

„In-vivo-Evaluationsmodelle zur Überprüfung der Wirkung von Hautschutzexterna: Bestimmung der schützenden Wirksamkeit und Vergleichbarkeit“

DGUV-Kennzeichen: FP 275

Wissenschaftlicher Abschlussbericht

31. Oktober 2013

Projektlaufzeit: 01.08.2007 – 31.07.2012



Forschungsnehmer

Prof. Dr. P. Elsner, Klinik für Hautkrankheiten, Universitätsklinikum Jena

Prof. Dr. Th. L. Diepgen, Abteilung klinische Sozialmedizin, Universitätsklinikum Heidelberg

Prof. Dr. H. Drexler, Abteilung klinische Sozialmedizin, Universität Erlangen-Nürnberg

Prof. Dr. S. M. John, Fachgebiet Dermatologie, Umweltmedizin und Gesundheitstheorie, Fachbereich Humanwissenschaften, Universität Osnabrück

FORSCHUNGSBEGLEITENDER ARBEITSKREIS

Herr J. Berger, DGUV

Herr Prof. Dr. Th. Brüning, IPA, Bochum

Herr Dr. E. Droll, BG der chemischen Industrie

Herr Dipl.-Ing. R. Ebenig, BG Bau

Frau Prof. Dr. M. Fartasch, IPA, Bochum

Herr Dr. J. Herrmann, DGUV Forschungsförderung

Herr Dr. P. Kleesz, BG Nahrungsmittel und Gaststätten (BG18), Mannheim

Herr Prof. Dr. G. Kutz, Hochschule OWL, Pharmatechnik

Frau Dr. A. Möller, IFA, Sankt Augustin

Herr Dr. E. Nies, IFA, Sankt Augustin

Herr Dr. P. Paszkiewicz, IFA, Sankt Augustin

Frau Dr. U. Pohrt, BGW (BG 36), Berlin

Herr Dipl.-Chem. M. Rocker, BG Metall

Herr Dr. K. Struppek, BG Bau

Herr Dipl.-Ing. J. Syma, Fachausschuss PSA, DGUV

Herr F.-D. Zagrodnik, DGUV, BK-Referat

FORSCHUNGSNEHMER UND BETEILIGTE PERSONEN IN DEN ARBEITSGRUPPEN

Klinik für Hautkrankheiten, Universitätsklinikum Jena

Prof. Dr. med. P. Elsner

Dr. med. S. Schliemann

Fachbereich Humanwissenschaften, FG Dermatologie, Universität Osnabrück

Prof. Dr. med. S. M. John

Dipl.-Biol. J. Maurer

Abteilung klinische Sozialmedizin, Universitätsklinikum Heidelberg

Prof. Dr. med. T.L. Diepgen

Dr. med. R. Scheidt

Institut und Poliklinik für Arbeits-, Sozial- und Umweltmedizin, Universität Erlangen-Nürnberg

Prof. Dr. med. H. Drexler

Prof. Dr. rer. nat. Th. Göen

BERICHTERSTATTER in Abstimmung mit den Forschungsnehmern:

Dr. S. Schliemann, Universitätsklinikum Jena

Prof. Dr. P. Elsner, Universitätsklinikum Jena

Dr. R. Scheidt, Universitätsklinikum Heidelberg

INHALTSVERZEICHNIS

Forschungsbegleitender Arbeitskreis	2
Forschungsnehmer	3
Berichtersteller.....	3
Inhaltsverzeichnis	4
Abkürzungsverzeichnis.....	6
Zusammenfassung	7
Summary	8
1. Problemstellung und Forschungsziele	9
1.1. Problemstellung	9
1.2. Forschungsziele	13
2. Methoden und Projektablauf	14
3. Ergebnisse	15
3.1. Projektschritt 1	15
3.2. Projektschritt 2	19
3.3. Projektschritt 3	20
3.4. Projektschritt 4a	21
3.4.1. Evaluation des Irritationspotentials	21
3.4.2. Screening der Hautschutzmittelmuster 1-6 im Modell	23
3.4.3. Nochmalige Prüfung der Hautschutzmittelmuster T1, T2	25
3.5. Projektschritt 4b Multicenterstudie.....	29
3.5.1. Einleitung	29
3.5.2. Material und Methoden	29
3.5.2.1. Fallzahlschätzung	29
3.5.2.2. Probanden	30
3.5.2.3. Irritantien	31
3.5.2.4. Hautschutzmittel-Referenzmuster.....	31
3.5.2.5. Visueller Score.....	32
3.5.2.6. Geräte und Durchführung der Messungen.....	32
3.5.2.7. Klimabedingungen.....	33
3.5.2.8. Untersuchungsablauf.....	33
3.5.2.9. Wiegeversuche.....	36
3.5.2.10. Auswertung.....	36
3.5.3. Ergebnisse	37
3.5.3.1. Plausibilitätsprüfung.....	37
3.5.3.2. Verfahren.....	37
3.5.3.3. Kollektiv.....	38
3.5.3.4. Messumfeld.....	39
3.5.3.5. Menge des applizierten Externums.....	40
3.5.3.6. Streuung der Doppel- bzw. Dreifachmessungen.....	42
3.5.3.7. Zentrenvergleich.....	43
3.5.3.8. Vergleich Irritation an 4 Tagen vs. Irritation an 5 Tagen.....	49

3.5.3.9. Schutzfaktor.bzw. Schutzindexberechnung.....	51
3.5.3.10. Zwischenfazit zu Schutzfaktoren nach Irritantien	56
4. Gesamtfazit und Ausblick	57
Literatur.....	62

ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS

COLIPA	Cosmetics Europe, Europäische Kosmetikorganisation
DFG	Deutsche Forschungsgemeinschaft
ESCD	European Society of Contact Dermatitis
HSP	Hautschutzprodukt
IFA	Institut für Arbeitsschutz der DGUV (ehem. BGIA)
IPA	Institut für Prävention und Arbeitsmedizin der DGUV (ehem. BGFA)
INCI	International Nomenclature of Cosmetic Ingredients
KSS	Kühlschmierstoff
NaOH	Natriumhydroxid
TEWL	Transepidermaler Wasserverlust
TRGS	Technische Regel für Gefahrenstoffe
SLS	Sodium Lauryl Sulphate, Natriumlaurylsulfat, Tensid
PAH	Polyaromatic Hydrocarbon, polycyclische aromatische Kohlenwasserstoffe

ZUSAMMENFASSUNG

Hautschutzprodukte werden an Arbeitsplätzen verwendet, um der Entwicklung irritativer Kontaktekzeme der Hände vorzubeugen, für die insbesondere Feuchtarbeit und Umgang mit milden Irritantien anerkannte Risikofaktoren darstellen. Im Rahmen von FP 275, einem Verbund-Forschungsprojekt von universitären berufsdermatologischen Zentren in Erlangen, Heidelberg, Jena und Osnabrück, wurde erstmals ein 5tägiges humanes in-vivo Evaluationsmodell zur Wirksamkeitsprüfung von Hautschutzmitteln für verschiedene repräsentative Expositionssituationen (Irritantienkategorien) unter Festlegung definierter Modellirritantien wie auch zweier definierter Referenzstandards (Rezepturen) für Schutzprodukte einschließlich eines Schutzindex entwickelt. Es wurden insgesamt relevante 3 Kategorien wässriger Irritantien identifiziert, die in der Arbeitswelt eine besondere Bedeutung in der Entwicklung irritativer Kontaktekzeme aufweisen. Es handelte sich hierbei um Irritantien mit alkalischem und saurem pH-Wert sowie tensidische Irritantien. Stellvertretend für die Irritantienkategorien wurden teils bewährte, teils neue, bisher in humanen in vivo-Testmodellen noch nicht untersuchte Chemikalien evaluiert und unter diesen die am besten geeigneten ausgewählt. Hierbei wurden diejenigen Konzentrationen und Expositionszeiten ermittelt, die zu einem ausreichenden und reproduzierbaren Irritationsgrad nach repetitiver Exposition innerhalb von 4 Tagen führen. Das entwickelte Wirksamkeits-Testmodell wurde abschließend in einer Multicenterstudie untersucht, wobei die Transferfähigkeit des Modells und die Reproduzierbarkeit der Ergebnisse gezeigt wurden.

Das Testverfahren eignet sich künftig für eine standardisierte Wirksamkeitsprüfung beruflicher Hautschutzpräparate im Vergleich zu den entwickelten Hautschutzmittelreferenzmustern. Es erlaubt eine gleichzeitige Prüfung mehrerer Hautschutzprodukte anhand eines Schutzindex. Derartige Prüfergebnisse können von der Industrie im Rahmen der Produktentwicklung eingesetzt werden und zu einer besseren Produkttransparenz für Anwender und Präventionsdienste beitragen. Die Ergebnisse des Forschungsvorhabens sind für die gesetzliche Unfallversicherung von Relevanz für den beruflichen Hautschutz, da sie erstmals Rahmenbedingungen für humane, repetitive in vivo-Prüfstandards von Hautschutzprodukten bieten, die bisher nicht existierten und die durch die gesetzliche Unfallversicherung weiter ausgestaltet werden können.

SUMMARY

Topical skin protection products are used at workplaces with exposure to wet work and mild irritants to prevent cumulative irritant dermatitis. In the context of the DGUV-supported research project FP 275, a cooperation between the Universities of Erlangen, Heidelberg, Jena and Osnabrück, a 5-day human in-vivo evaluation model for the efficacy assessment of skin protection products for several representative exposure situations was developed. Defined model irritants and two defined generic reference standards (formulations) for protective products were implemented and an efficacy index was generated.

Within the project, three relevant categories of hydrophilic irritants were identified that are especially important as risk factors for the irritant contact dermatitis. These included irritants with alkaline and acid pH and detergents.

As representatives for these categories, partly previously reported, partly new substances were evaluated in human test model experiments, and the most suitable substances were selected. The concentrations and exposure times were selected that lead to a sufficient and reproducible degree of irritation after repetitive exposure within four days.

The thus developed evaluation model for the efficacy assessment of skin protection product was finally validated in a multicenter study thus showing the transferability of the model and the reproducibility of the results.

The developed evaluation model may be used for future efficacy tests of occupational skin protection products in comparison to the developed generic reference standards. It allows for the simultaneous assessment of several skin protection products on the basis of a protection index. These results can be used by industry in product development and may lead to a better transparency of products on the market for users and preventive services. Thus the results of this research project are of relevance for the German Statutory Accidents Insurance in charge of the prevention of occupational skin diseases in Germany.

1. PROBLEMSTELLUNG UND FORSCHUNGSZIELE

1.1. PROBLEMSTELLUNG

Hautschutzexterna werden als Bestandteile der persönlichen Schutzausrüstung, PSA, an Arbeitsplätzen vornehmlich zur Prävention irritativer Kontaktekzeme vom subtoxisch-kumulativen Typ eingesetzt. Irritative Handekzeme machen den größten Anteil berufsbedingter Handekzeme aus, sodass deren Prävention eine besonders hohe Bedeutung zukommt (1).

Unter beruflichen Hautmitteln werden in Deutschland unter dem Begriff des integrativen Hautschutzkonzeptes *Externa zur präexpositionellen Applikation (Hautschutzmittel im engeren Sinn), Hautreinigungsmittel zu Dekontamination, und postexpositionell am Arbeitsplatz anzuwendende pflegende Externa* subsumiert. In der Literatur wird für die Kombination der drei Elemente der Begriff des „integrativen Hautschutzkonzeptes“ verwendet (2), der in der internationalen Literatur mit „three-step skin protection program“ übersetzt wird (3, 4).

Hautschutzmittel im engeren Sinn sind zur präexpositionellen Anwendung an Arbeitsplätzen konzipiert. Zu den anerkannten hautschädigenden Einflüssen an Arbeitsplätzen, denen die Anwendung von Hautschutzmitteln entgegen wirken soll, gehört die sogenannte Feuchtarbeit, die in Deutschland gemäß der technischen Regel für Gefahrenstoffe, TRGS 401 "Gefährdung durch Hautkontakt - Ermittlung, Beurteilung, Maßnahmen" definiert ist, sowie der ungeschützte Umgang mit hautirritierenden Substanzen, die mit bestimmten R-Sätzen (R66, 38, 21) gekennzeichnet sind (5).

Hautschutzmittel sollen der Austrocknung und Barrierschädigung durch die oben genannten Einwirkungen am Arbeitsplatz entgegen wirken. Nach aktuellem Verständnis kann eine Wirksamkeit einerseits direkt durch eine Verminderung der Penetration und damit reduzierte Einwirkung der Arbeitsplatzirritantien auf die epidermale Barriere, andererseits durch indirekte Barriestabilisierung im Sinne einer Unterstützung der Barrieregeneration hervorgerufen werden, wobei die Wirkung bei jedem Produkt unterschiedlich zustande kommen kann (6). Die Wirkmechanismen, die möglicherweise durch komplexe Interaktionen zwischen dem Stratum corneum und den Irritantien sowie den Hautschutzmitteln hervorgerufen wird, sind bisher im Einzelnen nicht vollständig verstanden. Die Wirksamkeit eines

Hautschutzmittels kann nicht anhand seiner galenischen Zusammensetzung vorhergesagt werden.

Der internationale Stand der Forschung und der Evidenz zur primären Prävention des beruflichen irritativen Handekzems wurde 2010 in einem umfassenden Cochrane-Review dargestellt (7). Die Autoren stellten darin fest, dass derzeit keine ausreichende Evidenz für die Wirksamkeit der meisten der in der Primärprävention von beruflichen irritativen Handekzemen verwendeten Interventionen vorliegt. Dies bedeutet nicht, dass die derzeitigen Maßnahmen unbedingt unwirksam sind, da die begrenzten Studien bisher eher klein und von heterogener Qualität gewesen sind. In dieser Übersicht wurden weitere Forschungsanstrengungen angemahnt, um die Wirksamkeit der verschiedenen Präventionsstrategien nachzuweisen. Inzwischen konnte in einer prospektiven randomisierten Studie an einer großen Kohorte von Metallarbeitern unter Arbeitsplatzbedingungen nachgewiesen werden, dass in einer Kontrollgruppe eine signifikante Verschlechterung des Hautzustands festgestellt wurde, während die größte und eine signifikante Verbesserung in der Gruppe nach dem allgemein empfohlenen Hautschutzprogramm (Hautpflege + Hautschutz), gefolgt von Hautschutz allein als zweitbeste Intervention erfolgte (8). In einer weiteren größeren Kohortenstudie an Beschäftigten im Holz- und Baugewerbe bestätigten sich diese prinzipiellen Ergebnisse, wobei allerdings Hautpflege allein hier besser wirkte als Hautschutz (9). Die Wirksamkeit eines Hautschutzprogrammes in der Sekundärprävention, das unter anderem die Beratung zur Anwendung von Hautexterna beinhaltet, wurde inzwischen in einer randomisierten prospektiven Studie an Gesundheitsmitarbeitern auch von dänischen Forschern bestätigt (10). Allerdings wird eine prinzipielle und didaktische Unterscheidung zwischen Hautschutz und Hautpflege, wie sie in den zitierten Studien durchgeführt wurde und in Deutschland gängig ist, international nicht durchgängig propagiert. Dänische Berufsdermatologen befürworten in Leitlinien zum Handekzem lediglich die Anwendung lipidhaltiger, möglichst duftstofffreier Pflegeprodukte („skin care“), die sowohl zur Protektion am Arbeitsplatz als auch nach der Arbeit angewendet werden sollen (11).

Während die oben genannten Studien einerseits die Wirksamkeit von Hautschutzpräparaten unter Praxisbedingungen an hautbelastenden Arbeitsplätzen belegen, zeigten andererseits Untersuchungen unter experimentellen Bedingungen,

dass einzelne Hautschutzmittel die an sie gestellten Erwartungen nicht erfüllen oder möglicherweise den Hautzustand im ungünstigsten Fall sogar verschlimmern können (12). Auch zeigte sich, dass ausgewählte Hautschutzmittel zwar gegen eine bestimmte Noxe schützen, jedoch gegenüber anderen Noxen unwirksam sein können (13). Es mehren sich Hinweise darauf, dass unterschiedliche Irritantien aus dem wässrigen und/oder lipophilen Bereich grundsätzlich verschiedene Schädigungsmechanismen an die Haut aufweisen (14). Insgesamt existieren validierte Prüfverfahren für die eingesetzten Produkte noch nicht und sollten in dem vorliegenden Forschungsprojekt entwickelt werden.

Regulatorisch unterliegen Hautschutzexterna als Kosmetika der EU-Kosmetik-Direktive 1223/2009. Gemäß deren Artikel 11 ist eine Produktinformationsdatei vom Hersteller vorzuhalten, „die den Nachweis der für das kosmetische Mittel angepriesenen Wirkung“ enthält (15). Genauere Vorgaben für Wirksamkeitsprüfungen existieren jedoch nicht. Die Anforderungen an Wirksamkeitsnachweise sind daher seitens der Hersteller interpretierbar, was zur Verwendung unterschiedlicher Prüfverfahren führt, die aus berufsdermatologischer Sicht nicht selten als unzureichend bewertet werden, da sie die Entstehung von kumulativen irritativen Hautschädigungen am Arbeitsplatz und die Anwendung der Externa nicht hinreichend modellieren. Aus Kostengründen werden in einigen Fällen ex vivo- oder in vitro-Modelle mit einmaliger Applikation von Noxen, wie zum Beispiel am perfundierten Kuheuter (16) oder an gezüchteten dreidimensionalen Hautmodellen aus humanen Keratinozyten (17), verwendet. Die verwendeten Methoden werden in der AWMF-Leitlinie „berufliche Hautmittel“ ausführlich referiert (http://www.awmf.org/uploads/tx_szleitlinien/013-056l_S1_Berufliche_Hautmittel_2008.pdf, aktuell in Überarbeitung). Die Ergebnisse solcher Untersuchungen können aus berufsdermatologischer Sicht nur begrenzt auf die menschliche Haut übertragen werden, wobei sie als Screeninguntersuchungen durchaus Aussagen zur Penetration von Modellsubstanzen und/oder zur akuten Toxizität liefern können. Die realen Expositionsbedingungen an Arbeitsplätzen, die entscheidend durch repetitive Expositionen gegenüber Irritantien und Feuchtarbeit geprägt sind, können allerdings durch solche Modelle nicht nachgestellt werden, da am Arbeitsplatz die pathogenetisch bedeutsame repetitive Exposition zu milden Irritantien nicht zu einer akut-toxische Hautschädigung führt, sondern vielmehr eine sich schleichend entwickelnde subtoxisch-kumulative Irritation der Haut induziert, wie bereits in den

1980iger Jahren von Malten postuliert (18) und wissenschaftlich inzwischen auf breiter Basis bestätigt wurde.

Die Leitlinie „Berufliche Hautmittel“ benennt Kohorten- und Interventionsstudien als Goldstandard für Wirksamkeitsnachweise von beruflichen Hautschutz- und Hautpflegemitteln, da diese eine Berücksichtigung der tatsächlichen Arbeitsplatzsituation beinhalten. Es wird gleichzeitig darauf hingewiesen, dass randomisierte, doppelblinde Studien unter realen Arbeitsplatzbedingungen nur schwer durchführbar sind. Als Ersatz für Interventionsstudien werden Modellexperimente unter idealisierten Bedingungen befürwortet. Ergebnisse von in vitro- und ex vivo-Methoden sollen möglichst durch geeignete in vivo-Untersuchungen ergänzt werden. Insbesondere werden repetitive Irritationsmodelle aufgrund ihrer besseren Wirklichkeitsnähe zur Arbeitsplatzexposition empfohlen. Im Sinne eines diversifizierten Hautschutzes wurde empfohlen, für eine Auslobung von Hautschutzexterna für bestimmte Expositionsszenarien eine Prüfung gegenüber repräsentativen Modellirritantien durchzuführen. Problematisch ist in diesem Zusammenhang die Vielzahl der in der Arbeitswelt vorkommenden relevanten Irritantien. Eine Wirksamkeitstestung von Externa gegenüber einer Vielzahl von Irritantien ist unrealistisch und nicht durchführbar. Es ist daher eine sinnvolle Einteilung in wesentliche Irritantiengruppen, die in der Arbeitswelt vorkommen, notwendig. Diese lassen sich grob in wasserlösliche und wasserunlösliche Substanzen unterteilen. Unter den wasserlöslichen Irritantien stellen die tensidischen, die alkoholischen, sowie die sauren und basischen Irritantien wesentliche Gruppen dar. Bei den lipophilen Substanzen können verschiedene Gruppen, wie aliphatische und aromatische, identifiziert werden. Neben irritativen Einzelsubstanzen spielen in der Arbeitswelt vielfach auch Stoffgemische eine Rolle als Irritantien. In diesem Zusammenhang sind insbesondere wassermischbare Kühlschmiermittel zu nennen, die nach berufsdermatologischer Erfahrung häufige Auslöser beruflicher Kontaktekzeme sind.

Nur für Natriumlaurylsulfat, SLS, aus der Gruppe der tensidischen Irritantien, existieren bisher Untersuchungen zur Eignung für Wirksamkeitsprüfungen (19, 20). Obwohl in Hautreinigungsprodukten heutzutage vielfach auch hautschonendere Tenside verwendet werden (21), ist SLS immer noch als relevantes Modelldetergens einzuschätzen. Für die Irritationsprüfung mit sauren Irritantien existieren die meisten

Erfahrungen für Milchsäure und für basische Irritantien mit verdünnter Natronlauge (13, 22, 23). Für die Untersuchung von Alkoholen, die unter anderem Relevanz durch die Verwendung in Händedesinfektionsmitteln besitzen, liegen die meisten Erfahrungen mit n-Propanol vor (24, 25). Allerdings hat n-Propanol sich als wenig irritativ gezeigt.

Aufgrund der bisher fehlenden Implementierung einer Standardmethode für repetitive in vivo-Wirksamkeitstestungen für berufliche Hautschutzpräparate ist gegenwärtig eine Vergleichbarkeit von Ergebnissen verschiedener Verfahren und Testinstitutionen nicht gegeben. Insbesondere fehlen vor allem für den Anwender von Hautschutzpräparaten objektive Kriterien zur Auswahl und zur Beurteilung der Wirksamkeitsauslobung. Vergleichsparameter für unterschiedliche Marktprodukte, die den Anwendern Kriterien für eine sinnvolle Produktauswahl ermöglichen würden, sind bisher nicht eingeführt worden. Ebenso fehlen allgemein akzeptierte Vergleichsstandards (definierte Referenzprodukte). Angesichts dieser Defizite bei einer gleichzeitig breiten Anwendung einer Vielzahl von Produkten, die für den beruflichen Hautschutz ausgelobt werden, ergibt sich die berufsgenossenschaftliche Relevanz des beantragten Forschungsprojektes.

1.2. FORSCHUNGSZIELE

Ziel des Verbundprojektes war es, repetitive humane in vivo-Modelle zur Wirksamkeitsprüfung von Hautschutzmitteln zu entwickeln, die Anwendern anhand definierter Parameter einen Produktvergleich von Hautschutzmitteln ermöglichen. Diese Modelle sollten für verschiedene Branchen und repräsentative Expositionssituationen einsetzbar sein. Hierfür sollten verschiedene Kategorien von hydrophilen Irritantien unter praxisbezogenen arbeitsmedizinischen Aspekten evaluiert und typische Modellirritantien für die genannten Expositionsszenarien identifiziert werden, die einen reproduzierbaren Irritationsgrad im Modell verursachen. In die Evaluation von Modellirritantien sollten auch repräsentative „Standardkühlschmierstoffe“ als in der Arbeitswelt häufige irritative Stoffgemische einbezogen werden. Ziel war es ferner, generische Referenzstandards für Schutzprodukte als standardisierte Rezepturen zu entwickeln, um sie in den in vivo-Modellen als Vergleichsstandards für kommerzielle Hautschutzprodukte zu verwenden. Insbesondere wurde angestrebt, nicht-invasive hautphysiologische

Zielparameter zu entwickeln, die den Irritationsgrad bzw. dessen Verminderung durch Schutzprodukte quantifizieren lassen, um hieraus einen Parameter für die erzielte Schutzwirkung eines Hautschutzexternums zu entwickeln. Am Ende des Projektes sollt(en) (ein) validierte(s), transferfähige(s) Modell(e) stehen, das Testinstitutionen und der Industrie angeboten werden könnte.

2. METHODEN UND PROJEKTABLAUF

Gemäß des Projektantrages gliederte sich das Projekt in folgende Arbeitspakete.

1. Identifikation von Leitirritantien (Tenside, saure und basische Irritantien, Kühlschmiermittel). Externe toxikologische Begutachtung in Frage kommender Leitirritantien.
2. Festlegung von Standard-Hautschutzprodukten in Zusammenarbeit mit externem Labor.
3. Selektion kommerzieller Hautschutzprodukte unter maßgeblicher Beteiligung des Forschungsbegleitkreises.
- 4.A Modellentwicklung in vivo. Evaluation des Irritationspotentials in Frage kommender Leitirritantien hinsichtlich ihrer Eignung unter experimentellen Gesichtspunkten. Definition geeigneter Zielparameter der Irritationswirkung, Entwicklung eines Prüfverfahrens mit externer statistischer Unterstützung. Entwicklung eines „Hautschutzfaktors“ für HSP.
- 4.B Modellvalidierung mit Prüfung der Transferfähigkeit in einer Multicenterstudie.

Die einzelnen Projektschritte und die Zuordnung der Forschungsaufgaben zu den einzelnen Kooperationspartnern werden in den nachfolgenden Abschnitten spezifiziert. Die Projektschritte wurden aufgrund von Zwischenergebnissen und dadurch erforderlichen Änderungen im Projektablauf nicht immer in chronologischer Abfolge bearbeitet. Die Studienprotokolle der Teilversuche wurden durch die jeweils zuständigen lokalen Ethikkommissionen genehmigt. Projektbegleitend fanden im Verlauf insgesamt 7 Arbeitstreffen der Forschungsnehmer mit den Mitgliedern des forschungsbegleitenden Arbeitskreises statt.

Projektkoordination

Die Projektkoordination wurde vorab durch einen Kooperationsvertrag der beteiligten Universitäten Erlangen, Heidelberg, Jena und Osnabrück geregelt. Von den Festlegungen wurde im Verlauf aufgrund sich ergebender projektspezifischer Erfordernisse abgewichen. Das Arbeitspaket 1 (Identifikation und Auswahl der wichtigsten in Bezug auf ihre Relevanz und Verbreitung an Arbeitsplätzen in Deutschland vorkommenden Leitirritantien nach Leitirritantiengruppen/-kategorien) wurde federführend von der Arbeitsgruppe von Prof. Drexler, Erlangen, geleitet. Im Projektschritt 2 wurde die Konzeption und Herstellung von Referenz-Hautschutzprodukten als externer Arbeitsauftrag durch Prof. G. Kutz, Pharmazeutische Technologie und Technologie der Kosmetika und Waschmittel, Abteilung Pharmatechnik der Hochschule Ostwestfalen-Lippe, realisiert. Die dafür erforderliche Selektion kommerzieller Hautschutzprodukte (Projektschritt 3) erfolgte durch den forschungsbegleitenden Arbeitskreis (Leitung Dr. P. Kleesz). Projektschritt 4A (Modellentwicklung in vivo) wurde federführend an und von der Klinik für Hautkrankheiten in Jena durchgeführt. In der Projektphase 4b (Multicenterstudie) erfolgte die Planung und Koordination durch das Zentrum Jena (Protokoll, Ethikantrag, Schulung des Studienpersonals der beteiligten Zentren, zentrale Materialdistribution). Die Arbeitsgruppe von Prof. Diepgen, Heidelberg, war verantwortlich für die Erstellung der Studiendatenblätter, die Randomisierung, das Datenmanagement und die biometrische Auswertung der Studie. Begleitend erfolgte anhand der in der Multicenterstudie generierten Resultate eine statistische Methodenentwicklung in Bezug auf einen „Hautschutzfaktor“ in Form eines externen Arbeitsauftrages an Menne Biomed Consulting, Tübingen.

Die Finanzmittel wurden gemäß Finanzierungsplan und Kooperationsvertrag von den Kooperationspartnern jeweils über das Universitätsklinikum Jena (zentrale mittelverwaltende Institution des Projektes) abgefordert.

3. ERGEBNISSE

3.1. Projektschritt 1

Die Auswahl der Leitirritantien des Instituts und der Poliklinik für Arbeits-, Sozial- und Umweltmedizin (IPASUM) der Friedrich- Alexander-Universität Erlangen Nürnberg

(Prof. Drexler) erfolgte entsprechend der nachfolgend dargelegten Auswahlkriterien und führte zu folgenden Ergebnissen.

Für die Identifikation und Auswahl der Leitirritantien wurde zunächst eine Umfrage bei den Mitgliedern des projektbegleitenden Ausschusses durchgeführt, um Erfahrungen aus der berufsgenossenschaftlichen Praxis zusammen zu tragen. Darüber hinaus führte das IPASUM eigene Recherchen zur Identifikation von gewerblich bedeutenden Chemikalien mit hautirritativen Eigenschaften unter Einbeziehung des IFA durch. Die wissenschaftlichen Auswahlkriterien werden nachfolgend spezifiziert. Ein Schwerpunkt lag auf Additiven, die in wassermischbaren Kühlschmierstoffen (KSS) verwendet werden. Da die Substanzen an Probanden in vivo angewendet werden sollten, wurden bestimmte Ausschlusskriterien definiert. Dies betraf die Verwendung von Stoffen, die Verätzungen (R34) oder schwere Verätzungen (R35) hervorrufen können, von Stoffen, die Krebs erzeugen (R45, R49), die vererbare Schäden verursachen (R46), die die Fortpflanzungsfähigkeit beeinflussen (R60, R62) oder die das Kind im Mutterleib schädigen können (R61, R63). Auch Substanzen mit hautsensibilisierendem Potential wurden ausgeschlossen (R43 bzw. Sh-Markierung der DFG). Da eine irritative Wirkung an der Haut andererseits erwünscht ist, galt die Einstufung eines Arbeitsstoffes als hautreizend (R38) als positives Auswahlkriterium. Ferner sollten die zu testenden Arbeitsstoffe eine ausreichende industrielle bzw. gewerbliche Relevanz haben. Als Kriterium für die industrielle Bedeutung wurde deshalb die EU-Einstufung in LPV- und HPV-Stoffe gewählt. Die Einstufung eines Stoffes als HPV-Stoff (HPV: high production volume) erfolgt, wenn die in der EU produzierten und in die EU importierten Mengen eine Größenordnung von 1000 t pro Jahr erreichen. Hiernach wurde zunächst eine Liste potentiell bedeutsamer Chemikalien erstellt (Tabelle 1), die nachfolgend eine weitere Eingrenzung aufgrund des geplanten Einsatzes für Probandenversuche erfuhr.

Tabelle 1: Ergebnisse der Recherchen. Physikalische Daten, Gefahreneinstufung und industrielle Bedeutung von potentiell bedeutsamen Chemikalien nach Vorauswahl, wobei zahlreiche Substanzen aufgrund ätzender bzw. stark ätzender Eigenschaften für in vivo- Studien ausgeschlossen wurden.

Substanz	CAS	Wasserlöslichkeit bei 20-25°C (mg/l)	pH-Wert (Konz.) / pKa	LPV/ HPV	R34/ R35	R38	Sonstige R-Sätze
2-(2-Aminoethoxy)-ethanol	929-06-6	1 000 000	9,62 (pKa)	HPV	R34	-	R21
2-Amino-2-ethyl-1,3-propandiol	115-70-8	1 000 000	10,8 (pH, 0,1 M)	LPV	-	R38	R36/R37
2-Amino-2-methyl-1-propanol	124-68-5	1 000 000	11,3 (pH, 9 g/l)	HPV	-	R38	R36, R52/53
Ammoniaklösung	1336-21-6	1 000 000	35 (pKa)	HPV	R34	-	R50
Cyclohexylamin	108-91-8	1 000 000	10,6 (pKa)	HPV	R34	-	R10, R21/22
Cumol	98-82-8	61,3	-	HPV	-	-	R10, R37, R51/53, R65
Essigsäure	64-19-7	1 000 000	4,76 (pKa)	HPV	R35	-	R10
2-Ethylhexansäure	149-57-5	2 000	4,89 (pKa)	HPV	-	-	R63
Isononansäure	3302-10-1	3 000	3,5 (pH, 100 %)	HPV	-	R38	R22, R36
Kaliumlauge	1310-58-3	1 120 000	14 (pH, 56 g/l)	HPV	R35	-	R22
Methyldiethanolamin	105-59-9	1 000 000		HPV	-	-	R36
Milchsäure	50-21-5	1 000 000	3,86 (pKa)	LPV	-	R38	R41
Natriumlaurylsulfat	151-21-3	150 000	6,5 – 8,5 (pH, 10g/l)	HPV	-	R38	R11, R21/22, R36/R37
Natronlauge	1310-73-2	1 260 000	14 (pH, 50 g/l)	HPV	R35	-	-
Nonansäure	112-05-0	284	4,95 (pKa)	HPV	R34	-	-
Octan	111-65-9	0,66	-	LPV	-	R38	R11, R50/53, R65, R67
Phosphorsäure	7664-38-2	539 000	2,15 (pKa)	HPV	R34	-	-
Pivalinsäure	75-98-9	25 000	5,03 (pKa)	HPV	-	R38	R21/22, R41
Propionsäureanhydrid	123-62-6	41 400	-	LPV	R34	-	-
Salzsäure	7647-01-0	360 000	- 8 (pKa)	HPV	R34	-	R37
Schwefelsäure	7664-93-9	1 000 000	-3 (pKa)	HPV	R35	-	-
Zitronensäure	77-92-9	592 000	2,79 (pKa)	HPV	-	-	R36

Anhand der genannten Kriterien wurden aus Tabelle 1 zunächst 6 Substanzen als potentiell geeignet für repetitive Irritationsversuche an Probanden identifiziert werden:

1. 2-Amino-2-ethyl-1,3-propandiol (*alkalische Substanz*)
2. 2-Amino-2-methyl-1-propanol (*alkalische Substanz*)
3. Isononansäure (*saure Substanz*)
4. Milchsäure (*saure Substanz*)
5. Pivalinsäure (*saure Substanz*)
6. Natriumlaurylsulfat (SLS) (*tensidische Substanz*)

Nachfolgend wurden 4/2008 zusätzlich weitere 3 Substanzen positiv bewertet:

7. Essigsäure, nur in einem Konzentrationsfenster von > 10 und $< 25\%$) (*saure Substanz*)
8. Zitronensäure (*saure Substanz*)
9. Natriumhydroxid (NaOH), nur in einem Konzentrationsfenster von $\geq 0,5$ und $< 2 \%$ (*alkalische Substanz*)

Keine positive toxikologische Freigabe wurde für eine Kühlschmiermittel-Rahmenrezeptur (Oemeta KSS Typ 4) erreicht. Nachdem Bedenken geäußert worden waren bezüglich eines möglichen Gehaltes an polyzyklischen aromatischen Kohlenwasserstoffen (PAHs) und hierzu keine Analysen vorlagen, wurde nach Beschluss im Begleitkreis durch das IFA im Februar 2009 eine Analyse der PAH durchgeführt. Getestet wurde das Konzentrat. Dafür wurden 5ml mit 5ml Acetonitril/MeOH 1 Stunde geschüttelt. Nach dem Absetzen wurden 2ml der oberen ACN/MeOH-Phase nacheinander über eine C18- und eine CN/SiOH-SPE-Kartusche gereinigt. Die Wiederfindung von zudotierten PAH lag bei 50-64%, dieser Faktor wurde einberechnet. Bei Betrachtung einer 5%igen AW-Konzentration war der erhaltene Wert jeweils durch 20 zu teilen. Außer für Naphthalin lagen alle Konzentrationen zwar unter der Nachweisgrenze (Tabelle 2). Naphthalin wurde von der DFG jedoch als Kanzerogen (K2) und hautresorbierbar (H) eingestuft. Auch unter Berücksichtigung der unter experimentellen Bedingungen nur kleinen Hautareale im Sinne einer sehr begrenzten Flächen-Belastung wurde dieser Befund durch das IPASUM dahingehend bewertet, dass eine Verwendung für Studien an freiwilligen hautgesunden Probanden im Rahmen eines zu etablierenden Modells aus ethischen

Gründen abgelehnt werden muss. Ferner wurde die KSS-Rahmenrezeptur aufgrund der Inhaltsstoffe 3-Iodpropinylbutylcarbammat und N,N'-Methylen(5-methylbisoaxolidin), die durch die Senatskommission zur Prüfung gesundheitsschädlicher Arbeitsstoffe mit Sh (Gefahr der Sensibilisierung durch Hautkontakt) gekennzeichnet wurden, als ungeeignet für Probandenversuche bewertet.

Tabelle 2: Ergebnisse der Analyse der KSS-Rahmenrezeptur auf PAH

	µg/ml
Naphthalin	0,074
Acenaphthylen	< 0,037
Anthracen	< 0,022
Fluoren	< 0,004
Phenanthren	< 0,48
Anthracen	< 0,64
Fluoranthren	< 0,32
Pyren	< 0,74
Benzo(a)anthracen	< 0,40
Chrysen	< 0,042
Benzo(b)fluoranthren	< 0,006
Benzo(k)fluoranthren	< 0,002
Benzo(a)pyren	< 0,004
DB(a,h)anthracen	< 0,006
Benzo(g,h,i)perylen	< 0,006
Indeno(1,2,3)pyren	< 0,009

3.2. Projektschritt 2

Um generische Referenz-Hautschutzprodukte zu konzipieren, wurden zunächst die durch den forschungsbegleitenden Arbeitskreis ausgewählten kommerziellen Hautschutzmittel evaluiert (Projektschritt 3). Die Konzeption von Referenzrezepturen sollte sich an bewährten kommerzielle Hautschutzprodukte anlehnen. Projektschritt 2 wurde daher erst nach dem Projektschritt 3 und nach Abarbeitung wesentlicher Anteile von Projektschritt 4a, Modellentwicklung, bearbeitet.

In Anlehnung an die Zusammensetzung nach INCI von 6 kommerziellen Hautschutzprodukte (s. Projektschritt 3) wurden 6 generische Hautschutzmusterrezepturen konzipiert. Diese standen im März 2010 für die weitere

Modellentwicklung zur Verfügung. Die Hautschutzmuster wurden mit S1, S2, L1, L2, T1 und T2 bezeichnet. Der zugehörige Bericht des Auftragsforschungsinstituts (Hochschule Ostwestfalen-Lippe OWL, Bereich Pharmatechnik (Prof. G. Kutz) einschließlich der Angaben zu Zusammensetzung und Herstellung wird der DGUV als Forschungsgeber separat übermittelt. Im Projektschritt 4A (s. dort) wurden die generischen Hautschutzmuster im neuen in vivo-Modell gegen die verschiedenen Irritantien auf ihre Schutzwirkung getestet. Hierbei qualifizierten sich die Hautschutzmuster unterschiedlich. Zwei Hautschutzmuster wurden nachfolgend ausgewählt (T1 und T2) und in einem zweiten Schritt an der Hochschule OWL weiter optimiert. In diesem Arbeitsgang wurden sogenannte Compounds, fertige Mischungen bestimmter Inhaltsstoffe, die unter Handelsnamen vertrieben und von Hautschutzmittelherstellern als Bestandteile für Produktrezepturen eingekauft und verwendet werden, durch geeignete Einzelinhaltsstoffe ersetzt. Ziel dieser Rezepturüberarbeitung war es, notwendige Inhaltsstoffe der künftigen Hautschutzmittelreferenz-Muster auch zukünftig herstellerunabhängig beziehen zu können, um eine langfristig reproduzierbare Rezeptur zu erhalten. Ferner wurden die beiden optimierten Muster Stabilitätsprüfungen unterzogen. Der detaillierte Bericht wird der DGUV als Forschungsgeber ebenfalls separat übermittelt.

3.3. Projektschritt 3

Im Dezember 2009 wurden durch den forschungsbegleitenden Arbeitskreis insgesamt 6 kommerzielle Hautschutzprodukte benannt, die eine Relevanz in Bezug auf Auslobung und Einsatz gegen saure, basische und tensidische Irritantien besitzen. Es handelte sich dabei um Produkte mit folgenden Auslobung:

- „Schutz vor wässrigen Arbeitsstoffen“, (S1)
- „Schutz gegen wässrige Lösung, Säuren, Laugen“, (S2)
- „Schutz gegen wasserlöslichen Schadstoffen“, (L1)
- „Schützt vor wasserlöslichen Schadstoffen“, (L2)
- „Eignung für Waschmittellösungen“, (T1)
- „Gegen SLS geprüft“, (T2)

Auf Grundlage der qualitativen Zusammensetzung dieser Produkte wurden in Projektschritt 2 die generischen Hautschutzmuster konzipiert (s. dort).

3.4. Projektschritt 4A

3.4.1 Evaluation des Irritationspotentials

Mit der Evaluation des Irritationspotentials der vom IPASUM positiv bewerteten Substanzen wurde nach Erhalt der toxikologischen Einschätzung begonnen. Ziel der in vivo-Testungen war es, die theoretisch geeigneten Substanzen in vivo im Hinblick auf Ihre Eignung als Standardirritantien in einem repetitiven Irritationsmodell zu untersuchen. Hierfür waren geeignete wässrige Konzentrationen und Einwirkzeiten zu identifizieren, die einen ausreichenden und reproduzierbaren Irritationsgrad hervorrufen.

Material und Methoden

9 Substanzen wurden untersucht (Tabelle 3).

Es wurden mit jeder Substanz mehrere repetitive Irritationstests mit simultaner Testung verschiedener wässriger Konzentrationen an einer Probandenzahl von jeweils $n=10-20$ durchgeführt. Verwendet wurde ein viertägiges repetitives Irritationsmodell mit 2mal täglicher Irritantieneinwirkung an der Rückenhaut im Abstand von 3 h (+/-1h). Die jeweilige Einwirkzeit für die okklusive Applikation von jeweils 50 Mikrolitern (Finn Chambers large, 12mm, mit Filterpapierscheiben) betrug 30 Minuten. Der Irritationsgrad wurde an den Versuchstagen 1-4 vor der Irritation und an Tag 5 klinisch durch bewertet und mit nicht-invasiven hautphysiologischen Standardmethoden (Transepidermaler Wasserverlust TEWL, Corneometrie, Chromametrie, weitere Angaben zu den Geräten und Messmodalitäten siehe Projektschritt 4b) quantifiziert. Zur klinischen Beurteilung der kumulativen Irritationswirkung wurde der ESCD Score für kumulative Irritation verwendet (20). Die Probanden wurden vor jeder Messung für mindestens 20 min. an die standardisierten Umgebungsbedingungen akklimatisiert (Raumtemperatur 21 ± 1 Grad; RLF $45 \pm 5\%$). Es wurden klinische Abbruchkriterien für einzelne Testfelder (Irritationsscore in einem oder mehreren Parametern = 3) definiert, um eine übermäßigen Irritationsgrad zu vermeiden. Im Falle des Erreichens dieser Kriterien (s. Projektschritt 4b) wurde die Irritation im betreffenden Testfeld vorzeitig beendet und eine Abschlussmessung durchgeführt. In diesen Versuchsserien wurde für die Auswertung der zuletzt erhaltene Wert fortgeschrieben.

Ergebnisse

Für die Mehrzahl der Substanzen lagen bis dato keine Erfahrungen und keine Literaturangaben über geeignete Anwendungskonzentrationen für die experimentelle kumulative Irritation vor. Es wurden daher sequentiell ansteigende Konzentrationsstufen untersucht, um die für einen ausreichenden und reproduzierbaren Irritationsgrad geeigneten wässrige Konzentration des jeweiligen Irritans bei der gegebenen Applikationszeit im Sinne einer Titration zu identifizieren. Insgesamt waren 20 Testserien von jeweils einwöchigen repetitiven Irritationstestungen an insgesamt 99 Probanden notwendig. Es wurden verschiedene Irritantien und Konzentrationen intraindividuell vergleichend gleichzeitig geprüft. Nicht alle Substanzen zeigten ein ausreichendes Irritationspotential. Zitronensäure zeigte sich auch in der maximal möglichen, durch die Löslichkeit bzw. Ausfällung limitierten, Konzentration als zu wenig irritativ. Die Modellentwicklung wurde daher nur mit den in Tabelle 3 gekennzeichneten Irritantien (fett unterlegt) fortgesetzt. Essigsäure erwies sich im Vergleich zu Milchsäure als besser steuerbar bei insgesamt ähnlicher Irritationswirkung und zeigte homogenere Irritationseffekte. Der Irritationsgrad war damit im Testfeld gleichmäßiger und besser standardisierbar. Im Vergleich zu den basischen Irritantien wiesen die sauren Substanzen klinisch ein follikuläres Penetrationsmuster mit der Ausbildung flüchtiger follikulärer Urticae im Sinne einer Soforttypreaktion auf. Diese Beobachtung weist auf eine Bedeutung der transfollikulären Penetration und eine durch Milch- und Essigsäure verursachte dermale Mastzelldegranulation im Follikel hin, die in dieser Form in der Literatur noch nicht beschrieben wurde. Die untersuchten basischen Irritantien wiesen gegenüber den sauren Irritantien insgesamt ein höheres Irritationspotential auf. Die Irritationseffekte waren klinisch flächiger Natur und wiesen morphologisch Ähnlichkeiten zu tensidischen Irritationseffekten, sogenannten Seifeneffekten, auf (26).

Tabelle 3: Übersicht über in vivo getestete Irritantien und Konzentrationen

	Substanz	Getestete Konzentrationen (%)	Geeignete Konzentration (%)	Bemerkungen
1	Pivalinsäure	1,2	keine	Zu wenig irritativ, andere Konz. nicht möglich
2	Isononansäure	0,3	keine	Zu wenig irritativ, andere Konz. nicht möglich
3	Zitronensäure	10, 15, 30, 40, 50, 60	keine	Zu wenig irritativ
4	Milchsäure	15 u. 20	20	15% auch möglich
5	Essigsäure	3, 4, 6, 8, 10, 12, 15, 20, 24	20	-
6	Natriumlaurylsulfat, SLS	0,5	0,5	
7	2- Amino-2-ethyl-1,3-propandiol	5, 8, 10	10	LPV, daher nicht gewählt
8	2-Amino-2-methyl-1-propanol	2, 3, 5	3	HPV, 5% zu irritativ
9	NaOH	0,3 ;0,5	0,5	-

3.4.2 Screening der Hautschutzmittelmuster 1-6 im Modell (Wirksamkeit)

Ziel dieser Untersuchung war es, für die Weiterentwicklung im Modell aus den 6 verfügbaren jeweils eine wirksame Referenzrezeptur gegen jede der 3 Irritantiengruppen zu identifizieren.

Material und Methoden

Die im Projektschritt 2 konzipierten generischen Hautschutzmittelmuster (S1, S2, L1, L2, T1, T2) wurden im repetitiven Irritationsmodell jeweils gegen die in Abstimmung mit dem Begleitkreis ausgewählten geeigneten Irritantien getestet. Es handelte sich um SLS (als Standardirritans für Tenside), um Essig- und Milchsäure (als Vertreter

saurer Irritantien) sowie um NaOH und 2-Amino-2-methyl-1-propanol (als Vertreter basischer Irritantien) in den ermittelten idealen Konzentrationen auf ihre Schutzwirkung untersucht. Hierfür wurden die 6 Muster jeweils einfach blind an 3 Kollektiven (n= 10-15) an der Rückenhaut getestet. Die Hautschutzpräparate wurden jeweils 10 Minuten vor der Irritantienapplikation mit einer Eppendorf Multipette als Volumina appliziert. Eine Versuchsserie wurde mit einem um den Faktor 10 geringeren Volumen, mit 5 Mikroliter pro Testfeld, durchgeführt. Nach Ermittlung von Wiegeversuchen der Hautschutzmittelmuster wurde eine approximative Dichte von 1 ermittelt. Die applizierte Dosis, d.h. die aufgetragene Masse (mg) pro Hautoberfläche (cm^2), lag somit bei einer Testfelddurchmesser von 18mm bei 20 bzw. 2mg/cm². Als Grundlage für diese methodischen Überlegungen dienten Erkenntnisse aus projektunabhängigen Untersuchungen zur tatsächlich verwendeten Dosis pro Hautoberfläche im Arbeitsalltag von Krankenschwestern und experimentelle Untersuchungen verschiedener Flächendosen im Halbseitenvergleich in einem repetitiven Irritationstest (27, 28). Ferner wurde berücksichtigt, dass in Lichtschutzfaktor-Prüfungen nach COLIPA verwendeten Externamengen 2mg/cm² betragen. Es wurden Standard-Volumina von 50 Mikroliter für die Irritantien pro Testfeld verwendet. Felder, die jeweils nur mit dem entsprechenden Irritans behandelt wurden (kein Hautschutz) und nur mit Aqua ad injectabilia behandelte Felder dienten als Positiv- bzw. Negativkontrollen.

Die Hautschutzmittel wurden nach Auftrag mittels Multipette im Testfeld gleichmäßig mit einem behandschuhtem Finger verteilt und wirkten offen 10 Minuten ein, wie es in etwa auch der Anwendungswirklichkeit von Hautschutzmitteln im Arbeitsalltag entspricht. Die Irritantien wurden anschließend in der geeigneten wässrigen Verdünnung (Tabelle 3) okklusiv appliziert, wie bereits im vorherigen Abschnitt beschrieben. Die Modalitäten der hautphysiologische Messungen entsprachen denjenigen im vorherigen Abschnitt.

Für die Untersuchung der Schutzeffekte wurden die an Tag 5 ermittelten Werte der jeweiligen Parameter (Differences to baseline) herangezogen und die eingetretenen Irritationseffekte der „geschützten“ Felder mit denjenigen der Kontrollen mittels Wilcoxon-Test auf signifikante Unterschiede geprüft, wobei ein p-Wert $\leq 0,05$ als signifikant bewertet wurde.

Ergebnisse

Es zeigte sich, dass bei der Testung zum Schutz vor kumulativer Irritationswirkung durch basische Irritantien alle Muster (Serie 50 Mikroliter pro Testfeld) bis auf L2 eine signifikante Wirksamkeit im Vergleich zum ausschließlich irritierten Testfeld aufwiesen, und zwar in den Parametern TEWL, Stratum-corneum Hydratation und Chromametrie, mit bester Schutzwirkung bei T1, T2 und L1. In der Serie mit 5 Mikrolitern pro Testfeld mit denselben Irritantien und Mustern wurden vergleichbare Ergebnisse festgestellt. Als Resultat wurde fortan mit 5 Mikrolitern pro Testfeld gearbeitet. Gegenüber den beiden sauren Irritantien erwiesen sich das Muster T2 als am wirksamsten, während keine Schutzwirkung für L1, S1 und S2 nachgewiesen wurde. Gegenüber SLS wurde eine Schutzwirkung bei T2 und L2 festgestellt, nicht jedoch bei T1.

Diskussion zur Methodenentwicklung

Die vorläufigen Ergebnisse deuteten darauf hin, dass eine nachgewiesene Schutzwirkung gegen eine Irritantiengruppe nicht automatisch eine ebensolche Schutzwirkung vor anderen wässrigen Irritantien impliziert. So war L2 zwar gegenüber SLS gut schützend, erwies sich jedoch gegenüber basischen Irritantien als unwirksam. In Folge dieser Befunde wurde im Rahmen des Begleitkreistreffens am 31.08.2010 beschlossen, die Muster T1 (gegen basische Irritantien) und T2 (gegen saure und tensidische Irritantien) als Hautschutzmittelreferenzen für das Testmodell zu optimieren (s. Projektschritt 2).

3.4.3 *Nochmalige Prüfung der optimierten Hautschutzmittelmuster T1 , T2*

Ziel dieser Untersuchung war es, die in der Rezeptur geringfügig veränderten Muster nochmals in Bezug auf ihre Wirksamkeit gegen die ausgewählten Irritantiengruppen zu untersuchen.

Material und Methoden

Das bereits beschriebene Testmodell wurde modifiziert. Es wurde nunmehr eine Zieldosis an Hautschutzmittel von $3\text{mg}/\text{cm}^2$ Hautoberfläche angestrebt. Ausschlaggebend für diese Modifikation waren Resultate im Laufe der Methodenentwicklung und neue Erkenntnisse zum Auftragsverhalten von Anwendern unter Arbeitsplatzbedingungen (27, 28). Als Konsequenz hieraus folgte eine

Umstellung des Verfahrens auf Abwiegen der Hautschutzpräparate anstatt einer bisherigen volumenbezogenen Applikation, da bei geringeren Auftragsmengen und parallele Testung galenisch unterschiedlicher Zubereitungen galenisch bedingte Dichteunterschiede anteilig bedeutsamer sind. Es erfolgten serielle Wiegeversuche mit den verschiedenen Präparationen, um den systematischen Verlust beim Auftragen bzw. Verteilen der HSP im Testfeld zu quantifizieren. Es erfolgten jeweils 3 Wiegevorgänge nacheinander pro HSP (Wiegen des Fingerlings, Wiegen des HSP auf Alufolie, Abnehmen des HSP mittels Fingerling und Verteilung auf 2cm durchmessendem Areal, Rückwiegen der Alufolie, Rückwiegen des Fingerlings). Hierbei zeigte sich, dass Anhaftungen an der Alufolie zu vernachlässigen sind. Der Verlust durch Anhaftungen am Fingerling betrug 1,9mg (+- 0,9mg). Hieraus ergab sich, dass nachfolgend pro Testfeld und Auftragsvorgang 11,4 mg abgewogen wurden, sodass bei einem Testfelddurchmesser von 2 cm (Testfeldfläche 3,14cm²) schlussendlich ein Auftrag von 9mg (3,0mg/cm²) resultierte.

Das übrige Procedere entsprach demjenigen im vorherigen Projektschritt.

Ergebnisse

Bei Vergleich der Irritationsintensität der vorbehandelten Testfelder in den verschiedenen Parametern an Tag 5 gegenüber den nur mit Irritantien behandelten Kontrollfeldern wurde positive Schutzwirkung für die modifizierten Muster T1 und T2 grundsätzlich auch bei der gegebenen Dosis bestätigt (Abb. 1 und 2).

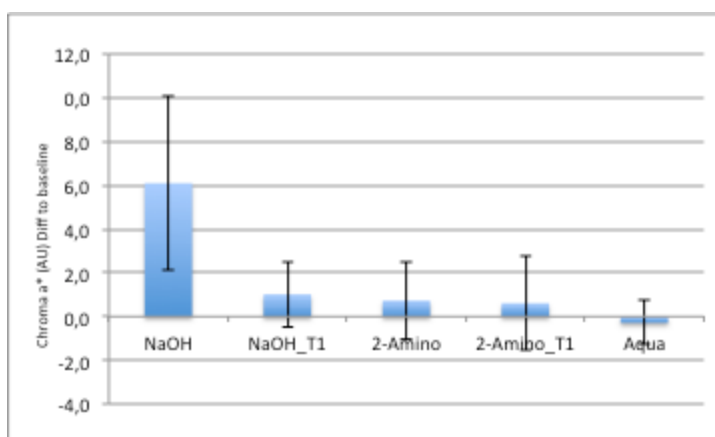


Abb. 1a: Erythementwicklung durch die beiden basischen Irritantien jeweils mit und ohne Schutz T1. Mittlere Differenzen der Chromametrie a*-Werte (d5-d1) mit Standardabweichungen (n=12). Signifikanter Unterschied bei NaOH mit T1 versus ohne Schutz ($p < 0,05$, Wilcoxon), n.s. für 2-Amino-2 methyl-1-propanol 3 % mit Schutz versus ohne.

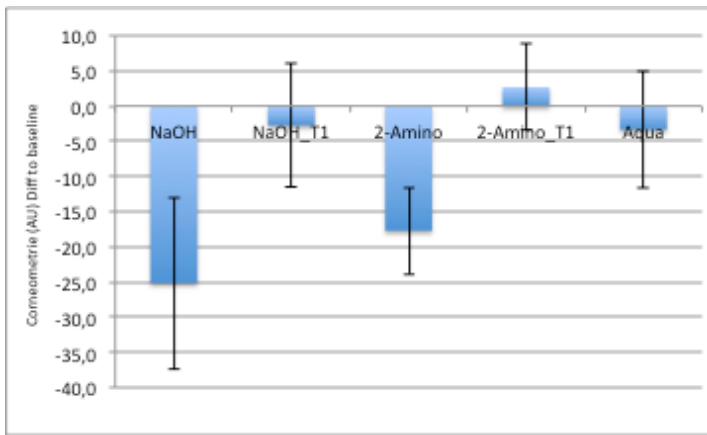


Abb. 1b: Abnahme der Stratum corneum-Hydratation durch die beiden basischen Irritantien jeweils mit und ohne Schutz T1. Mittlere Differenzen (d5-d1) mit Standardabweichungen (n=12). Signifikante Unterschiede jeweils zwischen geschütztem Feld (mit T1) versus ohne Schutz ($p < 0,05$, Wilcoxon).

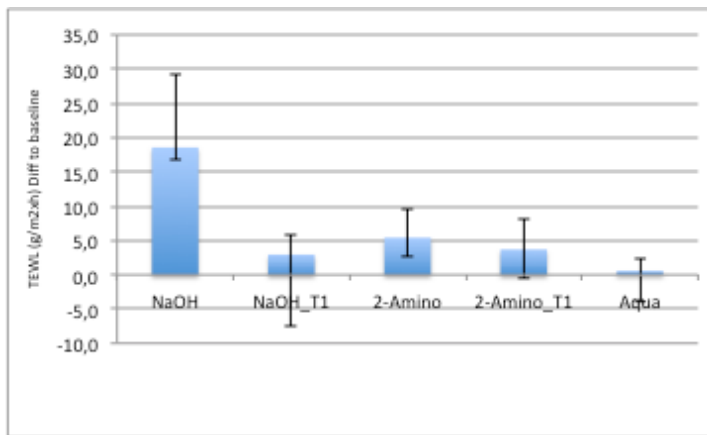


Abb. 1c: Zunahme des TEWL durch die beiden basischen Irritantien jeweils mit und ohne Schutz T1. Mittlere Differenzen (d5-d1) mit Standardabweichungen (n=12). Signifikanter Unterschied bei NaOH mit T1 versus ohne Schutz ($p < 0,05$, Wilcoxon), n.s. für 2-Amino-2 methyl-1-propanol 3 % mit Schutz versus ohne.

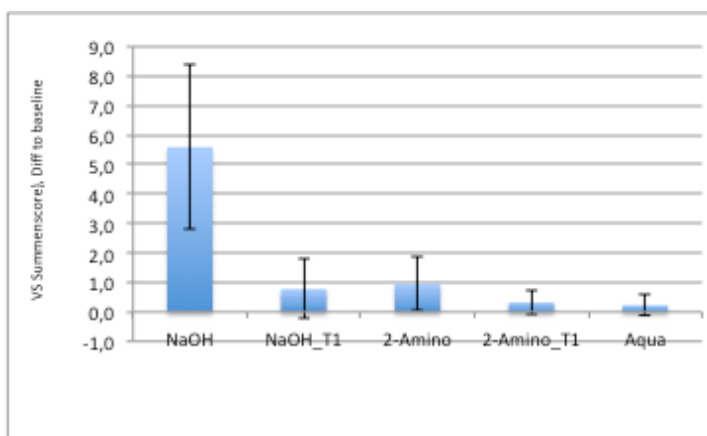


Abb. 1d: Anstieg des visuellen Summscores durch die beiden basischen Irritantien jeweils mit und ohne Schutz T1. Mittlere Differenzen (d5-d1) mit Standardabweichungen (n=12). Signifikante Unterschiede jeweils zwischen geschütztem Feld (mit T1) versus ohne Schutz ($p < 0,05$, Wilcoxon).

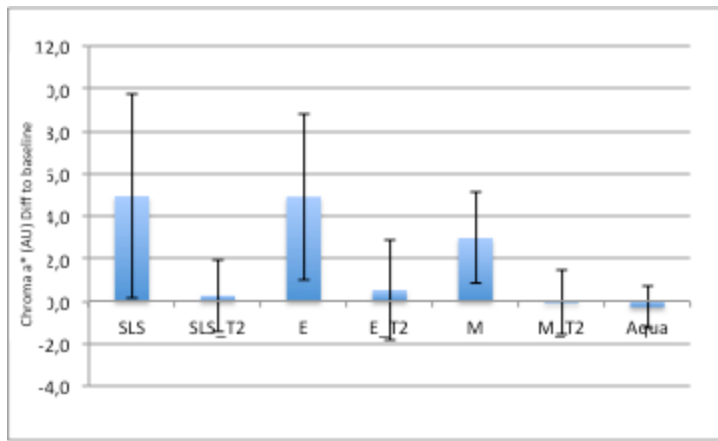


Abb. 2a: Erythementwicklung durch das tensidische Irritans SLS und die sauren Irritantien jeweils mit und ohne Schutz T2. Mittlere Differenzen der Chromametrie a*-Werte (d5-d1) mit Standardabweichungen (n=12). Signifikante Unterschiede jeweils zwischen geschütztem Feld (mit T2) versus ohne Schutz ($p < 0,05$, Wilcoxon).

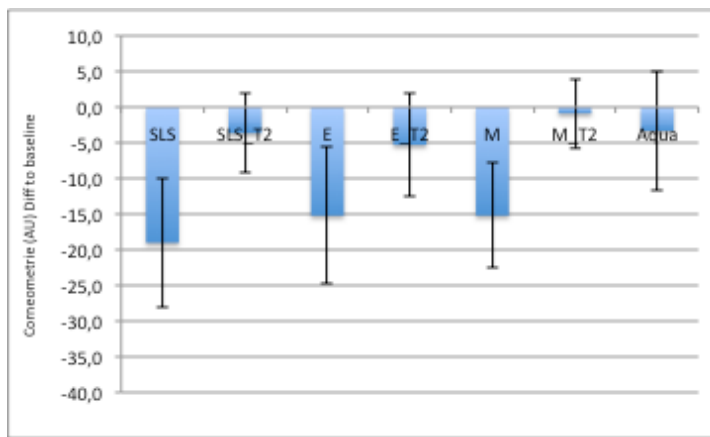


Abb. 2b: Abnahme der Stratum corneum-Hydratation durch das tensidische Irritans SLS und die sauren Irritantien jeweils mit und ohne Schutz T2. Mittlere Differenzen (d5-d1) mit Standardabweichungen (n=12). Signifikante Unterschiede jeweils zwischen geschütztem Feld (mit T2) versus ohne Schutz ($p < 0,05$, Wilcoxon).

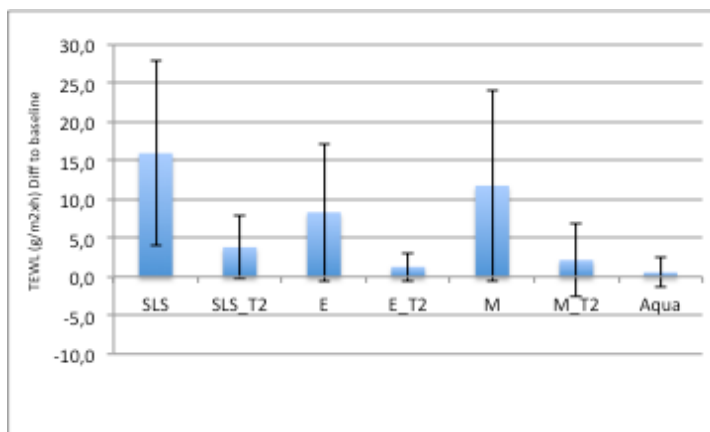


Abb. 2c: Zunahme des TEWL durch das tensidische Irritans SLS und die sauren Irritantien jeweils mit und ohne Schutz T2. Mittlere Differenzen (d5-d1) mit Standardabweichungen (n=12). Unterschiede jeweils zwischen geschütztem Feld (mit T2) versus ohne Schutz ($p < 0,05$, Wilcoxon).

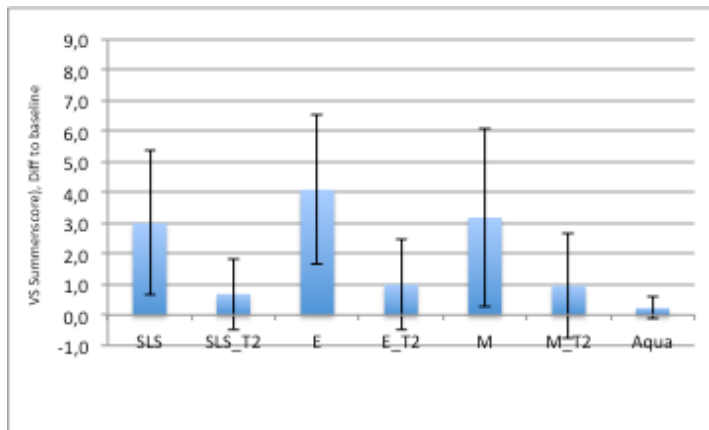


Abb. 2d: Anstieg des visuellen Summscores durch das tensidische Irritans SLS und die sauren Irritantien jeweils mit und ohne Schutz T2. Mittlere Differenzen (d5-d1) mit Standardabweichungen (n=12). Unterschiede jeweils zwischen geschütztem Feld (mit T2) versus ohne Schutz ($p < 0,05$, Wilcoxon).

3.5. Projektschritt 4B Multicenterstudie

3.5.1 Einleitung

Ziel der multizentrischen Validierungsstudie war es, die Transferfähigkeit des in-vivo Wirksamkeitstestmodells und die Reproduzierbarkeit der gewonnenen Ergebnisse (Wirksamkeit der entwickelten generischen Hautschutzmittelreferenzen T1 und T2 in Bezug auf die identifizierten Leitirritantien) zu evaluieren. Das Studienprotokoll wurde in Jena erstellt und mit den Projektpartnern inhaltlich abgestimmt. Der Ethikantrag wurde bei der lokalen Ethikkommission in Jena gestellt und nachfolgend bei den lokalen Ethikkommissionen der teilnehmenden Zentren Heidelberg und Osnabrück als Zweitvotum bestätigt. Die Vorbereitung der Multicenterstudie schloss ein Vorbereitungstreffen der beteiligten Mitarbeiter der Zentren Heidelberg und Osnabrück in Jena in der Kalenderwoche 41/2011 ein. Hierbei wurde das Testprocedere praktisch erprobt. Die Untersuchung erfolgte zeitgleich in 3 Zentren, Heidelberg, Jena und Osnabrück, zwischen den KW 42-50 2011. Die vollständigen Datensätze wurden an das Zentrum Heidelberg zur Auswertung übermittelt (realisiert in personeller Trennung zur dortigen Durchführungsphase).

3.5.2 Material und Methoden

3.5.2.1 Fallzahlschätzung

Bei der Berechnung der SampleSize durch das Zentrum Heidelberg wurde auf den zuvor festgelegten hautphysiologischen Primärparameter (TEWL) fokussiert.

Aufgrund der gefundenen Effektstärke von 0,52 – 1,61 wurde eine Fallzahl von 3*16 festgelegt (29).

3.5.2.2 Probanden

Pro Zentrum wurden 16 Probanden im Alter zwischen 18 und 55 Jahren rekrutiert. Bei allen Probanden wurde der Atopiescore erhoben (ohne Serumparameter). Um Zentrumsunterschiede durch Inhomogenitäten der Probandenkollektive des Merkmals einer „Hautatopie“ ausschließen, durften pro Zentrum maximal 2 von 16 Probanden (12,5%) einen Atopiescore > 8 Punkte aufweisen.

Einschlusskriterien

1. Unterschriebene Einverständniserklärung
2. Alter: 18 bis 55 Jahre
3. Geschlecht: männlich oder weiblich
4. Gesunde Haut am Rücken
5. Lichttyp I-IV nach Fitzpatrick
6. keine Anwendung von Externa am Rücken ab 3 Tage vorher (bei Beginn der Studie am Montag also von Freitag inklusive) und während der Studientage

Ausschlusskriterien

1. Schwangerschaft oder Stillzeit, soweit bekannt
2. Deutliche Behaarung am Rücken, Tätowierung oder Narben
3. Dermatologische Lokalthherapie am Rücken innerhalb der letzten 4 Wochen
4. Natürliche oder künstliche intensive UV-Lichtexposition innerhalb 4 Wochen vor Untersuchungsbeginn und während der Studie am Rücken
5. Sportliche Betätigung mit starkem Schwitzen (normale Fortbewegung per Fahrrad etc. ist erlaubt) während der Untersuchungswoche, Besuch von Sauna oder Schwimmbad
5. Kontaktsensibilisierungen gegen Bestandteile der Testsubstanzen (Muster T1 und T2).
6. Schwere bzw. chronische dermatologische Erkrankungen
7. Schwere Allgemeinerkrankungen oder Erkrankungen, die nach

Auffassung des Untersuchers das Ergebnis beeinflussen können

8. Einnahme immunsuppressiver Substanzen oder von Medikamenten, die nach Auffassung des Untersuchers das Ergebnis beeinflussen können
9. Mangelnde Kooperationsbereitschaft
10. Atopiescore > 8 Punkte, sofern bereits 2 weitere Probanden eingeschlossen wurden, die dieses Kriterium erfüllen

3.5.2.3 Irritantien

- Natriumlaurylsulfat (SLS) 0,5% Aqu. dest.
- 2-Amino-2 methyl-1-propanol 3 % Aqu. dest.
- Essigsäure 20% Aqu. dest.
- Natronlauge 0,5% Aqu. dest.

Die Verdünnungen waren jeweils zu Wochenanfang frisch herzustellen und im Kühlschrank zu lagern.

3.5.2.4 Hautschutzmittel-Referenzmuster

- T1 Zusammensetzung (INCI):

Aqua, Petrolatum, Paraffinum liquidum, Glycerin, Cetearyl Isononanoate, Glyceryl Oleate, Ozokerite, Hydrogenated Castor Oil, Steareth-2, Magnesium Sulfate, Propylparaben, Methylparaben

- T2 Zusammensetzung (INCI):

Aqua, Paraffinum liquidum, Urea, Petrolatum, Cera Alba, Cholesterol, Zinc Stearate, Stearic Acid, Lanolin Alcohol, Sodium Hydroxide, Propylparaben, Methylparaben.

Die Testmuster wurden durch die Hochschule Ostwestfalen-Lippe, Bereich Pharmatechnik (Prof. G. Kutz) bereitgestellt. Es lagen Herstellungsdocumentationen und Analysenzertifikate vor. Handelsnamen, Chargen und Artikelnummern der verwendeten Rohstoffe wurden hinterlegt. Die Muster waren im Kühlschrank zu lagern.

3.5.2.5 Visueller Score

Visueller Score: ESCD Irritationsscore für kumulative Irritation (20).

Erythem – **0**: keines, **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 Bewertung aller Parameter wurde einzeln erfasst und vom Datenmanagement die Punktwerte zum Summenscore addiert.

Abbruchkriterium: Die Irritation wurde nur im betroffenen Testfeld vorzeitig beendet, wenn in einem Testfeld morgens einer oder mehrere der Einzelparameter den Wert 3 erreichten. Es wurden am Folgemorgen nach der letzten Applikation die Abschlussbewertungen/Messungen dieses Feldes durchgeführt. An den Folgetagen wurden die fehlenden Werte nur für dieses Feld als „missing values“ eingetragen (die anderen Felder werden gemäß Randomisierungsplan und protokollgemäß weiter behandelt). Die ggf. eingetretenen vorzeitigen Abbrüche wurden auf dem Randomisierungsbogen mit Datum unter Ausformulierung des Abbruchgrundes dokumentiert und anschließend vom Datenmanagement deskriptiv ausgewertet.

3.5.2.6 Geräte und Durchführung der Messungen

Für die hautphysiologischen Messungen wurden folgende Geräte verwendet:

- Tewameter MPA/TM 300 (Fa. Courage & Khazaka, Köln)
- MPA/Corneometer® CM 820 (Fa. Courage & Khazaka, Köln)
- Chromameter CM 300 (Fa. Konica-Minolta)

Die Tewameter- und Corneometersonden durchliefen vorher einen Geräte/-Messabgleich mit Kalibrierung durch den Hersteller (Courage & Khazaka, Köln). Ein Abgleich der Chromameter war laut Hersteller wegen der verschiedenen Filter nicht möglich. Vergleichende Messungen anlässlich des Vorbereitungstreffens erbrachten ausreichend übereinstimmende Werte (a^* - und L-Werte) der in den Zentren verwendeten Geräte.

Die TEWL- und Corneometer-Messungen erfolgten mit der vom Hersteller zur Verfügung gestellten Software mit folgenden Standardeinstellungen: Heizung aus; Standardabweichung auf 0,2; mindestens 20 Messungen; Mittelwert bilden anhand von 5 Einzelmessungen; eine Messung pro Sekunde. Die chromametrischen und corneometrischen Messungen erfolgten als Dreifachmessung pro Testfeld, die Messung des TEWL als Zweifachmessung unter Beachtung der einschlägigen Empfehlungen (30-32).

3.5.2.7 Klimabedingungen

Der Einhaltung der Klimabedingungen (Temperatur 21 +/- 1 Grad; RLF 45 +/- 5%) kontinuierlich zu überwacht und in regelmäßigen Abständen mehrfach täglich protokolliert. Im Falle vorübergehender Abweichungen wurden Zeitpunkt und Dauer dokumentiert und anschließend hinsichtlich ihrer Relevanz durch den Untersucher bewertet.

3.5.2.8 Untersuchungsablauf

Nach der Unterschrift der Einwilligungserklärung, Erhebung der E/A-Kriterien und des Atopiescores (33, 34) erfolgte die Akklimatisierung der Probanden im Untersuchungsraum für mindestens 30 Minuten mit frei liegendem Rücken (Temperatur 21 +/- 1 Grad; RLF 45 +/- 5%). Die Akklimatisierung wurde an allen Studientagen vor den Messungen durchgeführt.

Es wurden 9 Testfelder am mittleren Rücken beidseits paravertebral am liegenden Probanden mittels Hautmarker und Schablone markiert (Anordnung in 2 Spalten und 3 Reihen pro Rückenhälfte, Durchmesser der runden Felder 20mm). Anschließend erfolgten die Ausgangsmessungen.

Zur Reihenfolge der klinischen Bewertung der Irritation und apparativen Ausgangsmessungen/Folgemessungen s. **Tabelle 4**.

Tabelle 4: Ablaufplan der einzelnen Untersuchungstage

Ablaufplan						
	Mo	Di	Mi	Do	Fr	Sa
Visueller Score	X	X	X	X	X	X
Chromametrie	X	X	X	X	X	X
Tewametrie	X	X	X	X	X	X
Corneometrie	X	X	X	X	X	X
1. Applikation T1/T2 & Irritation	X	X	X	X	X	
2. Applikation T1/T & Irritation	X	X	X	X	X	

Im Anschluss an die Messungen wurden die Externa auf die Testfelder aufgetragen. Die Zuordnung der Behandlung der einzelnen Testfelder folgte einem Randomisierungsplan. Die Externa wurden unmittelbar vor der Applikation abgewogen. Es wurden pro Testfeld (2cm Durchmesser) und Applikation jeweils 11,4mg (+/- 0,2mg) auf einem Alufolienabschnitt abgewogen (Zielmenge 3mg pro Quadratcentimeter, Testfeldgröße 3,14cm², Berücksichtigung eines Verlustes durch Anhaftungen am Fingerling). Es wurden geeichte und kalibrierte elektronische Analysenwaagen (Sartorius extend, Kl. 1; ED124S-OCE) verwendet. Von der Alufolie wurde das Externum mit einem mit Fingerling versehenen Finger vollständig abgenommen, gleichmäßig im Testfeld verteilt und offen einwirken gelassen. Nach Auftrag auf das letzte Testfeld betrug die Einwirkzeit 10 Minuten, wonach die

Irritantienapplikation erfolgte.

Tabelle 5: Testfelder

1	SLS (Positivkontrolle)
2	2- Amino-2 methyl-1-propanol 3 % (Positivkontrolle)
3	NaOH 0,5% (Positivkontrolle)
4	Essigsäure 20% (Positivkontrolle)
5	T1 gegen 2-Amino-2 methyl-1-propanol 3 %
6	T1 gegen NaOH 0,5%
7	T2 gegen SLS
8	T2 gegen Essigsäure 20%
9	Leerfeld ohne Okklusion und Behandlung (Negativkontrolle)

Nach Ablauf der Einwirkzeit von T1 bzw. T2 wurden die Irritantien nacheinander gemäß Randomisierungsplan auf die Testfelder appliziert. Es wurden jeweils 50 Mikroliter mit der Multipette in die mit Filterpapierscheiben versehenen Testkammern pipettiert. (Finn Chamber large, Durchmesser 12mm mit Filterpapierscheiben, (Epitest Ltd Oy, Tuusula, Vertrieb durch Smart Practice Germany GmbH, Barsbüttel). Erst nachdem die Substanzen in alle 8 Kammern pipettiert worden waren, wurden diese nacheinander in der Reihenfolge des Randomisierungsplanes exakt mittig innerhalb der 2cm durchmessenden Testfelder platziert und dort reihenweise mit einem Fixierpflaster für 30 Minuten fixiert. Nach Ablauf der 30 Minuten wurden die Testkammern entfernt und die Testfelder mit nur Kleidung bedeckt.

Die Applikation von HSP und Irritation wurden aufgrund einer vom forschungsbegleitenden Arbeitskreis gewünschten Protokollmodifikation von Montag bis einschließlich Freitag durchgeführt (insgesamt 10 Applikationen anstatt zuvor 8 an 4 Tagen), um eine Auswertung im Hinblick auf eine dadurch möglicherweise verbesserte Aussagekraft der Resultate untersuchen zu können. Die Behandlungen erfolgten am selben Tag 3 Stunden nach Beginn der vorherigen Applikation (+/- 1h).

3.5.2.9 Wiegeversuche

Pro Zentrum wurden einmalig 100 Fingerlinge im Paket ausgewogen und das mittlere Gewicht eines leeren Fingerlings bestimmt. Beim ersten Probanden jeder Woche wurden die Fingerlinge jeweils nach dem Auftrag des Externums mit Restanhaftung gewogen und das Gewicht notiert.

3.5.2.10 Auswertung

Das Zentrum Heidelberg war für die Erstellung der Datenblätter, für das Datenmanagement und die statistische Auswertung einschließlich des biometrischen Berichts verantwortlich. Um sicherzustellen, dass die zu untersuchenden Irritantien/Hautschutz-Externa-Kombinationen und die Negativkontrolle auf die neun Messfelder gleichverteilt untersucht werden, wurden für jeden zu untersuchenden Teilnehmer individuelle, vorbeschriftete Datenblätter vorbereitet.

Für jeden der 6 Messtage (Montag – Samstag) wurde je ein Datenblatt erstellt zur Dokumentation von

- Untersuchungstag mit Datum, Uhrzeit, Raumtemperatur und rel. Luftfeuchtigkeit
- Je Irritation: Uhrzeit und je Externum: Gewicht des Fingerlings zum Auftragen des Externums vor und nach Applikation
- Je Feld: Visual Score, zwei TEWL-Messungen, drei Corneometrie-Messungen und drei Chromametrie-Messungen.

Die ausgefüllten Datenblätter wurden in Heidelberg in eine Microsoft Access® Datenbank erfasst. Um fehlerhafte Erfassung auszuschließen, wurden Algorithmen verwendet, die schon während der Eingabe, die einzelnen Datensätze auf Plausibilität prüften. Alle Datensätze wurden doppelt erfasst und auf Übereinstimmung geprüft. Differenzen konnten allesamt entweder nach Durchsicht der Originalunterlagen oder nach Rücksprache mit dem Zentrum geklärt werden. Von allen erfassten Datensätzen wurden Ausdrücke angefertigt, die zur Endkontrolle nochmals mit den Originalbögen gegengeprüft wurden.

Alle statistischen Analysen (Heidelberg) wurden mit Prozeduren der SAS® 9.2 Software durchgeführt. Dabei kamen neben dem SAS Base® Produkt (35, 36) auch die Produkte SAS/Stat® (37) und SAS/Graph® (38) zum Einsatz. Da einfaktoriellement drei Zentren miteinander zu vergleichen waren, wurden gefundene Zentrumunterschiede mit Anpassungen nach „Bonferroni“ weiter aufgeschlüsselt (39). Die Analysen der

Schutzfaktoren (konservativ-lineare Modelle und lineare Mixed Models / Populations Fit und nicht lineare Mixed Models) wurden durch das externe Institut (Menne Biomed Consulting, Tübingen) mit dem Statistikprogramm R Version 2.15.0 (40) durchgeführt (siehe den detaillierten Bericht, Anlage 1).

3.5.3 Ergebnisse

3.5.3.1 Plausibilitätsüberprüfung

In Anlehnung an die Empfehlungen von Kuss (41) und die Auswertung von Schnetz (42) wurde zunächst jede individuelle Messreihe aus den 12 TEWL-Messungen (2 Messungen an 6 aufeinanderfolgenden Tagen) resp. den 18 Messungen für die Corneometrie und Chromametrie auf auffällige Einzelmessungen untersucht. Alle durch Proc ROBUSTREG (37) identifizierten Messreihen die mindestens einen Ausreißer (43) enthielten wurden graphisch dargestellt (38) und in jedem Einzelfall anhand der Datenblätter und Aufzeichnungen auf Plausibilität geprüft.

Für jede Messreihe wurde anschließend mit Proc REG eine lineare Regression berechnet. Damit wurde für jede Messreihe ein geschätzter Ausgangswert (Intercept der Regressionsgleichung) und durch $T_0 + 5 \cdot \beta$ (Steigung der Regressionsgeraden) der geschätzte Endwert bestimmt.

Die Plausibilitätsprüfung der so ermittelten T_0 und T_5 –Werte zeigte keine nennenswerten Auffälligkeiten.

3.5.3.2 Verfahren

Mit diesen durch lineare Regression geschätzten T_0 und T_5 –Werten wurden für alle Messreihen

- die absolute Differenz $\Delta TEWL = T_5 - T_0$
- die relative Differenz $\Delta TEWL = \frac{T_5 - T_0}{T_0}$

berechnet. Analog dazu wurden gleichfalls die Differenzen für die Schätzer der Messungen von Corneometrie und Chromametrie (a^* -Wert) bestimmt. Für diese Differenzen wurden dann die Verteilungen und Mittelwerte berechnet und varianzanalytisch mit Proc GLM (37) auf signifikanten Unterschied zwischen den Zentren getestet.

3.5.3.3 Kollektiv (Abb. 3 und Abb. 4)

Zur Überprüfung der Übertragbarkeit des Test-Verfahrens in die drei Zentren wurde zunächst die demographischen Daten der Zentren verglichen.

Der Anteil weiblicher Studienteilnehmer überwog in allen drei Studienzentren, Dennoch war der Anteil der teilnehmenden Männer deutlich unterschiedlich, von nur 9,5% in OS und 23,5% Männer in HD bis zu 38,1% männliche Teilnehmer in Jena (Tabelle 6, ab hier alle Tabellen in Anhang 2). Die Altersverteilung (Abb. 3) zwischen den Zentren war ebenfalls unterschiedlich. Das Durchschnittsalter war in HD mit 35 ± 5 Jahre höher als in Jena und dortige Teilnehmer nochmals drei Jahre älter als die Teilnehmer in Osnabrück, Dabei war der Unterschied zwischen HD und OS auf dem Niveau von 0,05% signifikant (Tabelle 7).

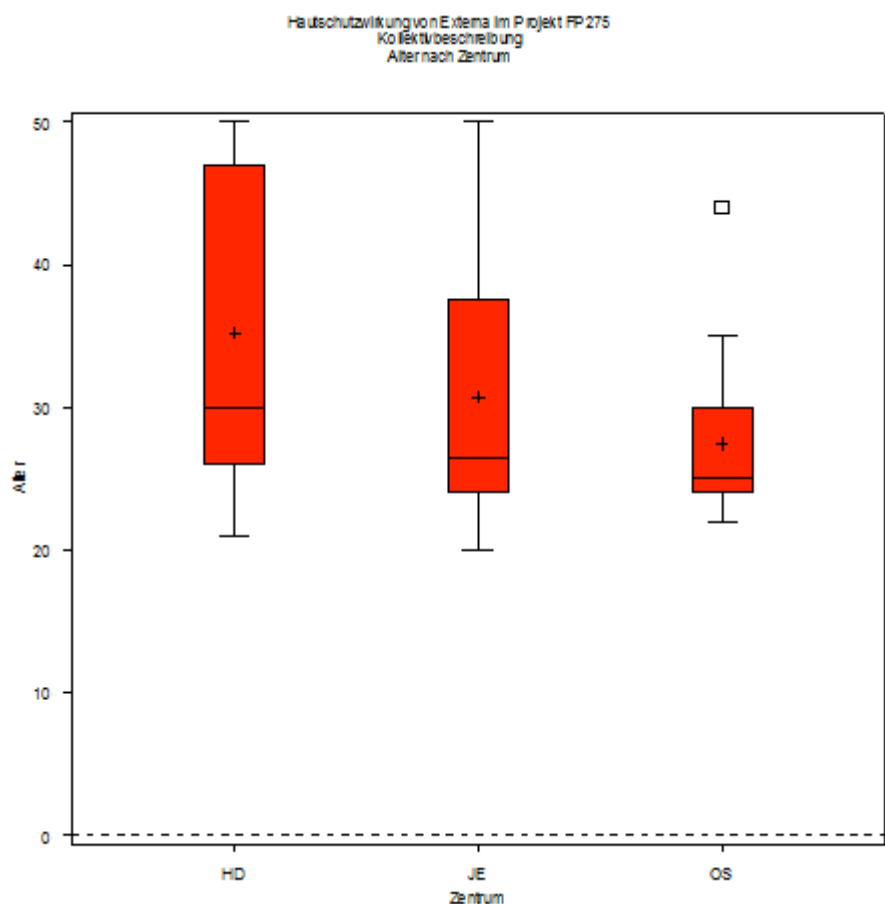


Abbildung 3: Altersverteilung als Boxplots: Median, Quartile und Extremwerte. Arithmetische Mittelwerte: +.

Den Vorgaben im Studienprotokoll entsprechend sollten maximal zwei der Teilnehmer in jedem Zentrum einen Atopie-Score ≥ 8 haben. Das war in HD und Jena der Fall. Da in Osnabrück keiner der Probanden einen Atopie-Score von $\geq 8,0$

hatte war zwangsläufig der Mittelwert in OS niedriger als in HD und JE, Dieser Unterschied zwischen JE / HD und OS erwies sich als signifikant mit 0,05) (Abb. 4), (Tabelle 8).

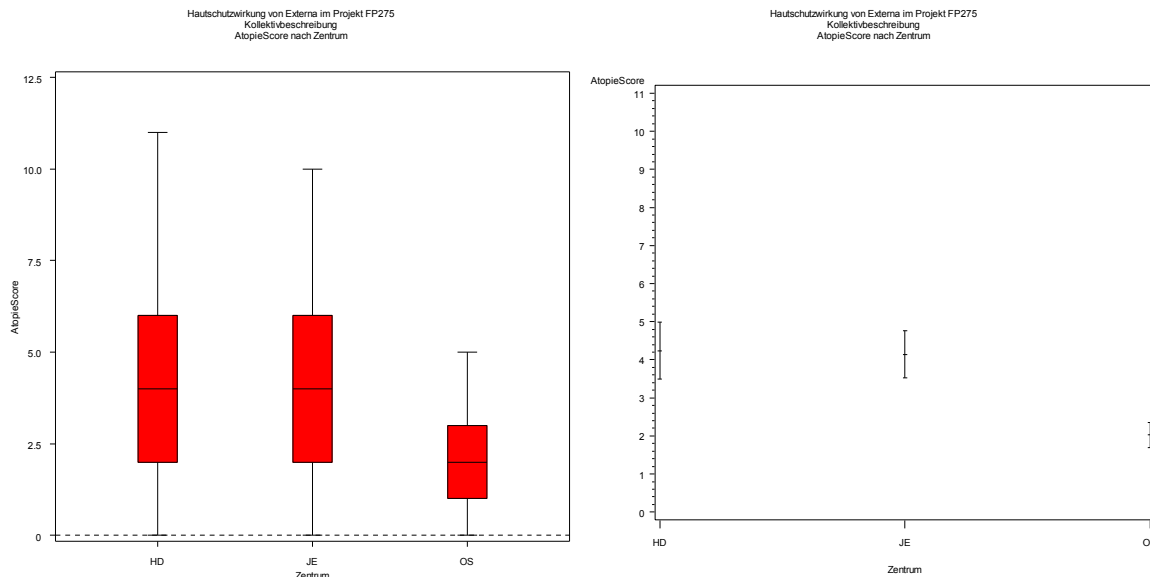


Abbildung 4: Atopie-Score Verteilung (links Boxplots: Median, Quartile und Extremwerte, rechts: arithmetische Mittelwerte und 95% Konfidenzintervalle).

Wegen der individuellen Reaktionen kam es in den Zentren zu Abbrüchen vor dem letzten Messtag. Wegen der Vorgabe, mindestens 5 Messungen durchzuführen, wurden Probanden nachrekrutiert, wenn es vorzeitige Abbrüche bei einem Irritans gab. Bei **2-Amino-2 methyl-1-propanol 3%** gab es insgesamt 3 vorzeitige Abbrüche (einer am dritten / zwei am vierten Tag), bei SLS 1 (0 / 1) bei NaOH 0,5% 10 (2/8) und bei Essigsäure 20% waren es 4 Abbrüche (1/3). Deshalb wurden in HD ein Proband und in Jena und Osnabrück jeweils 5 Probanden nachrekrutiert. Nur einer der vorzeitigen Abbrüche war in dem Testfeld mit Externum, alle anderen Abbrüche waren immer in den Testfeldern ohne Hautschutz (Tabelle 9).

Bei 17 bis 21 Probanden waren die neun unterschiedlichen Testsubstanz-Kombinationen auf die Messfelder rotiert zu verteilen. Entsprechend der Probandenzahl wurde jede Testkombination in jedem Zentrum 2 ± 1 mal an der gleichen Lokalisation getestet (Tabelle 10).

3.5.3.4 Messumfeld (Abb. 5)

Für valide hautphysiologische Messungen des TEWL war eine relative Luftfeuchte ($45\% \pm 5\%$) und Raumtemperatur ($21^\circ \pm 1^\circ$) erforderlich. Die Anzahl der Messungen in

den Zentren variierte von 102 bis 126. Bei den Raumtemperaturen waren in HD und JE nur vereinzelt Messungen außerhalb des vorgegebenen Bereichs. In OS konnte Raumtemperatur bei 16% der Messungen nicht im vorgegebenen Bereich gehalten werden. Dementsprechend unterschieden sich HD und JE diesbezüglich nicht. Mittelwert \pm std. Abweichung in den Zentren zeigten jedoch keinen wesentlichen Unterschied auch zu OS (Tabelle 11). Bei der relativen Luftfeuchtigkeit waren in HD keine, in JE 5 und in OS 9 Messungen außerhalb des vorgegebenen Bereichs. Dementsprechend unterschieden sich HD und JE diesbezüglich nicht. Mittelwert \pm std. Abweichung in den Zentren zeigten auch keinen wesentlichen Unterschied zu OS (Tabelle 12).

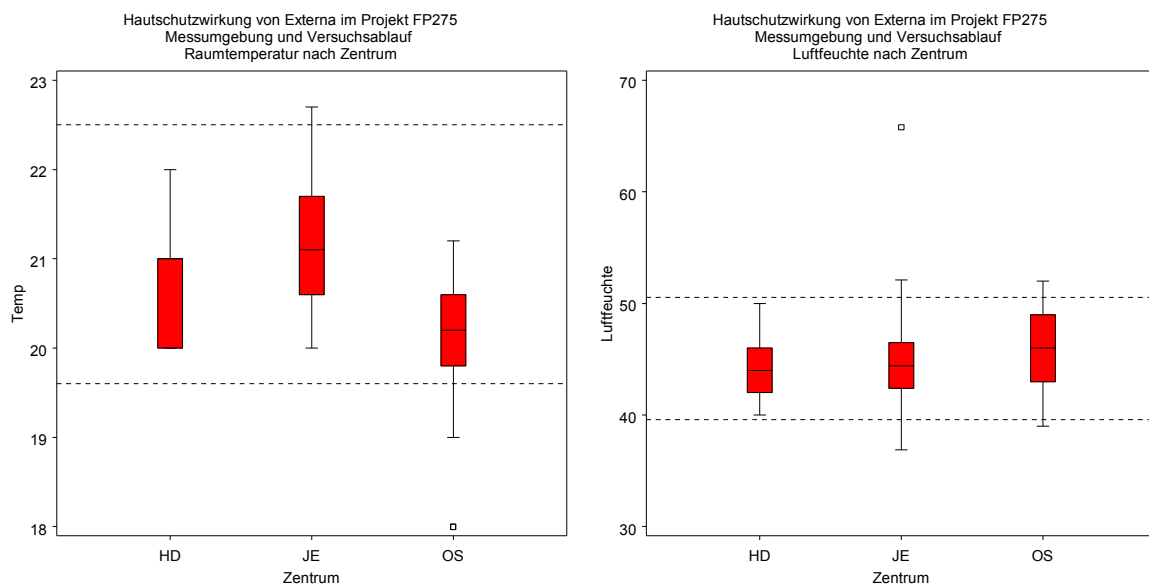


Abbildung 5: Raumtemperatur und rel. Luftfeuchte (Boxplots: Mediane, Quartile und Extremwerte. Gstrichelte Linie: Vorgaben seitens des Studienprotokolls)

3.5.3.5 Menge des applizierten Externums

Die Menge des aufzutragenden Hautschutzes war mit 11,4mg vorgegeben, um abzüglich des zu erwartenden Verlustes eine Dosis (Masse pro Hautoberfläche) von $3\text{mg}/\text{cm}^2$ zu erzielen. Zur Qualitätssicherung der verbleibenden Menge des Externums auf dem Fingerling und zur Ermittlung etwaiger Zentrumsunterschiede, war mindestens für einen Probanden pro Woche ein Wiegevorgang vor und nach Applikation des Externums durchzuführen, um die Nettomenge Externum zu bestimmen. Die unterschiedliche Anzahl Wiegevorgänge in den Zentren begründet sich in unterschiedlicher Laufzeit (Anzahl der Untersuchungswochen). In HD wurden

darüber hinaus mehrere Fingerlinge gewogen (Tabelle 13). Die Menge des am dem Fingerling verbliebenen Externums war in den Zentren gering unterschiedlich und betrug im zwischen 0,8mg (HD), 1,4mg (OS) bzw. 2,4 mg (J) für T1. Für T2 betrug die Menge des am dem Fingerling verbliebenen Externums zwischen 1,1mg (HD), 2,2mg (OS) bzw. 2,7mg (J). Die mittlere applizierte Menge betrug somit für T1 10,1mg und für T2 9,6mg über alle Zentren und lag damit geringfügig niedriger als in den Vorversuchen (Abb. 6a und Tabelle 14). Es wurde somit entsprechend den Protokollvorgaben pro cm^2 Hautoberfläche 3,2mg (T1) bzw. 3,1mg (T2) appliziert (Abb. 6b).

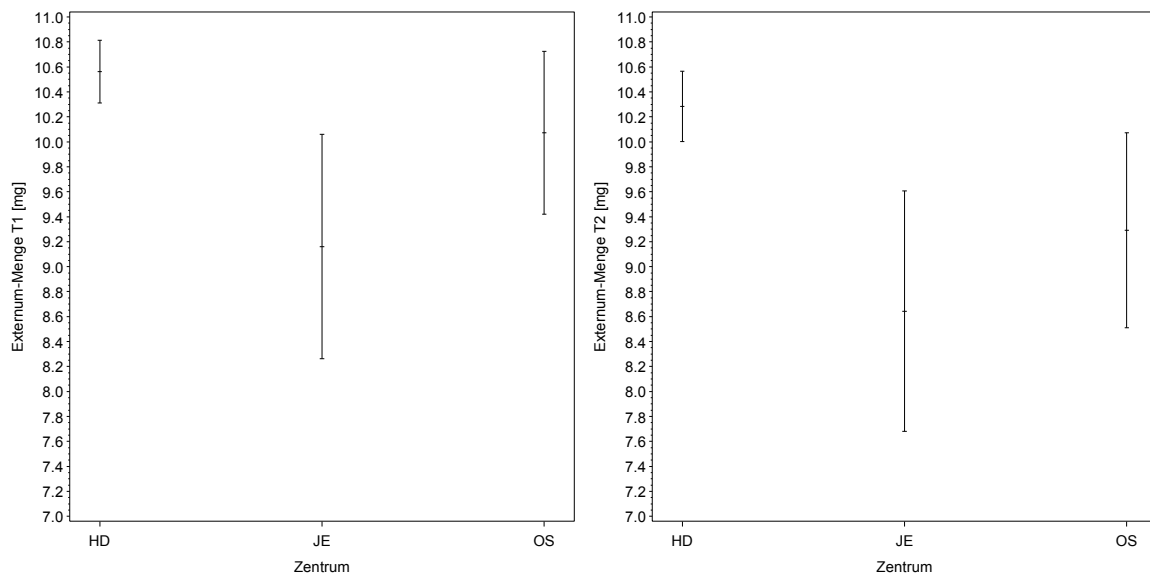


Abbildung 6a: Gesamtmenge des applizierten Externums in mg. Darstellung der Mittelwerte und 95% Konfidenzintervalle (links: T1, rechts: T2)

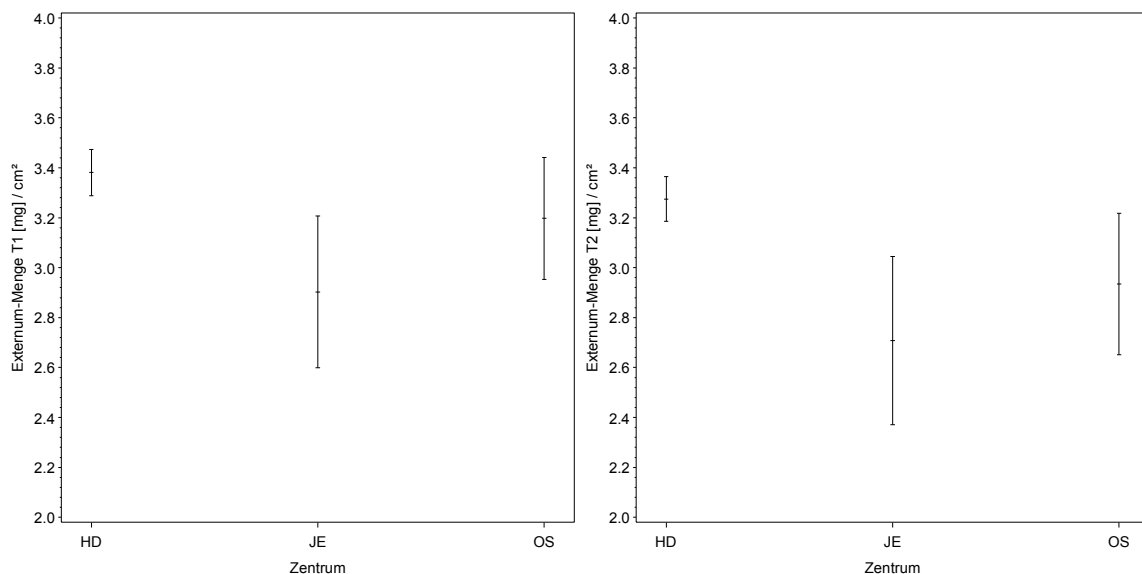


Abbildung 6b: Applizierte Dosis (mittlere Masse in mg pro cm^2 Testareal/Haut mit 95% Konfidenzintervallen, links: T1, rechts: T2)

3.5.3.6 Streuung der Doppelmessungen (TEWL) bzw. Dreifachmessungen (Chromametrie/Corneometrie), Abb. 7, 8 und Abb. 9)

Um Festzustellen ob externe Einflüsse Einzelmessungen verfälscht haben, wurde untersucht, wie weit die Doppel- bzw. Dreifach-Messungen voneinander streuen. Als relatives Streuungsmaß gab der Variationskoeffizient Auskunft. Die TEWL-Messungs-Paare streuten im Mittel um 6% in HD und JE, in OS um 9%. Allerdings gab es auch einzelne auffällige Paare, die bis zu 100% um ihren gemeinsamen Mittelwert streuten. Die Triplets der Corneometriemessungen streuten je nach Zentrum im Mittel 3 – 5,6% die der Chromametrimessungen um ca. 4%. Die Schwankungen der Mess-Triplet waren deutlich geringer (Tabelle 15).

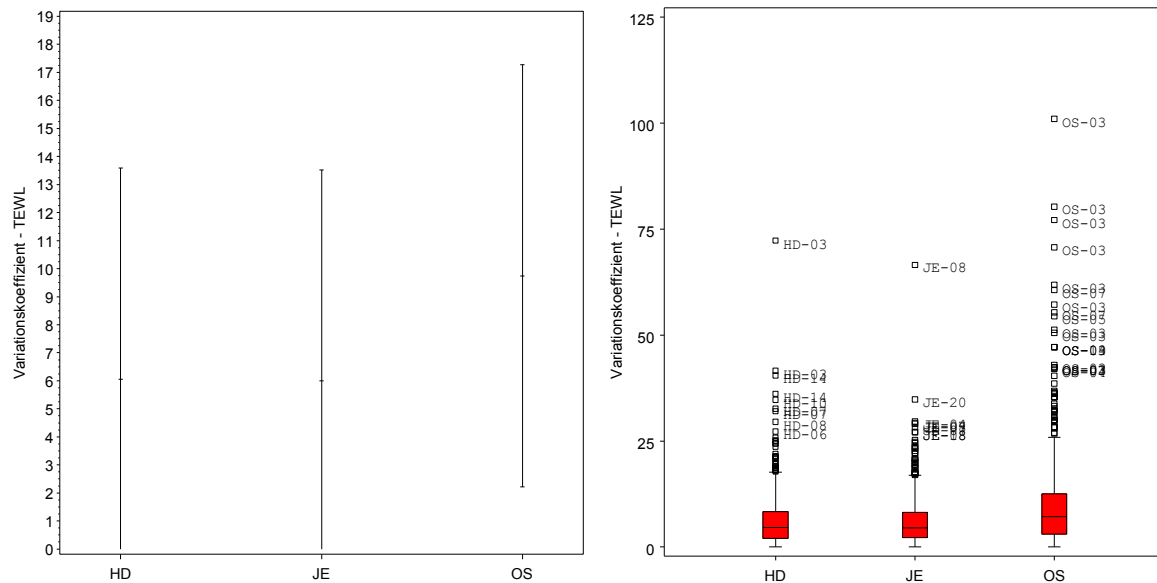


Abbildung 7: Variationskoeffizienten der TEWL Doppel-Messung

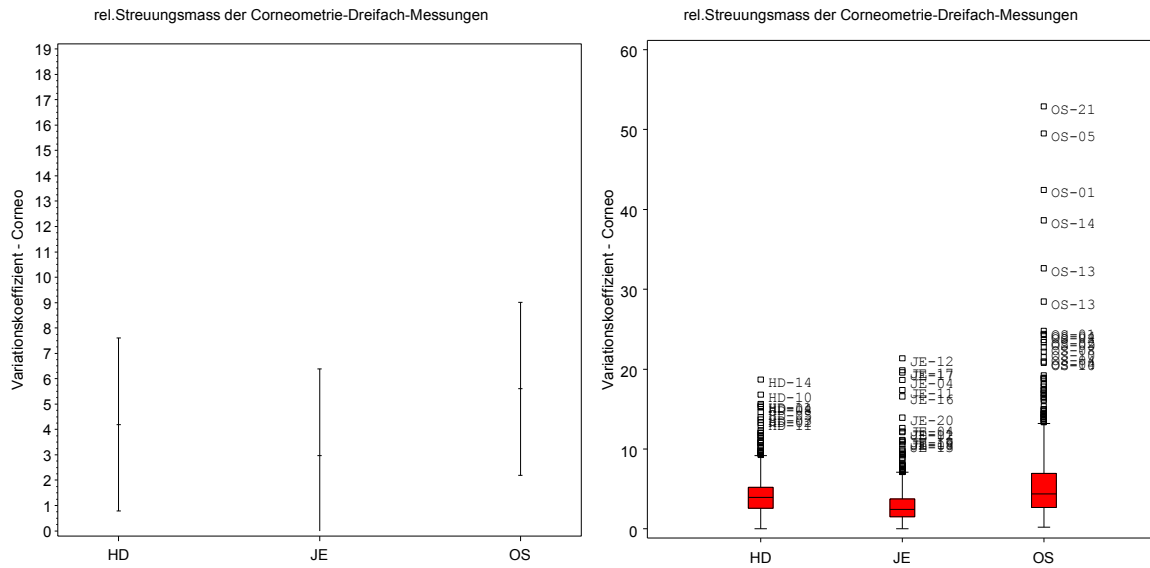


Abbildung 8: Variationskoeffizienten der Corneometrie Dreifach-Messung

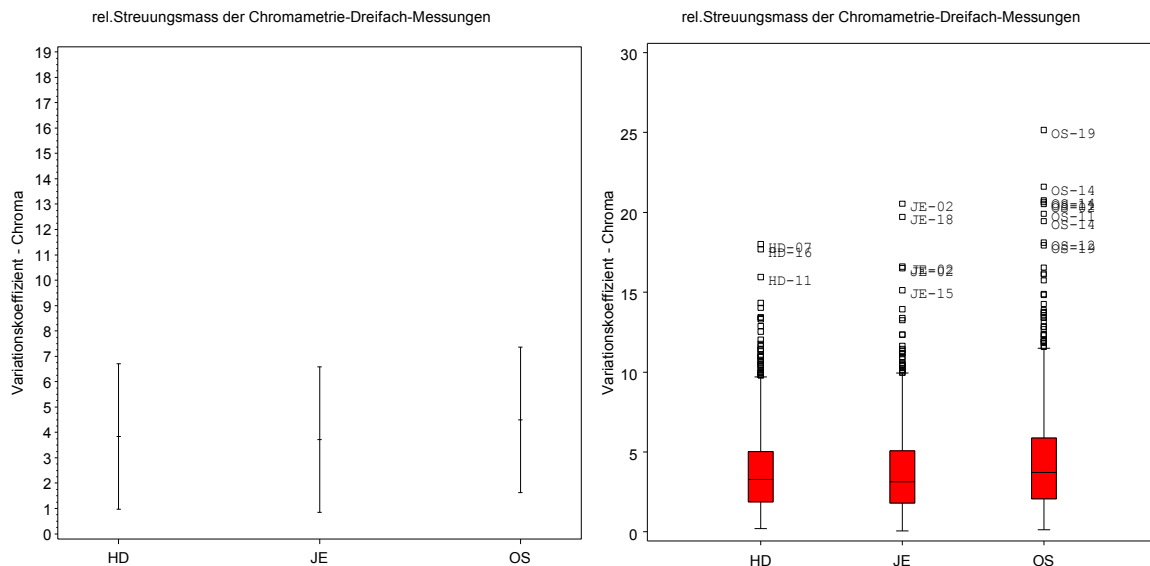


Abbildung 9: Variationskoeffizienten der Chromametrie Dreifach-Messung

Die manuelle Durchsicht der auffälligsten Messungen im Vergleich aller an diesem Probanden durchgeführten Messungen zeigten, dass Ausreißer keinen nennenswerten Einfluss auf die gesamte Messreihe haben.

3.5.3.7 Zentren-Vergleich

Um die Übertragbarkeit der Methode zu untersuchen wurden die Ergebnisse der drei Zentren miteinander verglichen (Tabelle 16 bis Tabelle 18). Für den Vergleich wurden nicht die gemessenen Rohwerte herangezogen, sondern die nach linearer Anpassung errechneten Differenzen von T5-T0. Da TEWL und Chromametrierwerte

mit zunehmender Irritation ansteigen, wurde die Differenz Samstag minus Montag berechnet. Für die Corneometrie wurde die Differenz umgekehrt berechnet.

3.5.3.7a TEWL

Beim TEWL (Abb. 10 und Abb. 11) unterschieden die Zentren sich hinsichtlich des Anstiegs über die 5 Tage nur bei Essigsäure im ungeschützten Feld (Tabelle 23). Hier waren die Mittelwerte in JE signifikant ($p < 0,05$) höher im Vergleich zu HD und JE. Die statistischen Kennwerte finden sich in Tabelle 19 bis Tabelle 23.

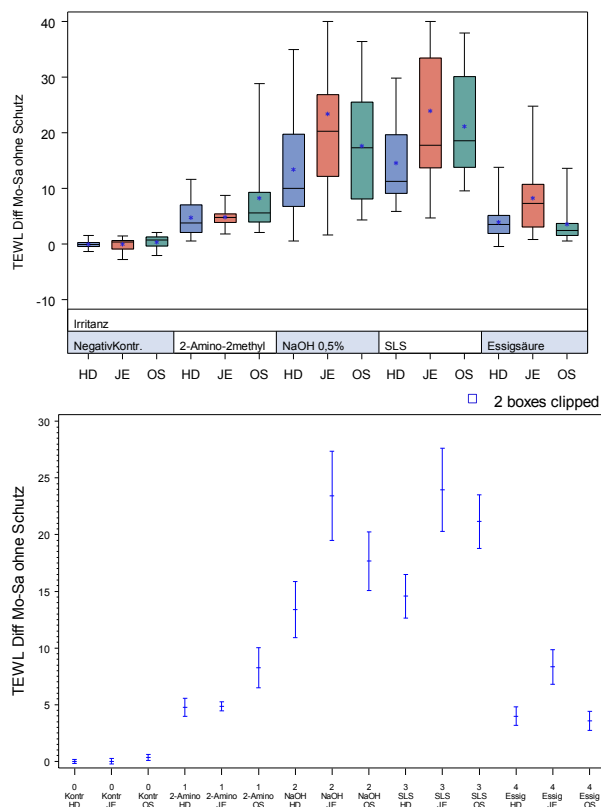


Abbildung 10 TEWL - Differenzen der Mittelwerte von den geschätzten Messwerten ohne Hautschutz (oben als Boxplots mit Medianen, Quartilen und Extremwerten sowie arithmetischen Mittelwerten (+); unten als arithmetische Mittelwerte mit 95%-Konfidenzintervallen).

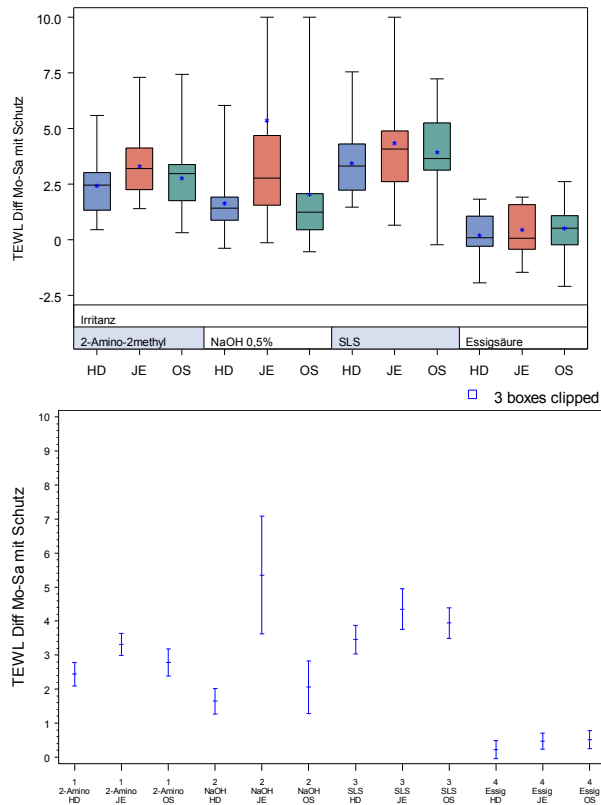


Abbildung 11 TEWL - Differenzen der Mittelwerte von den geschätzten Messwerten mit Hautschutz oben als Boxplots mit Medianen, Quartilen und Extremwerten sowie arithmetischen Mittelwerten (+); unten als arithmetische Mittelwerte mit 95%-Konfidenzintervallen).

3.5.3.7b Chromametrie

Bei der Chromametrie (Abb. 12 und Abb. 13) unterschieden OS und JE sich hinsichtlich des Anstiegs über die 5 Tage bei Essigsäure im ungeschützten Feld (Tabelle 28) ($p < 0,01$). Bei NaOH im ungeschützten Feld unterschieden sich HD/JE und JE/OS ($p < 0,05$). Im geschützten Feld war NaOH beim Vergleich HD/JE signifikant unterschiedlich ($p < 0,05$) (Tabelle 24 bis Tabelle 28).

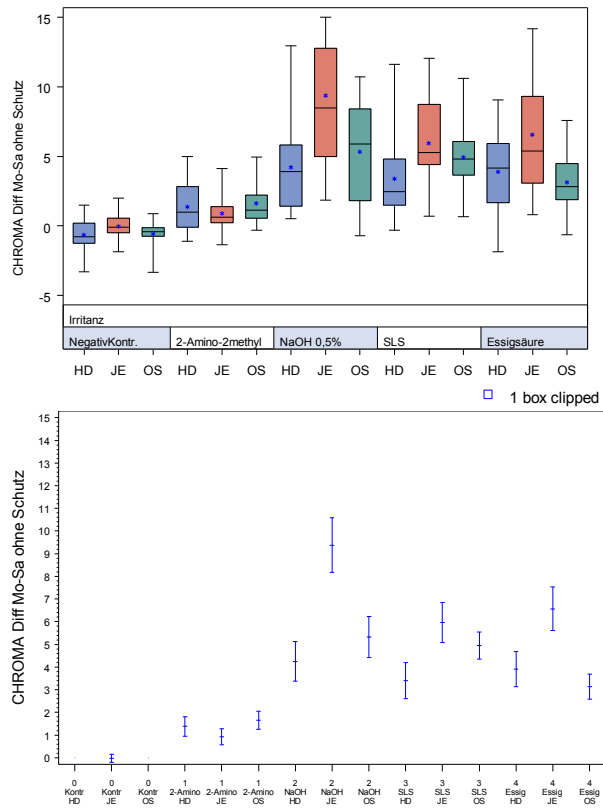


Abbildung 12 Chromametrie - absolute Differenzen der Mittelwerte von den geschätzten Messwerten ohne Hautschutz (oben als Boxplots mit Medianen, Quartilen und Extremwerten sowie arithmetischen Mittelwerten (+); unten als arithmetische Mittelwerte mit 95%-Konfidenzintervallen).

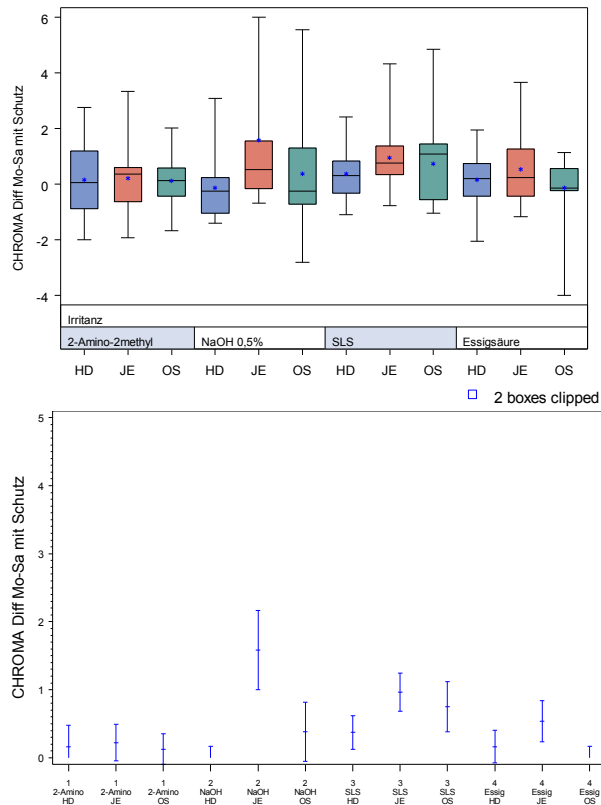


Abbildung 13 Chromametrie - absolute Differenzen der Mittelwerte von den geschätzten Messwerten mit Hautschutz oben als Boxplots mit Medianen, Quartilen und Extremwerten sowie arithmetischen Mittelwerten (+); unten als arithmetische Mittelwerte mit 95%-Konfidenzintervallen).

3.5.3.7c Corneometrie

Bei der Corneometrie (Abb. 14 und Abb. 15) war ein geringer Unterschied zwischen HD und OS im ungeschützten Feld für SLS zu berichten, $p < 0,05$. Die statistischen Kennwerte sind in Tabelle 29 bis Tabelle 33 dargestellt.

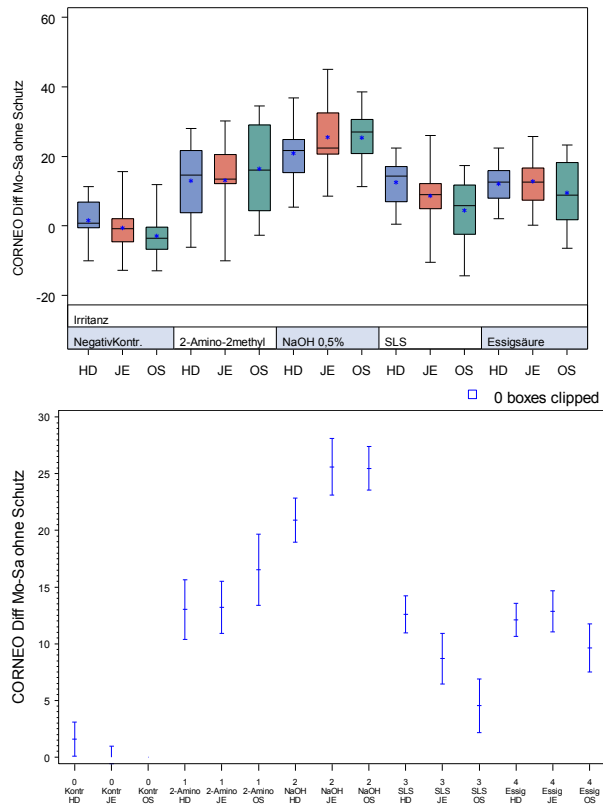


Abbildung 14 Corneometrie - absolute Differenzen der Mittelwerte von den geschätzten Messwerten ohne Hautschutz (oben als Boxplots mit Medianen, Quartilen und Extremwerten sowie arithmetischen Mittelwerten (+); unten als arithmetische Mittelwerte mit 95%-Konfidenzintervallen).

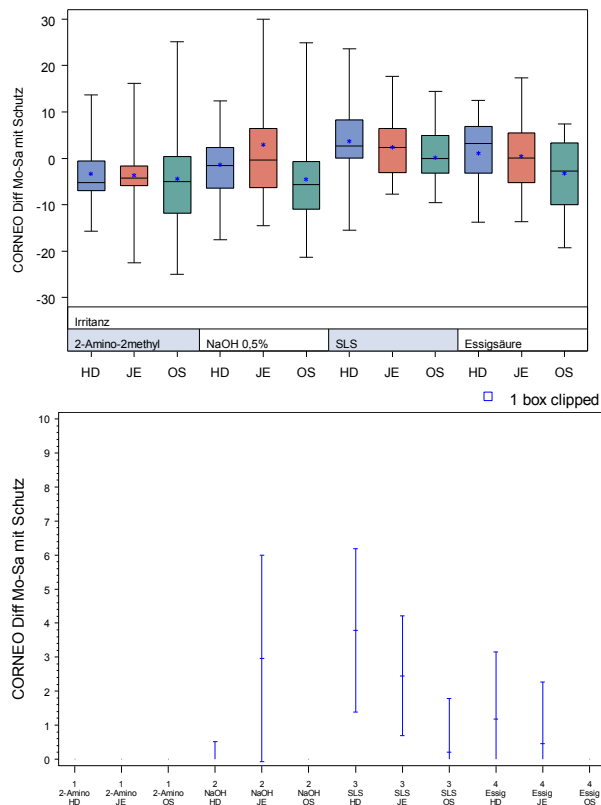


Abbildung 15 Corneometrie - absolute Differenzen der Mittelwerte von den geschätzten Messwerten mit Hautschutz oben als Boxplots mit Medianen, Quartilen und Extremwerten sowie arithmetischen Mittelwerten (+); unten als arithmetische Mittelwerte mit 95%-Konfidenzintervallen).

3.5.3.7d Zusammenfassung

Es gab vereinzelt Unterschiede zwischen den Zentren, die aber nicht systematisch sind und der Vorgehensweise in den Zentren zugeschrieben werden könnten. Die Unterschiede sind im Probandenkollektiv begründet. Die Vergleiche der gemessenen Rohwerte führten zu keinem statistisch gesicherten Unterschied zwischen den Zentren. Auch der Vergleich in Bezug auf die Ausgangswerte (relativer Anstieg) zeigte keinen Unterschied zwischen den Zentren.

Die Methode kann – entsprechende Standardisierung und Schulung des Personals vorausgesetzt – als übertragbar angesehen werden.

3.5.3.8 Vergleich Irritation an 4 Tagen vs. Irritation an 5 Tagen

Der ursprüngliche Versuchsplan sah an 4 Tagen jeweils zwei Irritationen vor. Dadurch wird eine normale Arbeitswoche in der Realität nicht wiedergegeben. Um diesem Einwand Rechnung zu tragen, wurden auf Wunsch des forschungsbegleitenden Arbeitskreises die Testfelder auch am Freitag nochmals

irritiert und am Samstag noch zusätzlich gemessen. Analysiert wurde, ob der dadurch bedingte Mehraufwand zu einem anderen Resultat führt. Dabei wurden die Steigungen der Regressionsgeraden verglichen, die sich zum einen aus den Messungen von Mo-Fr zum anderen aus den Messungen Mo-Sa ergaben.

Für den TEWL waren in den Feldern mit Hautschutz keine Unterschiede nachzuweisen (Abb. 16). In den ungeschützten Felder war im Feld mit NaOH 0,5% ein geringer Unterschied ($p < 0,05$) nachweisbar (Tabelle 34 bis Tabelle 38 und Abb. 17). Bei den sekundären Outcome-Parametern Chromametrie (Tabelle 39 bis Tabelle 43) und Corneometrie (Tabelle 44 bis Tabelle 48) waren keine Unterschiede nachweisbar.

Zum Nachweis von Effekten mit diesen Methoden ist es somit nicht erforderlich, den Versuch über eine komplette Woche durchzuführen, vielmehr führt eine Irritation von T0- T4 (8 Irritationen) mit Abschlussmessung an Tag 5 zu ebensolchen Ergebnissen.

Vergleich der TEWL Steigung nach 4 resp. 5 Tagen mit Irritation im geschützten Feld

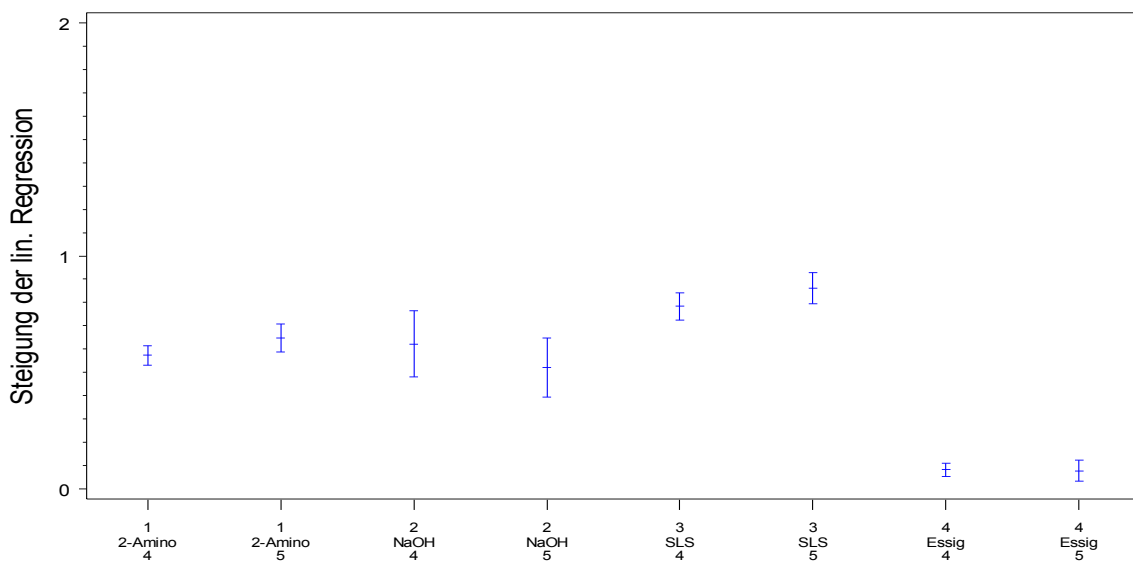


Abbildung 16 TEWL Vergleich 4 vs. 5 Irritationstage im geschützten Feld (arithmetische Mittelwerte und 95% Konfidenzintervalle).

Vergleich der TEWL Steigung nach 4 resp. 5 Tagen mit Irritation im ungeschützten Feld

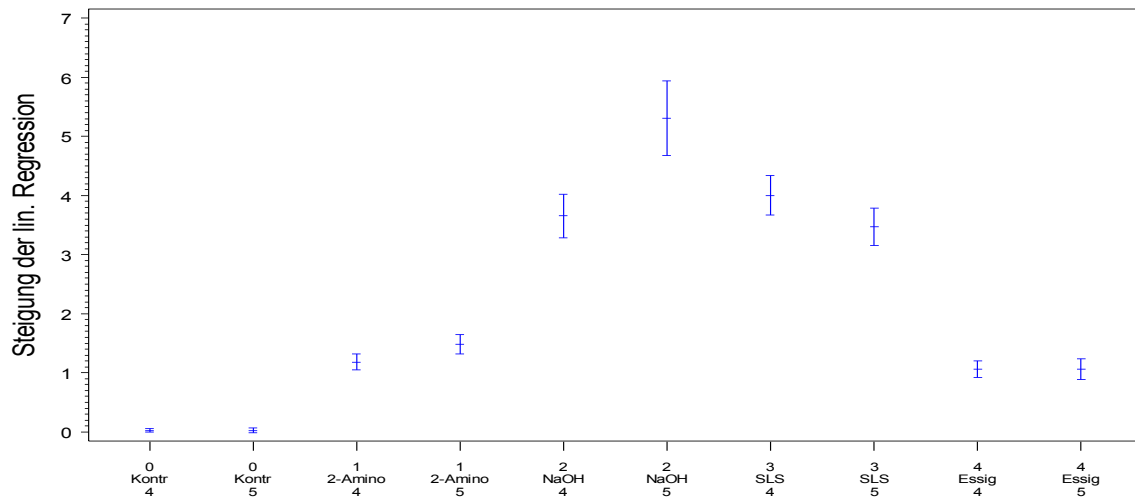


Abbildung 17 TEWL Vergleich 4 vs. 5 Irritationstage im ungeschützten Feld (arithmetische Mittelwerte und 95% Konfidenzintervalle).

3.5.3.9 Schutzfaktor- bzw. Schutzindexberechnung mit verschiedenen Methoden

Drei grundsätzlichen unterschiedlichen Modellen eines Schutzfaktors bzw.

Schutzindex wurde nachgegangen:

1. Der Ausgangswert im ungeschützten Feld sollte hierbei als Referenz dienen. Definiert wird zusätzlich aus klinischer Sicht ein Limit, z.B. Anstieg des TEWL um 5 Einheiten. Anschließend wird diese Schwellenüberschreitung im geschützten/ungeschützten Feld erfasst und verglichen. Die Methode hat sich mit diesen Daten als ungeeignet herausgestellt, weil nicht sichergestellt ist, dass ein solches Limit überhaupt erreicht wird.
2. Day 50 Methode: Ebenfalls ein Schwellen-Modell, wobei die Vorgabe nicht vom Einzelfall sondern vom Verlauf der Gesamtpopulation vorgegeben wird (sogenannter Populationsfit). Auch hier besteht die Möglichkeit, dass Ausgangswert plus Schwellenwert nicht erreicht werden.
3. Verhältnis von Anstieg im ungeschützten : geschützten Feld. Bei einem Untersuchten Irritans (Essigsäure) problematisch, weil im geschützten Feld häufig keine bzw. sogar negative „Steigungen“ gemessen wurden.

In diesem Fall geht der Nenner gegen Null, d.h. eine Division ist nicht sinnvoll.

Als Schutzindex wird das Verhältnis unterschiedliche Wirkungen verwendet, die hervorgerufen werden durch Irritation in zwei Hautarealen mit unterschiedlichen Dosen einer irritativ wirksamen Substanz. Als Dosis ist hierbei die Anzahl der Irritationen bei vorgegebener Wirkdauer und Konzentration zu verstehen, wobei ein Feld ungeschützt dem Irritans ausgesetzt war und das Vergleichsfeld durch ein Externum geschützt wurde.

Demzufolge handelt es sich hier um ein geschachteltes Design mit Versuchswiederholungen. Vernachlässigt wird der mögliche Einfluss durch benachbarte Irritantien. Es wird so verfahren, als ob nur ein Irritans zu testen war. Messreihen von Versuchsabbrüchen wurden nicht fortgeschrieben, um die vorliegenden extremen Reaktionen in ihrer tatsächlichen Wirkung mit zu berücksichtigen. Der sogenannte Schutzindex ist als Verhältnis des Verlaufs im ungeschützten und geschützten Feld zu betrachten.

3.5.3.9a Konservativ lineares Modell

Bestimmung der Steigungen im ungeschützten und geschützten Feld.

Für die Irritantien 2-Amino-2methyl-1-propranolol, NaOH und SLS war das Verhältnis der Steigungen mit den dazugehörigen Konfidenzintervallen deutlich größer Null und ein gesicherter Effekt bei den primären Outcome TEWL sicher (Abb. 18). Die Irritation durch Essigsäure im ungeschützten Feld war hingegen zu gering und in den Feldern mit Anwendung des Externums dadurch nicht beurteilbar. Die Ergebnisse in Tabelle 50 sind unterschiedlich zu den Ergebnissen im biometrischen Bericht von Biomed Consulting, weil hierbei Abbrecher nicht berücksichtigt wurden. Bei der Chromametrie (Abb. 19) waren leichte Effekte nur sichtbar für 2-Amino-2methyl-1-propranolol und NaOH (Tabelle 51); bei der Corneometrie (Abb. 20) nur für das Irritans NaOH (Werte mit Konfidenzintervall kleiner Null, weil der Wert mit Irritation abnimmt Tabelle 52).

TEWL

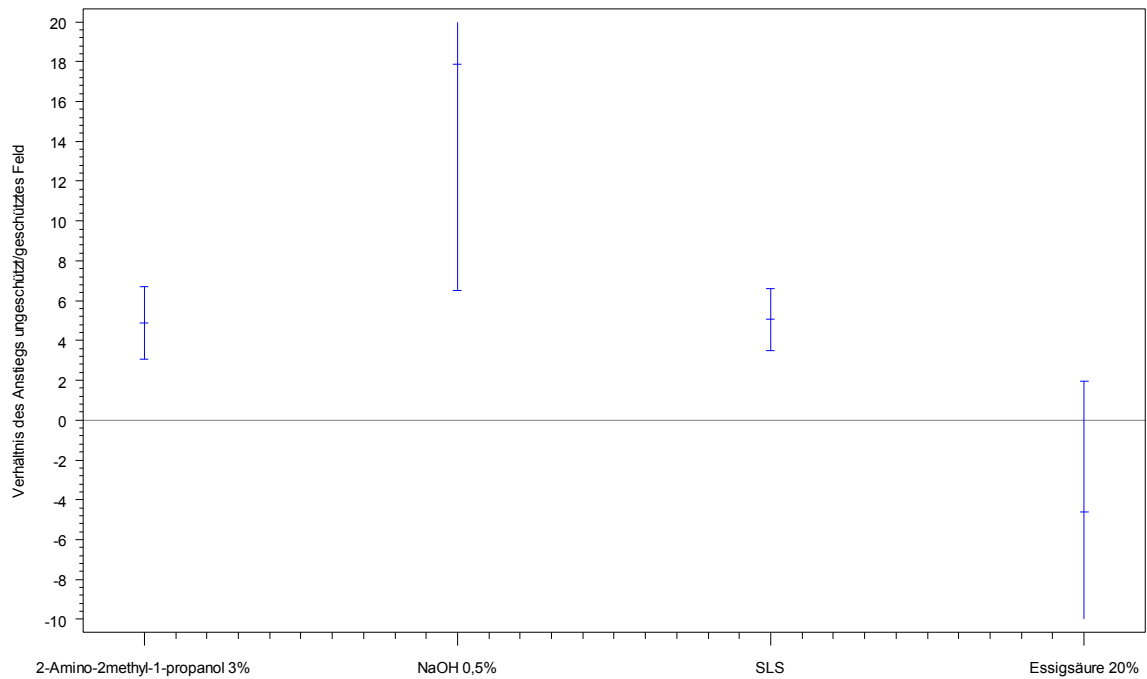


Abbildung 18 TEWL Nutzen ungeschütztes / geschütztes Feld (arithmetische Mittelwerte und 95% Konfidenzintervalle).

Chromametrie

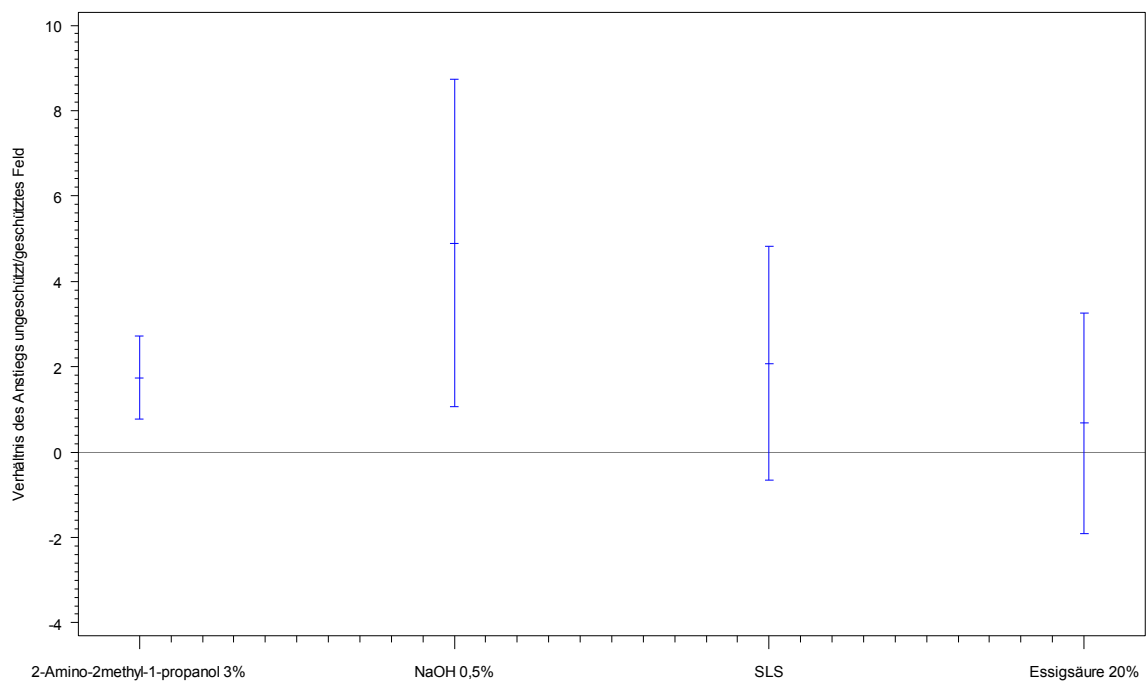


Abbildung 19 Chromametrie Nutzen ungeschütztes / geschütztes Feld (arithmetische Mittelwerte und 95% Konfidenzintervalle).

Corneometrie

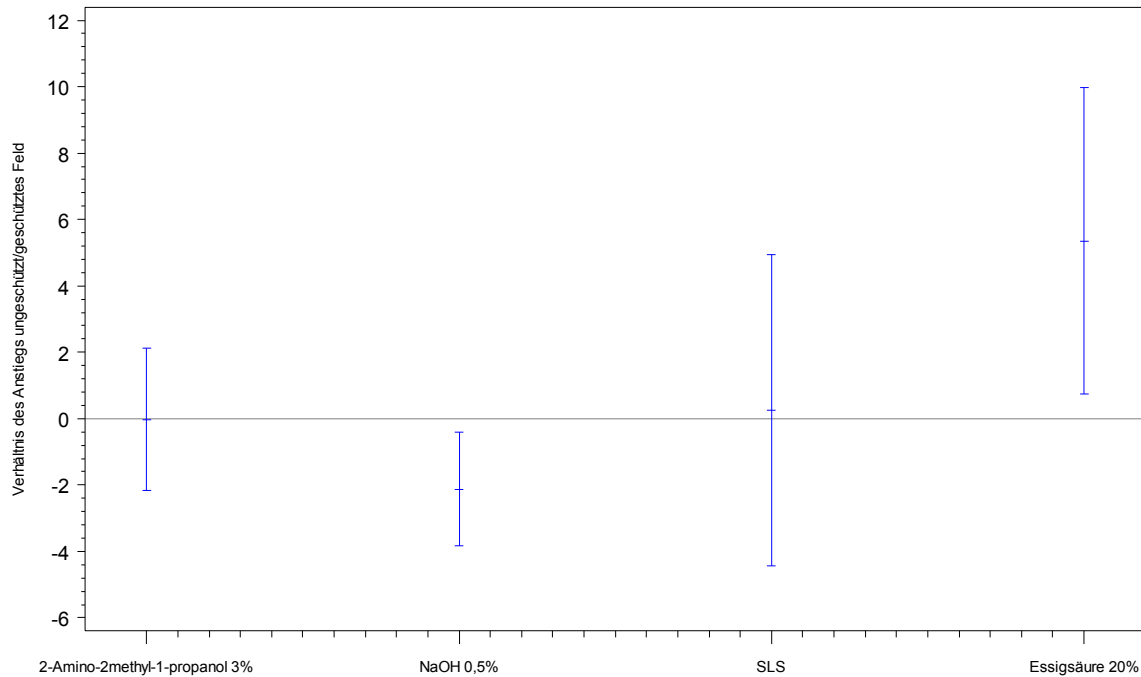


Abbildung 20 Corneometrie Nutzen ungeschütztes / geschütztes Feld (arithmetische Mittelwerte und 95% Konfidenzintervalle).

3.5.3.9b Menne Biomed Consulting

Im Bericht von Menne Biomed Consulting wurden Schutzfaktoren bzw. Schutzindizes nur für den TEWL berechnet. Dabei sind folgende Modelle berücksichtigt:

- Schutzindex unter der Annahme konservativ linearer Kennlinien (Einzelfits)
- Schutzindex mit robuster Korrektur fehlender Daten in linearen Mixed Models (Population fit). Bei dieser Methoden werden nicht allein die Steigungen der Einzelfits verwendet, sondern mit den Werten aller anderen Probanden korrigiert (regression to the mean)
- Schutzindex unter der Annahme nicht linearer Kennlinien (Nonlinear Mixed Model). Plateau-Bildungen und Extreme werden besser abgebildet. Zusätzlich zum Ausgangswert und der Steigung werden der Wendepunkt jeder Kurve und falls vorhanden ein Plateau Wert benötigt.

- Schutzindex unter Annahme einer Plateaubildung d.h. Stabilisierung eines TEWL-Niveaus (asymptotisches Modell).

Die Konfidenzintervalle wurden mit der Methode des „bootstrapping“ berechnet.

3.5.3.9b1 Vergleich der Schutzindizes in den Modellen

Um einen relativ stabilen Grenzwert des Schutzindex zu erhalten, empfiehlt sich als Referenz das untere 95% Konfidenzintervall. Die Spannweiten für das untere 95% Konfidenzintervall des Schutzindex liegen, je nach Modell (Tabelle 53 bis Tabelle 56, Abb. 21), bei:

NaOH 0,5%	4,0 bis 5,4
SLS	4,0 bis 5,6
2-Amino-2-Methyl-1-Propranolol	1,4 bis 1,9
Essigsäure	7,5 bis 8,2

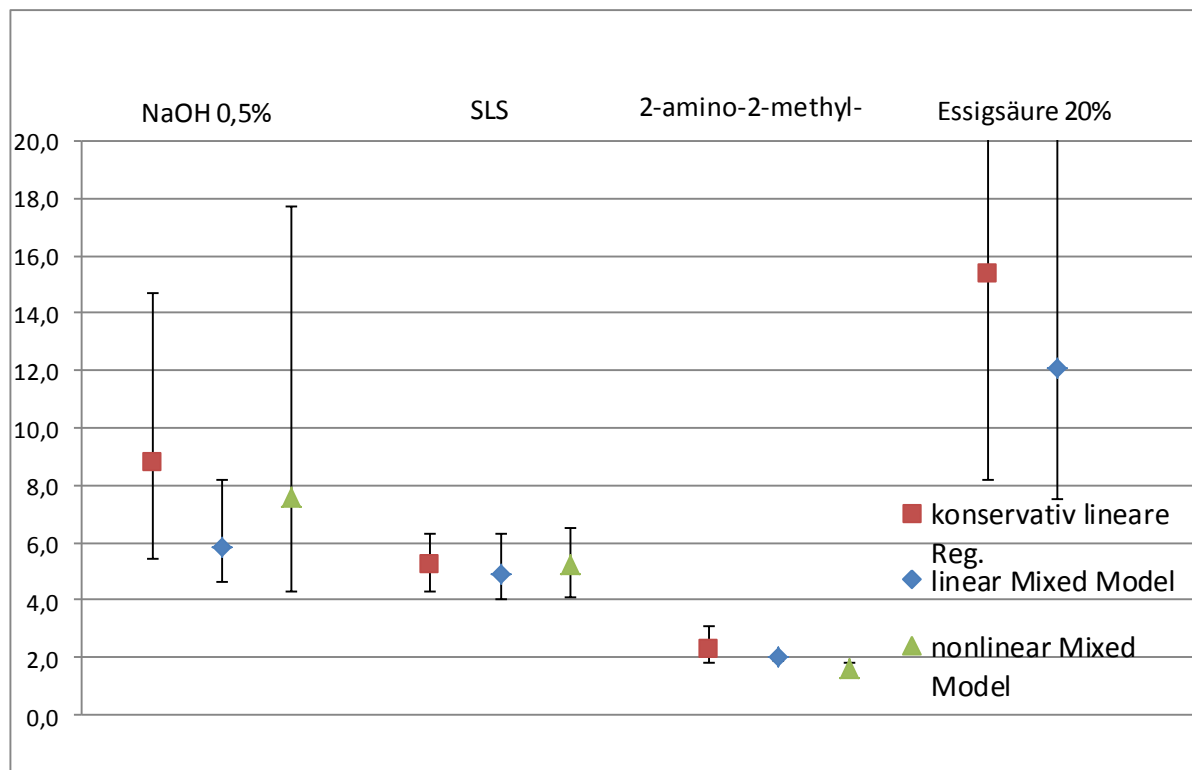


Abbildung 21 Vergleich der verschiedenen Schutzindex-Berechnungen (arithmetische Mittelwerte und 95% Konfidenzintervalle) .

3.5.3.10 Zwischenfazit zu den erhaltenen Schutzindizes nach Irritantien

2-Amino-2-methyl-1-propanol:

Es zeigte sich ein gesicherter ausreichend positiver Anstieg auch im geschützten Feld der Kombination 2-Amino-2-methyl-1-propanol 3% mit Externum T1.

SLS:

Auch die Kombination SLS und Externum T2 zeigten im linearen Mixed Model gesicherte positive Steigungen. Die Daten werden im nicht linearen Mixed Model allerdings besser beschrieben.

NaOH:

Dieses Irritans hat den stärksten Effekt auf die TEWL-Daten, deshalb kommt es zu vielen vorzeitigen Abbrüchen aus Sicherheitsgründen. Bei der statistischen Auswertung wird mit Mixed-Model Auswertung auf fehlende Daten korrigiert. Auch mit Schutzmittel T1 ist ein Anstieg erkennbar. Das nicht lineare Modell beschreibt die Daten am besten, wenngleich auch hier kein deutliches Plateau beschrieben wird.

Essigsäure:

Hier ist die Schutzwirkung von T2 so gut, dass keine Änderung durch die 5 tägige Irritation erkennbar ist. Die Berechnung eines Schutzindex aus diesen Daten ist nicht zuverlässig möglich. Insofern wäre hier unter mathematisch-statistischen Überlegungen heraus eine geringe Anhebung der Testkonzentration des Irritans zu erwägen, um den Irritationseffekt im ungeschützten Feld zu intensivieren.

4. GESAMTFAZIT UND AUSBLICK

Im Rahmen des Forschungsprojektes FP 275 wurde ein 5tägiges in-vivo Evaluationsmodell zur Wirksamkeitsprüfung von Hautschutzmitteln für verschiedene repräsentative Expositionssituationen (Irritantienkategorien) unter Festlegung zweier definierter Modellirritantien wie auch zweier definierter Referenzstandards (Rezepturen) für Schutzprodukte einschließlich eines Schutzindex entwickelt. Es wurden insgesamt 3 relevante Irritantienkategorien identifiziert. Es handelte sich hierbei um wässrige Irritantien mit alkalischem und saurem pH-Wert sowie um ein tensidisches Irritans. Eine Testung von Kühlschmiermittelrahmenrezepturen ist aus ethischen Gründen an hautgesunden Probanden nicht möglich, sofern Inhaltsstoffe mit potentiell kanzerogenem Potential enthalten sind. Stellvertretend für die Irritantienkategorien wurden teils bewährte, teils neue, bisher in humanen in vivo-Testmodellen noch nicht untersuchte Chemikalien evaluiert und unter diesen die am besten geeigneten ausgewählt. Das entwickelte repetitive Wirksamkeits-Testmodell wurde abschließend in einer Multicenterstudie untersucht, wobei die Transferfähigkeit des Modells und die Reproduzierbarkeit der Ergebnisse (keine wesentlichen Unterschiede zwischen den Zentren) gezeigt wurde.

Die Ergebnisse im Laufe der Methodenentwicklung haben die Vermutung bestätigt, dass bestimmte Hautschutzprodukte in Bezug auf wässrige Irritantien nicht universell wirksam oder unwirksam sind. Vielmehr ließen sich teilweise Wirksamkeiten und Unwirksamkeiten gegenüber den untersuchten Irritantienkategorien finden, die durch offenbar unterschiedliche Schädigungsmechanismen bei der Einwirkung auf die Haut zustande kommen. Diese Schädigungsmechanismen sind bis auf das Irritans SLS noch unvollständig verstanden und die Untersuchung war nicht Gegenstand des Projektes. Aufgrund der beobachteten klinischen Effekte der sauren und alkalischen Irritantien kann jedoch vermutet werden, dass u.a. den Penetrationsmechanismen am Vellushaarfollikel eine unterschiedliche Bedeutung zukommt. Um die verschiedenen Schädigungsmechanismen besser zu verstehen, sind unabhängig vom Projekt FP 275 weitere Untersuchungen nach repetitiver Einwirkung notwendig, wofür histologische, immunhistologische und ggf. auch elektronenmikroskopische Untersuchungen aus Biopaten humaner Haut sinnvoll erscheinen. Aus den Ergebnissen des Projektes kann geschlussfolgert werden, dass die Wirksamkeit eines gegebenen Hautschutzpräparates

gegenüber sauren, alkalischen und tensidischen wässrigen Irritantien nicht ohne in vivo Prüfung anhand der Inhaltsstoffe vorhersagbar ist. Die von berufsdermatologischer Seite bereits vor Projektbeginn empfohlene Durchführung repetitiver in vivo-Irritationstestungen für Hautschutzpräparate findet sich insofern bestätigt (http://www.awmf.org/uploads/tx_szleitlinien/013-056I_S1_Berufliche_Hautmittel_2008.pdf, aktuell in Überarbeitung).

Die Besonderheit des entwickelten Wirksamkeitsmodell besteht aus Sicht der Forschungsnehmer darin, dass hier erstmals definierte Parameter zum Nachweis der Schutzwirkung und zum Vergleich von Hautschutzprodukten für verschiedene Expositionsszenarien entwickelt wurden. Hierfür war es wichtig, Referenz-Hautschutzmittel in das Modell einzuführen. Die beiden entwickelten Referenz-Hautschutzmittel (T1 gegen alkalische und T2 gegen saure und tensidische Irritantien) wurden in der Zusammensetzung typischen kommerziellen Produkten nachempfunden und weisen im entwickelten Wirksamkeitstest-Modell eine reproduzierbare Schutzwirkung auf. Die Zusammensetzung und die Herstellung sind herstellerunabhängig nachhaltig reproduzierbar und sollten nicht verändert werden, um die Wirksamkeit nicht unkontrolliert zu verändern. Es lag dabei nicht in der Absicht der Forschungsnehmer, bestimmte Inhaltsstoffe zu bewerten oder zu postulieren, sondern es sollten vielmehr Standards mit bekannten Wirkindizes für Industrie und interessierten Testinstitutionen angeboten werden. Das Mit-Testen dieser Hautschutzreferenzmuster stellt für Testinstitutionen eine Maßnahme der Qualitätssicherung der Testung dar. Es ermöglicht anschließend einen Produktvergleich, der neuartig ist. Es können simultan mehrere Produkte untersucht werden und die erzielten Wirksamkeiten mit denjenigen der Hautschutzreferenzmuster verglichen werden. Die im Modell applizierten Dosis (Masse pro Fläche) der HSP wurde mit $3\text{mg}/\text{cm}^2$ bewusst deutlich niedriger gewählt als in der Mehrzahl der bisher publizierten experimentellen Studien zur Wirksamkeit von HSP (13, 42, 44, 45), da sich gezeigt hat, dass ungeschulte Anwender an Arbeitsplätzen tatsächlich nur eine sehr geringe Menge an HSP pro Anwendung auftragen, nämlich etwa nur $1\text{mg}/\text{cm}^2$ (27, 28). Mit $3\text{mg}/\text{cm}^2$ wird also im Wirksamkeitsmodell tatsächlich noch immer eine deutlich höhere Quantität pro Hautoberfläche aufgetragen. Eine Verringerung im Modell ist nicht praktikabel, da der exakten Applikation und Dosierung von Hautschutzexterna auf relativ kleinen Testfeldern technisch Grenzen gesetzt sind. Die Forschungsnehmer empfehlen daher

abschließend eine Dosierung von 2-3mg/cm² Hautoberfläche für repetitive in vivo-Wirksamkeitstestungen von HSP.

Als Parameter zu Quantifizierung der Schutzwirkung wurde im Projektplan die Entwicklung eines sogenannten „Hautschutzfaktors“ angestrebt. Der Begriff „Schutzfaktor“ wird häufig mit dem „Lichtschutzfaktor“ assoziiert, der denjenigen Faktor an Zeit beziffert, um den ein Lichtschutzmittel die Eigenschutzzeit bei Aufenthalt in der Sonne verlängert, ohne dass eine definierte Schädigung (minimale Erythemdosis, MED) auftritt. Im Laufe der Projektbearbeitung zeigte sich allerdings, dass der entwickelte „Hautschutzfaktor“ keinen analogen Zeitfaktor, sondern vielmehr einen Schutzindex unter definierten experimentellen Bedingungen darstellt. Dessen Berechnung ist nicht an ein Schwellenkriterium wie die MED geknüpft. Der Begriff „Schutzfaktor“ könnte insofern irreführend wirken. Die Forschungsnehmer schlagen daher abschließend in Abstimmung mit den Mitgliedern des forschungsbegleitenden Arbeitskreises den Begriff *„Schutzindex für Hautschutzpräparate“* vor.

Der Schutzindex ist definiert als Verhältnis zweier Dosen eines Irritans, das mit und ohne Schutz eine Wirkung erzielt. Die Dosis wurde im Modell definiert über die Anzahl der Tage (Irritationen), an denen ein Irritans bei vorgegebener Dauer und Konzentration einwirkt. Die Irritationswirkung wurde durch den Primärparameter TEWL gemessen, da dieser bereits eine subklinische epidermale Barrierestörungen am sensitivsten erfasst. Im Gegensatz zu lipophilen Irritantien ist die epidermale Barrierschädigung diejenige funktionell bedeutsamste Schädigung, die typischerweise durch wässrige Irritantien induziert wird (12, 46). Im Rahmen der Methodenentwicklung wurden in der Multicenterstudie verschiedene statistische Modelle geprüft, die jeweils einen ähnlichen, wenn auch leicht unterschiedlichen Wert für den Schutzindex erbrachten. Verglichen wurden lineare und nicht-lineare Modelle zur Berechnung des Verlaufes der Irritation über die Zeit. Ferner wurden sogenannte „Einzelfits“ einem Mixed Model mit Populationsfitting gegenüber gestellt. Hieraus ergaben sich für jedes Irritans und das zugehörige Hautschutzmittelreferenz-Muster 4 gering unterschiedliche Ergebnisse für den Schutzindex. Beim linearen Modell mit Populationsfit (Mixed model) waren die Konfidenzintervalle kleiner als bei Verwendung sogenannter Einzelfits. Die Güte der Anpassung an das lineare bzw. nicht-lineare Modell wurde mittels sogenannter Residualplots verglichen. Für 3 der 4 Irritantien war eine lineare Anpassung befriedigend. Abschließend empfehlen die Forschungsnehmer die Verwendung eines

linearen Modells mit Populationsfitting (Mixed Model). Es wird empfohlen, die Konfidenzintervalle mit einem unabhängigen Algorithmus über eine Bootstrap-Methode zu berechnen, um die Ergebnisse ausreichend abzusichern. Es wird vorgeschlagen, jeweils das unterer Konfidenzintervall unter der Angabe „Schutzindex des Produktes liegt mindestens bei“ zu verwenden.

In Bezug auf den Schutzindex waren die Resultate für das saure Irritans Essigsäure unergiebig, da die Substanz in der Multicenterstudie in 20%iger Konzentration, im Gegensatz zu den Vorversuchen, eine zu geringe Irritationswirkung aufwies, die von dem Schutzpräparat völlig nivelliert wurde. Ein Schutzindex konnte daher nicht zuverlässig berechnet werden. Um diesem methodischen Problem zu begegnen, sind verschiedene Maßnahmen denkbar, am ehesten wäre eine Anhebung der Konzentration zu prüfen (22 bzw. 24%), die jedoch nicht mehr im Rahmen des Projektes erfolgen konnte.

Die Ergebnisse des Forschungsvorhabens sind für die gesetzliche Unfallversicherung von Relevanz für den beruflichen Hautschutz, da sie erstmals Rahmenbedingungen für humane, repetitive in vivo-Prüfstandards von Hautschutzprodukten bieten, die bisher nicht existierten und die durch die gesetzliche Unfallversicherung weiter ausgestaltet werden können.

Voraussetzung für eine Anwendung des entwickelten Testmodells ist die Verwendung der Hautschutzmittelreferenzmuster T1 und T2. Die detaillierten Herstellungsvorgaben liegen der DGUV vor. Interessierte Testinstitutionen müssen über Erfahrungen und Voraussetzungen auf dem Gebiet der hautphysiologischen Messungen verfügen und sollten, je nach Expositionsszenarium und geplanter Auslobung der zu untersuchenden Schutzpräparate, die/das Hautschutzmittelreferenzmuster T1 bzw. T2 anfordern und mit testen. Die Ergebnisse solcher Testungen können Herstellern in der Produktentwicklungsphase als Entscheidungsgrundlage für die weitere Produktentwicklung im existierenden Markt dienlich sein. Ferner können die Ergebnisse im Vergleich zu den entwickelten Referenz- Hautschutzmittelreferenzmuster künftig, nach entsprechenden Vorgaben der DGUV, Eingang in eine spezifische Produktkennzeichnung finden, die von den Firmen auch als Marketingtool verwendet werden kann.

Um die Ergebnisse des Projektes und deren praktische Umsetzung in Zusammenarbeit mit der Industrie gezielt zu lenken, sind weitere Beratungen und Maßnahmen mit der DGUV und dem Sachgebiet Hautschutz geplant. Von Seiten der Forschungsnehmer sind Publikationen der Ergebnisse in Fachzeitschriften mit peer-review geplant.

Anhänge:

Anhang 1 Tabellen

Literatur

1. Dickel H, John SM. Ratio of irritant contact dermatitis to allergic contact dermatitis in occupational skin disease. *J Am Acad Dermatol.* 2003;49(2):360-1; author reply 1-2.
2. Berndt U, B G, S S-W, W W-A, D Z, P E. Integrated skin protection from workplace irritants: a new model for efficacy assessment. *Exogenous Dermatology.* 2002;1:45-8.
3. Kutting B, Drexler H. [The three-step programme of skin protection. A useful instrument of primary prevention or more effective in secondary prevention?]. *Dtsch Med Wochenschr.* 2008;133(5):201-5. Der dreistufige Hautschutzplan. Ein wirksames Instrument der Primarpravektion oder eher geeignet fur die Sekundarpravektion?
4. Mahler V, Erfurt-Berge C, Schiemann S, Michael S, Egloffstein A, Kuss O. Dirt-binding particles consisting of hydrogenated castor oil beads constitute a nonirritating alternative for abrasive cleaning of recalcitrant oily skin contamination in a three-step programme of occupational skin protection. *Br J Dermatol.* 2010;162(4):812-8. Epub 2009/12/10.
5. Technische Regeln für Gefahrenstoffe. Gefährdung durch Hautkontakt. TRGS 401, (Juni 2008, zuletzt berichtigt GMBI 2011 S. 175 (Nr.9)).
6. Schliemann-Willers S, Elsner P. [Occupational skin protection]. *J Dtsch Dermatol Ges.* 2005;3(2):120-33; quiz 34-6. Beruflicher Hautschutz.
7. Bauer A, Schmitt J, Bennett C, Coenraads PJ, Elsner P, English J, et al. Interventions for preventing occupational irritant hand dermatitis. *The Cochrane database of systematic reviews.* 2010(6):CD004414. Epub 2010/06/18.
8. 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.
9. Winker R, Salameh B, Stolkovich S, Nikl M, Barth A, Ponocny E, et al. Effectiveness of skin protection creams in the prevention of occupational dermatitis: results of a randomized, controlled trial. *Int Arch Occup Environ Health.* 2009;82(5):653-62. Epub 2008/10/31.
10. Ibler KS, Jemec GB, Diepgen TL, Gluud C, Lindschou Hansen J, Winkel P, et al. Skin care education and individual counselling versus treatment as usual in healthcare

workers with hand eczema: randomised clinical trial. *BMJ*. 2012;345:e7822. Epub 2012/12/14.

11. Menne T, Johansen JD, Sommerlund M, Veien NK. Hand eczema guidelines based on the Danish guidelines for the diagnosis and treatment of hand eczema.

Contact Dermatitis. 2011;65(1):3-12. Epub 2011/06/11.

12. Schliemann S, Kleesz P, Elsner P. Protective creams fail to prevent solvent-induced cumulative skin irritation - results of a randomized double-blind study. *Contact Dermatitis*. 2013.

13. 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.

14. Fartasch M, Schnetz E, Diepgen TL. Characterization of detergent-induced barrier alterations -- effect of barrier cream on irritation. *J Investig Dermatol Symp Proc*. 1998;3(2):121-7.

15. COUNCIL DIRECTIVE

of 27 July 1976 on the approximation of the laws of the Member States relating to cosmetic products (76/768/EEC) (last amendment: Commission Directive 2010/4/EU of 8 February 2010).

16. Pittermann WF, Kietzmann M. [Bovine udder skin (BUS): testing of skin compatibility and skin protection]. *Altex*. 2006;23(2):65-71. Bovine Udder Skin (BUS): Prufung von Hautvertraglichkeit und Hautschutz.

17. 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.

18. Malten KE. Thoughts on irritant contact dermatitis. *Contact Dermatitis*. 1981;7(5):238-47. Epub 1981/09/01.

19. Schnetz E, Fartasch M. Microdialysis for the evaluation of penetration through the human skin barrier - a promising tool for future research? *Eur J Pharm Sci*. 2001;12(3):165-74.

20. 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.

21. Ananthapadmanabhan KP, Moore DJ, Subramanyan K, Misra M, Meyer F. Cleansing without compromise: the impact of cleansers on the skin barrier and the

technology of mild cleansing. *Dermatologic therapy*. 2004;17 Suppl 1:16-25. Epub 2004/01/20.

22. 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.

23. 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.

24. Kappes UP, Goritz N, Wigger-Alberti W, Heinemann C, Elsner P. Tandem application of sodium lauryl sulfate and n-propanol does not lead to enhancement of cumulative skin irritation. *Acta Derm Venereol*. 2001;81(6):403-5. Epub 2002/02/28.

25. Lubbe J, Ruffieux C, van Melle G, Perrenoud D. Irritancy of the skin disinfectant n-propanol. *Contact Dermatitis*. 2001;45(4):226-31. Epub 2001/10/31.

26. Fregert S. *Manual of Contact Dermatitis*. . 2nd Ed. ed. Copenhagen: Munksgaard Publishers; 1981.

27. Schliemann S, Petri M, Elsner P. How much skin protection cream is actually applied in the workplace? Determination of dose per skin surface area in nurses. *Contact Dermatitis*. 2012;67(4):229-33. Epub 2012/06/20.

28. Schliemann S, Petri M, Elsner P. Preventing irritant contact dermatitis with protective creams: influence of the application dose. *Contact Dermatitis*. 2013. Epub 2013/07/13.

29. SAS II. *Getting started with the SAS Power and Sample size Applications*. Cary, NC: SAS Publishing; 2004.

30. Berardesca E. EEMCO guidance for the assessment of stratum corneum hydration: electrical methods. *Skin Research and Technology*. 1997;3:126-32.

31. Fullerton A, Fischer T, Lahti A, Wilhelm KP, Takiwaki H, Serup J. Guidelines for measurement of skin colour and erythema. A report from the Standardization Group of the European Society of Contact Dermatitis. *Contact Dermatitis*. 1996;35(1):1-10. Epub 1996/07/01.

32. 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.

33. Diepgen T, Fartasch M, OP H. Kriterien zur Beurteilung der atopischen Hautdiathese. *Dermatosen*. 1991;39(3):79-83.

34. Diepgen TL, Fartasch M, Hornstein OP. Evaluation and relevance of atopic basic and minor features in patients with atopic dermatitis and in the general population. *Acta Derm Venereol Suppl (Stockh)*. 1989;144:50-4. Epub 1989/01/01.
35. SAS II. SAS® 9.2 Macro Language: Reference. Cary, NC: SAS Publishing;; 2009.
36. SAS II. Base SAS® 9.2 Procedures Guide: Statistical Procedures. Cary, NC: SAS Publishing; 2010.
37. SAS II. SAS/Stat® 9.2 User's Guide. Cary, NC: SAS Publishing; 2009.
38. SAS II. SAS/Graph® 9.2: Reference. Cary, NC: SAS Publishing; 2010.
39. Hsu JC. *Multiple Comparison: Theory and Methods*. London: Chapman & Hall; 1966.
40. R. R: A language and environment for statistical computing Vienna, Austria: R Foundation for Statistical Computing; 2005.
41. Kuss O, Diepgen TL. Proper statistical analysis of transepidermal water loss (TEWL) measurements in bioengineering studies. *Contact Dermatitis*. 1998;39(2):64-7. Epub 1998/09/24.
42. 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.
43. Hoaglin D, M.F., T.J., editors. *Understanding Robust and Exploratory Data Analysis*. New York: John Wiley & sons; 1983.
44. Frosch PJ, Schulze-Dirks A, Hoffmann M, Axthelm I. Efficacy of skin barrier creams (II). Ineffectiveness of a popular "skin protector" against various irritants in the repetitive irritation test in the guinea pig. *Contact Dermatitis*. 1993;29(2):74-7.
45. Rieger T, Teichmann A, Richter H, Schanzer S, Sterry W, Lademann J. Evaluation of barrier creams - introduction and comparison of 3 in vivo methods. *Contact Dermatitis*. 2007;56(6):347-54.
46. Schliemann S, Schmidt C, Elsner P. Tandem repeated application of organic solvents and sodium lauryl sulfate enhances cumulative skin irritation. *Skin Pharmacol Physiol* 2013.