS vs. DEHP:</u>	p 0,08	<u>DINP vs. DEHP:</u>	p 0,89

Ergebnisse: IL-10, multipler T-Test-Vergleich

Die einfaktorielle Varianzanalyse ergab p 0,019.

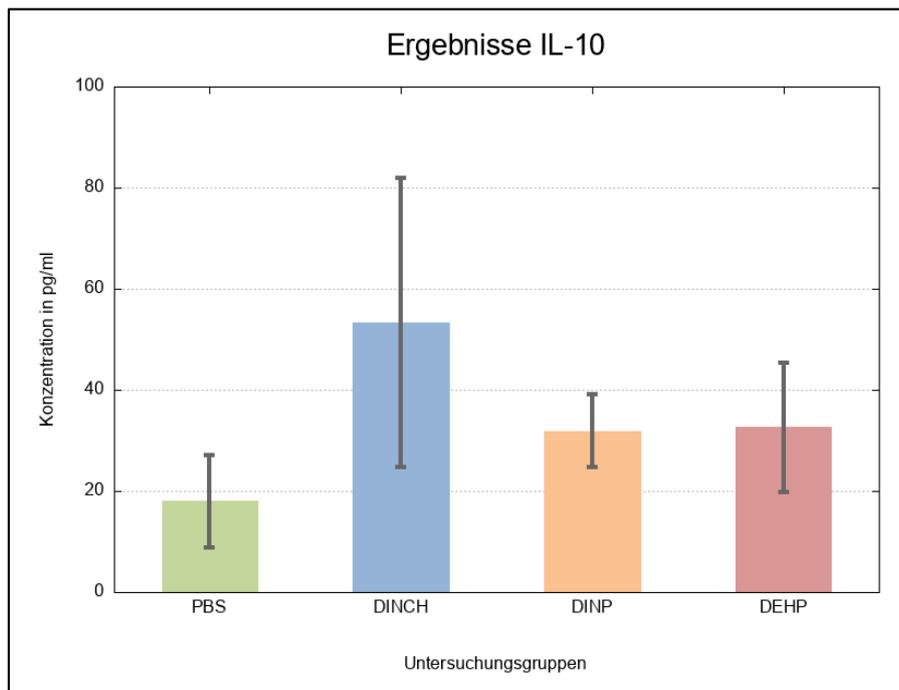


Abb. 14 Ergebnisse BAL- Proben, Interleukin-10

### 3.3.4 Interferon- $\gamma$ (IFN- $\gamma$ )

Im Vergleich der Weichmacherproben mit denen der Kontrollgruppe, ergab sich bei der PBS- Gruppe ein Mittelwert an IFN- $\gamma$  von 28,3 pg/ml mit einer Standardabweichung von 6,9 pg/ml. Dies ergab einen SEM- Wert von 3,4

pg/ml.

Die DINCH- Gruppe enthielt im Mittel 49 pg/ml Interferon- $\gamma$  und hatte eine Standardabweichung von 11,8 pg/ml und einen SEM- Wert von 5,3 pg/ml. Diese Werte ergaben ein T-Test- Ergebnis von 0,02.

Bei der DINP- Gruppe lag der Mittelwert bei 60,7 pg/ml und die Standardabweichung bei 26,6 pg/ml. Der SEM- Wert belief sich auf 10,0 pg/ml. Der darauf berechnete T-Test zeigte ein Ergebnis von 0,04.

Bei der Weichmacherguppe DEHP zeigte sich ein Mittelwert von 50 pg/ml und eine Standardabweichung bei 21,5 pg/ml. Der SEM- Wert belief sich auf 9,6 pg/ml und der T-Test ergab damit 0,1.

In der einfaktoriellen Varianzanalyse ergab sich für alle Gruppen p 0,12.

<u>PBS vs. DINCH:</u>	p 0,02	<u>DINCH gegen DINP:</u>	p 0,38
<u>PBS vs. DINP:</u>	p 0,04	<u>DINCH vs. DEHP:</u>	p 0,93
<u>PBS vs. DEHP:</u>	p 0,1	<u>DINP vs. DEHP:</u>	p 0,47

Ergebnisse: IFN-  $\gamma$ , multipler T-Test-Vergleich

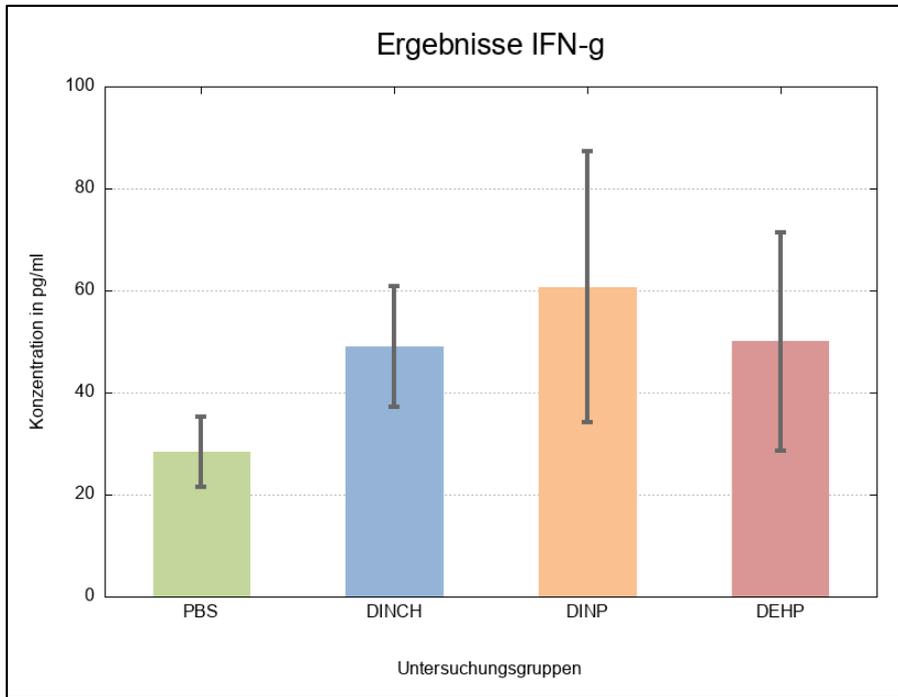


Abb. 15 Ergebnisse BAL-Proben, Interferon- $\gamma$

### 3.4 Ergebnisse der Zellzählung, Bronchoalveoläre Lavage

Bei der bronchoalveolären Lavage (BAL) wurden die gewonnenen Zellzahlen der PBS-Gruppe mit denen der Weichmachergruppen verglichen.

Die Kontrollgruppe zeigte eine mittlere Zellzahl von 38.913, mit einer Standardabweichung von 8989 und einem SEM-Ergebnis von 4.494.

Die DEHP-Gruppe hatte im Mittel 245.968 Zellen mit einer Standardabweichung von 146.357 und einem SEM-Wert von 59.750.

Bei der DINCH-Gruppe zeigte sich in Mittelwert von 282.157 Zellen mit einer Standardabweichung von 315.311 und einem SEM-Wert von 119.176.

Die DINP-Gruppe enthielt im Mittel 295.467 Zellen bei einer Standardabweichung von 199.552 und einem SEM-Wert von 81.466. Mit diesen Ergebnissen wurde in der einfaktoriellen Varianzanalyse und der anschließenden ANOVA deutlich, dass der berechnete F-Wert kleiner als der kritische F-Wert war. Es bestand also eine inhomogene Varianz.

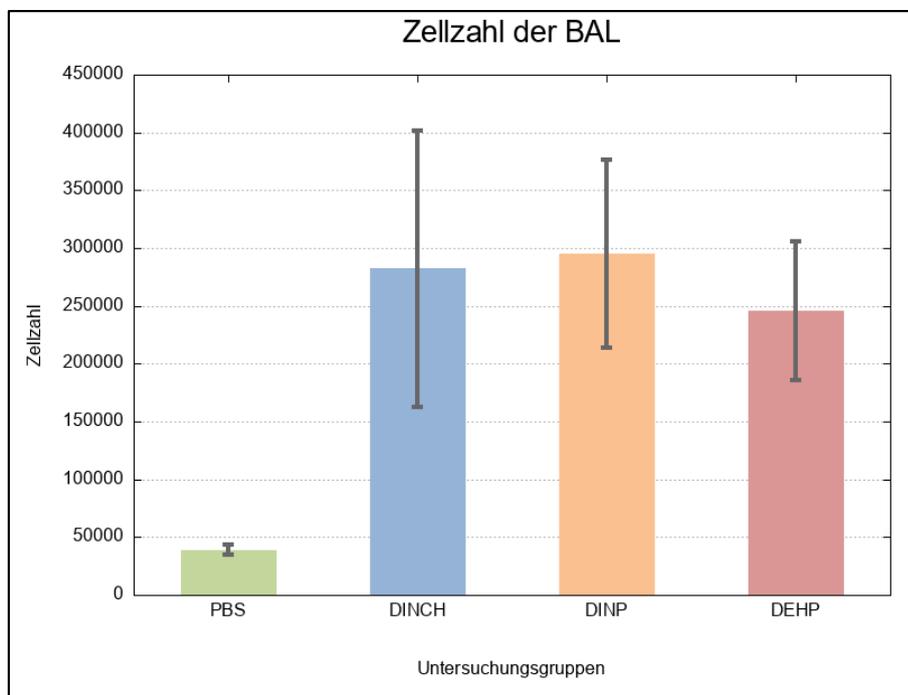


Abb. 16 Zellzahlen, Bronchoalveoläre Lavage

### 3.5 Ergebnisse der Lungenhistologie

Histologisch sichtbare Veränderungen der einzelnen Lungenabschnitte nach HE und PAS-Färbungen waren nicht zu beobachten, es konnten weder eine vermehrte Schleimbildung noch Zellinfiltrate detektiert werden.

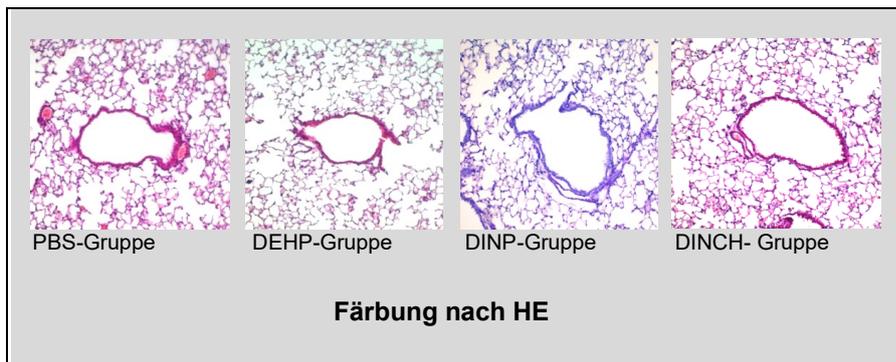


Abb. 17 Lungenhistologie, HE

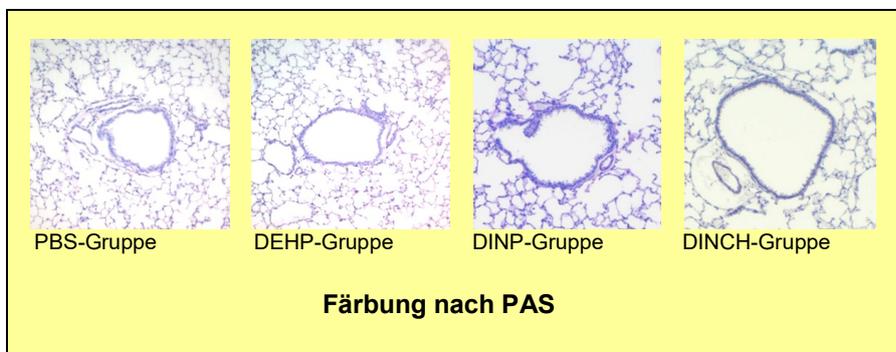


Abb. 18 Lungenhistologie, PAS

Es konnten histologisch keine Leukozyteninfiltrate nachgewiesen werden.

## 4 Diskussion

Zusammenfassend zeigen die Ergebnisse der Lungenfunktionsmessung unter Metacholinreizung signifikante Werte im Vergleich der Kontrollgruppe mit der DEHP-Gruppe mit einem T-Test von 0,004. Die DEHP-exponierten Tiere erlitten schon bei im Mittel 80 µg/ml Metacholin deutliche Verminderungen des Expirationsflusses von 50% des Ausgangswertes.

Die Ergebnisse der DINP und DINCH-exponierten Tiere lieferten keine signifikante Erhöhung der Atemwegsreagibilität unter Metacholin im Vergleich zur Kontrollgruppe. Bei ihnen betrug der Mittelwert an Metacholin 102 µg/ml für DINP, bzw. 132 µg/ml für DINCH. (Dabei ist zu bemerken, dass die nicht vorhandene Signifikanz erst unter Einbeziehung des Bonferronikorrekturfaktors sichtbar wurde (in diesem Versuch beträgt er für alle Tests  $p = 0,0125$ )). Im einfachen T-Test würde unter Festlegung eines normalen Wertes zwischen 5-95% die DINP Gruppe einen verminderten Atemfluss zeigen, da  $p$  hier 0,05 betrug). Wenn man die Mittelwerte der DINCH Gruppe mit denen der PBS-Gruppe vergleicht, die 137 µg/ml Metacholin betrug, kommt man zu keinem relevanten Mengenunterschied an benötigter Substanz zur Erlangung des angestrebten Effekts der Atemflussverminderung. Somit zeigte die DINCH-Inhalation keinen Einfluss auf die Atemwegshyperreagibilität in diesem Versuch, ebenso war es bei der DINP Gruppe. Ausgeprägt reagierten allein die Versuchstiere der DEHP-Gruppe. Im direkten Vergleich der Weichmachergruppen untereinander ergaben die Berechnungen einen signifikanten Wert für die DEHP Gruppe gegen die DINCH mit  $p = 0,007$ . Somit ist die Schlussfolgerung, dass DEHP einen größeren Einfluss auf die Lungenfunktion ausgeübt hat als DINCH zulässig, es scheint weniger toxische Eigenschaften zu haben als DEHP.

Bei den Ergebnissen der IgE-gesamt-Serumproben ergaben sich keine aussagekräftigen Unterschiede. Dies wurde bereits in der ANOVA deutlich, die einen T-Test von  $p = 0,11$  ergab. Die PBS-Kontrollgruppe enthielt im Mittel 490 ng/ml IgE-gesamt, die DINP-Gruppe 378 ng/ml, bei der DINCH-Gruppe waren es 688 ng/ml und die DEHP-Gruppe beinhaltete 579 ng/ml IgE-gesamt. Keine der Weichmachergruppen bot somit signifikante Erhöhungen des IgE-gesamt-

Spiegels im Vergleich zur Kontrollgruppe. Auch in den multiplen Vergleichstests war dies so.

Bei den Ergebnissen der Leukotrien B4 Spiegel war der Mittelwert der PBS-Kontrollgruppe 52 pg/ml, die DINCH-Gruppe kam im Mittel auf 21pg/ml, die Tiere der DINP-Gruppe hatten mittlere Spiegel von 100 pg/ml, bei diesen beiden Versuchsgruppen konnte aber im T-Test keine wesentlichen Unterschiede gezeigt werden. In der Gruppe der DEHP exponierten Tiere belief sich der T-Test auf 0,05 bei einem mittleren Wert von 120 pg/ml Leukotrien B4. Unter Berücksichtigung der Bonferroni-Korrektur liegt somit keine Signifikanz vor. Interessant ist aber der direkte Vergleich DEHP und DINCH. Mit einem p 0,007 zeichnet sich hier ein deutlicher Unterschied ab.

Aussagekräftige Abweichungen der IL-4-Gruppe konnten in diesem Versuch nicht gefunden werden. Der Mittelwert der Kontrollgruppe belief sich auf 19,1 pg/ml, bei der DINCH-Gruppe auf 33,4 pg/ml, die DINP-Gruppe kam im Mittel auf 23,6 pg/ml, die DEHP-Tiere kamen im Durchschnitt auf 18,1 pg/ml IL-4. Die Ergebnisse waren auch im multiplen Mittelwertvergleich der einzelnen Weichmachergruppen untereinander nicht wesentlich, was durch den T-Test Wert mit p 0,42 zu sehen war.

Ebenfalls keinerlei wesentliche Mengenunterschiede lieferten die Messungen von IL-5. Im Vergleich der PBS-Gruppe (Mittelwert: 5,4 pg/ml) mit der DINCH-Gruppe (Mittelwert: 5,1 pg/ml), der DINP-Gruppe (Mittelwert: 4,63 pg/ml) und der DEHP-Gruppe (Mittelwert: 5,6 pg/ml), schwankten die Ergebnisse der T-Test-Berechnungen zwischen 0,8 und 0,9. Im direkten Vergleich der drei Weichmacher untereinander bot sich ebenfalls kein Unterschied, die einfaktorielle Varianzanalyse ergab ein T-Test Ergebnis von 0,91

Anders fielen die Ergebnisse bei den Interleukin-10 Messungen aus. Hier zeigten sich zunächst eine deutliche IL-10-Erhöhung bei der DINCH-Gruppe

(Mittelwert: 53,3 pg/ml) im Vergleich zur Kontrollgruppe (Mittelwert: 18 pg/ml), was anhand des T-Tests mit 0,03 zu erkennen ist. Die Messungen der DINP

exponierten Tiere boten einen noch deutlicheren Unterschied (Mittelwert 31,9 pg/ml, T-Test: 0,015).

Bei den Tieren der DEHP-Gruppe konnte allerdings keine aussagekräftige Erhöhung der Spiegel nachgewiesen werden (Mittelwert 32,6 pg/ml, T-Test: 0,07), die direkten Vergleiche lieferten für DINCH gegen DINP mit 0,027 zunächst eine Signifikanz, allerdings relativieren sich diese Ergebnisse, wenn man die Bonferroni-Korrektur anwendet, unter den strengeren Grenzen von 1,25-98,75% liegen in den Gruppen keine Unterschiede vor.

Bei den Untersuchungen der IFN- $\gamma$ -Spiegel ergaben sich im Gruppenvergleich ähnliche Verteilungen der Signifikanzen wie bei den Interleukin-10 Tieren. Auch hier boten die Tiere im primären T-Test der DINP- und der DINCH-Gruppe wesentlich IN- $\gamma$ -Spiegel (DINCH-Gruppe im Durchschnitt 49 pg/ml, T-Test: 0,02; DINP-Gruppe im Mittel 60,1 pg/ml, T-Test 0,04). Die DEHP-Gruppe zeigte einen Mittelwert in Höhe von 50 pg/ml was zu einem T-Test Ergebnis von 0,1 führte. In der einfaktoriellen Varianzanalyse konnte ein p 0,12 ermittelt werden, unter Einbeziehung der Bonferroni-Korrektur sind keine signifikanten Unterschiede zu erkennen.

Die Auswertung der Lungenhistologie zeigte Makrophagen aber keine deutlichen Leukozyteninfiltrate.

Die Ergebnisse der BAL boten leider eine zu hohe Varianz, das Verteilungsmuster war insgesamt zu inhomogen so dass keine Aussagen über eventuelle Abweichungen zu treffen sind. Es gab in den Gruppen Ausreißer, die aber wegen der Fallzahl nicht außer Acht gelassen werden sollten, es wäre hier ein weiterer Versuch notwendig, idealerweise mit einer höheren Anzahl an Tieren, um eine Aussage treffen zu können.

Zusammengefasst ergaben sich bei der DINCH-Gruppe keine klinischen Hinweise auf eine Hyperreagibilität im Metacholinprovokationstest im Vergleich zur Kontrollgruppe. Die Tiere zeigten in diesem Versuch klinisch unauffällige Parameter bezogen auf die Kontrollgruppe; auch die Ergebnisse von IgE-gesamt,

Leukotrien B<sub>4</sub>, NGF, sowie von IL-4 und IL-5 waren nicht sonderlich

verschieden. Es ließ sich primär in den einfachen T-Tests eine IL-10- sowie eine INF- $\gamma$  Erhöhung nachweisen, allerdings ist diese unter Berücksichtigung der Bonferroni-Korrektur nicht weiter haltbar.

Die Tiere nach DINP-Exposition boten eine nachweisbare Überreaktion im Sinne einer früheren Bronchokonstriktion im Metacholintest bei einfachem T-Test. Ansonsten zeigten sich primär erhöhte IL-10 und INF- $\gamma$  Werte, die nach Bonferroni-Korrektur aber nicht mehr im signifikanten Bereich. Die Level von IgE-gesamt, Leukotrien B4, NGF und IL-4, sowie IL-5 waren im Vergleich zur Kontrollgruppe nicht abweichend.

Bei der DEHP-Gruppe stellte sich die sensibelste Atemwegsreagibilität unter Metacholinexposition heraus, der T-Test war mit 0,004 signifikant und behielt diesen Status auch unter Berücksichtigung des Korrekturfaktors. Die Tiere nach DEHP-Exposition zeigten deutlich frühere Reaktionen auf die Provokationssubstanz, und dies nicht nur im Vergleich zur Kontrollgruppe, sondern auch im Vergleich zu den Tieren der DINCH-Expositionsgruppe mit einem T-Test von 0,007. Keine signifikanten Unterschiede gab es im Gegensatz dazu im Vergleich DEHP- und DINP-Gruppe.

Die Ergebnisse der weiteren Untersuchungen zeigten in der DEHP-Gruppe mit p 0,046 eine Leukotrien-B4 Erhöhung in der einfachen T-Testung, aber interessanterweise keine weiteren Abweichungen von der Kontrollgruppe. Weder die IgE-gesamt- noch NGF-, INF- $\gamma$ -, IL-4-, IL-5- oder IL-10-Spiegel waren erhöht. Allerdings ergab der Vergleich der beiden Weichmacher DEHP und DINCH einen deutlichen und damit wesentlichen Unterschied mit p 0,007.

Die Auswertung der Histologie ergab bei der Kontrollgruppe und den drei Weichmachergruppen ein ähnliches Zellbild. Es fanden sich lediglich die für Lungengewebe typischen Makrophagen. Insbesondere eosinophile Granulozyten konnten nicht in gesteigertem Maße detektiert werden.

Eine allergische IgE-Reaktion konnte in diesem Versuch nicht gefunden werden. Wobei die Tatsache, dass die Tiere asthmatische Beschwerden unter geringen Mengen Metacholin zeigten, die Vermutung nahelegt, dass es sich um eine Sofort-Typ-Reaktion handeln könnte. Die IgE-Spiegel der Tiere boten bei

den mit Weichmachern exponierten Tieren und hier vor allem derer, die DEHP inhaliert haben, keine signifikante Erhöhung gegenüber der Kontrollgruppe. Dieses Ergebnis ist beinahe erwartungsgemäß, da es bereits ebenfalls durch andere Arbeitsgruppen erzielt wurde [16][133]: DEHP stimulierte auch in den bekannten Vorversuchen keine IgE Erhöhung. Die weiteren, gemessenen Zytokinmuster unterstützen die Theorie des Ausschlusses einer Sofort-Typ-Reaktion. Die Messung des IL-5 und des IL-4 zeigte in keiner der Gruppen eine signifikante Erhöhung im Vergleich zur Kontrollgruppe. Wenn man nun in Betracht zieht, dass diese beiden Interleukine als Bestandteil der TH2-Antwort des Immunsystems die Sekretion von IgE anregen, deutet dies zunächst auf eine TH1-Antwort hin, denn die gemessene Atemwegshyperreagibilität, die unter DEHP bereits mehrmals beschrieben worden ist, zeigte sich eben auch in diesem Versuch. Auch DINP steigerte hier die Atemwegshyperreagibilität in der einfachen T-Testung, mit Korrekturfaktor blieb dieses Ergebnis aber nicht bestehen.

Ohne Korrektur konnte bei den Tieren der DINP- und der DINCH-Gruppe signifikante INF- $\gamma$  Spiegel gemessen werden, was auf eine Reaktion in Richtung Th1-Antwort hindeutet, wenn man aber einen engeren Cut-Off zieht um falsch positive Ergebnisse zu erhalten, bestätigt sich die Signifikanz hier nicht. Auch die IL-10-Werte waren in den einfachen Tests erhöht, was auf eine TH2-Antwort hindeuten könnte, aber auch hier hielten die Ergebnisse nicht der Bonferroni-Korrektur Stand.

Geht man von einer einfachen Signifikanz in der T-Testung von jeweils zwei Gruppen aus und lässt die Bonferroni-Korrektur unberührt, führt diese primär zu widersprüchlichen Ergebnissen. Da sich aber beide Botenstoffe gegenseitig hemmen, und insgesamt nach Interaktion eine hemmende Wirkung auf die weitere Entzündungsreaktion bekannt ist, könnte man davon ausgehen, dass diese Ergebnisse zu den klinischen Ergebnissen passen. Beide Botenstoffe kommen jeweils aus einer anderen Reaktionskaskade und unterdrücken sich gegenseitig. So ist INF- $\gamma$  das leitende Interferon der TH1-Antwort und supprimiert die TH2-Reaktion des Immunsystems, die eng mit der Entstehung von Asthma in Verbindung steht. Man findet bei Asthmapatienten sogar auch erniedrigte Werte an INF- $\gamma$  und damit eine verminderte Fähigkeit IgE zu inhibieren [64] [22]. In diesem Versuch konnte kein erniedrigter Spiegel

festgestellt werden.

IL-10 wiederum ist Botenstoff der TH2-Zellen und supprimiert INF- $\gamma$ , beide führen somit zu einer negativen Rückkopplung der Reaktionen. Allerdings darf man, wie bereits erwähnt, bei den vorliegenden Ergebnissen nicht außer Acht lassen, dass sich mit Korrekturfaktor die Signifikanzen nicht bestätigt. Es besteht aber eine Anregung für weitere Tests, dann idealerweise mit einer höheren Fallzahl, denn Tendenzen zeigen die Ergebnisse sehr wohl.

Eine in der Zusammenfassung der IL-10 und INF- $\gamma$ -Spiegel entzündungshemmende Komponente würde zumindest auf die Tiere der DINCH-Gruppe zutreffen. Denn hier konnte keine Hyperreaktion im Provokationstest gefunden werden. Aber die DINP-Tiere boten im Einzelvergleich eine nachweisbare Hyperreagibilität unter Metacholinexposition und auch hier stellte sich eine IL-10 und eine INF- $\gamma$  Erhöhung dar, wobei auch hier nach Einbeziehen des Korrekturfaktors die Signifikanz nicht mehr darstellbar war. Beide Gruppen hatten keine wesentlich erhöhten LT-B4 Spiegel.

Das war bei den Tieren der DEHP-Gruppe anders, es zeigte sich keine Erhöhung von INF- $\gamma$  oder IL-10, aber hier waren die LT-B4-Spiegel im Vergleich zur Kontrollgruppe und noch deutlicher im Vergleich zur DINCH-Gruppe erhöht. Und gerade die Tiere der DEHP-Gruppe boten die ausgeprägteste Atemwegsobstruktion im Provokationstest unter Metacholinexposition.

Im direkten Gruppenvergleich konnte man sehr gut sehen, dass DEHP im Vergleich zu DINCH einerseits eine deutlichere Atemwegsreaktion zeigte und auch die IL-B4 in der DEHP-Gruppe wesentlich höher lagen als in der DINCH Gruppe.

LT-B4 provoziert als Eicosanoid aus der Arachidonsäure die klinische Entzündungsreaktion wie das lokale Ödem, die Hyperalgesie sowie die erhöhte Gefäßpermeabilität, und dies vor allem bei Patienten mit bekanntem Asthma bronchiale. Außerdem weist es eine stark bronchokonstriktorische Komponente auf. Gerade im Metacholintest zeigen Patienten mit Asthma bronchiale eine vermehrte Ausschüttung von LT-B4, die bei Gesunden nicht vorkommt und auch bei Aspirin-induziertem Asthma wurden erhöhte Spiegel festgestellt [75] [102] [85] [80]. Diese Form des Asthmas zählt zu den pseudoallergischen Reaktionen, die bekanntermaßen ohne IgE-Vermittlung entsteht.

Es stellt sich nun die Frage, ob gerade diese erhöhten LT-B4 Werte die ausgeprägte Reaktion bei den DEHP-Mäusen in diesem Versuch ausgelöst haben. So wäre es möglich, dass die Tiere nicht unter einer Typ-1-Reaktion gelitten haben, sondern dass vielmehr eine pseudoallergische Reaktion die asthmatischen Zustände hervorgerufen hat. Insgesamt auffällig ist, dass die Tiere in den Phthalat-Gruppen klinische Hyperreaktionen nach inhalativer Exposition boten, die Tiere, die dem Cyclohexandicarbonsäureester DINCH ausgesetzt waren, boten diese Reaktionen eben nicht; und dies trotz ähnlichem Zytokinmuster wie die Tiere der DINP-Gruppe.

Ob die im Vergleich zu den DEHP-Tieren sogar verminderten Spiegel an IL-B4 dazu beitragen, wäre weiter zu untersuchen, ebenso, ob ein eher erhöhter INF- $\gamma$  Spiegel im Vergleich zum IL-10-Spiegel eine abgemilderte Atemwegsbronchokonstriktion hervorruft. Wesentlich zu Klärung dieser Fragen wäre in möglichen Folgeversuchen einerseits eine höhere Fallzahl als auch auch eine Nummerierung der einzelnen Tiere, damit es möglich wäre, jedem Ergebnis der Lungenfunktion ein zusammenhängendes Ergebnis der IL-B4 Spiegel zuzuordnen.

Insgesamt ließ sich in diesem Versuch erneut klar darstellen, dass Phthalate nach längerer Inhalation eine bronchiale Reaktion hervorrufen und zu einer Verschlechterung der Lungenfunktion führen. Analog zu den Ergebnissen anderer Studien [16] [133] wurde auch in diesem Versuch keine IgE-Ausschüttung gesehen. Es zeigte sich eine LT-B4 Erhöhung bei DEHP und eine IL-10 sowie eine IFN- $\gamma$ -Erhöhung bei DINP im Einzelgruppenvergleich, diese könnten evtl. In weiteren Versuchen bestätigt werden, dazu wären aber sicherlich ebenfalls höhere Fallzahlen notwendig.

Was wir in diesem Versuch definitiv zeigen konnten war, dass die Inhalation von DINCH im Gegensatz zu DINP und DEHP keine Atemwegshyperreagibilität hervorgerufen hat, die Tiere wohl aber ähnliche Spiegel an IL-10 und IFN- $\gamma$  aufwiesen.

Eine Schlussfolgerung aus diesem Versuch lautet daher, dass DINCH als Cyclohexansäureester weniger toxikologischen Einfluss auf die Lungenfunktion ausübt als die anderen beiden Weichmacher. Da die anderen beiden im Versuch benutzten Weichmacher einer der Substanzklasse der Phthalsäureester angehören, also Phthalsäurederivate darstellen, liegt die Vermutung nahe, dass

genau dieser Substanzklasseunterschied die Ursache für die unterschiedlichen Ergebnisse ist. Allerdings ist weiter zu diskutieren, was genau nun diesen Einfluss ausübt. In dieser Studie zeigten die Mäuse nach DEHP-Inhalation hohe LT-B4 Werte, was sicherlich eine Ursache für das klinisch schlechtere Bild darstellt. Warum aber bei den DINP-Tieren auch eine Hyperreaktion zu sehen ist, ohne diese LT-B4-Erhöhung und mit ähnlichen Mustern der anderen Entzündungsmediatoren INF-  $\gamma$  und IL-10 wie bei der DINCH-Gruppe, bleibt unbeantwortet.

Aktuell wurde im April 2022 ein Review veröffentlicht, der die These, dass DINCH eine geringere Toxizität aufweist, untermauert. Es wird explizit auf die Eignung von DINCH für sensible Bereiche wie Kunststoffe mit Lebensmittelkontakt empfohlen, da bisher schädigende Wirkungen wie sie von den Phthalaten bekannt sind (karzinogene, endokrine und reproduktionstoxische Wirkung), bei diesem Weichmacher weitestgehend ausgeschlossen werden können. Die Ergebnisse der hier vorliegenden Arbeit untermauern diese Aussage zumindest für die Wirkung auf die Lungenfunktion [36.2].

## **5 Zusammenfassung**

Die vorliegende Arbeit befasst sich mit dem Vergleich der Wirkung der Weichmacher DEHP, DINP und DINCH auf die Lungenfunktion bei balb/c Mäusen. Ziel war es, herauszufinden, ob die Weichmacher unterschiedliche Effekte zum einen auf die Lungenfunktion und zum anderen auf das Immunsystem ausüben und wenn ja, welche dies sind.

Hierzu wurden vier Gruppen von Mäusen gebildet, die jeweils für 20 Minuten alle zwei Tage den jeweiligen Weichmacher (DEHP, DINP oder DINCH) in PBS oder nur PBS (Kontrolle) vernebelt inhalierten. Nach 20 Tagen wurde die Atemwegsreagibilität auf Metacholin mittels Head-out-Body-Plethysmographie ermittelt, sowie zur Zytokinmessung Blut entnommen.

Nach Tötung der Mäuse wurden Schnitte der Lungen angefertigt bzw. eine bronchoalveoläre Lavage durchgeführt mit dem Ziel zu ermitteln, wie viele Zellen im Lungengewebe vorhanden waren. Die Ergebnisse zeigten eine deutliche Atemwegshyperreagibilität bei den DEHP-Tieren und den DINP-Tieren im Vergleich zur Kontrollgruppe. Die DINCH-Tiere wiesen im Vergleich zur Kontrollgruppe keine erhöhte Atemwegshyperreagibilität auf. Die Ermittlung der Laborwerte entschlüsselte erhöhte LT-B4 Werte der DEHP-Gruppe, erhöhte Spiegel von IFN- $\gamma$  und IL-10 bei den DINP-Tieren und den DINCH-Tieren im einfachen T-Test, unter den strengeren Bedingungen der Bonferronikorrektur waren diese aber nicht mehr signifikant. Eine IgE-Erhöhung konnte bei keiner der Gruppen im Vergleich zur Kontrollgruppe gefunden werden, ebenso wenig abweichende Werte von NGF, IL-4 und IL-5. Die Tiere der drei Weichmachergruppen zeigten deutliche Zellzahlanstiege in der bronchoalveolären Lavage im Vergleich zur PBS, bei allerdings hoher Streuung. In den direkten Gruppenvergleichen konnten erhöhte Level von IL-B4 als auch eine deutliche bronchiale Hyperreagibilität der DEHP Gruppe im Vergleich zur DINCH-Gruppe gezeigt werden.

Die Ergebnisse lassen zum einen die Schlussfolgerung zu, dass es sich bei den Reaktionen der Tiere nicht um eine allergische Reaktion vom Soforttyp handelt, da keine IgE-Erhöhung festzustellen war, sondern dass es sich bei den Reaktionen der Tiere der Phthalsäureester-Gruppe zum Beispiel um eine Pseudoallergie handeln könnte, wobei die beiden Gruppen verschiedene

Zytokinmuster aufwiesen, so war nur bei der DEHP-Gruppe die LT-B4-Level erhöht, nicht bei den Tieren der DINP-Gruppe, auffällig war, dass die DINCH versus der DEHP Gruppe deutlich niedrigere Spiegel von IL-B4 boten und parallel dazu eine geringere bronchiale Hyperreagibilität

Es konnte hier gezeigt werden, dass die Inhalation von DINCH im Gegensatz zu DINP und DEHP keine methacholininduzierte Atemwegshyperreagibilität hervorrief und dementsprechend ein geringeres toxisches Potenzial zu haben scheint.

### **Abstract**

In the present study we compared the effect of the plasticizers DEHP, DINP and DINCH with respect to the airway reactivity of balb/c-mice. The research covered the question what kind of reactions of the lung function and the immune system were triggered by the plasticizers. Four groups of mice were formed, inhaling either an aerosol of PBS (control) or PBS spiked with DEHP, DINP or DINCH for 20 minutes every second day for 20 days. At the end a Metacholin based bronchoprovocation test was performed (Head-out-Body-Plethysmography) and blood samples were taken for measuring the level of various cytokines. After killing the mice via cervical dislocation, their lungs were prepared for further microscopic investigation and for performing a bronchoalveolar lavage to count the number of cells. The results revealed a significant respiratory hyperreactivity of the DEHP and DINP group compared to the PBS control group. The DINCH group mice showed no increased reactivity in comparison with the control group. The serum values revealed elevated levels of LT-B4 of the DEHP mice and an elevation of IFN- $\gamma$  and IL-10 levels in the DINP- and DINCH group under use of a simple T-test. The samples of NGF, IL-4 and IL-5 showed no significant difference between verum and control group and especially the level of IgE did not change significantly. The bronchoalveolar lavage revealed elevated cell counts in each plasticizer group, but the width of dispersion showed a high level.. Due to our results, and especially due to the low IgE levels, we can conclude that the bronchoalveolar hyperresponsiveness is not based on an allergic reaction type I. It more likely is a pseudo allergic reaction which is triggered by the phthalat esters, though the groups showed different entities of cytokine elevation (LT-B4 in the DEHP group and INF- $\gamma$  plus

IL-10 in the DINP group). In this experiment we observed no hyperreactive response within the DINCH group but higher levels of IL-10 and IFN- $\gamma$ .

## 7 Literaturverzeichnis

- [1] Agarwal DK, Eustis S, Lamb JC, Reel JR, Kluwe WM Effects of di(2-ethylhexyl) phthalate on the gonadal pathophysiology, sperm morphology, and reproductive performance of male rats. *Environ. Health Perspect.* 1986, 65, 343-350.
- [2] Agarwal DK, Lawrence WH, Turner JE, Autian J, Effects of parenteral di-(2-ethylhexyl)phthalate (DEHP) on gonadal biochemistry, pathology, and reproductive performance of mice. *J. Toxicol. Environ. Health.* 1989, 26, 39-59.
- [3] Arm JP, Horton CE, House F, Clark TJ, Spur BW, Lee Th Enhanced generation of leukotriene B4 by neutrophils stimulated by unopsonized uymosan and by calcium ionophore after exercise-induced asthma. *Am Rev Respir Dis .* 1988, 138:47-53.
- [4] Barnes KC, Neely JD, Duffy DL et al. Linkage of asthma and total serum IgE concentration to markers on chromosome 12q: evidence from Afro-Caribbean and Caucasoan populations. *Genomics.* 1996, 37 (1), S. 41-50.
- [5] BASF, [www.basf.com](http://www.basf.com) <http://www.basf.com/at/de/media/news-releases/2014/01/p-14-110.ht> [Online]
- [6] BASF. Safety Data Sheet HEXAMOLL® DINCH®, Revision Date 2018/01/26, Version:3.0. 2018.
- [7] Bundesinstitut für Arzneimittel und Medizinprodukte. DEHP als Weichmacher in Medizinprodukten aus PVC. Referenz-Nr.:9211/0506. 20.07.2016
- [8] Bhat VS, Durham JL, Ball GL et al. Derivation of an oral reference dose (RfD) for the nonphthalate alternative plasticizer 1,2-cyclohexane dicarboxylic acid, diisononyl ester (DINCH). *J.Toxicol Environ Health B.* 2014, S. Crit Rev;17(2):63-94.
- [9] Bis(2-ethylhexyl)phthalat (DEHP, auch bekannt als Dioctylphthalat DOP, CAS-Nr. 117-81-7. REACH-info.de . [Online] REACH-info.de. 2007
- [10] Bonini S, Lambiase A, Lapucci G, Properzi F, Bresciani M et al. Nerve Growth Factor and Asthma Allergy . *Apr,* 2003, 58(4):366.
- [11] Bousquet J, Jeffery PK, Busse WW, Johnson M, et al. Asthma. From bronchoconstriction to airways inflamaation and remodeling. *Am J Respir Crit Care Med.* 2000, 161 (5), S. 1720-1745.
- [12] Brooks SM, Weiss MA, Bernstein IL,. Reactive airways dysfunction syndrome. *Chest,* S. 376-384. 1985
- [13] Bundesinstitut für Risikobewertung. Fragen und Antworten zu Phthalatweichern, FAQ des BfRs und des Umweltbundesamtes. 07. 05 2013.
- [14] Bundestag, [www.bundestag.de](http://www.bundestag.de) [http://www.bundestag.de/dokumente/analysen/2005/2005\\_11\\_16.pdf](http://www.bundestag.de/dokumente/analysen/2005/2005_11_16.pdf). [Online] 16.11.2005.

- [15] Busse WW, The role of leukotrienes in asthma and allergic rhinitis Review. Clin Exp Allergy. 1996, Aug;26(8):868-79.
- [16] Butala JH, David RM, Gans G, McKee RH, et al. Phthalate treatment does not influence levels of IgE or Th2 cytokines in B6C3F1 mice. Toxicology. Sep, 2004, S. 201(1-3):77-85.
- [17] Caldwell DJ, Eldridge SR, Lington AW, McKee Rh, Retrospective evaluation of alpha 2u-Globulin Accumulation in Male Rat Kidneys Following High Dose of Di-isononyl Phthalate . Toxicol. Sci. 1999, 51, 153-160.
- [18] Campioli E, Lau M, Papadopoulos V, Effect of subacute and prenatal DINCH plasticizer exposure on rat dams and male offspring hepatic function: the role of PPAR-alpha. 2019 Dec;. Environ. Res. 2019.
- [19] Center for the Evaluation of Risks to Human Reproduction. NTP-CERHR Expert Panel Report on Di-isononyl Phthalat. s.l. : US Department of Health and Human Services, 2000.
- [20] Ceresana. Marktstudie Weichmacher. 5. Auflage. 04.2019
- [21] Chou YY, Huang PC, Lee CC, Wu MH, Lin SJ, Phthalate exposure in girls during early puberty. J Pediatr Endocrinol Metab. 2009, 22:69-77.
- [22] Chung F, Anti-Inflammatory Cytokines in Asthma and Allergy: Interleukin-10, Interleukin-12, Interferon-gamma Mediators. Inflamm . 2001, 10(2):51-59.
- [23] Commission, European. Commission Decision of 7 December 1999 adopting measures prohibiting the placing on the market of toys and childcare articles intended to be placed in the mouth by children under three years of age made of soft PVC containing one or. 1999.
- [24] Crisp TM, Clegg ED, Cooper RL, Wood WP, Anderson DG, Baetke KP, et al. Environmental endocrine disruption: an effects assessment and analysis . Environ Health Perspect . 1998, 106(Supp.1):11-56.
- [25] Daniels SE, Bhattacharya S, James A, Leaves NI, Young A, A genome-wide search for quantitative trait loci underlying asthma. Nature. 1996, 383 (6597), S. 247-250.
- [26] David RM, White RD, Larson RD Toxicity of Hexamll DINCH® following intravenous administration . Toxic Lett. 2015.
- [27] Davis BJ, Maronpot RR, Heindel J, Di-(2-ethylhexyl) phthalate suppresses estradiol and ovulation in cycling rats. Toxicol. Appl. Pharmacol. 1994, 128, 216-223.
- [28] Diller WF, Akute Reizgasinhalation-Systematik und Pathophysiologie. Zbl. Arbeitsmed. 1997, 47, S. 96-100.
- [29] Doull J, Cattley R, Elcombe C, Lake BG, Swenberg J, Wilkinson C, Williams G, van Gemert M, A cancer risk assessment of di(2-ethylhexyl)phthalate:

- application of the new U.S. EPA Risk Assessment Guidelines. Regul. Toxicol. Pharmacol. 29 32, 1999.
- [30] EFSA,. Opinion of the Scientific Panel on food additives, flavour, processing aids and materials in contact with food on a request related to a 12th list of substances for food contact materials. EFSA-Journal. 2006, 395-401, 1-21.
- [31] Elektronisches Amtsblatt der Europäischen Union: Verordnung (EU) Nr. 10/2011 der Kommission vom 14. Januar 2011 über Materialien und Gegenstände aus Kunststoff, die dazu bestimmt sind mit Lebensmitteln in Berührung zu kommen,. EU : s.n., Stand 30. Juli 2013.
- [32] Engel A, Buhrke Th, Kasper St, Behr AC, The urinary metabolites of DINCH<sup>®</sup> have an impact on the activities of the human nuclear receptors ER $\alpha$ , ER $\beta$ , AR, PPAR $\alpha$  and PPAR $\gamma$ . 2018.
- [33] European Plasticisers – a sector group of CEFIC  
<https://www.plasticisers.org/plasticisers/#> Abruf 19.06.2021
- [34] Fromme H, Schütze A, Int J Hyg Environ Health. 2016, S. 219(1):33-9.
- [35] Glue C, Platzer MH, Larsen ST, Nielsen GD, Poulsen LK, Phthalates potentiate the response of Allergic Effector Cells. Pharm.Toxicol. . 2005, 96:140-142.
- [36] Hansen DK, Grafton TF, Evaluation of di(2-ethylhexyl)phthalate-induced embryotoxicity in rodent whole-embryo culture. J. Toxicol. Environ. Health. 1994, 43 361-367.
- [36.2] Harmon P, Otterer R.; A Review of common non-ortho-phthalate plasticizers for use in food contact materials. Food Chem Toxicol. 2022 Apr 20; 164:112984
- [37] Heinemeyer G, Heiland A, Sommerfeld Ch, Phthalat-Belastung der Bevölkerung in Deutschland: Expositionsrelevante Quellen; Aufnahmepfade und Toxikokinetik am Beispiel von DEHP und DINP. s.l. : Umweltbundesamt, 2012. ISSN 1862-4340.
- [38] Henzgen M, Kroegel C, Manuale Allergicum, Allergische Erkrankungen der Lunge und der Atemwege. 2004. S. 107-111.
- [39] Hillenbrand Th, Marscheider-Weidemann F, Strauch M Emissionsminderung für prioritäre und prioritäre gefährliche Stoffe der Wasserrahmenrichtlinie; Stoffdatenblätter . s.l. : Umweltbundesamt, 2005. ISSN 1862-4804.
- [40] Hirayama K, Tanaka H, Kawana K, Tani T, Nakazawa H, Analysis of plasticizers in cap-sealing resins for bottled foods. Food Addit. Contam. 357-362, 2001, 18.
- [41] Hizawa N, Yamaguchi E, Kawakami Y, A common FCER1B gene promoter polymorphism influences total serum IgE levels in a Japanese population. Am J Respir Crit Care Med. 2000, 161, S. (3 P1):906-909.
- [42] Hsieh TH, Tsai CF, Hsu CY, Kuo PL, Lee JN, Chai CY et al. Phthalates induce proliferation and invasiveness of estrogen receptor-negative breast cancer

- through the AhR/HDAC6/cMyc signaling pathway. *FASEB J.* 2012, 26:778-87.
- [43] Huber WW, Grasl-Kraupp B, Schulte-Herrmann R, C14Hepatocarcinogenic potential of di(2-ethylhexyl)phthalate in rodents and its implications on human risk, (26):365-481. *Crit Rev Toxicol.* 1996, (26):365-481.
- [44] Jaakkola JJ, Jeromimon A, Jaakkola MS, Interior surface materials and asthma in adults: a population-based incident case-control study. *Am J Epidemiol.* 2006, 164:742-9.
- [45] Jaakkola JJ, Oie L, Nafstad P, Botten G, Samuelson SO, Development of bronchial obstruction in young children in Oslo, Norway. *Am J Public Health.* 1999, 89:188-92.
- [46] Jaeger RJ, Rubin RJ, Migration of Phthalate ester plasticizer from polyvinyl chloride blood bags into stored human blood and its localization in human tissues. *N Engl J Med.* 1972, 287:1114-1118.
- [47] Janeway C, Travers P, Walport M, Shlomchik M: *Immunologie.* 5. Auflage, Spektrum Akademischer Verlag, Heidelberg 2002, S. 505-513
- [48] Janeway C, Travers P, Walport M, Shlomchik M: *Immunologie.* 5. Auflage, Spektrum Akademischer Verlag, Heidelberg 2002, S. 522-523
- [49] Jinhong Wu, Bing Chen, Wenxian Li et al. Effects of Nerve Growth Factor shRNA Inhibition on Asthma Phenotypes in a Mouse Model of Asthma. *Iran J Allergy Asthma Immunol.* 17.04.2018(2):110-122.
- [50] Juergens UR, Christiansen SC, Stevenson DD, Zuraw BL. Inhibition of monocyte leukotriene b4 production after aspirin desensitization. *J Allergy Clin Immunol.* 1995, 96:148-56.
- [51] Jungclas H, Nachweis der Humanbelastung und klinische Relevanz des Weichmachers DEHP, sowie ausgewählte Metabolite. Dissertation. Marburg Deutschland : Fachbereich Chemie der Philipps-Universität Marburg, 2006.
- [52] Jungclas H, Wegmann M, Renz H, Wahl HG, Di-(2-ethylhexyl) phthalate modulates the allergic airway inflammation and enhances airway reactivity in a murine model of experimental asthma. *Clin Chem Lab Med.* 2008, 46(9):A167.
- [53] Jungclas H, M Wegmann, A Spies, H Renz, H.G. Wahl. Immunotoxicological effects of 2-ethylhexanol and 4-Heptanone in a mouse model of allergic asthma. *Toxicology and Applied Pharmacology*, 197: 280, 2004
- [54] Klimisch HJ, Gamer AO, Hellwig J, Kaufmann W, Jackh R, Di-(2-ethylhexyl) phthalate: a short-term repeated inhalation toxicity study including fertility assessment. *Food Chem. Toxicol.*, 1992, 30,915-919.
- [55] Koch HM, Bolt HM, Preuss R, Angerer J, New metabolites of di(2-ethylhexyl)phthalate (DEHP) in human urine and serum after single oral doses of deuterium-labelled DEHP. *Arch.Toxicol.* 2009, 79:367-376.

- [56] Koop CE, Judberg DR, Benedek EP, Brecher RW, Brent RL, Corn L, Corvello VV, Downes TW, Gad SC, Gold LS, Guengerich FP, Higginson J, L'Konemann, W.V., Lambiv, J.C., Lundberg, G. D., Thompson, K.M. . A scientific evaluation of health effects of two plasticizers used in medical devices and toys: a report from the American Council on Science and Health . MedGenMed. 1999.
- [57] Krämer U, Heinrich J, Wist M, Wichmann HE Age of entry to day nursery and allergy in later childhood. *Lancet*. 1996, 37 (1), S. 450-454.
- [58] Krauskopf LG, Studies of the toxicity of phthalate via ingestion . *Environ Health Prospect* . 1973, 3:62-72.
- [59] Larsen ST, Hansen JS, Hansen EW, Clausen PA, Nielson GD, Airway Inflammation and adjuvant Effects after Repeated Airborne Exposures to Di-(2-Ethylhexyl)Phthalate and Ovalbumin in BALB/c mice . *Toxicology*. 2007, 235:119-29.
- [60] Larsen ST, Hansen JS, Thygesen P, Begtrup M, Poulsen OM, Nielsen GD, Adjuvant and immuno-suppressive effect of six monophthalates in a subcutaneous injection model with BALB/c mice . *Toxicology* . 2001, 169(1),35-51.
- [61] Larsen S, My Lund R, Damgård Nielsen G, Thygesen P, Melchior Poulsen O. Di-(2-ethylhexyl) phthalate possesses an adjuvant effect in a subcutaneous injection model with BALB/c mice. *Toxicol Lett*. 125(1-3):11-8 (2001)
- [62] Latini G, De Felice C Exposure to Di(2-Ethylhexyl)Phthalate in humans during pregnancy. A preliminary report. *Biol Neonate*. 83(1):22-4, 2003.
- [63] Lee HY, Auslander SE, Kalmus GW, Toxicity of di(2-ethylhexyl) phthalate in chick embryos gel electrophoretic analysis of serum proteins. *Comp Biochem. Physiol C*. 1977, 56 9-12.
- [64] Lee YC, K H Lee KH, Lee HB, Serum levels of Interleukins (IL)-4, IL-5, IL-13, and interferon-gamma in acute asthma, *J. asthma*. 2001 Dec;38(8):665-71
- [65] Liss GM, Albro PW, Hartle RW, Stringer WT, Urine phthalate determinations as an index of occupational exposure to phthalic anhydride and di(2-ethylhexyl)phthalate. *Scand. J. Work Environ. Health*. 381-387, 11 1985.
- [66] Liu M, Zheng S, Wang X, Wen Z,. Regulatory Roles of IL-12, IL-4 and IFN-  $\gamma$  on IgE Synthesis of Atopic Patients . *Clin Med J*. 1999, 122(6):550-3.
- [67] Marin ML, Lopez J, Sanchez A, Vilaplana J, Limenez A, Analysis of potentially toxic phthalate plasticizers used in toy manufacturing. *Bull Environ. Contam Toxicol*. 1998, 60:8-73.
- [68] Markowitz JS, Self-reported short- and long-term respiratory effects among PVC-exposed firefighters. *Arch Environ Health*. 1989, 44:30-3.
- [69] Marsh D, Neely JD, Breazeale DR, Gosh B, et al. Linkage analysis of IL-4 and other Chromosome 5q31.1 markers and total serum immunoglobulin E concentrations. *Science*. 1994, 264 (5162), S. 1152-1156.

- [70] Martino-Andrade AJ, Chahoud I, Reproductive toxicity of phthalate esters. 2010. *Mol Nutr Food Res.* 2010, 54:148-57.
- [71] Ministry of Environment and Food of Denmark. Determination of Migration Rates for Certain Phthalates. Denmark : s.n., 2016. Survey of chemical substances in consumer products No.149.
- [72] Morishita Y, Namura Y, Fukui C, Kawakami T, Pilot Study on Novel Blood Containers with Alternative Plasticizers for Red Cell Concentrate Storage *PLoS one* 2017 Sept 28; 12(9). 2017.
- [73] Nakamura R, Teshima R, Sawada J, Effect of Dialkyl Phthalates on the Degranulation and Ca<sup>2+</sup>-Response of RBL-2H3 Mast Cells. *Immunol. Lett.* . 2002, 80:119-124.
- [74] Norbäck D, Wieslander G, Nordström K, Walinder R, Asthma symptoms in relation to measured building dampness in upper concrete floor construction, and 2-ethyl-1-hexanol in indoor air. *Int J Tuberc Lung Dis.* 2000, 4:1016-25.
- [75] Nowak D., Griminger F., Jörres R., et al. Increased LTB<sub>4</sub> Metabolites and PGD<sub>2</sub> in BAL fluid after metacholine challenge in asthma subjects. *Eur Respir J.* 1993, Bd. 6, S. 405-12.
- [76] Nowak, Angerer, . *Manuale Allergicum* 207-208. 2004. S. 207-208.
- [77] NTP CERHR Mon. NTP-CERHR Monograph on the Potential Human Reproductive and Developmental Effects of Di-isononyl Phthalate (DINP). 2003. I-III90..
- [78] NTP-CERHR Expert Panel Report on Di(2-ethylhexyl)Phthalate. National Toxicology Program Center for the Evaluation of Risks to human Reproduction. NC USA : s.n., 2000.
- [79] Obreira O, Ringkamp M, Forsch E, Schmelz M, NGF bewirkt eine differenzielle Sensibilisierung der axonalen Erregbarkeit von mechano-insensitiven Nozizeptoren. *Der Schmerz.* 2009, 23; Suppl 1, 59.
- [80] Ohnishi H, Nobuaki M, Gerlfand EW, The role of leukotriene B<sub>4</sub> in allergic diseases. *Allergology International.* 2008, Bd. 57, S. 291-298.
- [81] Oishi S, Effects of co-administration of di(2-ethylhexyl)phthalate and testosterone on several parameters in the testis and pharmacokinetics of its mono-de-esterified metabolite. *Arch. Toxicol.* 1989, 63 289-295.
- [82] Oishi S, Testicular atrophy induced by di(2-ethylhexyl)phthalate: changes in histology, cell specific enzyme activities and zinc concentrations in rat testis. *Arch. Toxicol.* 1986, 59, 290-295.
- [83] Oishi S., Effects of di-2-ethylhexyl phthalate on lipid composition of serum and testis in rats. *Toxicol. Lett.,.* 1984, 23, 67-72.
- [84] Oishi S., Reversibility of testicular atrophy induced by Di(2-ethylhexyl) phthalate in rats. *Environ. Res.* 1985, 36, 160-169.

- [85] Pacheco Y, Hosni R, Chabannes B et al. Leukotriene B4 Level in stimulated blood neutrophils and alveolar macrophages from healthy and asthmatic subjects. Effect of beta-2 agonist therapy. *Eur J Clin Invest* . 1992, 22:732-9.
- [86] Page BD, Lacroix GM, Studies into the transfer and migration of phthalate esters from aluminium foil-paper laminates to butter and margarine, *Food Addit. Contam. Food Addit. Contam.* 1992, Bde. 197-212, 9.
- [87] Page BD, Lacroix GM, The occurrence of phthalate ester and di-2-ethylhexyl adipate plasticizers in Canadian packaging and food sampled in 1985-1989: a survey. *Food Addit. Contam.* 1995, 12.
- [88] Pediatric exposure and potential toxicity of phthalate plasticizers. *Pediatrics*. 2003, Jun;111(6 Pt 1):1467-74.
- [89] Peters JM, Taubeneck MW, Keen CL, Gonzalez FJ, Di(2-ethylhexyl) phthalate induces a functional zinc deficiency during pregnancy and teratogenesis that is independent of peroxisome proliferator-activated receptor-alpha . *Teratology*. 1997, 56 311-31.
- [90] Petersen R. Toxicology of plastic devices having contact with blood . Washington DC : s.n., 1975.
- [91] Pichler W, *Manuale Allergicum Grundwerk* . s.l. : Dustri-Verlag Dr. Karl Feistle., 2004. S. 36.
- [92] PVCplus Kommunikations GmbH. Produktinformationen Nr.1: Wissenswertes über PVC. 53113 Bonn, Deutschland, PVCplus Kommunikations GmbH. (GENERIC). 2000. Bde. 1-12.
- [93] Richtlinie 2009/48/Eg des europäischen Parlaments und des Rates vom 18. Juni 2009 über die Sicherheit von Spielzeugen. Europäisches Parlament.
- [94] Risikobewertung, Bundesinstitut für. Weichmacher DEHP wird hauptsächlich über Lebensmittel aufgenommen. 07.05.2013. 13.
- [95] RomManent St, Allergic vs. nonallergic asthma: what makes the difference? *Allergy*. 2002, S. 57 (7): 607-613.
- [96] Roth B, Herkenrath P, Lehmann HJ, Ohles HD, Homig HJ, Benz-Bohm G, Kreuder J, Younossi-Hartenstein A, Di-(2-ethylhexyl)-phthalate as plasticizer in PVC respiratory tubing systems: indications of hazardous effects on pulmonary function in mechan. *Eur. J. Pediatr.* 1988, 147, 41-46.
- [97] S, Hoffjan, Association studies for asthma and atopic diseases: a comprehensive review of the literature. *Respir res.* 2003, S. 4 (1): 14.
- [98] Scharmann W, Teutsch GM, Zur ethischen Abwägung von Tierversuchen. 1995. S. 12§3):159.
- [99] Schulz CO, Rubin RJ, Hutchins GM, Acute lung toxicity and sudden death in rats following the intravenous administration of the plasticizer, di(2-ethylhexyl)phthalate, solubilized with Tween surfactants, . *Toxicol. Appl. Pharmacol.* 1975, 33, 514-525.

- [100] Schütze A, Kolossa-Gehring M, Apel P, Brüning Th, Koch H, Entering markets and bodies: increasing levels of the novel plasticizer Hexamoll® DINCH® in 24 h urine samples from the German Environmental Specimen Bank.
- [101] Shea KM, Pediatric exposure and potential toxicity of phthalate plasticizers. *Pediatrics*. 2003, 111, 1467-1474.
- [102] Shindo K, Matsumoto Y, Hirai Y et al. Measurement of leukotriene B4 in arterial blood of asthmatic patients during wheezing attacks. *J Intern Med*. 1990, 228:91-6.
- [103] Shiota K, Chou MJ, Nishimura H, Embryotoxic effects of di-2-ethylhexyl phthalate (DEHP) and di-n-butyl phthalate (DBP) in mice. *Environ. Res.* 1980, 22, 245-253.
- [104] Shiota K, Nishimura H, Teratogenicity of di(2-ethylhexyl) phthalate (DEHP) and di-n-butyl phthalate (DBP) in mice. *Environ. Health Perspect.* 1982, 45:65-70.
- [105] Shu H, Jönsson Ba, *J Expo Sci Environ Epidemiol.* Sep 2018, S. 28(5):437-447.
- [106] Sjoberg P, Bondesson U, Kjellen L, Lindquist NG, Montin G, Ploen L, Kinetics of di-(2-ethylhexyl) phthalate in immature and mature rats and effect on testis. *Acta Pharmacol. Toxicol.* 1985, 56, 30-37.
- [107] Sjoberg P, Bondesson U, Sedin G, Gustafsson J, Disposition of di- and mono-(2-ethylhexyl)phthalate in newborn infants subjected to exchange transfusions. *Eur.L. Clin. Invest.*, 1985, 15:430-436.
- [108] Sjoberg P, Bondesson U, Sedin G, Gustafsson J. Exposure of newborn infants to plasticizers. Plasma levels of di-(2-ethylhexyl)phthalate and mono-(2-ethylhexyl)phthalate during exchange transfusion. 1985, 25: 424-428.
- [109] Sokol WN, Aelony Y, Beale GN, Meat-wrapper`s-asthma. A new Syndrome? *JAMA.* 1973, 226:639-41.
- [110] Spektrum, [www.spektrum.de](http://www.spektrum.de).  
<https://www.spektrum.de/lexikon/biologie/nerve-growth-factor/45984>.  
[Online] 04.02.2021.
- [111] Steiner I, Scharf L, Fiala F, Washuttl J, Migration of di-(2-ethylhexyl) phthalate from PVC child articles into saliva and saliva simulant. *Food Addit. Contam.* 1998, 15, 812-817.
- [112] Swan SH, Main KM und Liu F Stewart SL, Kruse RL, Calafat AM et al. Decrease in anogenital distance among male infants with prenatal phthalate exposure. *Environ. Health Perspect.* 2005, 113:1056-61.
- [113] Swedish National Chemicals Inspectorate. Risk assessment for bis(2-ethylhexyl)phthalate. 1998. EINECS-No:204-211-0.
- [114] Teixeira L, Fonseca B, Barboza B, Viola J. The Role of Interferon- $\gamma$  on Immune and Allergic Response. *Mem Inst Oswaldo Cruz*. Vol 100, 2005, Suppl.I:137-144.

- [115] Tettenborn F, Hillenbrand Th, Bestandsaufnahme der Emissionen, Einleitungen und Verluste nach Art. 5 der RL 2008/105/EG bzw. § 4 Abs. 2 OGewV in Deutschland Methodenpapier Stoffflussanalyse Aktualisierung und Ergänzungen für ausgewählte Stoffe - DEHP. Fraunhofer Institut für System- und Innovationsforschung. 2014.
- [116] Tettenborn F, Hillenbrand Th, Methodenpapier Stoffflussanalyse, Aktualisierung und Ergänzung für ausgewählte Stoffe- DEHP, NP, OP, PAK, Pb; Fraunhofer Institut im Auftrag des Umweltbundesamtes. Fraunhofer Institut. s.l. : Umweltbundesamt. 01.2014, Anlage 3.
- [117] Tettenborn F, Marscheider-Weidemann F, Hillenbrand Th, Leitlinie für die Bestandsaufnahme gefährlicher Stoffe. Fraunhofer Institut für System- und Innovationsforschung. 2012.
- [118] Tickner JA, Schettler T, Guidotti T, McCally M, Rossi M, Health Risk as posed by use of Di-2-ethylhexyl phthalate (DEHP) in PVC medical devices. A critical review. *Am J Ind Med.* 2001, 39:100-111.
- [119] Tsumura Y, Ishimitsu S, Kaihara A, Yoshii K, Nakamura Y, Tonogai Y, Di(2-ethylhexyl) phthalate contamination of retail packed lunches caused by PVC gloves used in the preparation of foods. *Food Addit. Contam.* 2001, Bde. 569-579, 18.
- [120] Tuomainen A, Seuri M, Sieppi A, Indoor air quality and health problems associated with damp floor coverings. *Int Arch Occup Environ Health.* 2004, 77:222-6.
- [121] Uhde E, Bednarek M, Fuhrmann F, Salthammer T, Phthalic esters in the indoor environment--test chamber studies on PVC-coated wallcovering . *Indoor Air.* 150-155, 2001.
- [122] Umweltbundesamt, Phthalate- Die nützlichen Weichmacher mit den unerwünschten Eigenschaften. 02 2007.
- [123] Umweltbundesamt, Weichmacher. [umweltbundesamt.de/themen/gesundheit/umwelteinfluesse-auf-den-menschen/chemische-stoffe/weichmacher/haeufige-fragen-zu-phthalaten-bzw-weichmachern#was-sind-phthalate-wozu-dienen-sie](https://www.umweltbundesamt.de/themen/gesundheit/umwelteinfluesse-auf-den-menschen/chemische-stoffe/weichmacher/haeufige-fragen-zu-phthalaten-bzw-weichmachern#was-sind-phthalate-wozu-dienen-sie). [Online] [Zitat vom: 04.02.2021.]
- [124] Umweltprobenbank, [www.Umweltprobenbank.de](http://www.Umweltprobenbank.de)  
<https://www.umweltprobenbank.de/de/documents/search?commit=Suche&page=2&search=dinch&utf8=%E2%9C%93>. [Online] [Zitat vom: 03.02.2021.]
- [125] Van Vyve T, Chanez P, Bernard A, et al. Protein content in bronchoalveolar lavage fluid of patients with asthma and control subjects. *J Allergy Clin Immunol*, 95 (1 PT 1), 01.1995, S. 60-68.
- [126] von Mutius E, Weiland SK, Fritzscher C, Duhme H, et al. Increasing prevalence of hay fever and atopy among children in Leipzig, East Germany. *Lancet.* 1998, 351 (9106), S. 862-866.

- [127] von Mutius E, Weiland SK, Röhl G, Magnussen H, Prevalence of asthma and allergic disorders among children in united Germany: a descriptive comparison. *BMJ*. 1992, 5; 305(6866), S. 1395-1399.
- [128] Wahn U, Lau S, Bergmann R, Kulig M, Forster J et al. Indoor allergen exposure is a risk factor for sensitization during the first three years of life. *J Allergy Clin Immunol*. 1997, 99 (6t 1), S. 763-769.
- [129] Wallin RF, Klamer B, Nicora RW, Thompson CR. Di (2-ethylhexyl) phthalate (DEHP) metabolism in animals and post-transfusion tissue levels in man. *Bull Parenter Drug Assoc*. 1974, Nov-Dec ;28(6):278-87.
- [130] Waseda K, Mihyaha N, Kanehiro A, Koga, H, Blocking the Leukotriene B4 Receptor 1 inhibits Late Phase Airway Responses in Establishes Disease“. *Am J Respir Cell Mol Biol*. 18. March 2011.
- [131] Welle F, Walz G, Franz R, Migrationsverhalten von Weichamchern aus PVC Schläuchen in enteralen Nährlösungen. *Pharma International;Fraunhofer Institut für Verfahrenstechnik*. 2005, 3.
- [132] Wenzel R, JL(2), Kohno S(3), Wolf BJ(4), Brock JW(5), Cruze L(6), Newman RB(7), Kucklick JR(8), Biomentoring of emerging DINCH metabolites in pregnant women in charleston, . *Chemosphere*. Jan 2021.
- [133] Zou QY, Sue-Ling K, Ke X, et al. Effect of di-(2-ethylhexyl) phthalate (DEHP) on allergic rhinitis. *Scientific Reports*. 2020, Artikel number: 14625.

## **8 Anhang**

Lebenslauf aus datenschutzrechtlichen Gründen entfernt

## **8.1 Akademische Lehrer**

Meine akademischen Lehrer waren die Damen/Herren in Marburg:

Prof. Dr. Arnold, Prof. Dr. Aumüller, Prof. Dr. Bach, Prof. Dr. Dr. Basler, Prof. Dr. Barth, Prof. Dr. Baum, PD. Dr. Becker, PD. Dr. Christiansen, Prof. Dr. Dr. Daut, Prof. Dr. Eilers, Prof. Dr. Feuser, Prof. Dr. Geus, Prof. Dr. Gotzen, Prof. Dr. Griss, Prof. Dr. Gudemann, Prof. Dr. Happel, PD. Dr. Hellinger, PD. Dr. Hesse, Prof. Dr. Hofmann,  
Prof. Dr. Jungclas, Prof. Dr. Kern, Prof. Dr. Klenk, Prof. Dr. Koolman,  
Prof. Dr. Kretschmer, Prof. Dr. Krieg, Prof. Dr. Kroll, Prof. Dr. Lammel, Prof. Dr. Lang, Prof. Dr. Lennartz, Prof. Dr. Moll, Prof. Dr. Mutters, Prof. Dr. Oertel, Prof. Dr. Renschmidt, Prof. Dr. Renz, Prof. Dr. Schäfer, Prof. Dr. Schmidt, Schneyer,  
Prof. Dr. Suske, Dr. Vohland, Prof. Dr. Weder, Prof. Dr. Weihe, Prof. Dr. Werner,  
Dr. Westermann, Prof. Dr. Wulf

in Kassel:

PD. Dr. Neuzner, Dr. Raible, Prof. Dr. Tryba

## **8.2 Danksagung**

Danksagung entfernt

### ***Ehrenwörtliche Erklärung***

„Ich erkläre ehrenwörtlich, dass ich die dem Fachbereich Medizin Marburg zur Promotionsprüfung eingereichte Arbeit mit dem Titel „Vergleich der Wirkung der Weichmacher DEHP, DINP und DINCH auf die Lungenfunktion im Mausmodell“ in der Abteilung für Klinische Chemie und Molekulare Diagnostik am Universitätsklinikum Marburg und Gießen unter Leitung von Prof. Dr. med. Harald Renz mit Unterstützung durch Dr. Dr. Hans-Günther Wahl ohne sonstige Hilfe selbst durchgeführt und bei der Abfassung der Arbeit keine anderen als die in der Dissertation aufgeführten Hilfsmittel benutzt habe. Ich habe bisher an keinem in- oder ausländischen Medizinischen Fachbereich ein Gesuch um Zulassung zur Promotion eingereicht, noch die vorliegende oder eine andere Arbeit als Dissertation vorgelegt.

Ich versichere, dass ich sämtliche wörtlichen oder sinngemäßen Übernahmen und Zitate kenntlich gemacht habe.

Mit dem Einsatz von Software zur Erkennung von Plagiaten bin ich einverstanden.

Vorliegende Arbeit wurde in keinem Publikationsorgan veröffentlicht.

#### **Ort, Datum, Unterschrift Doktorandin/Doktorand**

Marburg, 25.05.2022

---

„Die Hinweise zur Erkennung von Plagiaten habe ich zur Kenntnis genommen.“

#### **Ort, Datum, Unterschrift Referentin/Referent**

Marburg, 25.05.2022

---