

---

AUS DER KLINIK UND POLIKLINIK FÜR  
DERMATOLOGIE UND ALLERGOLOGIE  
KLINIK DER LUDWIG-MAXIMILIANS-UNIVERSITÄT MÜNCHEN

Vorstand: Prof. Dr. med. Lars E. French

Etablierung und Bewertung von Palladium- und Gold-spezifischem  
Lymphozytentransformationstest und In-vitro-Zytokinfreisetzung bei  
Patienten mit Dentalmaterial-Unverträglichkeit

Dissertation  
zum Erwerb des Doktorgrades der Medizin an der Medizinischen Fakultät  
der Ludwig-Maximilians-Universität München

Vorgelegt von

Florian Alexander Alienus Kapp

aus Heidelberg

2021

---

---

Mit Genehmigung der Medizinischen Fakultät  
der Universität München

Berichterstatter: Prof. Dr. med. Peter Thomas

Mitberichterstatter: Prof. Dr. Dr. F. X. Reichl

Prof. Dr. M. Ege

Mitbetreuung durch den  
promovierten Mitarbeiter: Dr. rer. biol. hum. Burkhard Summer

Dekan: Prof. Dr. med. dent. Reinhard HICKEL

Tag der mündlichen Prüfung: 21.01.2021

---

Meiner Familie gewidmet.

---

# Inhaltsverzeichnis

<b>1. Einleitung</b> .....	<b>6</b>
<b>2. Ziel der Arbeit</b> .....	<b>16</b>
<b>3. Material und Methoden</b> .....	<b>16</b>
3.1. Material .....	17
3.2. Patienten .....	17
3.3. Epikutantest (ECT) .....	19
3.4. Lymphozytentransformationstest (LTT) .....	19
3.5. Zytokin-Bestimmung .....	21
3.6. Statistische Auswertung .....	22
<b>4. Ergebnisse</b> .....	<b>23</b>
4.1. Ergebnisse zu Gold, Testsubstanz Natriumthiosulfatoaurat (NTSA) .....	23
4.1.1. Allgemeine Patienten-Charakteristika .....	23
4.1.2. Epikutantest (ECT) .....	26
4.1.3. Lymphozytentransformationstest bei Verwendung von NTSA .....	26
4.1.4. Zytokin-Freisetzung bei NTSA-stimulierten Zellkulturen .....	29
4.2. Ergebnisse zu Palladium, Testsubstanz Palladiumchlorid (PdCl <sub>2</sub> ) .....	35
4.2.1. Allgemeine Patienten-Charakteristika .....	35
4.2.2. Epikutantest (ECT) .....	37
4.2.3. Lymphozytentransformationstest (LTT) .....	38
4.2.3.1. Lymphozytentransformationstest bei Verwendung von PdCl <sub>2</sub> ..	38
4.2.3.2. Lymphozytentransformationstest bei Verwendung von Nickelsulfat (NiSO <sub>4</sub> ) .....	39
4.2.4. Zytokin-Freisetzung bei PdCl <sub>2</sub> - und NiSO <sub>4</sub> -stimulierten Zellkulturen ..	40
<b>5. Diskussion</b> .....	<b>48</b>
5.1. Diskussion der Methodik .....	50
5.1.1. Epikutantest (ECT) .....	50
5.1.2. Lymphozytentransformationstest (LTT) .....	53
5.1.3. Zytokin-Freisetzung .....	55
5.2. Zusammenfassung der Ergebnisse .....	56
5.2.1. Gibt es einen Zusammenhang zwischen ECT-Reaktion und LTT- Antwort gegenüber den Metallen Gold, Palladium und Nickel? .....	56
5.2.2. Wie sieht die entsprechende In-vitro-Zytokinproduktion der stimulierten Zellkulturen aus? .....	57

5.2.3. Lässt sich anhand der Zytokinmuster unspezifisch-, sensibilisierungs- und kreuzreaktionsbedingte Zytokinfreisetzung unterscheiden? .....	58
5.3. Diskussion der Ergebnisse .....	58
5.3.1. Versuche zu Gold-(Au-)Allergie .....	59
5.3.2. Versuche zu Palladium-(Pd-)Allergie .....	60
<b>6. Zusammenfassung .....</b>	<b>63</b>
<b>7. Literaturverzeichnis .....</b>	<b>66</b>
<b>8. Abkürzungsverzeichnis .....</b>	<b>71</b>
<b>9. Danksagung .....</b>	<b>73</b>
<b>10. Eidesstattliche Versicherung .....</b>	<b>74</b>

# 1. Einleitung

## Hintergrund

Der Einsatz von Implantat-Materialien nimmt beim Menschen ständig zu. Die Weiterentwicklung betrifft nicht nur klassische Bereiche wie Osteosynthese oder Gelenkersatz, sondern auch die dentale Implantologie [1]. Der Hauptkontakt der Allgemeinbevölkerung mit Palladium (Pd) und Gold (Au) findet über Schmuck oder Dentalmaterialien statt [2]. Metallisches Au wird zwar als selten bei den Kontaktallergenen angesehen, aber die Sensibilisierung gegen Au scheint verbreiteter als angenommen [3]. Die klinische Relevanz ist aber immer noch unklar [4]. Ungefähr 8 % der jährlich steigenden Pd-Produktion wird alleine für Dentalmaterialien verbraucht [5, 6].

Bei geplanter Langzeitanwendung steht gerade die Bioverträglichkeit der Implantat-Materialien wie auch der Dentalmetalle im Vordergrund. Jedes Einbringen von diesen Materialien kann durch Fremdmaterial-Reaktion zu einer Entzündungsantwort führen. Deren Ausmaß und Dauer wird durch Materialeigenschaften, durch Lokalisation und Gewebeeigenschaften sowie durch immunologische Reagibilität des betroffenen Organismus bestimmt [7].

Die Zahl der von Allergie betroffenen Personen ist in Deutschland in den letzten Jahren stark gestiegen. Während aus Umweltmedizin-Sicht Valentine-Thon et al. [8] für Deutschland hohe Metallallergieraten (17,8 % für Au, 12,7 % für Pd und 68,2 % für Ni) angeben, liegen verlässlichere Daten aus epidemiologischen Studien, z. B. von Schäfer et al. [9], sowie Thyssen et al. [6] vor. Hier werden z. B. in der Allgemeinbevölkerung durchschnittliche Nickelsensibilisierungsraten von 13 %, Kobaltsensibilisierungsraten von 2 % und Chromsensibilisierungsraten von 1 % beschrieben [9, 10]. Innerhalb der kutanen Metallkontaktallergien ist dementsprechend die Nickelkontaktallergie am häufigsten mit im Mittel etwa 13 % sowie bei Frauen etwa 20 % und bei Männern knapp 6 % [6, 9]. Die Bedeutung von Sensibilisierungen gegen Dentalersatzstoffe ist auch in der Zahnmedizin daran zu erkennen, dass immer neue Werkstoffe gesucht und in der Implantologie „bioverträglichere“ Materialien wie Titan und Keramik bevorzugt werden. Der Erfahrungsbericht einer norwegischen Arbeitsgruppe aus deren Spezialabteilung für „Zahnmaterial-Unverträglichkeit“ zeigt sehr hohe Allergieraten gegen Nickel (Ni) (28

%), Au (23 %) und gegen Pd (9 %) bei den hier betreuten Patienten [11]. Metallimplantate im orthopädisch-chirurgischen Bereich bestehen häufig aus Legierungen, die die klassischen Kontaktallergene wie Ni, Cobalt (Co) und Chrom (Cr) enthalten. Im zahnärztlichen Bereich werden in der Implantologie vor allem titanbasierte Legierungen (wie Titan-Aluminium-Vanadium) verwendet und in der „restaurativen“ Behandlung Au und Pd oft eingesetzt. Acrylate in Adhäsiv-/Klebmaterialien oder antibiotische Zusätze werden ebenfalls häufig verwendet und sind damit auch mögliche Allergieauslöser. Metall-Legierungen setzen über Korrosion Bestandteile frei, sodass auch Dentallegierungen korrosionsbedingte Nebenwirkungen haben können, wie allergische Reaktionen, lokaltoxische, systemtoxische und galvanische Effekte [12, 13].

Dentallegierungen wird allerdings im Vergleich mit „Alltagsartikeln“ wie Druckknöpfen, Schnallen und Modeschmuck oder Münzen eine höhere Korrosionsfestigkeit zugeschrieben. Trotzdem können beispielsweise durch Speichelwirkung oder galvanische Effekte mit benachbarten unedleren Metallen freigesetzte Dentalmetalle (meist) vor Ort bei Sensibilisierten allergische Reaktionen an der Mundschleimhaut (MSH) hervorrufen.

Eine kürzlich erschienene Datenerhebung des IVDK (Informationsverbund Dermatologischer Kliniken) berichtete, dass das in der Dentalmetalltestreihe DKG 17 enthaltene Pd(II)chlorid das mit 3 % häufigste Allergen auch bei beruflich Exponierten, d. h. z. B. bei Zahnarzhelfern/-innen ist [14].

Da die MSH bei Allergenexposition jedoch „toleranter“ ist als die Haut, werden Dentallegierungen in etlichen Fällen bei bestehender kutaner Sensibilisierung gegen eine ihrer Komponenten problemlos vertragen [15]. Dennoch sollte bei bekannter Allergie generell ein Werkstoff verwendet werden, der die Allergie-auslösende Substanz nicht enthält [16, 17].

Au und Pd sind bekannte Allergene, die in Dentallegierungen vorkommen und MSH-Entzündungen, lichenoiden Läsionen oder Gingivitis auslösen [4, 5, 18, 19].

## **Gold (Au)**

Au ist die Basis für die Mehrzahl aller Dentallegierungen. Die extrem gute Beständigkeit prädestiniert es für den Einsatz im Mund des Patienten. Die biologische Verträglichkeit von metallischem Au wird als sehr gut bei im Wesentlichen fehlender Toxizität angesehen. Allergien gegen das Metall erfolgen eher, wenn Verbindungen und Salze vorliegen.

Seit 1980 haben Fallberichte über Au-Allergien deutlich zugenommen und die amerikanische Gesellschaft für Kontaktdermatitis kürte Au im Jahr 2001 zum „Kontaktallergen des Jahres“ [20]. Die Häufigkeit von Goldallergien wird mit rund 13 % für Nordamerika und 10 % in Europa angegeben. In Schweden ist Au nach Ni nunmehr das zweitwichtigste Metallallergen [20, 21].

Obwohl positive ECT-Reaktionen gegen Au signifikant mit dem Einbau von Zahngold korreliert waren, zeigten die meisten der Patienten keine Symptome. Dies beschrieben Ahlgren et al. 2012 [4] zusammen mit der gesehenen Korrelation und dosisabhängigen Beziehung zwischen Kontaktallergie gegen Au und dem Einsatz von Au-haltigem Zahnersatzmaterial. Es gibt nur wenige Berichte über lichenoiden Mucositis oder oralen Lichen planus direkt an der Stelle des Einbaus [18, 22]. Nach wie vor wird kontrovers diskutiert, ab welcher Freisetzungsmenge an Legierungsbestandteilen (wie Kupfer, Silber, Zink oder Ni) solche MSH-Veränderungen verursacht werden. Auch eine systemische Au-Exposition über Au-freisetzende Stents muss bedacht werden [23]. Aufgrund des von Svedman und Bruze beobachteten Zusammenhangs von Au-Freisetzung, erhöhter Au-Sensibilisierung und Stenosierungsrisiko von Au-beschichteten Stents wurden diese vom Markt genommen. Im Zeitraum von 1996-1998 waren 90 % der im ECT auf Au positiv getesteten Personen Frauen. Ein Drittel von ihnen war auch gleichzeitig gegen Ni allergisch [24].

## **Palladium (Pd)**

Das Edelmetall Pd gehört in die VII. Gruppe des Periodensystems zusammen mit Platin und Ni und weist eine hohe Korrosionsbeständigkeit auf. Pd ist in geringsten Mengen (2 ppb = parts per billion) in unserer Umwelt vorhanden. Pd in Form löslicher Verbindungen ist in sehr hohen Dosen zelltoxisch bzw. systemisch toxisch. Das



wertvolle Metall wird in der Telekommunikation, Automobilindustrie, bei Zahnlegierungen und Schmuck verwendet. Seit 1980 wuchs mit Anstieg des Goldpreises der Bedarf an Pd ständig gerade für die Herstellung von Zahnlegierungen, Katalysatoren oder Weißgold, das bis zu 20 % Pd enthält. Aufgrund der guten Biokompatibilität schlug die Regierung Japans seiner Bevölkerung Pd-haltige Zahnersatzmaterialien vor, sodass dort der Anteil an Pd auf 20 % stieg und bei fast 90 % aller japanischen Zahnbehandlungen eingesetzt wird [25].

Die Häufigkeit der im ECT gefundenen Pd-Allergien wurde mit 8 % in Österreich, 9 % in England, 9 % in der Türkei, 5,3 % in Italien und 13 % in Israel beschrieben [26]. In der Türkei wurde bereits zwischen 1996 und 1998 in einer Studie bei 9,4 % eine Pd-Allergie bei den getesteten Patienten ermittelt. Somit lag Pd nach Ni (19,1 %) und Cr (11,8 %) Anfang der 2000er Jahre gemäß Garner auf Platz 3 der „Allerghitliste“ [18]. In einer frühen Studie über Pd-Allergien in den USA ergab eine ECT-Auswertung 12,1 % der Patienten mit Sensibilisierung gegen Pd [26]. Der etwas höhere Prozentsatz der Pd-Allergien im Vergleich mit Europa korreliert gut mit dem vermehrten Einsatz von Dentallegierungen in den USA [26].

Das Thema „Pd-Allergie“ ist weiterhin aktuell und manche Autoren sehen deren Relevanz als unterschätzt [27-29].

## **Legierungen**

Voraussetzung für allergiebedingte Hautreaktionen auf Legierungen ist die erfolgte Sensibilisierung sowie Freisetzung und Ionenbildung der entsprechenden Metallkomponente. Zahnärztlich verwendete Edelmetall-Legierungen bestehen seit den 30er Jahren zu einem Viertel aus Pd-Au-Silber(Ag)-Legierungen, die 52-78 % Pd, 6-20 % Ag und 4-19 Masse% Au enthalten [16].

Als Nebenbestandteil in hoch goldhaltigen Legierungen trägt Pd wesentlich zu guten Festigkeitseigenschaften bei. Die Löslichkeit von Pd und anderen Edelmetallen aus Legierungen wurde untersucht. Dabei sind nicht nur Herstellungsprozess und Zusammensetzung der Legierungen sondern auch die Verweildauer im Mund, mechanische Faktoren, Ernährungsweise und pH-Wert wie auch der Kontakt mit dem Speichel ausschlaggebend für die Korrosion [22, 30]. Am Beispiel einer Kupfer-

Pd-Legierung zeigten Syverud et al., dass diese Kombination ein höheres Korrosionsrisiko zusammen mit erhöhter Zytotoxizität (speziell durch die Kupferkomponente) hat [31].

Au reagiert nicht als Metall selbst, sondern wie schon erwähnt nach „Salzbildung“ durch Einwirkung von Speichel oder Schweiß immunogen [32]. Die Korrosion der Legierungen wird auch durch die Anwesenheit anderer Metalle wie Kupfer (Cu) oder Cr oder auch von Amalgam gefördert. Aufgrund der unterschiedlichen elektrochemischen Eigenschaften der Edelmetalle werden die bereits erwähnten „galvanischen Effekte“ wirksam [22, 32].

Es wird immer wieder beobachtet, dass Ni-allergische Patienten auch eine Sensibilisierung gegen Pd haben können. Garner vermutete, dass die meisten Pd-positiven Patienten mit parallelem Ni-positivem ECT eine Kreuzreaktion auf die beiden Metalle haben dürften, da beide zur Gruppe VII des Periodensystems gehören [18].

Viele Patienten haben kunststoffbasierte Zahnersatzprothesen, wobei allergiebedingte Beschwerden selten sind und am ehesten durch Acrylat-Sensibilisierung hervorgerufen werden [33]. Ähnlich niedrig – aber epidemiologisch noch nicht untersucht – scheint die Komplikationsrate, wenn bei metall-allergischen Patienten das entsprechende Metall enthaltende Dentalmaterial eingesetzt wird. Hier bedarf es einer besseren Datenerfassung [34].

### **Epikutantest (ECT)**

Aus Sicht des Allergologen ist bei Metall-Allergieverdacht der ECT im Moment das beste standardisierte Testverfahren. Der ECT wurde für die Allergenidentifizierung bei einer bestehenden Kontaktallergie der Haut entwickelt.

Das Vorliegen von Metallallergien wird in der Regel nicht mit dem Metall selbst, sondern unter Verwendung von Metallsalzlösungen geprüft. Die ECT-Standardreihe (DKG 1) enthält z. B. die Ni-Testpräparation Ni(II)-sulfat. Neben Palladiumchlorid (PdCl<sub>2</sub>) wurde 1991 Au als Natriumthiosulfatoaurat (NTSA) in die Dentalmetall-Testreihe (DKG 17) eingeführt und ergab damals unerwartet hohe positive

Testergebnisse für Au. Seitdem konnte auch oft die klinische Relevanz der Au-Sensibilisierung gezeigt werden [35]. In Schweden und den USA konnte der Zusammenhang von Goldallergie und Anwesenheit von Zahngold gezeigt werden [36].

Au- und Pd-Allergien treten oft gekoppelt auf [3, 21, 37]. Unter den verschiedenen Au-Salzen zeigt NTSA weniger irritative Reaktionen im ECT. Somit wird mit NTSA bei Au-Allergieverdacht auch in Nordamerika getestet [3, 38].

Das Testprinzip beruht darauf, dass allergenspezifische T-Lymphozyten in das mit dem Testallergen versetzte Hautareal einwandern, die lymphohistozytäre Entzündung zum Ödem („Spongiose“) führt und damit eine makroskopisch wahrnehmbare Hautinfiltration nach 24h, 72h/96h bzw. bei sogenannten „späten Allergenen“ nach 7 bis 10 Tagen hervorrufen. Wichtig ist, dass die Testresultat-Ablesung durch geschulte, erfahrene Allergologen/Dermatologen erfolgt und Kontraindikationen/ Einflußfaktoren auf den ECT beachtet werden [39].

Es wird mitunter nicht nur der ECT mit standardisierten Testpräparationen, sondern auch mit Metallplättchen der Implantat-Legierungen durchgeführt. Dieses Vorgehen ist aber nicht standardisiert und hat viele offene Fragen:

Reicht die Metallfreisetzung aus Metallplättchen, um eine entsprechende Sensibilisierung im ECT nachzuvollziehen [40]?

Auf welche Komponente erfolgte – wenn beobachtet – die positive Reaktion?

Was sagt ein negatives Testresultat aus?

Dementsprechend gibt es eine Stellungnahme der DKG (Deutsche Kontaktallergie Gruppe), die vom Epikutantest mit „Metall-Legierungsplättchen“ abrät [34].

Auch wenn eine positive ECT-Reaktion als Indikator für eine spezifische Metallallergie gesehen werden kann, so besteht manchmal das Risiko der Fehleinschätzung „irritativer Reaktionen“. Dementsprechend fordert die DKG das Mitführen einer „Irritans“-Kontrolle. Auch hat der ECT eine variable Sensitivität, eine nicht 100 %ige Reproduzierbarkeit und betrifft bevorzugt eine epikutan erfolgte Sensibilisierung [39, 41]. Eine vorbeugende präventive Hauttestung im Rahmen der Planung von neuem Zahnersatzmaterial ist abzulehnen, da der ECT ja „nur“ eine

bestehende Sensibilisierung aufdecken kann. Auf Au im ECT bei Patienten mit Dentalersatzstoffen zu testen, wird daher nur bei entsprechendem Allergie-Verdacht empfohlen [42]. Die klinische Relevanz der gefundenen ECT-Reaktion muss dann beurteilt werden [3, 21].

Muris et al. berichteten, dass Patienten mit Pd-haltigem Zahnersatz deutlich öfter Reaktionen auf Pd sowohl im ECT als auch bei der Lymphozytenaktivierung in vitro zeigen [22].

### **Lymphozytentransformationstest (LTT)**

Zum besseren Verständnis von Unverträglichkeitsreaktionen wurde schon in den 60er Jahren von Coombs und Gell eine Einteilung krankmachender Immunreaktionen in 4 Typen entwickelt, die mit Erweiterung bis heute gilt [43, 44]. Typ I-III Reaktionen sind antikörpervermittelt; Beispiele sind Soforttypreaktionen wie Urtikaria oder allergische Rhinokonjunktivitis, weiterhin antikörpervermittelte zytotoxische Reaktionen und immunkomplex/komplementbedingte Entzündungen. Bei Spättyp- (Typ IV-) Reaktionen spielen T-Lymphozyten eine Schlüsselrolle in der Pathogenese der allergischen Kontaktdermatitis; das klassische Beispiel sind kontaktallergische Ekzeme durch niedermolekulare Substanzen. Im Hinblick auf allergische Reaktionen gegenüber Metallimplantaten stehen Typ-IV-Reaktionen im Vordergrund [44].

Die nach Sensibilisierung bei einem weiteren Antigenkontakt einsetzende T-Lymphozyten-vermittelte Spättypreaktion kann biologisch nützlich sein, wie z. B. gegen Mykobakterien. Sie kann aber auch als Typ-IV-Allergie, z. B. gegen Au oder Pd als Hapten in MHC Assoziation Ekzeme oder Mundschleimhaut-Reaktionen auslösen.

Ni und Pd haben eine weitere Eigenschaft gemeinsam wie von Rachmawati et al. [45] und Schmidt et al. [46] bereits beschrieben: Ni und Pd lösen beide auch eine unspezifische Aktivierung der T-Zellen aus indem sie direkt an den TLR4-Rezeptor binden.

Der LTT basiert auf der Messung einer einsetzenden Lymphozytenreaktion (z. B. Proliferation und/oder Zytokinexpression etc.) nach Antigenstimulation in vitro. Um dies als spezifische In-vitro-Antwort zu interpretieren müssen verschiedene Bedingungen erfüllt sein: Vorhandensein spezifischer sensibilisierter T-Zellen nach vorausgegangenem Kontakt des Patienten mit dem betreffenden Allergen; Ausschluss unspezifischer Reaktionen durch Mitführen von Kontrollansätzen (Kontrollantigene; Blutproben nicht exponierter Personen); Relevanzbeurteilung anhand von Klinik bzw. Gegenüberstellung mit anderen Testresultaten (z. B. ECT) [47-49].

Mit dem LTT lässt sich eine Sensibilisierung der mononukleären Zellen des peripheren Blutes (PBMC) – speziell der darin enthaltenen Lymphozyten – gegenüber Antigenen nachweisen [50, 51]. PBMC werden dafür in der Regel über Dichtegradientenzentrifugation aus heparinisierten Blutproben gewonnen. Im LTT kann bei Stimulation durch Metallionen in vitro eine spezifische Proliferationsantwort Hinweis auf T-Zell-vermittelte Reaktionen sein [44, 52, 53].

Der LTT wird derzeit als wissenschaftliche Labormethode zum Nachweis einer spezifischen T-zellulären Sensibilisierung gegenüber ausgewählten Metallen in unserem Labor eingesetzt [49, 54]. Der Test beruht darauf, dass die antigeninduzierte Zellteilung der entsprechend spezifischen T-Lymphozyten erkennbar gemacht wird. Beispielsweise durch Messung des Einbaus von radioaktiv (Tritium-) markiertem Thymidin ( $^3\text{H}$  Thymidin) in die sich teilenden Zellen oder über das Färbeverhalten der sich teilenden Zellen. Der Test wird allerdings in verschiedenen Laboren unter verschiedenen Bedingungen (verwendete Zellzahl, Kulturdauer, Limit für positive Reaktion) durchgeführt und nur bei entsprechender Validierung besteht eine hohe Sensitivität und Spezifität. Eine Einsatzmöglichkeit des LTT kann sein, bei Allergieverdacht auf Metalle in Zahnersatzmaterialien eine den ECT ergänzende Information zur Sensibilisierung zu liefern.

Obwohl In-vitro-Immuntests wünschenswert wären, um den ECT abzulösen, konnten bisher noch keine zufriedenstellenden Tests entwickelt werden. Der Laboraufwand ist zu komplex, eine Validierung fehlt weitgehend und die genauen

Pathomechanismen der Allergie-bedingten Dentalmaterialunverträglichkeit sind noch Gegenstand der Forschung [22].

In einer frühen Studie von Räsänen (1996) [1] wurden 52 Patienten (größtenteils Frauen) weiter untersucht, die aufgrund von Verdacht auf Dentalmaterialunverträglichkeit oder Unverträglichkeit auf Au-Schmuck einen ECT erhalten hatten und eine positive ECT-Reaktion gegenüber NTSA gezeigt hatten. Als Zusatzuntersuchung wurde bei 30/52 Patienten ein LTT mit Au-Salzen durchgeführt, wobei 22/30 (73,3 %) auf eine der Au-Salz-Testkonzentrationen einen positiven LTT zeigten. 13 Kontrollen ohne NTSA-ECT-Reaktion hatten einen negativen LTT. Schon damals interpretierten die Autoren dies als Hinweis darauf, dass der LTT den ECT unterstützen könnte.

Stejskal et al. publizierten eine Modifikation des LTT zum Nachweis einer „Metall-Sensitivität“ – den MELISA (memory lymphocyte immunostimulation assay). Zu diesem Zeitpunkt waren noch die meisten Patienten mit Zahnersatz gegen Au zusammen mit Amalgam ausgesetzt [55]. Valentine-Thon [56] untersuchte die Reproduzierbarkeit, Sensitivität, Spezifität und Zuverlässigkeit des MELISA-LTT bei Patienten mit Metallallergie und stellte fest, dass Ni mit 73 % die häufigsten „Probleme“ macht, gefolgt von Au mit 17 % und Pd mit 13 %. Stejskal untersuchte 2015 [57] anhand des MELISA die Häufigkeitsrate der Spättypsensibilisierung gegen Metalle – einschließlich Au und Pd – denen die Patienten ausgesetzt waren. Die Ergebnisse der Studie von 1991-2006 sollten zeigen, dass Pd und Au unter den häufigsten erkennbaren Allergenen im MELISA waren. Problematisch ist bei diesen Studien, dass aus umweltmedizinischer Sicht im MELISA gesehene „In-vitro-Sensibilisierung“ mit „Typ-4-Allergie“ gleichgesetzt wird.

Um eine Spättyp / Typ IV-Sensibilisierung festzustellen gibt es also zwei Testmethoden: den ECT als evaluierten Goldstandard und den LTT. Bei Fragen z. B. zur Arzneimittelallergie können sich die Tests ergänzen. Ein Hauptunterschied ist, dass a) der ECT als „Mini-Provokationstest“ an der Haut Kontaktallergien erfasst, bei denen meist der Allergenkontakt kutan erfolgt oder das klinische Problem auch eine Haut-/Schleimhautkomponente hat sowie b) der LTT als wissenschaftlicher, gering

evaluierter, Ansatz eine systemische Sensibilisierung erfassen kann, deren Wertigkeit ergänzend beurteilt werden muss.

### **Zytokinbestimmung**

Die Zytokinproduktion bei Kontaktallergie gegen Ni-spezifischen T-Zellen wurde anfangs als T-Helfer 1 (TH1) vermittelte Immunantwort gesehen. In der Zwischenzeit hat sich herauskristallisiert, dass es eine TH1- und TH2-Komponente gibt und Zytokine wie IFN $\gamma$ , IL-2, IL-5 und IL-13 involviert sind [22, 50, 53, 58, 59].

Das T-Helfer 1 (TH1-) Zytokin IFN $\gamma$  ist eines der wichtigsten, von Memory-T-Zellen produzierten Aktivierungssignale für Monozyten/Makrophagen und vermittelt damit Entzündungen und Gewebeschädigung. Es wurde spekuliert, dass der Typ der Zytokin-Antwort auf die Stimulation möglicherweise die nachfolgende Immunantwort modulieren könnte [52, 60, 61].

Für Au und Pd sind solche Zusammenhänge bisher selten hergestellt worden [22, 29, 62]. Vamnes et al. [63] bestimmten in den Überständen der Lymphozytenkulturen die Menge des IFN $\gamma$ . Sie diskutierten bereits die Relevanz der Lymphozytenreaktivität für die zukünftige Diagnostik bei allergischen Reaktionen gegen Pd und Au, wenn die Sensitivität und Spezifität festgestellt werden könnte. Die immunologischen Mechanismen bei überschiessenden Reaktionen gegen Metallionen wurden auch von Büdinger et al. [52] bereits diskutiert. Minang et al. [62] untersuchten die Zytokinfreisetzung, die durch z. B. Ni, Pd oder Au in PBMCs ausgelöst wurden bei Patienten mit positiven ECT-Reaktionen gegen die entsprechenden Metalle. Alle Metalle induzierten eine gemischte TH1- und TH2-Typ Zytokinproduktion. Signifikant höhere Antworten bei Patienten im Vergleich zu Kontrollen erhielten sie für Au bei IL-13 (TH2) und IFN $\gamma$  (TH1). Es wurde als Hinweis auf eine gemischte TH1- und TH2-Zytokinantwort auch bei Pd- oder Au-Sensibilisierung interpretiert. Ähnliches wurde in unserer Arbeitsgruppe bereits von Summer et al. [50, 58] bei Ni-Allergie gezeigt.

Interessanterweise konnten Muris et al. 2014 [22] berichten, dass eine erhöhte LTT-Reaktivität gegenüber Au in vitro auch erkennbar war, obwohl ein positives ECT-Ergebnis gegen Au fehlte. Die Arbeitsgruppe konnte bei Patienten mit Exposition

gegenüber Au-haltigem Zahnersatz und Komplikationen im LTT die Produktion von IL-5, IL-13 und IFN $\gamma$  messen. Diese Ergebnisse weisen darauf hin, dass In-vitro-Assays eine ergänzende Informationsquelle sein können z. B. wenn der ECT nicht aussagekräftig oder nicht durchführbar ist.

## **2. Ziel der Arbeit**

An der Universitätsklinik für Dermatologie und Allergologie der LMU München besteht seit über 10 Jahren eine Spezialsprechstunde für Patienten mit Verdacht auf Implantatunverträglichkeit. Es ergab sich die Möglichkeit, hier auch eine Patientengruppe mit Dentalmaterialunverträglichkeit im Hinblick auf Anamnesedaten und allergologische Befunde – insbesondere ECT-Ergebnisse – im Vergleich zu nicht allergischen Kontrollen zu analysieren. Weiterhin konnte auch anhand von Patienten-Blutproben die LTT-Reaktivität und die Zytokinfreisetzung in vitro untersucht werden. So sollten folgende Fragen bearbeitet werden:

1. Gibt es einen Zusammenhang zwischen ECT-Reaktion und LTT-Antwort gegenüber den Metallen Ni, Pd, Au?
2. Wie sieht die entsprechende In-vitro-Zytokinproduktion der stimulierten PBMC aus?
3. Lässt sich anhand der Zytokinmuster eine unspezifische, sensibilisierungs- und kreuzreaktionsbedingte Zytokinfreisetzung unterscheiden?

## **3. Material und Methoden**

Im Rahmen der vorliegenden Arbeit sollten Patienten mit Verdacht auf Zahnmaterialunverträglichkeit in Bezug auf die ECT-Reaktion speziell gegen Pd, Au und Ni hinterfragt werden. Von Interesse war nicht nur die ECT-Reaktivität, sondern auch die LTT-Antwort. Letztere interessierte sowohl im Sinne von Proliferationsantwort als auch von Zytokinproduktion in vitro. Deshalb untersuchten wir auch die Freisetzung der pro-inflammatorischen Zytokine wie IFN $\gamma$  und TNF- $\alpha$  (TH1-Profil), sowie IL-5 (TH2-Profil), als auch IL-17A (TH17) und schließlich IL-8 (unspezifische Immunantwort) aus den Überständen der stimulierten PBMC.



### 3.1. Material

ECT-Testsubstanzen	(Allmiral – Hermal, Reinbeck, Deutschland)
Ficoll-Paque	(Pharmacia, Uppsala, Schweden)
Medium RPMI-1640	(Biochrome, Berlin, Deutschland)
Antibiotic-/Antimykotic-Lösung	(Gibco, Deutschland)
MEM Vitamine	(Biochrome, Berlin, Deutschland)
Non-essential-amino-acids	(Biochrome, Berlin, Deutschland)
HBSS	(Hanks' Balanced Salt Solution, Biochrome, Berlin, Deutschland)
Trypitanblau Lösung 0,4%	(Gibco, Deutschland)
T-Zellmitogen Phytohämagglutinin (PHA)	(Biochrom, Berlin, Deutschland)
Tetanustoxoid (TT)	(Chiron Behring, Berlin, Deutschland)
3H-Thymidin	(Amersham Biosciences, Freiburg, Deutschland)
Phorbolmyristat Acetat (PMA)	(Sigma, Taufkirchen, Deutschland)
96 well Polystyren Kulturplatten	(Sarstedt, Nümbrecht, Deutschland)
Pippettenspitzen (10µl, 100µl, 1000µl)	(Sarstedt, Nümbrecht, Deutschland)
Serologische Pipetten (5ml, 10ml, 25ml)	(Sarstedt, Nümbrecht, Deutschland)
Combitips advanced (5ml)	(Eppendorf, Hamburg Germany)
Falcon-Tubes (50ml)	(Sarstedt, Nümbrecht, Deutschland)
Reagiergefäß Safe Seal (1,5ml)	(Sarstedt, Nümbrecht, Deutschland)
Polystyrene Round-Bottom Tube (5ml)	(Falcon, Mexico)
Palladium(II)chlorid: PdCl <sub>2</sub>	(Sigma, Taufkirchen, Deutschland)
Natriumthiosulfataurat: NTSA	(Allmiral-Hermal, Reinbeck, Deutschland)
Nickel-II-sulfat x 6 H <sub>2</sub> O	(Sigma, Taufkirchen, Deutschland)
Human Soluble Protein Master Buffer Kit	(BD Biosciences, Franklin Lakes, USA)
Zytokin-Flexset (IL-5, IL-8, IL-17A, IFN $\gamma$ , TNF- $\alpha$ )	(BD Biosciences, Heidelberg, Deutschland)

### 3.2. Patienten

Unter den Patienten, die in der Abteilung für Allergologie der Hautklinik der LMU München vorgestellt werden, gibt es immer eine Anzahl von Patienten, bei denen bei Verdacht auf Zahnmaterialunverträglichkeit ein ECT mit der Standardreihe DKG 1

inklusive Nickel(II)-sulfat ( $\text{NiSO}_4$ ) und der Dentalmetallreihe DKG 17, die auch Pd(II)-chlorid ( $\text{PdCl}_2$ ) und Natriumthiosulfatoaurat (NTSA) enthält, durchgeführt wird.

Insgesamt konnten zunächst 70 Patienten in der vorliegenden Studie aus dem zwischen 03/2016 und 03/2017 getesteten Patientengut eingeschlossen werden, die gegen Dentalmetalle im ECT getestet wurden und alle Pd- bzw. Au-haltige Zahnersatzmaterialien wie Kronen, Brücken oder Inlays nach Aussage ihrer Zahnärzte hatten. Eine Patientin hatte einen Pd-haltigen Ehering, der als Ursache für ihr Ekzem am Finger ermittelt werden konnte.

Die Rekrutierung geschah nach Aufklärung und Einwilligung der Patienten. Das Studienprotokoll ist von der zuständigen Ethikkommission genehmigt worden (EK-Nr. 61-15).

Für die vorliegende Arbeit konnten wir – um In-vitro-Reaktionen auf NTSA bzw  $\text{PdCl}_2$  zu testen – zusätzlich Blutspender aus diesem Kollektiv gewinnen:

9 Patienten (9 w, Altersdurchschnitt von 62 Jahren; 38-77 Jahre), die im ECT positiv auf NTSA reagierten, sowie 11 nicht im ECT darauf reagierende Patienten als Kontrollprobanden (2 m, 9 w, Altersdurchschnitt von 61 Jahren; 39-78 Jahre) und

10 Patienten (10 w, Altersdurchschnitt von 60 Jahren; 41-71 Jahre), die positiv auf  $\text{PdCl}_2$  reagierten, sowie 5 (1 m, 4 w, Altersdurchschnitt von 66 Jahren; 45-76 Jahre) nicht im ECT darauf reagierende Patienten als Kontrollprobanden.

Bei allen Patienten wurde eine fragebogengestützte detaillierte Anamnese (gemäß [64]) erhoben. Neben Alter und Geschlecht und Familienvorgeschichte wurde auch nach Zahnmaterialien und Implantatmaterialien, atopischer Diathese (Rhinoconjunctivitis allergica (RCA), Asthma bronchiale (AB) oder Atopischer Dermatitis (AD)) sowie Art, Intensität und Dauer der Beschwerden gefragt. Der verwendete Fragebogen ist im Anhang wiedergegeben. Bei allen eingeschlossenen Patienten lagen jeweils relevante positive ECT-Ergebnisse vor und zeigten somit die mögliche Unverträglichkeit gegen die untersuchten Metalle an.

Die Eigenschaften der eingeschlossenen Blutspender sind in Tab. 1 (Daten zu NTSA) und 5 (Daten zu PdCl<sub>2</sub>) dargestellt (siehe Ergebnisteil).

### **3.3. Epikutantest (ECT)**

Bei allen einbezogenen Patienten wurde ein ECT mit den aktuellen deutschen Standard-Testreihen durchgeführt. Die Testsubstanzen sind als standardisierte Testpräparationen in den jeweiligen Testreihen enthalten: Standardreihe DKG 1 (Ni(II)-sulfat: NiSO<sub>4</sub>) oder DKG 17 Dentalmetalle (Pd(II)-chlorid: PdCl<sub>2</sub> und Natriumthiosulfatoaurat: NTSA).

Alle Substanzen wurden nach Standardverfahren am Rücken aufgebracht und die Testablesung erfolgte nach 48, 72 Stunden, sowie als Spätablesung nach 6 Tagen. Die Beurteilung der Hautreaktionen erfolgte gemäß der Kriterien der DKG [65].

Die Hautreaktionen wurden als negativ - (keine Reaktion), oder positiv mit +, ++ und +++ beurteilt. Zweifelhafte oder irritative Reaktionen wurden als negativ gewertet.

### **3.4. Lymphozytentransformationstest (LTT)**

Nach erfolgter Einwilligung wurden bei den Probanden Blutproben entnommen. Die Abnahme von 60 ml Vollblut erfolgt in Standardtechnik aus einer Armvene. Entsprechend der etablierten Methode von Summer et al. [49, 50] wurden aus den heparinisierten Blutproben über Dichtezentrifugation die mononukleären Zellen des peripheren Blutes (PBMC) isoliert. Aufgrund der unterschiedlichen Dichte der Blutelemente konnten nach der Zentrifugation der Blutprobe (20 min bei 2000 U/min) mit Ficoll-HypaqueR (Phadia, Freiburg, Germany) (Dichte von 1,077 g/ml) die Lymphozyten enthaltenden mononukleären Zellen des Blutes (PBMC) in einer separaten „Interface“-Schicht erhalten und abpipettiert werden. Es folgten weitere Waschvorgänge um Verunreinigungen durch Erythrozyten und Thrombozyten sowie Ficoll-Resten zu entfernen. Das Pellet wurde in 1 ml Kulturmedium aufgenommen.

Die Zellzahlbestimmung der isolierten Zellen erfolgte unter dem Mikroskop mittels einer Neubauerkammer. Durch die Verdünnung mit Trypanblau-Lösung war eine Beurteilung der Vitalität der Zellen gleichzeitig möglich. Um vergleichbare Bedingungen für die verschiedenen Blutproben zu schaffen, wurde die

Zellkonzentration auf  $1 \times 10^6$ /ml in RPMI 1640 Medium eingestellt, das 10 % humanes autologes Serum mit HEPES (25 mM), L-Glutamin, antibiotisch-antimykotische Lösung (Gibco International, Karlsruhe, Germany, NEAA und MEM Vitamine (Biochrom, Berlin, Germany) enthält. Es erfolgte die weitere Inkubation in 96 well-Zellkulturplatten mit jeweils 200.000 Zellen pro Vertiefung im Kulturmedium (Biochrome, Berlin, Germany).

Um den LTT nach Stimulation mit NTSA/PdCl<sub>2</sub> zu optimieren, wurden zunächst 20 verschiedene Konzentrationen der Metallsalze in Vorversuchen getestet.

In der Studie wurden dann 9 verschiedene, nicht toxische NTSA-Konzentrationen von  $1,0 \times 10^{-2}$  M,  $3,33 \times 10^{-3}$  M,  $1,11 \times 10^{-3}$  M,  $3,70 \times 10^{-4}$  M,  $1,23 \times 10^{-4}$  M,  $4,12 \times 10^{-5}$  M,  $1,37 \times 10^{-5}$  M,  $4,57 \times 10^{-6}$  M und  $1,52 \times 10^{-6}$  M zur Stimulation verwendet.

Der Stimulus PdCl<sub>2</sub> wurde in den folgenden Konzentrationen eingesetzt:  $1,0 \times 10^{-3}$  M,  $5,0 \times 10^{-4}$  M,  $2,5 \times 10^{-4}$  M,  $1,25 \times 10^{-4}$  M,  $6,25 \times 10^{-4}$  M,  $3,13 \times 10^{-5}$  M,  $1,56 \times 10^{-5}$  M,  $7,81 \times 10^{-6}$  M,  $1,91 \times 10^{-7}$  M.

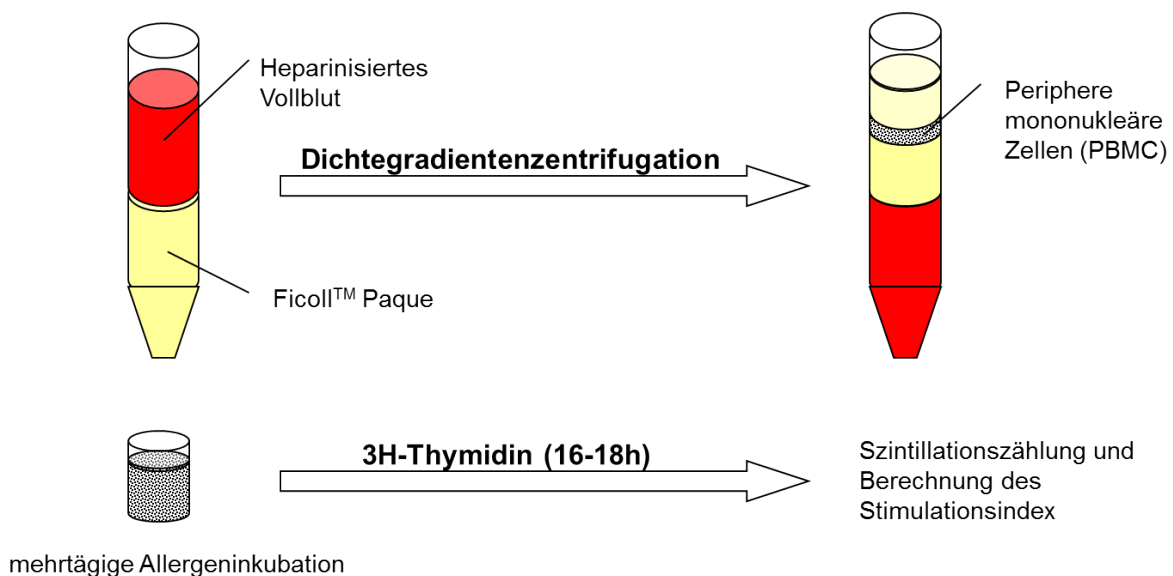
NiSO<sub>4</sub> wurde in folgenden Konzentrationen eingesetzt:  $2,5 \times 10^{-5}$  M,  $1 \times 10^{-5}$  M,  $7,5 \times 10^{-6}$  M. Das T-Zellmitogen Phytohämagglutinin (PHA) in einer Konzentration von 2,4 µg/ml (Biochrom, Berlin, Germany) sowie das Tetanustoxoid (TT, 5 µg/ml, Chiron Behring, Berlin, Germany) oder das reine Kulturmedium dienten als Kontrolle.

Um mögliche „Randeffekte“ auszuschließen wurde möglichst vermieden, die Zellen der äußeren Reihen zu verwenden. Am Tag 6 wurde die potenziell damit induzierte Proliferationsantwort durch am Vortag (= Tag 5) erfolgte Zugabe und Über-Nacht-Inkubation von radioaktivem 3-H-Thymidin (Amersham Biosciences Freiburg, Germany) beurteilt. Die Zellkulturplatten wurden eingefroren und anschließend die inkorporierte Radioaktivität gemessen.

Der Stimulationsindex (SI) als Ausdruck der LTT-Reaktion errechnet sich aus dem Verhältnis der gemessenen Radioaktivität (in counts per min = cpm) in der Mediumkontrollkultur geteilt durch die gemessene Radioaktivität in der stimulierten Zellkultur. Als positiv wurde ein SI > 3 gewertet, als fraglich ein SI zwischen 2 und 3.

Parallele, nicht radioaktive Kulturansätze wurden mitgeführt und deren Überstände kryokonserviert, um potentielle Unterschiede in der Zytokinproduktion in vitro bestimmen zu können. Für diese parallelen, „nicht-radioaktiven“ Kulturen wurde statt PHA eine Mischung aus Phorbol-myristate-acetate (PMA, 15 ng/ml, Sigma-Aldrich, München, Germany) und Ionomycin (1,5 µg/ml, Sigma-Aldrich, München, Germany) als positive Kontrolle eingesetzt.

Das folgende Übersichtsschema (Abb. 1) zeigt den Ablauf des LTT-Proliferationstests.



**Abb. 1:** Durchführung des Lymphozytentransformationstests; Abbildung mit Erlaubnis des Verlags aus [49].

### 3.5. Zytokin-Bestimmung

Nach der 6-tägigen Kultur wurden die Überstände der nicht-radioaktiv markierten Kulturen aus vierfach gepoolten Experimenten entnommen und auf die folgenden pro-inflammatorischen Zytokine getestet:

IFN $\gamma$  und TNF- $\alpha$  (TH1-Profil), IL-5 (TH2), IL-17A (TH17) und IL-8 (unspezifische Immunantwort) bei Stimulation mit NTSA und PdCl $_2$ ; zusätzlich IL-5 bei den Vergleichsexperimenten mit Ni-Stimulation.

Die Zytokinproduktion wurde ermittelt durch den Einsatz von Fluoreszenz-markierten Antikörpern in einem „cytometric bead assay“ (CBA) (BD Biosciences, Heidelberg, Deutschland). Bei der Methode des CBAs handelt es sich um ein Immunoassay zur Messung gelöster Proteine mittels Antikörper-gebundenen „Kügelchen“ (Beads). Hierfür wurde eine Lösung mit den „Mixed-capture-beads“ vorbereitet, die 5 verschiedenen Capture-beads sowie den Verdünnungspuffer enthielt. Zu 12,5 µl dieser Lösung wurde jeweils 12,5 µl der Probe hinzupipettiert. Es erfolgte eine Inkubation bei Raumtemperatur für eine Stunde. Anschließend wurden 12,5 µl einer Detektionsreagenzlösung hinzugefügt und für zwei Stunden bei Raumtemperatur inkubiert. In der Lösung befindliche Zytokine sowie nachträglich hinzugefügte fluoreszierender Antikörper werden an die Beads gebunden, woraus ein Zytokin-spezifisches Fluoreszenzmuster entsteht. Nach einem Waschschrift durch Zugabe von 250 µl Waschpuffer in jede Probe mit anschließender Zentrifugation für 5 Minuten bei 300 rpm werden die Beads in 150 µl Waschpuffer resuspendiert. Die Zytokin- sowie antikörpergebundenen Beads werden im Anschluss mittels Durchflusszytometrie nach Gebrauchsanweisung des Herstellers quantifiziert (Detection limit > 0,5 pg/ml) [66].

### **3.6. Statistische Auswertung**

Die statistische Auswertung erfolgte mit Hilfe des IBM Softwarepaketes SPSS (IBM Ehningen, Deutschland), die bereits in unserer Arbeitsgruppe etabliert ist [67].

Um Unterschiede zwischen den Versuchsgruppen und somit spezifische Phänomene aufzudecken, wurde der nichtparametrische Wilcoxon-Rangsummentest durchgeführt. Das Signifikanzniveau wurde bei  $p < 0,05$  angesetzt.

## **4. Ergebnisse**

Der vorliegende Ergebnisteil ist in zwei Teile untergliedert. Im ersten Teil werden die Ergebnisse dargestellt, die aus den Versuchen zu Au-Allergie (Testsubstanz NTSA) resultieren.

Der zweite Teil zeigt die Ergebnisse, die zu den Metallen Pd (Testsubstanz PdCl<sub>2</sub>) und zu Ni (Testsubstanz NiSO<sub>4</sub>) bei den jeweils relevanten (d. h. allergischen und nichtallergischen) Patienten erzielt wurden.

### **4.1. Ergebnisse zu Au (Testsubstanz NTSA)**

#### **4.1.1. Allgemeine Patienten-Charakteristika**

Bei allen untersuchten Patienten wurde eine fragebogengestützte detaillierte Anamnese erhoben. Gefragt wurde nach Art, Intensität und Dauer der Beschwerden, Unverträglichkeit von Dentalmaterialien, atopische Diathese (Eigenanamnese von Heuschnupfen, Asthma oder Neurodermitis), Metallunverträglichkeit an der MSH sowie sonstige potentielle Allergien [68].

9 Patienten mit Dentalmaterialunverträglichkeit und positiver ECT-Reaktion gegen NTSA und 11 Patienten ohne NTSA-ECT-Reaktion (Kontrollen) besaßen alle goldhaltige Zahnersatzmaterialien wie Brücken, Zahnprothesen oder Kronen. Die Patienten litten an Ekzemen, Mundschleimhautprobleme wie Gingivitis, Lichen ruber mucosa, Rötungen oder brennendes Gefühl im Mund. In unsere Untersuchung konnten als NTSA-ECT-positive Personen nur Frauen eingeschlossen werden. Dies steht in Übereinstimmung mit bereits publizierten Arbeiten, die zeigten, dass die Beschwerden deutlich mit steigendem Alter zunehmen und eindeutig mit dem weiblichen Geschlecht in Verbindung stehen [22].

Die in unserer Studie teilnehmenden 9 Patientinnen mit NTSA-ECT-Reaktion waren im Durchschnitt 62 Jahre (von 38-77 Jahren) alt. Bei den Patienten des Kontrollkollektivs fanden sich 2 männliche und 9 weibliche Personen mit einem mittleren Alter von 61 Jahren (39-78 Jahren) (Tab. 1 und 2).

	Alter/ ♀/♂	Art des Au enthaltenden Materials	Klinische Symptome	ECT			Bekannte Allergien
				Au	Pd	Ni	
NTSA 1	77, f	Krone, Brücke	Rötung, Zahnfleischentzündung	++	-	-	AA
NTSA 2	63, f	Prothese, Krone, Brücke	Schmerzen, Rötung, Zahnfleischverdickung, Schwellung	+	-	++	Keine
NTSA 3	73, f	Krone, Brücke	Brennen, Rötung, Zahnfleischentzündung	++	-	-	Keine
NTSA 4	73, f	Zahnkrone	Leukoplakie	+	-	-	Keine
NTSA 5	62, f	Krone, Brücke, Zahnimplantat	offene Stellen im Mund	+	++ +	+	Keine
NTSA 6	38, f	Zahnfüllung	Schmerzen, Rötung, Zahnfleischentzündung Zahnfleischverdickung	+	-	-	AA, AR
NTSA 7	47, f	Krone, Brücke, Schmuck	Juckreiz, Ekzeme/Ausschlag	++	-	-	AA, AE, AR
NTSA 8	55, f	Prothese	Schmerzen, Kribbeln	+	+	+++	Keine
NTSA 9	66, f	Schmuck, Uhrenarm- band	Ekzeme	+	++	-	AE, AR

**Tab. 1:** Übersicht Patientenkollektiv (n = 9) zum Themenbereich Au-Allergie einschließlich Symptomatik, vermutete Beschwerdenauslöser und Allergiehintergrund sowie ECT-Ergebnis. (AA = Allergisches Asthma bronchiale, AE = Atopisches Ekzem, AR = Allergische Rhinokonjunktivitis).



	Alter/ ♀/♂	Art des Au enthaltenden Materials	Klinische Symptome	ECT			Bekannte Allergien
				Au	Pd	Ni	
K- NTSA 1	67/f	Krone, Brücke	Schmerzen, Rötung, Zahnfleischentzündung, Zahnfleischverdickung, Lichen ruber planus	-	-	-	AA, AR
K- NTSA 2	62/f	Krone, Brücke	Schmerzen, Brennen, Zahnfleischentzündung, Zahnfleischverdickung	-	-	-	Keine
K- NTSA 3	75/f	Krone, Brücke, Zahnimplantat	Schwellung	-	-	++	Keine
K- NTSA 4	68/f	Krone, Brücke	Zahnfleischentzündung	-	-	-	Keine
K- NTSA 5	63/f	Prothese	Schmerzen. Brennen, Rötung, Zahnfleischverdickung	-	-	-	Keine
K- NTSA 6	78/f	Krone, Brücke, Prothese	Brennen, Schmerzen, Rötung, Zahnfleischentzündung, offene Stellen im Mund	-	-	-	AA, AR
K- NTSA 7	59/m	Krone, Brücke	Schmerzen, Zahnfleischentzündung, offene Stellen im Mund	-	-	-	Keine
K- NTSA 8	39/m	Zahnsperre	offene Stellen im Mund	-	-	-	Keine
K- NTSA 9	39/f	Krone, Brücke, Zahnimplantat	Sekret	-	-	-	Keine
K- NTSA 10	60/f	Krone, Brücke	Kribbeln, Bläschenbildung, metall. Geschmack	-	-	-	AA, AR
K- NTSA 11	61/f	Krone, Brücke, Prothese	Rötung, Zahnfleischentzündung, Zahnfleischverdickung, offene Stellen im Mund	-	-	-	Keine

**Tab. 2:** Übersicht Kontrollpatientenkollektiv (n = 11) zum Themenbereich Au-Allergie einschließlich Symptomatik, vermutete Beschwerdenauslöser und Allergiehintergrund sowie ECT-Ergebnis. (AA = Allergisches Asthma bronchiale, AE = Atopisches Ekzem, AR = Allergische Rhinokonjunktivitis).

#### 4.1.2. Epikutantest (ECT)

Die hier zugrunde gelegte Identifikation von NTSA-allergischen Patienten basiert auf dem ECT, der mit einer Serie der gängigsten Kontaktallergene inklusive Ni und der Dentalmetall-Testreihe mit PdCl<sub>2</sub> und NTSA in unserer Klinik durchgeführt wurde. Es konnte eine positive Korrelation zwischen gefundener NTSA-ECT-Reaktion mit der klinischen Geschichte bei allen Patienten gezeigt werden.

Bei der Ablesung des ECT zeigten bei den 9 eingeschlossenen NTSA-positiven Patientinnen die meisten, d. h. 6 eine einfach + Antwort im ECT auf NTSA, 3 eine ++. Je eine Patientin war im ECT gegen NTSA und nur Pd bzw. eine andere Patientin nur gegen NTSA und Ni positiv. 2 Patientinnen waren gegen alle drei getesteten Metalle im ECT sensibilisiert. 5 Patientinnen waren monosensibilisiert gegen NTSA. Sechs der neun Patientinnen reagierten nicht auf Pd und Ni im ECT.

Die Kontrollpersonen zeigten definitionsgemäß im ECT keine Reaktion auf NTSA – jedoch reagierte eine Kontrollperson positiv auf Nickel.

	Negativ	+	++	+++
NTSA	0	6	3	0
Pd	6	1	1	1
Ni	6	1	1	1

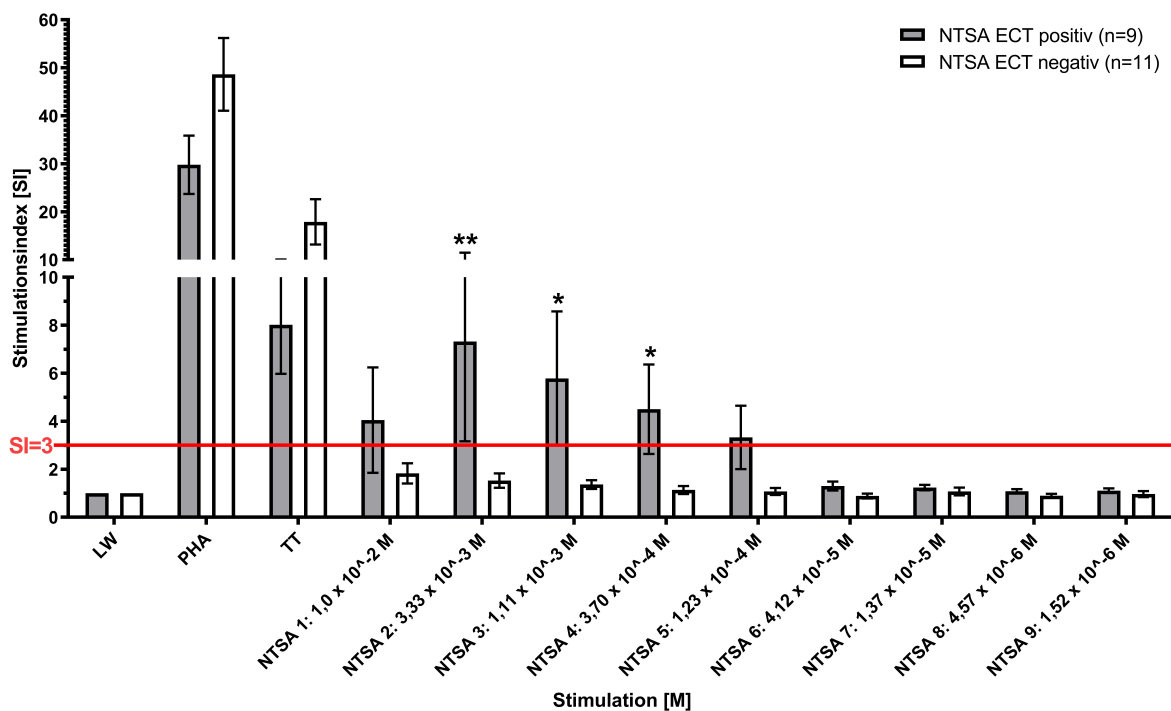
**Tab. 3:** ECT-Ergebnisse gegenüber Pd und Ni bei 9 Patienten mit positiver ECT-Reaktion gegenüber NTSA. Teils mehrfache Reaktionen pro Patient.

#### 4.1.3. Lymphozytentransformationstest (LTT) bei Verwendung von NTSA

Unsere Ergebnisse zeigen deutlich, dass eine klinisch vermutete Überempfindlichkeit gegen Au sowohl mit einem positivem ECT gegen NTSA als auch mit einer signifikanten Lymphozyten-Proliferationsantwort (SI > 3) im LTT einhergeht (Abb. 1a / Tab. 4). Letztere zeigte sich insbesondere dann, wenn „ideale“ In-vitro-Stimulationskonzentrationen von NTSA gewählt worden waren. Bei den Konzentrationen von NTSA 1 bis 5 lag der mittlere SI-Wert bei ECT positiven Patienten über 3 (NTSA 1 SI = 4,05 ± 2,19, NTSA 2 SI = 7,32 ± 4,16, NTSA 3 SI = 5,79 ± 2,80, NTSA 4 SI = 4,50 ± 1,86, NTSA 5 SI = 3,3 ± 1,32).

Bei den Konzentrationen NTSA 6 bis 9 lag der mittlere SI deutlich unter 3 (NTSA 6 SI =  $1,30 \pm 0,19$ , NTSA 7 SI =  $1,24 \pm 0,12$ , NTSA 8 SI =  $1,08 \pm 0,09$ , NTSA 9 SI =  $1,11 \pm 0,10$ ). Die NTSA-Reaktivität von PBMC nicht-NTSA-allergischer Personen blieb dagegen insgesamt unter dem „SI-Limit von 3“ und wies damit auf eine spezifische Reaktivität der Allergiker-Gruppe hin.

Die SI-Werte der ECT-negativen Patienten lagen im gesamten Stimulationsbereich von „NTSA 1 bis 9“ unter 3 (NTSA 1 SI =  $1,82 \pm 0,42$ , NTSA 2 SI =  $1,52 \pm 0,30$ , NTSA 3 SI =  $1,36 \pm 0,18$ , NTSA 4 SI =  $1,14 \pm 0,17$ , NTSA 5 SI =  $1,07 \pm 0,14$ , NTSA 6 SI =  $0,89 \pm 0,10$ , NTSA 7 SI =  $1,07 \pm 0,16$ , NTSA 8 SI =  $0,90 \pm 0,08$ , NTSA 9 SI =  $0,97 \pm 0,12$ ).



**Abb. 1a:** LTT-Reaktion bei Stimulation mit 9 verschiedenen NTSA-Konzentrationen von PBMC NTSA-allergischer (n = 9) und nicht-allergischer (n = 11) Patienten. Auswertung nach 6 Tagen Stimulation mit NTSA. SI = Stimulationsindex; PHA (Phytohämagglutinin) und TT (Tetanus-Toxoid) sowie LW (Leerwert unstimulierter Kulturen) sind mit angegeben.

\*p < 0,05, \*\*p < 0,01.

Fünf Patientinnen, welche im LTT einen SI > 3 aufwiesen, zeigten im ECT eine einfach + positive Reaktion, drei Patientinnen eine zweifach ++ Reaktion.

Eine Patientin, welche im LTT einen SI < 3 (bzw. fraglicher SI 1,97, aufgerundet 2) aufwies, zeigte im ECT eine einfach + positive Reaktion. Dies ist in Tab. 4 zusammengefasst.

	ECT -	ECT +	ECT ++
<b>LTT SI &gt; 3</b>	0	5	3
<b>LTT SI &lt; 3</b>	0	1	0

**Tab. 4:** Vergleich von ECT- versus LTT-Ergebnissen bei 9 NTSA-ECT-positiven Patienten; der Parameter LTT SI > 3 galt als erfüllt, wenn in mindestens einer der Testkonzentrationen der SI über 3 lag.

Die PBMC der Patienten und Kontrollpersonen zeigten bei den Kontrollstimuli auf PHA eine adäquate, nicht zwischen den Gruppen signifikant unterschiedliche Proliferationsantwort, sowie auf TT eine dem variierenden Immunisierungsstatus entsprechende In-vitro-Antwort.

8 Patientinnen hatten eine positive LTT-Reaktion mit SI > 3, eine zeigte eine fragliche Antwort mit SI < 3. Die Kontrollansätze waren alle negativ im LTT. Die besten Ergebnisse erhielten wir wie oben erwähnt bei einer Konzentration von NTSA zwischen  $1,0 \times 10^{-2}$  M und  $1,23 \times 10^{-4}$  M (als NTSA 1-5 bezeichnet); das Maximum lag bei einer Konzentration von  $3,33 \times 10^{-3}$  M (siehe Abb. 1a). Alle anderen getesteten Konzentrationen führten zu keiner erhöhten In-vitro-Reaktion in beiden Gruppen und konnten somit NTSA-ECT-positiv von NTSA-ECT-negativen Blutspender nicht unterscheiden.

Es lässt sich also zusammenfassend sagen, dass die NTSA-induzierte LTT-Antwort bei einem durch den obigen Versuch identifizierten idealen Stimulationsbereich mit den ECT-Ergebnissen weitgehend korreliert und Patienten mit positivem NTSA-ECT auch durch eine positive LTT-Antwort (bei mindestens einer NTSA-Konzentration des identifizierten Stimulationsoptimums) identifiziert werden.

#### **4.1.4. Zytokin-Freisetzung bei NTSA-stimulierten Zellkulturen**

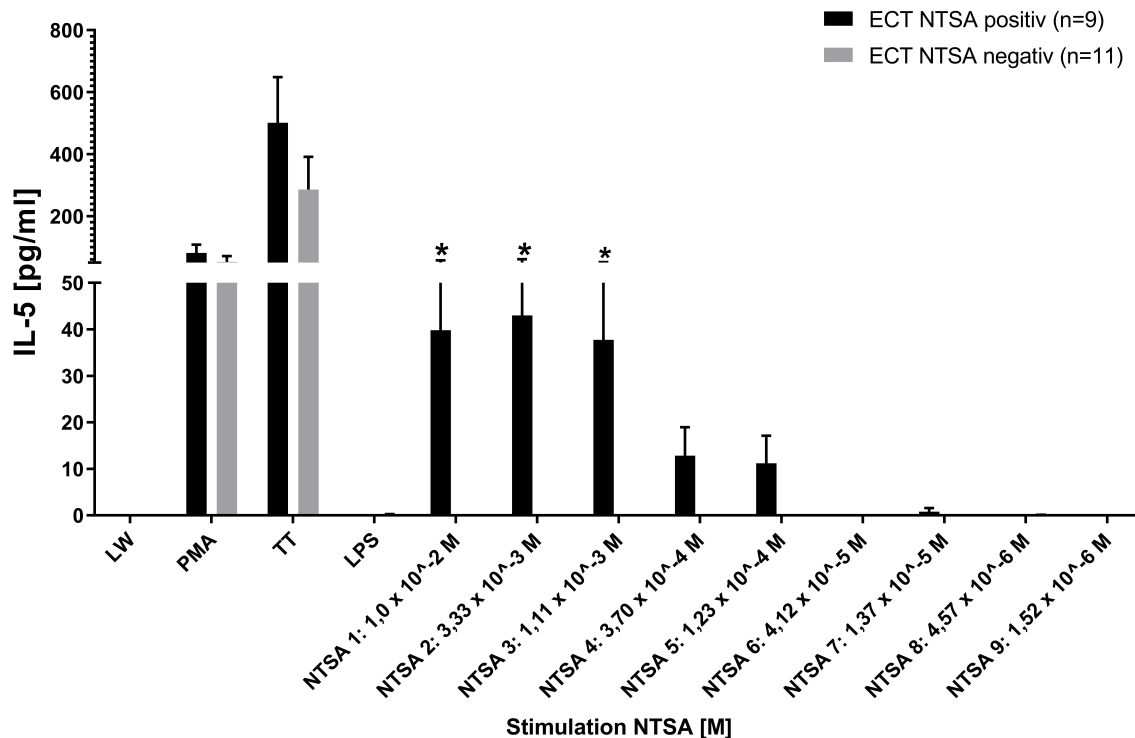
Die In-vitro-Zytokin-Freisetzung wurde bei allen 9 NTSA-ECT-positiven Patientinnen und 11 Kontrollpersonen nach identischer PBMC-NTSA-Stimulation wie bei den LTT-Proliferationsversuchen gemessen. Die getesteten Zytokine in unserer Studie waren IL-5, IL-8, IL-17A, TNF- $\alpha$  und IFN $\gamma$ . Die NTSA-induzierte Produktion der getesteten Zytokine war oft deutlich höher bei Patienten, die auch einen positiven ECT zeigten – verglichen mit den Kontrollen. Dies fiel besonders bei IL-5, TNF- $\alpha$  und IFN $\gamma$  auf, während einzig die IL-8-Freisetzung sich umgekehrt verhielt.

Die Stimulation mit PMA und besonders TT als positive Kontrollen zeigten eine deutlich gute, ähnliche Induzierbarkeit der IL-5-Produktion bei NTSA-ECT-negativen und -positiven Blutspendern (Details siehe nachfolgend). Das bedeutet, dass per se keine unterschiedliche „Fähigkeit“ zur IL-5-Freisetzung als „Störfaktor“ für den Vergleich der Kollektive vorlag. LPS induzierte keine Freisetzung von IL-5 und IFN $\gamma$ ; andererseits ergab sich eine deutliche LPS-induzierbare TNF- $\alpha$  Freisetzung als Positivkontrolle.

#### **IL-5-Freisetzung**

Das TH2-Zytokin IL-5 wurde von NTSA-stimulierten PBMC der NTSA-ECT-positiven Patienten signifikant freigesetzt im Vergleich mit den 11 NTSA-ECT-negativen Kontroll-Patienten. Eine maximale Freisetzung erfolgte nach NTSA-Stimulation mit den Konzentrationen von  $1,0 \times 10^{-2}$  M,  $3,33 \times 10^{-3}$  M,  $1,11 \times 10^{-3}$  M, wobei die maximale mittlere IL-5 Menge bei  $43 \pm 18$  pg/ml lag.

Die PBMC der Kontrollpersonen zeigten wenn überhaupt dann nur eine sehr geringe IL-5-Freisetzung nach NTSA-Zugabe. Eine Stimulation mit PMA / Ionomycin (Positivkontrolle) ergab keine Unterschiede bei Patienten oder Kontrollen. Die Ergebnisse sind in Abb. 1b zusammengefasst.

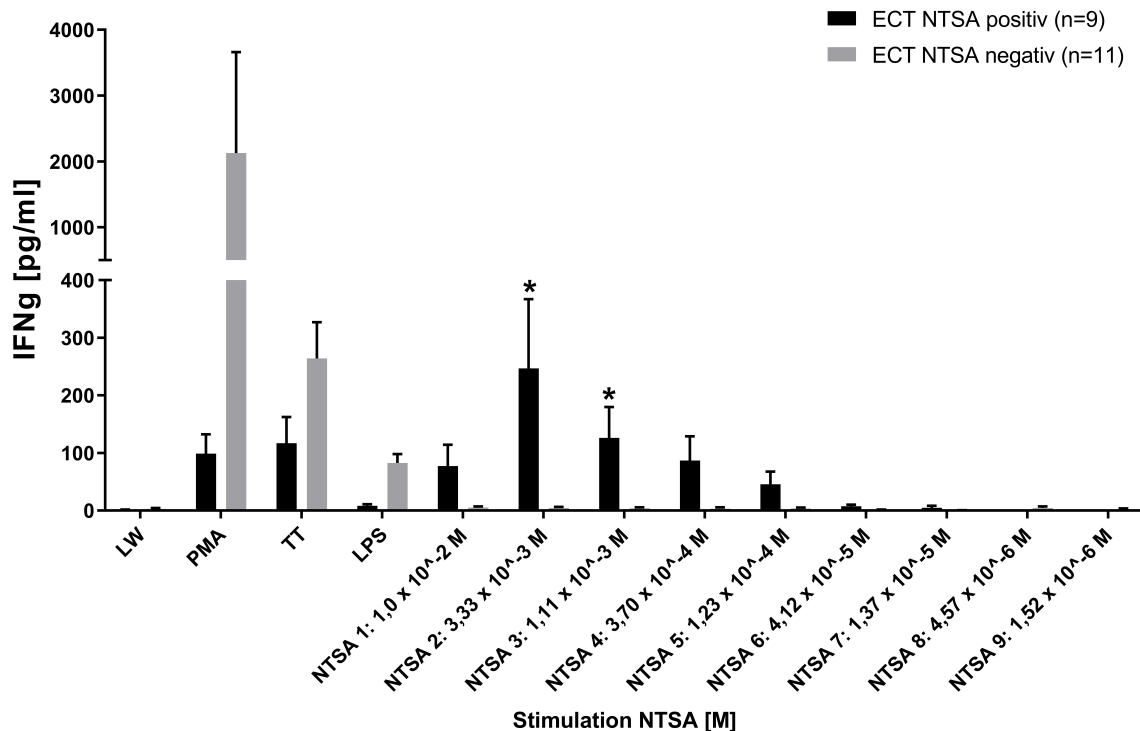


**Abb. 1b:** IL-5-Produktion nach Stimulation mit NTSA in 9 verschiedenen Konzentrationen von PBMC NTSA-allergischer (n = 9) und nicht-allergischer (n = 11) Patienten nach 6 Tagen. Stimulation mit PMA (Phorbolmyrestataacetat) und TT (Tetanus-Toxoid) sowie nur Kulturmedium (LW; Leerwert unstimulierter Kulturen) sind mit angegeben. \*p < 0,05.

### IFN- $\gamma$ -Freisetzung

Die Stimulation mit PMA sowie TT ergab eine erhöhte Freisetzung von IFN $\gamma$  der PBMC beider Patientengruppen. Bei den Kontrollblutproben war dies deutlicher.

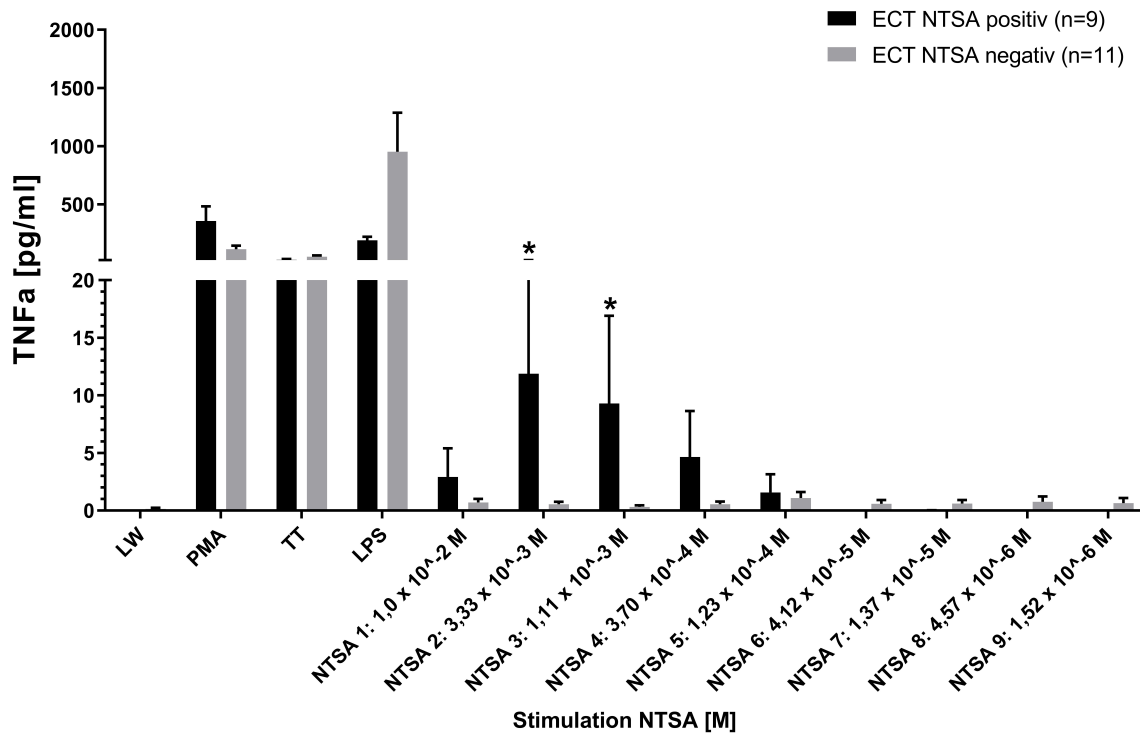
In Bezug auf NTSA-Stimulation ergaben die 11 Kontrollblutproben keine nennenswerte Freisetzung von IFN $\gamma$ . Andererseits konnte eine signifikante Freisetzung von IFN $\gamma$  bei einer Stimulation durch NTSA zwischen  $1,0 \times 10^{-2}$  M bis  $1,23 \times 10^{-4}$  M nur bei Patienten mit einem positiven ECT gegen NTSA gemessen werden. Das mittlere Maximum lag bei einer NTSA-Konzentration von  $3,33 \times 10^{-3}$  M bei 246 pg/ml IFN $\gamma$  (Abb. 1c).



**Abb. 1c:** IFN- $\gamma$ -Produktion nach Stimulation mit NTSA in 9 verschiedenen Konzentrationen von PBMC NTSA-allergischer (n = 9) und nicht-allergischer (n = 11) Patienten nach 6 Tagen. Stimulation mit PMA (Phorbolmyrestataacetat) und TT (Tetanus-Toxoid) sowie nur Kulturmedium (LW; Leerwert unstimulierter Kulturen) sind mit angegeben. \*p < 0,05.

### TNF- $\alpha$ -Freisetzung

Die Kontroll-Stimuli PMA, TT und LPS führten sowohl in der ECT-positiven Patientengruppe als auch bei den 11 negativen Kontroll-Bluspendern zur Freisetzung von TNF- $\alpha$ . Sieht man nun auf die PBMC-Reaktivität bei Stimulation mit NTSA, so ergab sich eine maximale Freisetzung von TNF- $\alpha$  bei einer Konzentration von  $1,0 \times 10^{-2}$  M,  $3,33 \times 10^{-3}$  M,  $1,11 \times 10^{-3}$  M bis  $3,70 \times 10^{-4}$  M bei der ECT-positiven Gruppe. Das Maximum lag wie bei der LTT-Proliferation sowie bei der IL-5- oder IFN- $\gamma$ -Freisetzung bei der zweiten Konzentration von NTSA mit  $3,33 \times 10^{-3}$  M, wobei der maximale Mittelwert von  $12 \pm 8$  pg/ml erreicht wurde. Die ECT-negative Kontrollgruppe zeigte keine nennenswerte Freisetzung von TNF- $\alpha$  nach NTSA-Stimulation. Der Unterschied zu den NTSA-allergischen Patienten war bei zwei Stimulationskonzentrationen signifikant (siehe Abb. 1d).



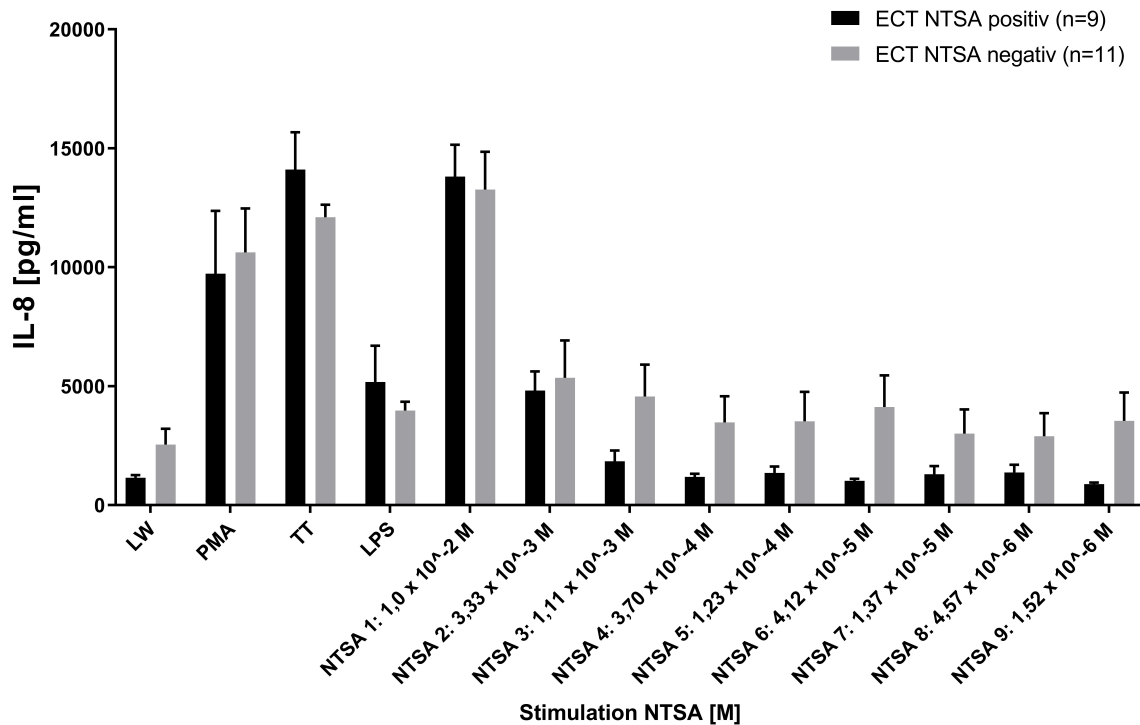
**Abb. 1d:** TNF- $\alpha$ -Produktion nach Stimulation mit NTSA in 9 verschiedenen Konzentrationen von PBMC NTSA-allergischer (n = 9) und nicht-allergischer (n = 11) Patienten nach 6 Tagen. Stimulation mit PMA (Phorbolmyrestataacetat) und TT (Tetanus-Toxoid) sowie nur Kulturmedium (LW; Leerwert unstimulierter Kulturen) sind mit angegeben. \*p < 0,05.

### IL-8-Freisetzung

Bei den Versuchen zur IL-8-Freisetzung wurden ebenfalls PMA, TT und LPS als Kontrollstimuli verwendet und zeigten eine ähnliche Reaktivität beider Patientengruppen. NTSA führte zwar in der Konzentration von  $1,0 \times 10^{-2}$  M bei den im ECT positiven ebenso wie bei den Kontrollprobanden zu einer erheblichen Freisetzung, die mit im Mittel  $13807 \pm 1335$  pg/ml bzw.  $13267 \pm 1584$  pg/ml IL-8 fast das Niveau der Positivkontrolle erreichte.

Die Rolle von IL-8 als möglichem Marker für eher unspezifische Reaktion zeigt sich bei den weiteren eingesetzten niedrigeren Konzentrationen von NTSA, da hier nur noch die PBMC der Kontrollgruppe eine deutliche IL-8-Produktion aufwiesen (siehe Abb. 1e).

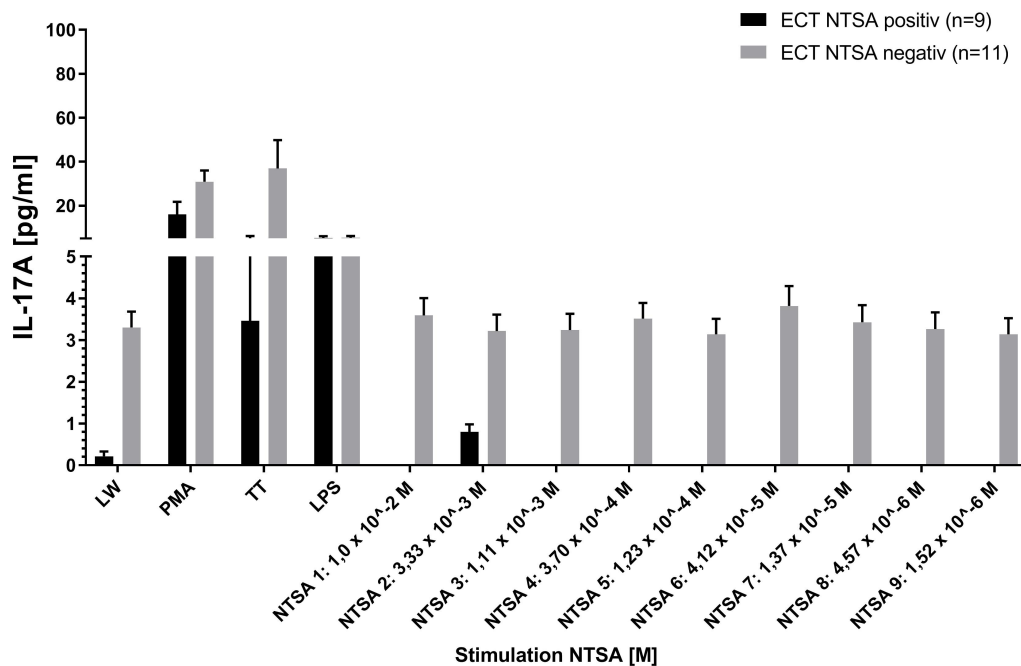




**Abb. 1e:** IL-8-Produktion nach Stimulation mit NTSA in 9 verschiedenen Konzentrationen von PBMC NTSA-allergischer (n = 9) und nicht-allergischer (n = 11) Patienten nach 6 Tagen. Stimulation mit PMA (Phorbolmyrestataacetat) und TT (Tetanus-Toxoid) sowie nur Kulturmedium (LW; Leerwert unstimulierter Kulturen) sind mit angegeben.

### IL-17A-Freisetzung

Auch bei IL-17A wurden als Positivkontrollen PMA, TT und LPS verwendet und zeigten eine deutliche Induzierbarkeit der IL-17A Produktion. Die Kontrollprobanden zeigten bereits eine deutliche basale IL-17A Produktion (maximaler Mittelwert  $3,8 \pm 0,5$  pg/ml), welche aber auch durch die Au-Exposition unverändert bleibt. Dem gegenüber zeigten die NTSA-ECT-positiven Probanden keine IL-17A Produktion.



**Abb. 1f:** IL-17A-Produktion nach Stimulation mit NTSA in 9 verschiedenen Konzentrationen von PBMC NTSA-allergischer (n = 9) und nicht-allergischer (n = 11) Patienten nach 6 Tagen. Stimulation mit PMA (Phorbolmyrestataacetat) und TT (Tetanus-Toxoid) sowie nur Kulturmedium (LW; Leerwert unstimulierter Kulturen) sind mit angegeben.

Zusammenfassend ergab sich zum Themenbereich Au-Allergie / NTSA-Testergebnisse, dass a) LTT-Proliferationsreaktion auf NTSA (d. h. im LTT ein SI > 3 bei mindestens einer der eingesetzten Konzentrationen) und Au-Allergie-Status (d. h. positive ECT-Reaktion gegenüber NTSA) positiv verknüpft waren; b) speziell die IL-5-Freisetzung und geringer die IFN- $\gamma$ - sowie TNF- $\alpha$ -Freisetzung besonders bei Patienten mit NTSA-Kontaktallergie erfolgte – und somit eine gemischte TH2-(IL-5) / TH1-(IFN $\gamma$  und TNF- $\alpha$ ) Antwort vorlag; c) die IL-8-Freisetzung dagegen speziell bei Nicht-NTSA-Allergikern auftrat, d. h. eine eher „unspezifische“ Reaktion (besonders in niedrigeren NTSA-Konzentrationsbereich) anzeigte; d) IL-17A bereits eine messbare basale Produktion bei Nicht-NTSA-Allergikern aufwies, welche sich jedoch nicht bei Au-Exposition ändert und bei NTSA-Allergikern ausblieb.

## **4.2. Ergebnisse zu Pd (Testsubstanz PdCl<sub>2</sub>)**

### **4.2.1. Allgemeine Patienten-Charakteristika**

Insgesamt wurden 15 Personen in diesen Untersuchungsblock eingeschlossen. Bei allen im folgenden beschriebenen 15 Personen wurde auch bei dieser Versuchsreihe analog zu 4.1.1. eine fragebogengestützte detaillierte Anamnese erhoben.

Es handelte sich um 10 Patienten mit einer im ECT festgestellten Allergie auf PdCl<sub>2</sub> und 5 nicht Pd-allergische Patienten als Kontrollen (d. h. Personen ohne festgestellte Allergie auf PdCl<sub>2</sub>). Von diesen 15 Personen besaßen 14 Zahnersatzmaterialien wie Brücken, Zahnprothesen oder Kronen als „potentielle Problemauslöser“. Bei einer Patientin ergab sich der Ehering als Beschwerdenursache, da ein lokales Fingerekzem nach Tragen eines Palladium-Eherings auftrat. 2/10 Patienten litten an Ekzemen, 8/10 hatten MSH-Probleme wie Gingivitis/Lichen ruber/Mucosa-Rötungen oder „brennende Missempfindung“ im Mund.

Von den in diesem Studienteil beschriebenen 15 Personen waren die 10 Patienten mit Allergie auf PdCl<sub>2</sub> alle weiblich und im Durchschnitt 60 Jahre alt (41-71 Jahre). Die 5 Kontrollen (1x männlich, 4x weiblich) hatten ein mittleres Alter von 66 Jahren (45-76 Jahre). Die Eigenschaften dieser 15 Personen sind in Tabelle 5 und 6 dargestellt.

	Alter/ ♀/♂	Art des Pd enthaltenden Materials	Klinische Symptome	ECT		Bekannte Allergien
				Pd	Ni	
Gruppe 1	71, f	Zahnprothese	Schmerzen, Brennen, Erythem, Zahnfleischentzündung Zahnfleischschwellung	+	++	Keine
	69, f	Zahnimplantat, Krone/Brücke	Hitzegefühl, Schmerzen, Schwellung	+	++	AR
	65, f	Zahnimplantat	Juckreiz, Erythem	++	+++	Keine
	57, f	Krone/Brücke	Schmerzen, Erythem, Zahnfleischentzündung	+	++	Keine
	58, f	Zahnimplantat, Krone/Brücke	Aphthen	+++	+	Keine
	68, f	Krone/Brücke	Zahnfleischentzündung	++	+++	AE
	57, f	Zahnimplantat, Krone/Brücke	Schmerzen, Brennen, Rötung, Zahnfleischentzündung	++	+++	Keine
Gruppe 2	52, f	Zahnimplantat, Krone/Brücke	Schmerzen, Zahnfleischentzündung	+	-	AE, AR, AA
	63, f	Zahnimplantat, Krone/Brücke	Schmerzen, Rötung, Zahnfleischentzündung	+	-	AR
	41, f	Ehering	Ekzem	++	-	Keine
Gruppe 3	61, f	Zahnimplantat	Zahnfleischentzündung	-	-	Keine
	75, m	Zahnimplantat, Krone/Brücke	Schmerzen, Zahnfleischentzündung	-	-	Keine
	76, f	Zahnprothese	Brennen	-	-	Keine
	73, f	Zahnprothese	Brennen, Erythem	-	-	Keine
	45, f	Zahnimplantat, Krone/Brücke	Schmerzen, Brennen, Erythem	-	-	AR

**Tab. 5:** Übersicht Patientenkollektiv (n = 15) zum Themenbereich Pd-Allergie einschließlich Symptomatik, vermutete Beschwerdenauslöser und Allergiehintergrund sowie ECT-Ergebnis. (AA = Allergisches Asthma bronchiale, AE = Atopisches Ekzem, AR = Allergische Rhinokonjunktivitis); Gruppe 1 = Patienten mit ECT-Reaktion gegen Pd und Ni; Gruppe 2 = Patienten mit isolierter Pd-Reaktion; Gruppe 3 = Patienten ohne ECT-Reaktion gegen Pd bzw. Ni.

	<b>Patienten mit positivem Pd ECT</b>	<b>Kontrollpatienten</b>
<b>Alter</b>	41-71 Jahre, Mittelwert 60,1 Jahre	45-76 Jahre, Mittelwert 66 Jahre
<b>Geschlecht</b>	10 w	4 w, 1 m
<b>Gründe für die ECT Testung</b>	9/10 Zahnmaterialintoleranz, 1/10 Eheringintoleranz	5/5 Zahnmaterialintoleranz
<b>Anamnestische Metallunverträglichkeit</b>	10/10	0/5
<b>Atopische Diathese</b>	5/10	1/5

**Tab. 6:** Charakteristika der Patienten mit positiven PdCl<sub>2</sub>-ECT (n = 10) und der Kontrollpatienten mit negativem PdCl<sub>2</sub>-ECT (n = 5).

#### 4.2.2. Epikutantest (ECT)

Von den zur Studienteilnahme Befragten hatten, wie oben genannt 15 Personen, d. h. 10 Personen mit positiver Pd-ECT-Reaktion, sowie 5 Personen ohne ECT-Reaktion auf Pd, sowie Ni eingewilligt. Da in diesem Abschnitt Ergebnisse zu PdCl<sub>2</sub> anhand der oben genannten 15 Personen behandelt werden, sind deren ECT-Reaktionen zu Ni bzw. Pd zusammen mit Symptomatik und allgemeiner Atopieanamnese in den obigen Tabellen 5 und 6 dargestellt.

Innerhalb der 15 Patienten des Studienteils zu Pd-Allergie hatten die 10 Patienten mit Pd-Kontaktallergie folgende Konstellationen: 3 Patienten hatten isolierte ECT-Reaktionen auf Pd (PdCl<sub>2</sub>), 7 reagierten sowohl auf Pd als auch Ni. 5 Patienten waren ohne ECT-Reaktion auf Dentalmetalle (speziell nicht auf Pd sowie Ni) und wurden dementsprechend als „Kontrollen“ bezeichnet.

Die ECT-Reaktionen auf Pd waren bei den o. g. 10 Patienten wie folgt: ein Patient reagierte +++, vier ++ und 5 + positiv. 3/10 Patienten zeigten eine Monosensibilisierung auf Pd, 7/10 reagierten gleichzeitig positiv auf Ni. Dazu kamen die oben genannten 5 Kontrollen. So konnten wir unsere 15 Patienten in 3 Gruppen unterteilen.

Gruppe 1: 7 Patienten mit Pd- und Ni-Reaktion im ECT  
Gruppe 2: 3 Patienten, mit isolierter Pd-ECT-Reaktion  
Gruppe 3: 5 Patienten („Kontrollen“) ohne ECT-Reaktionen  
Diese Einteilung gibt Tabelle 5 wider.

#### **4.2.3. Lymphozytentransformationstest (LTT)**

Es wurden wie unter 3.4. beschrieben auch hier die nach Vorversuchen ermittelten 9 nicht-toxischen Metallsalz-Konzentrationen verwendet. Da 7 der 10 Pd-allergischen Patienten auch eine positive ECT-Reaktion gegenüber Ni aufwiesen, war parallel auch ein LTT mit NiSO<sub>4</sub> erfolgt. Die 3 hierzu verwendeten Konzentrationen (siehe auch 3.4.) entsprachen der etablierten Methodik von Summer et al. [49, 50].

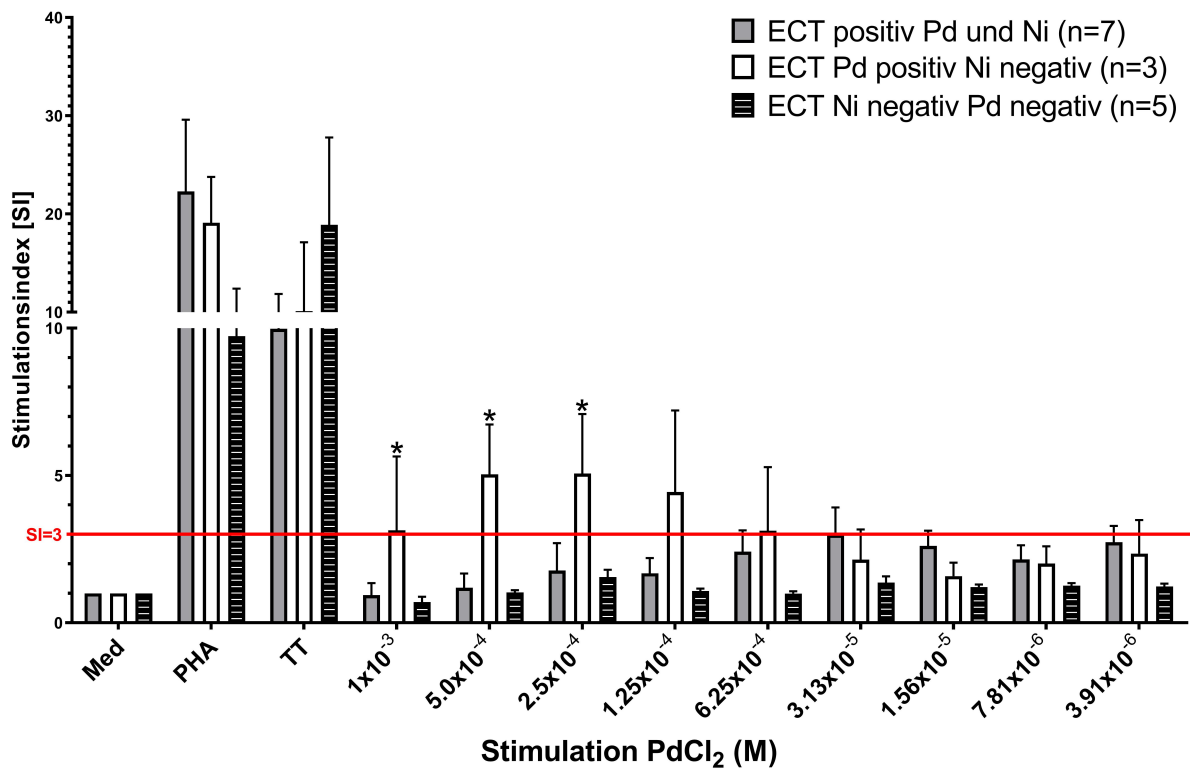
##### **4.2.3.1. Lymphozytentransformationstest (LTT) bei Verwendung von PdCl<sub>2</sub>**

Die LTT-Ergebnisse nach PdCl<sub>2</sub>-Stimulation wurden sowohl in Beziehung auf gefundene Pd-Allergie als auch auf doppelt positive ECT Reaktion (gegen Pd und Ni) bzw. auf doppelt negativen Status (weder Pd- noch Ni-Allergie) ausgewertet.

Abb. 2a zeigt die Proliferation von PBMC (als SI ausgedrückt) bei Patienten mit doppelt positivem ECT gegen Ni und Pd (Gruppe 1), positivem ECT nur gegen Pd (Gruppe 2) und negativem ECT gegen Ni und Pd (Gruppe 3) nach 6 Tagen Stimulation mit PdCl<sub>2</sub> in 9 verschiedenen Konzentrationen. Der SI gilt als positive Reaktion, wenn ein SI > 3 vorliegt. Dies ist dementsprechend mit einer roten Trenngrenze in der Grafik markiert.

Erwartungsgemäß zeigten die nur auf Pd im ECT positive Patienten (Gruppe 2) bei höheren PdCl<sub>2</sub>-Konzentrationen eine deutliche Stimulierbarkeit ihrer PBMC. Die höchste Stimulationsantwort erfolgte bei einer Konzentration zwischen  $5 \times 10^{-4}$  M bis  $1,25 \times 10^{-4}$  M PdCl<sub>2</sub> (maximaler mittlerer SI = 9,98). Patienten mit gleichzeitiger Ni-Reaktion im ECT blieben bei Pd-Stimulation jedoch negativ. PBMC aller drei Gruppen zeigten eine gute, nicht signifikant unterschiedliche Stimulationsantwort auf das pan T-Zell-Stimulans PHA sowie auf das „Recall-Antigen“ TT. Die PHA-Stimulationsantworten waren: Gruppe 1:  $22,29 \pm 7,3$ ; Gruppe 2:  $19,11 \pm 4,67$ ; Gruppe 3:  $9,72 \pm 2,67$ ). Die Stimulationsantworten auf TT spiegeln auch den (nicht signifikant) unterschiedlichen Immunstatus wider: Gruppe 1:  $9,98 \pm 1,88$ ; Gruppe 2:

10,11 ± 7,01; Gruppe 3: 18,88 ± 8,91. Die PHA- und TT-Antworten sind auch in Abbildung 2a mit aufgeführt.

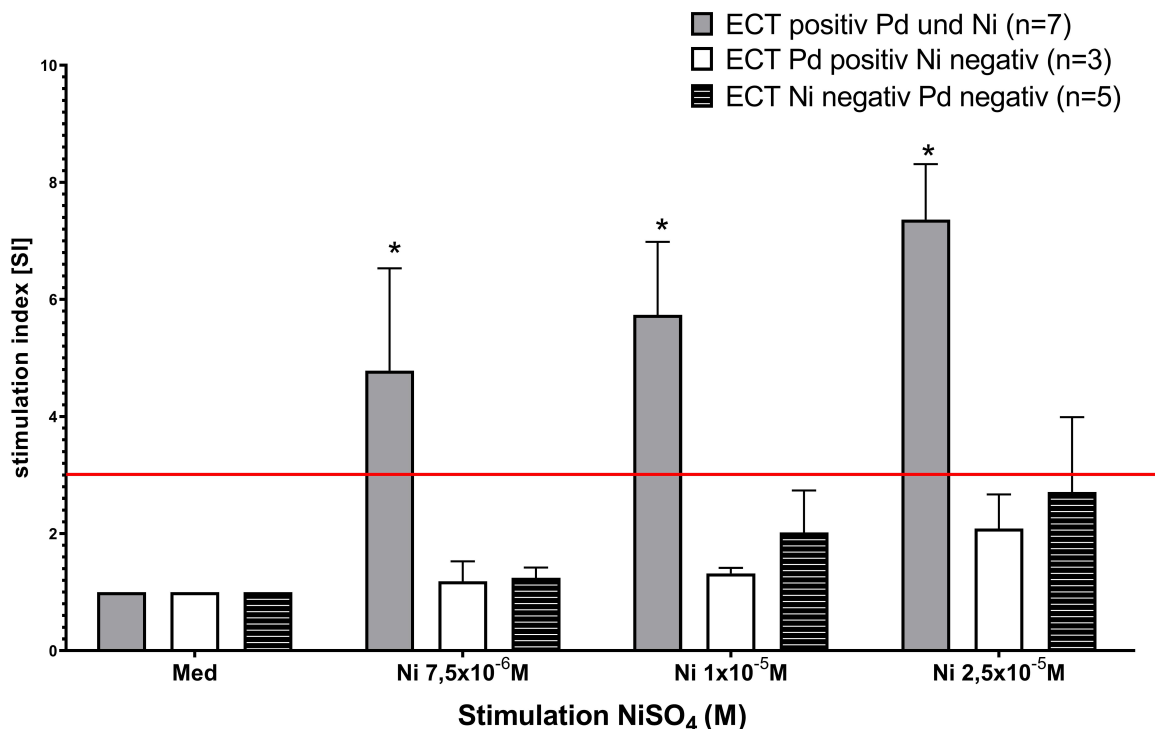


**Abb. 2a:** LTT-Proliferationsraten von PBMC nach PdCl<sub>2</sub> Stimulation bei Patienten mit zweifach positivem ECT gegen Ni und Pd (Gruppe 1), positivem ECT nur gegen Pd (Gruppe 2) and negativem ECT gegen Ni und Pd (Gruppe 3) nach 6 Tagen Stimulation mit PdCl<sub>2</sub> in drei verschiedenen Konzentrationen. Der Stimulations-Index (SI) wurde angegeben, wobei SI > 3 als positive Reaktion angesehen wird (SI = 3 als rote Linie angegeben); PHA = Phytohaemagglutinin; TT = Tetanus Toxoid; \*p < 0,05.

#### 4.2.3.2. Lymphozytentransformationstest (LTT) bei Verwendung von NiSO<sub>4</sub>

Alle Patienten mit einem positiven ECT gegen Ni reagierten im LTT auf NiSO<sub>4</sub> mit einem SI > 3 bei mindestens einer Konzentration, wobei SI > 3 als positive Reaktion angesehen wird. Diese Patienten-LTT-Daten sind als grauer Balken in der Abbildung 2b gezeigt. Die Proliferationsantworten auf NiSO<sub>4</sub> von PBMC bei Patienten mit zweifach positivem ECT gegen Ni und Pd (Gruppe 1), positivem ECT nur gegen Pd (Gruppe 2) und negativem ECT gegen Ni und Pd (Gruppe 3) zeigen, dass nur Blutproben von simultan Pd- und Ni-allergischen Blutspendern signifikant (d. h. mit SI > 3) reagieren. Im Vergleich mit der ausbleibenden Reaktion von „nur“ Pd

allergischen Blutspendern lässt sich schlussfolgern, dass bei der Gruppe 1 vermutlich die Nickelallergie im Vordergrund steht und die Pd-ECT-Reaktion eher eine „Kreuzreaktion“ sein dürfte.



**Abb. 2b:** LTT-Proliferationsraten von PBMC nach NiSO<sub>4</sub>-Stimulation bei Patienten mit zweifach positivem ECT gegen Ni und Pd (Gruppe 1), positivem ECT nur gegen Pd (Gruppe 2) and negativem ECT gegen Ni und Pd (Gruppe 3) nach 6 Tagen Stimulation mit Ni in drei verschiedenen Konzentrationen. Der Stimulationsindex (SI) wurde angegeben, wobei SI > 3 als positive Reaktion angesehen wird (SI = 3 als rote Linie angegeben). Die Positiv-Kontrollen Phytohaemagglutinin (PHA) und Tetanustoxoid (TT) – hier nicht gezeigt – ergaben keine Unterschiede in den 3 Gruppen). \*p<0.05.

#### 4.2.4. Zytokin-Freisetzung bei PdCl<sub>2</sub>-und NiSO<sub>4</sub>-stimulierten Zellkulturen

Die getesteten Zytokine in diesem Studienteil waren ebenfalls IL-5, IL-8, TNF-α und IFNγ sowie zusätzlich IL-17A, wobei die auffälligsten Unterschiede zwischen den Kollektiven bei der IL-5-Antwort in vitro auftraten.

Die PBMC der Patienten, die im ECT positiv sowohl auf Pd als auch Ni (Gruppe 1) reagierten, produzierten IL-5 als Antwort auf PdCl<sub>2</sub>- und NiSO<sub>4</sub>-Stimulation (Abb. 2c und d). Patienten mit Monosensibilisierung gegen Pd (Gruppe 2) und die Kontrollgruppe ohne Sensibilisierung (Gruppe 3) zeigten keine signifikante IL-5-Antwort ihrer PBMC auf den Einsatz von Pd oder Ni.

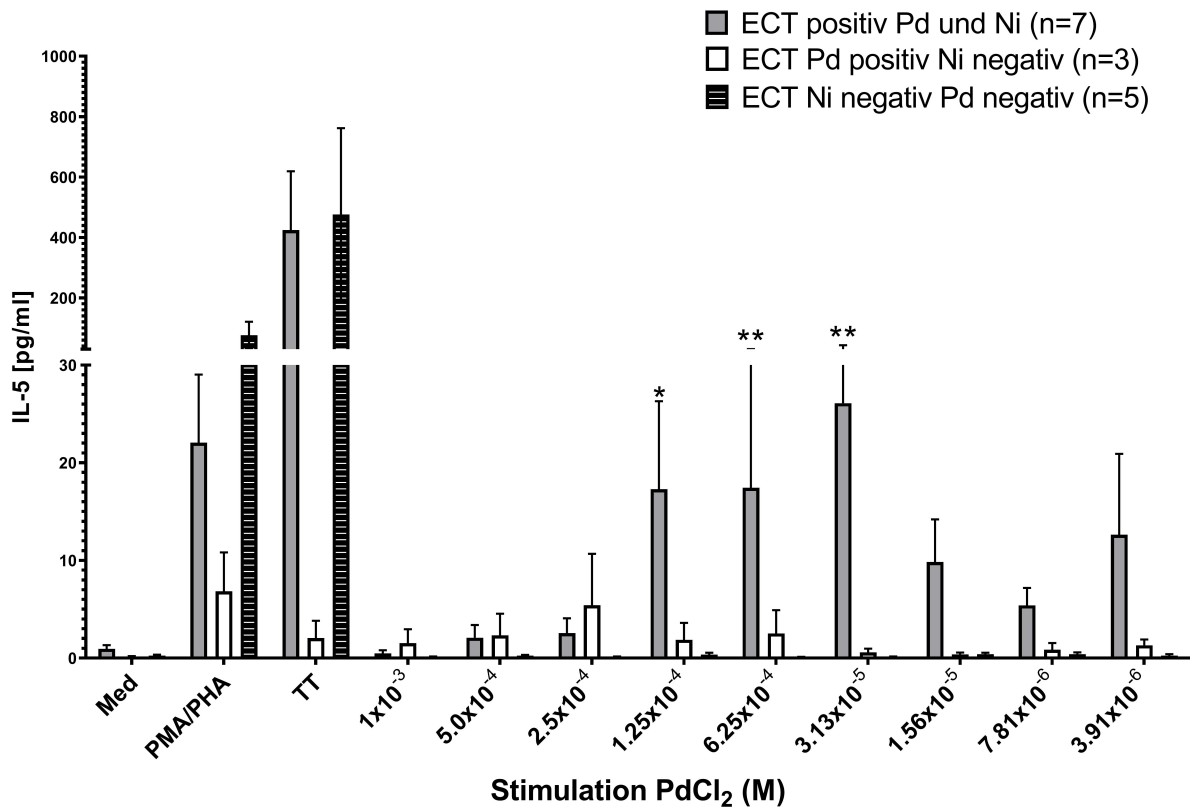


Des Weiteren zeigten unsere Experimente – wenn überhaupt – nur sehr geringe Konzentrationen an IFN $\gamma$ , TNF- $\alpha$ , IL-8 und IL-17A in den Zellkulturüberständen der drei Patientengruppen nach Stimulation deren PBMC mit NiSO $_4$  oder PdCl $_2$ . Wir haben diese Ergebnisse als Abbildungen aufgelistet, aber nur kurz kommentiert. Die Ergebnisse sind wohl nicht auf einen „mislungenen“ Stimulationsansatz zurückzuführen, da auf die parallel mitgeführten Kontroll-Stimuli (Pan-Stimulator PMA / Ionomycin und TT) adäquate Zytokinantworten erfolgten.

### **IL-5-Freisetzung nach Pd-Stimulation**

Die IL-5-Freisetzung von PdCl $_2$ -stimulierten PBMC bei Patienten mit positivem ECT gegen sowohl Pd als auch Ni (Gruppe 1), positivem ECT nur gegen Pd (Gruppe 2) und negativem ECT gegen Ni und Pd (Gruppe 3) ist in Abbildung 2c dargestellt. Es zeigt sich, dass a) bei nichtallergischen Patienten keine IL-5-Freisetzung auftritt, b) eine deutliche IL-5-Produktion stattfindet, wenn die Blutspender auch Ni-allergisch sind – und c) andererseits die IL-5-Produktion nur gering ist, wenn eine isolierte Pd-Allergie vorliegt. Teils wurde dabei ein signifikanter Unterschied von \*p < 0,05 bzw. \*\*p < 0,01 erreicht im Vergleich mit den Kontrollgruppen (ECT Pd positiv und Ni negativ bzw. ECT Ni und Pd negativ).

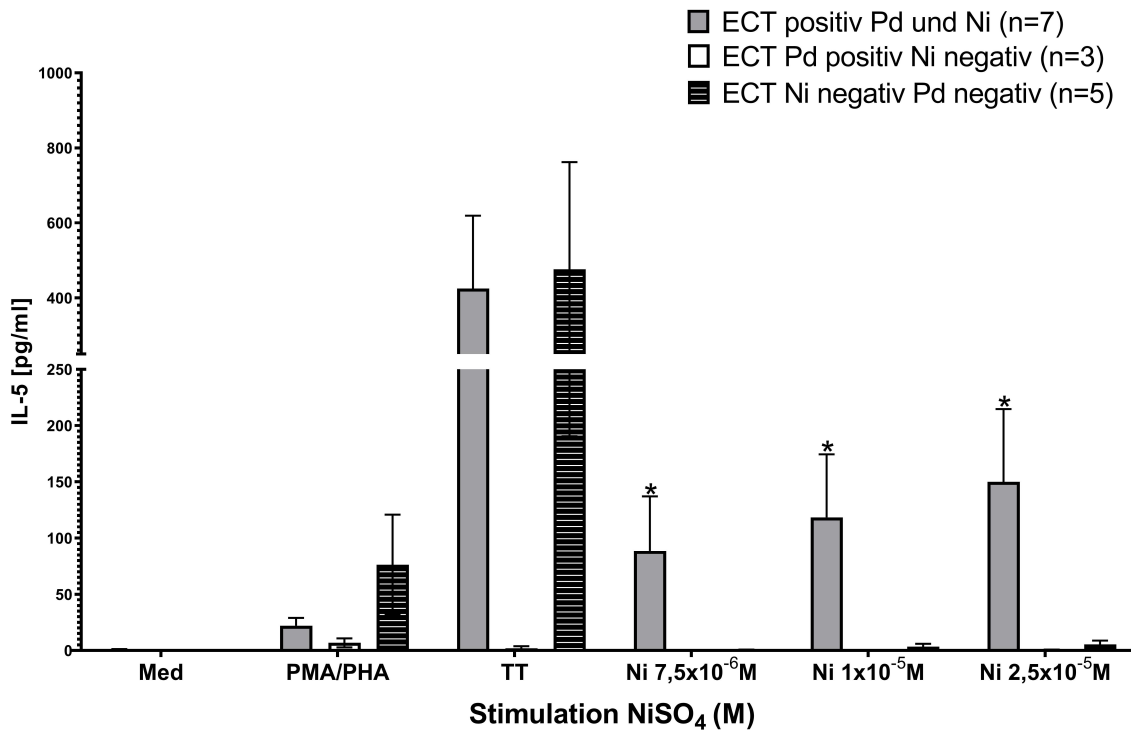
Die PdCl $_2$ -Stimulation von PBMC hatte maximal zur mittleren Freisetzung von etwa 26,1  $\pm$  17,2 pg/ml IL-5 bei der Konzentration von 3,13 x 10 $^{-5}$  M bei Ni-/Pd-doppelt ECT-positiven Blutspendern geführt. Dies lag deutlich unter der nachfolgend gezeigten Reaktion auf NiSO $_4$ -Stimulation bei Vorliegen von Ni-Allergie.



**Abb. 2c:** IL-5-Produktion von PBMC der drei Patientengruppen nach Stimulation mit PdCl<sub>2</sub> in 9 verschiedenen Konzentrationen ( $1 \times 10^{-3} \text{ M} - 3,91 \times 10^{-6} \text{ M}$ ) nach 6 Tagen. Stimulation mit PMA (Phorbolmyrestatacetat) und TT (Tetanus-Toxoid) sowie nur Kulturmedium (Med = Leerwert unstimulierter Kulturen) sind mit angegeben. \* $p < 0,05$ ; \*\* $p < 0,01$ .

### IL-5-Freisetzung nach Ni-Stimulation

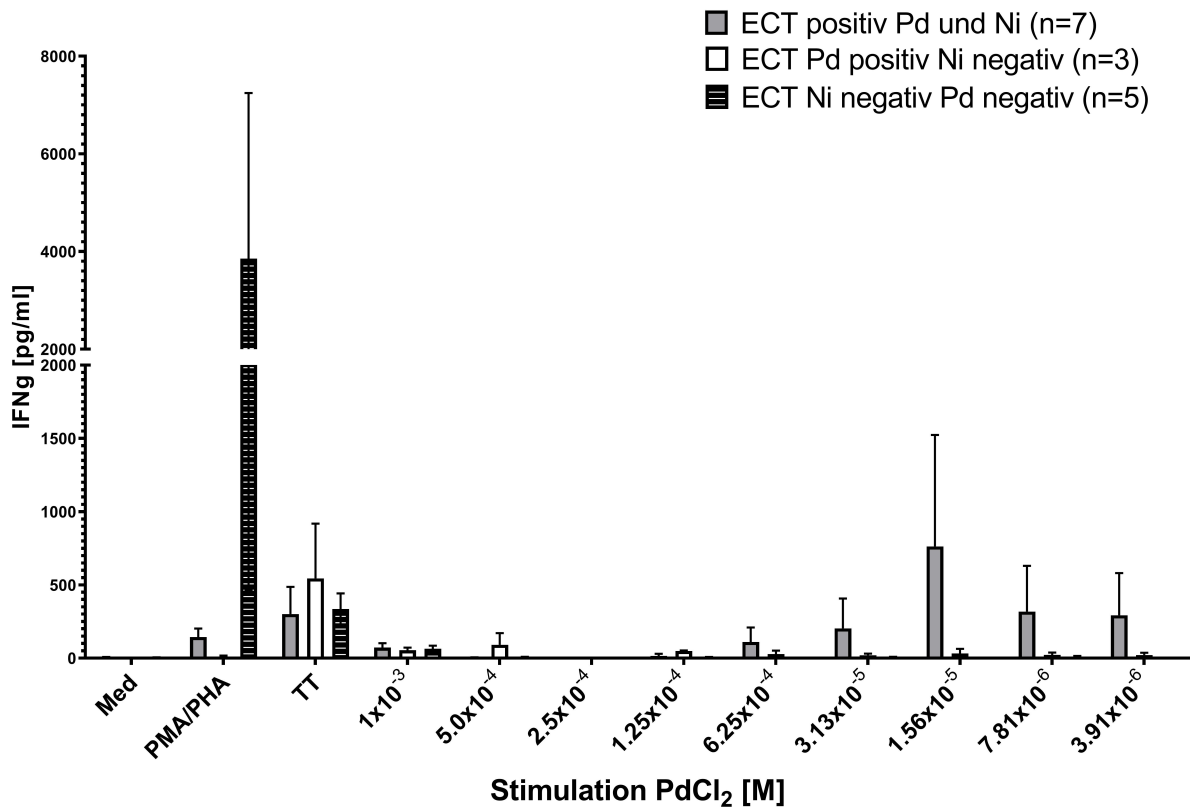
Die IL-5-Freisetzung von PBMC bei Patienten mit doppelt positivem ECT gegen Pd und Ni (Gruppe 1), positivem ECT nur gegen Pd (Gruppe 2) und negativem ECT gegen Ni und Pd (Gruppe 3) nach Stimulation mit NiSO<sub>4</sub> ist in Abbildung 2d dargestellt. Es fällt auf, dass die NiSO<sub>4</sub>-Stimulation bei einer Konzentration von  $2,5 \times 10^{-5} \text{ M}$  zu einer hohen IL-5-Freisetzung (im Mittel  $150,05 \pm 64,64 \text{ pg/ml}$ ) bei Blutproben von Ni- und Pd- doppelt ECT-positiven Blutspendern führt. Die ECT-negativen wie auch nur Pd-positiven Blutspender zeigen keine Reaktion. Dies lässt in Zusammenschau mit der deutlich höheren IL-5-Antwort im Vergleich zur PdCl<sub>2</sub>-Stimulation (siehe Abb. 2c) vermuten, dass hierfür vor allem der Ni-Allergie-Status verantwortlich ist. Die IL-5-Produktion nach Ni-Stimulation von PBMC bei Patienten mit doppelt positivem ECT gegen Pd und Ni war etwa 10mal höher im Vergleich zur Pd-Stimulation.



**Abb. 2d:** IL-5-Produktion von PBMC der drei Patientengruppen nach Stimulation mit NiSO<sub>4</sub> in 3 verschiedenen Konzentrationen ( $7,5 \times 10^{-6}$  –  $2,5 \times 10^{-5}$ ) nach 6 Tagen. Stimulation mit PMA (Phorbolmyrestataacetat) und TT (Tetanus-Toxoid) sowie nur Kulturmedium (Med = Leerwert unstimulierter Kulturen) sind mit angegeben. \*p < 0,05.

### IFN- $\gamma$ -Freisetzung

Die Stimulation mit PMA sowie TT ergab eine teils erhöhte Freisetzung von IFN $\gamma$  der PBMC. In Bezug auf PdCl<sub>2</sub>-Stimulation ergab sich nur bei den PBMC der sowohl Ni- als auch Pd-allergischen Blutspender eine teilweise messbare IFN- $\gamma$ -Freisetzung (Abb. 2e).



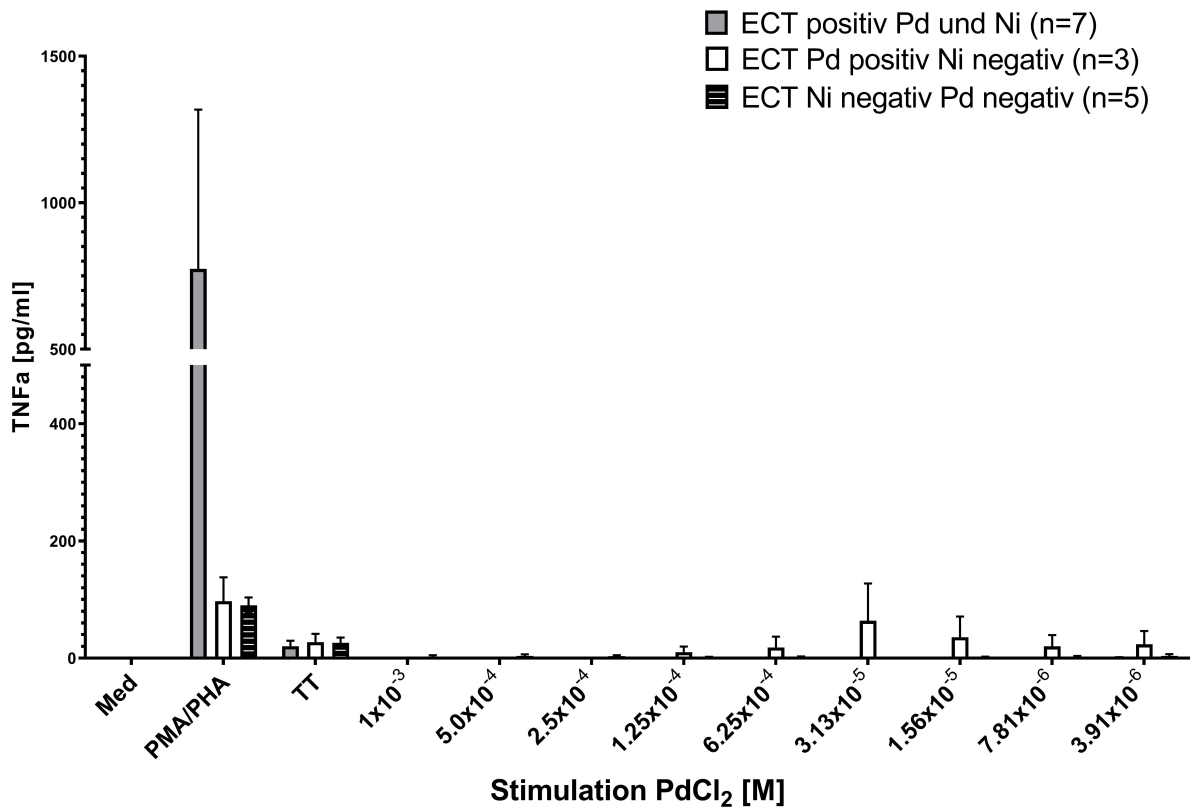
**Abb. 2e:** IFN $\gamma$ -Produktion von PBMC der drei Patientengruppen nach Stimulation mit PdCl<sub>2</sub> in 9 verschiedenen Konzentrationen ( $1 \times 10^{-3} - 3,9 \times 10^{-6}$ ) nach 6 Tagen. Stimulation mit PMA (Phorbolmyrestataacetat) und TT (Tetanus-Toxoid) sowie nur Kulturmedium (Med = Leerwert unstimulierter Kulturen) sind mit angegeben.

Speziell zeigte sich diese IFN $\gamma$ -Freisetzung nach Stimulation mit PdCl<sub>2</sub> bei der Konzentration von  $1,56 \times 10^{-5}$  M PdCl<sub>2</sub> bei ECT Pd und Ni positiven Blutspendern (Gruppe1) mit einem Mittelwert von  $762 \pm 1863$  pg/ml.

Die Kontroll-Stimuli PMA und geringer TT führten in allen drei Patientengruppen unterschiedlich stark zur Freisetzung von IFN $\gamma$ .

### TNF- $\alpha$ -Freisetzung

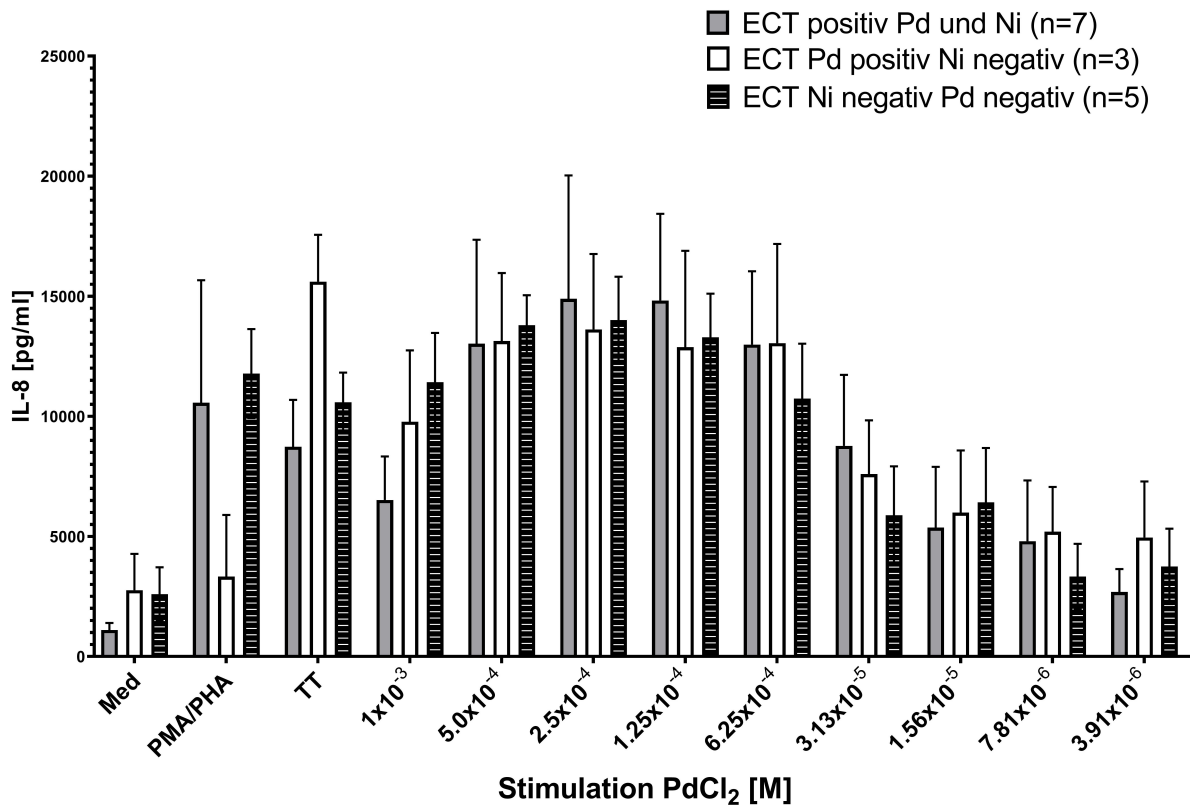
Nach PdCl<sub>2</sub>-Stimulation konnten wir eine Freisetzung von TNF- $\alpha$  (bei Stimulationskonzentration 5-9) nur in Gruppe 2 zeigen – d. h. bei Patienten mit isolierter Pd-ECT-Reaktion (Abb. 2f).



**Abb. 2f:** TNF- $\alpha$ -Produktion von PBMC der drei Patientengruppen nach Stimulation mit PdCl<sub>2</sub> in 9 verschiedenen Konzentrationen ( $1 \times 10^{-3} - 3,9 \times 10^{-6}$ ) nach 6 Tagen. Stimulation mit PMA (Phorbolmyrestataacetat) und TT (Tetanus-Toxoid) sowie nur Kulturmedium (Med = Leerwert unstimulierter Kulturen) sind mit angegeben.

### IL-8-Freisetzung

Bei den Versuchen zur IL-8-Freisetzung wurden ebenfalls PMA und TT als Kontrollstimuli verwendet und zeigten eine ähnliche Reaktivität der drei Patientengruppen.

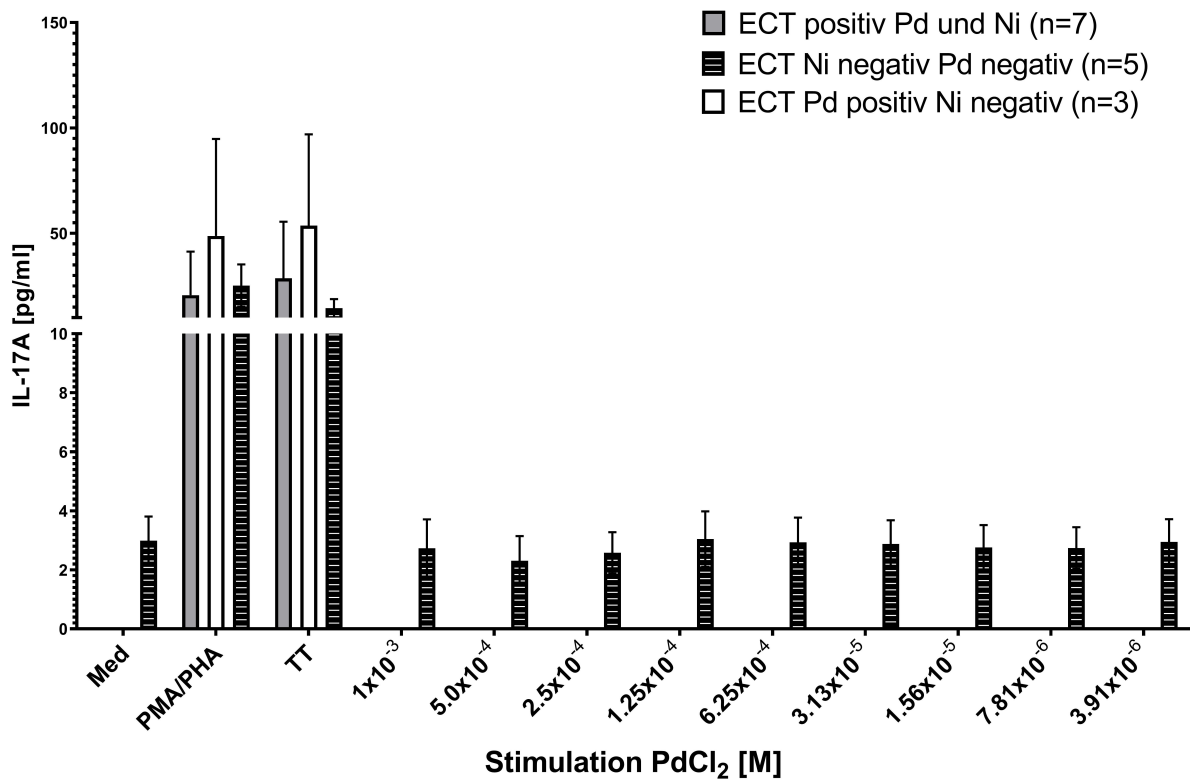


**Abb. 2g:** IL-8-Produktion von PBMC der drei Patientengruppen nach Stimulation mit PdCl<sub>2</sub> in 9 verschiedenen Konzentrationen ( $1 \times 10^{-3}$  –  $3,9 \times 10^{-6}$ ) nach 6 Tagen. Stimulation mit PMA (Phorbolmyrestataacetat) und TT (Tetanus-Toxoid) sowie nur Kulturmedium (Med = Leerwert unstimulierter Kulturen) sind mit angegeben.

Insgesamt konnte eine IL-8-Freisetzung nach PdCl<sub>2</sub>-Stimulation bei allen untersuchten Konzentrationen als auch in jeder der 3 gebildeten Patientengruppen gefunden werden, ohne dass sich wesentliche Gruppenunterschiede zeigten. Insofern lässt sich anhand der IL-8-Produktion keine Differenzierung gemäß dem „Allergiestatus“ ableiten. Die Ergebnisse sind in Abbildung 2g dargestellt.

### IL-17A-Freisetzung

Bei den Versuchen zur IL-17A-Freisetzung wurden wiederum PMA und TT als Kontrollstimuli verwendet und zeigten eine gleichmäßig gute Reaktivität der drei Patientengruppen.



**Abb. 2h:** IL-17A-Produktion von PBMC der drei Patientengruppen nach Stimulation mit PdCl<sub>2</sub> in 9 verschiedenen Konzentrationen ( $1 \times 10^{-3} - 3,9 \times 10^{-6}$ ) nach 6 Tagen. Stimulation mit PMA (Phorbolmyrestatacetat) und TT (Tetanus-Toxoid) sowie nur Kulturmedium (Med = Leerwert unstimulierter Kulturen) sind mit angegeben.

Nach PdCl<sub>2</sub>-Stimulation zeigte sich nur bei Patienten ohne Ni/Pd-Allergie eine Freisetzung von IL-17A (maximaler Mittelwert  $3,04 \pm 0,94$  pg/ml), die vergleichbar mit der unstimulierten Kultur (Mediumkontrolle) war. Insofern liess sich auch dieser Parameter nicht zur Differenzierung zwischen den drei Patientengruppen heranziehen. Es bleibt unklar, warum bei diesen Patienten bereits „spontan“ eine – wenn auch geringe – Freisetzung von IL-17A bestand. Die Abbildung 2h zeigt die Daten im Überblick.

Zusammenfassend ergab sich zum Themenbereich Pd-Allergie/PdCl<sub>2</sub>-Testergebnisse, dass eine positive ECT-Reaktion isoliert nur gegen PdCl<sub>2</sub> mit einer entsprechenden positiven PdCl<sub>2</sub>-LTT-Proliferationsreaktion ( $SI > 3$ ) verknüpft ist. Bei Patienten mit gleichzeitigem Ni- und Pd-positivem ECT als häufigste Konstellation konnte keine signifikante LTT-Reaktion auf PdCl<sub>2</sub> gezeigt werden, wohingegen die

Stimulation mit NiSO<sub>4</sub> eine positive LTT-Proliferationsreaktion ergab. Daraus lässt sich vermuten, dass bei dieser Gruppe die Ni-Allergie im Vordergrund steht und die ECT-Reaktion auf Pd eher eine Kreuzreaktion sein dürfte und speziell die IL-5-Freisetzung besonders bei Patienten mit kombinierter Ni-/Pd-Allergie auftritt und vermutlich auf die Ni-Sensibilisierung zurückzuführen ist.

## 5. Diskussion

In der vorliegenden Arbeit erfolgte bei Patienten mit Verdacht auf Dentalmaterialunverträglichkeit eine Gegenüberstellung von In-vivo-Allergietestreaktionen und In-vitro-Testergebnissen. Dies geschah anhand der ECT-Reaktionen auf Au, Pd und Ni sowie der Zytokin- und Proliferationsdaten des im Rahmen der Arbeit etablierten Au- und Pd-spezifischen LTT.

Die meisten der in Zahnlegierungen verwendeten Metalle haben auch Sensibilisierungspotential bzw. können allergische Reaktionen auslösen. Dementsprechend sind Kontaktallergien, d. h. Allergien vom Spättyp (Typ IV) gegenüber den Metallen Ni, Au und Pd nicht nur generell z. B. durch Schmuck häufig sondern auch durch „Dentalmaterialien“ [13, 69].

Eine gute Übersicht über die Relevanz und die Schwierigkeiten bei der Interpretation der ECT-Ergebnisse bei Testung mit Au-Präparationen gibt die Arbeit von Chen JK und Lampel HP [21]. Beispielsweise wurde genannt, dass Au-Testsalze als Irritants wirken können und das Risiko „falsch positiv“ eingestufte Reaktionen haben. Die Ablesung der Epikutantestreaktion hat weitere Besonderheiten. So können a) fraglich positive Reaktionen (bei hohem klinischen Allergieverdacht) mit erhöhter Nachtest-Konzentration doch positiv werden; b) oft verspätete Testreaktionen auftreten (deshalb auch 7-Tages-Spätablesung!); c) positive Testreaktionen oft wochenlang persistieren [70, 71]. Dennoch stellten Garner [18] wie auch andere Autoren fest, dass seit der Einführung des ECT für Pd und Au immer mehr Patienten mit positiver Reaktion auffallen. Viele dieser Patienten haben externen Au-Kontakt (z. B. über Schmuck oder beruflichen Umgang) oder systemische Exposition (z. B. über Dentalwerkstoffe, Orbitale/Augenlid-Implantate, inzwischen vom Markt genommene Au-beschichtete Stents, Au-haltige Medikamente) als Quelle ihrer Sensibilisierung /



Problemauslösung. In ihrer Übersicht beschreiben Chen JK und Lampel HP [21] lokale Manifestationen wie Ekzem, lymphomatoide/granulomatöse Reaktionen und Schleimhautreaktionen – aber auch systemische Kontaktdermatitis durch Au-beschichtete Stents, Orbita-Implantat, i. m. Injektion oder orale Aufnahme von Au-haltigen Medikamenten sowie durch Au-haltige Dentalmaterialien. Der Au-Spiegel korreliert mit der Menge an Au-basierter Zahnversorgung [35] und ein erhöhter Au-Spiegel im Blut beeinflusst dementsprechend auch das ECT-Resultat [70].

Der Themenbereich „Au-LTT“ wird unter 5.3. diskutiert.

Im Privatbereich besteht der Hauptkontakt mit Pd über die Schleimhaut durch Dentalmaterialien oder über die Haut durch Schmuck, da Pd in vielen Schmucklegierungen (z. B. Weissgold auf Pd-Basis) und in mehr als 90 % der zahnärztlichen Edelmetall-Legierungen (z. B. Au-Ag-Pd- oder Ag-Pd-Legierung) enthalten ist [28]. Kraenke wies schon 1995 [72] darauf hin, dass Pd zu den 7 häufigsten sensibilisierenden Metallen gehört. In der oben genannten Übersichtsarbeit von Fourschou A et al. [28] werden klinische Bilder der Pd-Allergie wie allergische Kontaktdermatitis und Kontaktgranulom sowie orale Manifestationen wie Lichen planus, Kontaktstomatitis und Schleimhauthyperplasie geschildert. Die Autoren berichten anhand von verschiedenen Veröffentlichungen mit insgesamt 10778 epikutan getesteten Patienten unter anderem über eine mittlere Pd-Allergie-Prävalenz von 7,8 % bei „Dermatitis-Patienten“ bzw. 7,4 % bei „Dentalpatienten“ - und eine hohe parallele Ni-Reaktivität von bis zu 97 %. Viele Autoren – wie auch Kielhorn et al. [5] hatten schon früher diese vermutete Kreuzreaktion mit Ni beschrieben. Der Themenbereich „Pd-LTT“ wird unter 5.3. diskutiert.

Dentalmaterialunverträglichkeit kann ein Spektrum von Ursachen haben, das – wie im Übersichtartikel von HJ Staehle [17] genannt – „zahnärztliche, psychosomatische, allergologische und toxikologische Aspekte“ einbezieht. Der Allergie-Anteil steht vermutlich nicht im Vordergrund [73]. Eine „zufällige“ Beobachtung könnte darauf hinweisen, dass „Beschwerden“ durch Implantatmaterialien und Dentalmaterialien parallel gehäuft bei manchen Patienten auftreten könnten. In einer Vergleichsstudie zwischen beschwerdenbehafteten und symptomfreien Endoprothesenträgern wurde auch nach dem Vorhandensein künstlicher Zahnmaterialien gefragt sowie nach dadurch verursachten Beschwerden. Bei der Kontrollgruppe mit symptomfreien

Endoprothesen zeigte sich, dass zwar 93,6 % der Patienten künstliche Zahnmaterialien hatten, aber keine Beschwerden dadurch entstanden [68]. Dagegen hatten bei den beschwerdebehafteten Endoprothesenträgern 88,2 % (also ähnlich viele Patienten) künstliche Zahnmaterialien angegeben und 9,2 % dadurch verursachte Beschwerden.

Sieht man generell unter dem Aspekt „Allergieverdacht“ auf „Dentalmaterialunverträglichkeit“, so wurden lokale Symptome beschrieben wie Kontaktdermatitis-/Stomatitis, Mucositis, oraler Lichen planus und Lippenschwellung aber auch allgemeine Symptome wie Schwindel, Asthma und Urtikariaschübe [5, 22]. Die Assoziation von Typ IV-Allergie gegen Metalle und Gegenwart von Metallimplantaten, wurde auch aus „umweltmedizinischer Sicht“ untersucht [55, 57]. Schon in den 90er Jahren berichteten Laeijendecker et al. [19] vom Zusammentreffen von positivem ECT gegen Dentalmaterial und Cheilitis, perioraler Dermatitis, „burning mouth“, Stomatitis, Ulzerationen und lichenoiden Reaktionen. Bei dem „burning mouth syndrome“ werden oft keine klaren Schleimhautveränderungen angegeben – aber doch auch eine mögliche Auslösung durch Kontakt mit Dentalmetallen oder z. B. Acrylaten, Additiva von Pflegeprodukten (wie Duftstoffe) diskutiert [19, 74]. Muris et al. zeigten in großangelegten Studien den Zusammenhang zwischen Au- oder Pd-Kontaktallergie, Exposition gegenüber Au- und/oder Pd-haltigen Dental-Legierungen und oralen lichenoiden Läsionen, oralem Lichen planus und bei nur Pd-haltigen bzw bei Au- und viel Pd-haltigen Legierungen zu „non plaque related gingivitis“ [22, 29].

## **5.1. Diskussion der Methodik**

### **5.1.1. Epikutantest (ECT)**

Der ECT wird als der Goldstandard zur Aufdeckung einer Kontaktallergie angesehen. Er bietet den Vorteil, dass standardisierte Testsubstanzen, Applikationsprotokolle und Ablesekriterien für die Einschätzung der Hautreaktionen vorliegen. In unserem Fall sind wir den Vorgaben der DKG gefolgt einschließlich Verwendung der entsprechenden Testreihen. Aber auch der ECT hat Einschränkungen. So wird eine Reproduzierbarkeit unter 100 % berichtet. Für Nickel wird bei simultanem Aufbringen

der Testpräparationen auf der linken und rechten Rückenhälfte nur eine Übereinstimmung der Reaktionen von etwa 90-95 % angegeben [39, 75].

Dazu kommt, dass manche Patienten erst verspätet Testreaktionen entwickeln, welche bei der „Routine-Ablesung“ nach 2-3 Tagen übersehen werden. Wir haben dementsprechend bei unserem Patientengut eine zusätzliche Spätablesung eingeführt (Tag 6 oder 7).

Analog zu anderen Arbeitsgruppen führte dies zu einer höheren Ausbeute an erkannter Ni-Allergie [76, 77].

Eine entsprechende Empfehlung zur Spätablesung für Dentalmetalle ist auch in der neusten S3 Leitlinie zur Epikutantestung [39] aufgenommen worden.

Dieses Vorgehen ist insofern wichtig, als auch Au-ECT-Reaktionen oft spät auftreten – dann aber lange persistieren [78].

Da eine korrekte ECT-Reaktionsbeurteilung auch von der Erfahrung/Training der involvierten Allergologen/Dermatologen abhängt, werden an unserer Klinik nur entsprechend erfahrene Ärzte damit betraut. Selbst das „Auswahlverfahren“ für die zu erfolgende Testung hat Einfluss auf die Testergebnisse. So haben Raap et al. [79] für die „self-reported“ Ni-Allergie nur bei 7 % dieser Patienten wirklich eine Ni-Allergie im ECT verifizieren können. D. h. so wie „Dunkelfärbung“ unter Modeschmuck oder Juckreiz bei Schwitzen und Okklusion nichts mit Ni-Allergie zu tun haben, so hängt auch die „Ausbeute“ positiver ECT-Reaktionen gegen Dentalmaterialien davon ab, ob: 1.) Vorab irritative Komponenten, Fehlstellung, Candida-Besiedlung der Mundhöhle u. ä. ausgeschlossen wurden [80]. 2.) Die für den Patienten relevanten Substanzen getestet wurden (d. h. entsprechende Exposition in der Mundhöhle besteht). 3.) Eine Spätablesung des ECT in der Folgewoche (Tag 6 oder 7) durchgeführt wurde.

Natürlich kann eine gefundene Metall-Kontaktallergie sowohl durch „neue“ Sensibilisierung über Dentalmetalle resultieren oder bereits vor Einsetzen der entsprechenden Dentalmaterialien vorhanden gewesen sein.

Gemäß Cristaudo et al. [81] sowie Muris et al. [22] werden zumindest in der Gruppe von Patienten mit oralen Erkrankungen deutlich mehr Pd-monosensibilisierte

Patienten gefunden als bei „generell“ metallallergischen Patienten. Bei letzteren ist die häufige Ni-Allergie - speziell bei Frauen - ein möglicher Grund für Kreuz-/Parallel-Sensibilisierungen [5, 18, 82].

Da auch eine Kontaktallergie eine biologische, variable Reaktionsbereitschaft abbildet, treten Reaktionsschwellen durch Expositionsmenge, Expositionsort und Menge/Art der entstandenen reaktiven Metallsalze auf. Beispiele sind Hautreaktion auf Au-haltige Ohrstecker ohne parallele Reaktion auf Au-Ringe [83], eine erhöhte Korrosionsrate bei direktem Kontakt unterschiedlich edler Dentalmetalle [16, 23] oder der Einfluss unterschiedlicher Speichelzusammensetzung [29] sowie das Zahnputzverhalten [22, 28, 84]. Neben stringenter Patientenauswahl, Testdurchführung und Expositionsüberprüfung kann auch die vorgegebene Auswahl an Testpräparationen Einfluss haben. So wird beispielsweise von der DKG zur Testung bzgl. „Pd“ das Metallsalz  $\text{PdCl}_2$  in der DKG 17 Reihe vorgegeben [14]. Muris et al. hatten allerdings 2014 publiziert, dass durch Verwendung von  $\text{Na}_2\text{PdCl}_4$  im Vergleich mehr positive Reaktionen erhalten wurden [22]. Wir haben uns aber hier an den DKG-Standard gehalten. Schließlich sind auch das Vorgehen beim ECT und dessen Ergebnisse nationalen Verwendungsmustern der „Problemauslöser“ wie auch Präventionsstrategien unterworfen. Dies wird z. B. an einem „Nord-Süd-Gefälle“ der Ni-Allergiehäufigkeit in Europa deutlich.

Eine Studie in Norwegen zwischen 1993-1997 [11] zeigte, dass 70 % Frauen zwischen 40-49 Jahren im ECT Sensibilisierungen zu 28 % gegen Ni, 23 % Au und 9 % Pd aufwiesen. Marcusson [37] untersuchte bereits 1996 in Schweden die Häufigkeit von Allergien bei „Zahnpatienten“ und gab an: Ni mit 22 %, Au mit 23 % und Pd mit 8 %. In der Türkei wurde bereits zwischen 1996 und 1998 in einer Studie 19,1 % gegen Ni, 9,4 % gegen Pd und 11,8 % gegen Cr ermittelt [18]. Während „ohne Regulation“ in Nordamerika die Inzidenz der Ni-Allergie steigt, wie von Warshaw [85] in einer Studie zwischen 2003-2004 von einer immer noch hohen Ni-Allergie von 18,7 % gezeigt werden konnte, fällt sie langsam in Europa. Hier wird der positive Einfluss der europäischen Nickeldirektive [77, 86] erkennbar.

Entsprechende Einflüsse unseres Wissens zu Dentalmetallen nur gering erforscht. Aufgrund des hilfreichen Goldstandard „ECT“ zur Aufdeckung einer

Kontaktallergie und andererseits aber bestehender Limitationen wird im Folgenden die „in-vitro“-Testergänzung des LTT diskutiert.

### **5.1.2. Lymphozytentransformationstest (LTT)**

Der LTT wurde schon in den 60er Jahren entwickelt, um „in vitro“ die Reaktion sensibilisierter Lymphozyten auf das zugegebene Antigen in Form der Proliferation („Transformation in Blasten“) lichtmikroskopisch zu bestimmen. Die Verwendung von 3H-Thymidin und anschließende Proliferationsbeurteilung über in DNA inkorporierte „Radioaktivität“ wurde 1976 für einen verbesserten LTT vorgeschlagen [87].

Während der ECT in vivo eine lokale, Antigen-spezifische Entzündungsreaktion als „Read-out“ nützt, zielt der LTT auf das Erkennen einer spezifischen, Antigen-induzierten T-Zell-Aktivierung in vitro hin. Proliferationsmessung und Muster der Zytokinfreisetzung stehen hier im Vordergrund. Pichler und Tilch [48] oder Merk [88] beschrieben wesentliche „Güte-Anforderungen“ an die LTT-Durchführung – speziell zu der ursprünglichen LTT-Domäne der Beurteilung von Arzneimittel-Unverträglichkeit. Ein Test-Zeitfenster von wenigen Wochen bis Monaten nach der klinischen Problematik besteht bei limitierter Antigen – (hier Arzneimittel-) Exposition, während bei protrahierter Exposition z. B. gegenüber Metallen ausreichend zirkulierende spezifische T-Zellen (durch wiederholtes „Boostern“) vorliegen [49]. Bei der von uns verwendeten Methodik wurden folgende wichtige Aspekte berücksichtigt: Schon bei der initialen PBMC-Gewinnung über Dichtegradientenzentrifugation sollten ausreichend – aber nicht angereichert – Monozyten mit enthalten sein, um weder einen immunsuppressiven Effekt zu hoher Monozytenzahlen [48, 89] noch eine Überrepräsentation von T-Lymphozyten (durch Monozytendepletierung) zu bekommen. Bei der Vorbereitung des Zellkulturmediums haben wir autologes Serum (erhalten parallel zur Dichtezentrifugation) verwendet, um bestmöglich individuelle Zusatzfaktoren nicht zu verlieren. Wir hatten in frühen Experimenten gesehen, dass oft von anderen Gruppen verwendetes kommerziell erhältliches gepooltes AB-Serum Chargen-abhängig den LTT-Verlauf generell beeinflusst. Bei der Stimulation eingesetzte Metall-Salze wurden zunächst in einer Dosis-Wirkung-Kontrolle geprüft, um toxische (Proliferations-inhibierende/Zytokinfreisetzung-hemmende) Effekte auf die PHA-Proliferationskontrolle und Basisproliferation auszuschließen genauso wie unspezifische mitogene Effekte. Blutspender ohne entsprechend gefundene

Kontaktallergie (aber mit zunehmender Antigen/Metallexposition) wurden zur Kontrolle mit eingeschlossen. Andererseits wurde die gefundene Metall – (Au, Pd oder Ni) ECT – Allergie als „Goldstandard“ zum Vergleich mit der LTT-Reaktion herangezogen. Mehrfachkulturansätze und Positiv-Grenzwert von SI > 3 wurden ebenso berücksichtigt wie die Verarbeitung der Blutproben innerhalb von 24h. Es wurden die vorab publizierten Test-Modifikationen und Evaluierungsansätze [49, 54, 90, 91] berücksichtigt mit dem Bewusstsein, dass der LTT für die Mehrzahl der eingesetzten Testantigene nicht evaluiert ist. Die Stellungnahme des RKI von 2008 [92] unterstreicht, dass von den Resultaten der In-vitro-Stimulation nicht ohne Weiteres der Beweis einer krankmachenden Sensibilisierung abgeleitet werden kann. Dementsprechend erfolgte unsere Ergebnisinterpretation (Siehe 5.3.) auch in Zusammenschau mit Klinik und Epikutantestergebnis. Wir haben interindividuell unterschiedliche Reagibilität mit Reaktionsoptimum bei unterschiedlichen Metallsalzkonzentrationen in Analogie zu Ständer S. et al. [54] angenommen und deswegen stets mehrere Antigen-Test-Konzentrationen mitgeführt. Zur Beurteilung der erfolgten Zytokinfreisetzung wurden identische Parallelkulturen durchgeführt – mit Ausnahme der Kontrollstimulation über PMA (statt PHA) [58].

Manche Arbeitsgruppen verwenden zugesetzte Zytokin-Cocktails, um die LTT-Antwort zu verstärken. So wurde beispielsweise in der Arbeitsgruppe um T. Rustemeyer [59] nach Zugabe von IL-4 / IL-7 eine verbesserte spezifische Proliferationsantwort auf Ni erreicht. Ein TH1- als auch TH2-Zytokinsekretionsprofil wurde ebenfalls klarer durch Benützen von Zytokin-angereichertem Kulturmedium.

Es gibt verschiedene „Read-out“ Systeme für die Proliferationsantwort im LTT. Neben dem oben beschriebenen 3H-Thymidin-Einbau mit Szintillationsmessung sind Farbstoff-(CFSE-) basierte Tests mit Beurteilung der Intensitätsminderung durch Zellteilung häufig benutzt [93]. Ebenso kann die Proliferation über den Einbau von BrdU und anschließender Messung mittels eines Europium-markierten monoklonalen Antikörpers „time resolved fluorescence“ (TRF) bestimmt werden (DELFI A Cell Proliferation Assay).

Da in unserem Labor weiterentwickelt und evaluiert, wurde hier der 3H-Thymidin-Einbau für den LTT herangezogen.

### 5.1.3. Zytokin-Freisetzung

Eine Alternativmethode zum LTT und der Proliferationsmessung stellt die Bestimmung von spezifischen Zytokinen in Abhängigkeit von der Antigenstimulation dar. Der Enzyme-linked Immunosorbent Assay (ELISA) gehört zum Immunassay-Verfahren und basiert auf Farbreaktionen im Sinne des enzymatischen Immunabsorptionsverfahren. Das grundsätzliche Prinzip umfasst die Bindung von Antigenen an enzymgekoppelte Antikörper (Detektionsantikörper) sowie den enzymkatalysierten Farbumschlag nach Kontakt des Antigen-Antikörper-Komplexes mit dem zu untersuchenden Substrat [94, 95].

Bei der direkten Methode wird das nachzuweisende Antigen auf einer Mikrotiterplatte fixiert und direkt mit dem Detektionsantikörper markiert [95-97].

Bei der indirekten Methode erfolgt zunächst die Bindung des an der Titerplatte fixierten Antigens mit einem Erstantikörper. Erst in einem zweiten Schritt erfolgt die Markierung mit dem Detektionsantikörper über den Erstantikörper.

Bei der direkten Sandwich-ELISA Methode erfolgt die Bindung des Antigens an der Titerplatte mittels „capture“ Antikörper, die Markierung erfolgt direkt mittels Detektionsantikörper. Bei der indirekten Sandwich-ELISA Methode wird erneut der Zwischenschritt der Markierung mittels Erstantikörperbindung benötigt.

Die Signalstärke der enzymvermittelten Farbreaktion korreliert dabei mit der Antigenkonzentration, wodurch sich der ELISA für quantitative Messungen von z. B. Zytokinen eignet [94-97].

Zu erwähnen ist, dass sich die Signalstärke bei der kompetitiven ELISA-Methode, welche auf der Antikörperbindungskonkurrenz mit dem zu untersuchenden Substrat basiert, umgekehrt proportional zur Konzentration verhält [94-97].

Der ELISPOT („enzyme-linked immunospot“) Assay stellt eine weitere etablierte Methode zur Detektion antigen-spezifischer Zytokinproduktion oder Antikörper-sezernierender Immunzellen dar. Diese Technik erlaubt es, zytokin- oder antikörperproduzierende Zellen (z. B. aus Blut oder Gewebe isoliert) erkennbar zu machen und zu quantifizieren. Dabei basiert die Methode auf der „Sichtbarmachung“ von Zytokinen oder Antikörpern, welche von in Kultur gehaltenen Immunzellen nach Antigen-Stimulation freigesetzt werden und im unmittelbaren Umfeld (d. h. im

Kontaktbereich auf dem Kulturplatten-Boden/Membran) abgefangen werden. Die Zytokine binden an auf der Membran immobilisierte Antikörper („capture antibodies“) und werden anschließend durch Immunfärbung sichtbar gemacht. Der Farbumschlag erfolgt durch Zugabe eines zweiten Antikörpers gegen ein Epitop des nachzuweisenden Zytokins, wodurch es zu einem Ausfallen eines Farbstoffes an der Sekretionsstelle kommt [98, 99] und „Spots“ erkennbar werden.

In unserem Fall wurden die in den Zellkulturüberstand freigesetzten Zytokine mit Hilfe des CBA bestimmt.

Der Vorteil des CBA liegt darin, dass bei einer geringen Probenmenge mehrere Zytokine in nur einer Probe gleichzeitig gemessen werden können (Multiplex Assay). Die Einführung der CBA-Methode stellte einen neuen zeitsparenden Ansatz zur gleichzeitigen Messung mehrerer Analysate in einer Lösung dar. Sie ist auch im Falle minimaler Probengröße anwendbar, was einen großen Vorteil gegenüber traditionellen Immunoassays darstellt, und besticht darüber hinaus durch Reproduzierbarkeit und guter Vergleichbarkeit mit bereits etablierten Methoden. Die Anwendbarkeit wurde für eine Reihe menschlicher Zytokine bewiesen. Darüber hinaus erlaubt die Methode die Messung von Entzündungs- sowie Apoptosemediatoren, Antikörpern, Chemokinen, Immunglobulinisotypen oder auch Signalmolekülen [66].

## **5.2. Zusammenfassung der Ergebnisse**

Anhand der durchgeführten Versuche haben wir im Wesentlichen die folgenden Antworten auf die drei unter „Ziel der Arbeit“ gestellten Fragen gefunden.

### **5.2.1. Gibt es einen Zusammenhang zwischen ECT-Reaktion und LTT-Antwort gegenüber den Metallen Au, Pd und Ni ?**

Betrachtet man den Zusammenhang zwischen ECT-Ergebnis und gemessenen LTT-Reaktionen, so lässt sich ein optimaler, zwischen Allergiker und Nicht-Allergiker differenzierender Stimulationsbereich feststellen: Bei NTSA konnte ein signifikant erhöhter SI  $> 3$  bei 3 der 9 überprüften verschiedenen NTSA-Konzentrationen nur bei Patienten gemessen werden, bei denen auch der ECT positiv auf NTSA war. Bei ECT- negativen Patienten führte keine der 9 NTSA-Konzentrationen zu erhöhter Proliferation in vitro.



Bei den Untersuchungen zu Pd bestand vorweg die Besonderheit einer möglichen Kreuzreaktion mit Ni (7/10 Pd-ECT positiven Patienten auch mit Ni-ECT-Reaktion). Bei Stimulation mit den 9 überprüften PdCl<sub>2</sub>-Konzentrationen konnte eine positive Reaktion im LTT (SI > 3) nur bei Patienten gezeigt werden, die im ECT isoliert nur auf PdCl<sub>2</sub> positiv reagierten (bester, signifikant differenzierender Stimulationsbereich = „Konzentration“ 2-4). Waren die Patienten im ECT gegen PdCl<sub>2</sub> und NiSO<sub>4</sub> negativ oder auf beide positiv, zeigte sich keine erhöhte Proliferation im LTT.

Bei zusätzlicher Stimulation mit NiSO<sub>4</sub> zeigte sich ein SI > 3 nur bei den 7 Patienten, die im ECT gegen NiSO<sub>4</sub> und PdCl<sub>2</sub> (Gruppe 1) positiv waren.

### **5.2.2. Wie sieht die entsprechende in vitro Zytokinproduktion der stimulierten PBMC aus?**

Folgende Zytokinproduktion konnte bei **NTSA**-stimulierten Zellkulturen gemessen werden:

- IL-5-Freisetzung (signifikante Werte bei 3 Konzentrationen von NTSA) nur bei NTSA-ECT-positiven Patienten.
- IFN $\gamma$ - und TNF- $\alpha$ -Freisetzung (signifikant je bei 2 Konzentrationen von NTSA) jeweils nur bei NTSA-ECT-positiven Patienten.
- IL-8-Freisetzung nur in geringer Höhe bei NTSA-ECT-negativen Patienten.

Folgende Zytokinproduktion konnte bei **PdCl<sub>2</sub>**-stimulierten Zellkulturen gemessen werden:

- IL-5-Freisetzung (signifikante Werte bei 3 Konzentrationen von PdCl<sub>2</sub>) bei Patienten mit positivem ECT gegen Pd und Ni (Gruppe1) – jedoch deutlich weniger als bei Ni-Stimulation (s. u.); geringer bei positivem ECT gegen PdCl<sub>2</sub> alleine; nicht bei insgesamt negativem ECT.
- IFN $\gamma$ -Freisetzung nur sehr mäßig bei Patienten mit positivem ECT gegen Pd und Ni (Gruppe 1).
- TNF- $\alpha$  Freisetzung nur bei den drei Pd-ECT + und Ni-ECT-Patienten.
- IL-8-Freisetzung bei allen 3 Gruppen ähnlich, d. h. unabhängig von ECT Pd / Ni positiv oder negativ.

- IL-17A-Freisetzung nur gering und in gleicher Ausprägung bei unstimulierten und stimulierten Kulturen von Pd- und Ni-doppelt negativen (Kontroll-) Patienten.

Folgende Zytokinproduktion konnte bei **NiSO<sub>4</sub>**-stimulierten Zellkulturen gemessen werden:

- IL-5-Freisetzung (signifikante Werte bei 3 Konzentrationen von NiSO<sub>4</sub>) bei Patienten mit positivem ECT gegen Pd und Ni (Gruppe1); nicht bei isoliert Pd-ECT-positiven oder insgesamt ECT-negativen Patienten.

### **5.2.3. Lässt sich anhand der Zytokinmuster unspezifisch-, sensibilisierungs- und kreuzreaktionsbedingte Zytokinfreisetzung unterscheiden?**

Über das Zytokin IL-5 wie auch über IFN $\gamma$  und TNF- $\alpha$  (beides TH1-Muster) lässt sich eine spezifische Freisetzung in unseren NTSA-Versuchen bei entsprechender NTSA-Allergie ablesen. Bei den Pd- und Ni-Ansätzen zeigte sich jeweils nur eine deutliche IL-5-Freisetzung bei Patienten, wenn der ECT sowohl gegen Pd als auch Ni positiv ist – bei isolierter Pd-Allergie deutlich geringer und nur, wenn mit PdCl<sub>2</sub> stimuliert wurde. Das deutet auf eine ECT-Kreuzreaktion der beiden Metalle hin (d. h. „Pd reagiert im Hauttest bei Ni-Allergie oft mit“), sowie auf Ni als Haupt-IL-5-Induktor – zumal im LTT die isoliert Pd-ECT-positiven Blutspender auf Ni-Stimulation keine und auf Pd-Stimulation nur geringe IL-5-Freisetzung haben. IL-8 hingegen zeigt eher eine unspezifische Reaktion, sowohl bei NTSA mit nur negativen ECT Patienten als auch mit der in allen Ansätzen messbaren Freisetzung bei PdCl<sub>2</sub>.

### **5.3. Diskussion der Ergebnisse**

Am Modell „Ni-Allergie“ wurde bereits nachgewiesen, dass PBMC Ni-allergischer Blutspender in vitro nach Zugabe von Ni-Salzen im LTT sowohl erhöhte Proliferationsraten haben als auch oft eine gemischte TH1-/TH2-Zytokinfreisetzung aufweisen. In früheren Experimenten unserer Arbeitsgruppe wurde gezeigt, dass bei standardisierten Durchführungsbedingungen (wie Zellzahl, autologes Plasma enthaltendes angereichertes Kulturmedium) und weder toxischen noch unspezifischen Stimulationskonzentrationen eine Ni-spezifische LTT-Reaktion in vitro mit hoher Korrelation (Sensitivität 88 %, Spezifität 96 %) zur ECT-Reaktion erreicht werden kann [54]. Auch in der hier vorgelegten Arbeit wurde zur Etablierung und

Optimierung des LTT bei Pd- und Au-Allergie der Epikutantest als „Goldstandard“-Referenz verwendet. Da die meisten Laborgruppen den LTT unterschiedlich durchführen – z. B. bei Radioaktiv-Methodik oft schon  $SI > 2$  als positiv gesetzt wird [100] oder als Proliferationsmessung alternativ durchflusszytometrische Analytik dient, muss zunächst eine Laborgruppen-interne Evaluierung der Ergebnisse erfolgen. Wie schon von Pichler et al. [48] zum „Arzneimittel-LTT“ beschrieben fanden auch wir, dass es keine einzelne sondern mehrere Testkonzentrationen als optimalen Stimulationsbereich gibt.

### **5.3.1. Versuche zu Gold-(Au-)Allergie**

Bei unseren untersuchten 9 Patienten zu Au-(NTSA-)-Allergie sahen wir zu Versuchsbeginn keinen wesentlichen „Confounder-Einfluss“, da alle nicht-allergischen 11 Kontrollen auch keine Ni- bzw. Pd-Allergie hatten und bei den 9 NTSA-allergischen Patienten nur jeweils einer eine isolierte Pd- sowie ein anderer eine isolierte Ni-Allergie hatte. Die von uns zur NTSA-Stimulation verwendeten (vorab als nichttoxisch und nicht unspezifisch mitogen gefundenen) 9 Testkonzentrationen (NTSA zwischen  $1,0 \times 10^{-2}$  M und  $1,52 \times 10^{-6}$  M) überlappen teilweise die in früheren Publikationen angegebenen (oft breit angesetzten) Au-Konzentrationen. Das waren beispielsweise 0,1-100 $\mu$ g/ml  $\text{HAuCl}_4$  in der Arbeit von Romagnoli P et al. [101], 25 $\mu$ M NTSA als Optimum in der Veröffentlichung von Minang JT et al. [62] sowie von 0,1-100 $\mu$ g/ml  $\text{HAuCl}_4$  in der Untersuchung von Hashizume et al. [102]. Unsere eingesetzten 9 Konzentrationen führten bereits zu einem deutlichen Unterschied zur darauf nicht/minimal reagierenden Kontrollgruppe und für drei als „optimal“ identifizierte bzw. eingestufte Konzentrationen war dieser Unterschied signifikant. Damit sind Testbedingungen für eine gute Trennschärfe geschaffen. Um Sensitivität und Spezifität genauer zu berechnen sind allerdings höhere Patientenzahlen nötig.

Immerhin lässt sich durch die Analyse des In-vitro-Zytokinmusters die im Proliferationsansatz gefundene Unterscheidung zwischen NTSA-ECT-positiven und negativen Personen noch untermauern. Bei NTSA-Allergie zeigte sich als Stimulationsreaktion sowohl eine über die IL-5-Freisetzung erkennbare TH2-Antwort als auch eine TH1-Reaktion anhand von  $\text{IFN}\gamma$ - und  $\text{TNF-}\alpha$ -Freisetzung. Diese Ergebnisse passen zu der auch von Minang et al. [62] beschriebenen „mixed Th1- and Th2-type cytokine response“ auf Au. Ergänzend fanden Hashizume H et al.

[102], dass die von Ihnen etablierten Au-spezifischen T-Zell Klone eines Au-allergischen Patienten heterogen waren und „Th0-like, Th2-like and Tc1-like cytokine profiles“ hatten. Die Autoren spekulieren, dass damit verknüpft Au-spezifische CD4<sup>+</sup> und CD8<sup>+</sup> T-Zellen unter Au-Stimulation ein Spektrum von Interaktionen mit APC haben könnten und dies in verschiedenen klinischen Manifestationen der Au-Allergie resultieren könnte. Dass sowohl TH1- als auch TH2-Zytokine im Sinne von Aktivierung zytotoxischer CD8<sup>+</sup>-T-Zellen, Zellrekrutierung und z. B. Eosinophilenaktivierung bei der Effektorphase, d. h. beim klinischen Bild der allergischen Kontaktdermatitis beteiligt sind, diskutierten Baeck et al. anhand von Stanzbiopsien am Modell der Kortikosteroid-ECT-Reaktion [103]. Wir haben bei unseren Versuchen ergänzend eine IL-8-Freisetzung als eher „innate/unspezifische“ Zytokinantwort zur potentiellen zusätzlichen Unterscheidung zum „Allergiestatus“ geprüft und dies auch bei den Stimulationsansätzen mit NTSA-Konzentration 3-9 so verifizieren können. Somit scheint eine ergänzende Messung der erhöhten IL-8-Freisetzung den „Nicht-Allergiestatus“ zu unterstreichen. Dies passt zu einer kürzlich veröffentlichten In-vitro-Beobachtung bei Ni-Allergie, bei der ein IL-5/IL-8 Quotient zur Abgrenzung von unspezifischer Reaktion hilft [58].

### **5.3.2. Versuche zu Palladium(Pd-)Allergie**

Bei den 15 untersuchten Patienten zu Pd-Allergie hatten wir bereits anhand der ECT-Ergebnisse gesehen, dass das häufige Zusammentreffen von Pd- und Ni-Allergie Testansätze auch zur Abgrenzung des „Confounders Kreuzreaktion“ nötig macht. Dementsprechend hatten wir die Pd ECT+ Patienten weiter unterteilt und insgesamt 3 Gruppen gebildet (7 Patienten mit Pd- und Ni-Allergie, 3 Patienten mit isolierter Pd-Allergie und 5 nichtallergische Kontrollpatienten). Auch zur PdCl<sub>2</sub>-Stimulation verwendeten wir (vorab als nichttoxisch und nicht unspezifisch mitogen gefundene) 9 Testkonzentrationen, welche ebenfalls teils den in früheren Publikationen angegebenen Pd-Konzentrationen ähnelten. Das waren beispielsweise 25 oder 2,5 µg/ml PdCl<sub>2</sub> in den Arbeiten von Bordignon et al., Cristaudo et al. [60, 81] sowie 27,8 µg/ml in der Untersuchung von Spoerri et al. [93] oder (als Optimum) 100 µM in der Veröffentlichung von Minang et al. [62]. Von den 9 in unseren Versuchen eingesetzten PdCl<sub>2</sub>-Konzentrationen führten die Konzentrationen 1-4 zu einer erhöhten (2-4 signifikant erhöhten) Proliferationsantwort bei den 3 isoliert Pd-allergischen Patienten, während die anderen beiden Gruppen keine erhöhte

Reaktion zeigten. Dieses Reaktionsmuster deutet schon darauf hin, dass bei den 7 Patienten mit paralleler positiver Pd- und Ni-ECT-Reaktion eher die Ni-Sensibilisierung im Vordergrund steht. Deshalb hatten wir bei Blutproben der gleichen Patientengruppen zum Vergleich auch eine Ni-Stimulation in vitro durchgeführt. Die Ergebnisse zeigen, dass nun ausschliesslich – und deutlich – erhöhte SI-Werte bei Patienten mit paralleler Ni- und Pd-ECT-Reaktion auftreten als weiteren In-vitro-Hinweis auf die im Vordergrund stehende Ni-Sensibilisierung. Zu einer ähnlichen Aussage kamen Bordignon et al. [60]. Sie hatten versucht, in vitro anhand der IFN $\gamma$ - bzw. IL-10-Produktion im ELISpot-Assay das In-vivo-Phänomen der simultanen ECT-Reaktion zu charakterisieren. Sie fanden, dass a) alle ECT-negativen Blutspender bei Stimulation mit Ni wie auch Pd nur IL-10 produzierten; b) isoliert Ni-ECT positive Patienten bei Stimulation mit Ni IFN $\gamma$ , auf Pd hin aber nur IL-10 freisetzen; c) Ni- und Pd-ECT positive Patienten bei Stimulation mit Ni IFN $\gamma$ , auf Pd hin aber nur IL-10 freisetzen; d) nur Pd-ECT positive Patienten bei Stimulation mit Ni IL-10, auf Pd hin aber IFN $\gamma$  produzierten. Proliferationsdaten waren in diesen Experimenten nicht erhoben worden. Minang et al. [62] hatten die In-vitro-Freisetzung von IL-2, IL-4, IL-13 und IFN $\gamma$  gegenüber Ni, Cr, Co, Pd und Au untersucht und bei allen entsprechenden Allergikern eine „mixed Th1- and Th2-cytokine response“ bei ihren Versuchen gefunden, wobei auf Ni-Stimulation hin bei Ni-Allergikern alle 4 untersuchten Zytokine sowie bei Pd-Stimulation Pd-Allergiker präferentiell IL-2 und IL-4 freisetzen. Allerdings hatten 3 der 4 untersuchten Pd-Allergiker parallel eine Ni-Allergie. Eine Gegenüberstellung zu ausschließlich Pd-Allergikern fehlt.

Durch die Zytokinanalyse unserer Versuche ergab sich zur PdCl<sub>2</sub>-Stimulation, dass eine IL-5-Freisetzung (TH2-Antwort) nur a) bei den Blutspendern mit Doppel-ECT-Reaktion (Ni und Pd) und b) deutlich geringer bei den 3 ausschliesslich Pd-ECT positiven Patienten auftrat. IFN $\gamma$  (TH1-Antwort) wurde nur gering von Patienten mit doppelter (d. h. Ni- und Pd-) Sensibilisierung freigesetzt. Eine TNF- $\alpha$ -Freisetzung (TH1-Reaktion) zeigte sich nur bei den drei isoliert Pd-Allergikern. Durch den ergänzenden Stimulationsansatz mit NiSO<sub>4</sub> konnten wir auch bei der Zytokinfreisetzung am Beispiel IL-5 zeigen, dass ähnlich wie bei der oben beschriebenen Proliferationsantwort bei den im ECT doppelt (d. h. auf Ni und auf Pd) Reagierenden die vergleichsweise höchste Reaktion (hier IL-5-Freisetzung) in Gegenwart von Ni auftritt und wahrscheinlich der im Vordergrund stehenden Ni-

Sensibilisierung zuzuschreiben ist. Die IL-8- Analyse erbrachte in unseren Versuchen keine klare Differenzierung zwischen den drei Gruppen. Am Mausmodell beschrieben Kobayashi et al. [104], dass bei Pd-Sensibilierung im Hautinfiltrat vornehmlich CD4+ T-Zellen mit TH1-Charakteristika, d. h. erhöhter Expression von CD25, IL-2, IFN $\gamma$  und TNF- $\alpha$  – nicht aber IL-4 oder IL-5 zu finden waren. Insgesamt gelang in unseren Versuchen die Etablierung eines Pd-spezifischen LTT. Es fiel jedoch auf, dass bei weiterführenden Untersuchungen auf eine Überlagerung der Reaktivität in vivo und vitro durch Ni-Allergie geachtet werden muss. Da isoliert auftretende Pd-Allergie selten ist, können wir derzeit anhand der relativ kleinen hier untersuchten Untergruppe keine endgültigen Aussagen zum Zytokinmuster machen – außer der erwähnten Abgrenzung zur Ni-Allergie.

## 6. Zusammenfassung

Im Rahmen der Spezialsprechstunde für Patienten mit Verdacht auf Implantatunverträglichkeit erfolgt eine allergologische Diagnostik auch bei Patienten mit Dentalmaterialunverträglichkeit anhand von fragebogengestützter Anamnese, ECT und LTT (bisher zu Ni, Co und Cr). Damit wurde es möglich, in der vorliegenden Arbeit an einer Patientengruppe mit Gold-(Au-) oder Palladium-(Pd-) Allergie (d. h. ECT jeweils positiv) den LTT gegenüber Au (Testpräparat NTSA) sowie gegenüber Pd (Testpräparat PdCl<sub>2</sub>) zu etablieren. D. h. in Relation zum „Goldstandard ECT“ sollten NTSA- sowie PdCl<sub>2</sub>-Konzentrationen ermittelt werden, die in Abgrenzung zu nichtallergischen Kontrollen den Allergiestatus im LTT-Proliferations-Assay erkennen lassen und ergänzend über Zytokinprofile charakterisieren lassen. Die Messung der Proliferationsreaktion erfolgte über Beurteilung von inkorporiertem radioaktiv markiertem Thymidin. Freigesetztes IFN- $\gamma$ , TNF- $\alpha$ , IL-5, IL-17A und IL-8 wurden im „CBA“ durchflusszytometrisch bestimmt. Als Besonderheit zeigte sich schon über die ECT-Daten, dass größtenteils Pd- und Nickel-(Ni-)Reaktionen parallel auftreten, d. h. dass diese Konstellation ergänzend beurteilt werden sollte.

Betrachtet man den Zusammenhang zwischen ECT-Ergebnis und gemessenen LTT-Reaktionen, so ließ sich ein optimaler, zwischen Allergikern und Nicht-Allergikern differenzierender Stimulationsbereich feststellen. Bei Einsatz der ermittelten optimalen Stimulationskonzentrationen von NTSA konnte ein signifikant erhöhter SI > 3 nur bei Blutproben von Patienten gemessen werden, bei denen auch der ECT positiv auf NTSA war. Bei NTSA-ECT-negativen Patienten ergab sich keine erhöhte Proliferation.

Bei den Untersuchungen zu Pd wurde der Besonderheit einer möglichen Kreuzreaktion mit Ni Rechnung getragen. Bei Stimulation mit PdCl<sub>2</sub> konnte im ermittelten optimalen Stimulationsbereich eine positive Proliferationsreaktion im LTT (SI > 3) nur bei Patienten gezeigt werden, die im ECT isoliert auf PdCl<sub>2</sub> positiv reagierten. Waren die Patienten im ECT gegen PdCl<sub>2</sub> und NiSO<sub>4</sub> negativ oder auf beide Substanzen positiv, zeigte sich keine erhöhte Proliferation im LTT.

Bei zusätzlicher Stimulation mit NiSO<sub>4</sub> zeigte sich ein SI > 3 nur bei Patienten, die im ECT gegen NiSO<sub>4</sub> (und ggf. PdCl<sub>2</sub>) positiv waren. Dies untermauert die oft postulierte Kreuzreaktion bei im Vordergrund stehender Ni-Sensibilisierung.

Als Zytokinproduktion bei NTSA-stimulierten Zellkulturen ergab sich eine signifikante IL-5-Freisetzung nur bei NTSA-ECT-positiven Patienten wie auch IFN- $\gamma$ - und TNF- $\alpha$ -Freisetzung ebenfalls nur bei NTSA-ECT-positiven Patienten. Eine IL-8-Freisetzung zeigte sich bei NTSA-ECT-negativen Patienten. Somit ließ sich über die Freisetzung von IL-5 (TH2-Muster) wie auch über IFN- $\gamma$  und TNF- $\alpha$  (beides TH1-Zytokine) ein spezifisches Muster in unseren NTSA-Versuchen bei entsprechender NTSA-Allergie ablesen. Die IL-8-Produktion bei NTSA-Stimulation in vitro grenzte zusätzlich Blutproben nicht-allergischer Blutspender ab.

Die Zytokinproduktion bei PdCl<sub>2</sub>-stimulierten Zellkulturen ergab eine IL-5-Freisetzung bei Patienten mit doppelt positivem ECT gegen Pd und Ni; nur gering bei positivem ECT gegen PdCl<sub>2</sub> alleine und nicht bei insgesamt negativem ECT. IFN- $\gamma$  Freisetzung ergab sich nur sehr gering bei Patienten mit doppelt positivem ECT gegen Pd und Ni; TNF- $\alpha$  Freisetzung konnte nur bei den drei isoliert Pd-ECT-positiven (also zeitgleich Ni-negativen) Patienten gemessen werden; IL-8-Freisetzung wie auch IL-17A-Freisetzung trugen nicht zur Unterscheidung von ECT Pd/Ni positiv oder negativ bei. Eine mögliche Erklärung liefert die Zytokinproduktion bei NiSO<sub>4</sub>-stimulierten Zellkulturen. Diese ergab eine hohe, signifikante IL-5-Freisetzung bei Patienten mit doppelt positivem ECT gegen Pd und Ni, nicht aber bei isoliert Pd-ECT-positiven oder insgesamt ECT- negativen Patienten.

Bei den Pd- und Ni-Ansätzen zeigten sich also jeweils nur eine deutliche IL-5-Freisetzung, wenn der ECT sowohl gegen Pd als auch Ni positiv ist – bei isolierter Pd-Allergie deutlich geringer und auch nur, wenn mit PdCl<sub>2</sub> stimuliert wurde. Das deutet auf eine Kreuzreaktion der beiden Metalle hin (d. h. Pd reagiert im Hauttest bei Ni-Allergie oft mit), sowie auf Ni als Haupt-IL-5-Induktor – zumal im LTT-Proliferationsversuch die isoliert Pd-ECT-positiven Blutspender nur auf PdCl<sub>2</sub>-, nicht auf Ni-Stimulation reagierten.

Bei Verdacht auf Metallunverträglichkeit kann also die Komponente Allergie/Sensibilisierung nicht nur über den „Goldstandard“ „positiver ECT“, sondern



auch ergänzend über eine erhöhte LTT-Proliferationsreaktion und über Entzündungszytokinprofile in vitro beurteilt werden. Die vorgelegte Arbeit zeigt anhand der Etablierung eines Au- sowie Pd-LTT auf den potentiellen Nutzen einer Kombination mehrerer diagnostischer Methoden. Der hier erarbeitete Au- sowie Pd-LTT und die hier erhaltenen Ergebnisse bieten auch die Grundlage, den Zusatz-Nutzen der In-vitro-Diagnostik in weiterführenden Experimenten an großen Fallzahlen evaluieren zu können.

## 7. Literaturverzeichnis

1. Rasanen, L., et al., *Contact allergy to gold in dental patients*. Br J Dermatol, 1996. **134**(4): p. 673-7.
2. Thyssen, J.P., et al., *Cobalt release from implants and consumer items and characteristics of cobalt sensitized patients with dermatitis*. Contact Dermatitis, 2012. **66**(3): p. 113-22.
3. Fowler, J., Jr., et al., *Gold allergy in North America*. Am J Contact Dermat, 2001. **12**(1): p. 3-5.
4. Ahlgren, C., et al., *Contact allergy to gold in patients with oral lichen lesions*. Acta Derm Venereol, 2012. **92**(2): p. 138-43.
5. Kielhorn, J., et al., *Palladium--a review of exposure and effects to human health*. Int J Hyg Environ Health, 2002. **205**(6): p. 417-32.
6. Thyssen, J.P., et al., *Pragmatic approach to the clinical work-up of patients with putative allergic disease to metallic orthopaedic implants before and after surgery*. Br J Dermatol, 2011. **164**(3): p. 473-8.
7. Przybilla, B., P. Thomas, and B. Summer, *Allergische Reaktionen auf Metallimplantate*. Dtsch Arztebl, 2001. **98**(30): p. 4.
8. Valentine-Thon, E., et al., *LTT-MELISA is clinically relevant for detecting and monitoring metal sensitivity*. Neuro Endocrinol Lett, 2006. **27 Suppl 1**: p. 17-24.
9. Schafer, T., et al., *Epidemiology of contact allergy in adults*. Allergy, 2001. **56**(12): p. 1192-6.
10. Thomas, P., et al., *Patients with intolerance reactions to total knee replacement: combined assessment of allergy diagnostics, periprosthetic histology, and peri-implant cytokine expression pattern*. 2015. **2015**: p. 910156.
11. Vamnes, J.S., et al., *Four years of clinical experience with an adverse reaction unit for dental biomaterials*. Community Dent Oral Epidemiol, 2004. **32**(2): p. 150-7.
12. Laeijendecker, R., et al., *Oral lichen planus and allergy to dental amalgam restorations*. Arch Dermatol, 2004. **140**(12): p. 1434-8.
13. *Metal allergy: From Dermatitis to Implant and Device Failure*. 2018, Berlin: Springer.
14. Heratzadeh, A., et al., *Contact sensitization in dental technicians with occupational contact dermatitis. Data of the Information Network of Departments of Dermatology (IVDK) 2001-2015*. 2018. **78**(4): p. 266-273.
15. Bartram, F., et al., *Bedeutung von Epikutantest und Lymphozytentransformationstest für die Diagnostik von Typ IV-Sensibilisierungen. Stellungnahme des deutschen Berufsverbandes der Umweltmediziner*. J Lab Med, 2006. **302**(2): p. 5.
16. Kappert, H.F., *Deutsche Gesellschaft für Zahn-, Mund- und Kieferheilkunde, wissenschaftl. Stellungnahme Palladiumlegierungen*. DZZ, 2000. **56**(01): p. 4.
17. Staehle, H.J., *Unverträglichkeit gegenüber Dentalmaterialien*. Dtsch Arztebl, 2000. **97**: p. 7.
18. Garner, L.A., *Contact dermatitis to metals*. Dermatol Ther, 2004. **17**(4): p. 321-7.
19. Laeijendecker, R. and T. van Joost, *Oral manifestations of gold allergy*. J Am Acad Dermatol, 1994. **30**(2 Pt 1): p. 205-9.
20. Mückter, H., *Gold - Zierde und Therapeutikum*. Pharmazeutische Zeitung online, 2005. **18**.
21. Chen, J.K. and H.P. Lampel, *Gold contact allergy: clues and controversies*. Dermatitis, 2015. **26**(2): p. 69-77.
22. Muris, J., et al., *Palladium-based dental alloys are associated with oral disease and palladium-induced immune responses*. Contact Dermatitis, 2014. **71**(2): p. 82-91.
23. Svedman, C., et al., *Implants and contact allergy: are sensitizing metals released as haptens from coronary stents? Contact Dermatitis, 2014. 71(2): p. 92-7.*
24. Richter, G., *[Dental materials--problem substances in allergologic diagnosis? II: Patch test diagnosis and relevance evaluation of selected dental material groups]*. Hautarzt, 1996. **47**(11): p. 844-9.
25. Carter, D., *Dental materials at a glance*. Platinum Metals Rev, 2010. **54**(4): p. 3.

26. Durosaro, O. and R.A. el-Azhary, *A 10-year retrospective study on palladium sensitivity*. *Dermatitis*, 2009. **20**(4): p. 208-13.
27. Larese Filon, F., D. Uderzo, and E. Bagnato, *Sensitization to palladium chloride: a 10-year evaluation*. *Am J Contact Dermat*, 2003. **14**(2): p. 78-81.
28. Faurschou, A., et al., *Metal allergen of the 21st century--a review on exposure, epidemiology and clinical manifestations of palladium allergy*. *Contact Dermatitis*, 2011. **64**(4): p. 185-95.
29. Muris, J., et al., *Sensitization to palladium and nickel in Europe and the relationship with oral disease and dental alloys*. *Contact Dermatitis*, 2015. **72**(5): p. 286-96.
30. Drasch, G., C. Muss, and G. Roeder, *Gold and palladium burden from dental restoration materials*. *J Trace Elem Med Biol*, 2000. **14**(2): p. 71-5.
31. Syverud, M., et al., *Corrosion and biocompatibility testing of palladium alloy castings*. *Dent Mater*, 2001. **17**(1): p. 7-13.
32. Ahlgren, C., et al., *Contact allergy to gold is correlated to dental gold*. *Acta Derm Venereol*, 2002. **82**(1): p. 41-4.
33. Koutis, D. and S. Freeman, *Allergic contact stomatitis caused by acrylic monomer in a denture*. *Australas J Dermatol*, 2001. **42**(3): p. 203-6.
34. Thomas, P., et al., *[DKG statement on the use of metal alloy discs for patch testing in suspected intolerance to metal implants]*. *J Dtsch Dermatol Ges*, 2015. **13**(10): p. 1001-5.
35. Ahnliide, I., et al., *Gold concentration in blood in relation to the number of gold restorations and contact allergy to gold*. *Acta Odontol Scand*, 2002. **60**(5): p. 301-5.
36. Schaffran, R.M., F.J. Storrs, and P. Schalock, *Prevalence of gold sensitivity in asymptomatic individuals with gold dental restorations*. *Am J Contact Dermat*, 1999. **10**(4): p. 201-6.
37. Marcusson, J.A., *Contact allergies to nickel sulfate, gold sodium thiosulfate and palladium chloride in patients claiming side-effects from dental alloy components*. *Contact Dermatitis*, 1996. **34**(5): p. 320-3.
38. Moller, H., et al., *Gold trichloride and gold sodium thiosulfate as markers of contact allergy to gold*. *Contact Dermatitis*, 2005. **53**(2): p. 80-3.
39. Mahler, V., et al., *S3-Leitlinie: Durchführung des Epikutantests mit Kontaktallergenen und Arzneimitteln*. *J Dtsch Dermatol Ges*, 2019. **17**(10): p. 18.
40. Summer, B., et al., *Patch test reactivity to a cobalt-chromium-molybdenum alloy and stainless steel in metal-allergic patients in correlation to the metal ion release*. *Contact Dermatitis*, 2007. **57**(1): p. 35-9.
41. Rietschel, R.L., *Reproducibility of patch-test results*. *Lancet*, 1996. **347**(9010): p. 1202.
42. Schalock, P.C., et al., *American contact dermatitis society core allergen series*. *Dermatitis*, 2013. **24**(1): p. 7-9.
43. Dispenza, M.C., *Classification of hypersensitivity reactions*. *Allergy Asthma Proc*, 2019. **40**(6): p. 470-473.
44. Thomas, P., *[Allergic reactions to implant materials]*. *Orthopade*, 2003. **32**(1): p. 60-4.
45. Rachmawati, D., et al., *Transition metal sensing by Toll-like receptor-4: next to nickel, cobalt and palladium are potent human dendritic cell stimulators*. *Contact Dermatitis*, 2013. **68**(6): p. 331-8.
46. Schmidt, M., et al., *Crucial role for human Toll-like receptor 4 in the development of contact allergy to nickel*. *Nat Immunol*, 2010. **11**(9): p. 814-9.
47. Brehler, R., D. Becker, and H. Merk, *[MELISA--in vitro test for detection of contact allergy? A comment by the German Contact Allergy Group]*. *Hautarzt*, 1998. **49**(5): p. 418-9.
48. Pichler, W.J. and J. Tilch, *The lymphocyte transformation test in the diagnosis of drug hypersensitivity*. *Allergy*, 2004. **59**(8): p. 809-20.
49. Summer, B., et al., *[Role of the lymphocyte transformation test in the evaluation of metal sensitization]*. *Hautarzt*, 2016. **67**(5): p. 380-4.
50. Summer, B., et al., *Nickel (Ni) allergic patients with complications to Ni containing joint replacement show preferential IL-17 type reactivity to Ni*. *Contact Dermatitis*, 2010. **63**(1): p. 15-22.

51. Thomas, P., et al., *Allergy or tolerance: reduced inflammatory cytokine response and concomitant IL-10 production of lymphocytes and monocytes in symptom-free titanium dental implant patients*. Biomed Res Int, 2013. **2013**: p. 539834.
52. Budinger, L. and M. Hertl, *Immunologic mechanisms in hypersensitivity reactions to metal ions: an overview*. Allergy, 2000. **55**(2): p. 108-15.
53. Werfel, T., et al., *Dichotomy of blood- and skin-derived IL-4-producing allergen-specific T cells and restricted V beta repertoire in nickel-mediated contact dermatitis*. J Immunol, 1997. **158**(5): p. 2500-5.
54. Stander, S., et al., *Evaluation of lymphocyte transformation tests as compared with patch tests in nickel allergy diagnosis*. Contact Dermatitis, 2017. **76**(4): p. 228-234.
55. Stejskal, V.D., et al., *Metal-specific lymphocytes: biomarkers of sensitivity in man*. Neuro Endocrinol Lett, 1999. **20**(5): p. 289-298.
56. Valentine-Thon, E. and H.W. Schiwara, *Validity of MELISA for metal sensitivity testing*. Neuro Endocrinol Lett, 2003. **24**(1-2): p. 57-64.
57. Stejskal, V., T. Reynolds, and G. Bjorklund, *Increased frequency of delayed type hypersensitivity to metals in patients with connective tissue disease*. J Trace Elem Med Biol, 2015. **31**: p. 230-6.
58. Summer, B., S. Stander, and P. Thomas, *Cytokine patterns in vitro, in particular IL-5/IL-8 ratio, to detect patients with nickel contact allergy*. J Eur Acad Dermatol Venereol, 2018. **32**(9): p. 1542-1548.
59. Rustemeyer, T., et al., *Analysis of effector and regulatory immune reactivity to nickel*. Clin Exp Allergy, 2004. **34**(9): p. 1458-66.
60. Bordignon, V., et al., *Nickel, palladium and rhodium induced IFN-gamma and IL-10 production as assessed by in vitro ELISpot-analysis in contact dermatitis patients*. BMC Immunol, 2008. **9**: p. 19.
61. Bordignon, V., et al., *A laboratory test based on determination of cytokine profiles: a promising assay to identify exposition to contact allergens and predict the clinical outcome in occupational allergic contact dermatitis*. BMC Immunol, 2015. **16**: p. 4.
62. Minang, J.T., et al., *Nickel, cobalt, chromium, palladium and gold induce a mixed Th1- and Th2-type cytokine response in vitro in subjects with contact allergy to the respective metals*. Clin Exp Immunol, 2006. **146**(3): p. 417-26.
63. Vamnes, J.S., et al., *In vitro lymphocyte reactivity to gold compounds in the diagnosis of contact hypersensitivity*. Contact Dermatitis, 1999. **41**(3): p. 156-60.
64. Thomas, P., et al., *[Allergy diagnostics in suspected metal implant intolerance]*. Orthopade, 2013. **42**(8): p. 602-6.
65. Brasch, J., et al., *Guideline contact dermatitis: S1-Guidelines of the German Contact Allergy Group (DKG) of the German Dermatology Society (DDG), the Information Network of Dermatological Clinics (IVDK), the German Society for Allergology and Clinical Immunology (DGAKI), the Working Group for Occupational and Environmental Dermatology (ABD) of the DDG, the Medical Association of German Allergologists (AeDA), the Professional Association of German Dermatologists (BVDD) and the DDG*. Allergo J Int, 2014. **23**(4): p. 126-138.
66. Morgan, E., et al., *Cytometric bead array: a multiplexed assay platform with applications in various areas of biology*. Clin Immunol, 2004. **110**(3): p. 252-66.
67. Kwon, Y.M., et al., *Lymphocyte proliferation responses in patients with pseudotumors following metal-on-metal hip resurfacing arthroplasty*. J Orthop Res, 2010. **28**(4): p. 444-50.
68. Thomas, P., et al., *[Characteristics of 200 patients with suspected implant allergy compared to 100 symptom-free arthroplasty patients]*. Orthopade, 2013. **42**(8): p. 607-13.
69. *Contact Dermatitis*, Johansen, J.D., Frosch, P.J., Lepoittevin, J.P., 5 ed. 2011, Berlin: Springer.
70. Ekqvist, S., et al., *Does gold concentration in the blood influence the result of patch testing to gold?* Br J Dermatol, 2009. **160**(5): p. 1016-21.

71. Bruze, M. and K.E. Andersen, *Gold--a controversial sensitizer*. *European Environmental and Contact Dermatitis Research Group*. *Contact Dermatitis*, 1999. **40**(6): p. 295-9.
72. Kranke, B., et al., [*Patch testing with the "Austrian standard series"--epidemiologic test values and results*]. *Wien Klin Wochenschr*, 1995. **107**(11): p. 323-30.
73. Gawkrödger, D.J., *Investigation of reactions to dental materials*. *Br J Dermatol*, 2005. **153**(3): p. 479-85.
74. Marino, R., et al., *Burning mouth syndrome: the role of contact hypersensitivity*. *Oral Dis*, 2009. **15**(4): p. 255-8.
75. Gollhausen, R., B. Przybilla, and J. Ring, *Reproducibility of patch tests*. *J Am Acad Dermatol*, 1989. **21**(6): p. 1196-202.
76. Koch, P. and F.A. Bahmer, *Oral lesions and symptoms related to metals used in dental restorations: a clinical, allergological, and histologic study*. *J Am Acad Dermatol*, 1999. **41**(3 Pt 1): p. 422-30.
77. Thomas, P. and B. Summer, *Diagnosis and management of patients with allergy to metal implants*. *Expert Rev Clin Immunol*, 2015. **11**(4): p. 501-9.
78. Moller, H., *Dental gold alloys and contact allergy*. *Contact Dermatitis*, 2002. **47**(2): p. 63-6.
79. Raap, U., et al., *Investigation of contact allergy to dental metals in 206 patients*. *Contact Dermatitis*, 2009. **60**(6): p. 339-43.
80. Thomas, P. and M. Thomsen, [*Implant allergies*]. *Hautarzt*, 2010. **61**(3): p. 255-62; quiz 263-4.
81. Cristaudo, A., et al., *Release of palladium from biomechanical prostheses in body fluids can induce or support PD-specific IFN $\gamma$  T cell responses and the clinical setting of a palladium hypersensitivity*. *Int J Immunopathol Pharmacol*, 2009. **22**(3): p. 605-14.
82. Gawkrödger, D.J., F.M. Lewis, and M. Shah, *Contact sensitivity to nickel and other metals in jewelry reactors*. *J Am Acad Dermatol*, 2000. **43**: p. 5.
83. Vamnes, J.S., et al., *Dental gold alloys and contact hypersensitivity*. *Contact Dermatitis*, 2000. **42**(3): p. 128-33.
84. Wataha, J.C., et al., *Effect of toothbrushing on elemental release from dental casting alloys*. *J Prosthodont*, 1999. **8**(4): p. 245-51.
85. Warshaw, E.M., et al., *North American Contact Dermatitis Group patch-test results, 2003-2004 study period*. *Dermatitis*, 2008. **19**(3): p. 129-36.
86. Ahlstrom, M.G. and J.P. Thyssen, *Nickel allergy and allergic contact dermatitis: A clinical review of immunology, epidemiology, exposure, and treatment*. 2019. **81**(4): p. 227-241.
87. Natvig, J.B., *Report of the committee on clinical immunology of the International Union of Immunological Societies (IUIS)*. *Clin Immunol Immunopathol*, 1976. **5**(3): p. 430-8.
88. Merk, H.F., *Diagnosis of drug hypersensitivity: lymphocyte transformation test and cytokines*. *Toxicology*, 2005. **209**(2): p. 217-20.
89. Walker, C., et al., *Lymphokine regulation of activated (G1) lymphocytes. I. Prostaglandin E2-induced inhibition of interleukin 2 production*. *J Immunol*, 1983. **130**(4): p. 1770-3.
90. Summer, B., et al., *Molecular analysis of T-cell clonality with concomitant specific T-cell proliferation in vitro in nickel-allergic individuals*. *Allergy*, 2001. **56**(8): p. 767-70.
91. Pacheco, K., et al., *Development of a validated blood test for nickel sensitization*. *J Allergy Clin Immunol*, 2013. **132**(3): p. 767-769.
92. Eis, D. and U. Wolf, "Qualitätssicherung beim Lymphozytentransformationstest" - *Addendum zum LTT-Papier der RKI-Kommission "Methoden und Qualitätssicherung in der Umweltmedizin"*. *Bundesgesundheitsblatt Gesundheitsforschung Gesundheitsschutz*, 2008. **51**: p. 6.
93. Spoerri, I., et al., *Detection of nickel and palladium contact hypersensitivity by a flow cytometric lymphocyte proliferation test*. *Allergy*, 2015. **70**(3): p. 323-7.
94. Konstantinou, G.N., *Enzyme-Linked Immunosorbent Assay (ELISA)*. *Methods Mol Biol*, 2017. **1592**: p. 79-94.

95. Aydin, S., *A short history, principles, and types of ELISA, and our laboratory experience with peptide/protein analyses using ELISA*. *Peptides*, 2015. **72**: p. 4-15.
96. Lin, A.V., *Indirect ELISA*. *Methods Mol Biol*, 2015. **1318**: p. 51-9.
97. Lin, A.V., *Direct ELISA*. *Methods Mol Biol*, 2015. **1318**: p. 61-7.
98. Czerkinsky, C.C., et al., *A solid-phase enzyme-linked immunospot (ELISPOT) assay for enumeration of specific antibody-secreting cells*. *J Immunol Methods*, 1983. **65**(1-2): p. 109-21.
99. Ji, N. and T.G. Forsthuber, *ELISPOT Techniques*. *Methods Mol Biol*, 2016. **1304**: p. 63-71.
100. Hallab, N.J., et al., *Lymphocyte responses in patients with total hip arthroplasty*. *J Orthop Res*, 2005. **23**(2): p. 384-91.
101. Romagnoli, P., G.A. Spinaz, and F. Sinigaglia, *Gold-specific T cells in rheumatoid arthritis patients treated with gold*. *J Clin Invest*, 1992. **89**(1): p. 254-8.
102. Hashizume, H., et al., *Promiscuous interaction between gold-specific T cells and APCs in gold allergy*. *J Immunol*, 2008. **181**(11): p. 8096-102.
103. Baeck, M., et al., *Characterization of the T cell response in allergic contact dermatitis caused by corticosteroids*. *Contact Dermatitis*, 2013. **68**(6): p. 357-68.
104. Kobayashi, H., et al., *Characterization of T cell receptors of Th1 cells infiltrating inflamed skin of a novel murine model of palladium-induced metal allergy*. *PLoS One*, 2013. **8**(10): p. e76385.

## 8. Abkürzungsverzeichnis

AA	Allergisches Asthma bronchiale
AB	Asthma bronchiale
AD	Atopische Dermatitis
AE	Atopisches Ekzem
AR	Allergische Rhinokonjunktivitis
Au	Gold
CBA	cytometric bead assay
Co	Cobalt
Cr	Chrom
Cu	Kupfer
Cpm	counts per minute
CFSE	Carboxy fluorescein succinimidyl ester
DKG	Deutsche Kontaktallergiegruppe
ECT	Epikutantest
ELISA	Enzyme-linked immunosorbent assay
FACS	Fluorescence-activated cell sorting
IFN $\gamma$	Interferon gamma
IL	Interleukin
IVDK	Informationsverbund Dermatologischer Kliniken
LW	Leerwert unstimulierter Kulturen
LTT	Lymhozytentransformationstest
MELISA	memory lymphocyte immunostimulation assay
MSH	Mundschleimhaut
Ni	Nickel
NiSO <sub>4</sub>	Nickelsulfat
NTSA	Natriumthiosulfataurat
PBMC	peripheral blood mononuclear cells
Pd	Palladium
PdCl <sub>2</sub>	Palladiumchlorid
PHA	Phytohämagglutenin
PMA	Phorbolmyrestataacetat
RCA	Rhinoconjunctivitis allergica
SI	Stimulationsindex

TH	T-Helferzelle
TNF $\alpha$	Tumornekrosefaktor alpha
TT	Tetanus Toxoid
$^3\text{H}$ -Thymidin ( $^3\text{H}$ =Tritium)	Tritium-(radioaktiv) markiertes Thymidin



## **9. Danksagung**

Ich danke den Klinikdirektoren der Klinik und Poliklinik für Dermatologie und Allergologie der Ludwig-Maximilians-Universität München Herrn Professor Dr. med. Dr. h.c. mult. Thomas Ruzicka und Herrn Professor Dr. med. Lars E. French für die Möglichkeit meine Dissertation in ihrer Klinik durchzuführen.

Herrn Professor Dr. med. Peter Thomas, Leiter der Arbeitsgruppe AllergoMat der Klinik und Poliklinik für Dermatologie und Allergologie der Ludwig-Maximilians-Universität München, danke ich für die Überlassung dieses hochaktuellen Themas, die kontinuierliche hervorragende Betreuung und die stets motivierende Unterstützung während der gesamten Arbeit.

Großer Dank gebührt ferner den Mitarbeitern der Arbeitsgruppe für ihre außerordentliche Hilfsbereitschaft. Besonders danke ich Herrn Priv. Doz. Dr. rer. biol. hum. Burkhard Summer für die große Unterstützung bei der Laborarbeit und bei der statistischen Auswertung der Ergebnisse.

Herrn Ralf Pohl danke ich für die Einarbeitung in die Methoden und das „offene Ohr“ bei technischen Problemen.

## 10. Eidesstattliche Versicherung

Kapp, Florian Alexander Alienus

---

Name, Vorname

Ich erkläre hiermit an Eides statt,

dass ich die vorliegende Dissertation mit dem Thema

*„Etablierung und Bewertung von Palladium- und Gold-spezifischem  
Lymphozytentransformationstest und In-vitro-Zytokinfreisetzung bei Patienten mit  
Dentalmaterial-Unverträglichkeit“*

selbstständig verfasst, mich außer der angegebenen keiner weiteren Hilfsmittel bedient und aller Erkenntnisse, die aus dem Schriftum ganz oder annähernd übernommen sind, als solche kenntlich gemacht und nach ihrer Herkunft unter Bezeichnung der Fundstelle einzeln nachgewiesen habe.

Ich erkläre des Weiteren, dass die hier vorgelegte Dissertation nicht in gleicher oder in ähnlicher Form bei einer anderen Stelle zur Erlangung eines akademischen Grades eingereicht wurde.

München, den 25.01.2021

Florian Alexander Alienus Kapp

---

Ort, Datum

---

Unterschrift Doktorand