



Wella Germany GmbH, Berliner Allee 65, 64295 Darmstadt

30. September 2024

Sachbericht: **Förderkennzeichen 281A307B18**

Vorhabensbezeichnung: Entwicklung von Methoden zur Beurteilung von Formulierungseinflüssen auf die Aktivierung von dendritischen Zellen in Kokultur mit Keratinozyten (**KOEXPOSENS**)

Laufzeit des Vorhabens: 1.1.2020 bis 31.12.2023

Berichtszeitraum: 1.1.2020 bis 31.12.2023

Zuwendungsempfänger: **Wella Germany GmbH (Partner 2)**
Berliner Allee 65, 64295 Darmstadt

Projektkoordinator: Prof. Dr. Brunhilde Blömeke

Projektleiter – Partner 2: Dr. Carsten Goebel

Projekträger: Bundesanstalt für Landwirtschaft und Ernährung (BLE), Referat 322, Deichmanns Aue 29, 53179 Bonn

Inhaltsverzeichnis

Teil I: Kurzbericht	3
Teil II: Eingehende Darstellung	5
AP 1: Auswahl und Herstellung der Testsubstanzen	5
AP 4 / 6: analytische und massenspektrometrische Untersuchungen.....	5
AP 6.1: Etablierung der analytischen Bestimmung von Edukten.....	5
AP 6.1: Etablierung der analytischen Bestimmung von Metaboliten	5
AP 7: in-chemico Analyse	5
AP 7.1: Etablierung der Methodik zur enzymatischen Umsetzung mit einem Modellenzym	5
AP 7.1: Etablierung der Methodik zur enzymatischen Umsetzung mit einem human relevanten Enzym.....	6
AP 7.2: Analyse und Validierung einer Bioaktivierung der Prüfsubstanzen – Umsetzbarkeit mit dem Modelenzym	6
AP 4 / 6: analytische und massenspektrometrische Untersuchungen.....	8
AP 6.2: Analyse und Aufklärung der Metabolite.....	8
AP 8: Überprüfung der In-chemico Analyse.....	8
Zusammenfassung, Relevanz und Ausblick	8
Veröffentlichung der Daten.....	9
Literaturverzeichnis	11

Teil I: Kurzbericht

Das vorgestellte Projekt KOEXPOSENS hat zum Ziel, mögliche Interaktionen zwischen sensibilisierenden Riechstoffen [1] und anderen kosmetischen Inhaltsstoffen (wie Farbstoffen für die Haarfärbung) und anderen Substanzen in Verbraucherprodukten anwendungsspezifisch zu erforschen. Dies dient zur verbesserten Einschätzung von Interaktionen zwischen einzelnen Stoffen oder von einzelnen Stoffen mit Matrices. Insgesamt sollen Methoden und Faktoren ermittelt werden, die die bisherige Vorgehensweise bei der Ermittlung von Potenzial und Wirkstärke (*hazard- und potency assessment*) sowie daraus abgeleitete Strategien zur Risikoermittlung ergänzen und maßgeblich verbessern.

Derzeit entwickeln zirka 15% der Bevölkerung innerhalb ihres Lebens eine allergische Kontaktdermatitis [2] gegen eine oder mehrere hautsensibilisierende Substanzen, bei beruflich exponierten Personen liegt die Rate zum Teil höher und beträgt beispielsweise bei Friseuren 46% [3]. In vielen Fällen werden Reaktionen auf Riechstoffe festgestellt [4]. Weitere wichtige Sensibilisierer sind gewisse Konservierungsmittel und sensibilisierende Chemikalien in Haarfärbemitteln, wie para-Phenylendiamin und para-Toluyldiamin.

Zur Erkennung potenzieller Interaktionen zwischen Substanzen einer Mischung in der Etablierung einer Sensibilisierung soll hier modellartig eine Reihe von Beispielen in bereits aufgebauten In-vitro Systemen (HaCaT/THP-1, RHE/THP-1), auf deren Potenzial dendritische Zellen im Kontext entsprechender Begleitstoffe aktivieren zu können, studiert werden. Die Methodik soll möglichst durch begleitende In-chemico Ansätze (isolierte Enzyme/oxidierende Systeme), den Einsatz von Aerosolexpositionen und analytische Messungen (Zytokine, Chemokine) verfeinert werden.

Entsprechende In-chemico Ansätze mit isolierten Enzymen erfolgten durch Partner 2. Hintergrund bilden Arbeiten, die aufzeigen, dass Keratinozyten [5] [6] und inflammatorische Zellen des Immunsystems, wie Monozyten und Neutrophile, bei der Toxifizierung von dermal applizierten Substanzen bzw. Mischungen von Substanzen eine wesentliche Rolle spielen können.

Daher soll der mögliche Einfluss von entsprechenden Enzymen in der Haut und in den Zellen des Immunsystems auf das sensibilisierende Potential von Riechstoffen und Haarfarbstoffen ebenfalls analysiert werden. Dies umfasst die Entwicklung und Validierung von zellfreien in-chemico Methoden, die mit einfachen Mitteln eine Identifizierung von potenziell bioaktivierbaren kosmetischen Inhaltsstoffen ermöglicht. Die potenzielle Aktivierbarkeit von Substanzen durch

Enzyme bzw. oxidierende Systeme soll analysiert werden, da dies von besonderer Bedeutung für ein verbessertes Verständnis von Ko-Expositionseffekten ist, wodurch enzymatische Vorgänge verstärkt oder auch abgeschwächt werden könnten.

Die in-chemico Ansätze wurden anhand von Positivkontrollen entwickelt, um eine potenzielle Bioaktivierung durch humane Peroxidasen zu potenziell stärker sensibilisierenden Derivaten zu untersuchen. Stellvertretend wurde zunächst das Modellenzym Meerrettich Peroxidase verwendet. Mit der entwickelten in-chemico Methode konnte die Umsetzung der Riechstoffe Eugenol und Dihydroeugenol sowie die Umsetzung der Haarfarbstoffe para-Phenylendiamin (PPD), para-Toluyldiamin und 2-methoxymethyl-PPD nachgewiesen werden. Zur analytischen Erfassung und Quantifizierung der Ausgangsprodukte wurden HPLC-UV Methoden entwickelt. Die entstandenen Metabolite/ Reaktionsprodukte wurden mittels high resolution mass spectrometry aufgeklärt. Die Analyse zeigte unter anderem die Bildung des bereits bekannten Oxidationsprodukts des PPDs, Bandrowski's Base [7].

Eine Validierung der Ergebnisse erfolgte mit dem human relevanten Enzym Myeloperoxidase. Analog zu den Arbeiten mit Meerrettich Peroxidase wurde eine in-chemico Methode etabliert, um die Bioaktivierung mit dem human relevanten Enzym Myeloperoxidase zu untersuchen. Umsetzung der oben aufgeführten Testsubstanzen konnte mit Myeloperoxidase ebenfalls beobachtet werden.

Teil II: Eingehende Darstellung

AP 1: Auswahl und Herstellung der Testsubstanzen

Siehe Partner 1.

AP 4 / 6: analytische und massenspektrometrische Untersuchungen

AP 6.1: Etablierung der analytischen Bestimmung von Edukten

Es wurden in Abstimmung mit Partner 3 zwei HPLC-UV Methoden (high performance liquid chromatography mit UV-Detektion) entwickelt (und teilweise validiert) zur Quantifizierung der ausgewählten Substanzen (Eugenol, Dihydroeugenol und para-Phenylendiamin (PPD), para-Toluyldiamin (PTD), 2-methoxymethyl-PPD (ME-PPD)).

AP 6.1: Etablierung der analytischen Bestimmung von Metaboliten

Es wurden drei HPLC-HR-MS Methoden (high performance liquid chromatography – high resolution – mass spectrometry) entwickelt zur Auftrennung und Identifizierung von Substanzmetaboliten. Bei dieser Methodik wurden zuerst verschiedene Komponenten in den Reaktionsgemischen chromatographisch voneinander getrennt. Nach der Ionisierung erfolgte die Ermittlung der exakten Massen im hochauflösenden Massenspektrometer. Mit dieser Information konnten unbekannte Verbindungen identifiziert und deren Struktur aufgeklärt werden. Diese Messungen dienen zunächst nur der qualitativen Analyse, weshalb keine Validierung durchgeführt wurde. Die Methoden wurden zunächst bei Partner 3 angewendet und später intern unter gerätespezifischen Anpassungen.

AP 7: in-chemico Analyse

AP 7.1: Etablierung der Methodik zur enzymatischen Umsetzung mit einem Modellenzym

Es wurde eine Methode entwickelt und optimiert, um eine potenzielle Bioaktivierung durch humane Peroxidasen zu potenziell stärker sensibilisierenden Derivaten zu untersuchen. Stellvertretend wurde Meerrettich Peroxidase als Modellenzym verwendet, da der Bioaktivierungsmechanismus dem der Myeloperoxidase gleicht. Hierbei wurden Pyrogallol und Eugenol als Positivkontrolle verwendet, da deren Umsetzung durch Meerrettich Peroxidase bereits in der Literatur beschrieben wurde [8] [9]. Hierbei wurden die Substrate unter verschiedenen Testbedingungen mit dem Enzym inkubiert. Die Effektivität der enzymatischen Reaktion konnte man photometrisch beobachten: bei einer Bioaktivierung von Eugenol und/oder

Pyrogallol durch Meerrettich Peroxidase bilden sich Reaktionsprodukte, die ein anderes Absorptionsmaximum aufweisen als die Substrate.

Für die optimale Umsetzung der Substrate mit dem Enzym wurden verschiedene Reaktionsbedingungen getestet und miteinander verglichen. Die optimierten Faktoren umfassen den pH-Wert des Mediums, die Art des Puffersystems, die Lösungsmitteltoleranz des Enzyms, bzw. die Wahl des optimalen Lösungsmittels zum Vor-lösen der Substrate und die Konzentration des als Co-Substrat eingesetzten Wasserstoffperoxid.

Die entsprechenden Optimierungsschritte wurden zunächst mit Pyrogallol (Puffersystem, Lösungsmitteltoleranz) durchgeführt, dann wurde das System mit Eugenol (Puffersystem & -konzentration, Substratkonzentration, Enzymkonzentration, Wasserstoffperoxid-konzentration, Lösungsmittelwahl und -konzentration) verfeinert. Es wurden gleiche Ergebnisse bei der Lösungsmitteltoleranz und -wahl, der Wahl des Puffersystems und der Enzymkonzentration ermittelt.

In weiteren Versuchen wurden die optimalen Reaktionsfaktoren Wasserstoffperoxidkonzentration und pH zwischen Eugenol und PPD verglichen. Auf Basis sämtlicher Versuche wurden die Reaktionsbedingungen festgelegt. Ziel war es dabei, ein System zu nutzen, was robust und auf verschiedene Substanzklassen anwendbar ist.

AP 7.1: Etablierung der Methodik zur enzymatischen Umsetzung mit einem human relevanten Enzym

Analog zu den Arbeiten mit Meerrettich Peroxidase wurde eine in-chemico Methode etabliert, um die Bioaktivierung mit dem human relevanten Enzym Myeloperoxidase unter Verwendung von Eugenol als Positivkontrolle zu untersuchen. Auch hier wird der Reaktionsverlauf zunächst spektralphotometrisch erfasst.

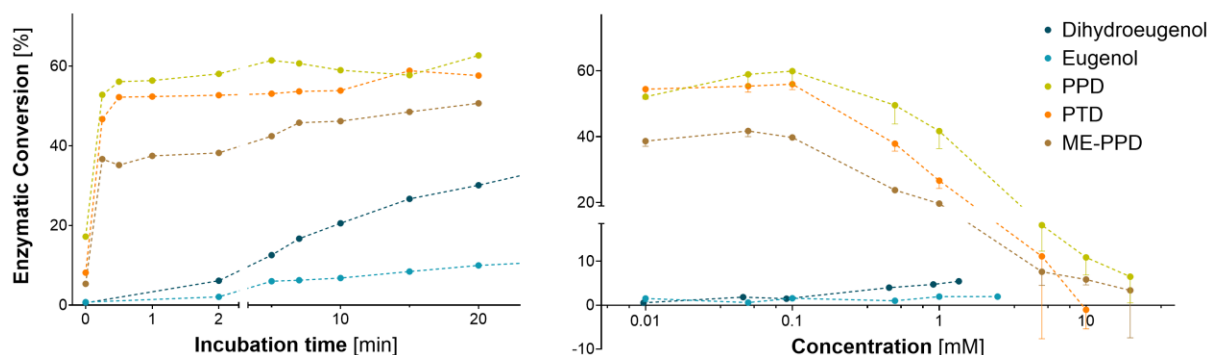
Zusätzlich werden derzeit verschiedene Reaktionsbedingungen getestet und deren Einfluss auf die Enzymaktivität verglichen. Folgende Faktoren werden dabei berücksichtigt: Lösungsmitteltoleranz, pH-Wert des Mediums, Reaktionstemperatur, die Konzentration der Testsubstanz, des Enzyms und des als Co-Substrat eingesetzten Wasserstoffperoxids. Auch hier ist noch ein Vergleich diverser Faktoren mit PPD geplant.

AP 7.2: Analyse und Validierung einer Bioaktivierung der Prüfsubstanzen – Umsetzbarkeit mit dem Modelenzym

Es wurden zunächst die als Pro-Haptene beschriebenen Terpene Zimtalkohol Eugenol und Dihydroeugenol mit Meerrettich Peroxidase umgesetzt, um herauszufinden, ob eine

Bioaktivierung auf diese Weise erfolgen konnte und welche Metabolite entstehen. Hierbei zeigte sich, dass Zimtalkohol nicht auf enzymatischem Wege oxidiert werden konnte, während die Parfüminhaltsstoffe Eugenol und Dihydroeugenol umgesetzt wurden. Die Reaktionen konnten photometrisch verfolgt werden. Des Weiteren wurde die gesamte Methodik auf die Haarfarbstoffe PPD, PTD und ME-PPD angewandt. Alle untersuchten Farb-Moleküle wurden von Meerrettich Peroxidase umgesetzt. Auch hier konnte der Reaktionsverlauf photometrisch verfolgt werden. Die Entwicklung von HPLC-UV Methoden ermöglichte die analytische Erfassung und Quantifizierung der Ausgangsstoffe sowie deren Abbau (AP 6.1).

Es wurde die enzymatische Umsetzung der oben genannten Testsubstanzen in Abhängigkeit von der Substratkonzentration sowie der Reaktionszeit getestet. Die Auswertung zeigte eine bessere Umsetzung der Haarfarbmoleküle (PPD, PTD, ME-PPD) verglichen mit den Riechstoffen (Eugenol, Dihydroeugenol) (siehe Abbildung).



Die Beobachtung der einzelnen Chromatogramme bei den verschiedenen Bedingungen zeigte die Bildung verschiedener Metabolite. Nächste Schritte sind die Validierung der Befunde mit einem human relevanten Enzym (AP 7.2) sowie die Analyse und Identifikation der gebildeten Metabolite (AP 6.2 bzw. AP 4.1).

AP 7.2: Analyse und Validierung einer Bioaktivierung der Prüfsubstanzen mit human relevantem Enzym

Zur Validierung der zuvor erzielten Ergebnisse wurde Myeloperoxidase herangezogen, da sie in großer Menge in Neutrophilen enthalten sind. Neutrophile sind Teil des angeborenen Immunsystems. Für die Entwicklung der in-chemico Methode sowie weitere Versuche wurde Myeloperoxidase aus humanen Leukozyten verwendet.

Die Peroxidase-abhängige Umsetzung der oben aufgeführten Substrate konnte mit Myeloperoxidase bestätigt werden.

AP 4 / 6: analytische und massenspektrometrische Untersuchungen

AP 6.2: Analyse und Aufklärung der Metabolite

Durch AP 7.2 wurde bereits erkannt, dass sich diverse Metabolite für jede Testsubstanz bilden. Die Identifikation der verschiedenen Metabolite erfolgte mit HPLC-HR-MS. Zunächst erfolgte die Messung durch Unterstützung von Partner 3. Seit Ende 2023 besitzt Partner 2 ebenfalls die entsprechende Ausrüstung, um die Messungen intern durchzuführen. Die Entwicklung einer chromatographischen Methode zur Trennung der Ausgangsstoffe sowie deren Metabolite erfolgte vorab durch Partner 2 (AP 6.1). Bei den im Folgenden aufgeführten Ergebnissen ist zu beachten, dass hochauflösende Massenspektrometrie auf die Identifizierung der Summenformel von unbekanntem Verbindungen ausgerichtet ist. Die Fragmentierung dieser Substanz im Massenspektrometer ermöglicht ebenfalls Aussagen über die Struktur der unbekanntem Verbindung, jedoch sind für eine eindeutige Aussage über die Struktur der gebildeten Metabolite NMR-Analysen notwendig.

Die Analyse zur Identifizierung der Metabolite von Eugenol zeigten die Bildung eines monomeren und zweier dimerer Reaktionsprodukte, wie sie bereits in der Literatur erwähnt wurden [9] [10]. Die Ergebnisse der Analyse der Metaboliten von Dihydroeugenol ergaben analoge Ergebnisse mit gleichen Metabolitstrukturen.

Die Analyse der Haarfarbmoleküle zeigt im Vergleich zu den Riechstoffen die Bildung vieler Reaktionsprodukte – überwiegend dimere und trimere Strukturen. Das bereits bekannte Oxidationsprodukt des PPDs, Bandrowski's Base, wurde ebenfalls nachgewiesen [7].

AP 8: Überprüfung der In-chemico Analyse

Eine Aktivierung mit Myeloperoxidase konnte beobachtet werden. Die Bestätigung der In-chemico Ergebnisse in isolierten Immunzellen steht noch aus.

Zusammenfassung, Relevanz und Ausblick

Es konnte ein komplettes Verfahren zur Analyse der Bioaktivierung im zellfreien System etabliert werden anhand des Modellenzym Meerrettich Peroxidase. Die Arbeiten führten von der Optimierung der Reaktionsbedingungen zur enzymatischen Umsetzung, angepasst an die verschiedenen Substrate, über die Probenaufarbeitung bis zur analytischen Methodenentwicklung unter dem Einsatz von komplexen Messinstrumenten. Dies ermöglicht die Quantifizierung der Ausgangssubstanzen sowie die Identifizierung der Metabolite. Die in-chemico

Methodik kann - nach entsprechender Adaption - grundsätzlich auch auf weitere Substrate angewendet werden. Die Übertragung von Meerrettich Peroxidase auf Myeloperoxidase war ebenfalls möglich. Die weiteren Schritte von Optimierung über Quantifizierung bis hin zur Metabolit-Identifikation laufen momentan noch.

Die Ergebnisse im Rahmen dieses Projekts zeigen eine Peroxidase-abhängige Umsetzung/Aktivierung der ausgewählten Substanzen – sowohl mit dem Modelenzym als auch mit einem human relevanten Enzym.

Hautirritationen können zur Rekrutierung von Immunzellen führen, die die Abtötung von Pathogenen und die Wundheilung unterstützen. Neutrophile besitzen in großer Menge Myeloperoxidase (2-5% des gesamten Proteinanteils) und können als Marker für eine Entzündungsreaktion dienen, da dies mit einer Ansammlung von Neutrophilen einher geht [11]. Durch die Rekrutierung der Neutrophile an die Entzündungsstelle kann Myeloperoxidase dort sowohl intra- als auch extrazellulär auftreten [12]. Der Nachweis der enzymatischen Umsetzung kann somit auch ein verändertes Sensibilisierungsverhalten durch die Präsenz dieser Immunzellen hervorrufen. Das bereits identifizierte Reaktionsprodukt von PPD, Bandrowski's Base, wurde bereits in der Literatur als stärker sensibilisierend im Vergleich zu PPD beschrieben [7] [13].

Nächste Schritte werden daher die Identifizierung der Metabolite durch enzymatische Umsetzung mit Myeloperoxidase sein. Das Hautsensibilisierungspotential der gebildeten Metabolite kann mit alternativen Testmethoden untersucht werden, um auf ein erhöhtes oder erniedrigtes Sensibilisierungspotential der ausgewählten Testsubstanzen durch die Präsenz von Immunzellen bzw. deren Peroxidasen schließen zu können. Ein weiterer Schritt, der noch aussteht, ist die Bestätigung der zuvor ermittelten in-chemico Ergebnisse mit isolierten humanen Zellen.

Veröffentlichung der Daten

Die Ergebnisse mit dem Modelenzym wurden auf dem Jahreskongress der Society of Toxicology am 10.-14. März 2024 in Salt Lake City, Utah (USA) vorgestellt. Eine weitere Publikation steht noch aus (geplant Ende 2025).



UNIVERSITÄT
TRIER

#3209 / P322

Potential Impact of Bioactivation on Skin Sensitizing Properties of Hair Dyes and Fragrance Ingredients: an In Chemico Analysis

Hannah Deusinger¹, Sabine Langhoff¹, Udo Bock², Brunhilde Blomeke², Carsten Goebel¹
¹Wella Germany GmbH, Darmstadt, Germany; ²Environmental Toxicology, Trier University, Trier, Germany

KOEXPOSENS Project (281A307):
Trier University, Wella Germany
GmbH, Symrise AG, Germany



Bundesministerium
für Ernährung
und Landwirtschaft

Introduction

Skin sensitization is an important end point in risk assessment of chemicals. Abiotic and/or biotic activation of chemicals may increase their potential to induce skin sensitization. Under conditions of skin damage and irritation, bioactivation of chemicals may be enhanced by enzymes from infiltrating immune cells, such as peroxidases of neutrophilic leukocytes. Peroxidases (EC 1.11.X) activate a wide variety of organic and inorganic substrates and were already incorporated in peptide reactivity assays to assess skin sensitization. [1,2]

Bioactivation of the oxidative hair dyes *p*-phenylenediamine (PPD), toluene-2,5-diamine (PTD), 2-methoxyethyl-PPD (ME-PPD) and the fragrance ingredient eugenol was investigated in chemico (Fig. 1). It was focused on peroxidase-dependent activation using horseradish peroxidase (HRP) due to its functional similarity to human peroxidases.

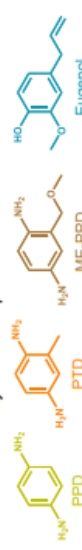


Figure 1: Chemical Structures of *p*-Phenylenediamine (PPD), Toluene-2,5-diamine (PTD), 2-Methoxyethyl-PPD (ME-PPD) and Eugenol.

Results

High resolution – mass spectrometry (HR-MS) of HRP-dependent activation showed the formation of dimeric and trimeric metabolites for hair dyes (Fig. 4 and 5) including the formation of Bandrowski's Base, a known oxidation product of PPD with higher skin sensitizing potency [3].

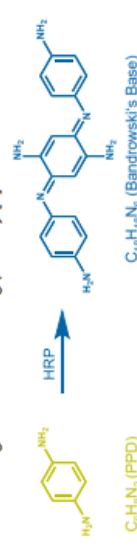


Figure 4: Chemical Structure of Potential Reaction Product of Horseradish Peroxidase (HRP)-dependent Oxidation of PPD.

Results

The ability of HRP to oxidize PPD, PTD, ME-PPD and eugenol was investigated and confirmed by UV-VIS spectroscopy. Time- and dose-dependent conversion was quantitatively analyzed by HPLC-UV. The tested hair dyes are converted within seconds while eugenol conversion is comparatively slow (Fig. 2).

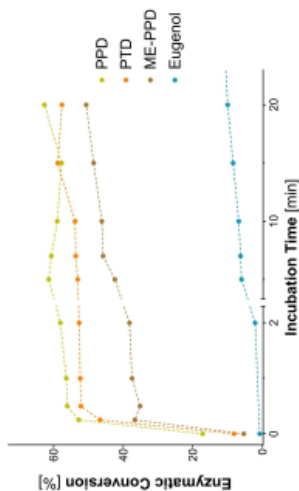


Figure 2: Enzymatic Conversion of PPD, PTD, ME-PPD and Eugenol with Horseradish Peroxidase in Dependency of Incubation Time (n=1), analyzed with HPLC-UV.

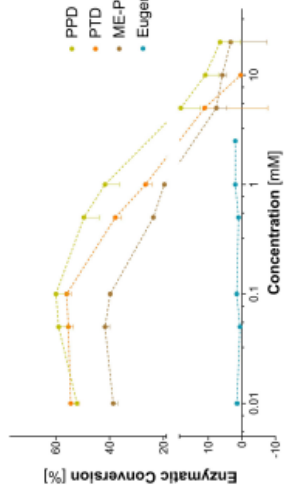


Figure 3: Enzymatic Conversion of PPD, PTD, ME-PPD and Eugenol with Horseradish Peroxidase in Dependency of Concentration (n=3), analyzed with HPLC-UV.

Conclusion

The in chemico analysis of the bioactivation of PPD, PTD and ME-PPD showed dose- and time-dependent conversion. The results showed that introduction of side chains in 2-position impacts enzymatic activation. Identification of the oxidation products showed the formation of Bandrowski's Base, a known oxidation product of PPD with higher skin sensitizing potency. Analysis of PTD and ME-PPD indicate the formation of dimeric oxidation products. HRP-dependent conversion of the fragrance ingredient eugenol was only slow and independent of dose.

Our data warrant further investigation how activation by human peroxidases may impact the skin sensitizing potential of hair dyes and fragrance ingredients.

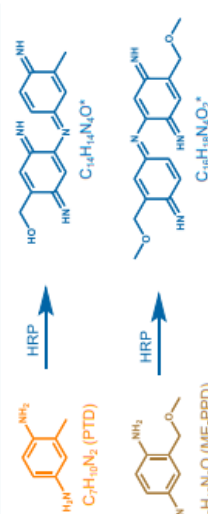


Figure 5: Chemical Structures of Potential Reaction Products of Horseradish Peroxidase (HRP)-dependent Oxidation of PTD and ME-PPD.
* Proposed structure based on HR-MS results

Acknowledgements: We thank Symrise AG and especially R. Wittlake and K. Kerth for their mass spectrometric support and expertise. The project was partly supported by the Federal Ministry of Food and Agriculture, Germany (KOEXPOSENS; FKZ 281A307B18).

References: [1] Weis et al. 2020, DOI:10.3934/microbiol.2020020 [2] Geberick et al. 2009, DOI:10.1093/toxsci/kfp192 [3] Juby et al. 2009, DOI:10.1039/b220062g

Literaturverzeichnis

- [1] SCCS (Scientific Opinion on consumer Safety), „Opinion on Skin Sensitization Quantitative Risk Assessment for Fragrance Ingredients (QRA2), Submission I,“ 30 July 2018.
- [2] A. Svensson, R. Ofenloch, M. Bruze, L. Naldi, S. Cazzaniga, P. Elsner, M. Goncalco, M.-L. A. Schuttelaar und T. Diepgen, „Prevalence of skin disease in a population-based sample of adults from european countries,“ *Br. J. Dermatol.*, Bd. 178(5), pp. 1111-1118, 2018.
- [3] R. Brans, C. Schröder-Kraft, C. Skudlik, S. John und J. Geier, „Tertiary prevention of occupational skin diseases: Prevalence of allergic contact dermatitis and pattern of patch test results,“ *Contact Dermatitis*, Bd. 173(6), pp. 35-44, 2019.
- [4] T. Diepgen, R. Ofenloch, M. Bruze, S. Cazzaniga, P. Coenraads, P. Elsner, M. Goncalo, A. Svensson und L. Naldi, „Prevalence of fragrance contact allergy in the general population of five European countries: a cross-sectional study,“ *Br. J. Dermatol.*, Bd. 173(6), pp. 1411-1419, 2015.
- [5] N. Kohli und S. Nedorost, „Inflamed skin predisposes to sensitization to less potent allergens,“ *J. Am. Acad. Dermatol.*, Bd. 75(2), pp. 312-317, 2016.
- [6] M. Klicznik, A. Szenes-Nagy, D. Campbell und I. Gratz, „Taking the lead - how keratinocytes orchestrate skin T cell immunity,“ *Immunol Lett*, Bd. 200, pp. 43-51, 2018.
- [7] P. Aeby, T. Sieber, G. Gerberick und C. Goebel, „Skin sensitization to p-phenylenediamine: the diverging roles of oxidation and N-acetylation of dendritic cell activation and the immune response,“ *J. Invest. Dermatol.*, Bd. 129(1), pp. 99-109, 2009.
- [8] A. Maehly und B. Chance, „The assay of catalases and peroxidases,“ *Methods Biochem. Anal.*, Bd. 1, pp. 357-424, 1954.
- [9] D. Thompson, K. Norbeck, L. Olsson, D. Constantin-Teodosiu, J. Van der Zee und P. Moldéus, „Peroxidase-catalyzed oxidation of eugenol: formation of a cytotoxic metabolite(s),“ *J. Biochem. Chem.*, Bd. 60(4), pp. 1052-1058, 1989.
- [10] C. Bouhlel, G. Dolhem, X. Fernandez und S. Antoniotti, „Model study of the enzymatic modification of natural extracts: peroxidase-based removal of eugenol from rose essential oil,“ *J. Agric. Food Chem.*, Bd. 60(4), pp. 1052-1058, 2012.
- [11] M. Trush, P. Egner und T. Kensler, „Myeloperoxidase as a biomarker of skin irritation and inflammation,“ *Food Chem. Toxicol.*, Bd. 32(2), pp. 143-147, 1994.

- [12] S. Klebanoff, „Myeloperoxidase: friend and foe,“ *J. Leukoc. Biol.*, Bd. 77(5), pp. 598-625, 2005.
- [13] J. Troutman, L. Foertsch, P. Kern, H. Dai, M. Quijano, R. Dobson, J. Lalko, J. Lepoittevin und G. Gerberick, „The incorporation of lysine into the peroxidase peptide reactivity assay for skin sensitization assessments,“ *Toxicol. Sci.*, Bd. 122(2), pp. 422-436, 2011.