



**Universitätsklinikum
Jena**

Klinik für Hautkrankheiten

Qualitäts-zertifiziert nach DIN EN ISO 9001:2008

Erfurter Straße 35
07743 Jena

Direktor: Prof. Dr. med. P. Elsner

**Entwicklung eines standardisierten
Testverfahrens zur Wirksamkeitstestung von
Hautschutzpräparaten gegen beruflich relevante
lipophile Hautirritantien**

DGUV-Kennzeichen: FP 243

Wissenschaftlicher Abschlussbericht

Laufzeit: 01.01.2005, zuwendungsneutral verlängert bis 30.06.2011

Verfasser: S. Schliemann, P. Elsner

Jena, im September 2012

Bachstraße 18 · 07743 Jena · Telefon 03641 93 00

Internet: www.uniklinikum-jena.de
Gerichtsstand Jena
Steuernummer 161 / 144 / 02978 · USt-IdNr. DE 150545777
Bankverbindung:
Sparkasse Jena · BLZ 830 530 30 · Konto 221

Universitätsklinikum Jena · Körperschaft des öffentlichen Rechts
als Teilkörperschaft der Friedrich-Schiller-Universität Jena
Verwaltungsratsvorsitzender: Prof. Dr. Thomas Deufel
Medizinischer Vorstand und Sprecher des Klinikumsvorstandes:
Prof. Dr. Klaus Höffken
Wissenschaftlicher Vorstand: Prof. Dr. Klaus Benndorf
Kaufmännischer Vorstand: Dr. Brunhilde Seidel-Kwem

**Inhaltsverzeichnis**

Forschungsnehmer.....	3
Mitglieder des Projektbegleitkreises.....	3
Glossar.....	4
Zusammenfassung.....	5
Summary.....	6
1. Problemstellung und Forschungsziele.....	7
1.1. Problemstellung.....	7
1.2. Forschungsziele.....	11
2. Allgemeine Methoden und Projektablauf	12
3. Ergebnisse.....	14
3.1 Arbeitspaket 1.....	14
3.2 Arbeitspaket 2.....	16
3.3 Arbeitspaket 3.....	29
3.4 Arbeitspaket 4.....	44
4. Fazit und Ausblick	46
5. Literaturverzeichnis.....	52



Forschungsnehmer an der *Klinik für Hautkrankheiten*

Prof. Dr. med. P. Elsner, Forschungsleitung, Direktor der Klinik
Dr. med. S. Schliemann, Projektmanagement, Berichterstattung

Unter Mitarbeit von

Dr. med. D. Lange
Dr. med. B. Opper
Dr. med. H. Mitzel
Frau A. Zahlten
Frau N. Siering (MTA)
Frau J. Schrimpf (MTA)

Mitglieder des Projektbegleitkreises des Forschungsvorhabens

Herr J. Berger, DGUV
Herr Dr. E. Droll, BG Rohstoffe und Chemische Industrie
Herr Dipl.-Ing. R. Ebenig, BG Bau
Herr Dr. med. rer. nat. M. Haufs, BGFA
Herr Dr. J. Herrmann, DGUV Forschungsförderung
Herr Dr. P. Kleesz, BG Nahrungsmittel und Gastgewerbe, Mannheim
Frau Dr. rer. nat. A. Möller, IFA
Herr Dr. rer. nat. E. Nies, IFA
Herr Dipl.-Chem. M. Rocker, BG Metall
Herr Dipl.-Ing. J. Syma, VBG BV Bergisch-Gladbach

**Glossar der verwendeten Abkürzungen**

CAS-Nr.	engl. CAS Registry Number, CAS = Chemical Abstracts Service, internationaler Bezeichnungsstandard für chemische Stoffe
DEGBE	Diethylenglykol-Monobuthylether
LDI	Laser Doppler Imager, Gerät zur nicht invasiven Messung der Hautdurchblutung
PSA	Persönliche Schutzausrüstung an Arbeitsplätzen (Handschuhe, Hautmittel)
SLS	Sodium Lauryl Sulfat = Natriumlaurylsulfat, anionisches Tensid welches in wässrigen Verdünnungen als hydrophiles Standardirritans eingesetzt wird
TEWL	Transepidermaler Wasserverlust, hautphysiologischer Parameter zur Untersuchung der epidermalen Barriere-Integrität



ZUSAMMENFASSUNG

Hautschutzprodukte sind Kosmetika, die an Arbeitsplätzen zur Prävention irritativer Kontaktekzeme eingesetzt werden, wenn eine Verwendung von Schutzhandschuhen nicht angezeigt oder unmöglich ist. Ihre prinzipielle Wirksamkeit ist zwischenzeitlich im Zusammenhang mit Feuchtarbeit und Kontakt zu wässrigen Irritantien, speziell Tensiden wie SLS, wissenschaftlich positiv belegt worden. Hautschutzprodukte werden aber auch bei multiplen Expositionen und Umgang mit lipophilen Arbeitsstoffen von Herstellern empfohlen. Insbesondere bei Auslobung zum Schutz gegen lipophile Arbeitsstoffe, zu denen auch organische Lösemittel zählen, fehlen jedoch bisher positive Wirksamkeitsnachweise, zumindest was Ergebnisse aus repetitiven in vivo-Testverfahren angeht, die von berufsdermatologischer Seite empfohlen werden. Im Rahmen des vorgelegten Forschungsprojektes wurden an einem berufsdermatologischen Zentrum wesentliche Entwicklungsarbeiten für ein transferfähiges Testverfahren zur Wirksamkeitstestung für berufliche Hautschutzmittel gegen lipophile Substanzen geleistet. Das in vivo-Irritationsmodell ermöglicht einen parallelen, intraindividuellen Vergleich von Wirksamkeiten mehrerer Hautschutzexterna an der Rückenhaut. Zwei beruflich relevante Lösemittel, darunter ein aliphatischer Kohlenwasserstoff (KW) (n-Octan, CAS-Nr. 111-65-9) und ein aromatischer KW (Cumol, Isopropylbenzol, CAS-Nr. 89-82-8, wurden als Modellirritantien implementiert. Der induzierte Irritationsgrad wird anhand der Zielparameter „klinischer Grad der kumulativen Irritation im Summenscore“ und „Dehydratation des Stratum corneums“ quantifiziert. Statistische Methoden wurden zur Absicherung der Produktwirkung entwickelt. In zwei aufeinanderfolgenden, verblindeten Studien zeigten sich bei 2 von 6 untersuchten Produkten allerdings nicht nur eine fehlende Schutzwirkung, sondern signifikant irritationsverstärkende Effekte. Eine isolierte Schutzwirkung vor Cumol-bedingter Dehydratation konnte im Modell für 2 von 6 Produkten nachgewiesen werden. Keines der untersuchten Externa wirkte ausreichend gegen Octan-bedingte Irritation. Aufgrund neuer Erkenntnisse zum toxikologischen Profil von Cumol wird die Substanz zwischenzeitlich nicht mehr uneingeschränkt als Modellsubstanz empfohlen. Das Projekt wurde daraufhin vor einer optionalen Multicentervalidierung des Testmodells beendet. Anschlussarbeiten auf dem Gebiet außerhalb des Projektrahmens sind notwendig.



SUMMARY

● Skin protection products, or so-called pre-work creams, are cosmetics that are used at workplaces to prevent or diminish irritant hand dermatitis, whenever gloves are inappropriate. Such products have been proven to be effective against the irritant impact of so-called wet work and contact to water soluble irritants such as detergents. They are as well marketed with the claim to be beneficial against irritation caused by lipophilic work substances, such as solvents. However, evidence of their actual properties against lipophilic irritants is missing to date, at least as far as results from repetitive in vivo efficacy tests are considered. In the scientific project presented here, a repetitive irritation model with lipophilic irritants was developed, which enables simultaneous efficacy testing of several preparations on human skin in vivo. Two occupationally relevant organic solvents, one aliphatic (n-octane, CAS-Nr. 111-65-9) and one aromatic (cumene, isopropylbenzene, CAS-Nr. 89-82-8), were chosen as model irritants, after toxicological reviewing. Methods were implemented to quantify the degree of irritation achieved by using capacitance measurements on the skin surface together with clinical grading. Statistical parameters were developed that allow to prove and compare the protection efficacy of preparations. Two subsequent blinded studies using this test protocol with commercial products claimed to „protect against irritation from solvents“ revealed that 2 out of 6 products did not only fail to protect, but indeed aggravated skin irritation. Two other products offered significant protection only against cumene-induced stratum corneum dehydration. Altogether, none of the products offered satisfactory protection against octane. Meanwhile, publications on the toxicological profile of cumene suggest that this substance can no longer be recommended as a model irritant. The project was therefore terminated and a multicentre validation study was cancelled. Subsequent work outside the given project frame is needed to establish a new model irritant to replace cumene.



1. PROBLEMSTELLUNG UND FORSCHUNGSZIELE

1.1. Problemstellung

Das berufsbedingte Kontaktekzem der Hände zählt zu den häufigsten gemeldeten berufsbedingten Erkrankungen. Das irritative Kontaktekzem nimmt dabei den größten Anteil ein (1, 2). Neben Kontakt zu wasserlöslichen Arbeitsstoffen, die als Hautirritantien wirken, besteht an vielen Arbeitsplätzen Hautkontakt zu lipophilen Substanzen mit potentiell irritativer Hautwirkung. Hierzu können Bestandteile technischer Öle und Fette, sowie Lösemittel, aber auch Fettsäuren, die in u. a. Nahrungsmitteln vorkommen, gezählt werden. Sogenannte organische Lösemittel werden in flüssiger Form zur Lösung anderer organischer Substanzen, wie Ölen, Fetten, Harzen und Wachsen, verwendet. Sie stellen eine chemisch heterogene Substanzgruppe dar, deren Hauptgruppen von aliphatischen und aromatischen Kohlenwasserstoffen (Alkanen, Alkylbenzolen), sowie Ketonen, Fettsäuren und Glykolethern gebildet werden. Ein beruflicher Umgang mit lipophilen Arbeitsstoffen kommt in Bereichen der chemischen Industrie, in der Bau- und Metallindustrie, sowie in der Papier- und Druckindustrie vor. Auch Mechaniker, Maler und Lackierer können genannt werden (Übersicht in: (3)). Beim Umgang mit hautgefährdenden Stoffen am Arbeitsplatz, zu denen auch organische Lösungsmittel zählen, sind Arbeitsschutzvorschriften zu beachten. Die technische Regel für Gefahrstoffe „Gefährdung durch Hautkontakt“ TRGS 401 unterstützt den Arbeitgeber im Hinblick auf seine Pflichten nach der Gefahrstoffverordnung zur Gefährdungsbeurteilung und bei der Auswahl und Bewertung von persönlichen Schutzausrüstungen (PSA) und Hautschutzmitteln (4). Trotz Umsetzung technisch-organisatorischer Maßnahmen und der Vorschrift, bei Umgang geeignete Schutzhandschuhe zu verwenden, besteht bei vielen Beschäftigten ein wiederkehrender, ungeschützter Hautkontakt zu verschiedenen Lösemitteln. Dieser kann indirekt, beispielsweise durch Kontakt zu kontaminierten Arbeitsmaterialien oder Kleidung, versehentlich, oder auch durch unsachgemäßen direkten Umgang hervorgerufen werden.

Der Hautkontakt zu Lösemitteln führt klinisch zu einer erkennbaren Trockenheit und Entfettung der Haut, die sich bei wiederholtem Kontakt bis hin zu einem chronisch



irritativen Kontaktekzem verstärken können. Die tatsächliche pathogenetische Bedeutung von lipophilen Irritantien für die Entwicklung berufsbedingter Handekzeme ist bisher nicht ausreichend geklärt. Es wurden weit weniger wissenschaftliche Studien mit diesen Substanzen durchgeführt, als es für die Untersuchung der Wirkung wasserlöslicher Irritantien auf die menschliche Hautbarriere der Fall ist (5-15). Dies betrifft sowohl human-experimentelle Studien als auch epidemiologische Untersuchungen. Demzufolge finden sich für Deutschland keine zuverlässigen Zahlen zur Epidemiologie von Kontaktekzemen, die durch lipophile Irritantien verursacht werden. In einer älteren skandinavischen Studie rangierten Lösemittel als Auslöser beruflicher Kontaktekzeme auf Rang 5 hinter anderen heterogenen Faktoren wie Feuchtarbeit, Detergentien, Nickel, Handreinigern und Seifen. In nur 3,6 % der untersuchten Fälle identifizierten die Autoren Lösemittel als relevante Auslöser berufsbedingter Handekzeme (16). In einer britischen Erhebung wurden Lösemittel als Auslöser für irritative Kontaktekzeme in 8% der Fälle genannt (Detergentien 22%, Feuchtarbeit 19,8%, Petroleumprodukte 8,7%) (17). In einer regionalen epidemiologischen Untersuchung in Bayern fanden sich Berufe mit potentiellen Lösemittelkontakten, wie u.a. Maler, Metallarbeiter, Mechaniker, Monteure und Lackierer, in etwa im Mittelfeld auf einer Liste von 21 Hautrisikoberufen. Die jährlichen Inzidenzen berufsbedingter Handekzeme lagen in diesen Berufen zwischen 5,8 – 6,6 Fällen pro 10.000 Beschäftigten – weit niedriger als in den Hautrisikoberufen an der Spitze (Friseure, Bäcker, Floristen mit Inzidenzen von 97, 33 bzw. 24 Fällen pro Jahr) (18). Hierbei ist zu berücksichtigen, dass gerade in diesen Berufen von multiplen Expositionen auszugehen ist, sodass Lösemittel bzw. generell lipophile Irritantien hier nicht die alleinigen Noxen für die Haut darstellen. Die vorhandenen Daten aus Deutschland weisen zumindest indirekt darauf hin, dass auch der berufliche Hautkontakt zu Lösemitteln einen Risikofaktor für die Entwicklung von Handekzemen darstellt.

Der Umstand, dass die betroffenen Berufszweige mit potentiellen Kontakten zu Lösemitteln oder anderen lipophilen Arbeitsstoffen häufig durch zusätzliche Co-Expositionen zu wasserlöslichen Hautirritantien gekennzeichnet sind, erschwert nicht nur epidemiologische Untersuchungen, sondern ist auch in experimentellen Studien nicht einfach zu berücksichtigen. Multiple Expositionen können zu Interaktionen von



Irritantien mit der Folge möglicher Irritationsaggravation führen. Anhand des Modells der sogenannten Tandem-Irritationstests (19), Übersicht bei (20), wurde dies bereits exemplarisch für Toluol bei gleichzeitiger Exposition zu Natriumlaurylsulfat (SLS) als wässrigem Irritans belegt (15). Für andere lipophile Irritantien wurde dieser Zusammenhang bisher nicht untersucht. Überhaupt wurde in humanen experimentellen Studien nur eine begrenzte Auswahl von Substanzen untersucht. Häufig wurde das aromatische Toluol verwendet (12, 13, 21, 22). Die möglichen reproduktionstoxischen Effekte von Toluol (EU-Einstufung: Repr.Cat.3; R63) lassen jedoch die uneingeschränkte Verwendung als Modellsubstanz fraglich erscheinen. Andere Autoren untersuchten Aceton (7, 23, 24), oder Glykolether (25-27), abgesehen von Propylenglykol, welches auch als Kontaktallergen gilt (Übersicht bei: (28). Bei Nonansäure ist zu berücksichtigen, dass es sich um eine Fettsäure handelt (29-35). Gründe für die nur begrenzte Anzahl der Untersuchungen am Menschen liegen in der Absorptionsfähigkeit der Haut für Lösemittel, die es notwendig macht, potentielle systemische toxikologische Effekte zu berücksichtigen, die in Abhängigkeit von Substanz, Kontaktfläche und Expositionsdauer (dosisabhängig) auftreten (36-38). Ferner ist die experimentelle Handhabung der bei Raumtemperatur flüchtigen und potentiell explosiven Lösemittel anspruchsvoll, da die Entwicklung von Dämpfen und deren Inhalation vermieden werden muss, und die Notwendigkeit einer standardisierten Applikation auf die Haut besteht. Untersuchungen zur Hautresorption und Hautirritabilität wurden mit Lösemitteln und deren Gemischen daher vielfach in Tiermodellen durchgeführt.

Als Bestandteile der PSA werden Hautschutzprodukte auch an Arbeitsplätzen mit Umgang mit lipophilen Arbeitsstoffen eingesetzt. Hautschutzmittel sollen vor und während der Arbeit auf die Haut aufgetragen werden und die Einwirkung von schwachen Irritantien auf die Hautbarriere vermindern. Sie können ferner die Hautreinigung erleichtern und damit dazu beitragen, unnötig aggressive Reinigungsprozeduren zu vermeiden (39, 40). (Die Problematik der beruflichen Hautreinigung wurde separat im Projekt „In vivo-Evaluierung von Hautreinigungsprodukten“, DGUV-Kennzeichen FP 276, bearbeitet). Hautschutzpräparate können tatsächlich im Arbeitsalltag eine irritationshemmende Wirkung entfalten. Jedoch wurde dieser Nachweis wissenschaftlich nur für



wasserlösliche Irritantien wie SLS und für Hautrisikoberufe mit Feuchtarbeit erbracht, und zwar sowohl in experimentellen Studien, als auch in einzelnen Feld- und Interventionsstudien (41, 42). Für fettlösliche Irritantien fehlen Wirksamkeitsnachweise aus in vivo Studien bisher. Zwar werden Wirksamkeitsnachweise von Herstellern auch in der Präventionsleitlinie Hautschutzmittel generell gefordert (4). Jedoch existieren keine gesetzlichen Vorgaben für spezifische Wirksamkeitsnachweise, weder für Produkte zum Schutz vor wasserlöslichen, noch vor lipophilen Irritantien, da es sich bei Hautschutzprodukten gemäß der EU-Kosmetikdirektive um Kosmetika handelt. Für diejenigen Hautschutzprodukte auf dem Markt, die von den Herstellern als geeignet zum Schutz vor fettlöslichen Arbeitsstoffen ausgelobt werden, werden positive Claims aus Ergebnissen unterschiedlicher in vitro- oder ex vivo-Verfahren, überwiegend mit Einzelexposition, abgeleitet (43, 44). Aus berufsdermatologischer Sicht sind die gängigen Verfahren vielfach als unzureichend zu bewerten, da sie keine Aussagen zur Wirksamkeit an der lebenden Haut zulassen. Der Arbeitsalltag ist durch repetitive Expositionen zu Irritantien gekennzeichnet, bei der es zu einer schleichenden Entwicklung subtoxisch-kumulativer Kontaktekzeme kommt. Diese natürlichen pathogenetischen Bedingungen an Arbeitsplätzen lassen sich weder durch in vitro-, ex vivo-Untersuchungen, noch durch Modelle mit einmaliger in vivo-Exposition an der humanen Haut imitieren. Berufsdermatologen haben sich daher für realitätsnähere in vivo-Studien an Probanden ausgesprochen, die naturgemäß einen höheren zeitlichen und finanziellen Aufwand für Hautschutzmittelhersteller erfordern (40). Unter den zu wissenschaftlichen Zwecken und nicht zum Claimsupport durchgeführten Studien mit repetitiver Exposition haben einzelne nicht nur Zweifel an einer Wirksamkeit gegen lipophile Irritantien aufkommen lassen, sondern sogar eine Tendenz zu einer bedenklichen Irritationsverstärkung erkennen lassen (8, 12).

Vor dem Hintergrund, dass Hautschutzpräparate als wirksam zum Schutz vor Lösungsmitteln vermarktet werden, ohne dass bisher standardisierte und realitätsnahe Wirksamkeits-Testmodelle existieren, die eine entsprechende Auslobung rechtfertigen und die eine nachvollziehbare Produktvergleichbarkeit für den Anwender ermöglichen, wurde ein Projektantrag gestellt, dessen berufsgenossenschaftliche Relevanz wesentlich auf den Inzidenzzahlen für beruflich bedingte Kontaktekzeme in den genannten Branchen gründet.



1.2 FORSCHUNGSZIELE

Das beantragte wissenschaftliche Forschungsprojekt hatte zum Ziel, in mehreren Projektschritten ein transferfähiges humanes in vivo-Modell für Wirksamkeitstestungen von Hautschutzpräparaten zu entwickeln, die zur Prävention von beruflichen Kontaktekzemen bei Hautkontakt zu lipophilen Irritantien eingesetzt werden.

Konkret beinhaltete dies zunächst auf dem Weg zur Modellentwicklung die Identifikation geeigneter, toxikologisch unbedenklicher Modellirritantien. Aufgrund der bisher nur eingeschränkten experimentellen Erfahrungen mit dieser Substanzgruppe sollten diese nachfolgend im Hinblick auf ihr Hautirritationspotential in vivo evaluiert werden, um unter den potentiell als geeignet bewerteten Substanzen diejenigen mit einem ausreichenden Hautirritationspotential zu identifizieren. In diesem Schritt war es erforderlich, sowohl das akute, als auch das kumulative Irritationspotential und dasjenige bei kombinierter Exposition zu wässrigen Irritantien an Probanden unter Einsatz nicht-invasiver hautphysiologischer Testmethoden zu quantifizieren. Nach Einengung der Auswahl der Modellirritantien war anschließend ein Humanmodell mit repetitiver Exposition zu den Substanzen für die Wirksamkeitstestung von Hautschutzprodukten zu entwickeln. Durch die repetitive Exposition kommt es zu einer allmählichen Entwicklung einer irritativen Hautschädigung, die damit die arbeitsplatzrealistische Entwicklung kumulativ-subtoxischer Kontaktekzeme experimentell nachahmen sollte. Als letzter Projektschritt nach dem Zwischenbericht beinhaltete der Projektantrag die optionale Modellvalidierung in einer Multicenterstudie unter Einbeziehung weiterer berufsdermatologischer Zentren in Deutschland.



2. ALLGEMEINE METHODEN UND PROJEKTABLAUF

An dieser Stelle wird die allgemeine Methodik des Projektes dargelegt. Spezielle Einzelheiten werden in den Abschnitten 3.1.ff behandelt. Dem Projektplan entsprechend waren folgende Schritte als Arbeitspakete vorgesehen:

1.	Identifikation möglicher Modellsubstanzen
2.	Evaluation des Irritationspotentials der Modellsubstanzen a) Planungsphase b) Durchführungsphase
3.	Entwicklung des Prüfverfahrens für Hautschutzmittel mit den evaluierten Modellsubstanzen a) Planungsphase c) Durchführungsphase
4.	Validierung des Prüfverfahrens für Hautschutzmittel in einer Multicenterstudie a) Planungsphase d) Durchführungsphase

Der erste Zwischenbericht zum Projekt wurde von den Forschungsnehmern im Dezember 2006, der zweite im Mai 2010 vorgelegt.

Insgesamt fanden zu dem Projekt 6 Forschungsbegleitkreistreffen statt.

Insgesamt wurden in den Projektschritten 2-4a 15 einzelne in vivo-Untersuchungen mit Ethikanträgen durchgeführt, in die 239 Probanden einbezogen wurden (Anhang I).

Die Identifikation geeigneter Modellsubstanzen (Projektschritt 1) erfolgte anhand einer Literaturrecherche, die durch das Institut für Arbeitsschutz der Deutschen Gesetzlichen Unfallversicherung, IFA, vertreten durch Herrn Dr. E. Nies und Frau Dr.



A. Möller, durchgeführt wurde. Die übrigen Projektschritte wurden an der Klinik für Hautkrankheiten des Universitätsklinikums Jena bearbeitet.

In thematischem Zusammenhang wurden über die im Projekt vorgesehenen Arbeitspakete hinaus aus projektunabhängigen Drittmitteln weitere Untersuchungen durchgeführt. Hierbei handelte es sich zum einen um Untersuchungen zur sensorischen Irritation im Rahmen einer Dissertation („Klinische Studie zur kutanen sensorischen Irritation durch die lipophilen Irritantien Cumol und Octan im kumulativen Irritationstest bei Probanden mit und ohne Stingingreaktion auf Milchsäure 5%“). Die Ergebnisse der Dissertation wurden zwischenzeitlich bereits publiziert (45, 46).

Die in den Projektabschnitten 2-4 durchgeführten Untersuchungen fanden an volljährigen, hautgesunden Probanden statt, die sich freiwillig zur Teilnahme bereit erklärten. Entsprechend der Deklaration von Helsinki wurden die Probanden zuvor mündlich und schriftlich über die Studien aufgeklärt und unterzeichneten eine schriftliche Einverständniserklärung. Schwangere und Stillende waren von den Untersuchungen ausgeschlossen. Alle Einzelversuche wurden vorab in Form eines Studienprotokolls sowie der dazugehörigen Dokumente der lokalen Ethikkommission des Universitätsklinikums Jena vorgelegt und durch diese jeweils genehmigt. Die nach Applikation auf die Haut induzierten irritativen Reaktionen wurden täglich klinisch durch einen Arzt und mittels hautphysiologischer Methoden beurteilt. Nach Abschluss der Untersuchung erhielten die Probanden eine zuvor festgelegte Aufwandsentschädigung. Eine erneute Teilnahme war einzelnen Probanden nach frühestens 6 Wochen gestattet.

Die hautphysiologischen Messungen im Forschungsprojekt wurden gemäß den gängigen Qualitätsstandards unter Beachtung der in den einschlägigen Guidelines genannten Bedingungen durchgeführt (47-50). Die Messungen fanden nach mindestens 20 minütiger Akklimatisation an die standardisierten Klimabedingungen des Messlabors (21 \pm 1 Grad C, RLF 45% \pm 5) unter ungestörten Bedingungen statt und wurden innerhalb einer Versuchsserie stets von demselben Untersucher durchgeführt. Die Einhaltung der Klimabedingungen wurde mittels Datenlogger



kontinuierlich dokumentiert. Hautphysiologische Geräte wurden den Erfordernissen und Gerätevorschriften entsprechend regelmäßig kalibriert. Die Messergebnisse wurden digital im PC erfasst und zur zusätzlichen Sicherung ausgedruckt. Im Fall der klinischen Bewertungen erfolgte die Erfassung stets manuell auf Papierbögen. Die weitere statistische Auswertung erfolgte unter Verwendung von gängiger Auswertungssoftware wie Excel und SPSS Version 16.0.

Bei den in vivo-Untersuchungen in den Projektabschnitten 2-4 hatte die Sicherheit von Probanden und Personal oberste Priorität. Zur Vermeidung intensiver irritativer Hautreaktionen wurden klinische Abbruchkriterien entwickelt (s.d.), die es ermöglichten, eine Exposition einzelner Hautareale jederzeit vorzeitig zu beenden. Unter intensiven Hautreaktionen waren Erosionen, Krustenbildung sowie nachfolgende Narbenbildung zu verstehen. Postinflammatorische Hyperpigmentierungen können nach Hautirritationen auftreten und mehrere Wochen andauern, bevor sie spontan abblassen. Über die Möglichkeit derartiger Pigmentverschiebungen wurden die Probanden ausdrücklich aufgeklärt. Eine Narbenbildung oder eine bleibende Pigmentverschiebung am Testareal wurde bei keinem der Probanden beobachtet. Ferner stand es den Probanden frei, die Teilnahme jederzeit ohne Angabe von Gründen vorzeitig zu beenden. Dies war vereinzelt aufgrund von sensorischer Irritation (Brennen) während der Applikation der Irritantien der Fall. Eine inhalative Exposition gegenüber Lösemitteldämpfen während der Applikation und Durchführung wurde durch Anwendung einer geeigneten mobilen Absaugung (Terfu-Punktabsauger Fumex®, Skelleftea, Schweden) mit austauschbarem Aktivkohlefilter verhindert (L50®, Asecos GmbH, Gründau).

3. ERGEBNISSE

3.1. Arbeitspaket 1

Potentiell geeignete Substanzen wurden anhand einer Literaturrecherche begutachtet. Insgesamt wurden in den Begutachtungsprozess 35 Substanzen einbezogen. Alle Substanzen kommen in der Arbeitswelt als potentielle Kontaktstoffe vor. Folgende Substanzgruppen wurden berücksichtigt: Alkane (3), Alkylbenzole (5),



Ketone (2), Fettsäuren (2), Glykolether (21) sowie sonstige Substanzen (2). Es wurde abschließend ein 74seitiges Gutachten verfasst, das Bestandteil des Zwischenberichts war und der DGUV vorliegt.

Die Evaluierung der Substanzen erfolgte analog der im Antrag formulierten Anforderungen an ein lipophiles Modellirritans. Die Voraussetzungen für eine mögliche positive Bewertung beinhalteten, dass die Substanz keine relevante systemische Toxizität, keine Kanzerogenität, kein nennenswertes Sensibilisierungspotential und keine Korrosivität aufweisen durfte und nicht hautverfärbend war. Ferner musste es sich um eine chemisch definierte, bei Raumtemperatur flüssige oder feste Substanz handeln. Die Bewertung der Substanzen stand dabei unter der Prämisse einer mehrfachen (repetitiven) Anwendung auf einzelnen umschriebenen Testfeldern der Rückenhaut von hautgesunden Probanden.

Abschließend wurden die nachfolgend aufgezählten Substanzen für humane in vivo-Versuche auf umschriebenen Hautarealen als potentiell geeignet bewertet und für weitere Untersuchungen vorgeschlagen. Bei den Aromaten (Alkyl-Benzole) wurde darauf geachtet, dass Ersatzsubstanzen für Toluol aufgrund möglicher reproduktionstoxischer Effekte einbezogen wurden, die Toluol nicht mehr als uneingeschränkt geeignet erscheinen lassen als Modellsubstanz. Neben Toluol (CAS-Nr. 108-88-3), welches als Vergleichssubstanz in die Testungen zumindest am Anfang in die Modellentwicklung einbezogen werden sollte, wurden Cumol (Isopropylbenzol, CAS-Nr. 89-82-8) sowie das stofflich verwandte p-Isopropyltoluol (p-Cymol, CAS-Nr. 99-87-6) positiv bewertet, ferner Xylol (CAS-Nr. 1330-20-7). Unter den aliphatischen Kohlenwasserstoffen (Alkanen) wurden Octan (CAS-Nr. 111-65-9) und Nonan (CAS-Nr. 111-84-2) vorgeschlagen, ferner das Keton Aceton (CAS-Nr. 67-64-1), sowie zwei Glykolether, 1-Methoxypropanol-2 (syn. 2-Propylenglykol-1-methylether, CAS-Nr. 107-98-2, Glykolether *basierend auf Propylenglykol*) und Diethylenglykolmonobutylether (DEGBE, CAS-Nr. 112-34-5, Glykolether *basierend auf Ethylenglykol*). Als Fettsäure wurde n-Nonansäure (Pelargonsäure, CAS-Nr. 112-05-0) positiv bewertet. Für die Untersuchungen wurde ein besonders hoher Reinheitsgrad der Chemikalien gefordert, um Verunreinigungen mit anderen



Isomeren auszuschließen. Für Octan und Nonan wurde ferner gefordert, nur unverzweigte (n-)-Verbindungen einzusetzen.

In die nachfolgenden Projektschritte wurden die genannten Substanzen in die in vivo-Untersuchungen bis auf p-Cymol einbezogen. Letztgenannte Substanz wurde aufgrund der strukturell engen Verwandtschaft zu Cumol und der besseren Datenlage zur Toxizität von Cumol bisher nicht berücksichtigt.

3.2. Arbeitspaket 2

Von den in Projektschritt 1 positiv bewerteten Substanzen wurden Cumol, Xylol, Octan, Nonan, und die beiden Glykolether zuvor noch nicht systematisch in humanen in vivo Studien verwendet. Im folgenden Projektschritt wurde das Irritationspotential der Substanzen zunächst schrittweise evaluiert.

Zunächst erfolgten **Untersuchungen zum akuten Irritationspotential der Substanzen in vivo** (Einzelversuche 1 und 2, s. Anhang).

Methoden

Die hier angeführten Materialien und Methoden wurden in allen nachfolgenden Projektschritten, sofern nicht anders angegeben, verwendet und werden anschließend im Einzelnen nicht redundant aufgeführt. Folgende Chemikalien und Konzentrationen wurden verwendet:

1. Natrium Dodecyl Sulfat (SLS) ultrarein (> 99%), Carl Roth GmbH, 5% in Aqua dest.
2. n-Nonan N 95%, Carl Roth GmbH, Deutschland, unverdünnt
3. n-Octan (99,2%), VWR, Deutschland, unverdünnt
4. Pelargonsäure reinst (> 95%), Sigma Chemie, Deutschland, unverdünnt
5. Toluol (99,5%), Carl Roth GmbH, Deutschland, unverdünnt
6. Aceton (99,8%), Carl Roth GmbH, Deutschland, unverdünnt
7. Cumol 99%, Merck Chemie, Deutschland, unverdünnt
8. p-Xylol, Merck Chemie, Deutschland, unverdünnt



9. DEGBE Diethylenglykol- monobuthylether (>99,0%), Fluka Chemie, Deutschland, unverdünnt
10. 1-Methoxy-2-propanol (>99,0%), Carl Roth GmbH, Deutschland, unverdünnt

Folgende hautphysiologische Geräte wurden verwendet:

i. TEWL

Tewameter MPA9/TM 300 (Fa. Courage & Khazaka, Köln) in gm²/h, Zweifachmessung, Verwendung des arithmetischen Mittelwertes für Endberechnungen

ii. Corneometrie

MPA9/Corneometer® CM 825 (Fa. Courage & Khazaka) in arbiträren Einheiten, Dreifach-Messung, Verwendung des arithmetischen Mittelwertes für Endberechnungen

iii. Chromametrie

Chromameter® CR 300 (Konica Minolta, Japan) in arbiträren Einheiten, Dreifach-Messung, Verwendung des arithmetischen Mittelwertes für Endberechnungen

iv. Laser Doppler Imaging (LDI)

Moor LDI Mk1 (Moor Instruments, Millwey Axminster, GB), als arbiträre Flow Einheiten (Flux), Software Moor LDI V2.3 Research (Lawrenz Medizin-Elektronik Vertriebs GmbH, Sulzbach/Taunus)

Folgender klinischer Irritationsscore wurde verwendet:

Visueller Score

- Für akute Irritation (51)

Erythem: 0 = keine Rötung
1 = leichte Rötung, punktförmig und/oder diffus
2 = moderate, gleichmäßige Rötung
3 = intensive Rötung
4 = feurig rot



- Trockenheit: 0 = keine Schuppung
1 = leicht rau, leicht unregelmäßiges Hautrelief
2 = mäßig rau, etwas schuppig, leicht faltig
3 = deutliche Schuppung, tastbare Faltenbildung
4 = starke Schuppung, intensive Faltenbildung

Das akute Irritationspotential wurde an der Unterarmhaut von insgesamt 2x 20 hautgesunden Probanden geprüft (Einzelversuche 1-2, s. Anhang). Im ersten Kollektiv wurden Toluol, Aceton, Octan, Nonan, und Nonansäure im Vergleich zu einer 5%igen wässrigen Natriumlaurylsulfat-Lösung (SLS) als Standard getestet. Im zweiten Kollektiv wurden im gleichen Versuchsaufbau Xylol, Cumol, DEGBE und 2-Methoxypropanol im Vergleich zu SLS untersucht. Hierzu wurden jeweils 6ml der Substanzen einmalig in offenen Glasringen unter einem Abzug für zunächst 10 Sekunden (Fraktion verworfen, zur Entfernung von Oberflächenlipiden) und anschließend für jeweils 10 Minuten offen auf die Unterarmhaut appliziert und dann der Überstand wieder abpipettiert (Abb. 1). Im Falle von Toluol wurde die Applikationsdauer aufgrund von lokaler Missempfindungen (Brennen) bei den Probanden auf 5 Minuten begrenzt. Vor und nach der Exposition (vor, nach 1h, 24 und 48h) wurden die Hautfeuchtigkeit (Corneometrie) und der TEWL (transepidermaler Wasserverlust) gemessen. Ferner wurde eine visuelle Beurteilung (Global Irritation Score) durchgeführt. Der Überstand der Lösungsmittel bei - 20 Grad C eingefroren und später einer Analyse der darin gelösten wesentlichen Hautgruppen von epidermalen Lipide (freie Fettsäuren, Cholesterol, Ceramide) mittels High-Performance Dünnschichtchromatografie zugeleitet (in Kooperation mit dem Institut für Pharmazie in Halle, Prof. Dr. Neubert, Universität Halle).

Ergebnisse

In Bezug auf die subjektiven Symptome verursachte Toluol die deutlichste Akut-Reaktion mit schmerzhaftem Brennen über das Applikationsareal hinaus und deutlichem Erythem, gefolgt von Xylol und Cumol. Xylol induzierte etwas schwächere Reaktionen. Nach Cumol zeigten sich deutliche Stinging-Reaktionen und schwächeres Brennen mit wenig Erythem, wobei die Intensität von den Probanden unterschiedlich empfunden wurde. Ferner wurde ein sogenanntes „Whitening“ (52) beobachtet. Hierunter versteht man eine weißliche Verfärbung der Hautoberfläche,



die unmittelbar nach Verdampfen von der Lösemittel von der Hautoberfläche auftritt. Diese Reaktionen traten bei den Aromaten unmittelbar während und nach der Applikation auf und klangen nach ca. 1h ab. Octan induzierte gelegentlich schwaches Brennen und Erytheme. Vereinzelt wurde nach 24h ein Erythem und Ödem beobachtet (53). Nach Aceton-Exposition trat ausschließlich ein deutliches Whitening auf, begleitet von einem „Kältegefühl“. Keine subjektiven und klinischen Reaktionen wurden nach Nonan, Nonansäure (Pelargonsäure), DEGBE und 2-Methoxypropanol (für letztere 2 Substanzen: vereinzelt Whitening) verzeichnet.

In Bezug auf die Abnahme der Stratum corneum-Hydratation verursachten alle Substanzen eine nachweisliche Hauttrockenheit nach einer Stunde, die geringer ausgeprägt war als für das Referenzensid SLS. Dies traf insbesondere für Xylol, 2-Methoxypropanol, und Aceton und Cumol zu, gefolgt von Toluol, Octan, Nonan und Nonansäure, mit reiner deutlichen Reduktion der Corneometer-Werte nach 1 h. Noch nach 24 h waren stärkere Differenzen zum Ausgangswert bei SLS und geringfügigere Differenzen bei Cumol und 2-Methoxypropanol nachweisbar, während sich die Werte für die anderen Substanzen wieder nahezu dem Ausgangswert angeglichen hatten.

In Bezug auf den TEWL wurden keine signifikanten Änderungen zu den Ausgangswerten registriert.

Die durch die Lösungsmittel im Überstand gelösten Hautlipide wurden untersucht, wobei für alle Lösungsmittel eine in etwa gleichartige Lösungsvermögen für freie Fettsäuren und Cholesterol festgestellt wurde. In Bezug auf die für die Barrierefunktion wichtigen Ceramide wies Aceton das größte Lipidextraktionspotential auf (Abb. 2).

Zusätzlich wurden an einem kleinen Probandenkollektiv $n = 5$ **Untersuchungen zur Kinetik des sogenannten „Whitenings“** durchgeführt (Einzelversuch 7, s. Anhang).

Methoden

Zur Dokumentation des Verlaufes des Whitenings sowie des Erythems und der Mikrodurchblutung nach Irritantienapplikation wurden nach Akklimatisation des Probanden am Unterarm Aceton, Octan und Cumol in der nachfolgend für die



Einzelversuche 3-4 (Untersuchungen zur Evaluation des kumulativen Irritations-Potentials im repetitiven offenen und okklusiven Irritationstest) beschriebenen Weise jeweils einmalig okklusiv für 15 (Aceton, Octan) bzw. 10 Minuten (Cumol) appliziert. Nach Entfernung der Testpflaster verblieb das Testfeld offen in der Raumluft. Die Reaktionen wurden vor Applikation und zu den Zeitpunkten t5 (nach 5 Minuten), t10, t15, t30 und tx (Zeitpunkt des Abklingens des Whitening) Minuten sowie nach 24 h (außer bei Aceton) fotografisch, mittels LDI (flux), sowie Chromametrie (a*- und L-Werte) dokumentiert.

Ergebnisse

Es zeigte sich, dass das Phänomen des Whitening nach etwa 30 Minuten bei den Probanden spontan abklang, ohne dass die Testfelder berührt worden waren. Während die Acetonapplikation ausschließlich ein Whitening erzeugte (Abb. 3), führte Octan sowohl zu einem Whitening, als auch zu einem lebhaften Erythem als Ausdruck einer gesteigerten kutanen Perfusion. Es konnte gezeigt werden, dass die beschriebene vorübergehende Abblassung nicht durch Änderungen der kutanen Mikrodurchblutung, etwa einer Abnahme derselben, hervorgerufen wird. Vielmehr zeigten die Fluxmessungen mit dem LDI, dass sich die kutane Mikrodurchblutung unmittelbar nach Entfernung der Octan- und Cumolpflaster, nicht jedoch nach Aceton, zeitgleich zunächst deutlich steigerte war und dann stetig wieder abnahm. 30 Minuten nach Abnahme der Pflaster waren die Ausgangswerte nahezu wieder erreicht. Aceton induzierte nahezu keinen Fluxanstieg. Nach 24h lagen die Fluxwerte bei Cumol wieder im Ausgangsbereich, während bei Octan ein erneuter Anstieg verzeichnet wurde, so wie es auch in den anderen Untersuchungen in den Projektphasen beobachtet wurde, (biphasischer Erythemverlauf bei Octan) wieder leicht angestiegen waren (Abb. 4). Die Chroma-a*-Werte zur Erythemquantifizierung zeigten einen ähnlichen Verlauf. Es handelt sich daher beim Whitening wahrscheinlich um ein optisches Phänomen, welches durch eine flüchtige Änderung der Lichtbrechung, hervorgerufen durch eine starke Austrocknung und Strukturänderung des normalerweise korbgeflechtartig konfigurierten Stratum corneums, verursacht wird. Eine Restitution tritt nach Kontakt zur Umgebungsluftfeuchtigkeit innerhalb von 30 Minuten ein. Die bekannte Fähigkeit der Substanzen zur Lipidextraktion scheint hingegen für dieses optische Phänomen eher



eine untergeordnete Rolle zu spielen (52), da hierdurch die beobachtete spontane Restitution innerhalb von 30 Minuten nicht zu erklären ist.

Untersuchungen zur Evaluation des kumulativen Irritations-Potentials im repetitiven offenen und okklusiven Irritationstest (Einzelversuche 3-4, s. Anhang).

Methoden

Es wurden die Substanzen Cumol, Toluol, Octan, Nonan, 2-Methoxypropanol und DEGBE im Vergleich zum Positiv- bzw. Negativstandard (SLS und Aqua dest.) in einem permutierenden Randomisierungsschema an der rechten bzw. linken paravertebralen Rückenhaul (jeweils 4 pro Reihe, d.h. je 2 paravertebral) von 20 Probanden getestet. Die Applikationen erfolgten 2xtgl. für jeweils 10 Minuten im Abstand von 3 +/- 1h an 11 Tagen, mit Abschlussmessungen an Tag 12 und mit Pause am Wochenende und somit maximal 18 Einzelapplikationen. Aufgrund der Vielzahl der Applikationen und der Aufwändigkeit der Messungen konnten jeweils maximal 6 Probanden in einem Durchgang à 2 Kalenderwochen getestet werden.

Die Substanzen wurden im Falle der offenen Applikation auf Filterplättchen mit 18 mm Durchmesser in einer Menge von 240µl Mikrolitern mittels einer geeichten Eppendorfpipette aufgebracht. Aufgrund des unterschiedlichen Dampfdruckes bei Körpertemperatur war ein Nachpipettieren in unterschiedlichem Ausmaß erforderlich (Octan und Toluol zweimal, alle anderen 1x pro 10 Minuten). Im Falle der okklusiven Applikation wurden entsprechende Mengen der Substanzen auf der kontralateralen Rückenseite auf Filterpapierscheiben unter großen Finnkammern appliziert, die ihrerseits durch Deckpflaster fixiert wurden (Abb 5). Der visuelle Score (s.u.) wurde täglich vor der ersten Applikation erhoben. An den Tagen Montag, Mittwoch und Freitag erfolgten ferner hautphysiologische Messungen: Hautfeuchtigkeit (Corneometrie), TEWL und Chromametrie.

An den Tagen 5 und 12 wurde ferner die Mikrodurchblutung mittels Laser Doppler Imaging (LDI) gemessen.

Sofern ein Einzelkriterium eines Testfeldes im klinischen Score den Wert 3 erreichte, wurden die Applikationen vorzeitig beendet und die Abschlussmessungen



durchgeführt, die nachfolgend für das betreffende Feld fortgetragen wurden („last value carried forward“). Die Abbrüche wurden gezählt und gingen ebenfalls in die Endbewertung ein.

Es wurden folgende Testkammern für die okklusive Applikation verwendet:

FinnChambers® extra large (Epitest Ltd Oy, Tuusula, Finnland, Innendurchmesser 18 mm) mit zugehörigen Filterpapierscheiben, diese mit einem Volumen von 240 Mikrolitern der unverdünnten Irritantien befüllten Kammern wurden mit einem Deckpflaster (Fixomull stretch®, BSN medical GmbH, Hamburg) während der Applikationszeit fixiert.

Es wurde der folgende klinische Irritationsscore für kumulative Irritation verwendet:

ESCD Score für kumulative Irritation (50)

Erythem

0	kein
0,5	sehr schwach/fraglich
1	schwach, fleckförmig oder diffus
2	mäßig
3	deutlich

Trockenheit/Oberfläche

0	keine Reaktion
0,5	glänzende Oberfläche
1	leichte Rauigkeit/Trockenheit und/oder Texturveränderung
2	mäßige Rauigkeit/Trockenheit
3	deutliche Rauigkeit/Trockenheit

Schuppung

0	keine
1	angedeutet/leicht
2	mäßig
3	deutlich, große Schuppen

Ödem

0	kein
---	------



	1	angedeutet/leicht
	2	mäßig
	3	deutlich
Fissuren	0	keine
	1	feine/angedeutete
	2	breite
	3	deutliche Fissurenbildung mit Hämorrhagie und/oder Exsudation

Die Punktwerte werden addiert und bilden den Summenscore.

Klinisches Abbruchkriterium: Sofern ein Einzelkriterium eines Testfeldes im klinischen Score den Wert 3 erreichte, wurden die Applikationen nur in dem betroffenen Feld vorzeitig beendet und die Abschlussmessungen durchgeführt. Die letzten Werte wurden nachfolgend für das betreffende Feld fortgetragen („last value carried forward“) mit Ausnahme der Versuche 9 und 11 (hier Berechnung von „missing values“). Die Abbrüche werden gezählt und gingen ebenfalls in die Endbewertung ein.

Ergebnisse

Insbesondere Cumol, aber auch Octan induzierte bei der Mehrzahl der Probanden während der Applikation unangenehmes Brennen und Juckreiz, bei okklusiver Applikation deutlicher als bei offener, welches am Ende der Applikationszeit von einem über das Areal hinausreichenden Erythem begleitet war (Abb. 6). Die akuten subjektiven Missempfindungen waren interindividuell deutlichen Unterschieden unterworfen. Eine ursprünglich angestrebte Applikationsdauer von 15 Minuten erwies sich als nicht tolerabel, da für ca. 30% der Probanden die Missempfindungen nach 10 Minuten zunahmen und als unangenehm empfunden wurden. In geringerem Ausmaß induzierten auch Toluol und Nonan ähnliche Missempfindungen, während die Glykolether keine Akutwirkungen erkennen ließen. Die akuten Reaktionen klangen innerhalb der nachfolgenden 30 bis 60 Minuten vollständig ab und waren anschließend, je nach Empfindlichkeit und Applikationshäufigkeit, von klinischen Zeichen der kumulativen Irritation wie auf das Testareal begrenztes Erythem,



Trockenheit und nachfolgend Schuppung gekennzeichnet. Bei Octan war der Erythemverlauf typischerweise biphasisch (s. Ergebnisse zu Einzelversuch 7).

Bezüglich der kumulativen Irritationswirkung zeigte Octan das deutlichste Irritationspotential, gefolgt von Nonan, sowohl bei offener als auch bei geschlossener Applikation, mit interindividuellen Unterschieden in der Empfindlichkeit. Bei der offenen Anwendung gab es deutlich weniger Unterschiede zwischen den Substanzen als bei der geschlossenen Anwendung. Octan und Nonan waren auch am stärksten Erythem-induzierend. Auch konnte bei diesen beiden Substanzen vereinzelt eine Ödembildung beobachtet werden. Octan und Nonan führten beide zu einer auch corneometrisch quantifizierbaren Hautaustrocknung, die über derjenigen von SLS lag, was sowohl aus den Ergebnissen des klinischen Scores (Abb. 7) als auch aus den Ergebnissen der Corneometrie (Abb. 8) hervorging. Einzelne vorzeitige Abbrüche der Irritation waren vornehmlich bei Octan, gefolgt von SLS, notwendig. Cumol und Toluol trockneten ähnlich stark aus wie SLS. Im Summenscore (Abb. 9) war zu erkennen, dass Octan und Nonan deutlich stärker irritieren als SLS und die beiden Aromaten. Die Ergebnisse der Chromametrie (a^* -Werte) korrelierten mit denjenigen des isolierten Erythemscores als Bestandteil des kumulativen Irritationsscores. Bei den TEWL-Messungen zeigten sich bei offener Applikation keine nennenswerten Veränderungen. Bei geschlossener Applikation wurden nur für Octan und Nonan an Tag 12 geringfügige Anstiege ggü. den Ausgangswerten verzeichnet, die allerdings von SLS deutlich übertroffen wurden. Die beiden Glykolether zeigten bis auf eine leichte Austrocknung keine Irritationswirkung.

Deshalb wurde bei 8 weiteren Probanden nur mit den beiden Glykolethern noch ein ebensolcher orientierender okklusiver Irritationstest mit einer 2x tgl. 30 minütigen Applikationsdauer durchgeführt. Dieser hatte das Ziel zu prüfen, ob sich unter verlängerten Expositionszeiten nur für diese beiden Substanzen eine geeignete Irritationswirkung induzieren lässt. Auch nach dieser verlängerten Applikationszeit kam es nur zu Austrocknung, die klinisch von einem Whitening unmittelbar nach Applikationsende und corneometrisch in einer leichten und stetigen Abnahme der Hydratationswerte (AU) des Stratum corneum zeigten (Abb. 10). Die beiden



Glykolether wurden daraufhin als nicht ausreichend irritierend bewertet und von weiteren Versuchen ausgeschlossen.

Basierend auf der Beobachtung, dass die Lösungsmittel neben Veränderungen im Summenscore vornehmlich zu einer Abnahme der Stratum corneum-Hydratation führen, wurde die Hypothese aufgestellt, dass die Austrocknung möglicherweise der entscheidende Faktor sein könnte, der die Haut bei Co-Exposition zu wässrigen Irritantien besonders für deren Irritationswirkung empfindlich macht. Um dies zu untersuchen, wurde ein zusätzlicher Pilotversuch unternommen, in welchem bei 11 Probanden in bekannter Weise über 5 Tage 2x tgl. 10 Minuten okklusiv ggü. Octan, Nonan, Cumol und Toluol im Vergleich zu Aqua als Negativkontrolle exponiert wurden, gefolgt von einer einmaligen Applikation von 0,2% SLS an Tag 8 auf diesen Feldern für 21h (Einzelversuch 5, s. Anhang). 3h nach Pflasterabnahme erfolgten Bewertung und Messungen. Hierbei zeigte sich jedoch im Vergleich zum nur mit Aqua vorbehandelten Feld auf den mit Lösungsmitteln vorirritierten Feldern nicht ein stärkerer, sondern schwächerer Irritationseffekt, sowohl anhand des Summenscores, als auch anhand der Corneometer-Werte. Der Versuch wurde daraufhin nicht an einer größeren Probandenanzahl fortgeführt. Die eingangs gestellte Vermutung ließ sich in dem gewählten Design dieses Pilotversuchs somit nicht bestätigen.

Die offene Applikation erbrachte eine weniger gute Diskrimination der Substanzen wegen nur geringer Irritationseffekte. Sie erwies sich auch als wenig standardisierbar aufgrund des durch den unterschiedlichen Dampfdruck und die leicht variable Hautoberflächentemperatur unterschiedlichen Verdampfungsverhaltens der verschiedenen Substanzen. Die Methode der repetitiven offenen Applikation wurde daher für die weitere Methodenentwicklung verlassen (Ausnahme Einzelversuche 13 und 14). Zu beobachten war ferner, dass es durch die „Wochenendpause“ im Modell an Tag 8 im Vergleich zu Tag 5 zu einem vorübergehenden Abfall der Parameter kam, da die bereits induzierte kumulative Irritation teilweise wieder abklang. Da eine nicht-kontinuierliche Irritationsentwicklung weniger günstig für die Beurteilung der Schutzwirkung von Externa war, wurde fortan eine Modifikation des Modells dahingehend vorgenommen, dass die Applikationen nunmehr durchgängig an 11 Tagen erfolgten. Des Weiteren wurde die Modellentwicklung auf Wunsch des



Forschungsbegleitkreises auf Octan und Cumol als Standardirritantien fokussiert, da für das Projekt ausschließlich rein lipophile Substanzen (organische Lösungsmittel) gewünscht wurden. Demgegenüber wurden amphiphile Substanzen wie Aceton, oder die Carbonsäure Pelargonsäure nicht favorisiert, sondern allenfalls als Vergleichssubstanzen in der Modellentwicklung empfohlen. Für Toluol galt, dass es nur zu Vergleichszwecken noch in einigen Untersuchungen verwendet werden sollte, aufgrund der eingangs erwähnten EU-Einstufung der Substanz.

Es folgte im Rahmen der Modelloptimierung ein ausschließlich **okklusiver repetitiver Irritationstest über 11 Tage ohne Unterbrechung** (Einzelversuch 6, s. Anhang)

Methoden

Es wurden die Substanzen Octan und Cumol, sowie Aceton im Vergleich zu SLS und Aqua in beschriebener Weise verwendet (n = 20). Zusätzlich wurde im Sinne eines Pilotversuches exemplarisch ein für den Schutz vor Lösungsmitteln ausgelobtes Hautschutzprodukt eines bekannten Herstellers (willkürliche Auswahl durch die Projektnehmer) in einem Volumen von 0,05 ml pro Testfeld für 10 Minuten vor der anschließenden Irritation auf zusätzlichen Testarealen offen appliziert und einwirken lassen.

Ergebnisse

Im Wesentlichen wurden die Ergebnisse des vorangehenden Versuches in Bezug auf das Irritationsranking der Lösungsmittel reproduziert. Die kumulative Irritationswirkung von Cumol war erneut deutlich geringer als diejenige von Octan. Es wurde das Ziel eines kontinuierlicheren Anstieges der Parameter erreicht (Abb.11). Bezüglich des verwendeten Hautschutzproduktes zeichnete sich kein Nachweis einer Schutzwirkung ab. Vielmehr kam es zu einer verstärkten Irritationswirkung sowohl für Octan als auch für Cumol. Die Probanden klagten auf den vorbehandelten Feldern bereits während der Applikation über verstärkte Missempfindungen, was mit einer vergleichsweise deutlicheren Ausprägung des Soforterythems korrelierte. Auch die kumulative Irritationswirkung war auf den vorbehandelten Lösungsmittelfeldern deutlicher ausgeprägt als auf den ausschließlich irritierten Vergleichsfeldern. Es waren daher vermehrt vorzeitige Abbrüche im Vergleich zu den „ungeschützten“



Feldern erforderlich. Als mögliche künftige Zielparameter wurden in erster Linie der klinische Summenscore und die Hornschichthydratation in der Corneometrie diskutiert. Der TEWL wurde hingegen bereits als ungeeignet bewertet. Es zeigte sich erstmals, dass Hautschutzmittel die Irritationswirkung auch verstärken können.

Um das kumulative Irritationspotential einer alternierenden Exposition zu lipophilen und hydrophilen Irritantien mit derjenigen einer jeweils ausschließlichen Exposition zu den einzelnen Irritantien zu vergleichen, wurde ein verkürzter **repetitiver okklusiver Tandem-Irritationstest mit den lipophilen Standardirritantien Octan bzw. Cumol und SLS** durchgeführt (Einzelversuch 12, s. Anhang).

Methoden

In einem okklusiven repetitiven Tandem-Irritationstest (19) wurden die Substanzen Cumol (C) und Octan (O) entweder ausschließlich jeweils 2x täglich oder alternierend mit SLS (SLS vor-, C/O nachmittags) in einem permutierenden Randomisierungsschema an der paravertebralen Rückenhaut von 29 Probanden getestet. Die Ergebnisse wurden mit denjenigen von ausschließlich 2x täglich mit SLS bzw. mit C/O irritierten Testfeldern verglichen. Ein mit Aqua dest. behandeltes Testfeld diente als Negativkontrolle (K). Hieraus resultierten auf 6 Testarealen folgende Behandlungen: SLS/SLS, C/C, O/O, SLS/C, SLS/O, K/K. Die Applikationen erfolgten 2xtgl. für jeweils 10 Minuten, im Abstand von 3 +/- 1h, an 4 aufeinanderfolgenden Tagen, sodass daraus 8 Einzelapplikationen resultierten. Nach Entfernung der Testkammern wurden die Testareale wie üblich offen gelassen und von Kleidung bedeckt. Die kumulative Irritation wurde an den Tagen 1-4 vor der ersten Irritation und an Tag 5 mit den genannten hautphysiologischen Standardparametern und dem o.g. klinischen Irritationsscore quantifiziert. Die statistische Auswertung erfolgte mit SPSS Version 16.0 unter Verwendung des nicht-parametrischen Friedman- bzw. Wilcoxon Tests. Aufgrund multipler Paarvergleiche erfolgte eine Alphaadjustierung nach Holm-Bonferroni.

Ergebnisse:

Die Datensätze von 27 Probanden gelangten zur Auswertung. In Bezug auf die chromametrisch bestimmte Hautrötung und den visuellen Summenscore induzierten



an Tag 5 die Behandlungskombinationen SLS/O die ausgeprägtesten Effekte, vor O/O (Unterschied n.s.) (Abb. 12 und 13). Das allein mit SLS/SLS behandelte Areal zeigte in diesen Parametern an Tag 5 einen geringeren Irritationsgrad als die Behandlungen SLS/O ($p < 0,05$) und als O/O (n.s.).

Ebenso fielen an Tag 5 die klinisch erfasste Irritation und die Hautrötung auf dem alternierend behandelten Feld mit SLS/C deutlicher aus als bei C/C ($p < 0,05$). Im Vergleich zum allein mit SLS/SLS behandelten Areal fielen die klinisch erfasste Irritation und die Hautrötung bei der alternierende Exposition mit SLS/C ebenfalls, analog zu Octan, deutlicher aus, hier war der Unterschied allerdings n.s.. Die wechselnde Exposition zu SLS/O und diejenige zu SLS/C induzierte somit an Tag 5 jeweils eine stärkergradige klinische Irritation, als die jeweiligen Irritantien allein, wenn auch die Unterschiede nicht immer signifikant waren.

In Bezug auf die Stratum-corneum Hydratation führten an Tag 5 ebenfalls die alternierenden Expositionen zu den Lösungsmitteln und SLS (SLS/O bzw. SLS/C) zu deutlich stärkeren Abnahmen der Hautfeuchtigkeit als die Exposition zu den jeweiligen Substanzen allein (Abb. 14). Die Unterschiede zwischen SLS/O vs. O/O bzw. SLS/C vs. C/C erreichten dabei auch nach Alpha-Adjustierung Signifikanzniveau. Anders verhielt es sich mit dem TEWL (Abb 15). Hier führte die Exposition zu SLS/SLS an Tag 5 zu der deutlichsten Zunahme im Sinne einer Barrierestörung. Die jeweilige alternierende Exposition SLS/O bzw. SLS/C induzierte zwar ebenfalls eine deutliche, aber signifikant geringer ausgeprägte Barrierestörung als SLS/SLS. Die alleinige Exposition zu den lipophilen Irritantien (O/O bzw. C/C) induzierte an Tag 5 im Vergleich zum Ausgangswert zwar einen sehr geringen, aber dennoch statistisch signifikanten Anstieg des TEWL. Allerdings war im Vergleich zum Ausgangswert auch bei der Negativkontrolle ein geringer, aber signifikanter Anstieg über die Zeit zu verzeichnen.

Die Ergebnisse bestätigten damit teilweise diejenigen einer ähnlichen Studie mit alternierender Exposition zu Toluol und SLS im Vergleich zu SLS bzw. Toluol allein (15). Anders als bei der zitierten Studie wurde im aktuellen Versuch aber keine überadditive Barrierestörung mittels TEWL durch alternierende Exposition zu den hier untersuchten Lösungsmitteln und SLS nachgewiesen. Unterschiede können einerseits durch substanzspezifische Eigenschaften hervorgerufen werden.



Andererseits sind methodische Unterschiede (Rücken vs. Unterarm, Kammersystem, anderer visueller Score) und die Möglichkeit unterschiedlich empfindlicher Kollektive bei solchen Stichprobenumfängen zu bedenken. Die Ergebnisse zeigen erneut, dass Lösungsmittel allein, im Vergleich zu Detergentien wie SLS, keine nennenswerte Barriestörung hervorrufen (auch wenn der geringe Anstieg statistisch signifikant war), solange die Irritation nicht so stark ist, dass epidermale Defekte auftreten, die dann zwangsläufig zu einem (im Einzelfall) erheblichen TEWL-Anstieg führen. Durch konsequente Anwendung der Abbruchkriterien wurden epidermale Defekte im aktuellen Versuch ausgeschlossen. Das Auftreten eines geringen, aber signifikanten

Anstiegs des TEWL im Kontrollareal schränkt die Interpretation der TEWL-Ergebnisse auf den Feldern O/O und C/C ein, da es sich hierbei möglicherweise um klimatisch bedingte Artefakte handelte.

Die hier untersuchten Lösungsmittel verursachten bei Co-Exposition SLS jedoch eine deutlich stärkere Dehydratation als die Lösungsmittel oder SLS allein, und auch im Hinblick auf die klinische Irritation und die chromametrisch quantifizierte Hautrötung waren deutlichere Effekte bei den kombinierten Expositionen zu verzeichnen. Bei einer kombinierten Exposition sind in Bezug auf die zu erwartenden Irritationswirkungen somit niedrigere Auslöseschwellen für Hautschädigung durch Austrocknung zu erwarten.

3.3. Arbeitspaket 3

Für die Entwicklung des Prüfverfahrens für Hautschutzmittel als humanes in-vivo-Modell wurden fortan kommerzielle Hautschutzmittel des entsprechenden Marktsegmentes einbezogen. Es war zu prüfen, ob im entwickelten Modell anhand der verwendeten Zielparameter eine unterschiedliche Schutzwirkung von kommerziellen Hautschutzprodukten nachgewiesen werden kann und ein damit ein vergleichendes Produktranking möglich ist. Ferner sollte anhand des Summenscores und der Corneometrie geprüft werden, ob sich ein „Hautschutzfaktor“ berechnen lässt.

Methoden



Es wurde, nach einer Pilotstudie mit 5 Probanden, eine **doppelblinde („blind investigator“), kontrollierte und randomisierte, repetitive okklusive Irritationsstudie unter Einbeziehung 6 kommerzieller Hautschutzprodukte (HSP)** durchgeführt (Einzelversuche 8 und 9, s. Anhang), die durch den Projektbegleitkreis ausgewählt und durch die Apotheke des Universitätsklinikums Jena verblindet und codiert in neutralen Behältern an die Klinik für Hautkrankheiten geliefert wurden. Als Lösungsmittel werden Octan und Cumol im Vergleich zu Aqua und SLS verwendet. Über 11 Tage wurden 2xtgl. jeweils 0,05 ml der HSP 1-6 pro Testfeld gemäß Randomisierungsschema mittels einer 1ml-graduierten Einmalspritze appliziert und mit dem behandschuhten Finger in kreisenden Bewegungen gleichmäßig im 18 mm großen Testareal verteilt. Die HSP wirkten für 10 Minuten ein. Anschließend wurden die Lösungsmittel und die Kontrollsubstanzen in bereits beschriebener Weise für 10 Minuten okklusiv appliziert. Auf 2 zusätzlichen nur irritierten Feldern wird jeweils nur Cumol bzw. Octan appliziert. Insgesamt ergaben sich damit 16 Felder: SLS, Aqua, Cumol jeweils unbehandelt, 6 Felder Cumol + HSP 1-6; Octan unbehandelt, 6 Felder Octan + HSP 1-6.

An Tag 12 erfolgten die Abschlussbewertungen bzw. Abschlussmessungen.

Der visuelle Score wurde vom verblindeten Untersucher täglich vor der Applikation erhoben. Der Untersucher hatte keine Einsicht in die Randomisierungspläne und nahm am Applikationsvorgang durch eine strikte räumliche Trennung der Vorgänge nicht teil.

Die Messungen von Erythem (Chromametrie) und Stratum corneum-Hydratation (Corneometrie) wurden durch die MTA durchgeführt und erfolgten ebenfalls täglich vor der ersten Applikation. Zusätzlich wurden an den Tagen 1, 5 und an Tag 12 (alternativ am Abbruchtag) Messungen des TEWL durchgeführt. Vorzeitige Abbrüche von Feldern durch Erreichen der Abbruchkriterien gingen ebenfalls in die Bewertungen ein. Von jeder Probandengruppe (5-6 pro 12 Tage) wurden zwei ausgewählt und deren Hautreaktionen täglich im Verlauf fotografisch dokumentiert.

Die Datensätze wurden statistisch in externer Beauftragung durch Dr. Menne Biomed Consulting, Tübingen, ausgewertet. Der ausführliche statistische Bericht und die



Detailerläuterung zu den Methoden wurde dem Zwischenbericht 2 beigelegt und liegt der DGUV vor. Alle hier berichteten p-Werte wurden nach Tukey auf „multiples Testing“ korrigiert, sind also konservativ.

Die Daten der Corneometrie (Auswertung der Mittelwerte der Mehrfachmessungen) wurden einer Mixed Model Analyse (package lme4, Funktion lmer)(54) unterworfen unter Anwendung der Formel:

$$\text{fixed} = \text{corneo} \sim \text{time} * \text{irr} * \text{treat}, \text{random} = \sim \text{time}/\text{subject}/\text{patch}$$

Dabei steht die Zielvariable *corneo* für die gemessenen Corneometriewerte. Sie werden modelliert durch die Parameter *time*, *irritanz*, *treatment*, sowie die *ID* des Probanden *subject*. Dies bedeutet, dass man eine Voraussageformel ableitet, bei der die Zielvariable mit möglichst geringem Restfehler (*residual*) aus den Parametern vorhergesagt werden kann (*prediction*). H_0 steht für „kein Schutzmittel (nur irritiertes Feld)“.

Die Mixed Model-Analyse geht, vereinfacht dargestellt, wie folgt vor: Für jedes Testareal jedes Probanden wird eine lineare Regressionsgerade durch die Zeitpunkte bestimmt. Für jede Hautstelle wird demzufolge eine Steigung („Änderung pro Tag“) und einen Achsenabschnitt errechnet, der den unwichtigen geschätzten Wert am Tag 0 ergibt. Es werden demzufolge nicht direkt Differenzen zum Ausgangswert („Baseline“) ausgewertet; da man dabei den Messpunkt am Tag 0 als „objektiv richtig und fehlerfrei“ ansehen würde- er ist aber potentiell genauso „fehlerbehaftet“ wie die anderen Punkte.

Die ermittelten Steigungen (Änderung pro Tag) sind die Messwerte, die ausgewertet werden, und dienen unter Berücksichtigung der Tatsache, dass viele davon am gleichen *subject* gemessen wurden, als Basis für die Statistik. Bei der Berechnung wird zusätzlich berücksichtigt, dass die Messwerte innerhalb einer Versuchsperson stärker korrelieren, als zwischen Versuchspersonen (within-subject vs. between-subject).



Es wird hierbei demzufolge eine „quasi-lineare“ Regressionsgrade bestimmt pro Testfeld pro Proband durch die Zeitpunkte 0-11 (Tage), wobei dann die Steigung der Änderung pro Tag entspricht.

Die Daten der Chromametrie wurden mit folgender Mixed Model Analyse ausgewertet:

$$\text{fixed} = \text{chroma} \sim \text{time} * \text{irr}, \text{random} = \sim \text{time/subject/patch}$$

Die Daten der Tewametrie wurden ebenfalls einer Mixed Model Analyse unterworfen unter Anwendung der Formel:

$$\text{fixed} = \text{tewa} \sim \text{time} * \text{irr} * \text{treat}, \text{random} = \sim 1/\text{subject/patch}$$

Für die Beschreibung der Summenscores (Ergebnis des kumulativen klinischen Irritationsscores) wurde die quasi-kontinuierliche Messgröße Summenscore auf eine dichotome Messgröße (Ja/Nein, 0/1) transformiert, die man bei Werten oberhalb einer gewählten Schwelle (threshold) auf 1, darunter auf 0 setzt. Die Wahl der Schwelle ist dabei entscheidend für das Ergebnis, denn es müssen genügend Messwerte oberhalb der Schwelle vorhanden sein. Für die Auswertung wurden die Schwellen 1,0; 1,5 und 2 des Summenscores vergleichend verwendet. Aus der Dichotomisierung ergibt sich prinzipiell eine S-förmige Kurve, die per Logit Transformation in eine Gerade transformiert werden kann. Die Gleichung kann mittels eines Generalized Linear Models erfolgen, welches hier verwendet wurde, wobei die die Funktion *lmer* im Package *lme* (55) untersucht wurde:

$$\text{Lme}(\text{crit} \sim \text{time} * \text{treat} * \text{irr} - \text{time} : \text{treat} : \text{irr} + (1/\text{subject} / \text{patch}), \text{family} = \text{binomial})$$

Dabei ist *crit* der Zielparameter, also der 0/1 Wert für „überschwellig“. Anhand von Dosis-Wirkungskurven kann hierbei der Parameter *day50* kalkuliert werden. Dies ist, in Analogie zum Parameter LD50 bei pharmakologischen Tests, der Schätzwert für die Anzahl der Behandlungstage, an dem 50% der Probanden Summenscores über



wählbaren Schwellenwert (0,5; 1; 1,5) erreicht oder überschritten haben. *Day50* erlaubt damit einen Vergleich der Wirksamkeit. Aus dem Verhältnis von *day50* der „geschützten“ Testareale im Verhältnis zu den nur mit den lipophilen Irritantien behandelten Kontrollfeldern lassen sich zudem Schutzfaktoren mit Konfidenzintervallen errechnen.

Ergebnisse

In die Auswertung flossen 20 Datensätze von 23 eingeschlossenen Probanden ein. Die Verträglichkeit war, aufgrund der höheren Anzahl der Lösungsmittelfelder, geringer ist als in den Vorversuchen. Es kam insgesamt vermehrt zu subjektiven Missempfindungen der Probanden während der Applikation. Dies manifestierte sich vorwiegend in den ersten drei Versuchstagen und führte bei 2 Probanden zu einem Abbruch der Studie (drop out, ein weiterer drop out aus nicht studienbezogenen Gründen). Wie bereits in den Vorversuchen zeigte sich, dass nach ca. 3 Tagen eine Abnahme der Sofortreaktionen und der Missempfindungen eintrat. Ebenfalls in Bestätigung der Beobachtungen aus den Vorversuchen zeigte sich erneut eine interindividuelle Variabilität der Empfindlichkeit ggü. den Irritantien.

Die Verblindung der Produkte wurde bis dato beibehalten, da es in diesem Abschnitt nicht Ziel der Modellentwicklung war, einzelne Produkte oder Hersteller zu bewerten.

Corneometrie: Keines der 6 untersuchten kommerziellen Hautschutzprodukte zeigte eine Schutzwirkung vor Austrocknung durch Cumol und Octan. Für Cumol war die Abnahme bei 4 von 6 Hautschutzprodukten im Vergleich zum Ausgangswert signifikant, bei zweien allerdings als Hinweis auf eine möglicherweise tendenzielle Schutzwirkung insignifikant. Auf den mit Octan behandelten Feldern führten 2 Hautschutzprodukte allerdings zu einer signifikanten Verstärkung der Austrocknung im Vergleich zum ungeschützten Octanfeld und verschlechterten den Hautzustand (Abb. 16).

Chromametrie: Unter der Irritation mit Octan zeigte sich, im Gegensatz zum mit SLS behandelten Kontrollareal, kein monotoner Trend im Sinne eines Anstieges. In den ersten Tagen trat eine leichte Erhöhung des Chroma-a* Wertes auf, der aber im weiteren Verlauf der Studie rückläufig war. Cumol induzierte keine signifikanten



Änderungen. Die Chromametrie lieferte weniger trennscharfe Messdaten als die Parameter Summenscore und Corneometrie. Die Chromametrie erwies sich somit als kaum geeignet zur Untersuchung der Schutzwirkung vor Lösungsmittel-induzierter Irritation.

Tewametrie: Beide Irritantien induzierten abermals keinen signifikante Änderung des TEWL über die Zeit, sodass erneut bestätigt wurde, dass dieser Parameter zur Untersuchung von Lösungsmittel-bedingter Irritation und Untersuchung der Schutzwirkung von Hautmitteln nicht verwendet werden kann.

Summenscore: Alle Hautschutzprodukte hatten bei der Bewertung des Summenscores mit einer Schwelle von 1,5 einen signifikant kleineren Wert für *day50* als H0 (=kein Schutz), waren also eher schädlich (Abb. 17). Alle errechneten „Schutzfaktoren“ waren kleiner 1 (gleichbedeutend mit „kein Schutz“). Den „besten“ Schutzfaktor wies Produkt HSP 3 gegen Octan und Cumol auf (Tab. 1). Betrachtet man das Produktranking, welches sich aus der Corneometrie und aus dem Summenscore ergibt, zeigte sich für beide Parameter dieselbe Produktreihenfolge (H3 „am besten“, H2 und H5 „am schlechtesten“) (Abb. 18 und 19). Bei explorativer Auswertung der Anzahl der vorzeitigen Feldabbrüche zeigte sich ebenfalls, dass H2 und H5 gegenüber Octan ungeschützt (=H0) zu einer vermehrten Anzahl an Abbrüchen (Irritationsverstärkung) und dass H2 gegenüber Cumol ungeschützt zu mehr Abbrüchen führte (Tab. 2).

Zusammenfassend zeigten somit nur gegenüber Cumol 2 HSPe eine tendenzielle, jedoch noch nicht signifikante, Schutzwirkung vor Austrocknung. Es zeigte sich eine Korrelation der Ergebnisse der verschiedenen Parameter. Das Modell erlaubte ein Produktranking und identifizierte 2 „hautschädliche“ „Hautschutzmittel“. Es musste in Betracht gezogen werden, dass der fehlende Wirksamkeitsnachweis in Bezug auf den klinischen Irritationsscore, insbesondere auf das Irritans Octan, der willkürlichen Auswahl verfügbarer Marktprodukte zuzuschreiben war („zufällig wurden 6 unwirksame Produkte ausgewählt“). Insofern war zu berücksichtigen, dass eine andere Auswahl möglicherweise ein wirksames Produkt hätte enthalten können.

Das Modell wurde nochmals einer kritischen Methodenprüfung unterworfen. In Bezug auf die experimentelle Exposition wurde diskutiert, inwieweit die durch die Art der



Applikation (okklusiv) und die Dauer und Häufigkeit der Einwirkung erzielte Irritationswirkung mit derjenigen einer natürlichen repetitiven Exposition am Arbeitsplatz gleichgesetzt werden kann. Eine möglicherweise vorhandene, wenn auch schwache Schutzwirkung von Externa könnte durch eine zu intensive Irritationswirkung maskiert werden. In diesem Falle würde das Modell der Produktwirkung nicht gerecht werden. Bei dieser methodenkritischen Diskussion wurde sowohl die kumulative Gesamtirritation (Endpunktbetrachtung) als auch die Intensität der Einzelirritation nochmals kritisch betrachtet. Eine Reduktion der Einzelexpositionszeit wurde verworfen, da die Irritationseffekte auf den ausschließlich irritierten Feldern zu schwach ausfielen. Bei Reduktion der Einzelexpositionszeiten wäre die Anzahl der täglichen Expositionen auf mindestens 3 pro Tag anzuheben gewesen. Dies wurde aufgrund der fehlenden Praktikabilität verworfen. Zu bedenken war, dass eine direkte Korrelation der modellhaften Expositionsverhältnisse zu realen Arbeitsplatzverhältnissen grundsätzlich schwierig ist. Es galt jedoch bei der weiteren Modellentwicklung zu untersuchen, ob die unter 2x tgl. okklusiver Exposition erzielte Irritationswirkung mit derjenigen einer (noch öfteren) offenen Exposition, wie sie an Arbeitsplätzen vorherrscht, approximativ vergleichbar ist, oder ob der erreichte Irritationsgrad im Modell unrealistisch hoch ist. Erkenntnisse, wie oft im Arbeitsalltag mit einer repetitiven Exposition zu lipophilen Irritantien zu rechnen ist, lagen den Projektnehmern nicht vor. Es kann unterstellt werden, dass eventuell ermittelbare Expositionszeiten sehr arbeitsplatzspezifisch und interindividuell unterschiedlich wären. Derartige Ermittlungen wurden nach Kenntnis der Projektnehmer bisher nicht durchgeführt, wären jedoch als sinnvoll zu erachten.

Abgesehen von den im Modell gewählten Größen für die Parameter Art, Dauer und Häufigkeit der Irritantienexposition wurden weitere, mathematisch-methodische Modifikationen im Bereich der Ergebnisauswertung diskutiert. Es zeigte sich bei der beschriebenen Auswertung insofern eine methodische Schwierigkeit, als dass die kalkulierten Dosis-Wirkungskurven den Schwellenwert *day50* für mehrere Behandlungsfelder, insbesondere jedoch aber für das nur irritierte Kontrollfeld (H0), nicht innerhalb von 11 Tagen schnitten. Anstatt dessen musste der Wert *day50* extrapoliert (mathematisch berechnet) werden und lag infolgedessen virtuell deutlich höher als 11 (Tage) (Tab. 3). Hierbei spielte vor allem die deutliche interindividuelle



Variabilität der Lösungsmittlempfindlichkeit der Probanden eine entscheidende Rolle, da bei Rekrutierung hautgesunder Personen ein relevanter Anteil von 10-20% Lösemittel-unempfindlich ist („non-responder“) und keine, oder nur eine sehr geringe, kumulative Irritationswirkung gegenüber den lipophilen Irritantien Octan und Cumol aufweist. Die zugrundeliegenden Ursachen unterschiedlicher Reagibilität sind für diese Substanzen bisher unklar. Ein Zusammenhang zum Vorliegen einer atopischen Hautdisposition, wie sie für das hydrophile Irritans und Tensid SLS beschreiben wird, scheint für lipophile Irritantien weniger deutlich vorzuliegen. Zumindest konnten in den bei allen in den Projektschritten 2-4 erhobenen Atopiescores aller Probanden keine Hinweise auf einen solchen Zusammenhang gefunden werden, da die „empfindlichen“ Probanden nicht überzufällig häufig höhere Atopiescores aufwiesen. Um einen solchen mögliche Prädisposition exakter zu untersuchen, sind allerdings gezieltere Studien an größeren Kollektiven notwendig. Selektionsphänomene sind in dem hier untersuchten Probandenkollektiven zu unterstellen, da sich für in-vivo Irritationstestungen eher Probanden mit unempfindlicher Haut zur Verfügung stellen. Die untersuchte Stichprobe ist somit nicht repräsentativ für die Grundgesamtheit, ein Faktor, der insbesondere bei kleinen Untersuchungskollektiven Bedeutung hat. Die gute Korrelation der Ergebnisse von Corneometrie und Summenscore im Hinblick auf das Produktranking stellen ein Indiz dafür dar, dass die Extrapolation der *day50* Werte zur Ermittlung eines solchen Rankings akzeptabel war.

Zur Vermeidung der Notwendigkeit beziehungsweise zur Verbesserung der Exaktheit einer rechnerischen Extrapolation der *day50* –Werte bestanden grundsätzlich folgende Möglichkeiten:

- a. Rekrutierung Lösemittel-empfindlicher Probanden durch Vorscreening zur Reduktion des Anteils an non-Respondern.
- b. Herabsetzen des *day50* –Parameters auf einen *day30*- Wert.
- c. Adaptation des Modells mit Verlängerung des Versuchszeitraumes solange, bis wirklich 50% der Probanden den Schwellenwert erreichen, d.h. Ausdehnung der Irritationstestung auf z.B. 20 Tage.
- d. Modifikation der Abbruchkriterien



Die Rekrutierung lösemittlempfindlicher Responder erschien dadurch gerechtfertigt, als ein Hautschutzmittel im Arbeitsalltag weniger von den konstitutionell unempfindlichen Individuen benötigt wird, als vielmehr seine Schutzwirkung bei den empfindlichen Individuen entfalten muss. Das Herabsetzen auf einen *day30*-Wert schien ebenso unpraktikabel wie die Verlängerung des Modells auf eine tatsächliche Dauer von mindestens 20 Tagen.

Es folgte daher eine weitere Studie, in der die Methoden leicht modifiziert wurden, **als 11-tägiger kumulativer okklusiver Irritationstest mit 4 kommerziellen Hautschutzprodukten (HSP) an Octan-Respondern** (Einzelversuche 10 und 11, s. Anhang)

mit dem Ziel einer weiteren Methodenoptimierung im Vergleich zum Vorversuch, insbesondere im Hinblick auf die Auswertbarkeit. Ferner sollte geprüft werden, ob die Ergebnisse des Vorversuch innerhalb des Zentrums reproduzierbar waren.

Methoden

Der Vorversuch wurde mit folgenden Modifikationen wiederholt:

- Unter erneuter Verblindung wurden 4 der zuvor 6 untersuchten Hautschutzprodukte einbezogen
- Einschlusskriterium: es wurden nur Octan-Responder nach einem Vorscreening eingeschlossen (n = 20; vergl. Anhang I, Versuch 10). Hierfür unterzogen sich die Probanden an einem Tag einer zweimaligen repetitiven okklusiven Applikation von Octan. Am nachfolgenden Morgen wurde das Applikationsareal visuell bewertet. Eingeschlossen wurden nur Probanden, die mindestens einen Summenscore von 1,0 aufwiesen.
- Der Summenscore wurde modifiziert: Neu eingeführt wurde beim Erythem zusätzlich die Bewertung „4“ für „stark“. Die Abbruchkriterien wurden derart modifiziert, dass nur noch ein Erythemscore von 4, ein Ödem von 3 oder Erosionen zum vorzeitigen Feldabbruch führten.
- Auf die Parameter Chromametrie und Tewametrie wurde verzichtet, da sie im Vorversuch keine wesentlichen Erkenntnisse erbrachten.
- Die statistische Auswertung wurde modifiziert. Aus den geschätzten Änderungen der Corneometriewerte wurden zusätzlich Corneometrie-



Schutzwerte bestimmt. Ein Schutzmittel hat den Schutzfaktor „2“, wenn eine Änderung des Corneometriewertes mit Schutzmittel Hx doppelt so lange braucht, wie die gleiche ohne Schutzmittel, also H0.

Die statistischen Methoden sowie die Detailergebnisse wurden im Report Lipolrr2 beschrieben, der als Anhang dem 2. Zwischenbericht beigelegt war und der DGUV vorliegt.

Die Corneometrieegebnisse wurden mit einem Mixed-Model package *lme4*, Funktion *lmer* ausgewertet(54). Das verwendete Modell hat die Form:

$$\text{fixed} = \text{corneo} \sim \text{time} * \text{irr} * \text{treat}, \text{random} = \sim \text{time} | \text{subject} / \text{patch}$$

Dabei steht die Zielvariable *corneo* für die gemessenen Corneometriewerte (Auswertung der Originalwerte der Mehrfachmessung). Sie werden modelliert durch die Parameter *time*, *irritans*, *treatment*, sowie die ID des Probanden *subject*. Als Test, wie groß die Fehler durch die lineare Anpassung waren, wurde ein Plot der Residualfehler verwendet.

Die Ergebnisse des Summenscores (visueller Score) wurden erneut mit einem Generalized Linear Model berechnet. Für die Schätzung des Modells wurde die Funktion *lmer* im Package *lme* verwendet (55). Das komplexeste Modell, das noch stabile Anpassungen ergab, war

$$\text{lme}(\text{crit} \sim \text{time} * \text{treat} * \text{irr} - \text{time} : \text{treat} : \text{irr} + (1 | \text{subject} / \text{patch}), \text{family} = \text{binomial}).$$

Bei der Auswertung dieser Studie wurde eine wesentliche Änderung im Auswerteverfahren im Vergleich zum Vorversuch (Einzelversuch 9) vorgenommen. Die Kurven wurden am ersten Tag, also beim Baseline-Wert, durch starke numerische Gewichte auf den Score-Wert 0 überbetont. Die ist äquivalent zur Aussage: „Wir gehen davon aus, dass vor der Behandlung mit hoher Sicherheit ein unterschwelliger Score-Wert festlag, da wir Probanden mit normaler Haut entsprechend ausgewählt haben“.

Ergebnisse



Die Reduktion des Corneometrie-Wertes unter H0 über 11 Tage wurde in der Reihenfolge Aqua, Cumol, Octan stärker, d.h. Octan bewirkte die stärkste Dehydratation des Stratum corneum. Die Änderungen waren bei beiden Irritantien (C und O) für alle Schutzmittel einschließlich H0 (ohne Schutz) signifikant (Abb. 20). Für H2 wurde unter beiden Irritantien eine gegenüber H0 hochsignifikant stärkere Abnahme der Hydratation nachgewiesen (Abb. 21). Somit verstärkte das Hautschutzprodukt H2 wie im Vorversuch die Irritantien-bedingte Austrocknung. Für die beiden Hautschutzprodukte H3 und H4 wurde bei nachfolgender Cumol-Irritation eine signifikant geringere Abnahme des Corneometrie-Wertes, demzufolge also eine Schutzwirkung, nachgewiesen, jedoch keine Schutzwirkung vor Octan-bedingter Austrocknung.

Als Maß für den Summenscore wurde wiederum *day50* verwendet, eine Schätzung der Anzahl Tage bis zum Überschreiten einer definierten Schwelle im Summenscore. Die Ergebnisse der kalkulierten Schutzfaktoren variierten zwar in Abhängigkeit von der gewählten Schwelle. Sie zeigten jedoch einen eindeutigen gemeinsamen Trend bei allen Schwellenannahmen (Tab. 4). Ein Hautschutzprodukt mit Schutzwirkung musste bei dieser Berechnung definitionsgemäß einen Schutzfaktor von > 1 aufweisen. Dies war tendenziell nur für das Produkt H3 der Fall. Die in dieser Studie getesteten Schutzmittel H2 (C, O), H4 (C) und H5 (C, O) hatten bei der Bewertung des Summenscores mit Schwelle 1.5 *kleinere Werte für day50* als H0, hatten also keine im Summenscore nachweisbare Schutzwirkung. Für das Irritans Octan hatten H2 und H5 sogar *signifikant kleinere day50-Werte* als H0, wirkten also erneut signifikant irritationsverstärkend (Tab. 5). Die Stabilität der Schätzung konnte gegenüber den Ergebnissen von Einzelversuch 9 durch die Auswahl der Probanden erhöht werden, und war zumindest für Octan nicht mehr von einer Extrapolation abhängig. Die numerische Stabilität konnte durch eine statistisch stärkere Gewichtung der Daten der Baseline entscheidend verbessert werden. Da die Ergebnisse der extrapolierten Schätzungen nur wenig von denen der nicht-extrapolierten abweichen, konnten die Unsicherheiten in Bezug auf die Präzision der Ergebnisse der Extrapolationsmethode weitgehend ausgeräumt werden.

Prinzipiell ließen sich auch aus den Corneometriedaten Schutzfaktoren ausrechnen. Keiner der Schutzfaktoren war von 1 signifikant verschieden. Schutzfaktoren, basierend auf Corneometriewerten, hatten allerdings eine geringere Trennschärfe,



bedingt durch die mathematisch-methodische Berechnung und daraus resultierenden großen Konfidenzintervallen.

Zusammenfassend wurden die Ergebnisse der Vorläuferstudie mit einigen Unterschieden reproduziert. Erneut wurde das Produkt H2 in Kombination mit beiden Irritantien als signifikant hautschädigend identifiziert. Für H5 traf dies in Bezug auf die Summenscore-Ergebnisse gegenüber Octan ebenfalls zu. Durch die Methodenmodifikation gelang es, im Gegensatz zur Vorstudie erstmals signifikante Schutzeffekte zumindest für 2 der untersuchten Produkte (H3, H4) vor Cumol-bedingter Austrocknung nachzuweisen. Gegen die stärkere, Octan-bedingte Irritation wurde erneut keine Schutzwirkung festgestellt. Die Methodenmodifikation, insbesondere die Untersuchung von Octan-Respondern, führte andererseits auch zu dem Ziel, dass eine mathematische Extrapolation bei dem stärkeren Irritans Octan (H0) nicht mehr notwendig war. Die beiden letzten Studien erbrachten somit innerhalb eines Labors reproduzierbare Ergebnisse und ermöglichten die Identifikation partiell hautschützender Effekte von Hautschutzprodukten sowie die Identifikation hautschädigender Produkte.

Vergleich der Irritationswirkung bei offener und geschlossener repetitiver Applikation von Cumol und Octan im Halbseitenvergleich (I)
(Versuch 13, s. Anhang)

Diese Untersuchung hatte das Ziel eines Vergleiches der Irritationswirkung nach offener und okklusiver repetitiver Applikation. Im Berufsalltag ist die offene Exposition gegenüber lipophilen Irritantien zwar häufiger anzutreffen, jedoch ist eine offene Applikation experimentell aufgrund des Verdunstungsverhaltens der Substanzen nicht standardisierbar. Sie ist zudem mit der Gefahr einer inhalativen Exposition zu Lösungsmitteldämpfen von Probanden und Personal verbunden und damit unpraktikabel. Dennoch sollte an diesem Setting gezeigt werden, inwieweit eine 2xtgl. okklusive Exposition einer um ein vielfaches häufigeren offenen Exposition im Hinblick auf den Irritationsgrad entspricht, um den Arbeitsplatzbezug des Modells zu belegen. Der zu erwartende Irritationsgrad einer offenen Einzelexposition ist im Vergleich zu einer okklusiven Applikation naturgemäß geringer, weil die Substanzen nicht 10 Minuten auf der Haut verbleiben. Vorversuche zeigten, dass die Anzahl der



offenen Applikation um den Faktor 5 gesteigert werden musste, um einen vergleichbaren Irritationsgrad wie bei einer okklusiven, 2xtgl. Applikation von 10 Minuten zu erreichen.

Methoden

Aufgrund des hohen zeitlichen und personellen Aufwandes wurde nur ein kleines Kollektiv ($n = 10$) einbezogen. Die Ein- und Ausschlusskriterien entsprachen denjenigen des Einzelversuchs 11. Es wurden im Octan und Cumol im Halbseitenversuch offen jeweils 10xtgl. bzw. auf der kontralateralen Seite 2xtgl. okklusiv appliziert. Die offene Applikation erfolgte durch Aufpipettieren der Standardmenge von $240\mu\text{l}$ auf eine auf der Rückenhaut aufgelegte Filterpapierscheibe von 18 mm Durchmesser. Die Filterpapierscheibe verblieb 10 Minuten auf dem Testfeld und war am Ende der Expositionszeit makroskopisch trocken. Bei der ersten und sechsten offenen Applikation des Tages wurde zeitgleich parallel die okklusive Applikation für 10 Minuten durchgeführt. Zwischen den beiden okklusiven täglichen Applikationen lag ein Zeitraum von 3h. Die offenen Applikationen verteilten sich auf die Zeit dazwischen. Während der Applikation befand sich der Proband in Bauchlage unter der mobilen Absaugung. Insgesamt erfolgten so pro Proband innerhalb von 4 aufeinanderfolgenden Tagen 40 offene und 8 okklusive Applikationen. Aqua dest. diente als Negativkontrolle. Insgesamt wurden 6 Testfelder untersucht. Die visuelle Bewertung (visueller Score) und die Corneometrie wurden jeweils morgens vor der ersten Applikation sowie im Tagesverlauf vor der 3., 5., 7., und 9. und nach der 10. offenen Applikation, mit einem zeitlichen Abstand von 30 Minuten zur vorangehenden Applikation (6 Messungen pro Tag), durchgeführt. An Tag 5 erfolgten Abschlussbewertungen und -messungen.

Ergebnisse

Die Hydratation des Stratum corneums nahm bei der offenen wie auch bei der okklusiven Applikation über die Zeit in vergleichbarem Ausmaß ab (Abb. 22 und 23). Es erfolgte jeweils ein Wiederanstieg der Werte über Nacht (jeweilige Messung am Morgen vor der ersten Exposition). An Tag 5 bestanden keine signifikanten Unterschiede zwischen dem Austrocknungsgrad auf den Feldern mit offener im



Vergleich zu okklusiver Exposition, d.h. es wurde für beide Irritantien bei beiden Expositionsformen derselbe Austrocknungsgrad erreicht (Wilcoxon Test). Hingegen induzierte im Summenscore die okklusiven Applikation von Octan eine deutlichere klinische Irritation als die offene Exposition (Abb. 24). Die Unterschiede erreichten das Signifikanzniveau nicht ($p = 0,059$, allerdings kleine Fallzahl). Bei Cumol fanden sich, bedingt durch die insgesamt geringgradige klinische Irritation, keine Unterschiede zwischen dem Irritationsgrad bei der offenen im Vergleich zur okklusiven Applikation (Abb. 25).

Zusammenfassend wurde gezeigt, dass die 10 mal tägliche offene Applikation von Cumol und Octan denselben Austrocknungsgrad des Stratum corneums hervorruft, wie eine 2x tgl. okklusive Exposition unter Finn Chambers. Nur für Octan galt, dass die okklusive Exposition zu einer stärkeren Irritation führt, wenngleich der Effekt nicht signifikant war. Die Unterschiede im klinischen Irritationsgrad wurden bei Detailbetrachtung der Einzelkriterien für den Summenscore vorwiegend durch das Kriterium „Erythem“ hervorgerufen.

Vergleich der Irritationswirkung bei offener und geschlossener repetitiver Applikation von Cumol und Octan im Halbseitenvergleich (II) mit 2 kommerziellen HSP (Versuch 14, s. Anhang)

Methoden

Mit demselben methodischen Vorgehen wie bei Versuch 13 wurde die Schutzwirkung von 2 der 6 Hautschutzprodukte untersucht. Hierzu wurden erneut verblindet und, codiert als „A“ bzw. „B“, jeweils offen und okklusiv im Halbseitenversuch im Vergleich zu jeweils nur irritierten Testfeldern (ebenfalls offen bzw. okklusiv) untersucht. Eines der ausgewählten Produkte hatte sich zuvor (Versuche 9 und 11) als wirkungslos bzw. teilwirksam gezeigt, während das andere eine irritationsverstärkende Wirkung erbracht hatte. Es sollte untersucht werden, ob sich die Ergebnisse der Versuche 9 bzw. 11 prinzipiell auch mittels offener Applikation reproduzieren lassen. Wegen des hohen personellen und zeitlichen Aufwandes, bedingt durch die Vielzahl der offenen Applikationen, konnten nur 6 Probanden in



diese orientierende Untersuchung einbezogen werden. Auf eine statistische Auswertung wurde daher verzichtet.

Ergebnisse

Die nachträgliche Entblindung erbrachte, dass es sich bei „A“ um HSP 3 (wirksam gegen Cumol-bedingte Austrocknung, sonst nicht signifikant wirksam in den Vorversuchen) und bei „B“ um HSP 2 (signifikant irritationsverstärkend in den Vorversuchen) handelte.

Die Corneometrie- Resultate für Cumol zeigten, dass auf den Feldern mit offener Exposition beide Hautschutzprodukte A und B an Tag 4 und 5 einen geringeren Austrocknungsgrad als das ungeschützte Cumolfeld aufwiesen und damit eine Schutzwirkung suggerierten (Abb. 26). Bei der okklusiven Applikation stellen sich die Effekte von „A“ und „B“ hingegen unterschiedlich dar: Während „A“ (HSP3) gut schützte vor Cumol-bedingter Austrocknung, wies „B“ (HSP2) erneut keine Schutzwirkung auf, aber andererseits hier auch nicht, wie in den Vorversuchen, eine klare Austrocknungsverstärkung (Abb. 27). Auf den Octanfeldern stellt sich der aus den Vorversuchen erwartete Unterschied zwischen HSP3 („A“) und HSP2 („B“) hingegen erneut klar dar, und zwar sowohl auf den Feldern mit offener als auch auf denjenigen mit okklusiver Exposition. HSP2 („B“) bewirkte auch hier eine erkennbare Aggravation der Austrocknung, während HSP3 zumindest in der okklusiven Exposition klar schützte (Abb. 28 und 29). Bei Auswertung der Ergebnisse des klinischen Summenscores ergab sich folgendes Bild. Für Cumol ergab sich, den Vorversuchen entsprechend, kaum eine klinisch erkennbare Irritation, und zwar sowohl auf den offenen wie auch okkludierten Feldern, weshalb die Ergebnisse nicht weiter auszuwerten waren (Abb. 30 und 31). Bei Octan wiederum entsprachen die Ergebnisse in Bezug auf die Differenzierung der beiden Hautschutzprodukte den Ergebnissen der Vorversuche. Produkt „B“ (HSP2) wirkte, sowohl bei offener als auch bei der geschlossenen Exposition, wieder irritationsverstärkend. Produkt „A“ hingegen, das in den Vorversuchen für Octan keine signifikante Schutzwirkung aufwies, wirkt auch hier weder im der offenen noch im okklusiven repetitiven Irritationstest (Abb. 32 und 33).



Zusammenfassend wurden die vorherigen Ergebnisse nach okklusiver Irritantienapplikation für die beiden Hautschutzprodukte prinzipiell reproduziert. Das zuvor im okklusiven repetitiven Irritationstest als „hautschädigend“ identifizierte Hautschutzprodukt (HSP2) wirkte hier ebenfalls als „nicht schützend“ (Cumol: Corneometrie okklusive Applikation) bzw. teilweise erneut irritationsverstärkend (Octan: visueller Score, Corneometrie). Nur in den Daten der Corneometrie für die offene Applikation ließen sich vorherige Effekte nicht wiederfinden, vielmehr entstand hier der Eindruck einer gegensätzlichen, „schützenden“ Wirkung für „B“, während das Produkt vor repetitiver okklusiver Cumolexposition nicht schützt. Einzig dieses Ergebnis wäre bei größerer Fallzahl insofern problematisch, als es die theoretische Möglichkeit einer Fehlbewertung von Produkten impliziert, die möglicherweise in der offenen Exposition eine gewisse Schutzwirkung vor Austrocknung aufweisen, jedoch bei okklusiver Applikation im Testmodell nicht wirken. Die Validität der Ergebnisse wird durch eine kleine Fallzahl limitiert.

3.4. Arbeitspaket 4

Nach positivem Votum des Begleitkreises für Fortsetzung des Projektes begann die Planungsphase für die in diesem Schritt vorgesehene Multicenterstudie. In diesem Rahmen wurden bei nochmaliger Literaturrecherche eine zwischenzeitlich publizierte neue toxikologische Bewertungen der Substanz Cumol durch das National Toxicology Program mit dem IFA diskutiert. Die Autoren sprechen darin der Substanz nach Versuchen an Nagern mit intensiver inhalativer Exposition ein genotoxisches Potential zu (56). Obwohl die kritische Bewertung der Substanz in Bezug auf ihr potentiell systemisches toxikologisches Profil bisher keinen Eingang in nationale Bewertungen zur Sicherheit der Substanz gefunden hat, zog das IFA, welches im Projektschritt 1 für die theoretische Eignungsevaluation potentieller Irritantien verantwortlich war, nach intensiver Diskussion mit den Projektnehmern seine positive Freigabe der Substanz Cumol als Standardirritans für humane in vivo-Irritationsstudien an der Haut zurück. Für die Projektfortführung stand damit ausschließlich Octan als bereits etabliertes Irritans zur Verfügung. Vor dem Hintergrund der Tatsache, dass in den vorangehenden Projektschritten noch keine Schutzwirkung eines Externums gegen Octan identifiziert wurde, stellte sich die



Frage nach dem weiteren Vorgehen und der Durchführung der Multicenter-Validierung des Modells. In Abstimmung mit der DGUV und dem Forschungsbegleitkreis fand daraufhin im Januar 2011 ein gemeinsames Treffen mit Vertretern von Hautschutzmittelherstellern unter Beteiligung von Herrn Prof. G. Kutz von der Hochschule Ostwestfalen-Lippe, Pharmatechnik, statt, in welchem der Projektstand dargelegt wurde. Es wurde beschlossen, dass die Industrie bzw. die Hochschule Ostwestfalen-Lippe auf freiwilliger Basis für einen weiteren Versuch Hautschutzmittel aus dem Segment bzw. eine sogenannte generische Mischung zur Testung gegen Octan zur Verfügung stellen wird, um einen eventuellen Positivstandard für die Testung gegen Octan zu identifizieren. Die Durchführung der Multicenterstudie wurde vom Ergebnis dieser weiteren Vorstudie abhängig gemacht.

Methoden

Es wurden den Projektnehmern 6 kommerzielle Hautschutzprodukte von der Industrie und 2 nach generischer Rezeptur hergestellte Externa (letztere von der Hochschule Ostwestfalen-Lippe) zur Verfügung gestellt. Wie vorab festgelegt, wurden die Proben an die Apotheke des Universitätsklinikums Jena gesandt und dort verblindet in neutrale und codierte Tuben (H7-H14) abgefüllt. Die Verblindung wurde beibehalten. Den Projektnehmern wie auch der DGUV ist insofern nicht bekannt, welche Produkte und welche Hersteller an der Prüfung beteiligt waren. Die Produktprüfung wurde zwischen April und Mai 2011 durchgeführt.

Die Prüfung der Produkte erfolgte gegen Octan im Vergleich zu einem ausschließlich mit Octan irritierten Testfeld, in einem 11tägigen repetitiven Irritationstest, wie in Teilversuch 11 beschrieben, an einem hautgesunden Probandenkollektiv (n=11). Die Quantifizierung der Irritationsgrade erfolgte klinisch mit dem beschriebenen visuellen Score, sowie durch corneometrische Messung der Abnahme der Stratum corneum-Hydratation in den Testfeldern.

Ergebnisse

Bereits ab Tag 3 zeigte sich der klinische Irritationsgrad, gemessen am kumulativen Summenscore, in den vorbehandelten Testfeldern tendenziell deutlicher ausgeprägt,



als im ausschließlich irritierten Octan-Kontrollfeld. Diese Tendenz setzte sich auch bei Betrachtung der Daten an Tag 5 und 12 fort. Tendenziell waren die Summenscores in allen „geschützten“ Feldern höher, wobei sich statistisch kein Unterschied zum ausschließlich irritierten Octanfeld darstellte. In zahlreichen Testarealen kam es im Verlauf zu einer deutlichen Irritation, sodass die klinischen Abbruchkriterien vor Tag 11 erreicht wurden und keine weiteren Applikationen der Hautschutzexterna und des Irritans in den betroffenen Feldern erfolgten. Die Anzahl der Abbrüche war dabei in allen vorbehandelten Feldern mindestens doppelt so hoch, wie im ausschließlich mit Octan irritierten Feld. Die Corneometrie-Ergebnisse an Tag 3 zeigten für 2 der 8 Produkte eine signifikant stärkere Abnahme der Stratum corneum Hydratation als für Octan allein, alle übrigen Unterschiede zu Octan allein waren nicht signifikant. Die Daten waren für eine Auswertung an Tag 5 ähnlich. Ein Auswertbarkeit an Tag 12 war aufgrund der Abbrüche nicht gegeben. Zusammenfassend zeigte keines der 8 untersuchten Externa eine signifikante Schutzwirkung, weder im klinischen Score, noch in der Corneometrie. Eine tendenzielle, nicht signifikante Schutzwirkung vor Octan-bedingter Dehydratation war lediglich für das Externum H10 (Tag 3 und 5) feststellbar.

Die geplante Multicenterstudie wurde aufgrund dieser Ergebnisse ausgesetzt.

4. FAZIT UND AUSBLICK

Im Rahmen der verschiedenen Projektschritte wurden zahlreiche neue Erkenntnisse zum kutanen akuten und kumulativen Irritationspotential verschiedener lipophiler Irritantien gewonnen. Mehrere Substanzen, darunter auch Octan und Cumol, waren zuvor nicht systematisch in humanen in vivo Studien eingesetzt worden, sodass für die Entwicklung des Modells Pionierarbeit zu leisten war.

Folgende Ergebnisse zum Irritationspotential von Cumol und Octan wurden im Zuge Modellentwicklung erarbeitet:

- Beide Substanzen penetrieren die intakte Epidermis (Oberhaut) in unterschiedlichem Ausmaß (Cumol > Octan). Das gute Penetrationsvermögen von Aromaten ist aus der Literatur bereits bekannt (57). Sie führen zu einer



mittel Laser Doppler Imaging nachweisbaren, innerhalb von etwa 30 Minuten zunächst reversiblen, Durchblutungsverstärkung im dermalen Plexus, die mit subjektiven sensorischen Stingingphänomenen einhergeht. Mehrfache Applikation führt zu einer sukzessiven Abnahme der Intensität des Soforerythems und der sensorischen Irritation. Aufgrund von Ergebnisse aus Tierversuchen ist es wahrscheinlich, dass die beschriebenen Phänomene durch Freisetzung von Neurotransmittern aus freien Nervenendigungen in der unteren Epidermis und oberen Dermis hervorgerufen werden (58, 59).

- Octan als aliphatischer organischer Kohlenwasserstoff penetriert die Epidermis ebenfalls, aber weniger gut als der Aromat Cumol und weist dadurch ein stärkeres kumulatives irritatives Potential auf (Schädigung durch Verbleib in der Epidermis) (60).
- Hautexposition zu den untersuchten Lösungsmitteln führt akut klinisch zu einem sogenannten „Whitening“ und zu zunehmender Hauttrockenheit nach mehrfachem Kontakt.
- Beim Whitening handelt es sich um ein optisches Phänomen, welches innerhalb einer Stunde spontan reversibel ist und wahrscheinlich durch intensive Austrocknung des Stratum corneums und eine reversible Strukturänderung der korbgeflechtartigen Struktur desselben verursacht wird. Die Eigenschaft der Lösungsmittel, Lipide aus dem Stratum corneum zu extrahieren, die belegt werden konnte, kann nach den im Projekt generierten Befunden für das optische Phänomen des Whitenings nicht allein verantwortlich gemacht werden (52).
- Eine Barrierestörung, messbar anhand von Veränderungen des transepidermalen Wasserverlustes, wird typischerweise nicht induziert. Im Gegensatz zu dem Parameter TEWL, der als Maß für die Integrität der Hautbarriere allgemein akzeptiert ist, ist die Bedeutung der Hautaustrocknung in der Entwicklung von irritativen Kontaktekzemen weniger klar und wissenschaftlich noch nicht ausreichend belegt.
- Experimentelle alternierende repetitive Exposition zu organischen Lösungsmitteln und zu dem hydrophilen, tensidischen Standardirritans SLS (sogenannte Tandemirritation) führt zu einer stärkeren Hautschädigung als die Exposition zu Cumol oder Octan oder SLS allein. Ergebnisse älterer Tandem-



Irritationstudien mit Toluol wurden damit bestätigt (15). Bei einer kombinierten Exposition sind in Bezug auf die zu erwartenden Irritationswirkung somit niedrigere Auslöseschwellen für Hautschädigung durch Austrocknung und Entwicklung kumulativer-subtoxischer Kontaktekzeme zu erwarten.

Bei der Testung kommerzieller Hautschutzexterna mit Auslobung „Schutz vor Lösungsmitteln“ bzw. „Schutz vor lipophilen Arbeitsstoffen“ im Modell gegen Cumol und Octan wurden folgende Resultate erarbeitet:

- Das repetitive Irritationsmodell ermöglicht einen intraindividuellen Vergleich von Wirksamkeiten mehrerer Hautschutzexterna. Es führt zu einem reproduzierbaren Irritationsgrad und ermöglicht eine Quantifizierung der Irritation anhand der Zielparameter „klinischer Grad der kumulativen Irritation im Summenscore“ und „Dehydratation des Stratum corneums“ und anhand des Parameters *day50* bei Definition von Schwellenwerten.
- In zwei aufeinanderfolgenden, verblindeten Studien wurden bei 2 von 6 untersuchten Produkten signifikant irritationsverstärkende Effekte monozentrisch reproduzierbar nachgewiesen. Eine isolierte Schutzwirkung vor Cumol-bedingter Dehydratation konnte im Modell für 2 von 6 Produkten nachgewiesen werden. Keines der untersuchten Externa wirkte ausreichend gegen Octan-bedingte Irritation.
- Die erzielten Ergebnisse mit den kommerziellen Schutzprodukten wurden im Modell unter okklusiver Irritantienexposition erzielt. Diese stellt im Berufsleben nicht die Regelexposition dar. Aus experimenteller Sicht ist die okklusive Applikation alternativlos. Sie wird auch bei hydrophilen Irritantien regelhaft angewendet und ist in diesem Zusammenhang bisher weder wissenschaftlich kritisch hinterfragt noch in Bezug auf ihre Korrelation zur offenen Exposition direkt evaluiert worden. Durch aufwendige, nicht-praxistaugliche und nicht-transferfähige intraindividuell vergleichende offene und geschlossene Irritationstestungen wurde in diesem Projekt ermittelt, dass der unter okklusiver Irritation induzierbare Grad der Hautreaktion durch eine um den Faktor 5 erhöhte Anzahl offener Einzelexpositionen erzielt werden kann. Bei Verwendung des Zielparameters „Stratum corneum–Dehydratation“ bestehen



nach unseren Ergebnissen keine Hinweise darauf, dass möglicherweise vorhandene Schutzeffekte von Produkten im Modell durch unnatürliche, möglicherweise zu intensive Irritationseffekte im okklusiven Wirksamkeitsmodell maskiert werden. Anders verhält es sich mit dem Parameter Summenscore in Bezug auf das Irritans Octan, da hier im Parallelversuch ein deutlicherer klinischer Irritationsgrad für die okklusive Applikation erkennbar wurde.

- Das Projekt wurde vor der geplanten Validierung des Modells in einer Multicenterstudie aufgrund einer negativen Re-Evaluation der toxikologischen Bewertung von Cumol (56) und aufgrund von Unwirksamkeit von Hautschutzexterna gegen das Modellirritans Octan beendet. Cumol wird vom IFA derzeit nicht mehr als Standardirritans für in vivo-Studien empfohlen (persönliche Mitteilung).

Folgende Empfehlungen in Bezug auf eine Weiterentwicklung des Wirksamkeitsmodells können gegeben werden:

- Prinzipiell können auch andere geeignete lipophile Modellsubstanzen in dem entwickelten Modell verwendet werden. Die geeigneten Einzelexpositionszeiten müssen jeweils erneut experimentell titriert werden. Eine toxikologische Freigabe ist Voraussetzung. Die Forschungsnehmer empfehlen eine Fortsetzung der Arbeiten, die der in FP 243 gesteckte Projektrahmen nicht mehr zulässt. Weitere Untersuchungen können in Anlehnung an die Ergebnisse der toxikologischen Evaluation erfolgen. Zu bedenken ist, dass es ein universell repräsentatives Standardirritans für die heterogene Gruppe der lipophilen Substanzen an Arbeitsplätzen nicht geben wird. Vor dem Hintergrund, dass auf dem Markt Hautschutzmittel explizit zum Schutz vor (organischen) Lösungsmitteln ausgelobt werden, war die Auswahl im Projekt FP 243 jedoch wohlbegründet.
- Die experimentelle repetitive Irritation mit lipophilen Irritantien ist im Vergleich zu allen hydrophilen Irritantien anspruchsvoller, sowohl in Bezug auf die Durchführung, als auch die Auswertung und erforderliche Gewährleistung der Probandensicherheit. Zur Vermeidung zu intensiver lokaler Irritationen sollten Abbruchkriterien eingehalten und die Testareale täglich ärztlich kontrolliert



werden. Bei Anwendung von Cumol und Octan wird eine Überschreitung der Einzelexpositionszeit von 10 Minuten nicht empfohlen.

Folgende berufsgenossenschaftlich relevante und praxisnahe Empfehlungen ergeben sich aus den Ergebnissen:

- Der wiederholte Kontakt zu Lösemitteln trocknet die Haut aus und führt im Arbeitsalltag zu Rauigkeit und Fissuren an den Händen. Hierdurch wird die Schadwirkung anderer Irritantien verstärkt und das Eindringen von Kontaktallergenen begünstigt. An Arbeitsplätzen mit kombinierter Exposition zu organischen Lösungsmitteln und tensidischen Irritantien sind daher in Bezug auf die zu erwartende Irritationswirkung niedrigere Auslöseschwellen für Hautschädigung und kumulativ-subtoxische Kontaktekzeme zu erwarten. Dies bedeutet, dass besondere Anforderungen an den Hautschutz an Arbeitsplätzen mit multiplen Expositionen zu stellen sind, auch wenn die Kontaktzeiten und -Intensität zu den einzelnen Schadensubstanzen bei der Ermittlung zunächst nicht auffallend deutlich erscheinen. Eine Relevanz dieser Ergebnisse dürfte sich insbesondere für Arbeitsplätze in Kleinbetrieben im Handwerk ergeben, da dort, im Gegensatz zu größeren Industriebetrieben, oft wechselnde Tätigkeiten mit scheinbar untergeordneten Einzelexpositionen vorherrschen, die zusätzlich eine Priorisierung in Bezug auf das auszuwählende Handschuhmaterial und die Hautmittel erschweren. Eine besondere diesbezügliche Schulung von Präventionsdiensten wird angeregt.
- Hersteller von Hautschutzmitteln sollten aufgefordert werden, Unterlagen zu den durchgeführten Wirksamkeitsnachweisen vorzulegen und eine möglichst spezifische Auslobung vorzunehmen, die Bezug auf die in den Tests verwendeten Modellsubstanzen nimmt. Gegenwärtig kann die Verwendung von Hautschutzmitteln mit einer Auslobung zum „Schutz bei Umgang mit organischen Lösungsmitteln“ nicht empfohlen werden, da sich auf dem Markt Produkte befinden, die zu einer Irritationsverstärkung führen, anstatt die Haut vor Irritation und Austrocknung zu schützen. Geeignete Schutzhandschuhe sind zu bevorzugen. Inwieweit Hautschutzmittel am Arbeitsplatz möglicherweise zu einer verstärkten Hautresorption von lipophilen



Arbeitsstoffen führen (61), kann aus dem Forschungsvorhaben nicht beantwortet werden, da diese Frage nicht Gegenstand des Projektes war.

Zusammenfassend sind durch die Ergebnisse des Projektes FP 243 Voraussetzungen für die Weiterentwicklung des repetitiven in vivo-Irritationsmodells mit lipophilen Irritantien geschaffen worden. In dieses müssen außerhalb des abgeschlossenen Projektrahmens erneut geeignete Standardirritantien implementiert werden. Die Relevanz des Projektes FP 243 wird durch die reproduzierbar nachgewiesene Irritationsverstärkung von 2 der untersuchten Produkte unterstrichen. Eine Auslobung von Hautschutzexterna von Herstellern zum „Schutz der Haut bei Umgang mit Lösungsmitteln“ ist angesichts einer nur unzureichender Teilwirksamkeit von 2 der insgesamt 14 Produkte des entsprechenden Marktsegmentes fragwürdig. Die Forderung aus Sicht der Berufsdermatologie, Produkte für einen Einsatz an Arbeitsplätzen einer fundierten Wirksamkeitstestung zu unterziehen, bleibt angesichts der dargestellten Ergebnisse unverändert bestehen. Im Idealfall sollten Wirksamkeitstestungen ein stufenweises Vorgehen mit in vitro oder ex vivo Verfahren, gefolgt von repetitiven in vivo-Testungen beinhalten. Gerade bei Auslobung von Produkten gegen lipophile Arbeitsstoffe sollten Hautschutzmittelhersteller dezidiert angeben, gegen welche Noxen getestet wurde. Die Ergebnisse des Forschungsprojektes werden in Abstimmung mit dem Forschungsgebern wissenschaftlich publiziert werden.

Anhang:

I Aufstellung der Einzelversuche

II Abbildungen und Tabellen



Danksagung

Besonderer Dank bei der Umsetzung des Forschungsvorhabens gilt den Mitgliedern des Forschungsbegleitkreises. Sie haben durch ihr beständiges Interesse den Projektfortgang inspiriert. Ebenso bedanken wir uns bei Herrn Dr. Menne, der die Auswertung mit der Entwicklung statistischer Methoden unterstützt hat, sowie für die Unterstützung bei der Produktverblindung bei Herrn Dr. Hartmann von der Apotheke des Universitätsklinikums. Frau Nadja Berger, die nicht nur in freundlicher Weise die Probanden betreut, sondern insbesondere die Messungen zuverlässig durchgeführt hat, gilt ebenfalls Dank.

5. LITERATUR

1. Dickel H, Kuss O, Schmidt A, Kretz J, Diepgen TL. Importance of irritant contact dermatitis in occupational skin disease. *Am J Clin Dermatol.* 2002;3(4):283-9. Epub 2002/05/16.
2. Goon AT, Goh CL. Epidemiology of occupational skin disease in Singapore 1989-1998. *Contact Dermatitis.* 2000;43(3):133-6. Epub 2000/09/14.
3. Schliemann S, A B, JE W. Organic solvents. In: T R, P E, SM J, HI M, editors. *Kanerva's Occupational Skin Diseases.* 2 ed. Heidelberg: Springer; 2012. p. in press.
4. BAuA AfrG-A-Gh-. TRGS 401 Gefährdung durch Hautkontakt Ermittlung – Beurteilung – Maßnahmen. [http://www.bgw-
onlinede/internet/generator/Inhalt/OnlineInhalt/Medientypen/Technische_20Regel/TRGS401_Gefaehrdung_dur
ch_HautkontakthtmlBundesarbeitsblatt](http://www.bgw-
onlinede/internet/generator/Inhalt/OnlineInhalt/Medientypen/Technische_20Regel/TRGS401_Gefaehrdung_dur
ch_HautkontakthtmlBundesarbeitsblatt) Bundesministerium für Arbeit und Soziales (BMAS)
Gemeinsamen Ministerialblatt (GMBI) 2011 S 175 [Nr 9]. 2011;9(9):175.
5. Choi JM, Lee JY, Cho BK. Chronic irritant contact dermatitis: recovery time in man. *Contact Dermatitis.* 2000;42(5):264-9. Epub 2000/05/02.
6. di Nardo A, Sugino K, Wertz P, Ademola J, Maibach HI. Sodium lauryl sulfate (SLS) induced irritant contact dermatitis: a correlation study between ceramides and in vivo parameters of irritation. *Contact Dermatitis.* 1996;35(2):86-91. Epub 1996/08/01.
7. Fartasch M. Ultrastructure of the epidermal barrier after irritation. *Microscopy research and technique.* 1997;37(3):193-9. Epub 1997/05/01.
8. Frosch PJ, Kurte A. Efficacy of skin barrier creams (IV). The repetitive irritation test (RIT) with a set of 4 standard irritants. *Contact Dermatitis.* 1994;31(3):161-8. Epub 1994/09/01.
9. Frosch PJ, Schulze-Dirks A, Hoffmann M, Axthelm I, Kurte A. Efficacy of skin barrier creams (I). The repetitive irritation test (RIT) in the guinea pig. *Contact Dermatitis.* 1993;28(2):94-100. Epub 1993/02/01.
10. Lee CH, Maibach HI. Study of cumulative irritant contact dermatitis in man utilizing open application on subclinically irritated skin. *Contact Dermatitis.* 1994;30(5):271-5. Epub 1994/05/01.
11. Schliemann-Willers S, Fuchs S, Kleesz P, Grieshaber R, Elsner P. Fruit acids do not enhance sodium lauryl sulphate-induced cumulative irritant contact dermatitis in vivo. *Acta Derm Venereol.* 2005;85(3):206-10. Epub 2005/07/26.
12. Schliemann-Willers S, Wigger-Alberti W, Elsner P. Efficacy of a new class of perfluoropolyethers in the prevention of irritant contact dermatitis. *Acta Derm Venereol.* 2001;81(6):392-4. Epub 2002/02/28.



13. Schnetz E, Diepgen TL, Elsner P, Frosch PJ, Klotz AJ, Kresken J, et al. Multicentre study for the development of an in vivo model to evaluate the influence of topical formulations on irritation. *Contact Dermatitis*. 2000;42(6):336-43. Epub 2000/06/28.
14. Widmer J, Elsner P, Burg G. Skin irritant reactivity following experimental cumulative irritant contact dermatitis. *Contact Dermatitis*. 1994;30(1):35-9. Epub 1994/01/01.
15. Wigger-Alberti W, Krebs A, Elsner P. Experimental irritant contact dermatitis due to cumulative epicutaneous exposure to sodium lauryl sulphate and toluene: single and concurrent application. *Br J Dermatol*. 2000;143(3):551-6. Epub 2000/09/06.
16. Halkier-Sorensen L. Occupational skin diseases. *Contact Dermatitis*. 1996;35(1 Suppl):1-120. Epub 1996/01/01.
17. Meyer JD, Chen Y, Holt DL, Beck MH, Cherry NM. Occupational contact dermatitis in the UK: a surveillance report from EPIDERM and OPRA. *Occup Med (Lond)*. 2000;50(4):265-73. Epub 2000/07/27.
18. Dickel H, Kuss O, Blesius CR, Schmidt A, Diepgen TL. Occupational skin diseases in Northern Bavaria between 1990 and 1999: a population-based study. *Br J Dermatol*. 2001;145(3):453-62. Epub 2001/09/05.
19. Wigger-Alberti W, Spoo J, Schliemann-Willers S, Klotz A, Elsner P. The tandem repeated irritation test: a new method to assess prevention of irritant combination damage to the skin. *Acta Derm Venereol*. 2002;82(2):94-7. Epub 2002/07/20.
20. Kartono F, Maibach HI. Irritants in combination with a synergistic or additive effect on the skin response: an overview of tandem irritation studies. *Contact Dermatitis*. 2006;54(6):303-12. Epub 2006/06/22.
21. Elsner P, Wigger-Alberti W, Pantini G. Perfluoropolyethers in the prevention of irritant contact dermatitis. *Dermatology*. 1998;197(2):141-5. Epub 1998/09/10.
22. Wahlberg J. Erythema-inducing effects of solvents following epicutaneous administration to man studied by laser Doppler flowmetry. *Scand J Work Environ Health* 1984a(10):159-62.
23. Endo K, Suzuki N, Yoshida O, Sato H, Fujikura Y. The barrier component and the driving force component of transepidermal water loss and their application to skin irritant tests. *Skin Res Technol*. 2007;13(4):425-35. Epub 2007/10/03.
24. Zhai H, Leow YH, Maibach HI. Human barrier recovery after acute acetone perturbation: an irritant dermatitis model. *Clinical and experimental dermatology*. 1998;23(1):11-3. Epub 1998/07/17.
25. Broding HC, van der Pol A, de Sterke J, Monse C, Fartasch M, Bruning T. In vivo monitoring of epidermal absorption of hazardous substances by confocal Raman micro-spectroscopy. *J Dtsch Dermatol Ges*. 2011;9(8):618-27. Epub 2011/07/28.
26. Brooke I, Cocker J, Delic JI, Payne M, Jones K, Gregg NC, et al. Dermal uptake of solvents from the vapour phase: an experimental study in humans. *Ann Occup Hyg*. 1998;42(8):531-40. Epub 1998/12/05.
27. Zissu D. Experimental study of cutaneous tolerance to glycol ethers. *Contact Dermatitis*. 1995;32(2):74-7. Epub 1995/02/01.
28. Lessmann H, Schnuch A, Geier J, Uter W. Skin-sensitizing and irritant properties of propylene glycol. *Contact Dermatitis*. 2005;53(5):247-59. Epub 2005/11/15.
29. Agner T, Serup J. Contact thermography for assessment of skin damage due to experimental irritants. *Acta Derm Venereol*. 1988;68(3):192-5. Epub 1988/01/01.
30. Andersen PH, Maibach HI. Skin irritation in man: a comparative bioengineering study using improved reflectance spectroscopy. *Contact Dermatitis*. 1995;33(5):315-22. Epub 1995/11/01.
31. Clemmensen A, Andersen KE, Clemmensen O, Tan Q, Petersen TK, Kruse TA, et al. Genome-wide expression analysis of human in vivo irritated epidermis: differential profiles induced by sodium lauryl sulfate and nonanoic acid. *J Invest Dermatol*. 2010;130(9):2201-10. Epub 2010/04/30.
32. Fullerton A, Rode B, Serup J. Skin irritation typing and grading based on laser Doppler perfusion imaging. *Skin Res Technol*. 2002;8(1):23-31. Epub 2002/05/15.
33. Grangso A, Leijon-Kuligowski A, Torma H, Roomans GM, Lindberg M. Different pathways in irritant contact eczema? Early differences in the epidermal elemental content and expression of cytokines after application of 2 different irritants. *Contact Dermatitis*. 1996;35(6):355-60. Epub 1996/12/01.
34. Wahlberg JE, Maibach HI. Nonanoic acid irritation - a positive control at routine patch testing? *Contact Dermatitis*. 1980;6(2):128-30. Epub 1980/01/01.
35. Willis CM, Stephens CJ, Wilkinson JD. Epidermal damage induced by irritants in man: a light and electron microscopic study. *J Invest Dermatol*. 1989;93(5):695-9. Epub 1989/11/01.
36. Daniell W, Stebbins A, Kalman D, O'Donnell JF, Horstman SW. The contributions to solvent uptake by skin and inhalation exposure. *American Industrial Hygiene Association journal*. 1992;53(2):124-9. Epub 1992/02/01.



37. Hino R, Nishio D, Kabashima K, Tokura Y. Percutaneous penetration via hand eczema is the major accelerating factor for systemic absorption of toluene and xylene during car spray painting. *Contact Dermatitis*. 2008;58(2):76-9. Epub 2008/01/12.
38. Kezic S, Monster AC, van de Gevel IA, Kruse J, Opdam JJ, Verberk MM. Dermal absorption of neat liquid solvents on brief exposures in volunteers. *AIHAJ : a journal for the science of occupational and environmental health and safety*. 2001;62(1):12-8. Epub 2001/03/22.
39. Information „Allgemeine Präventionsleitlinie Hautschutz“, (2009).
40. Fartasch M, Diepgen TL, Drexler H, Elsner P, Fluhr JW, John SM, et al. Berufliche Hautmittel AWMF-Leitlinien-Register Nr.013/056. <http://www.awmforg/leitlinien/aktuelle-leitlinien/ll-liste/deutsche-dermatologische-gesellschaft-ddghtml>. 2008.
41. Berndt U, Gabard B, Schliemann-Willers S, Wigger-Alberti W, Zitterbart D, Elsner P. Integrated Skin Protection from Workplace Irritants: A New Model for Efficacy Assessment. *Exogenous Dermatology*. 2002(1):45-8.
42. Kutting B, Baumeister T, Weistenhofer W, Pfahlberg A, Uter W, Drexler H. Effectiveness of skin protection measures in prevention of occupational hand eczema: results of a prospective randomized controlled trial over a follow-up period of 1 year. *Br J Dermatol*. 2010;162(2):362-70. Epub 2009/10/07.
43. Pittermann WF, Kietzmann M. (Bovine udder skin (BUS): testing skin compatibility and skin protection). *Altex*. 2006;23(23):65-71.
44. zur Muhlen A, Klotz A, Allef P, Weimans S, Veeger M, Thorner B, et al. Using skin models to assess the effects of a pre-work cream. Methodological aspects and perspective of the industry. *Curr Probl Dermatol*. 2007;34:19-32. Epub 2007/02/22.
45. Schliemann S, Antonov D, Manegold N, Elsner P. The lactic acid stinging test predicts susceptibility to cumulative irritation caused by two lipophilic irritants. *Contact Dermatitis*. 2010;63(6):347-56. Epub 2010/11/03.
46. Schliemann S, Antonov D, Manegold N, Elsner P. Sensory irritation caused by two organic solvents-short-time single application and repeated occlusive test in stingers and non-stingers. *Contact Dermatitis*. 2011. Epub 2011/06/23.
47. Berardesca E. EEMCO guidance for the assessment of stratum corneum hydration: electrical methods. *Skin Research and Technology*. 1997;3:126-32.
48. Berardesca E, Leveque JL, Masson P. EEMCO guidance for the measurement of skin microcirculation. *Skin pharmacology and applied skin physiology*. 2002;15(6):442-56. Epub 2002/12/12.
49. Pinnagoda J, Tupker RA, Agner T, Serup J. Guidelines for transepidermal water loss (TEWL) measurement. A report from the Standardization Group of the European Society of Contact Dermatitis. *Contact Dermatitis*. 1990;22(3):164-78. Epub 1990/03/01.
50. Tupker RA, Willis C, Berardesca E, Lee CH, Fartasch M, Agner T, et al. Guidelines on sodium lauryl sulfate (SLS) exposure tests. A report from the Standardization Group of the European Society of Contact Dermatitis. *Contact Dermatitis*. 1997;37(2):53-69. Epub 1997/08/01.
51. Frosch PJ, Kligman AM. The soap chamber test. A new method for assessing the irritancy of soaps. *J Am Acad Dermatol*. 1979;1(1):35-41. Epub 1979/07/01.
52. Goldsmith LB, Friberg SE, Wahlberg JE. The effect of solvent extraction on the lipids of the stratum corneum in relation to observed immediate whitening of the skin. *Contact Dermatitis*. 1988;19(5):348-50. Epub 1988/11/01.
53. Wahlberg JE. Edema-inducing effects of solvents following topical administration. *Derm Beruf Umwelt*. 1984;32(3):91-4. Epub 1984/01/01.
54. Pinheiro J, Bates D. *Mixed-effect models in S and S-Plus*. 1st ed. Hedelberg: Springer; 2000.
55. Bates D, Sakar D. *lme4: Linear mixed effects using S4 classes*. 2007.
56. Toxicology and carcinogenesis studies of cumene (CAS No. 98-82-8) in F344/N rats and B6C3F1 mice (inhalation studies). National Toxicology Program technical report series. 2009(542):1-200. Epub 2009/04/03.
57. Rowse DH, Emmett EA. Solvents and the skin. *Clinics in occupational and environmental medicine*. 2004;4(4):657-730, vi. Epub 2004/10/07.
58. Fulzele SV, Babu RJ, Ahaghotu E, Singh M. Estimation of proinflammatory biomarkers of skin irritation by dermal microdialysis following exposure with irritant chemicals. *Toxicology*. 2007;237(1-3):77-88. Epub 2007/06/19.
59. Iyadomi M, Higaki Y, Ichiba M, Morimoto M, Tomokuni K. Evaluation of organic solvent-induced inflammation modulated by neuropeptides in the abdominal skin of hairless rats. *Ind Health*. 1998;36(1):40-51. Epub 1998/02/25.
60. Kim D, Andersen ME, Nylander-French LA. Dermal absorption and penetration of jet fuel components in humans. *Toxicol Lett*. 2006;165(1):11-21. Epub 2006/02/25.



**Universitätsklinikum
Jena**

61. Korinth G, Luersen L, Schaller KH, Angerer J, Drexler H. Enhancement of percutaneous penetration of aniline and o-toluidine in vitro using skin barrier creams. *Toxicology in vitro : an international journal published in association with BIBRA*. 2008;22(3):812-8. Epub 2007/12/25.