

# Prävention gegen lipophile Noxen durch Hautschutzprodukte

W. Pittermann<sup>1</sup>, W. Holtmann<sup>1</sup> und M. Kietzmann<sup>2</sup>

(eingegangen am 30. I. 2003, angenommen am 16. 4. 2003)

**Zusammenfassung:** *Einleitung:* Nach wie vor gibt es einen großen Bedarf an systematischen Untersuchungen zur Wirksamkeit von Hautschutzprodukten. Während der Wirksamkeitsnachweis für wasserlösliche Schadstoffe mit SLS als Modellnoxe als gesichert erscheint, sind den entsprechenden Studien mit fettlöslichen Noxen experimentelle und ethische Grenzen gesetzt. Das Ziel dieser in-vitro-Studie war, das Schutzpotenzial von acht markt gängigen Produkten, sowie zwei Positivkontrollen (Magistralrezepturen: Wollwachsalkoholsalbe, Vaseline) und einer Negativkontrolle (Marktprodukt als W/O-Emulsion) gegen die lipophile Modellnoxe Toluol vergleichend zu prüfen.

*Methode:* Vier Produkte stellten O/W-Emulsionen dar, drei waren Suspensionen und zusätzlich eine Hydrogelformulierung mit der Auslobung: wirksam gegen wasserunlösliche oder wasserlösliche/wasserunlösliche Noxen. Als Modell diente die Haut des isoliert perfundierten Rindereuter (BUS-Modell), die einen aktiven Stoffwechsel mit einer funktionsfähigen Barriere aufweist. Das Prüfdesign erlaubt die gleichzeitige Prüfung der Hautverträglichkeit der Schutz- bzw. Referenzprodukte, der Noxeneigenschaften sowie der Noxewirkung auf die vorbehandelte Haut.

Fünfzehn Minuten nach Applikation der Schutz- bzw. Referenzprodukte wurde Toluol, unverdünnt aufgebracht: Nach weiteren 15 Minuten, 1,0 und 5,0 Stunden wurden Ganzhautbiopsien zur biochemischen Bestimmung der zytotoxischen (MTT-Test) und zellreizenden (PGE<sub>2</sub>-Konzentration) Eigenschaften entnommen. Neben der Hauptstudie an der behaarten Euterhaut (n = 4) wurde eine entsprechende Versuchsanordnung (n = 2) an der nicht-behaarten Zitzenhaut durchgeführt.

*Ergebnis:* Die toxische Wirkung von Toluol beruht auf einer fortschreitenden Zytotoxizität und einer geringen Zunahme der PGE<sub>2</sub>-Konzentration im Hautgewebe. Beide Referenzprodukte reduzierten den Toluolschaden bereits nach 15 Minuten statistisch signifikant um 70 %, während die Negativkontrolle kein Schutzpotenzial zeigte. Zwei Marktprodukte (Suspension, O/W-Emulsion) wiesen ein den Positivkontrollen vergleichbares Schutzpotenzial auf. Bei drei Marktprodukten (Suspension, O/W-Emulsionen) war das Schutzpotenzial mittelgradig und bei weiteren drei Produkten (Suspension, O/W-Emulsion, Hydrogel) war nur eine geringe Schutzwirkung zu beobachten. Nach längerer Expositionszeit (1,0h und 5,0h) war eine Zunahme des Schutzpotenzials nur bei der Negativkontrolle und den Produkten mit geringgradiger Wirkung zu messen. Vergleichbare Resultate wurden in den Untersuchungen auf unbehaarter Haut erzielt.

*Schlussfolgerung:* Die Negativkontrolle, ein Marktprodukt (W/O-Emulsion) mit Schutzpotenzial nur gegen wasserlösliche Noxen zeigte im Unterschied zu allen anderen geprüften Produkten keine Schutzwirkung. Damit erfüllen alle acht getesteten Marktprodukte den Nachweis eines, wenngleich differenzierten Schutzpotenzials gegen die lipophile Modellnoxe Toluol.

**Schlüsselwörter:** Hautschutzmittel – Toluol – Wollwachsalkoholsalbe – Vaseline – in-vitro – Rindereutermodell – Zellschädigung – Zellreizung

**Abstract:** *Aim of the study:* There is a widely accepted need for systemic investigations regarding the efficacy of skin protection products used in occupational health care. The efficacy of such products has been established for water-soluble irritants, such as SLS, but the use in studies of lipid-soluble irritants, such as tolu-

ene, poses experimental and ethical problems. The aim of the in-vitro study using toluene was to demonstrate the skin protecting properties of eight commercially available products and two positive controls (lanolin alcohol, petrolatum) and one market product (W/O emulsion) used as negative control. Four of the eight products were emulsions of the O/W type, three products were suspensions and one product was described as a hydrogel formulation. All of them claimed to be protective either against water-insoluble or water-soluble/water-insoluble irritants.

*Method:* The viable, natural skin of the isolated, perfused, bovine udder (BUS model) was used as the in-vitro model. Continuously oxygenised perfusion maintains skin metabolism and the performance of the barrier within the horny layer for more than 8 hours. Using whole skin biopsies the degree of irritation is measured by evaluating the irritancy (PGE<sub>2</sub> concentration) and cytotoxicity (MTT assay). The BUS study design allows the simultaneous evaluation of the status of the untreated skin, the skin-compatibility of the products/reference substances, the irritation capability of toluene itself, and finally the irritation capability of toluene applied to the skin pre-treated with the products 15 minutes previously. The first samples of whole skin biopsies were taken 15 minutes after the toluene was applied. The following exposure periods were 1 hour and a prolonged exposure period of 5 hours. In addition to the main study using the hairy skin (follicular) of the lateral udder (n = 4) in a 2<sup>nd</sup> study (n = 2) the hairless skin of the teats was used for the assay.

*Results:* The local effects of toluene are based on progressive cytotoxicity and a slight increase in the PGE<sub>2</sub> concentration in the skin tissue. Both reference substances (lanolin alcohol, petrolatum) reduced significantly the toluene-related alterations by approx. 70 % within 15 minutes after application of the toluene. In contrast, the negative reference (W/O emulsion) did not influence the tissue reactions induced by toluene at all.

Two (suspension, O/W emulsion) of the eight market products were comparable to the reference substances regarding their protective potential. Three market products (suspension, O/W emulsion) had a moderate degree of protective potential, while three other market products (suspension, O/W emulsion, and hydrogel) had a low degree of protective potential.

After exposure for 1 hour and 5 hours, only the negative control and the products with the low performance demonstrated a distinct increase in protective potential. No distinct difference was observed between the results after exposure for 1 hour and 5 hours. Similar results were obtained after application on the hairless skin of the teats.

*Conclusions:* None of the eight market products was comparable with the negative reference (market product) formulated as a W/O emulsion. This product claimed to protect against water-soluble irritants only. In this assay it proved to be ineffective against lipid-soluble irritants, such as toluene. All skin protection products tested in the BUS model showed a certain degree of protective potential against the lipophilic model toxicant, toluene.

**Keywords:** skin protection products – lipophilic irritant – toluene, in vitro – bovine udder skin model (BUS) – petrolatum

Arbeitsmed.Sozialmed.Umweltmed. 38 (2003) 435–442

**Einleitung**

Topische Hautschutzprodukte gehören zur persönlichen Schutzausrüstung (PSA), deren Bereitstellung durch den Arbeitgeber gesetzlich eingefordert ist. Für diese Produktkategorie sind die entsprechenden Wirksamkeitsnachweise zu fordern. Nach wie vor gibt es einen großen Bedarf an systematischen Untersuchungen zu Wirksamkeit von Hautschutzprodukten. In neuerer Zeit wird daher der Hautschutz als Forschungsgebiet von Dermatologen bearbeitet (Rast 2001). Zusätzliche Impulse haben neue biophysikalische Methoden gegeben, wie sie für den Wirksamkeitsnachweis von Kosmetika eingesetzt werden. Damit eröffnete sich die Möglichkeit, die Produkteffizienz mit Reizmodellen und induzierter Schädigung unter Laborbedingungen zu überprüfen (Berndt et al. 1999, Lachapelle 1996).

Als Modellnoxen werden in Probandenstudien meist reine Chemikalien verwendet, wobei sich SLS (Natriumlaurylsulfat) als hydrophile, Toluol hingegen als lipophile Noxe herausgebildet haben (Schnetz et al. 2000). Allerdings hat die Bedeutung von Toluol als typisches organisches Lösungsmittel in der Arbeitswelt in den letzten Jahren abgenommen. Neben ethischen Bedenken weist die Noxe Toluol Nachteile auf, die dem Einsatz in Humanstudien entgegenstehen: Im Gegensatz zu SLS kann eine Dosis-Wirkungsbeziehung weder mit biophysikalischen Messungen noch mit visueller Bewertung sicher reproduziert werden. Zudem ist die individuelle Reaktion auf Toluoleinwirkung nicht vorhersehbar. Daher erfolgte in der jüngst publizierten Ringstudie keine Bewertung der Schutzwirkung gegen Toluol, die der Absicherung gegen SLS im ROIT (Repeated Occlusive Irritation Test) vergleichbar wäre (Schnetz et al. 2000). Andere Autoren berichten ebenfalls über experimentelle Schwierigkeiten in der Wirksamkeitsprüfung gegen diese Noxe (Wigger-Alberti et al. 1998).

Grundsätzlich waren daher Prüfanordnungen zu suchen, die diese Einschränkungen nicht aufweisen, wie zum Beispiel in-vitro-Methoden mit funktionell intakten Hautstrukturen. Diese Bedingungen finden sich in isoliert perfundierten Organen in Verbindung mit Haut als Zielorgan. Beispiele sind die perfundierten Organmodelle, wie etwa die Schweinepote, das Schweineohr oder das Rindereuter (Pittermann 2000). Das Hautmodell des isoliert perfundierten Rindereuter (BUS-Modell = Bovine Udder Skin) wurde 1993 eingeführt. Seither wurden u. a. die Penetration von Arzneimitteln, kosmetischen Wirk- und Inhaltsstoffen unter leave-on/rinse-off-Bedingungen oder die zelluläre Reaktion nach topischer Applikation von pharmakologischen, kosmetischen und anderen Stoffen oder Produkten untersucht (Kietzmann et al. 1993, Pittermann et al. 1997, Förster et al. 1997, Förster et al. 1999, Lampen et al. 2003, Bäumer und Kietzmann 2001).

Auf dieser experimentellen Basis wurde für die Testung von Hautschutzprodukten das im folgenden beschriebene zweistufige Prüfdesign mit invasiver Messmethodik entwickelt. Insgesamt wurden acht

Marktprodukten im Vergleich zu zwei Positiv- und einer Negativkontrolle als Referenzprodukte in ihrer Schutzwirkung gegen die Modellnoxe Toluol geprüft.

**Material und Methode**

*BUS-Modell*

Die kontinuierliche Perfusion des isoliert perfundierten Rindereuter mit oxigener Tyrodelösung ermöglicht die Lebensfähigkeit der Haut unter aeroben Stoffwechselbedingungen über mehr als 8 Stunden, wobei Hautbarriere (TEWL-Messung) und Metabolismus aktiv bleiben (Kietzmann et al. 1993, Pittermann et al. 2000). Zu den weiteren Vorteilen zählen die große Applikationsfläche (bis 400 cm<sup>2</sup>/Euterseite), so dass komplexe Prüfanordnungen kostengünstig durchgeführt werden können. Die seitliche, behaarte Euterhaut ist dünn und histologisch der Haut des Handrückens vergleichbar. Die unbehaarte Zitzenhaut ist wegen der mechanischen Belastung dick, straff strukturiert und histologisch vergleichbar mit der Handinnenfläche (Greiffläche).

Mit Biopsien werden alle Hautschichten erfasst, um die zelluläre Reaktion der Eicosanoidfreisetzung (PGE<sub>2</sub>) und die Zellschädigung (Zytotoxizität) nach topischer Applikation biochemisch zu verfolgen (Pittermann et al. 1997, Bäumer und Kietzmann 2001, Nicotera 1996). Von behandelten und unbehandelten Arealen wird die Hautprobe mit Stanzen (Fa. Stiefel, Deutschland; D = 6 mm) entnommen und bei -20 °C zwischengelagert. Anschließend wird der modifizierte MTT-Test (µg Formazan/µg DNA) durchgeführt und die Konzentration von Prostaglandin E<sub>2</sub> (ng PGE<sub>2</sub>/µg DNA) (Kietzmann et al. 1993) im Hautgewebe bestimmt (Institut für Pharmakologie, Toxikologie und Pharmazie, Tierärztliche Hochschule Hannover).

*Material und Applikation*

Die Modellnoxe Toluol p. a. (Fa. Merck, Deutschland) wurde unverdünnt verwendet und weist unter den lipidlöslichen Noxen eine mittlere Polarität auf. Als Positivkontrolle wurden die Magistralrezepturen Wollwachsalkoholsalbe, wasserhaltig (Ungt. Alcohol. Lanae aq.; DAB 99; Fa. Caelo, Hilden) und Vaseline (Vaselinum album DAB 99; Fa. Caeleo, Hilden) eingesetzt. Ein Marktprodukt (W/O-Emulsion) das als Schutz gegen hydrophile Noxen ausgelobt wird, diente als Negativkontrolle. Alle eingesetzten Marktprodukte sind

Code	Typ der Zubereitung	Auslobung
G	Suspension	gegen wasserunlösliche Noxen
H	Suspension	gegen wasserunlösliche Noxen
C	Suspension	gegen wasserlösliche/wasserunlösliche Noxen
D	O/W-Emulsion	gegen wasserlösliche/wasserunlösliche Noxen
E	O/W-Emulsion	gegen wasserunlösliche Noxen
F	Hydrogel	gegen wasserlösliche/wasserunlösliche Noxen
P1	Ungt. Alcohol. Lanae aq. DAB 99	Positivkontrolle
P2	Vaselinum album DAB 99	Positivkontrolle
A	O/W-Emulsion	gegen wasserlösliche/wasserunlösliche Noxen
Ne	W/O-Emulsion	„bewahrt die Haut vor äußeren Einflüssen“ (Negativkontrolle)
B	O/W-Emulsion	gegen wasserlösliche/wasserunlösliche Noxen

Tab. 1: Eingesetzte Testprodukte: Hautschutzprodukte, Negativkontrolle (Marktprodukte), Positivkontrollen (Magistralrezepturen); Code, Typ der Zubereitung, Auslobung

in Tabelle 1 beschrieben. Die Produkte werden ausgelobt als wirksam gegen wasserunlösliche (lipophil) oder wasserlösliche/wasserunlösliche Noxen.

Die Produkte und Proben wurden von den beteiligten Firmen aus dem Bundesverband Handschutz e.V. (Beiersdorf AG; Peter Greven Fett-Chemie GmbH und Co. KG; Physiaderm GmbH und Co. KG; Ursula Rath GmbH und Co. KG; Singer-Kosmetik GmbH; Stockhausen GmbH und Co. KG; Paul Voormann GmbH; Carl Wilden GmbH) individuell kodiert geliefert. Die Koordination und Beauftragung der Studie erfolgte durch Dr. D. Mehlan (Ursula Rath GmbH und Co. KG).

Alle Markt- und Referenzprodukte wurden anschließend einheitlich verschlüsselt zu Simred GmbH (Großburgwedel) geschickt, wo dem Prüfplan entsprechend die Applikation und Entnahme der Hautproben erfolgte.

Die Rindereuter sind Schlachthofmaterial und werden nach dem Transport im Labor gereinigt und rasiert. Etwa eine Stunde nach aerober Adaption des Stoffwechsels durch die Perfusion mit oxigenerter, erwärmter Tyrodelösung wurden die Testsubstanzen appliziert (Kietzmann et al. 1993).

Die Prüfanordnung mit sechs Testarealen umfasste neben der unbehandelten Kontrolle die Einzelprüfung (2 Prüfprodukte, Toluol) sowie die Vorbehandlung mit dem jeweiligen Schutzprodukt und nachfolgendem Auftrag der Noxe, d. h. die Kombination von Schutzprodukt und Toluol. Diese Anordnung mit dem direkten Vergleich zweier, zufällig ausgewählter Schutzprodukte erfolgte in der behaarten Haut (follikulär) von jeweils vier Eutern, insgesamt 24. Für die Prüfung auf der unbehaarten Haut (afollikulär) wurden nur

jeweils zwei Euter eingesetzt, wobei aus anatomischen Gründen (4 Zitzen/Euter) die Einzelprüfung entfiel. Nach der Anwendung (2 g/100 cm<sup>2</sup>) wirkten die Produkte über 15 Minuten auf die Haut ein. Anschließend wurde Toluol mittels eines Glasspatels appliziert (1 ml/100 cm<sup>2</sup>). Nach einer Einwirkzeit von 15 Minuten wurde die erste Hautstanze (0,25 h), nach 1,0 h die zweite und nach 5,0 h die dritte Biopsie entnommen. Auf diese Weise wird die Hautverträglichkeit der Markt- und Referenzprodukte, der individuelle Irritationsgrad der Noxe und schließlich das Schutzpotenzial der Produkte nach unmittelbarem Kontakt mit der Noxe (15 Minuten) sowie über einem längeren Expositionszeitraum (1,0 h und 5,0 h) geprüft (Tab. 2).

**Auswertung und Statistik**

Das Irritationspotenzial von Toluol und die Schutzwirkung der Referenzprodukte auf der behaarten Haut (n = 4) wurden mit einer Varianzanalyse einschließlich des LSD-Testes für multiple Vergleiche abgesichert. Statistisch erfasst wurden die MTT-Werte und die PGE<sub>2</sub>-Gewebskonzentration über alle Expositionszeiten. Die Signifikanzbereiche werden in den Abbildungen wie folgt gekennzeichnet: (\*) p ≤ 0,1; \* p ≤ 0,05; \*\* p ≤ 0,01; \*\*\* p ≤ 0,001.

Die Schutzwirkung der einzelnen Marktprodukte wurden nicht statistisch bearbeitet, jedoch mittels einer Maßzahl (Score-Wert) direkt mit dem Schutzpotenzial der Referenzprodukte abgeglichen. Um vergleichbare Ergebnisse zu erhalten, wurde aus den MTT-Daten und der PGE<sub>2</sub>-Konzentration

**Toluol (Gesamtstudie)**

			0,25 h		1,0 h		5,0 h	
			Expositionszeit unbehandelt Toluol		Expositionszeit unbehandelt Toluol		Expositionszeit unbehandelt Toluol	
MTT	MW	n = 24	1,10	0,96	1,08	0,89	1,02	0,77
	Stabw		0,08	0,07	0,08	0,08	0,08	0,08
PGE <sub>2</sub>	MW	n = 24	0,55	0,58	0,55	0,64	0,54	0,60
	Stabw		0,04	0,03	0,04	0,03	0,04	0,03

**Hautschutz durch Referenzprodukte**

			0,25 h Expositionszeit			1,0 h Expositionszeit			5,0 h Expositionszeit					
			unbehandelt	PI + Toluol	P2 + Toluol	unbehandelt	PI + Toluol	P2 + Toluol	unbehandelt	PI + Toluol	P2 + Toluol			
MTT	MW	n = 4	1,07	0,93	1,01	1,03	1,05	0,83	0,97	0,97	1,01	0,70	0,89	0,91
	Stabw		0,05	0,03	0,03	0,04	0,04	0,03	0,01	0,05	0,03	0,03	0,03	0,02
PGE <sub>2</sub>	MW	n = 4	0,54	0,58	0,57	0,56	0,54	0,63	0,59	0,57	0,53	0,60	0,57	0,55
	Stabw		0,06	0,01	0,02	0,03	0,05	0,03	0,03	0,05	0,03	0,02	0,02	0,04

			0,25 h Expositionszeit			1,0 h Expositionszeit			5,0 h Expositionszeit		
			unbehandelt	Ne + Toluol	unbehandelt	Ne + Toluol	unbehandelt	Ne + Toluol	unbehandelt	Ne + Toluol	
MTT	MW	n = 4	1,02	0,87	0,87	0,99	0,77	0,82	0,93	0,67	0,72
	Stabw		0,08	0,07	0,09	0,07	0,09	0,08	0,07	0,08	0,09
PGE <sub>2</sub>	MW	n = 4	0,53	0,57	0,57	0,55	0,62	0,58	0,55	0,60	0,58
	Stabw		0,02	0,04	0,01	0,04	0,04	0,05	0,03	0,04	0,02

Tab. 2: Mittelwerte, Standardabweichung: MTT-Test (µg Formazan/µg DNA); PGE<sub>2</sub>-Konzentration (ng PGE<sub>2</sub>/µg DNA). Gesamtstudie: Wirkung von Toluol auf die unbehandelte Haut. Hautschutz durch Referenzprodukte: Positivkontrollen (PI, P2); Negativkontrolle (Ne)

tration in Relation zur unbehandelten Hautfläche (= 100 %) ein kombinierter, gewichteter Score-Wert gebildet. Der Umfang (%) der Schutzwirkung der Produkte und Referenzsubstanzen entspricht der Reduktion des Schadenspotenzials von Toluol (= 100 %) zu den einzelnen Expositionszeiten.

**Ergebnisse**

**Follikuläre Haut (Hautverträglichkeit)**  
**Toluol:** Die lipophile Noxe Toluol löst nach 15 Minuten eine signifikante Zellschädigung (MTT-Test: Zytotoxizität) aus, die über die gesamte Expositionszeit deutlich zunimmt. Nach 5,0 h sind etwa 30 % der Zellen im Vergleich zum Kontrollareal geschädigt. Hingegen wird das Potenzial der Zellreizung (Zunahme der PGE<sub>2</sub>-Gewebskonzentration) erst nach längerer Expositionszeit (1,0 h) wirksam und ist im Gegensatz zur Zytotoxizität nach 5,0 h reversibel (Tab. 2; Abb. 1, 2, 3, 6).

**Referenzprodukte/Marktprodukte:** Die Magistralrezepturen (P1, wasserhaltige Wollwachsalkoholsalbe; P2, Vaseline) und die Negativkontrolle (Ne; Marktprodukt) sind erwartungsgemäß über den gesamten Expositionszeitraum sehr hautverträglich (Abb. 1). Weder unmittelbar nach der Applikation noch nach längerer Exposition (1,0 h/5,0 h) werden biochemisch Veränderungen im Vergleich zur unbehandelten Haut beobachtet. Die acht Marktprodukte, deren Schutzpotenzial geprüft wird, weisen ebenfalls eine sehr gute Hautverträglichkeit auf und unterscheiden sich nicht von den Referenzprodukten. Ebenso war keine Produktdifferenzierung hinsichtlich der Hautverträglichkeit zu erkennen (Abb. 1).

**Follikuläre Haut (Schutzwirkung)**

**Referenzprodukte:** Beide Magistralrezepturen erzielen bereits unmittelbar nach der Noxenexposition eine statistisch signifikante Schutzwirkung, die sich hauptsächlich auf das zytotoxische Potenzial von Toluol bezieht (Tab. 2, Abb. 4). Das Schadenspotenzial von Toluol (= 100 %) wird durch die Vorbehandlung bereits nach 15 Minuten um 65 % signifikant reduziert. Diese Schutzwirkung nimmt im weiteren Verlauf noch zu (Abb. 5A). Während für die Wollwachsalkoholsalbe (P1) mit der Expositionszeit von 1,0 h die maximale Reduktion (79 %) erreicht wird und nach 5,0 h abnimmt (71 %), bleibt für Vaseline (P2) das hohe Schutzniveau (1,0 h: 81 %; 5,0 h: 83 %) erhalten. Für die Negativkontrolle (Ne; Marktprodukt), des-

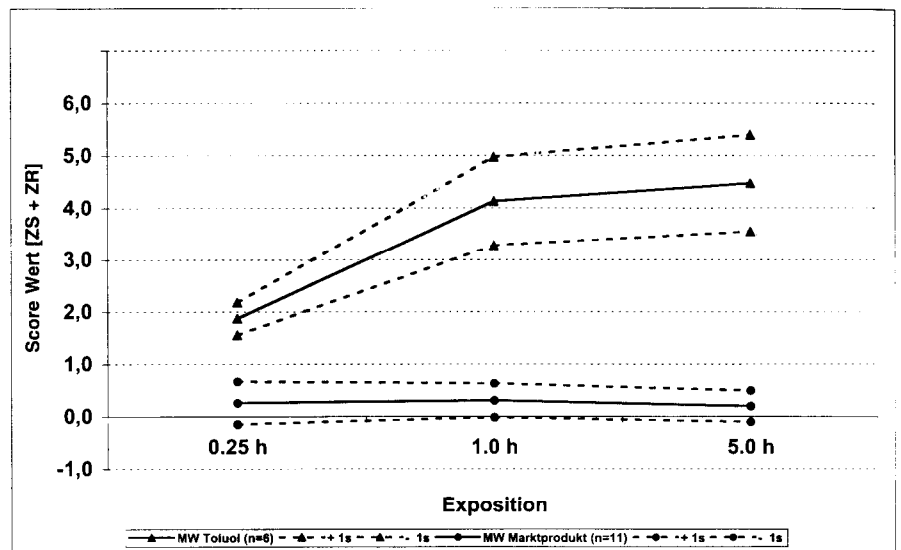


Abb. 1: Hautverträglichkeit in follikulärer Haut (Score-Werte [ZS = Zellschädigung + ZR = Zellreizung]; MW, ± 1 s) der elf Testprodukte (Positivkontrollen, Marktprodukte) und sechs Toluolstudien (Expositionszeiten: 0,25 h, 1,0 h und 5,0 h)

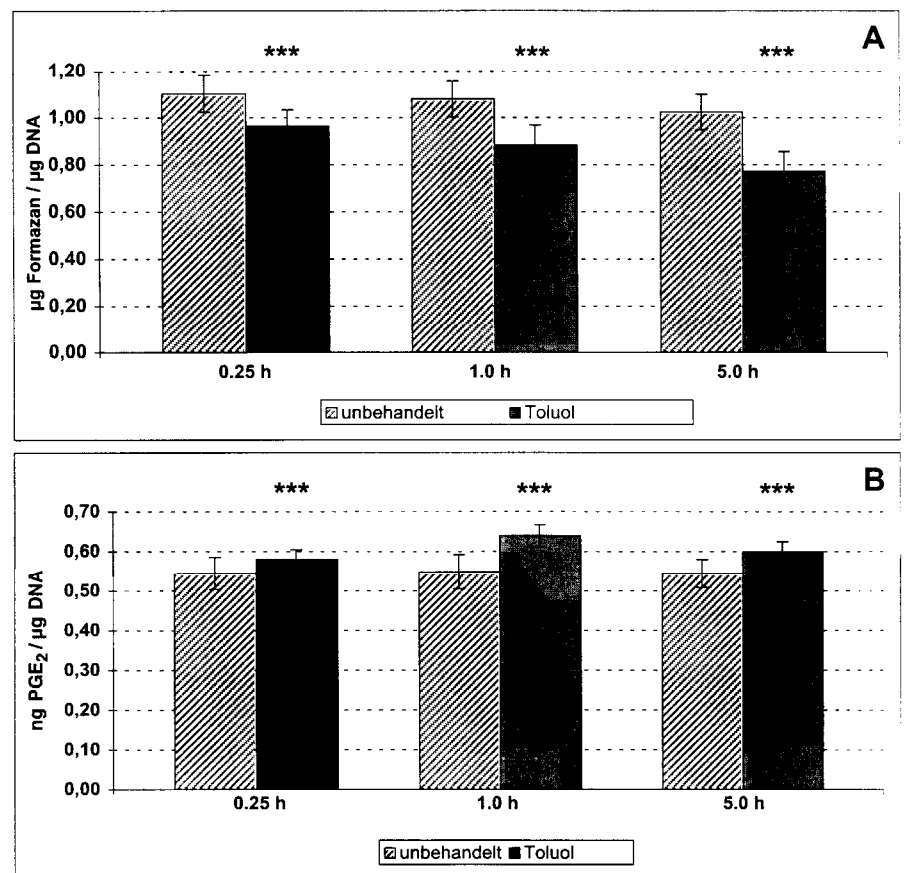


Abb. 2: Gesamtstudie (MW, Stabw.; n = 24; follikuläre Haut): Wirkung von Toluol auf die unbehandelte Haut nach 0,25 h, 1,0 h und 5,0 h. A: Zytotoxizität (µg Formazan/µg DNA); B: Zellreizung (ng PGE<sub>2</sub>/µg DNA)

sen Schutzwirkung nur gegen hydrophile Noxen ausgewiesen wird, kann hingegen keine signifikante Schutzwirkung gegen das zytotoxische Potenzial beobachtet werden (Abb. 7). Nach 15 Minuten ist kein Schutzeffekt (0 %) nachzuweisen. Erst nach längerer Exposition liegt eine Reduktion auf niedrigem Niveau (38 % bzw. 27 %) vor (Abb. 5A).

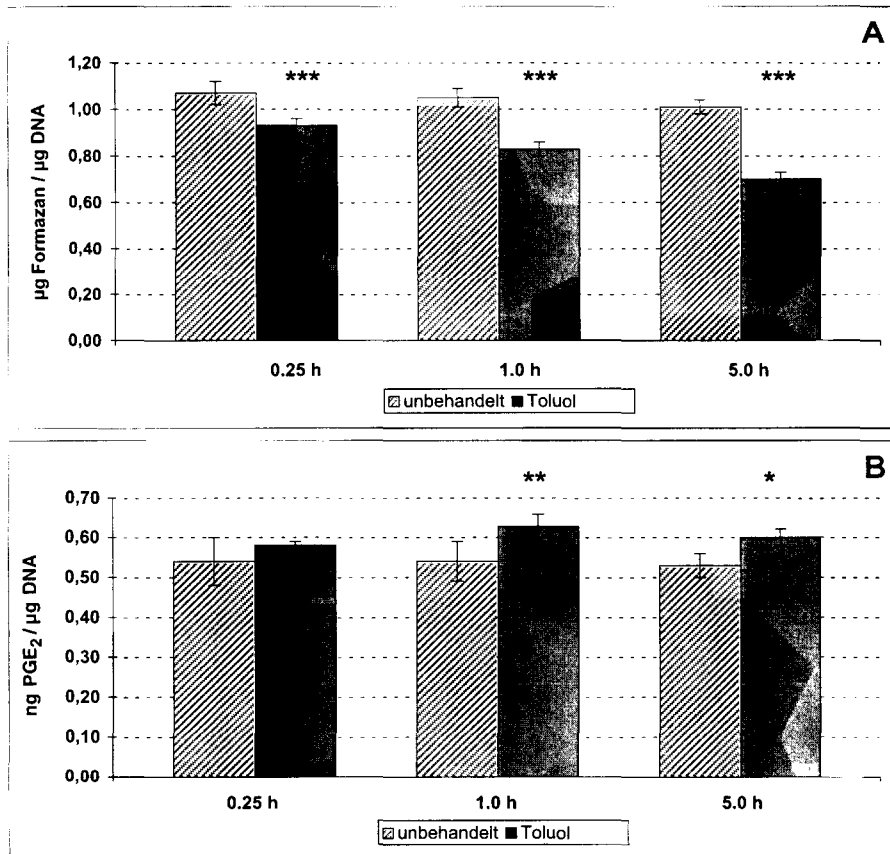
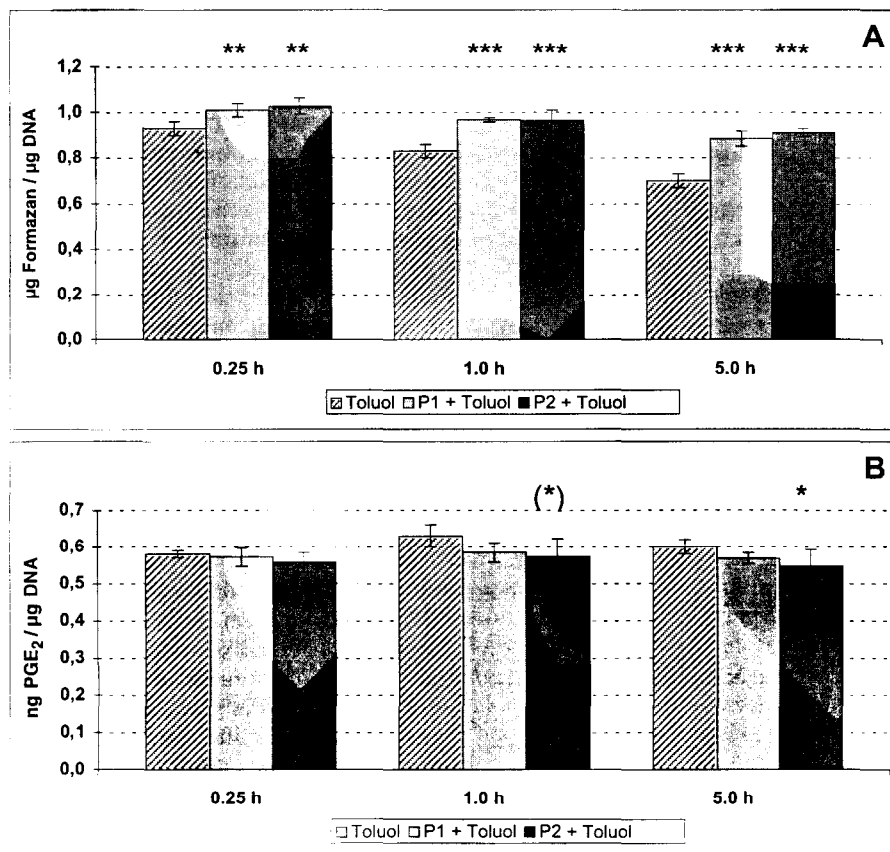


Abb. 3: Magistralrezepturen (MW, Stabw.; n = 4; folliculäre Haut): Wirkung von Toluol auf die unbehandelte Haut nach 0,25 h, 1,0 h und 5,0 h. A: Zytotoxizität (µg Formazan/µg DNA); B: Zellreizung (ng PGE<sub>2</sub>/µg DNA)



**Marktprodukte:** Unter den acht Marktprodukten bieten nur zwei Formulierungen (C, E) ein sehr hohes, den Positivkontrollen vergleichbares Schutzniveau, wobei keines der beiden Marktprodukte den Langzeiteffekt (1,0 h und 5,0 h) der Magistralrezepturen erreicht (Abb. 5A). Drei Produkte (G, A, D) sind in einer mittleren Leistungsgruppe einzuordnen. Ihre unmittelbare Schutzleistung liegt zwischen 40 % und 50 %, wobei die Langzeitwirkung unterschiedlich ist. In der letzten Gruppe (B, F, H) liegt die unmittelbare Schutzwirkung unter dem Reduktionswert von 30 %, differenziert sich aber noch gegen die Ergebnisse der Negativkontrolle. Die letzt genannte Produktgruppe weist ein gemeinsames Merkmal auf: Nach längerer Expositionszeit nimmt die Schutzwirkung z. T. deutlich zu. Hinsichtlich der verzögerten Schutzleistung ist das Produkt D ebenfalls dieser Gruppe zuzuordnen.

*Afollikuläre Haut (Hautverträglichkeit)*

**Toluol:** Wie unter folliculären Bedingungen löst Toluol auf der unbehaarten Haut nach 15 Minuten eine Zellschädigung (MTT-Test: Zytotoxizität) aus, die über die gesamte Expositionszeit deutlich zunimmt. Hingegen wird das Potenzial der Zellreizung (PGE<sub>2</sub>-Konzentration) erst nach der Expositionszeit von 1,0 h wirksam und ist, wie in der behaarten Haut, im Gegensatz zur Zytotoxizität nach 5,0 h reversibel.

Eine Einzelproduktprüfung wurde in der unbehaarten Zitzenhaut nicht durchgeführt.

*Afollikuläre Haut (Schutzwirkung)*

In der Zitzenhaut war die Applikation der Noxe aus anatomischen Gründen technisch schwierig. Für den Zeitpunkt 15 Minuten konnte sie nur in 6 von 11 Testen vollständig durchgeführt werden. Daher werden nur die Ergebnisse der Referenzprodukte, nicht aber die Ergebnisse der Marktprodukte ausgewiesen (Abb. 5B).

**Referenzprodukte:** Beide Positivsubstanzen zeigen unmittelbar nach der Noxenexposition eine deutliche Schutzwirkung (Abb. 5B). Das Schadenspo-

Abb. 4: Magistralrezepturen (MW, Stabw.; n = 4; folliculäre Haut): Wirkung von Toluol auf die vorbehandelte Haut nach 0,25 h, 1,0 h und 5,0 h. A: Zytotoxizität (µg Formazan/µg DNA); B: Zellreizung (ng PGE<sub>2</sub>/µg DNA)

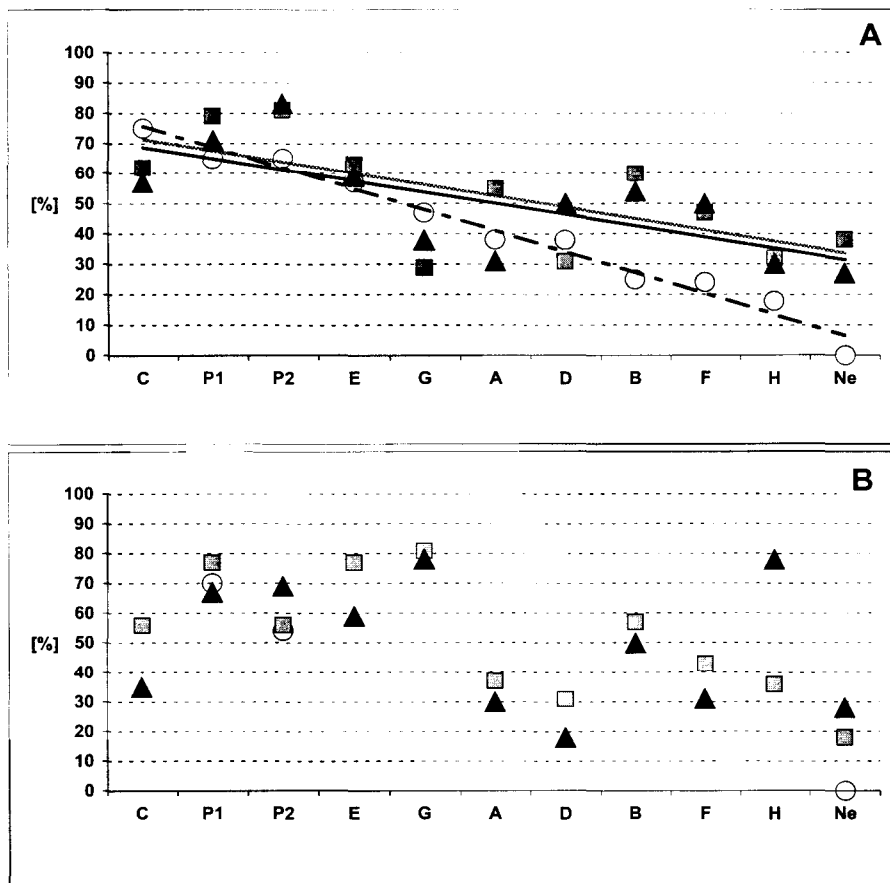


Abb. 5: Gesamtstudie: Schutzwirkung aller 11 Testprodukte (P1, P2: Positivkontrollen; Ne: Negativkontrolle; A-H: Marktprodukte). Reduktion des Schädigungspotenzials von Toluol (= 100 %). A: Behaarte (follikuläre) Haut (n = 4) nach der Expositionszeit von 0,25 h (Kreis, gestrichelte Linie), 1,0 h (Quadrat, punktierte Linie) und 5,0 h (Dreieck, durchgezogene Linie). B: unbehaarte (afollikuläre) Haut (n = 2) nach 0,25 h (Kreis; nur Referenzprodukte), 1,0 h (Quadrat) und 5,0 h (Dreieck)

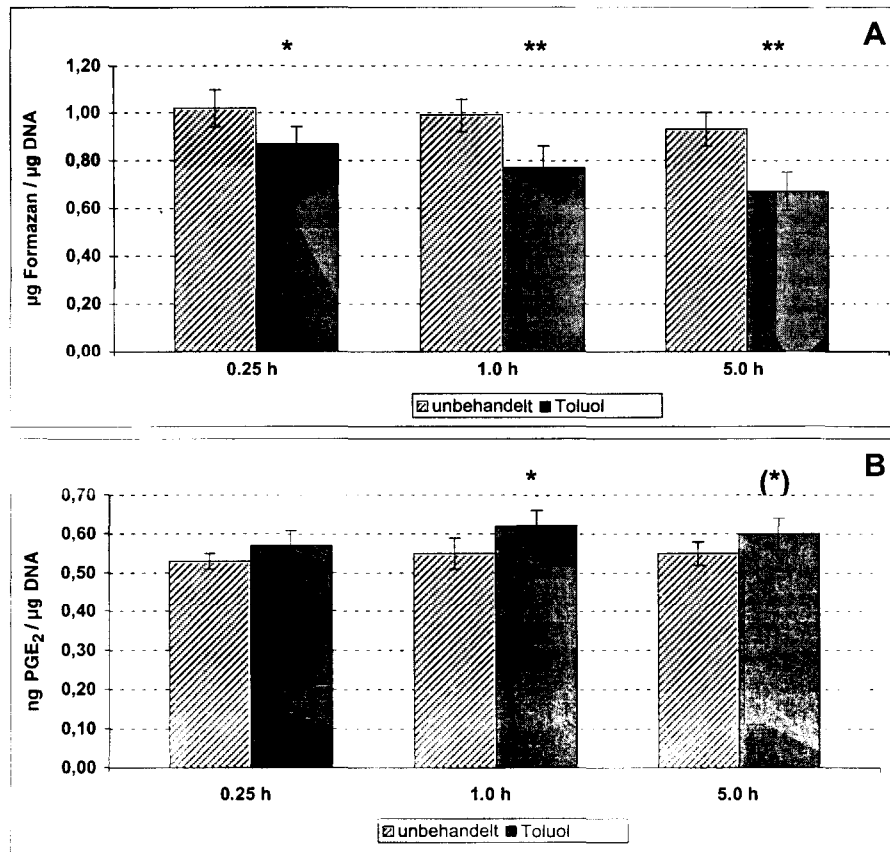


Abb. 6: Negativkontrolle (MW, Stabw.; n = 4; follikuläre Haut): Wirkung von Toluol auf die unbehandelte Haut nach 0,25 h, 1,0 h und 5,0 h. A: Zytotoxizität (µg Formazan/µg DNA); B: Zellreizung (ng PGE<sub>2</sub>/µg DNA).

tenzial von Toluol wird nach 15 Minuten um 70 % mit Wollwachsalm (P1) und um 55 % mit Vaseline (P2) reduziert. Die Schutzwirkung nimmt im weiteren Verlauf nur nach Vaselineapplikation deutlich (Reduktion nach 5,0 h: 69 %) zu, während sie nach der Vorbehandlung mit Wollwachsalkoholalm stabil bleibt (5,0 h: 69 %).

Für die Negativkontrolle (Ne; Marktprodukt) mit Schutzwirkung gegen hydrophile Noxen, kann hingegen kein signifikantes Schutzz Potenzial nachgewiesen werden. Nach 15 Minuten ist kein Schutzeffekt (0 %) zu messen und erst nach längerer Expositionszeit liegen Reduktionswerte von 18 % bzw. 28 % vor.

**Marktprodukte:** Unter den acht Marktprodukten erreichen je zwei Produkte (C, E bzw. G, B) nach 1,0 h Reduktionswerte von ca. 70 % bzw. 50 %, wobei die Reduktion mit verlängerter Exposition deutlich differiert (Abb. 5B). Bei weiteren drei Produkten (A, D, F) liegt die Reduktion unter 50 % und nimmt nach 5,0 h geringgradig ab. Das Produkt H weist erst nach 5,0 h eine verzögerte Schutzleistung von 79 % auf.

## Diskussion

### BUS-Hautschutzztest

Das Prinzip des BUS-Hautschutzztests mit der einmaligen Applikation basiert darauf, dass hautschädigende Eigenschaften abhängig von der Expositionszeit nach Penetration in die oberen Schichten wirksam werden. Daher wird der Grad der Reizwirkung der Noxe so gewählt, dass er ohne Prävention innerhalb kurzer Zeit zu einer nachweisbaren Schädigung führt. Die Studienergebnisse weisen auf eine unmittelbare und eine verzögerte Schutzwirkung hin. Die Noxe wird unmittelbar nach Kontakt mit der vorbehandelten Haut an der Penetration in die oberen Hautschichten gehindert. Unabhängig davon werden mit zunehmender Expositionsdauer Zellschädigung und die Freisetzung von Arachidonsäurederivaten aus epidermalen Zellen produktabhängig gehemmt. Die Trendlinien in Abb. 5A machen deutlich, dass nach der Anwendung von Magistralrezepturen und den Marktprodukten C und E nur geringe Unterschiede zwischen unmittelbarer und verzögerter Schutzleistung bestehen. Ein Unterschied wird bereits in der mittleren Gruppe (G, A, D) teilweise und in der unteren Leistungsgruppe (B, F, H) voll-

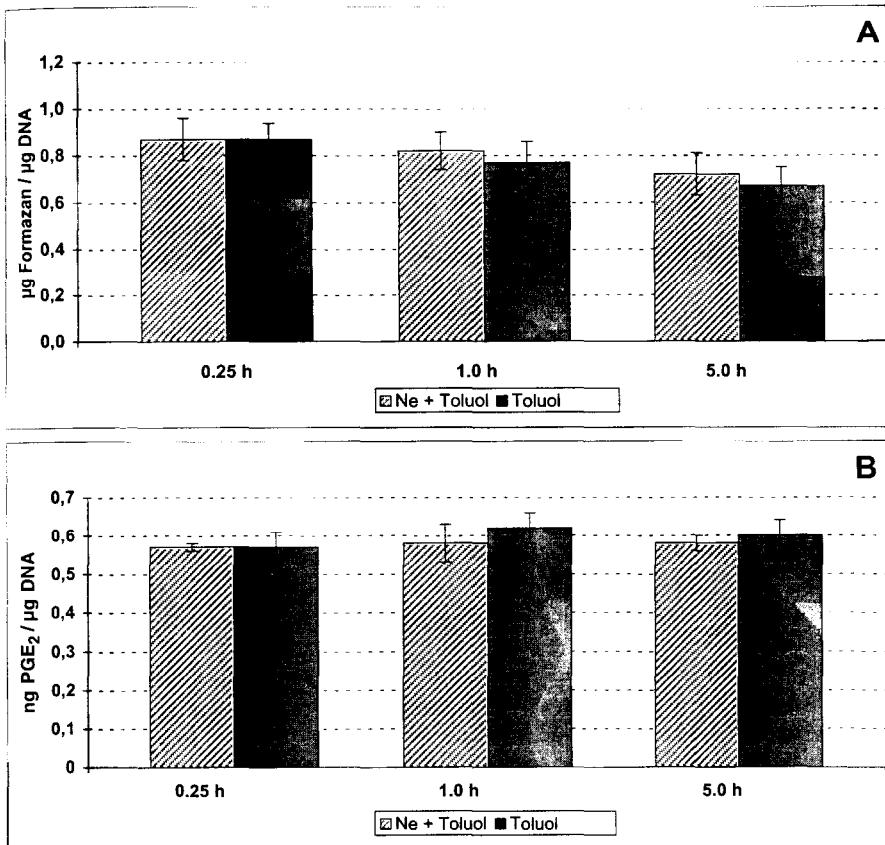


Abb. 7: Negativkontrolle (MW, Stabw.; n = 4; folliculäre Haut): Wirkung von Toluol auf die vorbehandelte Haut nach 0,25 h, 1,0 h und 5,0 h. A: Zytotoxizität (µg Formazan/µg DNA); B: Zellreizung (ng PGE<sub>2</sub>/µg DNA)

ständig sichtbar. Das Extrem bildet die Anwendung der Negativkontrolle (Ne), wo sich nach unmittelbarem Kontakt kein, nach 1,0 h und 5,0 h jedoch ein geringes Schutzpotenzial entwickelt. Diese Ergebnisse bestätigen sich für die Referenzprodukte ebenfalls nach Anwendung auf der unbehaarten Haut (Abb. 5B). Zwischen den Expositionszeiten von 1,0 h und 5,0 h verändert sich der Umfang der Schutzwirkung nicht mehr wesentlich. Ohne Berücksichtigung des unmittelbaren Schutzpotenzials wäre die Rangfolge verändert und die sichere Abgrenzung zwischen den Marktprodukten und der Negativkontrolle nicht möglich.

Unter den täglichen Werkbankbedingungen wird nach Anwendung des Hautschutzprodukts der Kontakt mit der Noxe sehr schnell erfolgen. Demgegenüber tritt die Bedeutung der verzögerten Schutzwirkung eher in den Hintergrund, bleibt aber Ziel einer zuverlässigen Prävention. Auch lässt die mechanische/thermische Belastung in der Praxis und mehrmalige Handreinigung einem längerfristigen Aufbau einer Schutzfunktion in der Haut nur bedingt Raum.

Das in der BUS-Studie verwendete Prüfdesign geht im Gegensatz zu der in der Ringstudie (Schnetz et al. 2000) praktizierten wiederholten, okklusiven Applikation von einer einmaligen, offenen Applikation der marktgängigen Schutzprodukte und der Noxe, aber verschiedenen langen Expositionszeiten aus. Die Einwirkzeit des Schutzprodukts und der Noxe war auf je 15 Minuten beschränkt, der Schutzpotenzial wurde dreimal nach Noxenkontakt (0,25 h, 1,0 h und 5,0 h) mit Hautstanzen biochemisch überprüft. Auf diese Weise ist das unmittelbare Einsetzen der Schutzwirkung und deren verzögerte Entwicklung getrennt zu erfassen.

Wie in der Ringstudie wurden die Magistralrezepturen Wollwachsalkohol-salbe und Vaseline als Referenzsubstanzen verwendet (Schnetz et al. 2000). Zusätzlich wurde in der BUS-Studie ein Marktprodukt als Negativkontrolle eingesetzt sowie auf behaarter (n = 4) und auf unbehaarter Haut (n = 2) vergleichend geprüft.

#### Toluol als Noxe

Der Einsatz von Toluol als Noxe verursachte in der Ringstudie im Gegensatz zu den unauffälligen TEWL-Werten eine unregelmäßig auftretende Ödem- und Erythembildung sowie eine hohe Ausfallrate (8 von 20) unter den Probanden (Schnetz et al. 2000). Die Autoren vermuten, dass das lipophile Toluol ohne Barrierschädigung penetriert und klinische, kaum reproduzierbare Reaktionen in der Dermis verursacht. Diese sind daher nicht mittels TEWL-Messung oder Colorimetrie, sondern nur mit klinischer Beurteilung zu erfassen. Die biochemische Untersuchung der zellulären Reaktion ist im BUS-Modell mit Ganzhautbiopsien verbunden, um subjektive Kriterien und eine Beeinflussung der Messmethoden durch penetrierende Prüfsubstanzen auszuschließen.

Die Schädigung der Haut ist im BUS-Modell als unmittelbar einsetzende, progressive Zytotoxizität zu definieren, wobei die Aktivierung des Arachidonsäurestoffwechsels (Prostaglandin E<sub>2</sub>) nur eine untergeordnete Rolle spielt (Abb. 2, 3, 6). Dieses Ergebnis stimmt mit den klinischen Beobachtungen der Ringstudie überein (Schnetz et al. 2000). Die epidermalen Zellen, die empfindlich auf zytotoxische Eigenschaften reagieren, liegen im basalen und suprabasalen Bereich (Boelsma et al. 2002). Toluol penetriert sehr schnell in diese Schichten, d. h. ohne Prävention stellt die Hornschicht keine Barriere dar. Unterschiede in Art und Grad der Penetration bzw. Schädigung sind nach Applikation in behaarter oder unbehaarter Haut nicht zu erkennen.

#### Schutzpotenzial gegen Toluol

Produkte, die eine sichere Prävention gegen lipophile Noxen leisten, sollten daher nach einmaliger Anwendung das zytotoxische Potenzial unmittelbar nach Kontakt, aber auch nach längerer Exposition wirkungsvoll hemmen. Die Ergebnisse der BUS-Hautschutzstudie lassen erkennen, dass das Schutzpotenzial der unter in-vivo-Bedingungen geprüften Magistralrezepturen bestätigt werden konnte, ebenso wie die Wirkungslosigkeit der Negativkontrolle. Die Vorbehandlung mit den Magistralrezepturen reduziert die durch Toluol induzierte Zytotoxizität zu allen Zeitpunkten. Die Zunahme der PGE<sub>2</sub>-Gewebskonzentration wird von beiden Magistralrezepturen gehemmt, statistisch signifikant jedoch nur von Vaseline.

Auf der unbehaarten Haut führt die Vorbehandlung mit den Referenzsubstanzen zu einem ähnlichen Ergebnis. Der Wirkungsunterschied zwischen den Magistralrezepturen ist in beiden Hauttypen gering. Allerdings ist mit Vaseline eine

effektivere Langzeitwirkung zu erzielen. Ursächlich könnte dies mit dem hemmenden Einfluss auf den Arachidonsäurestoffwechsel (PGE<sub>2</sub>) zusammenhängen.

Alle elf Markt- bzw. Referenzprodukte weisen eine vom Zubereitungstyp unabhängige, hervorragende Hautverträglichkeit über die gesamte Expositionszeit auf. Erst der Kontakt mit der Noxe führt zu signifikanten Produktunterschieden auf behaarter und unbehaarter Haut. Die Ergebnisse in beiden Hauttypen weisen im wesentlichen eine gleichgerichtete, breite Produktdifferenzierung aus, die unter afollikulären Bedingungen deutlicher hervortritt. Eine klare Zuordnung des Schutzpotenzials zum Zubereitungstyp (Tab. 1) ist nicht möglich. Die Produkte (C, E), die auf follikulärer Haut eine den Magistralrezepturen vergleichbare Schutzwirkung erzielt haben, entwickeln auf unbehaarter Haut ein ähnlich hohes Schutzpotenzial. Drei Produkte (G, A, D) ergeben eine Produktgruppe mit einer mittleren Schutzleistung zu allen drei Zeitpunkten. Die letzte Gruppe (B, F, H) ist durch eine niedrige unmittelbare Schutzleistung (15 Minuten), aber eine z. T. verzögerte Reduktion des durch Toluol induzierten Schadens definiert. Die Resultate nach der Anwendung der Produkte G, B und H unter afollikulären Bedingungen lassen im Vergleich zu den Ergebnissen auf follikulärer Haut Schutzpotenziale erkennen, die die Ergebnisse der Magistralrezepturen erreichen oder übertreffen.

**Schlussfolgerung**

Der zweistufige Aufbau des BUS-Modells und die Charakterisierung des Irritationsmechanismus von Toluol durch invasive Methoden führte zu Ergebnissen, in denen die unterschiedliche Schutzwirkung von Produkten gegen lipophile Noxen sicher definiert wurde. Damit konnte erstmals unter in-vitro-Bedingungen standardisiert der Grad des Schutzpotenzials von acht Marktprodukten im direkten Vergleich mit den Referenzsubstanzen bewertet werden. Die Praxisnähe der neuartigen Versuchsanordnung ergibt sich durch die Berücksichtigung von sehr kurzen und längeren Expositionszeiten sowie der Prüfung auf behaarter und unbehaarter Haut. Die strikten in-vitro-Bedingungen erlauben zukünftig, ohne ethische oder gesetzliche Einschränkungen das Schutzpotenzial von Entwicklungs- und Marktprodukten gegen jede mögliche Noxe z. B. gebrauchte Prozesschemikalien zu prüfen und mit den dargestellten Ergebnissen zu vergleichen.

Einige der Marktprodukte waren hinsichtlich des Grads des Schutzpotenzials direkt mit den Positivkontrollen vergleichbar. Alle Hautschutzformulierungen waren jedoch der Negativkontrolle, einem Marktprodukt, dessen Schutzwirkung nur gegen hydrophile Noxen ausgewiesen wird, in der Schutzwirkung überlegen. Damit erfüllen alle acht getesteten Marktprodukte den Nachweis eines, wenngleich differenzierten Schutzpotenzials gegen die lipophile Modellnoxe Toluol.

**Literatur:**

1 Bäumer, W., M. Kietzmann: The isolated Perfused Bovine Udder as a Model of Dermal Eicosanoid Releaser. *ATLA* 28 (2000) 643-649

2 Bäumer, W., M. Kietzmann: Effects of steroidal and non-steroidal antiphlogistic drugs on eicosanoid synthesis in irritated skin: studies with the isolated perfused bovine udder. *J Pharm Pharmacol* 53 (2001) 743-747

3 Berndt, U., W. Wigger-Albert, P. Elsner: Hautphysiologische Untersuchungen – Methoden in Diagnostik und Prävention von Berufsdermatosen. *Berufsmedizin*, 12 (1999) 209-212

4 Boelsma, E., S. Gibbs, C. Faller, M. Ponc: Characterisation and comparison of reconstructed skin models: morphological and immunohistological evaluation. *Acta Dermat Venereol* 80 (2002) 82-88

5 Förster, Th., B. Jackwerth, W. Pittermann, W. von Rybinski, M. Schmitt: Properties of Emulsions: Structure and skin penetration. *Cosmetics & Toiletries* 112 (1997) 73-82

6 Förster, Th., W. Pittermann, M. Schmitt, M. Kietzmann: Skin penetration properties of cosmetic formulations using a perfused bovine udder model: *J Cosmet Sci* 50 (1999) 147-157

7 Kietzmann, M., W. Löscher, D. Arens, P. Maaß, D. Lubach: Perfused Bovine Udder as an in Vitro Model of Percutaneous Drug Absorption. Skin Viability and Percutaneous Absorption of Dexamethasone, Benzoyl Peroxide and Etofenamate. *J Pharm Toxicol Meth* 30 (1993) 75-84

8 Lachapelle, J. M.: Efficacy of protective creams and/or gels. *Curr Probl Dermatol* 25 (1996) 182-192

9 Lampen, P., W. Pittermann, H. M. Heise, H. Jungmann, M. Kietzmann: Penetration studies of vitamin E-acetate applied from cosmetic formulations to the stratum corneum of an in vitro model using quantification by tape stripping, UV-spectroscopy and HPLC: *J. Cosm. Sci.* 54 (2003) 119-131

10 Nicotera, P.: Alteration of Cell Signalling in Chemical Toxicity. *Arch Toxicology (Suppl.)* 18) 3-11; Springer-Verlag Berlin, Heidelberg (1996)

11 Pittermann, W.: Proceedings of a Workshop on Isolated Perfused Organs (Hamburg 1998). *IFSCC-magazine* 2 (2000) 38-39

12 Pittermann, W., B. Jackwerth, M. Schmitt: The Isolated Perfused Bovine Udder Skin Model: A New in-Vitro Model for the Assessment of Skin Penetration and Irritation. *In Vitro Toxicology* 10 (1997) 17-21

13 Pittermann, W., Th. Gassenmeier, S. Nieveler, Th. Förster, M. Kietzmann: Experimentally induced epidermal barrier perturbation: Measurement of transepidermal water loss (TEWL) using the isolated perfused bovine udder skin (BUS) model. *IFSCC-magazine* 3, (2000) 29-32

14 Rast, H.: Anforderungen an modernen Hautschutz. *Dermatologie in Beruf und Umwelt*, 49 (2001) 52-53

15 Schnetz, E., T. L. Diepgen, P. Elsner, P. J. Frosch, A. J. Klotz, J. Kresken, O. Kuss, H. Merk, H. J. Schwanitz, W. Wigger-Alberti, M. Fartasch: Multicentre study for the development of an in vivo model to evaluate the influence of topical formulations on irritation. *Contact Dermatitis* 12 (2000) 336-341

16 Wigger-Alberti, W., A. Rougier, A. Richard, P. Elsner: Efficacy of Protective Creams in a Modified Repeated Irritation Test. *Acta Derm Venereol* 78 (1998) 270-273

**Anschrift für die Verfasser:**

Dr. med. vet. Wolfgang Pittermann  
 Fachtierarzt für Pathologie  
 40191 Düsseldorf  
 Henkel KGaA  
 E-Mail: Wolfgang.Pittermann@henkel.com  
 Tel. (02 11) 7 97 45 46  
 Fax (02 11) 7 98 12 56