

Katharina Friebe

**Einfluß von Okklusionseffekten auf  
die Epikutantestung mit  
Natriumlaurylsulfat**

Aus der Klinik für Dermatologie und Allergologie  
der Philipps Universität Marburg  
Geschäftsführender Direktor: Prof. Dr. med. M. Hertl

---

# **Einfluß von Okklusionseffekten auf die Epikutantestung mit Natriumlaurylsulfat**

Inaugural-Dissertation zur Erlangung des Doktorgrades  
der gesamten Medizin

dem Fachbereich Humanmedizin  
der Philipps-Universität Marburg vorgelegt

von  
Katharina Friebe  
aus Koblenz

Marburg, 2004

Angenommen vom Fachbereich Humanmedizin  
der Philipps-Universität Marburg am 24.02.2005.  
Gedruckt mit Genehmigung des Fachbereichs.

Dekan: Prof. Dr. med. B. Maisch

Referent: PD Dr. med. H. Löffler

Korreferent: Prof. Dr. med. C. Vogelmeier

In Dankbarkeit  
meinen Eltern  
gewidmet

# Inhaltsverzeichnis

<b>1. EINLEITUNG</b> .....	<b>1</b>
1.1. Problemstellung.....	1
1.2. Die physiologische Barriere der Haut .....	2
1.3. Epikutantestungen mit Natriumlaurylsulfat.....	7
1.3.1. Natriumlaurylsulfat.....	7
1.3.2. Durchführung von Epikutantestungen mit NLS .....	10
1.3.3. Wirkung von NLS auf die Haut .....	12
1.4. Hautphysiologische Untersuchungsmethoden.....	19
1.4.1. Transepidermaler Wasserverlust .....	20
1.4.2. Corneometrie.....	33
1.4.3. Colorimetrie .....	37
1.5. Einfluß der Okklusion auf die Haut .....	44
1.6. Ableitung der Fragestellung und Hypothesen.....	48
<b>2. MATERIAL UND METHODE</b> .....	<b>50</b>
2.1. Probanden .....	50
2.2. Testsubstanzen .....	51
2.3. Hautphysiologische Meßgeräte.....	52
2.3.1. Tewameter TM 210® .....	52
2.3.2. Corneometer CM 820® .....	52
2.3.3. Chromameter CR 300® .....	53
2.4. Standardisierung der Untersuchungsbedingungen .....	53
2.5. Testdurchführung .....	54
2.6. Statistik.....	56
2.7. Methodenkritik .....	57

<b>3. ERGEBNISSE .....</b>	<b>58</b>
<b>3.1. Ergebnisse TEWL .....</b>	<b>59</b>
3.1.1. Basisdaten .....	59
3.1.2. Zeitlicher Verlauf der TEWL-Werte .....	61
<b>3.2. Ergebnisse Corneometrie .....</b>	<b>63</b>
3.2.1. Basisdaten .....	63
3.2.2. Zeitlicher Verlauf der Corneometrie-Werte.....	65
<b>3.3. Ergebnisse Chromametrie .....</b>	<b>67</b>
3.3.1. Basisdaten .....	67
3.3.2. Zeitlicher Verlauf der Chromametrie-a*-Werte.....	69
<b>4. DISKUSSION .....</b>	<b>71</b>
<b>4.1. TEWL .....</b>	<b>71</b>
4.1.1. Leerkammer .....	73
4.1.2. Wasserkammer .....	75
4.1.3. NLS-Kammern .....	77
<b>4.2. Corneometrie.....</b>	<b>81</b>
4.2.1. Leerkammer .....	81
4.2.2. Wasserkammer .....	82
4.2.3. NLS-Kammern .....	84
<b>4.3. Chromametrie-a*-Werte.....</b>	<b>86</b>
4.3.1. Leerkammer .....	86
4.3.2. Wasserkammer .....	87
4.3.3. NLS-Kammern .....	88
<b>5. ÜBERGREIFENDE DISKUSSION .....</b>	<b>90</b>
<b>6. ZUSAMMENFASSUNG .....</b>	<b>93</b>
<b>7. LITERATURVERZEICHNIS .....</b>	<b>95</b>
<b>8. ANHANG .....</b>	<b>FEHLER! TEXTMARKE NICHT DEFINIERT.</b>

## Abkürzungsverzeichnis

Abb.	Abbildung(en)
AE	Anzeige-Einheiten
ESCD	Standardization Group of the European Society of Contact Dermatitis
g	Gramm
h	Stunde(n)
Hrsg.	Herausgeber
min	Minute(n)
NLS	Natriumlaurylsulfat
NMF	natural moisturizing factor
SSWL	superficial stratum corneum water loss
Tab.	Tabelle(n)
TEWL	transepidermaler Wasserverlust
WPB	Wasserpermeabilitätsbarriere

# 1. EINLEITUNG

## 1.1. Problemstellung

Zur Bestimmung der Hautempfindlichkeit werden Epikutantestungen mit dem Detergens Natriumlaurylsulfat (NLS) schon seit Jahren in der dermatologischen Diagnostik als Hautirritationstests eingesetzt. Eine klinische Relevanz besitzen diese Irritationstests für die chronisch-irritative Kontaktdermatitis, die zu den häufigsten Hauterkrankungen gehört.

Bei der Bewertung der infolge der Testung auftretenden Hautreaktionen kommen neben der visuellen Beurteilung verschiedene nicht-invasive hautphysiologische Meßmethoden zum Einsatz, von denen die Messung des transepidermalen Wasserverlustes (TEWL) am aussagekräftigsten erscheint. Diese Meßmethode ermöglicht eine Aussage über die Wasserpermeabilitätsbarriere der Epidermis und damit auch die Bewertung subklinischer Hautveränderungen. Der TEWL erfaßt sowohl die durch passive Diffusion abgegebene als auch die durch Schweißdrüsenaktivität abgegebene Wassermenge pro Zeiteinheit. Dabei sind für die Messung des TEWL Okklusionseffekte durch die Pflasterapplikation an sich von Bedeutung. Durch das okklusive Milieu des Pflasters wird die Abdiffusion von Wasser durch die Epidermis behindert und der Wassergehalt des Stratum corneum steigt an. Auch das mit dem applizierten Irritans zugeführte Wasser erhöht den Wassergehalt der Epidermis und führt zu einer darüber hinausgehenden Schädigung der Wasserpermeabilitätsbarriere. Diese Effekte bewirken eine artifizielle Erhöhung der TEWL-Meßwerte nach Abnahme des Testpflasters durch Abdiffusion des zusätzlich durch die Okklusion zurückgehaltenen Wassers und durch eine Schädigung der Wasserpermeabilitätsbarriere durch die Okklusion an sich. Aussagekräftige TEWL-Meßwerte können somit erst nach Abklingen aller Okklusions-Artefakte gewonnen werden.

Neben der Messung des TEWL steht eine Reihe weiterer hautphysiologischer Untersuchungsmethoden zur Verfügung. In dieser Studie kamen - außer der Messung des TEWL - die Messung der Hautdurchfeuchtung mittels

Corneometrie und die Messung des Hauterythems mittels Chromametrie zur Anwendung. Bisher wurde der Effekt der Okklusion auf die Meßwerte der Chromametrie und der Corneometrie nicht untersucht, obwohl ein Einfluß der Okklusion auf die Hautoberflächenfeuchtigkeit und damit auch auf den Farbeindruck sicher anzunehmen ist.

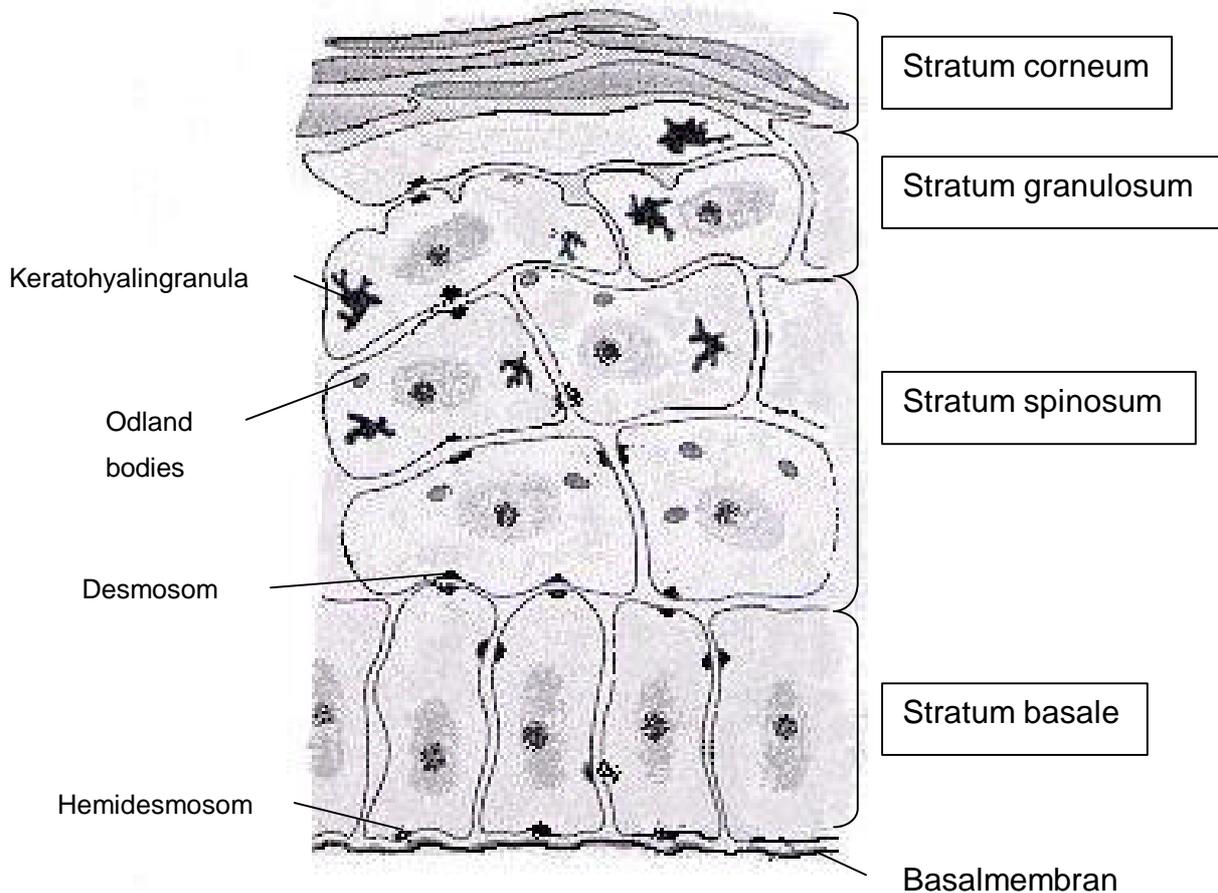
Ziel dieser Studie war es, bei der Epikutantestung mit NLS unterschiedlicher Konzentrationen im Vergleich zu Wasser und zu einer Leerkammer als Kontrolle den Zeitpunkt nach der Abnahme der Testpflaster zu ermitteln, an dem Okklusionseinflüsse auf die TEWL-, die Corneometrie- und die Chromametrie-Messungen weitgehend abgeklungen sind.

## **1.2. Die physiologische Barriere der Haut**

Die Haut des Menschen erfüllt als Grenzorgan zur Umwelt eine Vielzahl von Schutz- und Kontaktfunktionen. Sie besteht aus drei Schichten: der Epidermis (Oberhaut), der Dermis (Lederhaut) und der Subcutis (Unterhaut). Für die Regulation des Stoffaustausches zwischen Organismus und Umwelt ist die Epidermis von besonderer Bedeutung.

Die Epidermis ist ein geschichtetes Plattenepithel, welches zu 95 % aus Keratinozyten besteht. Man kann insgesamt vier Schichten unterscheiden: zuunterst das Stratum basale, darüber das Stratum spinosum, das Stratum granulosum und das Stratum corneum als äußerste Schicht. Das Stratum corneum übernimmt eine entscheidende Funktion als mechanisch-chemische Barriere zwischen Körper und Außenwelt. Besondere Bedeutung kommt dem Stratum corneum in seiner Funktion als Wasserpermeabilitätsbarriere (WPB) zu. So führt die sukzessive Verdünnung des Stratum corneum z. B. durch tape stripping zu einer exponentiellen Zunahme der Wasserdurchlässigkeit (Baker H & Kligman AM, 1967; Schwindt DA et al., 1998), die bis auf den 50-fachen Wert gesteigert sein kann (Baker H & Kligman AM, 1967). Bei längerer Wassereexposition des Stratum corneum kommt es zu Schwellungen der Korneozyten und damit zu einer Änderung der physikalischen Eigenschaften

der Hornschicht, z. B. zu einer Herabsetzung der Reißfestigkeit und einer Beeinträchtigung der Barrierefunktion (Warner RR et al., 2003).

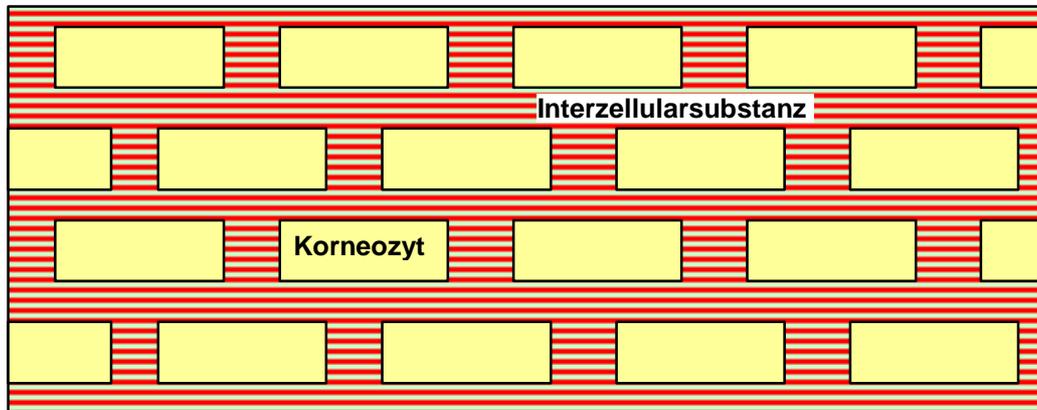


**Abbildung 1.1:** Schematischer Aufbau der Epidermis

Die Dermis gibt der Haut durch einen hohen Anteil an Kollagen- und Elastinfasern Elastizität und Reißfestigkeit. Durch einen hohen Gehalt an Chondroitin und Hyaluronsäure verfügt die Dermis über ein Flüssigkeitsdepot, durch das die Zellen der Epidermis versorgt werden. Bis in die Dermis reichen auch die Gefäße der Haut. Die Subcutis besteht hauptsächlich aus Fettzellen und dient der Polsterung gegen Stöße und der Wärmeisolierung.

Das Stratum corneum ist insgesamt nur ca. 6-20 µm dünn und besteht aus 10 bis 18 Schichten fest kohärenter, plattenartiger, kernloser Korneozyten und einer lipidreichen Interzellulärsubstanz (Plewig G et al., 1997). Der Aufbau des Stratum corneum kann mit einer Ziegelsteinmauer („brick- and mortar“-Modell)

verglichen werden, in der die kompakten Korneozyten in Form einander überlappender und ineinander verzahnter Säulen wie Ziegelsteine angeordnet sind, umgeben von der lipidreichen Interzellulärsubstanz als Mörtel (Elias PM, 1983; Schaefer H & Redelmeier TE, 1996).



**Abbildung 1.2:** „Brick- and mortar“-Modell des Stratum corneum nach Elias et al.  
(Elias PM, 1983)

Die proteinreichen Keratinozyten enthalten ein Gerüst aus Keratin- und Aktinfilamenten in einer amorphen Proteinmatrix, umhüllt von einer starren Protein- und Lipidschicht, dem sogenannten „cornified envelope“. Die Synthese der Keratinfilamentproteine und der interfilamentösen Matrix, den Filaggrinen, erfolgt in den basalen Schichten der Epidermis. Filaggrine sind eine Gruppe stark basischer, histidinreicher Proteine, die aus dem Vorläuferprotein Profilaggrin durch posttranslationale Modifikation hervorgehen, welches im oberen Stratum spinosum synthetisiert wird und mit Keratinfilamenten zusammen als Aggregat ausfällt (Keratohyalgranula). Im Stratum granulosum kommt es zur Dephosphorylierung und zum proteolytischen Zerfall von Profilaggrin und zur Dispersion der Bruchstücke. Dabei wird Filaggrin freigesetzt, welches zur Aggregation der Keratinfilamente und deren Vernetzung zu unlöslichen Keratinkomplexen führt (Redelmeier T & Schaefer H, 1999). Die Synthese des polaren cornified envelope erfolgt im oberen Stratum spinosum, wo das unlösliche Protein Involukrin gebildet wird, welches sich im Stratum granulosum an die Innenseite der Keratinozytenzellmembran anlagert und Quervernetzungen mit anderen Proteinen (Loricrin, Keratolinin, Envoplakin, Pancornullin) sowie verschiedenen Lipiden bildet. Diese Verdichtung des inneren Anteils der Zellmembran beträgt ca. 15 nm (Redelmeier T & Schaefer H, 1999). An der Außenseite der Keratinozytenzellmembran lagert sich eine

membranartige, ceramidreiche Lipidschicht (covalently bound envelope) an, welche die Verbindung zwischen Korneozyten und Interzellulärsubstanz herstellt (Abraham W & Downing DT, 1990). Diese Schicht ist reich an Hydroxyceramiden (Swartzendruber DC et al., 1987).

Die entscheidende Rolle für die Permeabilitätsbarriere des Stratum corneum scheint jedoch die lipidreiche Interzellulärsubstanz zu übernehmen (Elias PM & Menon GK, 1991; Williams ML & Elias PM, 1987). Diese enthält eine Reihe von Glykosaminoglykanen (Heparan- und Chondroitinsulfate) und Lipiden, besonders Ceramide, freie Fettsäuren und Cholesterin. Die Synthese des Lipidanteils erfolgt in den unteren, kernhaltigen Epidermisschichten zunächst in Form membrangebundener Phospholipide. Im oberen Stratum spinosum werden die lamellar bodies (Odland-Körperchen) synthetisiert, die Glykosylceramide, Sterolester und Phospholipide, aber auch hydrolytische Enzyme, z. B. saure Phosphatasen, Proteasen, Lipasen und Glykosidasen, enthalten (Elias PM et al., 2003). Am Übergang vom Stratum granulosum ins Stratum corneum erfolgt die Freisetzung dieser Bestandteile in den Interzellulärraum durch Exozytose (Elias PM et al., 1987). Der Extrazellulärraum wird durch die Menge der ausgeschleusten Lipide immer größer (Fartasch M & Diepgen TL, 1992). Gleichzeitig kommt es zu einem Abfall des pH-Wertes, der zu einer Aktivierung verschiedener Enzymsysteme führt, die Ceramide, Cholesterin und freie Fettsäuren aus den ausgeschleusten Bestandteilen freisetzen. Diese nehmen anschließend eine durch ihre hydrophilen und hydrophoben Bestandteile modifizierte räumliche Konfiguration ein und werden zu breiten, parallel geschichteten, membranähnlichen Lipidlamellen remodelliert (Madison KC et al., 1987; Swartzendruber DC et al., 1989). Diffusionsprozesse der Lipide in diesen membranähnlichen Strukturen scheinen im Vergleich zu zellulären Membranen deutlich herabgesetzt. Modellsysteme dieser Anordnung wurden kürzlich erstellt (Glombitza B & Müller-Goymann C, 2002). Norlen (Norlen L, 2001) sowie Engström et al. (Engström S et al., 2000) postulierten die Anordnung der interzellulären Lipide in Form einer kohärenten Gelphase.

Die Bedeutung der interzellulären Lipide für die Permeabilitätsbarriere konnte in Versuchen bestätigt werden, in denen durch Herauslösung der interzellulären Lipide mit einem Aceton-/Äthergemisch ein Anstieg des transepidermalen Wasserverlustes gezeigt werden konnte (Imokawa G et al., 1986; Scheuplein RJ & Blank IH, 1971). Auch durch Änderung der Lipidkonfiguration durch Erhitzen konnte eine Änderung in der Permeabilitätsbarriere beobachtet werden (Golden GM et al., 1987; Ribaud C et al., 1991; Wertz PW et al., 1989). Eine Störung in der Freisetzung der interzellulären Lipide aus den lamellar bodies oder eine fehlerhafte Ausbildung der membranartigen Anordnung in Lipidlamellen im Interzellularraum geht mit einer Störung der WPB einher (Elias PM, 1981;1983; Proksch E, 1992; Velkova V & Lafleur M, 2002; Williams ML & Elias PM, 1993). Im Vergleich zu anderen Biomembranen ist die Wasserpermeabilität des Stratum corneum ca. 1000-fach niedriger, was auf die besondere Lipidzusammensetzung und -anordnung mit Ausbildung multilamellärer Strukturen zwischen den eingebetteten, weitgehend impermeablen Korneozyten zurückgeführt werden kann (Bouwstra J et al., 2001; Bouwstra JA et al., 1997; Potts RO & Francoeur ML, 1991).

Neben der lipidreichen Interzellulärschicht bestehen weitere Verbindungen zwischen den Keratinozyten, u. a. proteinreiche Desmosomen, Hemidesmosomen etc., die ebenfalls eine Rolle für die WPB spielen (Tsuruta D et al., 2002). Der Hydratationszustand der Korneozyten wird zu einem Großteil beeinflusst durch den sogenannten „natural moisturizing factor“ (NMF), zusammengesetzt aus intrazellulären Aminosäuren und deren Derivaten sowie verschiedenen Salzen, die Feuchtigkeit anziehen und speichern können (Rawlings AV et al., 1994). Als Vorläuferprotein des NMF konnte Profilagin identifiziert werden. Die enzymatische Umwandlung von Profilagin über Fillagin zum NMF ist abhängig vom Hydratationszustand des Stratum corneum (Rawlings AV & Harding CR, 2004). Der Gehalt an NMF ist in den Korneozyten der mittleren Zellagen des Stratum corneum am höchsten, in den ganz basalen Zellagen ist nur sehr wenig bzw. kein NMF mehr nachweisbar (Rawlings AV et al., 1994).

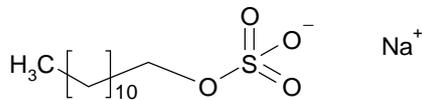
### **1.3. Epikutantestungen mit Natriumlaurylsulfat**

Bezüglich der Reagibilität der Haut auf exogene irritative Reize bestehen große individuelle Unterschiede, die nicht nur auf die Art und die Dosis des einwirkenden Irritans, sondern auch auf eine individuelle Prädisposition zurückzuführen sind. Die Epikutantestung als „Läppchenprobe“ zur Ermittlung der Hautirritabilität wurde erstmals 1947 durch Burckhardt eingeführt (Burckhardt W, 1947). Hier wurden mit Seifenlauge getränkte Stoffläppchen auf die Rückenhaut aufgebracht und die Hautreaktion visuell beurteilt. Der darauf aufbauend entwickelte Alkali-resistenztest bestand in einer Provokation der Rückenhaut mit 0,5 molarer wäßriger Natriumhydroxid-Lösung unter Okklusion für jeweils ca. 10 Minuten (Locher G, 1962; Wilhelm KP et al., 1990). Bei Untersuchungen zur Beurteilung der Hautempfindlichkeit nehmen oberflächenaktive Substanzen eine zentrale Stellung ein. Erste Irritationstests wurden mit Seifen und Waschmitteln durchgeführt (Finkelstein P et al., 1963; Smeenk G, 1969), später erfolgte die Auftrennung dieser Gemische in ihre Einzelsubstanzen und Testung derselben (Walker AI et al., 1967). Zu Irritationstestungen wurden eine Reihe unterschiedlicher experimenteller Substanzen eingesetzt, so z. B. Ammoniumhydroxid (Frosch PJ & Kligman AM, 1977), Benzalkoniumchlorid (Park KB & Eun HC, 1995), Dimethylsulfoxid (DMSO) (Hinnen U et al., 1995) und Natriumhydroxid (Alkali-resistenztest) (Burckhardt W, 1947; Kolbe L et al., 1998). In hautphysiologischen Irritationstestungen hat sich in den letzten Jahren zunehmend Natriumlaurylsulfat als Modell-Irritans durchgesetzt (Agner T & Serup J, 1989; Lee CH & Maibach HI, 1995; Löffler H et al., 2001; Tupker RA et al., 1997; Wilhelm KP et al., 1989).

#### **1.3.1. Natriumlaurylsulfat**

Natriumlaurylsulfat (NLS), auch Dodecylsulfat-Natriumsalz, ist ein anionisches Detergens mit einer molekularen Masse von 288,38 g/mol. Im Rohzustand ist NLS ein weißes, geruchloses, kristallines Pulver. Es zeigt eine gute Löslichkeit

in Wasser (1 g/10 ml), schlechter hingegen ist die Löslichkeit in Ethanol (Tupker RA et al., 1997). Die Summenformel nach Hill ist  $C_{12}H_{25}NaO_4S$ , in der Strukturformel stellt sich das Molekül folgendermaßen dar:



In hautphysiologischen Epikutantestungen werden wäßrige Lösungen von NLS unterschiedlicher Konzentrationen von 0,1 % bis 10 % mit unterschiedlichen Applikationszeiten verwendet. Dabei zeigte sich eine konzentrationsabhängige Penetrationsrate von NLS (Fullerton A et al., 1994). Das Zusammenwirken von Konzentration und Einwirkzeit eines Irritans auf die Hautschädigung läßt sich zusammenfassen in einer durch Schreus erarbeiteten Wirkformel (Kühl M & Klaschka F, 1990):

$$c \times t^n = K, 0 < n < 1 \text{ (c=Konzentration, t=Einwirkzeit, K=Konstante)}$$

In dieser Formel wird deutlich, daß bei einer hohen Konzentration (c) eines Irritans auch bei kurzer Einwirkzeit (t) eine bestimmte Wirksamkeit (K) erreicht werden kann. Bei geringerer Konzentration (c) des Irritans muß folglich die Einwirkzeit (t) zum Erreichen der gleichen Wirksamkeit (K) überproportional der Konzentrationsminderung sein, da bei längerer Einwirkzeit Reparatur- und Schutzmechanismen aufgrund der niedrigeren Konzentration stärker wirksam werden. Dies spiegelt sich in dem Exponenten n wider, der damit kleiner als eins definiert ist (Aramaki J et al., 2001). Nach 6-stündiger Applikation unterschiedlicher NLS-Konzentrationen (0,125 %, 0,25 %, 0,5 %, 1 %) war bei TEWL-Messungen 30 Minuten nach Abnahme der Testpflaster noch keine signifikante Testreaktion nachweisbar, bei Messungen 24 Stunden nach Abnahme der Testpflaster zeigten sich jedoch bereits signifikante Erhöhungen der TEWL-Werte bei allen applizierten Konzentrationen. Bei längeren Applikationszeiten (12, 24, 48 Stunden) waren sowohl bei Messungen 30 Minuten als auch 24 Stunden nach Abnahme der Testpflaster signifikante Erhöhungen der TEWL-Werte bei allen applizierten Konzentrationen zu erheben (Aramaki J et al., 2001).

In verschiedenen Studien konnte eine lineare Abhängigkeit der Hautreaktion auf NLS von der applizierten NLS-Konzentration nachgewiesen werden (Agner T & Serup J, 1990; Aramaki J et al., 2001; Fullerton A et al., 1994; van Neste D, 1990; Welzel J et al., 1998). In der Morphologie der Hautreaktion (Erythem, Trockenheit, Fältelung, Fissuren, Blasen, Nekrose) zeigte sich ebenfalls eine Dosisabhängigkeit mit frühen, starken, eher toxischen Veränderungen bei hohen NLS-Konzentrationen und mildereren, später einsetzenden Veränderungen bei niedrigeren Konzentrationen (Reiche L et al., 1998). Verzögerte Reaktionen nach 24-stündiger okklusiver Applikation unterschiedlicher NLS-Konzentrationen mit Erreichen des Maximums der Hautreaktion nach 48 Stunden sind ebenfalls beschrieben (Agner T & Serup J, 1989; Bruynzeel DP et al., 1982; Tupker RA et al., 1990; Welzel J et al., 1998). Nach einmaliger okklusiver Applikation einer 1%igen NLS-Lösung über 24 Stunden konnten Spuren von NLS in Epidermis und Dermis noch mehrere Tage nach Entfernen der Testpflaster, in Untersuchungen an Rattenhaut bis zu 7 Tage nach Applikation nachgewiesen werden (Patil S et al., 1995).

Neben der Konzentration ist auch der Reinheitsgrad des NLS entscheidend für die auftretende Hautreaktion: Ein geringerer Reinheitsgrad geht mit einer verminderten Hautreaktion einher (Agner T et al., 1989). Ursächlich hierfür ist der Anteil an NLS-Molekülen mit einer Kettenlänge von 12 Kohlenstoffatomen, welche eine maximale irritative Wirkung auf die Haut zeigen (Kligman AM & Wooding WM, 1967; Stillman MA et al., 1975). Längere wie auch kürzere Kohlenstoffketten haben einen geringeren irritativen Effekt (Agner T et al., 1989; Kosswig H & Stache H, 1993). Mit zunehmender Alkylkettenlänge ist eine Zunahme der Lipophilie verbunden, die eine Penetration in die Epidermis begünstigt (Wilhelm KP et al., 1993). Bei weiterer Zunahme der Alkylkettenlänge über 12 Kohlenstoffatome scheint das Optimum der Lipophilie überschritten und eine Penetration der Moleküle ins Stratum corneum auch aufgrund der Molekülgröße erschwert, die kritische mizellare Konzentration sinkt mit zunehmender Kettenlänge ab (Wilhelm KP et al., 1993). Zusätzlich treten hydrophobe Wechselwirkungen mit zunehmender Kettenlänge in den Vordergrund (Wilhelm KP et al., 1994). Bei Abnahme des Reinheitsgrades auf unter 96,5 % ist bereits mit einer deutlich schwächeren Hautreaktion zu rechnen

(Agner T et al., 1989). Daher sollte bei Epikutantestungen mit NLS ein Reinheitsgrad von >99 % angestrebt werden (Tupker RA et al., 1997).

NLS gehört zur Gruppe der anionischen Tenside, welche aufgrund ihres amphiphilen Molekülaufbaus (sowohl hydrophobe, als auch hydrophile Eigenschaften) grenzflächenaktive Eigenschaften besitzen. Neben den in der Trägersubstanz gelösten Molekülen reichern sich Tenside an Grenzflächen (z. B. Wasser/Luft) an und verändern deren Grenzflächenspannung (Rhein LD et al., 1990). Bei Erhöhung der Tensidkonzentration über die sogenannte kritische mizellare Konzentration, wenn die Grenzflächen bereits mit Tensidmolekülen belegt sind, treten diese mit sich selbst in Wechselwirkung und bilden in der Volumenphase Aggregate, die man als Mizellen bezeichnet. Die kritische mizellare Konzentration für NLS liegt bei 7-10 mM ( $8,2 \times 10^{-3}$  mol/l bei 25 °C) (Tupker RA et al., 1997). Eine weitere Erhöhung der Konzentration führt in der Epikutantestung nur zu einer leichten Zunahme der Irritabilität, da der irritative Effekt überwiegend durch die Wirkung von NLS-Monomeren vermittelt zu sein scheint (Loden M, 1990). Auch die Temperatur beeinflusst das Ausmaß der Hautirritation (Berardesca E et al., 1995; Emilson A et al., 1993). Höhere Temperaturen der NLS-Lösung führen zu einer stärkeren Barrierschädigung, vermittelt durch eine stärkere Hydratation des hydrophilen Molekülanteils, welche die Mizellenbildung begünstigt (Berardesca E et al., 1995).

### **1.3.2. Durchführung von Epikutantestungen mit NLS**

Die durch die hautphysiologischen Testungen mit NLS erzeugte Hautreaktion ist abhängig von der Konzentration, Applikationsmenge, Applikationsdauer und Applikationsart der NLS-Lösung. Verschiedene Applikationsarten sind für NLS-Lösungen beschrieben:

1. Akute Irritation: einfache okklusive epikutane Testung (Agner T & Serup J, 1990; Basketter DA et al., 1998; Löffler H et al., 2001), einmalige offene Testung (Lammintausta K et al., 1988)

2. Chronische Irritation: mehrfache kurzzeitige okklusive Epikutantestungen in Folge (Agner T & Serup J, 1990; Lee CH & Maibach HI, 1994; Tupker RA et al., 1989; Tupker RA et al., 1990; Wigger-Alberti W et al., 2000), mehrfache offene Testungen in Folge mit Aufbringen von NLS-Lösungen direkt auf die Haut (Lammintausta K et al., 1987) oder Anwendung offener Testkammer (Hannuksela A & Hannuksela M, 1995; Lee CH & Maibach HI, 1994; Tupker RA et al., 1999; Tupker RA et al., 1990; Wilhelm KP et al., 1990), der Plastic occlusion Test (POST) (Berardesca E & Maibach HI, 1990; van der Valk PG & Maibach HI, 1989) oder Waschtests (Gehring W et al., 1998; Grunewald AM et al., 1995; Klein G et al., 1992)

Zur Einschätzung der Hautempfindlichkeit findet zumeist die einmalige epikutane okklusive Applikation von NLS ihre Anwendung (Tupker RA et al., 1997; Wilhelm KP et al., 1989). Die Applikation der NLS-Lösung bei der Epikutantestung erfolgt in Konzentrationen von 0,1-10 % über 12-48 Stunden in speziellen Testkammersystemen an unterschiedlichen Körperstellen, meist an Unterarmbeugeseiten oder Rückenhaut (Tupker RA et al., 1997). Bei der einfachen okklusiven Applikation von NLS werden meistens Finn Chambers® verwendet, jedoch stehen auch andere Testsysteme zur Verfügung (Duhring Chamber®, Hilltop Chamber®, Agfa Bayer Chamber®). Finn Chambers® sind erhältlich in den Innendurchmessern von 8 mm, 12 mm und 18 mm entsprechend einem Befüllungsvolumen von 17 µl, 60 µl und 200 µl. Eine zu geringe NLS-Applikationsmenge in der Epikutantestung führt zu einer schwächeren Hautreaktion im Vergleich zu einer größeren Applikationsmenge gleicher NLS-Konzentration (Frosch PJ & Kligman AM, 1979). Testkammern mit einem Innendurchmesser von mindestens 12 mm scheinen daher geeigneter zu sein für Epikutantestungen mit NLS als kleinere Testkammern, wie sie bei den Epikutantestungen mit Kontaktallergenen zur Anwendung kommen (Tupker RA et al., 1997).

Wäßrige NLS-Lösungen sind zu bevorzugen, da in der Epikutantestung von einer Freisetzung von ca. 70 % der Testsubstanz aus der aufgetragenen Lösung auszugehen ist. Im Vergleich dazu ist die Freisetzung aus Gelen deutlich geringer (Agner T et al., 1990). Ferner zeigte sich eine geringere

Hautreaktion auf NLS 10 % in wäßriger Lösung, wenn vor der Applikation der Testlösung mittels epikutaner Testkammer die Flüssigkeit in der Kammer bereits völlig verdunstet war, d. h. das Filterpapier zum Zeitpunkt der Applikation bereits trocken war. Im Vergleich dazu zeigte sich nach Applikation einer unmittelbar zuvor befüllten Testkammer eine stärkere Hautreaktion auf NLS (Agner T, 1992; Dahl MV & Roering MJ, 1984). In Epikutantestungen mit NLS zur Erfassung der Hautempfindlichkeit erfolgt die Testung häufig in Konzentrationen zwischen 0,125 % und 1 % (Brasch J et al., 1999; Löffler H et al., 1996). Die sich entwickelnde Hautreaktion kann visuell (Tupker RA et al., 1997) und mit unterschiedlichen hautphysiologischen Meßmethoden ausgewertet werden, die in den nachfolgenden Kapiteln näher erläutert werden.

### **1.3.3. Wirkung von NLS auf die Haut**

#### **Einflußfaktoren auf die NLS-Reaktion**

Die Irritationswirkung von NLS ist abhängig von mehreren Faktoren und umfaßt eine Reihe verschiedener klinischer und histopathologischer Reaktionen. Neben Konzentration, Reinheitsgrad, Applikationsdauer und –menge sowie Trägersubstanz haben in geringerem Ausmaß auch folgende Faktoren einen Einfluß:

- Alter der Testperson: Geringere Hautempfindlichkeit auf NLS trat bei älteren Menschen mit dafür länger anhaltenden Hautreaktionen auf (Ghadially R et al., 1995; Tsuruta D et al., 2002), jedoch ließen sich keine signifikanten Unterschiede in der Empfindlichkeit auf NLS in der Altersgruppe zwischen 18 und 50 Lebensjahren feststellen (Agner T, 1992; Cua AB et al., 1990; Lammintausta K & Maibach HI, 1990).
- Ethnische Zugehörigkeit: Hellhäutige Testpersonen kaukasischen Ursprungs zeigten eine höhere Empfindlichkeit auf NLS als dunkelhäutige (Agner T, 1991; Lammintausta K et al., 1988), in einer Studie von Berardesca fand sich hingegen eine stärkere Hautreaktion in

der okklusiven Testung mit NLS bei Dunkelhäutigen (Berardesca E & Maibach HI, 1988). In der asiatischen Bevölkerung zeigten chinesische Testpersonen eine höhere Empfindlichkeit als malaysische (Goh CL & Chia SE, 1988).

- Geschlecht: Bezüglich des Geschlechtes konnte in einer Reihe von Studien kein signifikanter Unterschied in der Empfindlichkeit auf NLS herausgestellt werden (Agner T, 1991; Lammintausta K et al., 1987; Tupker RA et al., 1989; van der Valk PG et al., 1984). Statistisch gesehen liegt die Inzidenz der irritativen Kontaktdermatitis bei Frauen höher als bei Männern, was jedoch auf eine stärkere Exposition mit Feuchtarbeiten insgesamt zurückzuführen sein dürfte (Björnberg A, 1975; Lammintausta K & Maibach HI, 1990). Bei weiblichen Testpersonen konnte eine Änderung der Empfindlichkeit im Menstruationszyklus mit einer erhöhten Empfindlichkeit am ersten Zyklustag und anschließender Abnahme bis zum 10. Zyklustag gezeigt werden (Agner T et al., 1991).
- Vererbung: Ein genetischer Einfluß auf die Hautempfindlichkeit wird ebenfalls diskutiert. Agner und Serup konnten eine höhere interindividuelle Variabilität der NLS-Reaktion nachweisen als die intraindividuelle Variabilität bezüglich unterschiedlicher Testorte bei einem Patienten (Agner T & Serup J, 1990). Studien an ein- und zweieiigen Zwillingspärchen u. a. mit Natriumlaurylsulfat zeigten eine sehr hohe Korrelation zwischen den Testreaktionen eineiiger Zwillingspärchen im Vergleich zu denen zweieiigen Zwillingspärchen. Auch die Reaktionen zweieiiger Zwillingspärchen zeigten noch eine deutliche Korrelation verglichen mit denen nicht-verwandter Testpersonen (Holst R & Möller H, 1975). Frosch beschreibt das Vorliegen einer „allgemein empfindlichen Haut, welche verstärkt auf exogene Einflüsse reagiert“ (Frosch PJ, 1985). Bei Patienten mit atopischem Ekzem konnten höhere TEWL-Werte nach NLS-Exposition als bei Hautgesunden gemessen werden (Basketter DA et al., 1998; Löffler H & Effendy I, 1999).

- Testort: Nach NLS-Epikutantestung zeigte sich am Unterarm in Ellenbogennähe eine erhöhte Empfindlichkeit im Vergleich zur übrigen volaren Unterarmseite, in Handgelenksnähe eine erniedrigte Empfindlichkeit (van der Valk PG & Maibach HI, 1989). Hautregionen an Extremitäten und Rumpf unterscheiden sich erheblich in ihrem Ansprechen auf Irritantien, nicht nur in Bezug auf die Penetrationsrate (Cua AB et al., 1990; Henry F et al., 1997). Dabei spielt insbesondere die Dicke der Haut, hier vor allem des Stratum corneum, eine Rolle bei der Durchlässigkeit für ein Irritans, da nach dem Fick'schen Diffusionsgesetz die Menge des diffundierten Stoffes von der Dicke des durchdrungenen Materials, hier von der Dicke des Stratum corneum, abhängig ist. Eine Verminderung der Dicke des Stratum corneum, z. B. durch einen Tesafilmabriß, führt zu einer verminderten Permeabilitätsbarriere und damit zum tieferen Eindringen des Irritans (Welzel J et al., 1996; Zhai H et al., 1998). Gesicht, oberer Rücken, Retroaurikular- und Genitalregion reagieren empfindlicher auf Detergentien (Britz MB & Maibach HI, 1979; Elsner P et al., 1990; Frosch PJ, 1992; Lammintausta K & Maibach HI, 1988). Unterschiede bezüglich der Körperhälften waren nicht nachweisbar (Agnier T & Serup J, 1990; Breit R & Agathos M, 1992).
- Applikationsart: Nach einmaliger epikutaner Applikation von NLS 0,5 % über 24 Stunden waren Veränderungen des TEWL bis zu 14 Tage nachweisbar (Wilhelm KP et al., 1993). Bei Provokation der Haut mit NLS 1 % über 24 Stunden und anschließender okklusiver Applikation von NLS 2 % und 7 % über jeweils 30 Minuten an 4 aufeinanderfolgenden Tagen zeigten sich erhöhte TEWL-Werte bis zu 2-4 Wochen nach der letzten Applikation (Lee JY et al., 1997). Lammintausta et al. konnten nach wiederholter offener Applikation von NLS unterschiedlicher Konzentration an 6 aufeinanderfolgenden Tagen bei anschließender epikutaner okklusiver Provokation mit NLS 0,5 % und 1 % 6 Wochen nach erfolgter primärer Irritation eine Hyporeaktivität im Sinne eines „hardening“-Effektes nachweisen (Lammintausta K et al., 1987). Auch Tupker et al. und Widmer et al. beschreiben ähnliche Adaptationsphänomene nach wiederholter täglicher Applikation (Tupker RA et al., 1989; Widmer J et al., 1994).

- Jahreszeit: Aufgrund einer erniedrigten Hautfeuchte im Winter zeigte sich eine erhöhte Irritabilität der Haut auf NLS-Testungen in verschiedenen Studien (Agner T, 1992; Agner T & Serup J, 1989; Lammintausta K & Maibach HI, 1988). Besonders ausgeprägt zeigte sich dieser saisonale Unterschied bei atopischen Testpersonen (Tupker RA et al., 1995). Der pathophysiologische Hintergrund dieser erhöhten Hautempfindlichkeit könnte der erniedrigte Wasserdampfdruck bei niedrigeren Temperaturen sein, der zu einer erniedrigten WPB der Haut führt (Tupker RA et al., 1997).
- UV-Exposition: Vorhergehende Bestrahlung des Testareals mit UVA oder UVB vermindert die Hautreaktion auf verschiedene Irritantien, u. a. NLS, im Sinne eines Licht-„hardenings“ (Frosch PJ & Wissing C, 1982; Lehmann P et al., 1988).

### **Klinische Beurteilung der Hautreaktion auf NLS**

In geringen Konzentrationen beeinflusst NLS zunächst vorwiegend das Stratum corneum, was sich klinisch in einer geringgradigen Schuppung der Haut, bei stärkerer Hautreaktion auch in stärkerer Schuppung mit unterschiedlicher Rötung, ödematösen Veränderungen, Vesikeln, Pusteln bis hin zu nekrotischen Hautveränderungen äußert. Bei längeren Einwirkzeiten und höheren Konzentrationen von NLS treten Zeichen der Entzündung deutlicher in den Vordergrund. Die oberflächliche Rissigkeit und Schuppung der Haut, der sog. „Seifeneffekt“ zeigt sich deutlich 4 Tage nach Abnahme der Testpflaster und nimmt weiter bis ca. 7 Tage nach Entfernen der Pflaster zu (Wilhelm KP et al., 1993). Die visuelle Bewertung einer Hautreaktion auf NLS sollte nach den Richtlinien der Standardization Group of the European Society of Contact Dermatitis (ESCD) erfolgen (Pinnagoda J et al., 1990).

**Tabelle 1.1:** Richtlinien zur visuellen Bewertung der Hautreaktion nach Epikutantestung mit NLS. Ausführliches Bewertungssystem nach den Richtlinien der ESCD (Tupker RA et al., 1997)

Qualität	½	1	2	3
Erythem	sehr schwach	schwach, diffus oder fleckig	mäßig	stark
Oberflächenbeschaffenheit	glänzende Oberfläche	leichte Unebenheiten	mäßige Risse	deutliche Risse
Schuppung	-	minimal	mäßig	stark
Ödem	-	leicht	mäßig	deutlich
Risse	-	feine Risse	tiefe Risse	tiefe Risse mit Blutung, Nässen



**Abbildung 1.3:** Klinische Bilder einer typischen Hautreaktion auf NLS nach 24-stündiger Applikation des Testpflasters: links Mazeration unmittelbar nach Abnahme des Testpflasters, rechts Seifeneffekt 96 Stunden nach Abnahme des Testpflasters

### Histopathologische und ultrastrukturelle Veränderungen durch NLS

Lichtmikroskopisch zeigt sich nach einmaliger epikutaner Applikation von NLS über 24 bzw. 72 Stunden eine Spongiose sowie ein Ödem der Epidermis (Fartasch M et al., 1998; Leveque JL et al., 1993; Willis CM et al., 1989). Bei längerer Einwirkungszeit von NLS treten Zeichen der Entzündung hinzu

(Lachapelle JM, 1992). NLS hat ferner einen Einfluß auf die proliferative Aktivität epidermaler Keratinozyten (Willis CM et al., 1992). In mehreren Studien konnten eine Parakeratose sowie eine Steigerung des DNA-Umsatzes in der Epidermis nachgewiesen werden (Lachapelle JM, 1992; Lee M et al., 1996; Leveque JL et al., 1993; Proksch E, 1992; Willis CM et al., 1989). Nach Schädigung der epidermalen Barriere durch unterschiedliche Tenside war eine Steigerung der Lipid-Biosynthese mit einem Anstieg der Lipid-synthetisierenden Enzyme innerhalb von 1,5 Stunden nach Beginn der Schädigung zu beobachten, gefolgt von einer Steigerung der DNA-Synthese mehrere Stunden später, welche zu einer epidermalen Hyperplasie führt (Proksch E et al., 1991). Auch in vitro konnten Varani et al und Bloom eine Stimulation der Fibroblasten- und Keratinozytenaktivität durch NLS feststellen (Bloom E et al., 1994; Varani J et al., 1993).

Welzel et al. zeigten eine konzentrationsabhängige Zunahme der epidermalen Proliferationsrate durch NLS (Welzel J et al., 1998). Dabei konnte keine Korrelation zwischen der Steigerung der Proliferationsrate und dem Ausmaß der Schädigung der WPB dargestellt werden. Die Steigerung der Proliferationsrate beruht somit weniger auf einer Störung der Permeabilitätsbarriere als vielmehr auf direkten Interaktionen von NLS mit den Keratinozyten bzw. über die Freisetzung verschiedener Mediatoren (Welzel J et al., 1998). Beschrieben sind eine Steigerung der Expression des interzellulären Adhäsionsmoleküls ICAM-1 (Willis CM et al., 1991) sowie der Integrin-Rezeptoren  $\alpha 3$ ,  $\beta 1$ ,  $\alpha 6$ ,  $\beta 4$  und  $\beta 5$  (Brian JN & Yathi N, 1993; Lindberg M et al., 1991; von den Driesch P et al., 1995). Ferner konnte eine vermehrte Bildung verschiedener Cytokine, u. a. Interleukin-8 und Interleukin-1 $\beta$  in Zellkulturen humaner Keratinozyten nachgewiesen werden (Wilmer JL et al., 1994) sowie in der frühen Phase der Reaktion besonders Interleukin-6 und TNF $\alpha$  in der Lymphflüssigkeit durch NLS stimulierter Hautareale (Hunziker T et al., 1992). Als früher Marker einer Barrierschädigung konnte auch Interleukin-1 $\alpha$  nachgewiesen werden (Gibbs S et al., 2002).

In Abhängigkeit der hervorgerufenen entzündlichen Veränderungen wurde eine Einwanderung von Leukozyten in die Epidermis und Dermis nachgewiesen, besonders CD4<sup>+</sup>-Lymphozyten, einiger CD8<sup>+</sup>-Lymphozyten sowie geringer auch

die Einwanderung polymorphkerniger Leukozyten und Monozyten (Ferguson J et al., 1985; Willis CM et al., 1993). Die Mehrzahl dieser T-Lymphozyten sind T-memory cells (CD45RO<sup>+</sup>), und bei einem Teil der Zellen konnten Rezeptoren für Interleukin-2 (IL-2) nachgewiesen werden (Avnstorp C et al., 1987; Willis CM et al., 1993). Frosch und Czarnetzki beobachteten eine direkte chemotaktische Wirkung von NLS auf neutrophile Granulozyten (Frosch PJ & Czarnetzki BM, 1987). Auswirkungen auf die Langerhanszellen mit einer Mitochondrienschwellung und Vakuolisierung des Zytoplasmas, bei hohen Applikationsdosen auch Membranrisse mit Desorganisation der Zellorganellen sind beschrieben (Willis CM et al., 1990). Brandt et al. konnten eine Zunahme der Langerhanszellen in den superfiziellen Lymphgefäßen der papillären Dermis nach Stimulation des Hautareals mit NLS nachweisen (Brand CU et al., 1992). Bei hohen NLS-Konzentrationen treten Nekrosen und Verlust der epidermo-dermalen Verbindungsstrukturen auf (Willis CM et al., 1989). Die epidermale Regenerationszeit („stratum corneum turnover rate“) liegt etwa bei 17-22 Tagen (Finlay AY et al., 1982). Imokawa et al. konnten in einer Studie eine Verminderung verschiedener interzellulärer Lipide nach Applikation von Detergentien zeigen (Imokawa G et al., 1989). Eine Vielzahl weiterer Studien zeigten eine Verminderung verschiedener Lipide und eine Desorganisation der Lipidlamellen nach Einwirkung von NLS (Fartasch M, 1997; Froebe CL et al., 1990; Leveque JL et al., 1993; Ribaud C et al., 1991; Warner RR et al., 1999; Welzel J et al., 1998). Bei Untersuchung mit Rutheniumtetroxid zur Darstellung der Lipidlamellen ergab sich hingegen kein Hinweis auf eine direkte Einwirkung von NLS auf die lamelläre Doppelmembran (Fartasch M, 1995). Auch in den Korneozyten wurden Ansammlungen intrazellulärer Lipidtröpfchen und membrangebundene Vesikel nachgewiesen (Imokawa G et al., 1989).

In höheren Konzentrationen wurde eine proteindenaturierende Wirkung durch NLS beschrieben (Miyazawa K et al., 1984). Testungen mit niedrigeren NLS-Konzentrationen konnten hingegen nur reversible Strukturveränderungen epidermaler Proteine mit einer Schwellung des Stratum corneum aufzeigen, welche nach Auswaschen des NLS mit Wasser rasch rückläufig war (Rhein LD et al., 1986). Diskutiert wurde auch eine Freisetzung neuer Wasserbindungsstellen durch die Störung der Tertiär- und Sekundärstruktur epidermaler Proteine durch NLS, welche zunächst zu einer Hyperhydratation

des Stratum corneum führt (Wilhelm KP, 1995). Die zu beobachtende Schwellung des Stratum corneum nach Einwirkung von NLS wird möglicherweise auch durch hydrophobe Wechselwirkungen zwischen den langen Kohlenstoffketten des NLS und epidermaler Proteine hervorgerufen (Rhein LD et al., 1986). In dieser Anordnung der hydrophoben Ketten kommt die anionische Gruppe des NLS in den Zwischenräumen der Proteinketten zu liegen und führt über abstoßende Kräfte zu einem Auseinanderweichen der Proteinketten (Rhein LD et al., 1990). Hier spielt der konzentrationsabhängige pH-Wert einer wäßrigen NLS-Lösung eine Rolle. Normalerweise liegt der pH-Wert zwischen 7,5 und 9, wobei eine 1%ige NLS-Lösung bereits einen pH-Wert von 9 hat. Bei einem niedrigeren pH-Wert der NLS-Lösung liegen die Carboxylat- und auch die primären Amin-Gruppen größtenteils in protonierter Form vor. Es kommt zu einer Bindung an die Sulfonat-Gruppen des NLS, wodurch das Auseinanderweichen der Proteinketten weitaus geringer auftritt mit weniger ausgeprägter Schwellung des Stratum corneum (Rhein LD et al., 1986; Rhein LD et al., 1990).

#### **1.4. Hautphysiologische Untersuchungsmethoden**

Neben der visuellen Einschätzung einer Hautreaktion stehen heute eine Reihe unterschiedlicher, nicht-invasiver hautphysiologischer Untersuchungsmethoden zur objektiven Erfassung morphologischer aber auch funktioneller Veränderungen der Haut zur Verfügung. Ein großer Vorteil dieser Untersuchungsmethoden ist die Möglichkeit einer Objektivierung des Ausmaßes subklinischer Hautschädigungen lange vor dem Auftreten sichtbarer Hautveränderungen. Zu diesen Methoden zählen die Messung des transepidermalen Wasserverlustes (TEWL) zur Erfassung der Funktion der WPB der Epidermis, Ultraschalluntersuchungen zur Dickenmessung der Haut, die Messung des elektrischen Hautwiderstandes, die Erfassung der Hautdurchfeuchtung mittels Kapazitätsmessung nach dem Kondensatorverfahren oder mittels Squamometrie, die Sebumetrie zur Erfassung der Hautoberflächenlipide sowie verschiedene Methoden zur Beurteilung der Entzündungsreaktion, z. B. die Laser-Doppler-Rheometrie, mit der Änderungen der kutanen Durchblutung erfaßt werden können (Nilsson GE

et al., 1980), die Chromametrie zur Farbbestimmung (Agner T & Serup J, 1989) und die Thermometrie zur Erfassung der Hautoberflächentemperatur (Carpentier PH, 2001). Dabei erscheint die Messung des transepidermalen Wasserverlustes als die derzeit aussagekräftigste hautphysiologische Meßmethode mit der höchsten Sensitivität zur Erfassung der Hautreaktion nach Irritationstestungen mit NLS (Agner T & Serup J, 1990; Aramaki J et al., 2001; Tupker RA et al., 1997). Neben der Messung des TEWL wurden in dieser Studie noch die Messung der Hautdurchfeuchtung mittels Corneometrie und die Messung des Hauterythems mittels Chromametrie eingesetzt.

#### **1.4.1. Transepidermaler Wasserverlust**

Der Wasserverlust durch die Haut setzt sich zusammen aus der passiven Diffusion von Wasser durch die Epidermis und zum anderen aus dem über die Aktivität ekkriner Schweißdrüsen bestimmten Anteil (Pinnagoda J et al., 1989). Unter dem transepidermalen Wasserverlust (TEWL) versteht man somit die passiv durch Diffusion über die Epidermis in Ruhe abgegebene Wassermenge pro Hautoberfläche und Zeiteinheit. Der Wasserverlust über die Haut beträgt in Ruhe ca. 0,5 Liter pro Tag, kann jedoch durch eine Steigerung der Aktivität der Schweißdrüsen, z. B. durch eine Körpertemperaturerhöhung oder durch körperliche Aktivität, auf das mehr als Zehnfache dieses Wertes ansteigen (Forslind B et al., 1997).

#### **Messung des TEWL**

In physikalischem Sinne baut sich aufgrund der Diffusion von Wasser aus dem Körperinneren durch die Epidermis ein Druckgradient auf. Der Diffusionsmassenstrom kann als transepidermaler Wasserverlust (TEWL) gemessen werden. Das Prinzip der Messung des TEWL beruht auf einer Diffusionsformel, welche von dem Fick'schen Diffusionsgesetz (zitiert in Gobrecht et al. (Gobrecht A, 1990)) abgeleitet wird:

$$\frac{\Delta Q}{\Delta t} = - \frac{D \cdot A}{l} \cdot \Delta c$$

Der Quotient  $\Delta Q/\Delta t$  gibt dabei die Diffusionsgeschwindigkeit (Anzahl der diffundierenden Moleküle pro Zeiteinheit) an,  $D$  ist der substanzabhängige Permeabilitätskoeffizient,  $A$  die Austauschfläche,  $l$  die Diffusionsstrecke und  $\Delta c$  die Konzentrationsdifferenz an der Grenzfläche (Berkowitz BA & Katzung BG, 2001). Bei dem sich ergebenden Nettoteilchenstrom in Richtung des Konzentrationsgefälles ist die Teilchenstromdichte proportional zur mittleren Geschwindigkeit und zur mittleren freien Weglänge. Abgeleitet ergibt sich hieraus folgende Formel:

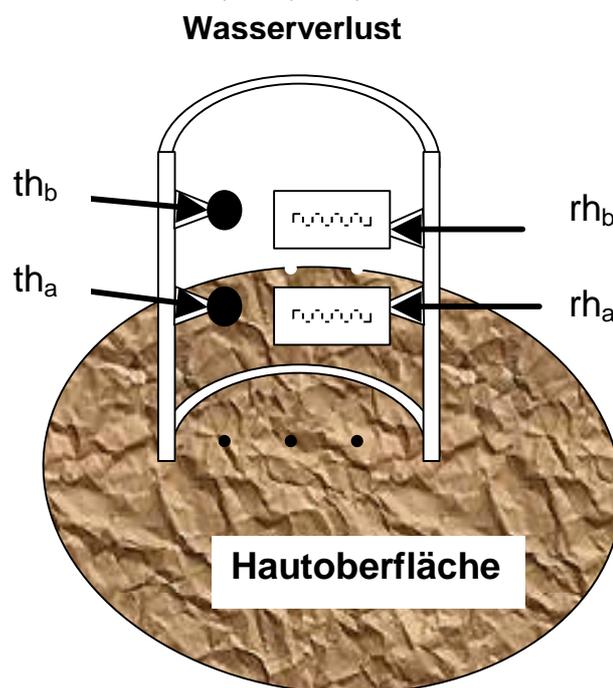
$$\frac{\Delta m}{\Delta t} = -D \cdot A \cdot \frac{\Delta s}{\Delta l}$$

Dabei gibt der Quotient  $\Delta m/\Delta t$  den Diffusionsstrom an, der die pro Zeiteinheit transportierte Masse wiedergibt (Bucks DA et al., 1988). Dieser Diffusionsstrom ist der senkrecht durchtretenen Austauschfläche  $A$  und der Dichteänderung pro Weglängeneinheit ( $\Delta \sigma/\Delta l$ ) proportional. Die Konstante  $D$  stellt hier den Diffusionskoeffizienten von Wasserdampf in Luft dar. Unter kontrollierten Meßbedingungen können für die Diffusionsstrecke bei kurzen Strecken und die Zeitdifferenz ( $\Delta l$  und  $\Delta t$ ) definierte Größen erreicht werden. Als offene Variablen in der Formel bleiben somit die diffundierte Masse an Wasser ( $\Delta m$ ) und die Dichteänderung ( $\Delta \sigma$ ). Die Dichte  $s$  kann nach dem Boyle-Mariotteschen Gesetz bei Gasen bei konstanter Temperatur auch durch Messung des Partialdruckes ersetzt werden (Bucks DA et al., 1988). Damit ergibt sich die Möglichkeit, in der Formel des Diffusionsgesetzes die diffundierende Masse an Wasser aus der Änderung des Partialdampfdruckes  $\Delta p_{\text{part}}$  zu bestimmen. Der Partialdampfdruck  $\Delta p_{\text{part}}$  ergibt sich aus dem Produkt der relativen Feuchtigkeit ( $rh$ ) und dem gesättigten Dampfdruck  $\Delta p_{\text{ges}}$ , wobei eine Abhängigkeit von der Temperatur ( $th$ ) besteht:

$$\Delta p_{\text{part}} = rh \cdot \Delta p_{\text{ges}}(th)$$

Zur Erfassung des Partialdruckes müssen daher die relative Luftfeuchtigkeit und die Temperatur zuvor gemessen werden. Aus der Messung der Partialdampfdrücke zweier benachbarter Meßpunkte kann ein Partialdampfdruckgradient errechnet werden (Bucks DA et al., 1988).

Nach diesem Prinzip erfolgt die Messung des TEWL mittels Evaporimetrie. In einem Zylinder aus Polytetrafluorethylen (Höhe 20 mm, Innendurchmesser 10 mm), welcher auf die Hautoberfläche aufgesetzt wird, sind jeweils zwei Sensorenpaare (Hygro- und Thermosensoren) in unterschiedlichem Abstand zur Hautoberfläche (ca. 3 mm und 9 mm) angebracht, die jeweils die Temperatur ( $th$ ) und die relative Luftfeuchtigkeit ( $rh$ ) erfassen.



**Abbildung 1.4:** Schematische Darstellung des Meßzylinders bei der TEWL-Messung

$th_a$ ,  $th_b$  = Temperatursensoren

$rh_a$ ,  $rh_b$  = Meßsensoren für die relative Luftfeuchtigkeit

Ausgehend von der Annahme, daß der Wert des Partialdampfdruckgradienten ( $\nabla p_{\text{part}}$ ) von zwei in geringem Abstand über der Hautoberfläche liegenden Meßpunkten proportional zum Partialdampfdruckgradienten zweier fiktiver Punkte innerhalb der Diffusionszone (d. h. innerhalb der Epidermis) ist, kann somit durch Messung des Partialdampfdruckgradienten an diesen beiden Meßpunkten in der Sonde knapp oberhalb der Hautoberfläche auf die Menge des Wasserverlustes ( $\Delta m$ ) durch die Epidermis geschlossen werden. Erstmals eingesetzt wurde dieses Meßprinzip durch Nilsson in 1977 (Nilsson GE, 1977).



**Abbildung 1.5:** Meßsonde des Tewameter TM 210® (Courage + Khazaka /Köln) –  
Aufsicht

Aus den durch die Meßsonde erhobenen Partialdampfdruckgradienten wird automatisch durch einen angeschlossenen Mikroprozessor der TEWL errechnet. Die Angabe erfolgt in  $\text{g}/\text{m}^2\text{h}$ . Weiterentwickelt wurde dieses Verfahren durch die schwedische Firma Servomed und durch die deutsche Firma Courage+Khazaka GmbH.



**Abbildung 1.6:** Tewameter TM 210® (Courage + Khazaka /Köln)

### **Einflußfaktoren auf die TEWL-Messung**

Aus einer Reihe hautphysiologischer Studien sind verschiedene Faktoren bekannt, welche einen Einfluß auf die Messung des TEWL haben und daher berücksichtigt werden sollten. Im folgenden werden die wichtigsten Einflußfaktoren auf die TEWL-Messung diskutiert.

#### ***Anatomische Region***

Die Abhängigkeit des Basis-TEWL, d. h. des TEWL auf klinisch gesunder, unbehandelter Haut, von der Lokalisation ist durch die unterschiedliche Hautbeschaffenheit zu erklären, insbesondere durch Unterschiede in der Anzahl der ekkrinen Schweißdrüsen und der Dicke und Struktur des Stratum corneum (Schwindt DA et al., 1998; van Neste D & de Brouwer B, 1992). Auch die Einwirkung verschiedener Umwelteinflüsse (z. B. UV-Bestrahlung) spielt dabei eine Rolle (Fluhr JW et al., 2001). Die höchsten TEWL-Meßwerte finden sich an den Handinnenflächen und Fußsohlen, die niedrigsten an der Rückenhaut. Die Ergebnisse verschiedener Studien zeigen zusammenfassend eine Abnahme des TEWL in angeführter Reihenfolge: Handinnenflächen > Fußsohle > Stirn = Postaurikularregion = dorsale Hand = Nagel > Unterarm

(Beugeseite > Streckseite) = Oberarm = Oberschenkel = Thorax > Abdomen > Rücken (Cua AB et al., 1990; Henry F et al., 1997; Pinnagoda J et al., 1990). Eine Studie von Lotte et al. konnte eine Abnahme des TEWL in folgender Reihenfolge nachweisen: Stirn > Postaurikularregion > Abdomen > Unterarmbeugeseite (Lotte C et al., 1987). Zwischen rechter und linker Körperhälfte waren keine signifikanten Unterschiede zu erkennen (Oestmann E et al., 1993; Pinnagoda J et al., 1990). Eine Studie von Panisset et al. zeigte keine signifikanten TEWL-Unterschiede zwischen sieben unterschiedlichen Meßorten an der Unterarmbeugeseite, mit Ausnahme einer Region nahe des Handgelenkes (Panisset F et al., 1992). Nur geringe Unterschiede waren in einer Studie von van der Valk et al. bezüglich verschiedener Meßorte am Unterarm nachweisbar (van der Valk PG & Maibach HI, 1989). In den meisten Studien wurde die Unterarmbeugeseite oder der Rücken als Testort gewählt.

### ***Intra- und interindividuelle Variabilität***

Angaben bezüglich intraindividuelle Schwankungen der TEWL-Meßwerte bei wiederholten Messungen reichen in der Literatur von 11 % (Blichmann CW & Serup J, 1987) bis unter 1 % (Oestmann E et al., 1993). Dabei sind jedoch auch die unterschiedlichen Studienbedingungen (Meßplatz, Meßgerät) zu berücksichtigen. Ähnlich große Unterschiede in den TEWL-Schwankungen fanden sich in diesen Studien auch bezüglich der interindividuellen Schwankungen der TEWL-Meßwerte mit 31-57 % bei Blichmann und Serup (Blichmann CW & Serup J, 1987), im Vergleich zu 18-20 % bei Oestmann et al. (Oestmann E et al., 1993). Auch Lammintausta et al. konnten hohe interindividuelle Schwankungen aufzeigen (Lammintausta K et al., 1987). In einer Studie zur intra- und interindividuellen Variabilität der TEWL-Meßwerte von Pinnagoda et al. zeigte sich bei Messungen an 5 aufeinanderfolgenden Tagen eine intraindividuelle Variabilität von etwa 20 % und eine interindividuelle Variabilität von 79 % (Pinnagoda J et al., 1989; Smit HA et al., 1990). Insgesamt ist die intraindividuelle Variabilität damit wesentlich geringer als die interindividuelle Variabilität (Agner T & Serup J, 1990). Das Verhältnis zwischen intra- zu interindividuelle Variabilität liegt bei etwa 1 : 5, sodaß die

Meßunterschiede zwischen zwei Personen zu etwa 80 % durch die interindividuelle Variabilität bestimmt werden (Pinnagoda J et al., 1989).

Bei Patienten mit einem abgeheilten atopischen Ekzem konnten keine erhöhten TEWL-Werte (sowohl basal, als auch nach epikutaner Testung mit NLS) in ekzemfreier Haut nachgewiesen werden, auch bei atopischer Disposition (Rhinokonjunktivitis allergica, allergisches Asthma bronchiale) zeigten sich keine erhöhten TEWL-Werte im Vergleich zu hautgesunden Probanden (Löffler H & Effendy I, 1999). Bei Patienten mit aktivem atopischem Ekzem waren hingegen die TEWL-Werte nach epikutaner NLS-Testung signifikant erhöht, auch die basalen TEWL-Werte zeigten eine Tendenz zu höheren TEWL-Werten als in der hautgesunden Vergleichsgruppe (Löffler H & Effendy I, 1999). Beispielhaft zeigten Tupker et al., daß die Hautreaktion von Atopikern auf NLS mit dem Schweregrad des Ekzems zu korrelieren scheint (Tupker RA et al., 1995). In einigen Studien wurden höhere basale TEWL-Werte bei Patienten mit akutem atopischem Ekzem auch in ekzemfreien Arealen nachgewiesen (Fartasch M & Diepgen TL, 1992; Werner Y & Lindberg M, 1985). In diesen Studien zeigte sich ferner - auch bei Hautgesunden - eine signifikante Korrelation zwischen erhöhten basalen TEWL-Werten und solchen nach einfacher oder wiederholter Applikation von NLS (Agner T, 1991; Pinnagoda J et al., 1989; Tupker RA et al., 1989).

### ***Alter***

Beim Erwachsenen konnten keine signifikanten Unterschiede im Basis TEWL in der Altersgruppe zwischen 20 und 60 Jahren nachgewiesen werden (Agner T, 1991). Nach dem 60. Lebensjahr wurde in mehreren Studien eine leichte Abnahme des TEWL im Vergleich zu jüngeren Erwachsenen festgestellt (Cua AB et al., 1990; Leveque JL et al., 1984; Tupker RA et al., 1989; Wilhelm KP et al., 1991). Bei Frühgeborenen im Vergleich zu Reifgeborenen zeigten sich erhöhte TEWL-Werte mit stärkerer Variabilität im Vergleich zu älteren Kindern (Hammarlund K et al., 1979; Wilson DR & Maibach HI, 1980).

## ***Geschlecht***

In einer Reihe von Studien konnten keine signifikanten Unterschiede zwischen Männern und Frauen bezüglich des Basis-TEWL nachgewiesen werden (Agner T, 1991; Effendy I et al., 1995; Lammintausta K et al., 1987; Tupker RA et al., 1990; van der Valk PG et al., 1984). Studien von Agner und Kemmet sowie Alexander zeigten bei Frauen zyklusabhängige Schwankungen der Hautempfindlichkeit mit einer Erhöhung der TEWL-Werte nach NLS-Testung kurz vor und während der Menstruation (Agner T et al., 1991; Alexander S, 1988). Auch Harvel et al. konnten erhöhte TEWL-Werte prämenstruell und eine Erniedrigung der TEWL-Werte präovulatorisch nachweisen (Harvell J et al., 1992). Dabei waren jedoch keine zyklusabhängigen Schwankungen der Basis-TEWL-Werte feststellbar, sondern lediglich eine erhöhte Irritabilität der Haut im NLS-Test, was für eine verstärkte Entzündungsreaktion spricht und nach Agner nicht als Verminderung der epidermalen WPB zu werten ist (Agner T, 1992). Das Geschlecht ist damit nicht als wesentlicher Einflußfaktor auf die TEWL-Messung in Betracht zu ziehen.

## ***Ethnische Zugehörigkeit***

Verschiedene klinische Studien zum Einfluß der Zugehörigkeit zu bestimmten ethnischen Gruppen auf den TEWL konnten keine signifikanten Unterschiede herausstellen. So fanden Gho & Chia keinen Unterschied zwischen Malaysiern, Chinesen und Indern bezüglich des Basis-TEWL (Goh CL & Chia SE, 1988). Luca et al. verglichen Afrikaner (Somalier) und Kaukasier und konnten ebenfalls keine Unterschiede herausstellen (De Luca R et al., 1984). Wilson et al. konnten keine Unterschiede in den Basis-TEWL-Werten zwischen Schwarzhäutigen und Weißhäutigen nachweisen (Wilson D et al., 1988), obwohl mikroskopische Unterschiede in der Hautbeschaffenheit vorliegen (Wilson D et al., 1988). Nach Tape-Stripping zeigten sich in einer Studie von Kompaore et al. Unterschiede im TEWL-Anstieg zwischen Schwarzhäutigen, Kaukasiern und Asiaten (Kompaore F et al., 1993), ebenso in einer Studie von Reed et al., die eine Abhängigkeit der Wasserpermeabilität vom Hauttyp aufzeigen konnten (Reed JT et al., 1995).

## ***Schweißdrüsenaktivität***

Neben der passiven Diffusion von Wasser durch die Epidermis wird der transepidermale Wasserverlust maßgeblich durch die Aktivität der Schweißdrüsen bestimmt. Diese ist abhängig von der Körpertemperatur und dem Aktivitätszustand des Körpers. Auch die psychische Belastung spielt eine Rolle, das „emotionale Schwitzen“ tritt maßgeblich an Handinnenflächen, Fußsohlen und Axillen auf (Baker H & Kligman AM, 1967; Pinnagoda J et al., 1989). Es bestehen verschiedene pharmakologische Möglichkeiten, die Aktivität der Schweißdrüsen auszuschalten, u. a. durch Einnahme von Parasympatholytika, z. B. Scopolamin oder okklusiver topischer Anwendung von Scopolaminhydrobromid bzw. anderer anticholinergischer Substanzen (Hexopyrroniumbromid) über 1-3 Stunden. Hierunter kommt es zur nahezu vollständigen Suppression der Schweißdrüsenaktivität (Baker H & Kligman AM, 1967). Es können jedoch eine Reihe von Nebenwirkungen auftreten, die möglicherweise ihrerseits die TEWL-Messung ungünstig beeinflussen (Pinnagoda J et al., 1989). Ausgehend von der Beobachtung, daß in körperlicher Ruhe die Schweißdrüsen nur bei einer Umgebungstemperatur von über 28 °C aktiv sind, ist eine Ruhephase von 20-30 Minuten bei einer Umgebungstemperatur von ca. 20-22 °C ausreichend, um den Einfluß der Schweißdrüsenaktivität weitgehend auszuschalten (Pinnagoda J et al., 1989).

## ***Hautdurchblutung***

Studien mit vasoaktiven Substanzen konnten im physiologisch relevanten Bereich keinen eindeutigen Einfluß von Vasokonstriktion bzw. Vasodilatation der dermalen Hautgefäße auf den TEWL nachweisen (Pinnagoda J et al., 1990). Alkohol- oder coffeinhaltige Getränke sowie Zigaretten sollten dennoch vor den Messungen vermieden werden (Rogiers V, 2001). Der Einfluß vasodilatierender Medikamente (z. B.  $\beta$ -Rezeptorenblocker, Nitrate, Calciumkanal-Blocker, systemische Kortikosteroide und systemische Retinoide) wird kontrovers diskutiert (Reiche L et al., 1998).

## ***Hautoberflächen- und Umgebungstemperatur***

Die Hautoberflächentemperatur stellt einen der wichtigsten Einflußfaktoren auf den TEWL dar. Grice et al. konnten zeigen, daß der Basis-TEWL exponentiell mit der Hautoberflächentemperatur ansteigt (Grice K & Bettley FR, 1967). Daraus ergibt sich eine Verdoppelung des Basis-TEWL bei einer Erhöhung der Hautoberflächentemperatur um 7-8 °C. Um den Einfluß der Hautoberflächentemperatur so weit wie möglich zu reduzieren, sollte die Hautoberflächentemperatur in einem Bereich von etwa 28-32 °C konstant gehalten werden (Grice K et al., 1975; Hammarlund K et al., 1979; Mathias CG et al., 1981; Pinnagoda J et al., 1990). Da die Umgebungstemperatur durch Konvektion, aber auch indirekt über die Beeinflussung thermoregulatorischer Mechanismen einen Einfluß auf die Hautoberflächentemperatur hat, sollte auch hier auf konstante Temperatur geachtet werden. Bei einer Umgebungstemperatur von 20-22 °C liegt die Hautoberflächentemperatur in Ruhe bei ca. 28-32 °C und damit in einem Intervall, in dem Temperaturschwankungen keinen entscheidenden Einfluß auf den TEWL besitzen. Auch die Schweißdrüsenaktivität ist in diesem Temperaturintervall nach einer entsprechenden Ruhephase vernachlässigbar gering (Agner T & Serup J, 1990; Lamke LO et al., 1977; Pinnagoda J et al., 1989).

## ***Luftfeuchtigkeit***

Neben der Hautoberflächen- und Umgebungstemperatur wird der Hydratationszustand der Haut u. a. auch wesentlich durch die Luftfeuchtigkeit bestimmt. Der Hydratationszustand wiederum beeinflusst maßgeblich den TEWL, da die Permeabilität für eine Reihe verschiedener Substanzen mit steigendem Wassergehalt der Haut zunimmt (Kalia YN et al., 1996; Pirot F et al., 1997). Dabei ist die Beziehung zwischen der Luftfeuchtigkeit und dem TEWL nicht linear, sondern zeigt einen anfänglichen Anstieg, bei weiterer Zunahme der Luftfeuchtigkeit nimmt die Aufnahmekapazität des Stratum corneum immer weiter ab, sodaß der TEWL-Anstieg immer geringer ausfällt (Pinnagoda J et al., 1990).

Nach den Empfehlungen der Deutschen Kontaktallergie-Gruppe (DKG), einer Arbeitsgruppe der Deutschen Dermatologischen Gesellschaft (DDG), sollte die Luftfeuchtigkeit bei TEWL-Messungen konstant bei ca. 40 % liegen, am sichersten kontrolliert durch eine Klimaanlage (Brasch J et al., 1999). Falls diese technischen Voraussetzungen nicht gewährleistet sein sollten, ist die Angabe der Luftfeuchtigkeit bei vergleichenden Studien unbedingt erforderlich (Pinnagoda J et al., 1990).

### ***Luftzug***

Luftbewegungen beeinflussen eine gleichmäßige Ausbildung des Partialdampfdruckgradienten an der Hautoberfläche und führen daher zu starken Schwankungen in den Meßergebnissen des TEWL. Auch geringe Luftbewegungen, z. B. durch das Öffnen oder Schließen von Türen oder Fenstern, vorbeigehende Personen, Atmen oder Sprechen über der Meßsonde, und Zugluft einer Klimaanlage führen bereits zu Luftturbulenzen im Meßzylinder und sollten daher während der Messungen vermieden werden (Pinnagoda J et al., 1990). Um diese Meßfehler zu minimieren, sollten die Messungen in einem geschlossenen Raum erfolgen. Es besteht auch die Möglichkeit, die Messung in speziellen Meßkammern (z. B. aus Plexiglas) durchzuführen, um so den Einfluß von Luftbewegungen zu verringern. Diese Meßkammern sollten nach oben offen sein, um einen Temperaturanstieg während der Messungen zu vermeiden (Löffler H et al., 1996).

### ***Jahreszeitliche Einflüsse***

Bei konstanten Temperatur- und Luftfeuchtigkeitsbedingungen konnten keine signifikanten jahreszeitlichen Unterschiede in den TEWL-Meßwerten erhoben werden (Agner T & Serup J, 1989). Die ohne kontrollierte Meßbedingungen zu beobachtenden Änderungen des TEWL im Winter im Vergleich zum Sommer sind daher auf Änderungen in der Umgebungstemperatur und der relativen Luftfeuchtigkeit sowie den unterschiedlichen Hydratationszustand der Haut zurückzuführen (Agner T & Serup J, 1989; Basketter DA et al., 1996; Denda M, 2001; Pinnagoda J et al., 1990). Grundsätzlich liegen bei diesbezüglich nicht

kontrollierten Meßbedingungen die TEWL-Werte nach einer entsprechenden Ruhephase im Sommer eher niedriger, da durch die höhere Luftfeuchtigkeit der Wasserdampfdruckgradient geringer ist. Durch verstärktes Schwitzen können jedoch auch erhöhte TEWL-Werte im Sommer beobachtet werden. Daher ist eine Ruhephase von mindestens 15 Minuten vor Meßbeginn dringend erforderlich. Im Winter hingegen ergibt sich durch einen höheren Wasserdampfdruckgradienten aufgrund der niedrigeren Luftfeuchtigkeit ein Anstieg des TEWL. Messungen des TEWL sollten daher möglichst entweder innerhalb einer Jahreszeit oder unter konstanten Temperatur- und Luftfeuchtigkeitsbedingungen durchgeführt werden. Tageszeitliche Schwankungen konnten nicht nachgewiesen werden (Pinnagoda J et al., 1990).

### ***Geographische Unterschiede***

Unterschiede in geographischen Umweltfaktoren, wie z. B. unterschiedliche Temperatur- und Luftfeuchtigkeitsbedingungen, Höhenunterschiede und damit Unterschiede im Wasserdampfpartialdruck, müssen (da sie auch durch eine Klimakammer nicht vollständig ausgeschaltet werden können) bei vergleichenden TEWL-Messungen in Betracht gezogen werden (Pinnagoda J et al., 1990).

### ***Gerätetechnische Einflußfaktoren***

Die Messungen sollten auf waagerechter Hautoberfläche erfolgen, um Luftbewegungen durch Konvektion aufgrund der Temperaturunterschiede zwischen Hautoberfläche und Umgebung zu verringern („Schornsteineffekt“ am stehenden Probanden). Der Anpreßdruck der Meßsonde auf die Haut sollte möglichst konstant sein. Ferner sollte die Messung erst nach Angleichung der Meßsondentemperatur an die Hautoberflächentemperatur erfolgen, da sich die Meßsonde beim Hautkontakt erwärmt, und dadurch der TEWL zunächst ansteigt. Zur Verminderung der Temperaturbeeinflussung der Meßsonde durch die Körpertemperatur des Untersuchers sind Isolierhandschuhe bei der Handhabung der Meßsonde oder der Einsatz einer speziell isolierten Klemmvorrichtung zu empfehlen (Pinnagoda J et al., 1990).

## Anwendungsbereiche des TEWL

Die Messung des TEWL wird vorwiegend bei hautphysiologischen Testungen zur Beurteilung der Integrität des Stratum corneum eingesetzt. TEWL-Werte von klinisch unauffälliger und nicht-vorbehandelter Haut, auch Basis-TEWL-Werte genannt, geben Auskunft über den Zustand der epidermalen Wasserschutzbarriere. In einer Reihe von Studien wurde versucht, den Basis-TEWL-Wert unter Berücksichtigung der dermatologischen Anamnese zu evaluieren. Für das atopische Ekzem konnte eine Erhöhung des Basis-TEWL auch auf klinisch ekzempfreier Haut als Ausdruck einer gestörten Wasserschutzbarriere im Vergleich zu Kontrollprobanden nachgewiesen werden (Agner T, 1991;1992; Fartasch M & Diepgen TL, 1992; Loden M et al., 1992; Löffler H & Effendy I, 1999; Tupker RA et al., 1990; Werner Y & Lindberg M, 1985). In einer Studie von Basketter et al. zeigten sich hingegen keine erhöhten basalen TEWL-Werte bei Atopikern ohne derzeitige akute Ekzeme im Vergleich zu Hautgesunden (Basketter DA et al., 1998). Für andere dermatologische Erkrankungen konnte eine solche Korrelation nicht gezeigt werden (Berardesca E et al., 1990). In verschiedenen Studien bei Probanden mit Handekzemen in der Anamnese zeigte sich kein signifikant erhöhter Basis-TEWL (Agner T, 1991). Dabei erfolgte jedoch keine genauere Differenzierung bezüglich der Ekzemanamnese.

Weitaus häufiger findet die Messung des TEWL Anwendung in der Beurteilung von Hautreaktionen bei Irritationstestungen. Dabei stehen eine Reihe unterschiedlicher Irritantien, meist Detergentien, zur Verfügung. Am aussagekräftigsten erscheinen Testungen mit dem Irritans Natriumlaurylsulfat, welches eine konzentrationsabhängige Steigerung des TEWL hervorruft (Agner T & Serup J, 1990; Aramaki J et al., 2001; Welzel J et al., 1998). Diskutiert wurde der prädiktive Wert der Basis-TEWL-Werte auf das Ausmaß der zu erwartenden Hautreaktion auf NLS. Tupker et al. und auch Pinnagoda et al. fanden eine lineare Assoziation zwischen erhöhtem Basis-TEWL-Wert und deutlich erhöhtem TEWL-Wert nach NLS-Exposition im Vergleich zu Testpersonen mit niedrigerem Basis-TEWL (Agner T, 1991; Pinnagoda J et al., 1989; Tupker RA et al., 1989; Wilhelm KP et al., 1990). Im Gegensatz dazu stehen die Ergebnisse einer Studie an Metallarbeitern von Berndt et al., bei der

kein prädiktiver Wert des Basis-TEWL im Vergleich zu den TEWL-Werten nach erfolgter epikutaner Testung mit NLS nachweisbar war (Berndt U et al., 1999).

Auch bei Irritationstestungen mit Natriumhydroxid (NaOH) wurden TEWL-Messungen zur Beurteilung der Testreaktionen eingesetzt, die zu beobachtende Erhöhung des TEWL war jedoch wesentlich schwächer als bei NLS (Malten KE & Thiele FA, 1973; van der Valk PG et al., 1985). Eine Reihe weiterer Substanzen, z. B. Phenol, Benzalkoniumchlorid (Park KB & Eun HC, 1995; van der Valk PG et al., 1985), Ammoniumhydroxid (Frosch PJ & Kligman AM, 1977), Dimethylsulfoxid (DMSO) (Hinnen U et al., 1995), Dodecyltrimethylammonium-bromid (DTAB) (Effendy I & Maibach HI, 1995), Toluene (Wigger-Alberti W et al., 2000), Nonanionic acid (Agner T & Serup J, 1989; Reiche L et al., 1998) und Popylenglykol (Willis CM et al., 1989) kamen zum Einsatz. Im Vergleich dazu waren bei NLS-Testungen bereits Erhöhungen des TEWL bei Barrierschädigungen im subklinischen Bereich nachweisbar (Agner T & Serup J, 1990).

Aber auch die Einwirkung mechanischer Faktoren - wie z. B. eine Barriestörung aufgrund einer Verdünnung des Stratum corneum (z. B. durch einen Klebefilmabriß), die bereits ohne Einwirken eines chemischen Irritans zu einer Erhöhung des transepidermalen Wasserverlustes führt - kann so erfaßt werden (Baker H & Kligman AM, 1967; Proksch E et al., 1996; Schwindt DA et al., 1998).

#### **1.4.2. Corneometrie**

Zur Erfassung der relativen Hornschichtfeuchte stehen verschiedene Methoden zur Verfügung, die über unterschiedliche Verfahren Veränderungen der elektrischen Eigenschaften bestimmen: Leitfähigkeit, elektrischer Widerstand (Impedanz) und Kapazität. Zur Erfassung des Feuchtigkeitsgehaltes der obersten Hautschichten werden bei der Corneometrie zwei unterschiedliche Testverfahren eingesetzt: Der Skicon 100 Hydrometer mißt die elektrische Leitfähigkeit der Haut durch eine Änderung des Widerstandes gegen einen hochfrequenten Strom (3,5 MHz) zwischen zwei konzentrisch angeordneten

Elektroden auf der Haut. Die Angabe erfolgt in  $1/\mu\text{Ohm}$  (Blichmann CW & Serup J, 1988). Die Corneometer nutzen hingegen das kapazitive Verfahren zur Erfassung des Wassergehaltes des Stratum corneum der Haut und bedienen sich dabei der hohen dielektrischen Konstante von Wasser. Der Wassergehalt der oberen Hautschichten, besonders des Stratum corneum, führt dabei zu Veränderungen der elektrischen Leitfähigkeit (Berardesca E et al., 2002). In mehreren Studien konnte ein Einfluß der Hydratation des Stratum corneum auf die intracorneale Membranfluidität nachgewiesen werden (Alonso A et al., 1996; Treffel P & Gabard B, 1995).

Die beiden beschriebenen Verfahren zur Erfassung der Hautdurchfeuchtung eignen sich für unterschiedliche Meßtiefen und Hydratationsstärken. So scheint die Erfassung des Wassergehaltes ganz oberflächlicher Schichten des Stratum corneum und hoher Hydratationszustände besser mit dem Skicon 100 Hydrometer möglich (Blichmann CW & Serup J, 1988). Die Corneometer erfassen Änderungen der Hydratation bis in eine Eindringtiefe von 0,1 mm und scheinen besser geeignet in der Evaluation erniedrigter Hydratationszustände (Blichmann CW & Serup J, 1988; Courage&Khazaka, 2000).

### **Messungen mit dem Corneometer**

Die Messungen in dieser Studie erfolgten mit dem Corneometer CM 820 der Firma Courage & Khazaka (Köln). Die Meßsonde, welche einen Durchmesser von ca. 12 mm hat, arbeitet als Kondensator, dessen Kapazität sich durch Einbringen der zu messenden Probe in das sich ausbildende elektrische Feld bei Kontakt mit der Meßsonde ändert (Courage&Khazaka, 2000). Bei der Messung wird die Meßsonde mit einem standardisierten Anpreßdruck von ca. 3,5 N über eine Feder im Sondenkopf senkrecht auf die Hautoberfläche aufgesetzt. In der Meßsonde befinden sich feine Kondensatorplatten in Form mehrerer feiner Goldspulen, die von der Hautoberfläche nur durch ein sehr feines Glasplättchen getrennt sind. Zwischen den Spulen baut sich konzentrisch ein elektrisches Feld mit wechselseitiger Anziehungskraft parallel zur Hautoberfläche angeordnet auf, welches die obersten Schichten des Stratum corneum durchdringt (Courage&Khazaka, 2000).



**Abbildung 1.7:** Meßsonde des Corneometer CM 820 (Courage & Khazaka/Köln)

Die Meßtiefe beim Corneometer CM 820 wird mit ca. 30 – 100 µm in einer Studie von Wilhelm et al. angegeben (Wilhelm KP et al., 1993). Organische Stoffe, wie z. B. die Proteinbestandteile des Stratum corneum wirken dabei als elektrische Isolatoren (Dielektrizitätszahl kleiner 7). Die elektrische Leitfähigkeit dieser Materialien ist daher im wesentlichen durch ihren Gehalt an Wasser beeinflusst, das eine hohe dielektrische Konstante besitzt (Dielektrizitätszahl 81) (Courage&Khazaka, 2000; Wilhelm KP et al., 1993). Ist das Meßobjekt sehr wasserhaltig, äußert sich das in einem hohen Wert. Nach ca. 1 Sekunde gibt ein akustisches Signal den Abschluß der Messung an, der Wert erscheint im digitalen Display. Der Wert wird in arbiträren Anzeige-Einheiten (AE) angegeben. Zur Erfassung der Hautdurchfeuchtung sollte der Mittelwert aus drei Messungen an unterschiedlichen Arealen gewählt werden mit Abständen von ca. 5 Sekunden, um Okklusionseffekte durch die Meßsonde an sich zu vermeiden (Courage&Khazaka, 2000). Das Corneometer CM 820 der Firma Courage & Khazaka weist eine Meßgenauigkeit von  $\pm 2,6$  AE auf (Courage&Khazaka, 2000).



**Abbildung 1.8:** Corneometer CM 820 (Courage & Khazaka/Köln)

### **Einflußfaktoren auf die Corneometrie**

Neben der relativen Durchfeuchtung des Stratum corneum beeinflussen ferner eine Reihe verschiedener Faktoren die Kapazitätsmessungen: Anpreßdruck der Sonde an die Hautoberfläche, Hautstruktur und Hautturgor, anatomische Region (geringste intraindividuelle Variabilität an der Unterarminnenseite), Dicke des Stratum corneum, Behaarung (Anzahl der Haarfollikel in dem Meßareal) (Loden M et al., 1995), Schuppung, oberflächlicher Lipidgehalt, Haut- und Umgebungstemperatur, Luftfeuchtigkeit, Jahreszeit (geringerer Hydratationszustand des Stratum corneum im Winter), Schweißdrüsenaktivität, Alter (Abnahme des Hydratationszustands mit zunehmendem Alter) sowie Vorbehandlung mit Externa (Gollhausen R, 1992). Ein Einfluß des Geschlechts auf die Corneometrie-Meßwerte konnte nicht beobachtet werden (Wilhelm KP, 1995).

## **Anwendungsbereiche der Corneometrie**

Die Erfassung der Hydratation der oberflächlichen Hautschichten spielt neben dem Einsatz bei hautphysiologischen Testungen inzwischen zunehmend eine Rolle bei der Prüfung kosmetischer Produkte. Neben der Testung von Hautschutzcremes (Ramsing DW & Agner T, 1997; Wigger-Alberti W et al., 1998) wird die Corneometrie besonders in der Testung der regenerationsfördernden Eigenschaften von Hautcremes eingesetzt (Loden M, 1997). Zur Überprüfung der Hautverträglichkeit von Feuchtigkeitscremes, Syndets und anderen Produkten findet sie ihre Anwendung in der kosmetischen Industrie (Rogiers V, 2001).

Die Messung der Hautdurchfeuchtung mit dem Corneometer erscheint in Bezug auf die Reproduzierbarkeit der Meßergebnisse genauer als Messungen mittels Änderungen der elektrischen Leitfähigkeit (Blichmann CW & Serup J, 1988). Aufgrund der hohen intraindividuellen Variation ist der Einsatz der Corneometrie zur Quantifizierung irritativer Epikutantestreaktionen umstritten (Agner T & Serup J, 1990). Diskutiert wurden die hohe Störanfälligkeit und z.T. geringe Reproduzierbarkeit der Meßergebnisse sowie paradoxe Meßergebnisse nach Irritation (Gollhausen R, 1992).

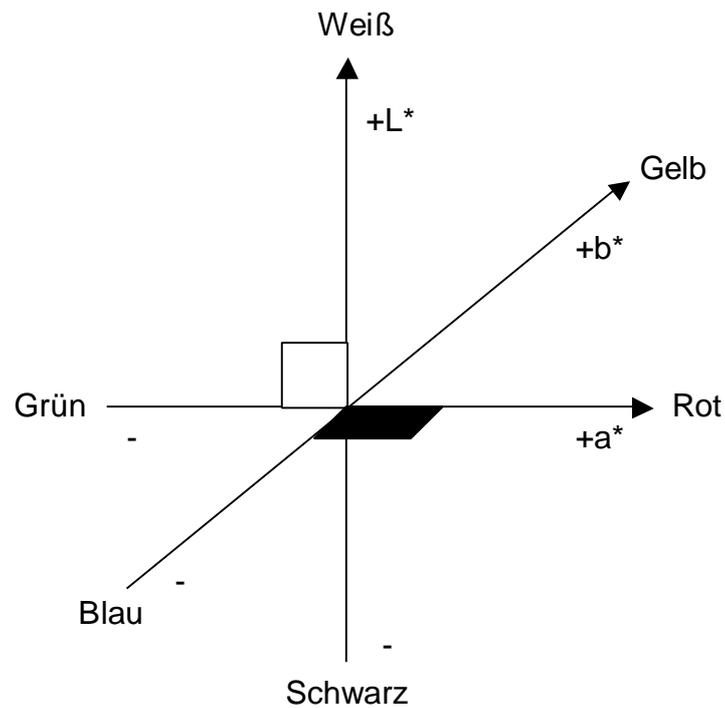
### **1.4.3. Colorimetrie**

#### **Messungen zur Farbestimmung der Haut**

Die Farbe sowie Farbänderungen der Haut stellen ein wesentliches Beurteilungskriterium in der Bewertung von Hautreaktionen dar. Neben der visuellen Beurteilung mit großen individuellen Unterschieden in der Farbwahrnehmung des menschlichen Auges und Gehirnes und der Terminologie der Farbbeschreibungen stehen zwei Verfahren zur objektiven Farbestimmung der Haut zur Verfügung: die Spektrophotometrie und die Colorimetrie.

Die Spektrophotometrie erfaßt die Absorption und Reflexion von Licht von der Haut in einem Wellenlängenbereich von 400-800 nm unter Verwendung einer grünen und einer roten LED (light emitting diode) sowie einer Photodiode zur Erfassung des von der Haut reflektierten Lichtes (Clarys P et al., 2000). Dabei erlauben die so gewonnen Meßwerte keine eindeutige Zuordnung zu einer bestimmten Farbe, da die beiden wichtigsten Chromophoren der Haut, Melanin und Hämoglobin, Licht in einem ähnlichen Wellenlängenspektrum absorbieren. Melanin überlagert durch sein breites Absorptionsspektrum die spezifischen Absorptionsspektren von Hämoglobin (Fullerton A et al., 1996). Unspezifische Hautveränderungen, z. B. verstärkte Schuppung der Haut, zeigen einen deutlichen Einfluß auf diese Meßmethode (Fullerton A et al., 1996). Zudem ist die Messung aufwendig. Neuere Geräte ermöglichen die spezifische Erfassung der Hämoglobin-Absorptionsspektren und somit eine Auswertung in Relation zur Melanin-Absorption (Diffey BL et al., 1984).

Die Colorimetrie erfaßt die Hautoberflächenfarbe unter Berücksichtigung des Farbtones (d. h. der Grundfarben Rot, Grün und Gelb) der Helligkeit und der Farbsättigung (d. h. der Leuchtkraft der Farbe). Diese drei Komponenten fanden in einem von der Commission Internationale de l'Eclairage (CIE) entwickelten standardisierten, dreidimensionalen System Ausdruck (Fullerton A et al., 1996). Hier liegt in der waagerechten Ebene der Farbton entsprechend dem Farbkreis mit einer gleichzeitigen Abnahme der Sättigung zur dritten Achse hin. Dabei beruht die Achse  $a^*$  auf einer Rot-Grün-Messung, die Achse  $b^*$  auf einer Gelb-Blau-Messung. In der senkrechten Achse liegt der Wert für die Helligkeit (luminance,  $L^*$ ) zwischen Schwarz und Weiß. Diese Darstellung berücksichtigt die nicht-lineare Farbwahrnehmung des menschlichen Auges und Gehirnes (Fullerton A et al., 1996).



**Abbildung 1.9:** Dreidimensionales Farbsystem nach der Commission Internationale de l'Eclairage (CIE)

Die Colometrie-Werte zeigen daher eine hohe Korrelation mit der visuellen Auswertung der Testreaktion (Serup J & Agner T, 1990). Bei der Messung mit dem Tristimulus-Chromameter dient als Lichtquelle eine Xenon-Blitzlampe, die gepulst betrieben weißes Licht des gesamten sichtbaren Spektrums aussendet (Fullerton A et al., 1996). Das Meßfeld hat einen Durchmesser von ca. 8 mm.



**Abbildung 1.10:** Meßfeld des Chromameters CR 300® der Firma Minolta (Japan)

Sowohl das emittierte als auch das von der Hautoberfläche reflektierte Licht wird durch Photozellen gemessen, und die daraus ermittelte Farbe wird als Punkt in dem dreidimensionalen Farbsystem ( $L^*$ ,  $a^*$ ,  $b^*$ ) dargestellt (Fullerton A et al., 1996). Die Helligkeit ( $L^*$ ) wird dabei als Wert zwischen Weiß (-) und Schwarz (+) angegeben,  $a^*$  als Wert zwischen Grün (-) und Rot (+) und  $b^*$  als Wert zwischen Blau (-) und Gelb (+). Das Meßsystem erfaßt Farbton, Sättigung und Helligkeit numerisch als Absolutwert. Vor der Messung erfolgt jeweils eine Kalibrierung mit einer standardisierten weißen Fliese (Minolta, Osaka/Japan). Bei der Messung wird das Meßfeld vorsichtig vertikal zur Hautoberfläche ohne Ausübung von Druck aufgesetzt und die Blitzlampe ausgelöst. Die Messung erfolgt automatisch. Nach ca. 10-15 Sekunden wird der Meßwert im angeschlossenen Computerplatz in Form von Anzeige-Einheiten (AE) angegeben (Fullerton A et al., 1996). Die Meßabweichung kann laut Herstellerangaben bis zu 0,15 AE betragen (Minolta Co. L, 2000).



**Abbildung 1.11:** Chromameter CR 300® der Firma Minolta (Japan)

Bei der Beurteilung irritativer Hautreaktionen erscheint insbesondere die Erfassung des Erythems, d. h. der Hautrötung und damit des  $a^*$ -Wertes in der Colorimetrie von Bedeutung. Eine Reihe von Studien konnten eine eindeutige Beziehung zwischen der Konzentration der Testsubstanz NLS und den erfaßten  $a^*$ -Werten (Agner T & Serup J, 1990; Wilhelm KP et al., 1989) sowie der Änderung der Hautfarbe ( $\Delta E^*$ ) nach Irritation (Wilhelm KP et al., 1989) zeigen. In verschiedenen Studien wird eine intraindividuelle Variationsbreite zwischen

1,9 % und 4,7 % angegeben (Fullerton A et al., 1996; Seitz JC & Whitmore CG, 1988; Serup J & Agner T, 1990). Wilhelm et al. konnten eine signifikante, lineare Korrelation zwischen der Änderung der Hydratation des Stratum corneum und der Ausbildung einer Hautrötung (erfaßt durch den  $a^*$ -Wert in der Colorimetrie) nach okklusiver kurzzeitiger Applikation von NLS-Lösungen unterschiedlicher Konzentration über 1-5 Minuten nachweisen (Wilhelm KP et al., 1993). Agner konnte eine signifikante Korrelation der basalen  $L^*$ -Werten mit der nachfolgenden Hautreaktion nach okklusiver Applikation von NLS 0,5 % über 24 Stunden zeigen (Agner T, 1991). Hier bestand ein signifikanter statistischer Zusammenhang zwischen einer erhöhten basalen Lichtreflexion und einer erhöhten Empfindlichkeit gegenüber NLS (Agner T, 1991).

### **Einflußfaktoren auf die Colorimetrie**

Da die intrainstrumentelle Variabilität bei wiederholten Messungen mit dem Minolta-Chromameter als gering beurteilt wurde (Wilhelm KP & Maibach HI, 1989), ist vor allem von einem Einfluß geräteunabhängiger Faktoren auf die Messung auszugehen:

- Anatomische Region: Es wurden höhere  $a^*$ -Werte an der Gesichtshaut, Nacken, Handinnenflächen und Fußsohlen gemessen als am Rumpf (Fullerton A et al., 1996). Bei den  $L^*$ -Werten zeigten sich höhere Werte am Rumpf und den Oberarminnenseiten, niedrigere  $L^*$ -Werte an der Gesichtshaut, Nacken und Händen (Fullerton A et al., 1996). Behaarte Areale (behaarte Kopfhaut, Bartbereich) sowie stärkere Schuppung scheinen ebenfalls die Meßwerte zu beeinflussen (Takiwaki H et al., 1994). Auch eine Vorbehandlung mit Cremes oder Kosmetika führt zu einer Änderung der Chromametrie-Werte (Seitz JC & Whitmore CG, 1988). Bei den  $b^*$ -Werten zeigte sich eine Abhängigkeit von der UV-Exposition mit niedrigeren Werten in Arealen mit hoher UV-Belastung (Seitz JC & Whitmore CG, 1988).
- Alter: Bezüglich des Alters konnten signifikant niedrigere basale  $a^*$ -Werte in einer Gruppe von 66-73jährigen Probanden als in einer Gruppe von

18-65jährigen Probanden bei Messungen an der Rückenhaut nachgewiesen werden (Fullerton A et al., 1996). Bei der Beurteilung des Einflusses des Geschlechtes auf die Chromametrie zeigten sich niedrigere  $a^*$ -Werte bei Frauen in Messungen an den Unterarmbeugeseiten als bei Männern (Fullerton A et al., 1996). Unterschiede bestehen auch in der Anwendung der Chromametrie bei den verschiedenen ethnischen Gruppen, da bei Dunkelhäutigen die Bestimmung des Erythem-Index durch den Einfluß des höheren Melaningehaltes der Haut erschwert wird (Fullerton A et al., 1996). Jahreszeitliche Einflüsse durch Bräunung im Sommer und Xerosis cutis besonders in den Wintermonaten wurden ebenfalls beschrieben (Fullerton A et al., 1996).

- Körperliche Aktivität: Diese führt zu einer Zunahme der Hautdurchblutung und hat damit einen erheblichen Einfluß auf die Hautfarbe. Streßsituationen und eine Erhöhung der Aktivität des Sympathikus gehen mit einer Vasokonstriktion einher und können dadurch zu einer deutlichen Änderung der Hautdurchblutung und damit auch der Hautfarbe führen, ebenso Nikotin, Koffein und verschiedene Medikamente aber auch topische Glucocorticoide (Fullerton A et al., 1996). Alkohol wirkt gefäßerweiternd (Fullerton A et al., 1996). Orthostatische Effekte führen zu einer Zunahme der  $L^*$ - und  $b^*$ -Werte und einer Abnahme der  $a^*$ -Werte beim Anheben des Armes. Daher sollte bei Messungen am Unterarm dieser in eine horizontale Position gebracht werden. Dabei spielen nicht nur Veränderungen der Durchblutung, sondern auch Änderungen der Sauerstoffsättigung des Hämoglobins eine Rolle (Fullerton A et al., 1996). Vor Meßbeginn sollte ein Intervall von mindestens 5 Minuten bei unbedeckter Teststelle in Ruhe eingehalten werden (Fullerton A et al., 1996).
- Intraindividuelle Reproduzierbarkeit und interindividuelle Unterschiede: Die Werte bei wiederholten Messungen an einem Tag bei derselben Person zeigten nur geringe Abweichungen, bei Messungen an mehreren aufeinanderfolgenden Tagen jedoch höhere Abweichungen (Wilhelm KP & Maibach HI, 1989). Die interindividuellen Unterschiede erscheinen

hingegen groß (Agner T, 1991). Tageszeitliche Schwankungen mit einem Anstieg der  $a^*$ -Werte im Laufe des Tages und einer Abnahme der  $L^*$ - und  $b^*$ -Werte wurden beobachtet (Fullerton A et al., 1996).

- Umgebungstemperatur: Da die Umgebungstemperatur, die Hautoberflächen- sowie die Körperkerntemperatur einen großen Einfluß auf die Hautdurchblutung haben (Fullerton A et al., 1996), sollten Messungen bei einer Umgebungstemperatur von 19-23 °C erfolgen. Eine direkte Besonnung ist zu vermeiden (Fullerton A et al., 1996).
- Anpreßdruck: Zu großer Anpreßdruck des Instrumentes bei der Messung sollte vermieden werden, da es hierbei zu einer Zunahme der  $a^*$ -Werte und einer Abnahme der  $L^*$ -Werte kommen kann, vermutlich in erster Linie durch Kompression kleinster Venolen bei ungestörtem arteriellem Blutzustrom (Fullerton A et al., 1996). Auch der Aufsetzwinkel des Gerätes auf die Haut beeinflusst die Messung (Fullerton A et al., 1996). Daher sollte das Gerät vertikal zur Hautoberfläche mit konstantem, geringem Druck aufgesetzt werden. Bei wiederholten Messungen sollte der Meßkopf von der Haut abgehoben und wieder neu plziert werden (Fullerton A et al., 1996).

### **Anwendungsbereiche der Colorimetrie**

Bestimmungen der Hautoberflächenfarbe sowie ihre Veränderungen stellen ein wichtiges Beurteilungskriterium bei der Erfassung von Hautreaktionen dar. Dabei nimmt die Erythemmessung eine besondere Stellung ein. Neben ihrem Einsatz bei hautphysiologischen Testungen mit Irritantien (Agner T & Serup J, 1990; Wilhelm KP et al., 1989) findet sie auch Anwendung in der Wirksamkeitsprüfung und bei Verträglichkeitsuntersuchungen dermatologischer Produkte. Wilhelm et al. konnten in einer Studie zur Erythembestimmung nach Applikation von NLS unterschiedlicher Konzentration eine hochsignifikante Korrelation der Änderung der  $a^*$ -Werte ( $\Delta a^*$ ) sowie auch der Änderung des Gesamtfarbeindruckes ( $\Delta E^*$ ) mit der applizierten NLS-Konzentration nachweisen (Wilhelm KP & Maibach HI, 1989). Seitz et al. zeigten die

Bedeutung der Colorimetrie für die objektive Bestimmung von Erythem ( $a^*$ ) und Bräunung der Haut ( $b^*$ ) auf (Seitz JC & Whitmore CG, 1988). Die Colorimetrie kann somit bei der Wirksamkeitsprüfung von z. B. Sonnenschutzfaktoren eingesetzt werden.

## **1.5. Einfluß der Okklusion auf die Haut**

Okklusion (von lat. *occludere*=abschließen, verschließen) bezeichnet eine direkte oder indirekte Bedeckung der Haut mit einer zusätzlichen Barriere, welche Einfluß nimmt auf die Wasserpermeabilität und damit auf den Hydratationszustand der Haut. Neben der Zunahme der Hydratation durch die Hemmung der Abdiffusion von Wasser durch die Epidermis unter Okklusion wurde auch die irritative Wirkung des unter der Okklusion zurückgehaltenen Schweißes auf die Hautbarriere diskutiert, welcher möglicherweise stärker irritativ wirkt als Wasser alleine (Tsai TF & Maibach HI, 1999). Für den verstärkten Wasserverlust nach Okklusion hat sich der Begriff des Hautoberflächen-Wasserverlustes („skin surface water loss“, SSWL) etabliert, der sich aus dem basalen transepidermalen Wasserverlust plus der Abdiffusion des überschüssigen Wassers aufgrund der Hyperhydratation nach Okklusion zusammensetzt (Wilhelm KP et al., 1993).

Okklusivverbände werden zur Penetrationsverbesserung verschiedener Wirkstoffe in der Dermatologie eingesetzt. Dabei werden z. B. weichmacherfreie Kunststoff-Folien aufgelegt, nachdem der Arzneistoff als Salbe, Creme oder Lösung auf die Haut aufgebracht wurde (Gloor M et al., 2000). Durch die luft- und wasserdichte Abdeckung kommt es zu einer Zunahme der Hydratation, einer Quellung des Stratum corneum, einer Zunahme der Hautoberflächentemperatur und in der Folge zu einer Steigerung der Penetrations- und Permeationsrate einiger Wirkstoffe (Warner RR et al., 2003). Diese Methode findet u. a. Anwendung in der Therapie von Narben (Sawada Y & Sone K, 1992; Suetak T et al., 2000). Auch die Okklusivwirkung verschiedener Externa (z. B. Vaseline) ohne Folienanwendung kann bereits zu einer gesteigerten Hydratation der Hornschicht führen (Sawada Y & Sone K, 1992). Bei nässenden Dermatosen ist die Anwendung okklusiv wirkender

Externa problematisch, da es zu einem Sekret- und Wärmestau kommt (Gloor M et al., 2000). Ferner wurde ein Anstieg des pH-Wertes sowie eine Änderung der mikrobiellen Besiedelung unter Okklusion, z. B. mit *Pityrosporon orbiculare*, *Candida* und verschiedenen Hautbakterien nachgewiesen (Faergemann J et al., 1983).

Eine Beeinflussung der Barrierefunktion des Stratum corneum durch Okklusion mit einer leeren Plastik-Testkammer konnte durch Fluhr et al. gezeigt werden (Fluhr JW et al., 1999). Dabei war die Störung der WPB, erfaßt durch TEWL-Messungen, bereits nach 24-stündiger Okklusion nachweisbar mit einem Maximum nach 48-stündiger Okklusion. Bei verlängerten Expositionszeiten über 72 Stunden und 96 Stunden zeigte sich kein weiterer Anstieg der TEWL-Werte; die Barrierschädigung war jedoch im Vergleich zum Basalwert vor Okklusion auch hier signifikant nachweisbar. Ein Zusammenhang zwischen der TEWL-Änderung und der Änderung der Wasserbindungskapazität des Stratum corneum nach Okklusion konnte nicht nachgewiesen werden (Fluhr JW et al., 1999). Nach Okklusion der Haut mit einem wasserundurchlässigen Plastikfilm über 1, 3 und 8 Tage konnten eine TEWL-Erhöhung und eine Zunahme der Hydratation des Stratum corneum auch noch 24 Stunden nach Abnahme der Folie beobachtet werden (Faergemann J et al., 1983).

In einer Studie von Schäfer et al. wurde der Effekt okklusiv applizierter Folien (semipermeabel und nicht-permeabel) aus Hygieneartikeln über 1, 3 und 6 Stunden auf verschiedene hautphysiologische Parameter getestet (Schäfer P et al., 2002). Dabei zeigte sich ein steiler Anstieg des TEWL innerhalb der ersten Stunde mit einem langsamen Abfall bis zu den Meßzeitpunkten 3 und 6 Stunden nach Ende der Okklusion. Die Hydratation des Stratum corneum zeigte einen Anstieg innerhalb der ersten Stunde nach Okklusion mit stabilen Werten bis zu 3 Stunden und einem langsamen Abfall bis zum Meßzeitpunkt nach 6 Stunden. Insgesamt lagen die Werte für die nicht-permeable Folie höher als die der permeablen Folie (Schäfer P et al., 2002). Unter normalen Umweltbedingungen liegt der Hydratationszustand des Stratum corneum bei ca. 30-50 % des Trockengewichtes, unter Okklusion kann es jedoch zu einem massiven Anstieg kommen (Graves CJ et al., 1995). In Abhängigkeit von einem erhöhten Hydratationslevel des Stratum corneum wurde eine gleichzeitige

Erhöhung der Wasserpermeabilität um den Faktor 2-3 nachgewiesen (Blank IH et al., 1984).

In mehreren Studien konnte gezeigt werden, daß bereits die alleinige epikutane, okklusive Applikation von Wasser zu ultrastrukturellen Veränderungen der Haut führt, und somit Wasser als schwaches Irritans agiert. In einer elektronenmikroskopischen Studie von Warner et al. zeigte sich bereits nach 4 Stunden, eindrucksvoller nach 24-stündiger epikutaner Applikation von Wasser, ein interzelluläres Ödem im Stratum corneum mit Auseinanderweichen der Korneozyten aufgrund einer Störung der Lipidlamellen (Warner RR et al., 2003). Alonso et al. konnten eine vorübergehende Zunahme der Membranfluidität im Stratum corneum bei zunehmender Hydratation des Stratum corneum nachweisen (Alonso A et al., 1996). Van Hal et al. konnten mittels elektronenmikroskopischer Darstellung an Gefrierschnitten von Hautproben, die zuvor über 48 Stunden okklusiv mit Kochsalzlösung inkubiert waren, die Ausbildung interzellulärer Wasseransammlungen im Stratum corneum zeigen (van Hal DA et al., 1996). Ferner wurde eine Änderung der Lipidzusammensetzung als Ursache der Barrierestörung diskutiert, die wiederum auf den Gehalt an NMF Einfluß nimmt (Rawlings AV et al., 1994).

Die Wasseraufnahme in die Korneozyten unter Okklusion ist in den mittleren Zellagen des Stratum corneum am größten, geringer in den basalen Lagen sowie in den ganz oberflächlichen Zellagen (Bouwstra JA et al., 2003; Warner RR et al., 2003). Dies steht in Übereinstimmung mit der Verteilung des sogenannten NMF, dessen Konzentration in den mittleren Zellagen des Stratum corneum am größten ist (Rawlings AV et al., 1994). In den basalen Zellagen zeigte sich keine Schwellung der Korneozyten, auch bei starker Hyperhydratation bis 300 % des Trockengewichtes des Stratum corneum. Hier wurde ursächlich eine geringere Konzentration bzw. das Fehlen des NMF in den Korneozyten sowie eine besondere Ausbildung des cornified envelope diskutiert (Bouwstra JA et al., 2003). Die Wasseraufnahme in die Korneozyten erfolgt durch eine Zunahme der vertikalen Korneozytendicke, weniger durch Zunahme des horizontalen Korneozytendurchmessers (Bouwstra JA et al., 2003). Norlen et al. konnten nachweisen, daß die Zunahme der Korneozytendicke um bis zu 25-30 % nach ca. 90 Minuten Immersion mit

destilliertem Wasser abgeschlossen ist (Norlen L et al., 1997). Längere Expositionszeiten führen zu einer Störung der interzellulären Lipidlamellen (Warner RR et al., 1999). Ferner wurde eine Extraktion der NMF durch okklusiven Wasser- und Irritantienkontakt diskutiert (Imokawa G et al., 1991).

Auch Kligman (Kligman A, 1996) wies eine Störung der epidermalen Wasserschutzbarriere nach 24-stündiger okklusiver Applikation von Wasser nach. Hier wurde diskutiert, daß durch die Schwellung des Stratum corneum proinflammatorische Substanzen freigesetzt werden könnten, die in tiefere Hautschichten diffundieren und die nachfolgende Entzündungsreaktionen auslösen (Kligman A, 1996). Eine Erhöhung der Interleukin-1 $\alpha$ -Expression als ein früher Marker einer Barrierschädigung konnte in frischen Hautexzidaten nach alleiniger epikutaner Applikation von Wasser über 8 Stunden durch Gibbs et al. nachgewiesen werden (Gibbs S et al., 2002). Mikulowska stellte nach 24-stündiger Applikation einer mit Wasser gefüllten Epikutantestkammer reaktive Veränderungen in Langerhans-Zellen fest (Mikulowska A, 1990).

Diskutiert wurde auch eine Hemmung der Barriere-Restitution durch die Okklusionseffekte auf wasserimpermeable Membransysteme im Stratum corneum mit einer nachfolgenden Hemmung der DNA-Synthese im Stratum corneum (Proksch E et al., 1991). Welzel et al. konnten hingegen keine Verzögerung in der Barriere-Restitution durch Okklusion nach Barrierschädigung nachweisen (Welzel J et al., 1996). In einer Studie von van de Kerkhof et al. zeigte sich ebenfalls keine Änderung der epidermalen Proliferation unter Okklusion mit Hydrokolloiden nach erfolgter Barrierschädigung durch tape stripping (van de Kerkhof PC et al., 1995).

Häufig diskutiert wurde der Einfluß von Handschuhen auf die Hautschutzbarriere durch Okklusionseffekte. In einer Studie von Ramsing und Agner konnte bei kurzzeitiger Okklusion gesunder Haut mit einem hypoallergenen Untersuchungshandschuh für jeweils 6 Stunden pro Tag an drei aufeinanderfolgenden Tagen bei Messungen bereits 1 Stunde nach Entfernen der Handschuhe am dritten Tag keine Änderung der TEWL-Werte im Vergleich zu den Basalwerten nachgewiesen werden; ebenso zeigte sich keine Änderung der Hydratation (Ramsing DW & Agner T, 1996). Nach 14-tägiger Tragezeit war

ein signifikanter Anstieg der TEWL-Werte zu bemerken (Ramsing DW & Agner T, 1996). Auf vorgeschädigter Haut (NLS 0,5 % über 10 Minuten zweimal täglich an 2 aufeinanderfolgenden Tagen) zeigte sich nach anschließendem Tragen der Handschuhe an 3 aufeinanderfolgenden Tagen über jeweils 6 Stunden pro Tag bereits ein deutlicher Anstieg der TEWL-Werte im Vergleich zu der Kontrolle ohne Handschuh und zu den Basalwerten (Ramsing DW & Agner T, 1996). Ähnliche Ergebnisse konnten auch van der Valk und Maibach zeigen (van der Valk PG & Maibach HI, 1989).

Der Effekt von Wasser auf experimentell vorgeschädigter Haut durch okklusive Einwirkung von 0,5%iger NLS-Lösung über 10 Minuten an 2 aufeinanderfolgenden Tagen und anschließender nicht-okklusiver Einwirkung von Wasser zweimal täglich über 10 Minuten an 10 aufeinanderfolgenden Tagen zeigte keinen weiteren Anstieg der TEWL oder Corneometrie-Werte bei Messungen 90 Minuten nach Beginn der Wasserexposition an Tag 5 und 9 im Vergleich zu den Werten nach Irritation (Ramsing DW & Agner T, 1997).

## **1.6. Ableitung der Fragestellung und Hypothesen**

In der vorliegenden Studie wird der Einfluß von Okklusionseffekten auf verschiedene hautphysiologische Untersuchungsmethoden bei epikutanen Hauttestungen mit Natriumlaurylsulfat untersucht. Neben der Messung des TEWL stehen bei der Beurteilung der Hautreaktion auf Irritantien als weitere hautphysiologische Untersuchungsmethoden die Corneometrie zur Erfassung des Feuchtigkeitsgehaltes des Stratum corneum sowie die Colorimetrie zur Erfassung der Hautoberflächenfarbe zur Verfügung.

Ziel dieser Studie war es, bei der Epikutantestung mit NLS unterschiedlicher Konzentrationen im Vergleich zu Wasser und zu einer Leerkammer als Kontrolle den Zeitpunkt nach der Abnahme der Testpflaster zu ermitteln, an dem Okklusionseinflüsse auf die Ergebnisse der angewendeten hautphysiologischen Untersuchungsmethoden weitgehend abgeklungen sind. Dabei wurde auch der Einfluß der Konzentration von NLS sowie unterschiedlicher Applikationszeiten auf die Okklusionseffekte untersucht.

## **Hypothesen:**

H1<sub>0</sub>: Der Meßzeitpunkt nach Abnahme der Testpflaster hat keinen Einfluß auf die Meßwerte der durchgeführten hautphysiologischen Testungen.

H2<sub>0</sub>: Die Applikationsdauer der Testpflaster hat keinen Einfluß auf die Meßwerte nach Abnahme der Testpflaster.

H3<sub>0</sub>: Die unterschiedlichen Testsubstanzen (NLS 0,25 % NLS 0,5 %, Wasser, Leerkammer) haben keinen Einfluß auf die Meßwerte zu den einzelnen Meßzeitpunkten.

H4<sub>0</sub>: Es besteht keine Korrelation zwischen den Werten der verschiedenen hautphysiologischen Meßmethoden bezüglich ihres zeitlichen Verlaufes nach Pflasterabnahme.

## **2. MATERIAL UND METHODE**

### **2.1. Probanden**

An der Studie nahmen insgesamt 45 hautgesunde Probanden im Alter von 18 bis 70 Jahren (Mittelwert: 48 Jahre  $\pm$  13 Jahre) teil, davon 20 Frauen und 25 Männer. 15 Probanden waren der Altersgruppe 18-44 Jahre zuzuordnen, die übrigen 30 Probanden der Altersgruppe 45-70 Jahre. Bei keinem der Probanden war eine atopische Diathese in der Anamnese, akute Haut- oder sonstige Erkrankungen oder Schwangerschaft zum Testzeitpunkt bekannt. Der Hautzustand an den Teststellen war unauffällig. Topische Behandlungen, z. B. mit Glucocorticoiden oder auch pflegenden Externa mindestens über 12 Stunden vor und während der Testungen, die Verwendung von Hautreinigungsmitteln an den Teststellen, relevante systemische Therapien (z. B. Glucocorticoide, gefäßerweiternde oder -verengende Substanzen, Immunsuppressiva bis mindestens drei Wochen vor Testbeginn) sowie UV-Bestrahlungsbehandlungen waren den Probanden untersagt.

Die Untersuchungen wurden unter Berücksichtigung der Empfehlungen für Ärzte in der klinischen Forschung der Deklaration von Helsinki (Weltärztebund 1991) durchgeführt (Schuklenk U & Ashcroft R, 2000). Vor Untersuchungsbeginn wurde die Zustimmung der Kommission für Ethik in der ärztlichen Forschung des Klinikums der Philipps-Universität Marburg eingeholt. Nach einem ausführlichen Informationsgespräch durch einen Testarzt wurde den Probanden vor der Testung ein ausführlicher Aufklärungsbogen ausgehändigt. Eine schriftliche Einverständniserklärung für die Teilnahme an der Studie mußte unterzeichnet werden. Nach Beendigung der Datenerhebung erfolgte die anonymisierte Kodierung der Daten zur statistischen Weiterbearbeitung.

## **2.2. Testsubstanzen**

### **Natriumlaurylsulfat**

Für die Irritationstestung wurden wäßrige NLS-Lösungen in den Konzentrationen 0,25 % und 0,5 % NLS der Firma Sigma® (Deisenhofen, Deutschland), Reinheitsgrad 99 %, verwendet. Das Befüllen der Testkammern erfolgte mit einer Eppendorf Reference-Pipette (Eppendorf®, Hamburg).

### **Aqua ad iniectabilia Braun**

Als Kontrollsubstanz diente Aqua ad iniectabilia Braun der Firma Braun Melsungen, CH.-B.: 2344A95.

### **Testpflaster**

Bei der epikutanen Irritationstestung wurden jeweils vier Large Finn Chambers® (Eptest Ltd Oy, Tuusula/Finnland, Vertrieb durch HERMAL, Reinbek) mit einem inneren Durchmesser von 12 mm auf Scanpore Pflaster® (Alpharma AS, Norgesplaster Facility/Norwegen), bestückt mit einem Zellulose-Filterplättchen (Whatman Chromatographie-Papier®, Grad 31 ET, 11 mm Durchmesser), verwendet. Die Fixierung der Testpflaster erfolgte zusätzlich mit einem schmalen Streifen hypoallergenem, luft- und wasserdampfdurchlässigem Klebevlies (Fixomull® stretch, BSN medical GmbH, Hamburg).

## **2.3. Hautphysiologische Meßgeräte**

### **2.3.1. Tewameter TM 210®**

Die Messungen des TEWL erfolgten mit dem Tewameter TM 210® der Firma Courage + Khazaka (Köln). Nach Aufsetzen der Meßsonde wurde 6 Sekunden später automatisch die Messung des TEWL in Zeitabständen von ca. 2 Sekunden durchgeführt. Die Meßwerte wurden gespeichert und die mittlere Abweichung der Meßwerte der letzten 20 Sekunden mit einem vorgegebenen Toleranzwert verglichen. Bei Unterschreitung dieses Toleranzwertes wurde dies durch ein akustisches Signal angezeigt; die Messung konnte ggf. gestoppt werden. Der TEWL-Wert in g/m<sup>2</sup>h ergibt sich als Mittelwert der Messungen der letzten 20-60 Sekunden (Wilhelm KP et al., 1993). Bei einer Raumtemperatur zwischen 15 °C und 40 °C und einer relativen Luftfeuchtigkeit von über 30 % arbeitet das Gerät nach Herstellerangaben dabei mit einem Meßfehler von  $\pm 15 \%$  des Meßwertes (Courage&Khazaka, 2000).

### **2.3.2. Corneometer CM 820®**

Zur Beurteilung des Feuchtigkeitsgehaltes des Stratum corneum wurde in dieser Untersuchung der Corneometer CM 820® der Firma Courage & Khazaka (Köln) eingesetzt. Bei der Messung wird die Sonde mit einem standardisierten Anpreßdruck von 3,5 N auf die Hautoberfläche aufgebracht und die Kapazitätsänderung erfaßt. Nach ca. 1 Sekunde wird ein arbiträrer Wert in Anzeige-Einheiten (AE) angegeben. Zur Erfassung der Hautdurchfeuchtung wurde der Mittelwert aus drei Messungen innerhalb von Abständen von ca. 5 Sekunden an unterschiedlichen Arealen gewählt. Das Gerät weist nach Herstellerangaben eine Meßgenauigkeit von  $\pm 2,6$  AE auf (Courage&Khazaka, 2000).

### **2.3.3. Chromameter CR 300®**

Zur Farbbestimmung wurde der Chromameter CR 300® der Firma Minolta (Japan) verwendet, welcher als Tristimuluscolorimeter die Hautoberflächenfarbe in einem dreidimensionalen Farbsystem erfaßt. Zunächst erfolgt eine Kalibrierung des Gerätes mit einer weißen standardisierten Meßplatte. Um orthostatische Einflüsse zu vermindern, wurden die Messungen am Unterarm in einer horizontalen Position bei sitzendem Probanden durchgeführt. Vor Beginn der Messungen wurde ein Ruheintervall von mindestens 5-10 Minuten eingehalten, in denen der Unterarm bereits unbedeckt und bewegungslos in dieser Stellung gehalten wurde. Es wurden drei aufeinanderfolgende Messungen mit dem Chromameter unter jeweils erneutem Aufsetzen und konstant geringem Anpreßdruck des Meßkopfes durchgeführt und der Mittelwert dieser Messungen errechnet (Angabe in Anzeige-Einheiten, AE). Die Meßabweichung kann laut Herstellerangaben bis zu  $\pm 0,15$  AE betragen (Minolta Co., 2000).

## **2.4. Standardisierung der Untersuchungsbedingungen**

Grundlage der Untersuchung waren die Empfehlungen zur Durchführung von Messungen des TEWL (Pinnagoda J et al., 1990), die Empfehlungen zur Durchführung des NLS-Irritationstests der „Standardization Group of the European Society of Contact Dermatitis“ (Tupker RA et al., 1997) sowie Empfehlungen zur Messung der Hautoberflächenfarbe der „Standardization Group of the European Society of Contact Dermatitis“ (Fullerton A et al., 1996).

### **Jahreszeit**

Um den Einfluß der Jahreszeit auf die Messungen möglichst gering zu halten, wurden die Untersuchungen in den Wintermonaten Oktober 2000 bis Februar 2001 durchgeführt. Die Messungen erfolgten ferner jeweils zur gleichen Tageszeit.

## **Raumtemperatur**

Die Raumtemperatur lag zwischen 21 °C und 23 °C, die Temperaturregulation erfolgte durch Thermo-Tex®-Folien. Die Messungen wurden in einem abgetrennten Meßraum, der vor direkter Sonneneinstrahlung geschützt war, durchgeführt. Fenster und Türen blieben stets geschlossen, um mögliche Beeinflussungen der Messung durch Luftzug zu vermeiden. Während der Messungen wurde nicht gesprochen.

## **Relative Luftfeuchtigkeit**

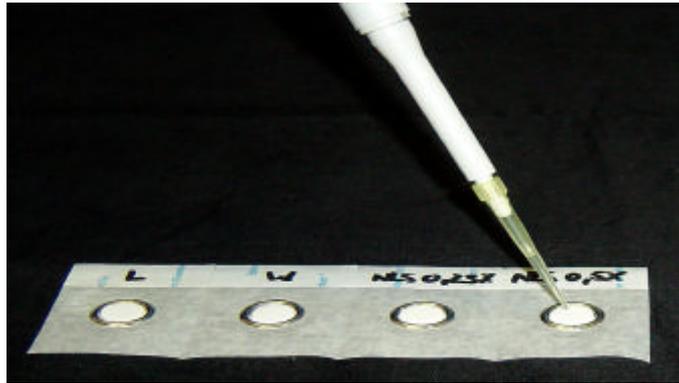
Die relative Luftfeuchtigkeit lag bei 40-50 % (eine genauere Regulation war nicht möglich).

## **Ruheintervall vor der Messung**

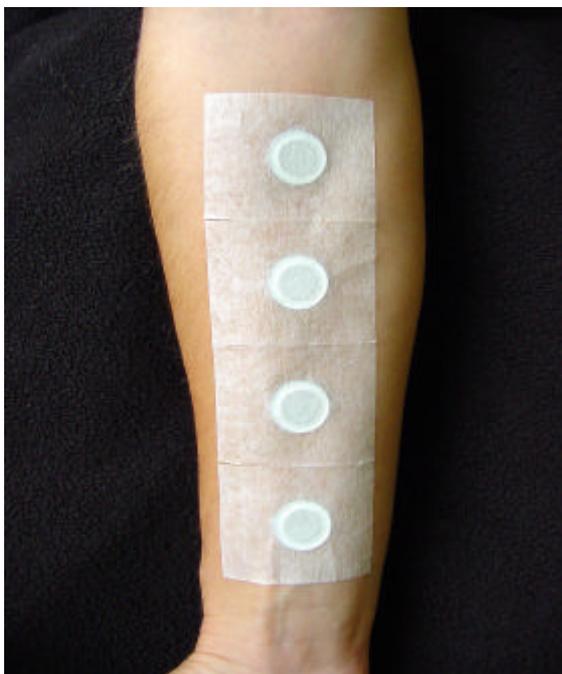
Vor jeder Messung hielten sich die Probanden für mindestens 20 Minuten im Meßraum auf, um die Aktivität der Schweißdrüsen zu vermindern. Die Teststellen waren dabei nicht von Kleidung bedeckt, um eine gleichmäßige Hautoberflächentemperatur zu erreichen und Okklusionsartefakte durch Kleidungsstücke herabzusetzen.

## **2.5. Testdurchführung**

Bei allen Probanden wurden jeweils insgesamt vier epikutane Large Finn Chambers® (Innendurchmesser 12 mm) mit Zellulose-Filterpapier wenige Minuten vor der Applikation befüllt mit jeweils 60 µl einer wäßrigen 0,25%igen NLS-Lösung, einer 0,5%igen NLS Lösung sowie mit Aqua ad iniectabilia Braun. Diese Kammern wurden zusammen mit einer leeren Testkammer auf die mediale Unterarmbeugeseite aufgebracht und mit luftdurchlässigem Klebevlies (Fixomull® stretch) flächig fixiert.



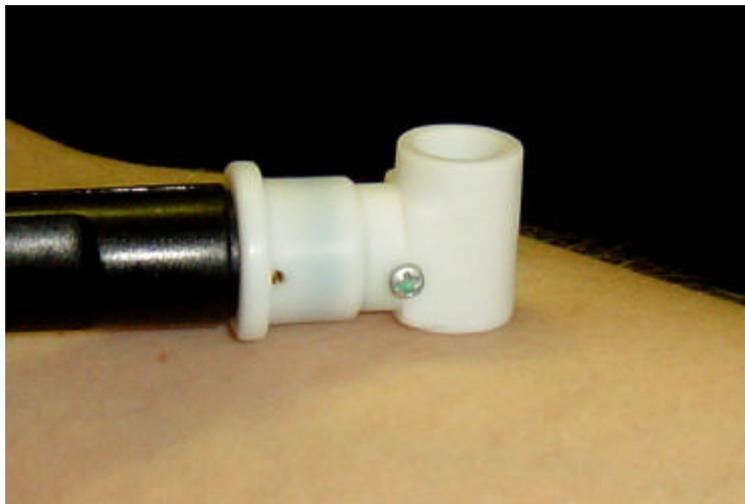
**Abbildung 2.1:** Einpipettieren der Testlösungen in die Finn Chambers®



**Abbildung 2.2:** Applikation der Testpflaster und Fixieren mit Klebevlies

Die Testpflaster wurden bei 15 der Probanden bereits nach 12 Stunden entfernt, bei weiteren 15 Probanden nach 24 Stunden und bei den restlichen 15 Probanden erst nach 48 Stunden. Die Markierung der Teststellen erfolgte mit einem wasserfesten Stift. Die Zuordnung der Probanden zu den unterschiedlichen Applikationszeiten wurde randomisiert.

Messungen des transepidermalen Wasserverlustes, der Corneometrie und der Chromametrie wurden vor Applikation der Pflaster (Basalwerte), direkt nach Pflasterabnahme (Zeitpunkt 0), alle 15 Minuten innerhalb der ersten Stunde nach Pflasterabnahme, alle 30 Minuten innerhalb der nachfolgenden 3 Stunden sowie 24 Stunden nach Pflasterabnahme durchgeführt. Dabei wurde eine jeweils ca. 20-minütige Ruhepause vor den Messungen von den Probanden im Testlabor eingehalten. In der ersten Stunde nach Abnahme der Pflaster verließen die Probanden den Testraum nicht.



**Abbildung 2.3: Messung mit der Tewametersonde**

## **2.6. Statistik**

Die statistische Auswertung erfolgte in Zusammenarbeit mit Herrn Dr. P. Zöfel vom Hochschulrechenzentrum der Philipps-Universität Marburg unter Verwendung von SPSS für Windows 10.0.

Der Kolmogorov-Smirnov-Test zeigte eine Normalverteilung der Daten, so daß in der Folge die Berechnungen mit dem t-Test durchgeführt werden konnten. Der Vergleich der Daten, getrennt nach den unterschiedlichen Applikationszeiten (12 Stunden, 24 Stunden, 48 Stunden), erfolgte mit dem t-Test für unabhängige Stichproben, die Korrelationsuntersuchung durch Bestimmung des Korrelationskoeffizienten nach Spearman. Die

Verlaufsbeobachtung von Meßwerten jeweils aufeinanderfolgender Meßzeitpunkte nach Pflasterabnahme wurde mit dem t-Test für gepaarte Stichproben durchgeführt.

Da insbesondere der Unterschied der Meßwerte vom Basalwert von Interesse dieser Untersuchung war, wurden die Auswertungen mit den Delta-Werten ( $\Delta$ -Wert = Wert zu einem Meßzeitpunkt abzüglich des Basalwertes) durchgeführt.

## **2.7. Methodenkritik**

Bezüglich der Standardisierung der Untersuchungsbedingungen war die Möglichkeit einer Luftfeuchtigkeitsregulation aufgrund des Fehlens einer entsprechenden Klimaanlage in den Testräumen nicht gegeben. Die Luftfeuchtigkeit lag meist zwischen 40 % und 50 %. Die Messungen erfolgten in einem abgetrennten Meßraum, der vor direkter Sonneneinstrahlung geschützt war. Fenster und Türen blieben stets während der Messungen geschlossen, um mögliche Beeinflussungen der Messung durch Luftzug zu vermeiden. Ein direkter Vergleich der absoluten Meßwerte mit anderen, unter streng standardisierten Bedingungen (Luftfeuchtigkeit!) gewonnenen Daten, ist daher nicht uneingeschränkt möglich.

Bei der Corneometrie ist eine hohe Störanfälligkeit des Corneometers von verschiedenen Autoren mehrfach beschrieben worden, ferner wurden die geringe Reproduzierbarkeit der Meßergebnisse dieser hautphysiologischen Testmethode sowie paradoxe Meßwerte nach Irritation diskutiert (Blichmann CW & Serup J, 1988; John SM, 2001).

### 3. ERGEBNISSE

Nach erfolgter Plausibilitätskontrolle zeigte die Testung der erhobenen Daten auf Normalverteilung mittels Kolmogorov-Smirnov-Test, aufgetrennt nach den unterschiedlichen hautphysiologischen Methoden, daß eine Normalverteilung vorliegt.

Im zeitlichen Verlauf der Messungen aller drei angewendeten hautphysiologischen Methoden nach Pflasterabnahme ergaben sich bezüglich der unterschiedlichen Applikationszeiten (12 Stunden, 24 Stunden, 48 Stunden) im t-Test für unabhängige Stichproben keine signifikanten Unterschiede. Die Werte dieser drei Gruppen wurden daher im folgenden zusammengefaßt beurteilt.

Bezüglich der Geschlechtsabhängigkeit der Testreaktion auf NLS und auf die Leer- und Wasserkammer waren keine signifikanten Unterschiede im Mittelwertvergleich der TEWL- und der Corneometrie-Werte zu allen Testzeitpunkten nachweisbar. Auch bezüglich des Alters konnten im Vergleich der gebildeten Altersgruppen (Alter 18-44 Jahre und 45-70 Jahre) keine signifikanten Unterschiede in der Testreaktion auf NLS sowie auf die Leer- und Wasserkammer beobachtet werden, und zwar zu allen Testzeitpunkten und auch bei allen drei angewendeten Testverfahren. Es folgt die beschreibende Darstellung der statistischen Ergebnisse, getrennt nach den hautphysiologischen Untersuchungsmethoden.

## 3.1. Ergebnisse TEWL

### 3.1.1. Basisdaten

Tabelle 3.1 zeigt die  $\Delta$ -TEWL-Werte in g/m<sup>2</sup>h, die sich aus der Differenz der gemessenen Absolutwerte und dem Basalwert ergeben. Aufgeführt sind die  $\Delta$ -TEWL-Mittelwerte, Standardabweichungen sowie Minima und Maxima zu den unterschiedlichen Meßzeitpunkten nach Pflasterabnahme.

**Tabelle 3.1:** Basalwert und  $\Delta$ -TEWL-Werte in g/m<sup>2</sup>h:  $\Delta$ -Mittelwert  $\pm$  Standardabweichung, Minimal- und Maximal-Meßwerte (Min/Max) zu den unterschiedlichen Meßzeitpunkten

	Leerkammer		Wasser		NLS 0,25 %		NLS 0,5 %	
Basal	7,39 $\pm$ 2,92	Min 4,0 Max 19,4	7,39 $\pm$ 2,92	Min 4,0 Max 19,4	7,39 $\pm$ 2,92	Min 4,0 Max 19,4	7,39 $\pm$ 2,92	Min 4,0 Max 19,4
0 min	15,85 $\pm$ 12,63	Min -3,7 Max 50,7	29,08 $\pm$ 19,5	Min -5,7 Max 75,2	49,82 $\pm$ 26,77	Min -4,0 Max 99,3	64,83 $\pm$ 21,01	Min 7,0 Max 97,8
15 min	5,81 $\pm$ 6,67	Min -6,3 Max 28,4	12,11 $\pm$ 9,52	Min -1,9 Max 36,7	23,83 $\pm$ 13,39	Min -2,8 Max 53,1	35,00 $\pm$ 12,36	Min 2,8 Max 60,0
30 min	4,63 $\pm$ 5,54	Min -3,6 Max 26,6	8,87 $\pm$ 7,25	Min -3,4 Max 28,5	18,08 $\pm$ 9,24	Min -1,6 Max 37,8	25,49 $\pm$ 10,35	Min 4,4 Max 66,4
45 min	4,46 $\pm$ 12,05	Min -4,1 Max 64,9	7,70 $\pm$ 8,32	Min -4,7 Max 49,9	13,67 $\pm$ 6,07	Min 0,0 Max 27,1	22,18 $\pm$ 11,98	Min -0,8 Max 66,7
60 min	1,42 $\pm$ 3,94	Min -7,2 Max 18,6	6,04 $\pm$ 4,99	Min -6,6 Max 19,1	11,82 $\pm$ 6,20	Min -0,3 Max 34,2	18,10 $\pm$ 9,75	Min -2,2 Max 58,5
90 min	0,23 $\pm$ 2,81	Min -5,2 Max 6,4	3,52 $\pm$ 4,33	Min -8,3 Max 12,4	10,07 $\pm$ 5,47	Min -1,0 Max 31,4	16,88 $\pm$ 10,02	Min 4,0 Max 61,4
120 min	0,17 $\pm$ 3,40	Min -4,8 Max 15,6	2,59 $\pm$ 3,68	Min -6,0 Max 13,2	8,35 $\pm$ 5,79	Min -2,8 Max 26,2	15,06 $\pm$ 10,24	Min 0,7 Max 53,6
150 min	-0,74 $\pm$ 2,58	Min -6,0 Max 3,6	1,48 $\pm$ 3,32	Min -6,8 Max 8,1	7,53 $\pm$ 6,45	Min -2,1 Max 27,4	14,96 $\pm$ 11,24	Min 0,8 Max 54,1
180 min	-0,74 $\pm$ 3,23	Min -5,7 Max 12,7	0,47 $\pm$ 2,50	Min -3,7 Max 8,1	6,48 $\pm$ 7,49	Min -1,0 Max 38,7	13,68 $\pm$ 12,09	Min 0,7 Max 61,3
210 min	-1,25 $\pm$ 2,30	Min -6,7 Max 4,8	0,40 $\pm$ 3,97	Min -9,7 Max 18,7	6,84 $\pm$ 6,91	Min -1,9 Max 33,0	14,98 $\pm$ 12,84	Min -0,4 Max 62,0
240 min	-1,62 $\pm$ 2,82	Min -10,6 Max 5,7	0,16 $\pm$ 4,46	Min -12,6 Max 21,0	6,47 $\pm$ 7,92	Min -9,3 Max 35,2	14,21 $\pm$ 13,48	Min -3,9 Max 61,9
24 h	0,55 $\pm$ 6,96	Min -6,3 Max 36,6	2,35 $\pm$ 7,67	Min -5,3 Max 32,2	10,64 $\pm$ 10,43	Min -0,4 Max 51,9	18,67 $\pm$ 15,99	Min 0,3 Max 65,7

Unmittelbar nach Abnahme der Testpflaster (Zeitpunkt 0) zeigte sich ein steiler, hochsignifikanter Anstieg der TEWL-Werte an allen 4 Teststellen (NLS 0,5 %, NLS 0,25 %, Wasser, Leerkammer) im Vergleich zum Basalwert. Die höchsten Werte ergaben sich für NLS 0,5 %, gefolgt von NLS 0,25 %, Wasser und der Leerkammer. Sowohl die Meßwerte für NLS 0,5 % als auch die für NLS 0,25 % wiesen im Vergleich zum Basalwert an allen nachfolgenden Meßzeitpunkten

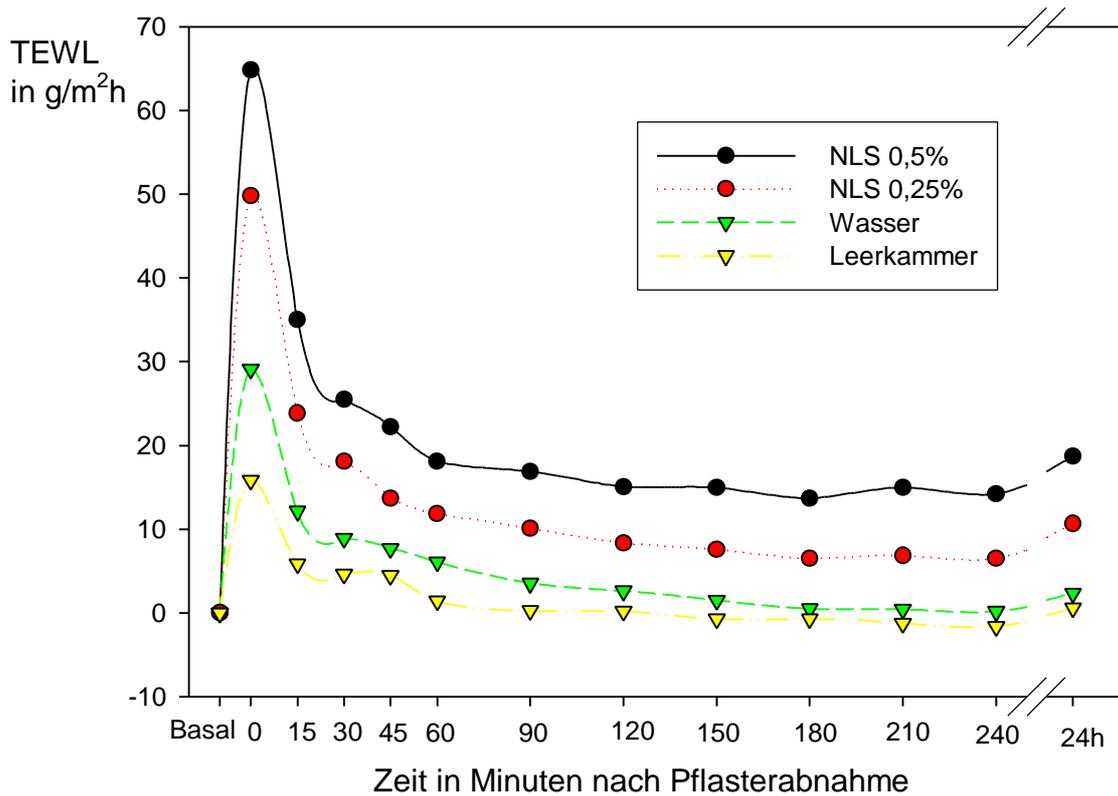
signifikant höhere Werte auf. Dabei waren die Meßwerte für NLS 0,5 % zu allen Meßzeitpunkten signifikant höher als die nach Applikation von NLS 0,25 %. Im Vergleich zum Basalwert zeigten sich signifikant erhöhte Meßwerte für die Leerkammer nur bis 60 Minuten, für die Wasserkammer bis 150 Minuten nach Abnahme der Testpflaster. Innerhalb der ersten 15 Minuten nach Entfernen der Testpflaster war bei allen Testarealen eine steile Abnahme der TEWL-Werte um mehr als 40 % zu beobachten (Tabelle 3.2).

Im Vergleich der Wasserkammer mit der Leerkammer zeigten sich in der vorliegenden Studie signifikant höhere Werte für die Wasserkammer bis 240 Minuten nach Pflasterabnahme. Die TEWL-Unterschiede der NLS-Kammern im Vergleich zur Leerkammer waren zu allen Meßzeitpunkten hochsignifikant. Beim Vergleich der TEWL-Werte der NLS-Kammern mit denen der Wasserkammer zeigten sich ebenfalls hochsignifikante Unterschiede zu allen Meßzeitpunkten nach Pflasterabnahme.

Bei den TEWL-Werten 24 Stunden nach Abnahme der Testpflaster war erneut ein Anstieg im Vergleich zum Basalwert und zu den Messungen 240 Minuten nach Abnahme der Testpflaster zu beobachten. Die höchsten Werte ergaben sich auch hier für NLS 0,5 %, gefolgt von NLS 0,25 %, der Wasserkammer und der Leerkammer. Bei der Leerkammer war der erneute Anstieg der TEWL-Werte 24 Stunden nach Entfernen der Testpflaster jedoch nicht signifikant im Vergleich zum Basalwert, für die Wasserkammer und beide NLS-Kammern ergaben sich hochsignifikante Unterschiede im Vergleich zum Basalwert. Die TEWL-Meßwerte beider NLS-Konzentrationen korrelierten 24 Stunden nach Pflasterabnahme signifikant mit denen der Wasserkammer ( $p < 0,001$ ).

### 3.1.2. Zeitlicher Verlauf der TEWL-Werte

Die Änderung der TEWL-Werte nach Entfernen der Testpflaster ist anschaulich in der Abbildung 3.1 erkennbar (?- TEWL-Werte).



**Abbildung 3.1:** TEWL-Werte in  $\text{g/m}^2\text{h}$  im Verlauf der Messungen: Meßwerte von 0 Minuten bis 24 Stunden nach Pflasterabnahme

Bezüglich des zeitlichen Verlaufes der TEWL-Werte nach Abnahme der Testpflaster wurden Vergleiche der Meßwerte (Absolutwerte) aufeinanderfolgender Meßzeitpunkte mit dem t-Test für gepaarte Stichproben durchgeführt (Tabelle 3.2).

**Tabelle 3.2:** Verlauf der TEWL-Meßwerte: Signifikanzniveau beim Vergleich aufeinanderfolgender Meßwerte und Abnahme der Werte (vom vorhergehenden zum jeweils nachfolgenden Meßzeitpunkt) in % (Absolutwerte),  
ns = nicht signifikant

Zeit in min/h Irritans												
Leerkammer	P<0,01 -47,4%	P<0,05 -15,3%	P<0,05 -12,2%	P<0,05 -16,8%	P<0,05 -14,1%	P<0,05 -8,2%	P<0,05 -11,9%	ns +1,1%	ns -8%	ns -7,5%	ns +20,1%	
Wasser	P<0,01 -47,3%	P<0,01 -17,9%	P<0,05 -14,5%	P<0,05 -11,1%	P<0,01 -18%	P<0,05 -10,4%	P<0,05 -11,4%	P<0,05 -8,5%	ns -8,7%	ns -3,4%	ns +19,8%	
NLS 0,25 %	P<0,01 -47,6%	P<0,01 -20,6%	P<0,01 -18,3%	P<0,01 -10%	P<0,01 -10,4%	P<0,05 -11,3%	ns -5,4%	ns -5,7%	ns -2,2%	ns +0,2%	P<0,01 +30,2%	
NLS 0,5 %	P<0,01 -42,5%	P<0,01 -24,4%	P<0,01 -14,1%	P<0,01 -12,8%	P<0,05 -4,3%	P<0,05 -9,8%	ns -1,3%	ns -7,8%	ns +4,3%	ns -5,1%	P<0,01 +35,7%	

Bis zur Messung 120 Minuten nach Entfernen der Testpflaster nahmen die TEWL-Meßwerte beim Vergleich jeweils aufeinanderfolgender Meßzeitpunkte bei allen Kammern kontinuierlich signifikant ab. Für die NLS-Kammern war im Vergleich aufeinanderfolgender Meßzeitpunkte zwischen 120 und 240 Minuten nach Pflasterabnahme keine weitere signifikante Abnahme der TEWL-Werte mehr nachweisbar. Erst die Messung nach 24 Stunden zeigte im Vergleich zur 240-Minuten-Messung erneut eine signifikante Zunahme der TEWL-Werte. Bei der Leerkammer wurde eine signifikante Abnahme der TEWL-Meßwerte im Vergleich jeweils aufeinanderfolgender Meßzeitpunkte bis zu 150 Minuten, bei der Wasserkammer bis 180 Minuten nach Pflasterabnahme beobachtet. Die erneute Zunahme der Werte 24 Stunden im Vergleich zu 240 Minuten nach Pflasterabnahme war für die Leerkammer und die Wasserkammer nicht signifikant.

## 3.2. Ergebnisse Corneometrie

### 3.2.1. Basisdaten

Tabelle 3.3 zeigt die  $\Delta$ -Corneometrie-Werte in Anzeige-Einheiten (AE), die sich aus der Differenz der gemessenen Absolutwerte und dem Basalwert ergeben. Dargestellt sind die  $\Delta$ -Mittelwerte, Standardabweichungen sowie Minima und Maxima zu den unterschiedlichen Meßzeitpunkten nach Pflasterabnahme.

**Tabelle 3.3:** Basalwert und  $\Delta$ -Corneometrie-Werte in AE:  
Corneometrie- $\Delta$ -Mittelwert  $\pm$  Standardabweichung, Minimal- und Maximal-Meßwerte (Min/Max) zu den unterschiedlichen Meßzeitpunkten

	Leerkammer		Wasser		NLS 0,25 %		NLS 0,5 %	
Basal	52,17 $\pm$ 10,69	Min 28,0 Max 80,0						
0 min	13,35 $\pm$ 11,42	Min -13,0 Max 42,0	13,63 $\pm$ 15,02	Min -28,0 Max 51,0	19,00 $\pm$ 15,97	Min -18,0 Max 55,0	25,3 $\pm$ 18,49	Min -35,0 Max 57,0
15 min	10,76 $\pm$ 10,06	Min -19,0 Max 34,0	8,52 $\pm$ 11,68	Min -20,0 Max 30,0	11,74 $\pm$ 11,13	Min -10,0 Max 29,0	16,72 $\pm$ 10,88	Min -17,0 Max 37,0
30 min	10,39 $\pm$ 9,86	Min -23,0 Max 33,0	6,74 $\pm$ 10,26	Min -14,0 Max 29,0	7,20 $\pm$ 9,72	Min -11,0 Max 28,0	9,85 $\pm$ 10,03	Min -13,0 Max 33,0
45 min	9,33 $\pm$ 7,25	Min -5,0 Max 25,0	7,48 $\pm$ 9,06	Min -8,0 Max 29,0	5,09 $\pm$ 8,81	Min -12,0 Max 24,0	8,09 $\pm$ 9,51	Min -14,0 Max 33,0
60 min	8,70 $\pm$ 8,22	Min -9,0 Max 26,0	6,91 $\pm$ 9,09	Min -9,0 Max 28,0	3,22 $\pm$ 9,21	Min -14,0 Max 27,0	5,80 $\pm$ 9,17	Min -11,0 Max 32,0
90 min	7,13 $\pm$ 7,49	Min -9,0 Max 24,0	5,59 $\pm$ 8,03	Min -8,0 Max 23,0	1,07 $\pm$ 8,05	Min -15,0 Max 22,0	3,78 $\pm$ 8,78	Min -16,0 Max 21,0
120 min	6,72 $\pm$ 6,96	Min -5,0 Max 23,0	5,09 $\pm$ 6,82	Min -8,0 Max 21,0	-0,43 $\pm$ 7,04	Min -13,0 Max 16,0	3,50 $\pm$ 8,81	Min -17,0 Max 23,0
150 min	6,35 $\pm$ 7,68	Min -9,0 Max 25,0	4,50 $\pm$ 8,10	Min -12,0 Max 24,0	-1,28 $\pm$ 8,03	Min -15,0 Max 20,0	3,35 $\pm$ 9,44	Min -17,0 Max 31,0
180 min	5,72 $\pm$ 8,31	Min -12,0 Max 20,0	4,15 $\pm$ 7,47	Min -9,0 Max 21,0	-0,76 $\pm$ 8,19	Min -16,0 Max 22,0	3,13 $\pm$ 9,81	Min -17,0 Max 27,0
210 min	5,24 $\pm$ 7,62	Min -8,0 Max 26,0	3,76 $\pm$ 7,90	Min -11,0 Max 20,0	-1,74 $\pm$ 8,12	Min -20,0 Max 15,0	3,70 $\pm$ 10,66	Min -20,0 Max 29,0
240 min	4,78 $\pm$ 7,07	Min -10,0 Max 19,0	2,89 $\pm$ 7,94	Min -16,0 Max 19,0	-3,15 $\pm$ 7,70	Min -19,0 Max 14,0	2,48 $\pm$ 9,70	Min -21,0 Max 28,0
24 h	4,17 $\pm$ 8,59	Min -22,0 Max 23,0	4,11 $\pm$ 7,13	Min -11,0 Max 21,0	2,57 $\pm$ 8,93	Min -15,0 Max 25,0	4,61 $\pm$ 7,92	Min -11,0 Max 23,0

Unmittelbar nach Abnahme der Testpflaster (Zeitpunkt 0) war ein deutlicher, signifikanter Anstieg der Corneometrie-Werte an allen 4 Teststellen (NLS 0,5 %, NLS 0,25 %, Wasser, Leerkammer) im Vergleich zum Basalwert mit einem nachfolgenden Abfall bis zum Meßzeitpunkt 15 Minuten nach Pflasterabnahme sichtbar. Die höchsten Werte ergaben sich für die NLS 0,5 %-Kammer, gefolgt von der NLS 0,25 %-Kammer, der Wasser- und der Leerkammer. Sowohl die

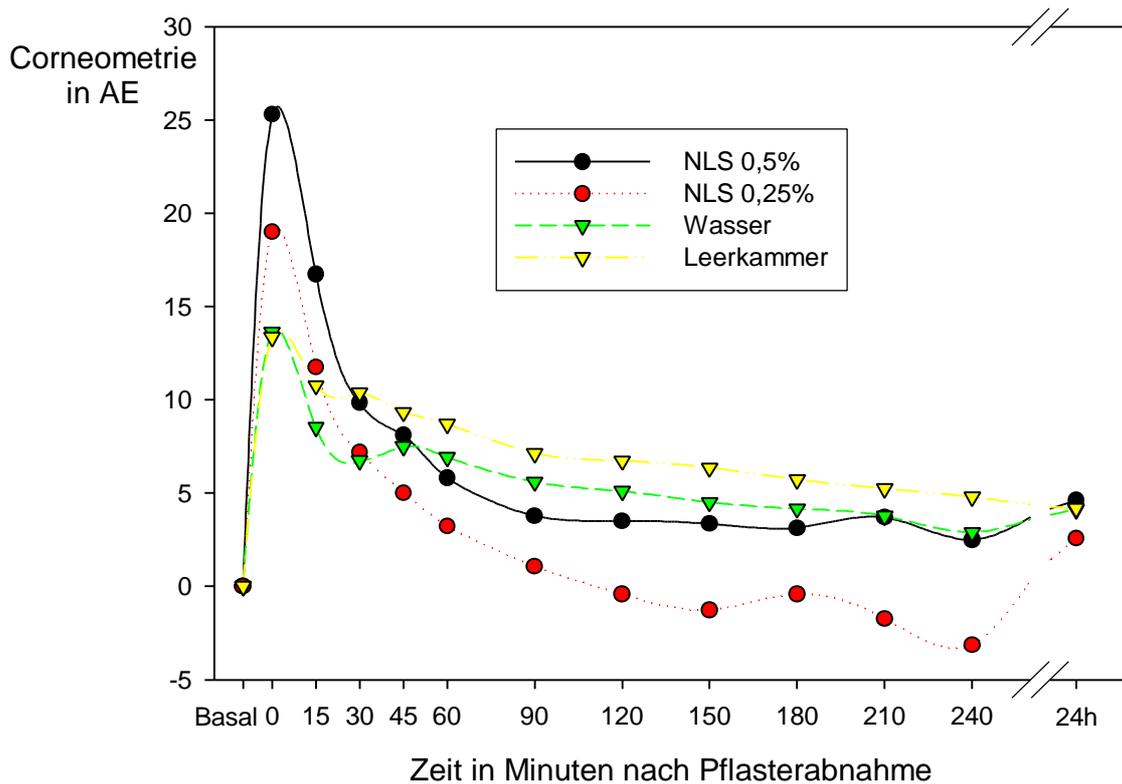
Meßwerte für die Leerkammer wie auch für die Wasserkammer wiesen zu allen nachfolgenden Meßzeitpunkten im Vergleich zum Basalwert signifikante Unterschiede auf. Im Vergleich zum Basalwert zeigten sich signifikant erhöhte Meßwerte für die NLS 0,5 %-Kammer ebenfalls zu allen weiteren Meßzeitpunkten, für die NLS 0,25 %-Kammer jedoch nur bis 60 Minuten nach Abnahme der Testpflaster, ab 120 Minuten nach Pflasterabnahme waren die Corneometrie-Werte der NLS 0,25 %-Kammer sogar niedriger als der Basalwert, jedoch nicht signifikant. Dabei lagen die Corneometrie-Meßwerte bei der NLS 0,25 %-Kammer stets signifikant niedriger als die der NLS 0,5 %-Kammer, gefolgt von der Wasser- und der Leerkammer mit den höchsten Werten zu allen Meßzeitpunkten später als 15 Minuten nach Pflasterabnahme. Bei den Corneometrie-Werten 24 Stunden nach Abnahme der Testpflaster war ein erneuter hochsignifikanter Anstieg für die Wasser- und Leerkammer sowie für beide NLS-Kammern zu beobachten im Vergleich zum Basalwert. Die höchsten Werte ergaben sich hier für die NLS 0,5 %-Kammer, gefolgt von der Leer- und der Wasserkammer.

Im Vergleich der Corneometrie-Meßwerte der Leer- und der Wasserkammer waren keine signifikanten Unterschiede zu den unterschiedlichen Meßzeitpunkten sichtbar. Im Vergleich der NLS 0,5 %-Kammer zur Wasserkammer waren nur bis 30 Minuten nach Pflasterabnahme signifikant höhere Meßwerte bei der NLS-Kammer nachzuweisen und erneut 24 Stunden nach Pflasterabnahme. Für die NLS 0,25 %-Kammer zeigten sich signifikante Unterschiede zur Wasserkammer direkt bei Abnahme der Testpflaster und zwischen 45 und 240 Minuten nach Pflasterabnahme, wobei die Corneometrie-Werte der NLS 0,25 %-Kammer zu allen Meßzeitpunkten später als 45 Minuten nach Pflasterabnahme unter denen der Wasserkammer lagen.

In der Untersuchung der Korrelation zwischen der erfaßten Hautreaktion auf NLS 24 Stunden nach Abnahme der Testpflaster und der Reaktion auf Wasser ergab sich eine signifikante Korrelation.

### 3.2.2. Zeitlicher Verlauf der Corneometrie-Werte

Die Änderung der Corneometrie-Werte nach Entfernen des Pflasters ist anschaulich in der Abbildung 3.2 erkennbar ( $\Delta$ -Corneometrie-Werte).



**Abbildung 3.2:**  $\Delta$ -Corneometrie-Werte in Anzeige-Einheiten im Verlauf der Messungen: Meßwerte von 0 Minuten bis 24 Stunden nach Pflasterabnahme

Im zeitlichen Verlauf der Corneometrie-Werte nach Abnahme der Testpflaster wurden Vergleiche der Meßwerte (Absolutwerte) aufeinanderfolgender Meßzeitpunkte mit dem t-Test für gepaarte Stichproben durchgeführt (Tabelle 3.4).

Tabelle 3.4: Verlauf der Corneometrie-Meßwerte: Signifikanzniveau beim Vergleich aufeinanderfolgender Meßwerte und Abnahme der Werte (vom vorhergehenden zum jeweils nachfolgenden Meßzeitpunkt) in % (Absolutwerte), ns = nicht signifikant

Zeit in min/h Irritans												
Leerkammer	P<0,05 -6,8%	ns -0,6%	ns -1,7%	ns -1,0%	ns -1,6%	ns -0,7%	ns -0,6%	ns -1,1%	ns -0,8%	ns -0,8%	ns -1,1%	
Wasser	P<0,01 -7,7%	ns -2,9%	ns +1,2%	ns -0,9%	ns -1,7%	ns -0,9%	ns -1,0%	ns -0,6%	ns -0,7%	ns -1,5%	ns +2,2%	
NLS 0,25%	P<0,01 -10,2%	P<0,01 -7,1%	P<0,01 -3,9%	P<0,05 -3,3%	P<0,05 -3,6%	P<0,05 -2,8%	ns -1,6%	ns -1,0%	ns -1,9%	ns -2,3%	P<0,01 +11,7%	
NLS 0,5%	P<0,01 -11,1%	P<0,01 -10,0%	P<0,05 -3,8%	P<0,05 -3,7%	P<0,05 -3,5%	ns -0,5%	ns -0,3%	ns -0,4%	ns +1%	ns -2,2%	ns +3,8%	

Im Vergleich der Corneometrie-Meßwerte jeweils aufeinanderfolgender Meßzeitpunkte zeigte sich ein signifikanter Anstieg der Corneometrie-Werte bei allen Kammern zum Zeitpunkt der Pflasterabnahme im Vergleich zum Basalwert mit einer erneuten steilen Abnahme der Werte bis 15 Minuten nach Abnahme der Testkammern. Für die NLS-Kammern war eine weitere signifikante Abnahme der Corneometrie-Werte für NLS 0,5 % bis 90 Minuten, für NLS 0,25 % sogar bis 120 Minuten nach Abnahme der Testpflaster sichtbar. In der Messung 24 Stunden im Vergleich zu 240 Minuten nach Abnahme der Testpflaster zeigte sich für beide NLS-Kammern erneut eine signifikante Zunahme der Corneometrie-Werte im Vergleich zu den Meßwerten 240 Minuten nach Abnahme der Testpflaster, nicht jedoch für die Leer- und die Wasserkammer.

### 3.3. Ergebnisse Chromametrie

#### 3.3.1. Basisdaten

Da bei der Beurteilung irritativer Hautreaktionen insbesondere die Erfassung des Erythems, d. h. der Hautrötung und damit des  $a^*$ -Wertes in der Colorimetrie, eine zentrale Stellung einnimmt, erfolgte die statistische Auswertung dieses Parameters der Chromametrie. Tabelle 3.5 zeigt die  $\Delta$ -Chromametrie- $a^*$ -Werte, die sich aus der Differenz der gemessenen Absolutwerte und dem Basalwert ergeben. Dargestellt sind die  $\Delta$ -Mittelwerte, Standardabweichungen sowie Minima und Maxima zu den unterschiedlichen Meßzeitpunkten nach Pflasterabnahme.

**Tabelle 3.5:** Basalwert und  $\Delta$ -Chromametrie- $a^*$ -Werte in Anzeige-Einheiten:  $\Delta$ -Mittelwert  $\pm$  Standardabweichung, Minimal- und Maximal-Meßwerte (Min/Max) zu den unterschiedlichen Meßzeitpunkten

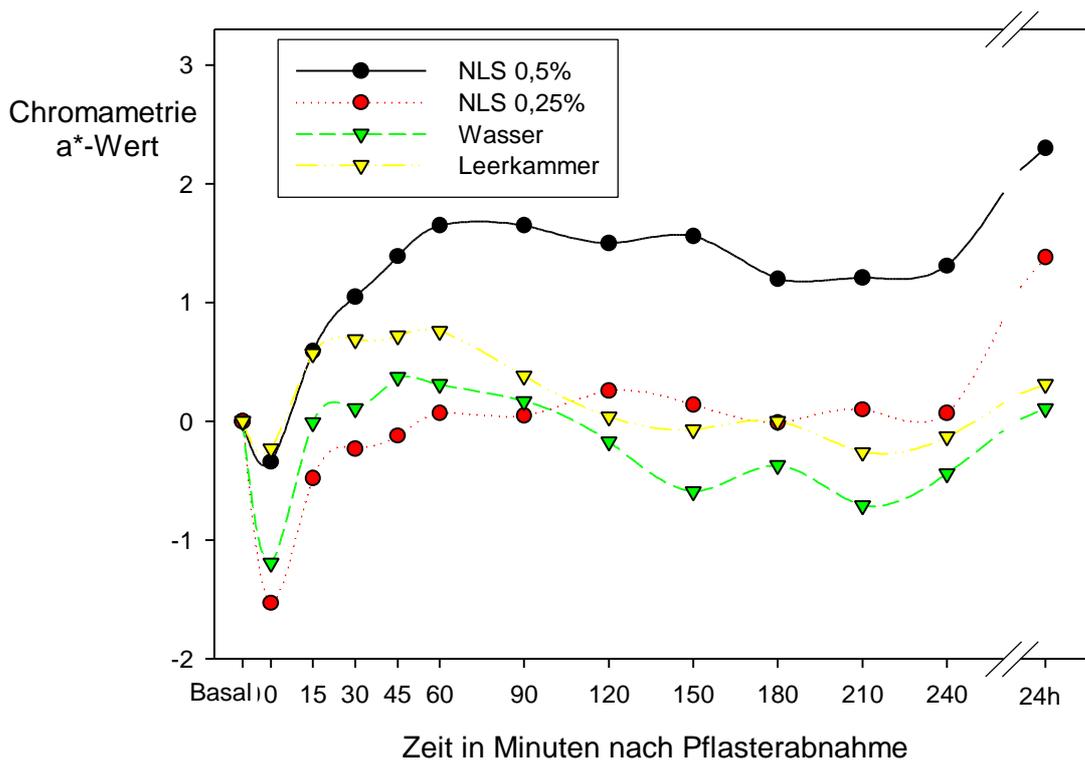
	Leerkammer		Wasser		NLS 0,25 %		NLS 0,5 %	
Basal	9,22 $\pm$ 1,70	Min 5,70 Max 12,90						
0 min	-0,23 $\pm$ 2,12	Min -5,00 Max 5,20	-1,19 $\pm$ 1,49	Min -4,90 Max 2,40	-1,53 $\pm$ 1,58	Min -5,40 Max 3,20	-0,34 $\pm$ 2,11	Min -3,80 Max 3,70
15 min	0,57 $\pm$ 2,13	Min -3,70 Max 5,17	-0,01 $\pm$ 1,90	Min -3,50 Max 4,23	-0,48 $\pm$ 2,20	Min -5,60 Max 7,00	0,59 $\pm$ 1,90	Min -3,50 Max 3,60
30 min	0,69 $\pm$ 2,07	Min -4,00 Max 5,20	0,11 $\pm$ 2,30	Min -3,21 Max 5,30	-0,23 $\pm$ 2,20	Min -4,50 Max 4,60	1,05 $\pm$ 2,30	Min -3,00 Max 6,10
45 min	0,72 $\pm$ 2,03	Min -2,90 Max 7,10	0,30 $\pm$ 2,18	Min -3,90 Max 5,20	-0,12 $\pm$ 2,30	Min -5,30 Max 5,50	1,39 $\pm$ 2,22	Min -2,50 Max 6,30
60 min	0,76 $\pm$ 1,94	Min -3,40 Max 4,80	0,31 $\pm$ 2,18	Min -3,50 Max 6,30	0,07 $\pm$ 2,26	Min -4,00 Max 5,00	1,65 $\pm$ 2,43	Min -3,00 Max 6,80
90 min	0,38 $\pm$ 1,90	Min -4,40 Max 5,20	0,17 $\pm$ 2,04	Min -3,50 Max 5,70	0,05 $\pm$ 2,26	Min -4,30 Max 5,40	1,65 $\pm$ 2,37	Min -2,40 Max 5,90
120 min	0,04 $\pm$ 1,74	Min -3,90 Max 3,90	-0,17 $\pm$ 1,64	Min -3,20 Max 3,15	0,26 $\pm$ 2,06	Min -3,60 Max 4,40	1,50 $\pm$ 2,29	Min -3,20 Max 6,50
150 min	0,07 $\pm$ 7,92	Min -4,30 Max 4,00	-0,59 $\pm$ 1,69	Min -3,30 Max 3,10	0,14 $\pm$ 2,10	Min -4,20 Max 4,20	1,56 $\pm$ 2,37	Min -4,00 Max 7,10
180 min	0,00 $\pm$ 1,55	Min -3,50 Max 3,60	-0,37 $\pm$ 1,82	Min -2,90 Max 4,90	-0,01 $\pm$ 1,95	Min -4,40 Max 5,80	1,20 $\pm$ 2,15	Min -3,00 Max 5,90
210 min	-0,26 $\pm$ 1,77	Min -3,60 Max 3,60	0,71 $\pm$ 1,53	Min -3,30 Max 3,00	0,10 $\pm$ 1,94	Min -4,40 Max 5,40	1,21 $\pm$ 2,19	Min -3,30 Max 5,10
240 min	-0,13 $\pm$ 1,80	Min -3,30 Max 4,00	-0,44 $\pm$ 1,71	Min -3,90 Max 3,80	0,07 $\pm$ 1,78	Min -4,70 Max 4,40	1,31 $\pm$ 2,26	Min -3,10 Max 5,70
24 h	0,31 $\pm$ 2,20	Min -3,90 Max 9,50	0,11 $\pm$ 2,11	Min -2,90 Max 9,40	1,38 $\pm$ 2,35	Min -2,20 Max 8,80	2,30 $\pm$ 2,69	Min -2,80 Max 7,50

Unmittelbar nach Abnahme der Testpflaster (Zeitpunkt 0) war ein deutlicher, signifikanter Abfall der Chromametrie-a\*-Werte an allen 4 Teststellen (NLS 0,5 %, NLS 0,25 %, Wasser, Leerkammer) im Vergleich zum Basalwert mit einem erneuten Anstieg bis zum Meßzeitpunkt 15 Minuten nach Pflasterabnahme festzustellen. Zum Zeitpunkt 0 direkt nach Abnahme der Testpflaster zeigten sich die höchsten Chromametrie-a\*-Werte für die Leerkammer, gefolgt von der NLS 0,5 %-Kammer, der Wasserkammer und der NLS 0,25 %-Kammer mit den niedrigsten Chromametrie-a\*-Werten. Zu allen nachfolgenden Meßzeitpunkten ergaben sich im Vergleich zum Basalwert durchgängig signifikant erhöhte Meßwerte für die NLS 0,5 %-Kammer. Für die NLS 0,25 %-Kammer hingegen waren bereits 15 Minuten nach Abnahme der Testpflaster keine signifikanten Unterschiede zum Basalwert feststellbar. Zu allen späteren Meßzeitpunkten lagen die Chromametrie-a\*-Meßwerte der NLS 0,5 %-Kammer durchgängig höher als die der Wasser- und der Leerkammer, gefolgt von den Werten der NLS 0,25 %-Kammer. Für die Leerkammer zeigten sich im Vergleich zum Basalwert signifikant erhöhte Chromametrie-a\*-Werte bis 60 Minuten nach Abnahme der Testpflaster, für die Wasserkammer nur bis 15 Minuten nach Pflasterabnahme. Für die NLS 0,25 %-Kammer waren nach initialem Abfall bei den weiteren Messungen ab 15 Minuten bis 240 Minuten nach Abnahme der Testpflaster keine signifikanten Unterschiede zum Basalwert nachweisbar. Erst 60 Minuten nach erfolgter Pflasterabnahme lagen die Werte geringfügig, jedoch nicht signifikant über dem Basalwert, ab 120 Minuten nach Pflasterabnahme auch über den Werten der Leer- und Wasserkammer.

Bei den Chromametrie-a\*-Werten 24 Stunden nach Abnahme der Testpflaster war bei allen Kammern ein erneuter Anstieg zu beobachten. Für die Leer- und die Wasserkammer war diese Erhöhung im Vergleich zum Basalwert nicht signifikant, für beide NLS-Kammern war hingegen eine hochsignifikante Erhöhung im Vergleich zum Basalwert nachweisbar. Die höchsten Werte ergaben sich hier für die NLS 0,5 %-Kammer, gefolgt von der NLS 0,25 %-Kammer, der Leerkammer und der Wasserkammer.

### 3.3.2. Zeitlicher Verlauf der Chromametrie-a\*-Werte

Der Verlauf der Chromametrie-a\*-Werte lässt sich in Abbildung 3.3 erkennen ( $\Delta$ -Chromametrie-a\*-Werte). Nach einem anfänglichen Absinken der Meßwerte unter den Basalwert stiegen diese im weiteren Verlauf erneut an.



**Abbildung 3.3:**  $\Delta$ -Chromametrie-a\*-Werte in Anzeige-Einheiten im Verlauf der Messungen: Meßwerte von 0 Minuten bis 24 Stunden nach Pflasterabnahme

Im zeitlichen Verlauf der Chromametrie-a\*-Werte (Absolutwerte) nach Abnahme der Testpflaster wurden Vergleiche der Meßwerte aufeinanderfolgender Meßzeitpunkte mit dem t-Test für gepaarte Stichproben durchgeführt (Tabelle 3.6).

**Tabelle 3.6:** Verlauf der Chromametrie-a\*-Meßwerte: Signifikanzniveau beim Vergleich aufeinanderfolgender Meßwerte, Abnahme der Werte (vom vorhergehenden zum jeweils nachfolgenden Meßzeitpunkt) in % (Absolutwerte),  
ns = nicht signifikant

Zeit in min/h Irritans												
Leerkammer	P<0,01 +8,9%	ns +1,3%	ns +0,3%	ns +0,3%	ns -1,6%	P<0,05 -3,5%	ns -1,2%	ns -0,7%	ns -1,8%	ns +1,5%	P<0,05 +4,8%	
Wasser	P<0,01 +14,7%	ns +1,3%	ns +2,8%	ns -0,6%	ns -1,5%	P<0,05 -3,6%	P<0,05 -4,6%	ns +2,5%	P<0,05 -3,7%	ns +3,2%	P<0,05 +6,3%	
NLS 0,25%	P<0,01 +13,6%	ns +2,9%	ns +1,2%	ns +2,1%	ns -0,1%	ns +2,1%	ns -1,3%	ns -1,5%	ns +1,1%	ns -0,3%	P<0,01 +14,9%	
NLS 0,5%	P<0,01 +10,5%	ns +3,7%	ns 2,5%	ns -0,1%	ns -1,3%	ns +0,5%	ns -3,4%	ns -0,1%	ns +1%	ns -2,2%	P<0,01 +9,4%	

Es zeigte sich zunächst eine signifikante Abnahme der Chromametrie-a\*-Werte zum Zeitpunkt der Pflasterabnahme im Vergleich zum Basalwert mit einem anschließenden signifikanten Anstieg der Werte bis zum Meßzeitpunkt 15 Minuten nach Pflasterabnahme bei allen Kammern. Bei der Erfassung der Chromametrie-a\*-Werte 24 Stunden im Vergleich zu 240 Minuten nach Abnahme der Testpflaster zeigte sich für alle Kammern erneut eine hochsignifikante Zunahme der Chromametrie-a\*-Werte. Bei der Leerkammer war ferner eine signifikante Abnahme der Meßwerte zwischen den Messungen 90 und 120 Minuten nach Pflasterabnahme nachweisbar, ebenso bei der Wasserkammer zwischen den Messungen 90 und 120 Minuten, 120 und 150 Minuten sowie 180 und 210 Minuten nach Pflasterabnahme. Die Erythemreaktion auf NLS 24 Stunden nach Abnahme der Testpflaster korrelierte signifikant mit der entsprechenden Reaktion auf Wasser.

## **4. DISKUSSION**

Bei der Evaluation kutaner Testreaktionen gibt es, abhängig von der jeweils verwendeten Meßmethode, spezifische Störfaktoren. Klassische Störfaktoren sind für die TEWL-Messung im Kapitel 1.4.1, für die Corneometrie im Kapitel 1.4.2 und für die Colorimetrie im Kapitel 1.4.3. beispielhaft aufgeführt. Bei der Auswertung epikutaner Testungen (sowohl irritativer wie auch allergischer) ist ein klassisches Testartefakt auf den Einfluß des Testpflasters zurückzuführen. Hierbei ist das Trauma der Pflasterablösung ebenso zu berücksichtigen wie mögliche Einflüsse durch die Okklusionswirkung des Testpflasters. Die Untersuchungen dieser Arbeit befassen sich mit dem Einfluß der Okklusion auf die Meßergebnisse bei Irritationstestungen mit NLS. Unterschieden wird dabei: Einfluß der Okklusion allein (untersucht durch die Leerkammer), Einfluß der Okklusion in Verbindung mit Wasser (untersucht durch die Wasserkammer) und Einfluß der Okklusion in Verbindung mit einem klassischen Detergens (untersucht durch okklusive epikutane Applikation von 2 unterschiedlichen NLS-Konzentrationen).

Da keine signifikanten Unterschiede im zeitlichen Verlauf der Meßwerte nach Abnahme der Testpflaster für die unterschiedlichen Applikationszeiten bei den verschiedenen hautphysiologischen Methoden nachweisbar waren, werden die Ergebnisse der drei Applikationszeiten daher zusammengefaßt diskutiert.

Im folgenden werden die Ergebnisse getrennt nach den unterschiedlichen Evaluationsmethoden diskutiert:

### **4.1. TEWL**

In Übereinstimmung mit vorhergehenden Studien zeigte sich unmittelbar nach Abnahme der Testpflaster (Zeitpunkt 0) ein steiler, hochsignifikanter Anstieg der TEWL-Werte an allen 4 Teststellen (NLS 0,25 %, NLS 0,5 %, Wasser, Leerkammer) im Vergleich zum Basalwert (Barel AO & Clarys P, 1995; Berardesca E et al., 1992; Pinnagoda J et al., 1989). Dabei waren auch in der

Phase des stärksten Einflusses der Okklusion signifikante Unterschiede zwischen den einzelnen Testkammern nachweisbar, die sich auch bei den nachfolgenden Meßzeitpunkten fortsetzten. Die höchsten Werte ergaben sich für NLS 0,5 %, gefolgt von NLS 0,25 %, Wasser und der Leerkammer. An allen Teststellen war eine kontinuierliche Abnahme der Werte bis 120 Minuten nach Pflasterabnahme zu sehen.

Die rasche Abnahme der TEWL-Werte innerhalb weniger Minuten nach Entfernen der Testpflaster wurde in mehreren Studien beschrieben (Agner T & Serup J, 1993; Barel AO & Clarys P, 1995; Berardesca E et al., 1990; Pinnagoda J et al., 1989; Tupker RA et al., 1990; Wilhelm KP et al., 1993). Einen großen Anteil dieses superfiziellen Wasserverlustes nimmt die Abdiffusion des überschüssigen Wassers ein, welches sich aufgrund der Okklusion in den obersten Hautschichten angesammelt hat (im weitesten Sinn ein Mazerations-Effekt) (Barel AO & Clarys P, 1995; van Neste D, 1990; Wilhelm KP et al., 1993). Dieser Okklusionseffekt (oder besser Okklusionsartefakt) nimmt nach Pflasterabnahme so lange ab, bis der TEWL ein Plateau erreicht. Dieser Plateauwert zeigt dann den realen, von Okklusionsartefakten nur noch gering beeinflussten transepidermalen Wasserverlust an. Ist dieser höher als der Basalwert, so muß von einer Barrierschädigung ausgegangen werden.

Die vorliegenden Ergebnisse der TEWL-Werte nach unterschiedlichen Applikationszeiten (12, 24 und 48 Stunden) zeigten bei der Leerkammer, der Wasserkammer und auch den NLS-Kammern keinen signifikanten Unterschied bezüglich der Kinetik der Meßwertveränderung nach Entfernen der Testpflaster. Dies verdeutlicht, daß die entscheidenden Vorgänge, welche zu den Okklusionseffekten führen (Mazeration und Irritation), bereits innerhalb der ersten 12 Stunden in der Haut vonstatten gehen. Diese Ergebnisse stehen in Einklang mit Untersuchungen bezüglich der Beeinflussung der Barrierefunktion des Stratum corneum durch Okklusion mit einer leeren Plastik-Testkammer durch Fluhr et al. (Fluhr JW et al., 1999) über 24, 48, 72 und 96 Stunden. Auch hier zeigten sich signifikant erhöhte TEWL-Werte bereits nach 24-stündiger Okklusion mit einem weiteren geringen Anstieg nach 48-stündiger Okklusion. Bei längerer Okklusion über 72 Stunden und 96 Stunden ergab sich kein

weiterer Anstieg der TEWL-Werte, die Barrierschädigung war jedoch im Vergleich zum Basalwert vor Okklusion auch hier noch signifikant nachweisbar (Fluhr JW et al., 1999).

Im folgenden werden die Ergebnisse der TEWL-Messungen getrennt nach den einzelnen Testkammern diskutiert:

#### **4.1.1. Leerkammer**

Der reine Okklusionseffekt müßte sich in dem vorliegenden Testdesign in erster Linie in den Testergebnissen der Leerkammer widerspiegeln. Zunächst war eine massive Abnahme des bei Pflasterentfernung deutlich erhöhten TEWL innerhalb der ersten 15 Minuten zu beobachten, gefolgt von einer geringeren Abnahme bis zu 60 Minuten (Abbildung 3.1). Dabei zeigten sich im Vergleich zum Basalwert signifikant erhöhte TEWL-Werte für die Leerkammer nur bis 60 Minuten nach Pflasterabnahme, was die Ergebnisse einer vorhergehenden Studie von Agner und Serup stützt (Agner T & Serup J, 1993). Hier erfolgte die Erfassung des TEWL jedoch mit dem Evaporimeter der Firma Servo Med. Die in in der vorliegenden Studie zu beobachtende weitere Abnahme der TEWL-Werte im Vergleich aufeinanderfolgender Meßwerte ist dann weniger in der Abbildung als vielmehr vor allem durch die statistische Auswertungen der Meßwerte zu erfassen (Tabelle 3.2.). Hierbei fand sich überraschenderweise, daß die Zeit bis zum Erreichen des Plateaus (d. h. die Zeit bis zum reinen, nicht mehr durch Okklusionseffekte beeinflussten TEWL) 150 Minuten betrug. Auch in der bereits genannten Studie von Agner und Serup war eine signifikante Abnahme der TEWL-Werte im zeitlichen Verlauf bis 150 Minuten nach Pflasterabnahme nachweisbar (Agner T & Serup J, 1993). Dieses ist eine sehr lange Zeitspanne, vergleicht man sie mit den Aussagen von van Neste und Berardesca et al., die von einem Einfluß der Okklusion auf den TEWL von maximal 30-60 Minuten ausgehen (Berardesca E et al., 1992; van Neste D, 1990). Dieser scheinbare Widerspruch könnte einerseits in den unterschiedlichen Applikationszeiten und dem unterschiedlichen Testdesign aber andererseits auch in den unterschiedlichen Meßabständen liegen. Bei den Untersuchungen von Berardesca et al. (Berardesca E et al., 1992), Schäfer et

al. (Schäfer P et al., 2002) und van Neste (van Neste D, 1990) wurden Meßabstände von 45 Sekunden gewählt, welche evtl. zu kurz sein könnten. Bei einer Verlängerung der Meßabstände werden die Unterschiede pro untersuchter Zeiteinheit größer und können so Signifikanzniveau erreichen. Der in der vorliegenden Studie bis zu 150 Minuten nach Abnahme der Testpflaster nachweisbare signifikante Rückgang der TEWL-Werte im zeitlichen Verlauf könnte sich daraus ergeben, daß die Meßwerte zunächst im Abstand von 15 Minuten und später im Abstand von 30 Minuten erhoben wurden. Daher werden in dieser Untersuchung auch geringfügigere Veränderungen erfaßt, die bei kurzfristigeren Messungen in z. B. 5-minütigen oder sogar noch kürzeren Intervallen nicht als signifikant aufgefallen wären.

Auch Ramsing und Agner konnten bei einer Studie zum okklusiven Einfluß von Schutzhandschuhen bei Messungen ½ Stunde, 1 Stunde und 2 Stunden nach Entfernen der Handschuhe, die zuvor an drei aufeinanderfolgenden Tagen über mindestens 6 Stunden pro Tag getragen worden waren, erhöhte TEWL-Werte nur bis bis ½ Stunde nach Abnahme der Handschuhe nachweisen im Vergleich zur Kontrollhand und den basalen Werten (Ramsing DW & Agner T, 1996). Dabei war jedoch eine weitere Abnahme der TEWL-Werte im zeitlichen Verlauf noch bis 3 Stunden nach Beendigung der Okklusion zu beobachten, die mit den Ergebnissen der vorliegenden Studie übereinstimmt.

Aufgrund unserer Untersuchungen und den vorhandenen Studien kann deshalb davon ausgegangen werden, daß die reinen Okklusionseffekte (d. h. ohne daß ein Irritans der Testkammer zugefügt wurde) innerhalb der ersten 30 Minuten stark abnehmen, aber bis zu 150 Minuten noch nachweisbar sind. Außerdem ist anzunehmen, daß die Okklusion an sich zu einer Schädigung der Wasserpermeabilitätsbarriere führt und Effekte über die reine Okklusion mit nachfolgender Hyperhydratation hinaus zeigt. Diese Barrierschädigung führt möglicherweise auch zu einer verstärkten Wirkung der in der okklusiven Testkammer applizierten Irritantien.

Gioia et al. entwickelten in einer Studie zur Dynamik der TEWL-Werte nach Entfernung okklusiver Bedeckungen der Haut ein mathematisches Modell zur Abschätzung dieser Okklusionseffekte (Gioia F & Celleno L, 2002). In diesem

Modell beschreiben sie die Erhöhung der TEWL-Werte nach Okklusion als einen transienten Effekt, welcher einen charakteristischen Verlauf nimmt: Zunächst kommt es zu einer initialen massiven Abnahme der unmittelbar nach Aufhebung der Okklusion stark erhöhten TEWL-Werte, die zunehmend geringer wird und schließlich in eine Plateauphase einmündet. Auffallend an der Beschreibung dieses Effektes durch die Autoren ist, daß nach ihren Untersuchungen der Maximalwert bereits nach 1 Minute nach Aufhebung der Okklusion halbiert ist. Dabei führten die Autoren die Studie mit einer Okklusionszeit von nur 2 Stunden durch (Gioia F & Celleno L, 2002). Diese Applikationszeit ist jedoch für den Vergleich mit der dermatologischen Routine ungeeignet, da Epikutantestungen zumeist 24 oder 48 Stunden auf der Haut verbleiben. Auch die vorliegende Studie zeigte, daß bei einer reinen Okklusion (hier die Leerkammer) über 12–48 Stunden bereits 15 Minuten nach Pflasterentfernung nur noch ca. 50 % des Maximalwertes vorhanden war, und somit ein Großteil des Okklusionseffektes in den ersten Minuten bereits nachließ, jedoch darüber hinaus noch länger nachweisbar blieb.

#### **4.1.2. Wasserkammer**

Die länger andauernde signifikante TEWL-Wert-Erhöhung bei der Wasserkammer bis 150 Minuten nach Entfernen der Testpflaster im Vergleich zum Basalwert in der vorliegenden Studie weist auf eine Beeinflussung der epidermalen Barriere durch Wasser nach okklusiver Applikation im Sinne eines milden Irritans hin, welche auch schon in anderen Studien angenommen wurde (Agner T & Serup J, 1993; Tsai TF & Maibach HI, 1999). Die Wasserkammer ist somit keine reine Kontrollkammer. Auch Wasser alleine muß als ein mildes Irritans angesehen werden, welches sicherlich stärker zu bewerten ist als die durch die reine Okklusion verursachten Effekte (van der Valk PG et al., 1984). Dies zeigte sich auch bei der vorliegenden Studie in den TEWL-Werten der Wasserkammer, die durchgängig zu allen Meßzeitpunkten höher waren als die Basalwerte und auch höher als die Werte der Leerkammer. Im Vergleich der Wasserkammer mit der Leerkammer ergaben sich signifikant höhere Werte für die Wasserkammer bis 240 Minuten nach Pflasterabnahme. Aufgrund des vermehrt mit der Testkammer zugeführten Wassers erfolgt die Abdiffusion bei

der Wasserkammer langsamer, was evtl. auch zu geringen, jedoch länger anhaltenden Barrierschäden führt, die sich in einer länger andauernden Abnahme der TEWL-Werte bis zum Erreichen des Plateaus äußern.

Der Okklusionseffekt auf die Wasserkammer war (ähnlich dem auf die Leerkammer) innerhalb der ersten 15 Minuten anhand der abnehmenden Kurve deutlich zu sehen. Danach wies die Kurve einen gleichmäßig abfallenden Verlauf bis zum Meßzeitpunkt 180 Minuten nach Pflasterabnahme auf, wo sie in ein Plateau übergang. Diese Ergebnisse stehen in Einklang mit der bereits angeführten Studie von Agner und Serup, die ebenfalls eine signifikante Abnahme der Werte bis 180 Minuten nach Pflasterabnahme zeigen konnten (Agner T & Serup J, 1993). Bis zu diesem Zeitpunkt waren auch die Unterschiede zwischen aufeinanderfolgenden Meßzeitpunkten statistisch signifikant.

Es ist davon auszugehen, daß das applizierte Wasser in die obersten Schichten des Stratum corneum eindringt und dort aufquellend wird. Der makroskopische Eindruck ist der einer mazerierten Haut, der entsprechende hautphysiologische Zustand ist der eines (artifizuell) erhöhten TEWL-Meßwertes. Da die wasserbindenden Strukturen der Haut nicht in der Lage sind, dieses überschüssige Wasser länger zu binden, verdampft es nach Beendigung der Okklusion wieder. Die Geschwindigkeit dieser Abdiffusion ist jedoch dabei offensichtlich erheblich langsamer als bisher vermutet (Berardesca E et al., 1992; Pinnagoda J et al., 1989; van Neste D, 1990).

In einer anderen Studie wurde angenommen, daß ein reiner Mazerations-Effekt durch das Verdampfen von exogen zugeführtem Wasser nach 20 Minuten abgeschlossen sei. In jener Studie wurde allerdings die Mazeration nur durch ein 20-minütiges Bad erzeugt (Stender IM et al., 1990). In einer Studie von Wilhelm et al. konnte nach 5-minütiger okklusiver Applikation von Wasser eine Erhöhung des skin surface water loss (SSWL) direkt nach Abnahme der Testpflaster beobachtet werden mit anschließendem raschen Abfall bis auf die basalen Werte innerhalb von 10 Minuten (Wilhelm KP et al., 1993). Nach einmaliger okklusiver epikutaner Applikation von Wasser über 30 Minuten wurde bei Messungen von Lee und Maibach 30 Minuten nach Abnahme der

Testpflaster hingegen bereits kein signifikanter Unterschied zu den Basalwerten in der Messung des TEWL nachgewiesen (Lee CH & Maibach HI, 1994). Die in der vorliegenden Studie vorgenommene Applikation einer Wasserkammer über 12-48 Stunden schafft hingegen offenbar einen deutlich länger anhaltenden Okklusionseffekt. Im Vergleich dazu war in einer Studie von Pinnagoda et al. nach 24-stündiger okklusiver Applikation von Wasser mit nachfolgenden Messungen 1, 2 und 4 Stunden nach Abnahme der Testpflaster eine signifikante Erhöhung der TEWL-Werte eine Stunde nach Abnahme des Testpflasters noch nachweisbar. Bei der Messung zwei Stunden nach Abnahme des Testpflasters lagen die TEWL-Werte bereits nur noch gering über den Basalwerten (Pinnagoda J et al., 1989). Der wesentliche Unterschied zwischen den Ergebnissen der vorliegenden Studie und den bisher durchgeführten Untersuchungen dürfte dabei neben der Applikationsmethode und Applikationsdauer sowie den Testverfahren (z.B. Verwendung eines Evaporimeter der Firma Servo-Med bei der Studie von Pinagoda) ebenfalls in den unterschiedlichen Meßzeitpunkten nach Pflasterabnahme liegen.

#### **4.1.3. NLS-Kammern**

Der in der vorliegenden Studie beobachtete steile Anstieg der TEWL-Werte direkt nach Pflasterabnahme mit nachfolgendem raschen Abfall wurde bereits in mehreren Studien nach Applikation von NLS beschrieben (Agner T & Serup J, 1993; Barel AO & Clarys P, 1995; Berardesca E et al., 1990; Pinnagoda J et al., 1989; Tupker RA et al., 1990; Wilhelm KP et al., 1993). Bezüglich der Unterschiede zwischen den TEWL-Werten nach Applikation von NLS und dem Basalwert vor Applikation zeigten sich übereinstimmend mit einer vergleichbaren Studie von Agner und Serup signifikant erhöhte TEWL-Werte zu allen Meßzeitpunkten (Agner T & Serup J, 1993), in der vorliegenden Studie sogar hochsignifikant für beide NLS-Konzentrationen (0,25 % und 0,5 %). Auch im Vergleich der Leerkammer mit den NLS-Kammern und der Wasserkammer mit den NLS-Kammern bestanden zu allen Meßzeitpunkten signifikant höhere TEWL-Werte für die NLS-Kammern. Dabei lagen die TEWL-Werte der NLS 0,5 %-Kammer durchgängig zu allen Meßzeitpunkten signifikant höher als die der NLS 0,25 % Kammer. Dies bestätigt den konzentrationsabhängigen

Effekt der Hautreaktion auf NLS (Agner T & Serup J, 1990; Aramaki J et al., 2001; Fullerton A et al., 1994; van Neste D, 1990; Welzel J et al., 1998).

In den meisten Studien erfolgt die Erfassung des TEWL nach Applikation von NLS 20 Minuten nach Pflasterabnahme (Lee JY et al., 1997), 30 Minuten nach Abnahme der Testpflaster (Agner T & Serup J, 1990; Berardesca E & Maibach HI, 1988; Lammintausta K et al., 1987; Lee CH & Maibach HI, 1994; Leveque JL et al., 1984; van Neste D, 1990; Wilhelm KP, 1995) oder 60 Minuten danach (Agner T, 1991; Agner T & Serup J, 1990; Lammintausta K et al., 1988; Löffler H et al., 1999; van der Valk PG et al., 1984; Welzel J et al., 1996; Wilhelm KP et al., 1993), seltener wurden Intervalle von 2 Stunden (Fluhr JW et al., 1999; Pinnagoda J et al., 1989; Tupker RA et al., 1990), 3 Stunden (Baker H & Kligman AM, 1967), 4 Stunden (Pinnagoda J et al., 1989) oder 12 Stunden (van Neste D & de Brouwer B, 1992) eingehalten.

In einigen Studien erfolgten Messungen bis wenige Stunden nach Abnahme der okklusiven Testpflaster im Vergleich zur erneuten Messung 24 Stunden oder später nach Abnahme der Testpflaster. So konnten Agner und Serup nach 24-stündiger epikutaner Applikation von NLS 2,5 % 30–60 Minuten nach Abnahme der Testpflaster eine signifikante Erhöhung des TEWL im Vergleich zu einer Leerkammer und einer mit Wasser gefüllten Testkammer zeigen, die auch noch nach 48 und 96 Stunden nachweisbar war (Agner T & Serup J, 1989). Auch in einer nachfolgenden Studie von Agner et al. konnte für verschiedene Konzentrationen von NLS (0,12 %, 0,25 %, 0,5 % und 1 %) nach 24-stündiger epikutaner Applikation 1 Stunde nach Entfernen der Testpflaster sowie weitere 24 Stunden später eine signifikante Erhöhung der TEWL-Werte gezeigt werden (Agner T, 1991; Agner T & Serup J, 1990). Deutlich höhere TEWL-Werte ergaben sich bei Messungen 24 Stunden nach Entfernen der Testpflaster (Treffel P & Gabard B, 1996; Wilhelm KP, 1995), ein Testdesign, welches sich in der dermatologischen Routine immer breiter durchsetzt (Löffler H et al., 2001; Tupker RA et al., 1999; van Neste D & de Brouwer B, 1992; Welzel J et al., 1998; Wilhelm KP et al., 1989).

In den vorliegenden Messungen konnte nach Applikation von NLS unterschiedlicher Konzentrationen über jeweils 12, 24 oder 48 Stunden auch

24 Stunden nach Abnahme der Testpflaster noch eine signifikante Barrierschädigung im Vergleich zum Basalwert nachgewiesen werden. Dies steht in Übereinstimmung mit einer Reihe verschiedener Studien. So konnten Wilhelm et al. bei Messungen 24 Stunden nach Abnahme von Testpflastern nach erfolgter 24-stündiger Applikation verschiedener Konzentrationen von NLS-Lösungen (0,125 %, 0,25 %, 1 %, 2 % und 3 %) ebenfalls eine signifikante Erhöhung der TEWL-Werte beobachten.(Wilhelm KP et al., 1989) Gleiches fanden Treffel et al. bei Messungen des TEWL 24 Stunden nach Abnahme von Testpflastern unterschiedlicher NLS-Konzentrationen über eine Applikationszeit von 24 Stunden (Treffel P & Gabard B, 1996), Aramaki et al. mit unterschiedlichen NLS-Konzentrationen und Applikationszeiten, u. a. über 24 Stunden und Ablesung 24 Stunden nach Entfernung der Testpflaster (Aramaki J et al., 2001) und andere Gruppen (Welzel J et al., 1998; Wilhelm KP et al., 1994). Basketter et al. konnten nach 24-stündiger Applikation von NLS unterschiedlicher Konzentrationen eine Erhöhung der TEWL-Werte 24, 48 und (geringer) 72 Stunden nach Abnahme der Testpflaster beobachten (Basketter DA et al., 1998). Bei Messungen 24, 48, 72 bzw. 96 Stunden nach okklusiver Applikation von NLS 0,1 %, 0,25 % 0,5 % und 2 % über 24 Stunden zeigten sich die höchsten NLS-Werte nach 48 Stunden bei der höchsten Konzentration (Bruynzeel DP et al., 1982; Welzel J et al., 1998).

Bezüglich der Dauer einer nachweisbaren Irritation durch NLS war in einer Studie von van Neste et al. (van Neste D & de Brouwer B, 1992) nach 48-stündiger epikutaner Applikation von NLS 5 % 12 Stunden nach Abnahme der Testpflaster eine signifikante Erhöhung des TEWL zu beobachten, die im weiteren Verlauf bis zu 7 Tage nach Applikation anhielt. Lee et al. konnten nach einmaliger Applikation von NLS unterschiedlicher Konzentrationen über 24 Stunden TEWL-Wert-Veränderungen bis 2 Wochen nach Applikation zeigen (Lee JY et al., 1997). Dies steht in Übereinstimmung mit einer Studie von Wilhelm et al., die ebenfalls nach einmaliger epikutaner Applikation von NLS 0,5 % über 24 Stunden signifikante TEWL-Wert-Erhöhungen bis 14 Tage nach Abnahme der Testpflaster beobachteten (Wilhelm KP et al., 1993). Die Messungen erfolgten hier ebenfalls mit dem Corneometer 820 der Firma Courage & Khazaka (Köln).

Die vorliegenden Ergebnisse der TEWL-Werte wiesen hier nur geringe (nicht signifikante) Unterschiede zwischen den unterschiedlichen Applikationszeiten (12, 24 und 48 Stunden) auf, welches die Ergebnisse von Aramaki et al. bestätigt (Aramaki J et al., 2001). Dies läßt darauf schließen, daß die entscheidende Penetration von NLS in die Haut bereits nach wenigen Stunden weitgehend abgeschlossen ist, was durch entsprechende in vivo- und in vitro-Studien unterstützt wird (Agner T et al., 1990; Fullerton A et al., 1994). Der geringe Einfluß der Applikationsdauer beschränkt sich jedoch auf die NLS-Teststellen und hat auch hier nur eine Bedeutung für die Absolutwerte.

Die in der vorliegenden Studie aufgezeigte signifikante Abnahme der TEWL-Werte für beide NLS-Kammern bis 120 Minuten nach Pflasterabnahme weist im Vergleich zu der Leer- und der Wasserkammer auf ein zeitlich kürzeres Intervall des Okklusionsartefaktes hin. Bei der Leerkammer war eine signifikante Abnahme der TEWL-Meßwerte noch bis 150 Minuten nach Pflasterabnahme zu beobachten, bei der Wasserkammer sogar bis 180 Minuten. Ursächlich hierfür könnte die wesentlich stärkere Schädigung der epidermalen Barriere durch das Irritans NLS mit nachfolgend verstärkter Abdiffusion von Wasser durch das Stratum corneum sein. Im Vergleich zu der vorliegenden Studie konnten Agner und Serup in einer ähnlichen Studie nach okklusiver Applikation einer 0,5%igen Lösung über 24 Stunden eine signifikante Abnahme der TEWL-Werte nur bis 60 Minuten nach Entfernen der Testpflaster zeigen (Agner T & Serup J, 1993). Diese Unterschiede sind vermutlich durch das Studiendesign (Probandenzahl, unterschiedliche Evaporimeter, unterschiedliche Meßzeitpunkte) und unterschiedliche statistische Verfahren bei der Auswertung (Normalverteilung der Daten in der vorliegenden Studie, Anwendung verteilungsfreier Testverfahren bei Agner und Serup) zu erklären.

Die hochsignifikante Korrelation zwischen der erfaßten Hautreaktion auf NLS 24 Stunden nach Abnahme der Testpflaster und der Reaktion auf Wasser weist auf die Bedeutung von Wasser als ubiquitäres Irritans im Berufsumfeld hin (Tsai TF & Maibach HI, 1999). Die Verwendung von NLS zur berufsrelevanten Beurteilung der Hautempfindlichkeit bei Feuchtberufen erscheint somit von besonderer Bedeutung (Held E et al., 2002; Uter W et al., 1999).

## **4.2. Corneometrie**

Im folgenden werden die Ergebnisse der Corneometrie-Messungen getrennt nach den einzelnen Testkammern diskutiert:

### **4.2.1. Leerkammer**

In der vorliegenden Studie zeigte sich ein signifikanter Anstieg der Corneometrie-Werte nach Entfernen der Testpflaster in allen Testkammern mit raschem Abfall innerhalb von 15 Minuten. Bereits nach 30 Minuten war für die Leerkammer keine weitere Abnahme der Werte mehr festzustellen. Dies wird durch Studien anderer Gruppen unterstützt: Fluhr et al. konnten nach einfacher Okklusion der Haut mit Plastik-Testkammern über 24, 48, 72 und 96 Stunden bei Messungen 2 Stunden nach Abnahme der Testpflaster keine signifikanten Änderungen der Corneometrie-Werte, erfaßt ebenfalls mit dem Corneometer CM 820, nachweisen (Fluhr JW et al., 1999). Emtestam et al. konnten nach 24-stündiger Okklusion mit einer Leerkammer keine Änderung der elektrischen Impedanz 1 Stunde sowie 24 Stunden nach Abnahme der Testpflaster zeigen (Emtestam L & Ollmar S, 1993). Bei kürzerer Okklusion der Haut über 30 Minuten mit einer Testkammer wiesen bei Messungen von Ryatt et al. die Meßwerte der dielektrischen Bestimmung bereits eine Stunde nach Beendigung der Okklusion keine signifikanten Abweichungen mehr auf (Ryatt KS et al., 1988).

Bei Ramsing und Agner zeigten sich bei einer Studie zum okklusiven Einfluß von Schutzhandschuhen bei Messungen ½ Stunde, 1 und 2 Stunden nach Entfernen der Handschuhe, die zuvor an drei aufeinanderfolgenden Tagen über mindestens 6 Stunden pro Tag getragen worden waren, keine erhöhten Corneometrie-Werte nach Abnahme der Handschuhe im Vergleich zur Kontrollhand und den basalen Werten (Ramsing DW & Agner T, 1996). Dies dürfte u. a. an der deutlich kürzeren Okklusion liegen sowie an einer evtl. nicht vollständigen Okklusion durch die Handschuhe.

Die kurzzeitige starke Erhöhung der Corneometrie-Werte direkt nach Pflasterabnahme in der vorliegenden Studie ist durch eine vorübergehende Hyperhydratation des Stratum corneum aufgrund des durch die Okklusion mit der Testkammer zurückgehaltenen Wassers zu erklären. Aber auch nach Abdiffusion eines Großteils des überschüssigen Wassers war in dieser Studie noch eine signifikante Erhöhung der Corneometrie-Werte im Vergleich zum Basalwert zu allen nachfolgenden Meßzeitpunkten nachweisbar. Dies ist auf eine Aufsättigung der wasserbindenden Strukturen der Haut zurückzuführen, welche das Wasser länger in der Epidermis binden können und somit eine länger andauernde Hyperhydratation hervorrufen. Die Diskrepanz zu den Ergebnissen der oben genannten Studien, bei denen die Hyperhydratation kürzer andauerte, ist vermutlich durch unterschiedliche Applikationszeiten und unterschiedliche Meßverfahren der Hautfeuchte (elektrische Leitfähigkeit versus kapazitive Verfahren) zu erklären.

#### **4.2.2. Wasserkammer**

Wie auch bei der Leerkammer zeigte sich bei der Wasserkammer unmittelbar nach Abnahme der Testpflaster (Zeitpunkt 0) ein deutlicher, signifikanter Anstieg der Corneometrie-Werte im Vergleich zum Basalwert mit einem raschen Abfall bis 15 Minuten nach Pflasterabnahme. Auch bei der Wasserkammer waren darüber hinaus jedoch im Vergleich zum Basalwert zu allen weiteren Meßzeitpunkten erhöhte Corneometrie-Werte zu beobachten. Dabei scheint das zusätzlich mit der Kammer applizierte Wasser als mildes Irritans eine länger andauernde Hyperhydratation zu verursachen als die Leerkammer alleine. Agner und Serup konnten hingegen nach 24-stündiger Applikation von Wasser in einer epikutanen Testkammer bereits 30 Minuten nach deren Abnahme keine Änderung des Hydratationszustandes der Haut, erfaßt durch Messungen mit dem Hygrometer, mehr nachweisen (Agner T & Serup J, 1989). Dies dürfte vor allem an den unterschiedlichen Meßmethoden liegen, welche nur bedingt vergleichbar sind (s. Kapitel 1.4.2).

In einer Studie von Wilhelm et al. wurde nach nur 10-minütiger okklusiver Applikation von Wasser eine Erhöhung der Corneometrie-Werte mit einem steilen Anstieg direkt nach Pflasterabnahme und nachfolgender Abnahme der Werte bis zum Erreichen des Basalwertes über 20 Minuten beobachtet (Wilhelm KP et al., 1993). Blichman und Serup konnten nach Applikation von Wasser über 10 Sekunden bereits einen Anstieg der Corneometrie-Werte bis 7 Minuten zeigen (Blichmann CW & Serup J, 1988). In einer Studie von Emtestam et al. war nach 24-stündiger Okklusion der Haut mit einer Testkammer, befüllt mit Wasser, 1 Stunde und auch 24 Stunden nach Abnahme der Testkammer keine Änderung der elektrischen Impedanz zu beobachten (Emtestam L & Ollmar S, 1993). Diese Studie zeigt exemplarisch die Problematik der Vergleichbarkeit von Studien zur Hautoberflächenfeuchtigkeit auf, die mit unterschiedlichen Meßinstrumenten (hier mit einem selbst entwickelten Meßverfahren mit einer Wechselstrom-Meßbrücke, die an ein Oszilloskop angeschlossen ist) durchgeführt wurden.

Auch in einer Studie von Ramsing und Agner zur Erfassung längerfristiger Effekte konnte nach zweimaliger täglicher Wasserexposition über 15 Minuten an 10 aufeinanderfolgenden Tagen auf experimentell vorgeschädigter Haut 90 Minuten nach Beendigung der Exposition kein Einfluß auf den Hydratationszustand der Haut, erfaßt durch die Corneometrie, nachgewiesen werden (Ramsing DW & Agner T, 1997). Hier dürfte die Exposition (insgesamt 30 Minuten täglich) für stärkere Veränderungen der Hautoberflächenfeuchtigkeit nicht ausgereicht haben.

Im zeitlichen Verlauf der Corneometrie-Werte nach Abnahme der Testpflaster zeigte sich in der vorliegenden Studie eine signifikante Abnahme der Meßwerte der Wasserkammer ebenfalls nur bis 15 Minuten nach Abnahme der Testpflaster, danach kam es zu keiner weiteren signifikanten Abnahme der Werte (obwohl die Werte im Vergleich zum Basalwert noch immer erhöht waren). Dies belegt, daß der Großteil der Abdiffusion des durch die Okklusion zusätzlich zurückgehaltenen Wassers innerhalb der ersten ca. 15 Minuten erfolgt.

### 4.2.3. NLS-Kammern

Auch für die NLS-Kammern zeigte sich in der vorliegenden Studie ein steiler Anstieg der Corneometrie-Werte unmittelbar nach Abnahme der Testpflaster mit erneutem Abfall innerhalb von 15 Minuten. Diese Kinetik steht in Übereinstimmung mit den Ergebnissen einer Studie von Wilhelm et al., bei der nach kurzzeitiger (1-10 Minuten) okklusiver Applikation wäßriger NLS-Lösungen im Vergleich zur Applikation von Wasser ebenfalls ein steiler Anstieg der Hydratation des Stratum corneum direkt nach Abnahme der Testpflaster beobachtet werden konnten. Anschließend kam es innerhalb von 10 Minuten zu einem raschen Abfall bis auf die basalen Werte (Wilhelm KP et al., 1993). In der vorliegenden Studie ergaben sich signifikant erhöhte Corneometrie-Werte im Vergleich zum Basalwert für die NLS 0,5 %-Kammer nach 12-48-stündiger Applikation auch zu allen weiteren Meßzeitpunkten, für die NLS 0,25 %-Kammer jedoch nur bis 60 Minuten nach Abnahme der Testpflaster. Dabei waren die Werte der NLS 0,5 %-Kammer zu allen Zeitpunkten größer als die der NLS 0,25 %-Kammer in Übereinstimmung mit den Ergebnissen anderer Arbeitsgruppen (Agner T & Serup J, 1990; van Neste D, 1990).

Die erfaßten Corneometrie-Werte direkt nach Abnahme der Testpflaster waren in der vorliegenden Studie für die NLS-Kammern deutlich höher als für die Wasser- oder Leerkammer mit einem steileren Abfall der Werte bis 15 Minuten nach Abnahme der Testpflaster. Dieser steilere und höhere Anstieg bei den NLS-Kammern deutet auf eine verstärkte Hyperhydratation des Stratum corneum nach erfolgter stärkerer Schädigung durch das Irritans NLS hin mit nachfolgend rascherer Abdiffusion des überschüssigen Wassers aus der geschädigten Epidermis. In der bereits oben angeführten Studie von Wilhelm et al. war eine signifikante Korrelation zwischen der Hydratation und der NLS-Konzentration sowie der Applikationszeit zu erkennen (Wilhelm KP et al., 1993). In dieser Arbeit wurde auch eine signifikante Korrelation zwischen dem Hydratationszustand des Stratum corneum nach kurzzeitiger Applikation von NLS einerseits und dem Irritationspotential nach 24-stündiger okklusiver Epikutantestung festgestellt (Wilhelm KP et al., 1993). In Übereinstimmung mit diesen Ergebnissen zeigte sich in einer Studie von Treffel et al. eine lineare Korrelation zwischen dem Hydratationszustand des Stratum corneum nach

NLS-Applikation unterschiedlicher Konzentrationen (0,5 %, 2,5 %) und den nachfolgend erfaßten TEWL-Werten (Treffel P & Gabard B, 1996).

Auch Agner et al. konnten mittels Hygrometrie nach 24-stündiger epikutaner Applikation von 2,5%iger NLS-Lösung 30 Minuten nach Abnahme der Testpflaster eine Hyperhydratation der Epidermis nachweisen, welche bis 24 Stunden nach Pflasterabnahme anhielt. 72 Stunden nach Abnahme der Testpflaster zeigte sich hier hingegen eine deutliche Verminderung der Hydratation im Vergleich zu einer Wasser- und Leerkammer (Agner T & Serup J, 1989). In einer vergleichbaren Studie konnten Wilhelm et al. nach Exposition verschiedener Tenside in Messungen 30 Minuten nach Abnahme der Testpflaster eine initiale Hyperhydratation des Stratum corneum nachweisen, die möglicherweise aus einer Störung der Sekundär- und Tertiärstruktur von Keratinproteinen hervorgeht, wodurch neue Wasserbindungsstellen freigesetzt werden (Wilhelm KP et al., 1993). Rhein et al. diskutierten in diesem Zusammenhang einen zusätzlichen Einfluß durch die Bindung hydrophiler Gruppen und hydrophober Wechselwirkungen zwischen den Alkylketten des Detergens und Keratinproteinen, die zur Freisetzung neuer Wasserbindungsstellen führen (Rhein LD et al., 1986). Im Rahmen der Irritation gehen jedoch nachfolgend zunehmend wasserbindende Strukturen der Haut verloren. So liegt nach Abdiffusion des Wassers schließlich eine erniedrigte Wasserbindungskapazität des Stratum corneums vor, welche sich in einem Abfall der Corneometrie-Werte unter die Basalwerte äußert (Wilhelm KP, 1995). Sichtbare Hautveränderungen sind hingegen erst vollständig nach 7 Tagen ausgebildet (Wilhelm KP et al., 1994). Abweichungen vom Basalwert in der elektrischen Kapazitätsmessung waren noch bis zu 17 Tage nach einer einmaligen okklusiven NLS-Testung mit einer 0,5%igen Lösung über 24 Stunden nachweisbar (Wilhelm KP et al., 1994).

In der Messung 24 Stunden nach Entfernen der Testpflaster zeigte sich für die NLS-Kammern erneut eine signifikante Zunahme der Corneometrie-Werte, nicht jedoch für die Leer- und die Wasserkammer. Dieser in der vorliegenden Studie beobachtete erneute Anstieg der Corneometrie-Werte 24 Stunden nach Abnahme der NLS-Testkammern steht im Widerspruch zu den Ergebnissen vorhergehender Studien, in denen eine Verminderung der Hydratation des

Stratum corneum 24 Stunden nach Beendigung der Okklusion im Vergleich zum Basalwert nachgewiesen werden konnte (van Neste D & de Brouwer B, 1992; Wilhelm KP, 1995). Möglichweise ist hier die hohe intraindividuelle Variabilität der Messungen, unterschiedliche NLS-Konzentrationen, eine hohe Störanfälligkeit und z. T. geringe Reproduzierbarkeit der Meßergebnisse bei der Corneometrie sowie eventuell paradoxe Meßergebnisse nach Irritation zu diskutieren (Gollhausen R, 1992). Dieses Ergebnis zeigt jedoch auch auf, daß die Corneometrie für die Evaluation der akuten Irritation durch Detergentien kein geeignetes Instrumentarium darstellt (Agner T & Serup J, 1989; Wilhelm KP, 1995).

### **4.3. Chromametrie-a\*-Werte**

Bezüglich der Geschlechtsabhängigkeit der Testreaktion auf NLS und auch auf die Leer- und Wasserkammer waren keine signifikanten Unterschiede im Mittelwertvergleich zu allen Testzeitpunkten in den Chromametrie-a\*-Werten nachweisbar. Dies steht in Übereinstimmung mit den Ergebnissen zahlreicher vorhergehender Studien (Agner T, 1991; Lammintausta K et al., 1987; Tupker RA et al., 1989; van der Valk PG et al., 1984). Lediglich in den basalen a\*-Werten der Chromametrie-Messungen zeigten sich signifikant niedrigere a\*-Werte in der Frauengruppe im Vergleich zu der Männergruppe. Dies wurde zuvor bereits von Fullerton et al., ebenfalls bei Messungen an der Unterarmbeugeseite, beschrieben (Fullerton A et al., 1996).

Im folgenden werden die Ergebnisse der Chromametrie-Messungen getrennt nach den einzelnen Testkammern diskutiert:

#### **4.3.1. Leerkammer**

Die in der vorliegenden Studie zu beobachtende signifikante Abnahme der Chromametrie- a\*-Werte unmittelbar nach Abnahme der Testpflaster mit einem erneuten steilen Anstieg bis 15 Minuten danach ist durch eine Mazeration der oberflächlichen Hautschichten mit einem Aufquellen der Korneozyten durch die

Hyperhydratation unter Okklusion und der anschließenden Abdiffusion des überschüssigen Wassers zu erklären. Aufgrund dieser Hyperhydratation kommt es zu einer veränderten Lichtbrechung der Epidermis, sodaß das durch die Durchblutung verursachte Erythem an der Oberfläche schwächer erscheint. Nach erfolgter Abdiffusion des überschüssigen Wassers war eine weitere signifikante Zunahme der  $a^*$ -Werte im Vergleich aufeinanderfolgender Meßzeitpunkte für die Leerkammer zunächst nicht zu beobachten. Lediglich in dem Zeitraum zwischen 90 und 120 Minuten nach Pflasterabnahme zeigte sich eine signifikante Abnahme der Werte, die jedoch nicht als relevant zu bewerten ist.

Nach dem initialen Abfall mit im Vergleich zum Basalwert deutlich erniedrigten  $a^*$ -Werten und später erneutem Anstieg der  $a^*$ -Werte waren im Vergleich zum Basalwert signifikant erhöhte Werte bei der Leerkammer bis 60 Minuten nach Abnahme der Testpflaster nachweisbar. Der erneute, geringe Abfall der Werte zu den späteren Zeitpunkten war im Vergleich zum Basalwert nicht mehr signifikant. Basketter et al. konnten hingegen nach 24-stündiger Applikation 15 Minuten nach Abnahme der leeren Testkammer keinen Unterschied der  $a^*$ -Werte im Vergleich zu den unbehandelten Basalwerten mehr feststellen, ebenfalls bei Ablesungen weitere 24, 48 und 72 Stunden nach Abnahme der Testpflaster (Basketter DA et al., 1998). Auch in der vorliegenden Studie ergaben sich nur geringe, nicht jedoch signifikante Unterschiede der  $a^*$ -Werte 24 Stunden nach Entfernen der Testpflaster im Vergleich mit dem Basalwert. Insgesamt sind die Veränderungen der  $a^*$ -Werte und somit die Veränderungen in der Hautrötung durch die Leerkammer als schwach zu bewerten.

#### **4.3.2. Wasserkammer**

Nach Applikation von Wasser zeigten sich in einer Studie von Wilhelm et al. nach 24-stündiger okklusiver epikutaner Applikation bei Messungen 15 Minuten nach Entfernen der Testpflaster keine signifikanten Unterschiede in den Messungen des Parameters  $a^*$  sowie auch der Parameter  $b^*$ , der Helligkeit  $L^*$  und des Gesamtfarbeindrucks  $E^*$  im Vergleich zum Basalwert (Wilhelm KP & Maibach HI, 1989). Dies wird bezüglich der  $a^*$ -Werte durch die Ergebnisse der

vorliegenden Studie bestätigt. Basketter et al. konnten nach 24-stündiger okklusiver Applikation 15 Minuten nach Abnahme der Wasserkammer erhöhte  $a^*$ -Werte im Vergleich zu den unbehandelten Basalwerten und der Leerkammer feststellen (Basketter DA et al., 1998). 24 Stunden nach Abnahme der Testpflaster war in der vorliegenden Studie eine geringe, jedoch im Vergleich zum Basalwert nicht signifikante Erhöhung der  $a^*$ -Werte für die Wasserkammer zu beobachten. Auch die durch die Wasserkammer durchaus hervorgerufene Irritation ist daher als zu schwach zu bewerten, als daß sie eine entzündliche Rötung und somit eine Veränderung im  $a^*$ -Wert hervorrufen könnte.

### **4.3.3. NLS-Kammern**

In einer Studie von Agner und Serup zeigten sich signifikant erhöhte  $a^*$ -Werte nach 24-stündiger epikutaner Applikation verschiedener NLS-Konzentrationen (0,12 %, 0,25 %, 0,5 % und 1 %) 1 Stunde nach Entfernen der Testpflaster sowie weitere 24 Stunden später (Agner T & Serup J, 1990). Dies wird durch die Ergebnisse der vorliegenden Studie bezüglich der  $a^*$ -Werte nach Applikation von NLS 0,5 % bestätigt. Hier waren zu allen Meßzeitpunkten nach Pflasterabnahme signifikante Unterschiede zum Basalwert nachweisbar, zunächst als geringerer Wert, ab 15 Minuten nach Pflasterabnahme jedoch als signifikant höherer Wert. Basketter et al. konnten nach 24-stündiger okklusiver Applikation von NLS 15 Minuten und 24 Stunden nach Abnahme des Pflasters ebenfalls erhöhte  $a^*$ -Werte im Vergleich zu den unbehandelten Basalwerten und der Leerkammer feststellen (Basketter DA et al., 1998). Dies steht in Übereinstimmung mit den Daten von Treffel et al. (Treffel P & Gabard B, 1996) und Wilhelm et al. (Wilhelm KP & Maibach HI, 1989), die ebenfalls eine signifikante Erhöhung der  $a^*$ -Werte 24 Stunden nach Abnahme der Testpflaster nach erfolgter 24-stündiger Applikation verschiedener NLS-Konzentrationen (0,125 %, 0,25 %, 1 %, 2 % und 3 %) beobachteten. Es zeigte sich eine hochsignifikante Korrelation der Änderung der  $a^*$ -Werte ( $\Delta a^*$ ) sowie auch der Änderung des Gesamtfarbeindruckes ( $\Delta E^*$ ) mit der applizierten NLS-Konzentration (Wilhelm KP & Maibach HI, 1989). Ferner konnte eine Korrelation der  $\Delta a^*$ -Werte mit dem TEWL herausgestellt werden (Wilhelm KP et al., 1989). Auch in einer nachfolgenden Studie zeigten sich nach okklusiver Applikation

von NLS (20 mM) über 24 Stunden sowohl 30 Minuten nach Abnahme der Testpflaster, stärker 24 Stunden später, eine deutliche Erhöhung der  $a^*$ -Werte mit einem langsamen Abfall bis 7 Tage nach Abnahme der Testpflaster (Wilhelm KP, 1995). Bei Lee war die Erhöhung der  $a^*$ -Werte sogar bis 14 Tage nach einmaliger okklusiver Applikation von NLS 1 % über 24 Stunden nachweisbar (Lee JY et al., 1997). Die durch NLS verursachte entzündliche Reaktion der Haut kann daher bereits wenige Minuten nach Abnahme des Testpflasters nachweisbar sein und hält (konzentrationsabhängig) über viele Tage an.

Für NLS 0,25 % waren nach initialem Abfall ab 15 Minuten nach Abnahme der Testpflaster zunächst keine signifikanten Unterschiede zum Basalwert nachweisbar. Erst 60 Minuten nach erfolgter Pflasterabnahme lagen die Werte geringfügig, jedoch nicht signifikant über dem Basalwert, erst ab 120 Minuten lagen sie über den Werten der Leer- und der Wasserkammer. Die Irritation durch NLS 0,25 % scheint nicht stark genug zu sein, um ein deutlich stärker entzündliches Erythem zu verursachen als jenes der Leer- und der Wasserkammer. Erst bei einer Konzentration von 0,5 % hat NLS die irritative Potenz, eine signifikant stärkere Rötung (evaluiert durch den Chromametrie- $a^*$ -Wert) direkt nach Entfernung der Testpflaster hervorzurufen. Diese Konzentrationsabhängigkeit der  $a^*$ -Werte wurde in verschiedenen Studien zuvor beschrieben (Agner T & Serup J, 1990; Wilhelm KP et al., 1989). Exemplarisch dafür steht die Studie von Basketter et al. (Basketter DA et al., 1998): Obwohl direkt nach Pflasterabnahme die  $a^*$ -Werte der NLS 0,5 %-Kammer tendentiell höher waren als diejenigen der NLS 1,0 %-Kammer, lagen bei der Messung 24 Stunden nach Abnahme der Testpflaster die  $a^*$ -Werte der NLS 1,0 %-Kammer dann höher als die der NLS 0,5 %-Kammer, ebenso im Verlauf nach 48 Stunden und 72 Stunden (Basketter DA et al., 1998). Dies bestätigt die Ergebnisse der vorliegenden Studie, in der auch 24 Stunden nach Abnahme der Testpflaster der  $a^*$ -Wert der NLS 0,5 %-Kammer deutlich über dem der NLS 0,25 %-Kammer lag. Es fällt jedoch auf, daß 24 Stunden nach Pflasterabnahme die entzündliche Rötung auch bei der 0,25%igen NLS-Applikation deutlich ansteigt. Dieses bekannte „Crescendo-Phänomen“ der NLS-Irritation wird u. a. durch eine verzögerte Reaktion der Haut auf im Stratum corneum gespeichertes NLS verursacht (Brasch J et al., 1999; Löffler H &

Effendy I, 1997). Wie auch in der vorliegenden Studie zu sehen, treten diese verzögerten Reaktionen insbesondere bei Irritationen mit niedrigeren NLS-Konzentrationen auf (Bruynzeel DP et al., 1982).

## **5. Übergreifende Diskussion**

Okklusionseffekte bei Epikutantestungen durch die Pflasterapplikation haben Einfluß auf hautphysiologische Messungen, insbesondere auf die Messung des TEWL. Durch die Okklusion mit den Testkammern wird die Abdiffusion von Wasser durch die Epidermis behindert. Der Wassergehalt des Stratum corneum steigt an und führt zu einer zusätzlichen artifiziellen Erhöhung der TEWL- und Corneometrie-Meßwerte unmittelbar nach Pflasterabnahme, die über die Abdiffusion dieses retinierten Wassers hinaus noch bis zum vollständigen Abklingen der durch die Okklusion verursachten Schädigung der WPB anhält.

Die Retention von Wasser in der Epidermis durch die Okklusion zeigte sich in der vorliegenden Studie sowohl in dem steilen, signifikanten Anstieg der TEWL-Werte in allen Testkammern unmittelbar nach Abnahme der Testpflaster als auch in einem signifikanten Anstieg der Corneometrie-Werte in allen Testkammern als Zeichen der Hyperhydratation der Epidermis. Direkt nach Pflasterabnahme war eine Abnahme der Hautrötung zu beobachten, die durch die massive Hyperhydratation bedingt war. Interessant ist dabei, daß die Stärke der Irritation auch in der Phase des stärksten Einflusses der Okklusionsartefakte nachweisbar blieb. So war auch direkt nach Testpflasterabnahme in allen Testverfahren eine Unterscheidung zwischen den einzelnen Irritantien (NLS 0,5 %, NLS 0,25 %, Wasser und Leerkammer) möglich.

Nach diesem initialen Anstieg der TEWL- und Corneometrie-Meßwerte zeigte sich ein deutlicher Abfall der Werte innerhalb der nachfolgenden 15 Minuten in allen Testkammern, der sich aus der Abdiffusion eines Großteils des retinierten Wassers aus der Epidermis ergibt. Im Vergleich aufeinanderfolgender TEWL-Meßzeitpunkte war eine signifikante Abnahme bei der Leerkammer noch bis 150 Minuten nach Pflasterabnahme, bei der Wasserkammer sogar bis

180 Minuten, bei den NLS-Kammern hingegen nur bis 120 Minuten nach Pflasterabnahme zu beobachten. Dies ist durch die wesentlich stärkere Schädigung der epidermalen Wasserschutzbarriere durch das Irritans NLS bedingt, welche zunächst zu höheren TEWL-Werten führt. Nachfolgend kommt es dann jedoch zu einer schnelleren Abdiffusion des retinierten Wassers durch die massiv gestörte epidermale Barriere bis zum Erreichen eines Plateauwertes. Dieser Effekt ist konzentrationsabhängig, die TEWL-Werte der NLS 0,5 %-Kammer lagen durchgängig über denen der NLS 0,25 %-Kammer.

Im Gegensatz zu den NLS-Kammern sind bei der Leerkammer und der Wasserkammer die TEWL-Okklusionsartefakte noch länger nachweisbar. Dies liegt an der noch intakteren WPB, durch die das aufgenommene Wasser nicht so schnell abdiffundieren kann.

Der Einfluß von Okklusionseffekten auf die Corneometrie ist eher als kurzzeitig zu bewerten, später als 30 Minuten nach Pflasterabnahme scheint er (mit Ausnahme einer durch die Okklusion verursachten Irritation) in den Testergebnissen nicht mehr nachweisbar. Dies bedeutet, daß eine durch die Okklusion artifiziell erhöhte Hautoberflächenfeuchtigkeit nur bis zu 30 Minuten nachweisbar ist. Bei einer hohen intraindividuellen Variabilität der Corneometrie-Messungen und einer hohen Störanfälligkeit mit z.T. geringer Reproduzierbarkeit der Meßergebnisse erscheint die Messung des TEWL zur Beurteilung von Okklusionseffekten insgesamt besser geeignet.

Die in der vorliegenden Studie beobachtete signifikante Abnahme der Hautrötung unmittelbar nach Abnahme der Testpflaster mit einer erneuten Zunahme innerhalb der folgenden 15 Minuten ist durch eine Mazeration der oberflächlichen Hautschichten mit einem Aufquellen der Kerneozyten durch die Hyperhydratation unter Okklusion und anschließender Abdiffusion des überschüssigen Wassers zu erklären. Erst 24 Stunden nach Abnahme der Testpflaster war erneut ein verstärktes Erythem bei allen Testkammern, besonders jedoch bei den NLS-Kammern, zu beobachten. Der Einfluß der Okklusion auf das entzündliche Hautcolorit erscheint damit kurzzeitig und nach 15 Minuten weitgehend abgeschlossen. Die Chromametrie eignet sich folglich

zur Erfassung der später einsetzenden, entzündlichen Hautreaktionen auf Irritantien weitaus besser als zur Beurteilung früher Effekte.

Aufgrund der vorliegenden Untersuchungen und den Ergebnissen vorhergehender Studien kann daher davon ausgegangen werden, daß die reinen Okklusionseffekte bei Epikutantestungen, d. h. ohne daß ein Irritans der Testkammer zugefügt wurde, innerhalb der ersten 30 Minuten nach Pflasterabnahme stark abnehmen aber bis zu 180 Minuten nach Abnahme der Testpflaster noch nachweisbar sind. Bei Epikutantestungen mit NLS ist davon auszugehen, daß nur TEWL-Wert-Veränderung, die länger als 3 Stunden anhalten, auf eine direkte oder indirekte Wirkung des Irritans zurückgeführt werden können.

In einem korrekten Testdesign bei Epikutantestungen mit Irritantien sollte die Erfassung des TEWL daher später als 3 Stunden nach Pflasterabnahme erfolgen. Darüber hinaus müssen natürlich auch vorhandene irritantienspezifische Effekte mit einbezogen werden. Da in dem Zeitintervall zwischen 180 und 240 Minuten nach Abnahme der Testpflaster keine weitere Änderung der TEWL-Werte mehr nachweisbar war, kann davon ausgegangen werden, daß Okklusionseffekte bei Messungen innerhalb dieses Zeitraums weitgehend vermieden werden können. Eine Auswertung ist daher in diesem Zeitfenster zu empfehlen.

Aus praktischen Gründen ist auch eine Evaluation der Testergebnisse 24 Stunden nach Entfernen der Testpflaster möglich. Hierbei ist jedoch eine Beeinflussung der Testergebnisse durch beginnende Regenerationsprozesse und durch verzögerte Testreaktionen der Irritantien („Crescendo-Effekt“) zu beachten.

## 6. Zusammenfassung

In der Bestimmung der Hautempfindlichkeit bei Epikutantestungen mit dem anionischen Detergens Natriumlaurylsulfat (NLS) werden verschiedene nicht-invasive hautphysiologische Meßverfahren eingesetzt. Weit verbreitet sind die in der vorliegenden Studie eingesetzten Messungen der Hautdurchfeuchtung mittels Corneometrie, des Hauterythems mittels Chromametrie und des transepidermalen Wasserverlustes (TEWL), der die durch die Haut pro Zeiteinheit abgegebene Wassermenge erfaßt. Diese setzt sich zusammen aus der passiven Diffusion von Wasser durch die Epidermis und der Wasserabgabe über die Schweißdrüsen und ermöglicht so eine Aussage über die Wasserpermeabilitätsbarriere der Epidermis.

Ziel dieser Studie war es, bei der Epikutantestung mit NLS unterschiedlicher Konzentrationen im Vergleich zu Wasser und einer Leerkammer den Zeitpunkt nach der Abnahme der Testpflaster zu ermitteln, an dem diese Okklusionseffekte auf die Erfassung der Hautreaktion mittels TEWL, Corneometrie und Chromametrie weitgehend abgeklungen sind.

Wir führten bei 45 hautgesunden Probanden im Alter zwischen 18 und 70 Jahren an jeweils einer Unterarmbeugeseite einen Epikutantest mit NLS 0,25 %, NLS 0,5 % sowie zum Vergleich mit einer mit Wasser befüllten Testkammer und einer Leerkammer durch. Bei 15 Probanden wurden die Testpflaster nach 12 Stunden, bei weiteren 15 Probanden nach 24 Stunden und bei den übrigen 15 Probanden nach 48 Stunden entfernt. Die Messungen erfolgten unmittelbar nach Abnahme der Testpflaster, alle 15 Minuten nach Pflasterabnahme innerhalb der ersten Stunde, anschließend alle 30 Minuten bis 3 Stunden sowie erneut 24 Stunden nach Pflasterabnahme.

Signifikante Unterschiede der Meßwerte bezüglich der unterschiedlichen Applikationsdauer waren nicht nachweisbar; daher erfolgte eine gemeinsame Auswertung der Testergebnisse. Unmittelbar nach Entfernen der Testpflaster zeigte sich bei allen Testkammern zunächst eine steile Zunahme der TEWL- und der Corneometrie-Meßwerte, welche durch die Hyperhydratation unter Okklusion mit stärkerer Schädigung der Wasserpermeabilitätsbarriere bedingt

ist. Innerhalb der ersten 15 Minuten nach Pflasterabnahme fielen die Meßwerte deutlich ab aufgrund der Abdiffusion eines Großteils des überschüssigen Wassers. Darüberhinaus war jedoch eine weitere signifikante Abnahme der TEWL-Werte im zeitlichen Verlauf aufeinanderfolgender Messungen bis zum Übergang in eine Plateauphase für die Leerkammer bis 150 Minuten, für die Wasserkammer sogar bis 180 Minuten nach Pflasterabnahme sichtbar. Für beide NLS-Kammern war eine weitere signifikante Abnahme der TEWL-Werte nur bis 120 Minuten nach Entfernen der Testpflaster noch nachweisbar. Dies ist durch die wesentlich stärkere, konzentrationsabhängige Schädigung der epidermalen Wasserschutzbarriere durch das Irritans NLS bedingt mit nachfolgend rascher Abdiffusion des retinierten Wassers. Bei der Leerkammer und der Wasserkammer sind aufgrund der geringer geschädigten Wasserpermeabilitätsbarriere (durch die das retinierte Wasser langsamer verdunstet) diese TEWL-Okklusionsartefakte noch länger sichtbar. Bezüglich der Hautoberflächenfeuchtigkeit war nach dem initialen Anstieg der Cornemetrie-Werte durch die Hyperhydratation ein signifikanter Abfall durch Abdiffusion des retinierten Wassers nur bis 15 Minuten nach Pflasterabnahme nachweisbar, sodaß der Einfluß von Okklusionseffekten auf die Corneometrie eher als kurzzeitig zu bewerten ist. Ebenso erscheint der Einfluß der Okklusion auf das entzündliche Hautcolorit nur kurzzeitig mit einer vorübergehenden Abnahme der Hautrötung bis 15 Minuten nach Abnahme der Testpflaster. Dies ist in erster Linie durch eine temporäre Mazeration der oberflächlichen Hautschichten aufgrund der Hyperhydratation unter Okklusion zu erklären.

Die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit zeigen, daß die Erfassung der Hautreaktionen bei Epikutantestungen mit dem Irritans NLS - insbesondere mittels TEWL - später als 3 Stunden nach Entfernen der Testpflaster erfolgen sollte, um Okklusionseffekte auf die Meßergebnisse zu vermeiden. Aus praktischen Gründen ist auch eine Evaluation der Testergebnisse 24 Stunden nach Entfernen der Testpflaster unter Beachtung des Einflusses beginnender Regenerationsprozesse und auftretender „Crescendo-Effekte“ des Irritans NLS möglich. Aufgrund dieser Ergebnisse sollten international weit verbreitete Testprotokolle (mit einem Intervall von nur 30 Minuten nach Pflasterabnahme) dringend überarbeitet werden.

## 7. LITERATURVERZEICHNIS

- 1 Abraham W, Downing DT (1990) Interaction between corneocytes and stratum corneum lipid liposomes in vitro. *Biochim Biophys Acta* 1021: 119-25.
- 2 Agner T (1991) Basal transepidermal water loss, skin thickness, skin blood flow and skin colour in relation to sodium-lauryl-sulphate-induced irritation in normal skin. *Contact Dermatitis* 25: 108-14.
- 3 Agner T (1991) Skin susceptibility in uninvolved skin of hand eczema patients and healthy controls. *Br J Dermatol* 125: 140-146.
- 4 Agner T (1991) Susceptibility of atopic dermatitis patients to irritant dermatitis caused by sodium lauryl sulphate. *Acta Derm Venereol* 71: 296-300.
- 5 Agner T (1992) Noninvasive measuring methods for the investigation of irritant patch test reactions: A study of patients with hand eczema, atopic dermatitis and controls. *Acta Derm Venereol Suppl (Stockh)* 173: 1-26.
- 6 Agner T, Damm P, Skouby SO (1991) Menstrual cycle and skin reactivity. *J Am Acad Dermatol* 24: 566-70.
- 7 Agner T, Fullerton A, Broby-Johansen U, Batsberg W (1990) Irritant patch testing: Penetration of sodium lauryl sulphate into human skin. *Skin Pharmacol* 3: 213-7.
- 8 Agner T, Serup J (1989) Seasonal variation of skin resistance to irritants. *Br J Dermatol* 121: 323-8.
- 9 Agner T, Serup J (1989) Skin reactions to irritants assessed by non-invasive bioengineering methods. *Contact Dermatitis* 20: 352-9.
- 10 Agner T, Serup J (1990) Individual and instrumental variations in irritant patch-test reactions - clinical evaluation and quantification by bioengineering methods. *Clin Exp Dermatol* 15: 29-33.
- 11 Agner T, Serup J (1990) Sodium lauryl sulphate for irritant patch testing--a dose-response study using bioengineering methods for determination of skin irritation. *J Invest Dermatol* 95: 543-7.
- 12 Agner T, Serup J (1993) Time course of occlusive effects on skin evaluated by measurement of transepidermal water loss (TEWL): Including patch tests with sodium lauryl sulphate and water. *Contact Dermatitis* 28: 6-9.

- 13 Agner T, Serup J, Handlos V, Batsberg W (1989) Different skin irritation abilities of different qualities of sodium lauryl sulphate. *Contact Dermatitis* 21: 184-8.
- 14 Alexander S (1988) Patch testing and menstruation. *Lancet* 2: 751.
- 15 Alonso A, Meirelles NC, Yushmanov VE, Tabak M (1996) Water increases the fluidity of intercellular membranes of stratum corneum: correlation with water permeability, elastic, and electrical resistance properties. *J Invest Dermatol* 106: 1058-63.
- 16 Aramaki J, Effendy I, Happle R, Kawana S, Löffler C, Löffler H (2001) Which bioengineering assay is appropriate for irritant patch testing with sodium lauryl sulfate? *Contact Dermatitis* 45: 286-90.
- 17 Aramaki J, Löffler C, Kawana S, Effendy I, Happle R, Löffler H (2001) Irritant patch testing with sodium lauryl sulphate: interrelation between concentration and exposure time. *Br J Dermatol* 145: 704-8.
- 18 Avnstorp C, Ralfkiaer E, Jorgensen J, Wantzin GL (1987) Sequential immunophenotypic study of lymphoid infiltrate in allergic and irritant reactions. *Contact Dermatitis* 16: 239-45.
- 19 Baker H, Kligman AM (1967) Measurement of transepidermal water loss by electrical hygrometry. Instrumentation and responses to physical and chemical insults. *Arch Dermatol* 96: 441-52.
- 20 Baker H, Kligman AM (1967) A simple in vivo method for studying the permeability of the human stratum corneum. *J Invest Dermatol* 48: 273-4.
- 21 Barel AO, Clarys P (1995) Study of the stratum corneum barrier function by transepidermal water loss measurements: comparison between two commercial instruments: Evaporimeter and Tewameter. *Skin Pharmacol* 8: 186-95.
- 22 Basketter DA, Griffiths HA, Wang XM, Wilhelm KP, McFadden J (1996) Individual, ethnic and seasonal variability in irritant susceptibility of skin: The implications for a predictive human patch test. *Contact Dermatitis* 35: 208-13.
- 23 Basketter DA, Miettinen J, Lahti A (1998) Acute irritant reactivity to sodium lauryl sulfate in atopics and non- atopics. *Contact Dermatitis* 38: 253-7.
- 24 Berardesca E, Fideli D, Borroni G, Rabbiosi G, Maibach H (1990) In vivo hydration and water-retention capacity of stratum corneum in clinically uninvolved skin in atopic and psoriatic patients. *Acta Derm Venereol* 70: 400-4.
- 25 Berardesca E, Fideli D, Gabba P, Cespa M, Rabbiosi G, Maibach HI (1990) Ranking of surfactant skin irritancy in vivo in man using the plastic occlusion stress test (POST). *Contact Dermatitis* 23: 1-5.

- 26 Berardesca E, Leveque JL, Masson P (2002) EEMCO guidance for the measurement of skin microcirculation. *Skin Pharmacol Appl Skin Physiol* 15: 442-56.
- 27 Berardesca E, Maibach HI (1988) Racial differences in sodium lauryl sulphate induced cutaneous irritation: black and white. *Contact Dermatitis* 18: 65-70.
- 28 Berardesca E, Maibach HI (1990) Monitoring the water-holding capacity in visually non-irritated skin by plastic occlusion stress test (POST). *Clin Exp Dermatol* 15: 107-10.
- 29 Berardesca E, Vignoli GP, Distante F, Brizzi P, Rabbiosi G (1995) Effects of water temperature on surfactant-induced skin irritation. *Contact Dermatitis* 32: 83-7.
- 30 Berardesca E, Vignoli GP, Fideli D, Maibach HI (1992) Effect of occlusive dressings on the stratum corneum water holding capacity. *Am J Med Sci* 304: 25-8.
- 31 Berkowitz BA, Katzung BG (2001) Basic principles - Introduction. In: Katzung BG (Hrsg.) *Basic and Clinical Pharmacology*. Lange Medical Books/Mc Graw-Hill, New York, 34-42.
- 32 Berndt U, Hinnen U, Iliev D, Elsner P (1999) Is occupational irritant contact dermatitis predictable by cutaneous bioengineering methods? Results of the Swiss Metalworkers' Eczema Study (PROMETES). *Dermatology* 198: 351-4.
- 33 Björnberg A (1975) Skin reactions to primary irritants in men and women. *Acta Derm Venereol* 55: 191-4.
- 34 Blank IH, Moloney J, Emslie AG, Simon I, Apt C (1984) The diffusion of water across the stratum corneum as a function of its water content. *J Invest Dermatol* 82: 188-94.
- 35 Blichmann CW, Serup J (1987) Reproducibility and variability of transepidermal water loss measurement. Studies on the Servo Med Evaporimeter. *Acta Derm Venereol* 67: 206-10.
- 36 Blichmann CW, Serup J (1988) Assessment of skin moisture. Measurement of electrical conductance, capacitance and transepidermal water loss. *Acta Derm Venereol* 68: 284-90.
- 37 Bloom E, Sznitowska M, Polansky J, Ma ZD, Maibach HI (1994) Increased proliferation of skin cells by sublethal doses of sodium lauryl sulfate. *Dermatology* 188: 263-8.
- 38 Bouwstra J, Pilgram G, Gooris G, Koerten H, Ponc M (2001) New aspects of the skin barrier organization. *Skin Pharmacol Appl Skin Physiol* 14: 52-62.

- 39 Bouwstra JA, de Graaff A, Gooris GS, Nijssse J, Wiechers JW, van Aelst AC (2003) Water distribution and related morphology in human stratum corneum at different hydration levels. *J Invest Dermatol* 120: 750-8.
- 40 Bouwstra JA, Thewalt J, Gooris GS, Kitson N (1997) A model membrane approach to the epidermal permeability barrier: an X- ray diffraction study. *Biochemistry* 36: 7717-25.
- 41 Brand CU, Hunziker T, Braathen LR (1992) Studies on human skin lymph containing Langerhans cells from sodium lauryl sulphate contact dermatitis. *J Invest Dermatol* 99: 109s-110s.
- 42 Brasch J, Becker D, Effendy I (1999) Reproducibility of irritant patch test reactions to sodium lauryl sulfate in a double-blind placebo-controlled randomized study using clinical scoring: Results from a study group of the German Contact Dermatitis Research Group (Deutsche Kontaktallergie-Gruppe, DKG). *Contact Dermatitis* 41: 150-5.
- 43 Breit R, Agathos M (1992) Quality control in epicutaneous testing--reproducibility in the right- left comparison. *Hautarzt* 43: 417-21.
- 44 Brian JN, Yathi N (1993) Perturbation of epidermal barrier function correlates with initiation of cytokine cascade in human skin. *JAAD* 30: 535-546.
- 45 Britz MB, Maibach HI (1979) Human cutaneous vulvar reactivity to irritants. *Contact Dermatitis* 5: 375-7.
- 46 Bruynzeel DP, van Ketel WG, Scheper RJ, von Blomberg-van der Flier BM (1982) Delayed time course of irritation by sodium lauryl sulfate: observations on threshold reactions. *Contact Dermatitis* 8: 236-9.
- 47 Bucks DA, Maibach HI, Guy RH (1988) Mass balance and dose accountability in percutaneous absorption studies: development of a nonocclusive application system. *Pharm Res* 5: 313-5.
- 48 Burckhardt W (1947) Neuere Untersuchungen über die Alkaliempfindlichkeit der Haut. *Dermatologica* 94: 73-96.
- 49 Carpentier PH (2001) Current techniques for the clinical evaluation of the microcirculation. *J Mal Vasc* 26: 142-7.
- 50 Clarys P, Alewaeters K, Lambrecht R, Barel AO (2000) Skin color measurements: comparison between three instruments: the Chromameter, the DermaSpectrometer and the Mexameter. *Skin Res Technol* 6: 230-238.
- 51 Courage&Khazaka (2000) Information und Gebrauchsanweisung zum Tewameter TM 210 und Corneometer CM 820. CK electronics (Hrsg.) Köln.

- 52 Cua AB, Wilhelm KP, Maibach HI (1990) Cutaneous sodium lauryl sulphate irritation potential: Age and regional variability. *Br J Dermatol* 123: 607-13.
- 53 Cua AB, Wilhelm KP, Maibach HI (1990) Frictional properties of human skin: relation to age, sex and anatomical region, stratum corneum hydration and transepidermal water loss. *Br J Dermatol* 123: 473-9.
- 54 Dahl MV, Roering MJ (1984) Sodium lauryl sulfate irritant patch tests. III. Evaporation of aqueous vehicle influences inflammatory response. *J Am Acad Dermatol* 11: 477-9.
- 55 De Luca R, Balestrieri A, Dinle Y, Costa M (1984) Cutaneous evaporimetry. VIII. Cutaneous water loss in Somalian newborn infants. *Boll Soc Ital Biol Sper* 60: 161-4.
- 56 Denda M (2001) Epidermal proliferative response induced by sodium dodecyl sulphate varies with environmental humidity. *Br J Dermatol* 145: 252-7.
- 57 Diffey BL, Oliver RJ, Farr PM (1984) A portable instrument for quantifying erythema induced by ultraviolet radiation. *Br J Dermatol* 111: 663-72.
- 58 Effendy I, Löffler H, Maibach HI (1995) Baseline transepidermal water loss in patients with acute and healed irritant contact dermatitis. *Contact Dermatitis* 33: 371-4.
- 59 Effendy I, Maibach HI (1995) Surfactants and experimental irritant contact dermatitis. *Contact Dermatitis* 33: 217-25.
- 60 Elias PM (1981) Lipids and the epidermal permeability barrier. *Arch Dermatol Res* 270: 95-117.
- 61 Elias PM (1983) Epidermal lipids, barrier funktion, and desquamation. *J Invest Dermatol* 80: 44-49.
- 62 Elias PM, Feingold KR, Fluhr JW (2003) Skin As an Organ of Protection. In: Freedberg I, Eisen A, Wolff K, Austen K, Goldsmith L, Katz S (Hrsg.) *Fitzpatrick's Dermatology in General Medicine*. Sixth Edition. McGraw-Hill, New York, 107-117.
- 63 Elias PM, Friend DS, McNutt NS (1987) Epidermal permeability barrier: transformation of lamellar granule- disks into intercellular sheets by a membrane fusion process. *J Invest Dermatol* 88: 459-60.
- 64 Elias PM, Menon GK (1991) Structural and lipid biochemical correlates of the epidermal permeability barrier. *Adv Lipid Res* 24: 1-26.
- 65 Elsner P, Wilhelm D, Maibach HI (1990) Sodium lauryl sulfate-induced irritant contact dermatitis in vulvar and forearm skin of premenopausal and postmenopausal women. *J Am Acad Dermatol* 23: 648-52.

- 66 Emilson A, Lindberg M, Forslind B (1993) The temperature effect on in vitro penetration of sodium lauryl sulfate and nickel chloride through human skin. *Acta Derm Venereol* 73: 203-7.
- 67 Emtestam L, Ollmar S (1993) Electrical impedance index in human skin: measurements after occlusion, in 5 anatomical regions and in mild irritant contact dermatitis. *Contact Dermatitis* 28: 104-8.
- 68 Engström S, Ekelund K, Engblom J, Eriksson L, Sparr E, Wennerstrom H (2000) The skin barrier from a lipid perspective. *Acta Derm Venereol Suppl* 208: 31-5.
- 69 Faergemann J, Aly R, Wilson DR, Maibach HI (1983) Skin occlusion: effect on *Pityrosporum orbiculare*, skin PCO<sub>2</sub>, pH, transepidermal water loss, and water content. *Arch Dermatol Res* 275: 383-7.
- 70 Fartasch M (1995) Human barrier formation and reaction to irritation. *Curr Probl Dermatol* 23: 95-103.
- 71 Fartasch M (1997) Ultrastructure of the epidermal barrier after irritation. *Microsc Res Tech* 37: 193-9.
- 72 Fartasch M, Diepgen TL (1992) The barrier function in atopic dry skin. Disturbance of membrane-coating granule exocytosis and formation of epidermal lipids? *Acta Derm Venereol Suppl* 176: 26-31.
- 73 Fartasch M, Schnetz E, Diepgen TL (1998) Characterization of detergent-induced barrier alterations -- effect of barrier cream on irritation. *J Investig Dermatol Symp Proc* 3: 121-7.
- 74 Ferguson J, Gibbs JH, Beck JS (1985) Lymphocyte subsets and Langerhans cells in allergic and irritant patch test reactions: Histometric studies. *Contact Dermatitis* 13: 166-74.
- 75 Finkelstein P, Laden K, Miechowsky W (1963) New methods for evaluating cosmetic irritancy. *J Invest Dermatol* 40: 11-14.
- 76 Finlay AY, Marshall RJ, Marks R (1982) A fluorescence photographic photometric technique to assess stratum corneum turnover rate and barrier function in vivo. *Br J Dermatol* 107: 35-41.
- 77 Fluhr JW, Kuss O, Diepgen T, Lazzerini S, Pelosi A, Gloor M, Berardesca E (2001) Testing for irritation with a multifactorial approach: comparison of eight non-invasive measuring techniques on five different irritation types. *Br J Dermatol* 145: 696-703.
- 78 Fluhr JW, Lazzerini S, Distante F, Gloor M, Berardesca E (1999) Effects of prolonged occlusion on stratum corneum barrier function and water holding capacity. *Skin Pharmacol Appl Skin Physiol* 12: 193-8.

- 79 Forslind B, Engstrom S, Engblom J, Norlen L (1997) A novel approach to the understanding of human skin barrier function. *J Dermatol Sci* 14: 115-25.
- 80 Froebe CL, Simion FA, Rhein LD, Cagan RH, Kligman A (1990) Stratum corneum lipid removal by surfactants: relation to in vivo irritation. *Dermatologica* 181: 277-83.
- 81 Frosch PJ (1985) Hautirritation und empfindliche Haut. In: Grosse-Scripta-7. Grosse Verlag, Berlin, 15-30.
- 82 Frosch PJ (1992) Cutaneous irritation. In: Rycroft RCG, Menné T, Frosch PJ, Benezra C (Hrsg.) *Textbook of Contact Dermatitis*. Springer Verlag, Berlin, 28-61.
- 83 Frosch PJ, Czarnetzki BM (1987) Surfactants cause in vitro chemotaxis and chemokinesis of human neutrophils. *J Invest Dermatol* 88: 52s-55s.
- 84 Frosch PJ, Kligman AM (1977) Rapid blister formation in human skin with ammonium hydroxide. *Br J Dermatol* 96: 461-73.
- 85 Frosch PJ, Kligman AM (1979) The Duhring chamber: An improved technique for epicutaneous testing of irritant and allergic reactions. *Contact Dermatitis* 5: 73-81.
- 86 Frosch PJ, Wissing C (1982) Cutaneous sensitivity to ultraviolet light and chemical irritants. *Arch Dermatol Res* 272: 269-78.
- 87 Fullerton A, Broby-Johannsen U, Agner T (1994) Sodium lauryl sulphate penetration in an in vitro model using human skin. *Contact Dermatitis* 30: 222-225.
- 88 Fullerton A, Fischer T, Lahti A, Wilhelm KP, Takiwaki H, Serup J (1996) Guidelines for measurement of skin colour and erythema. A report from the Standardization Group of the European Society of Contact Dermatitis. *Contact Dermatitis* 35: 1-10.
- 89 Gehring W, Gloor M, Kleesz P (1998) Predictive washing test for evaluation of individual eczema risk. *Contact Dermatitis* 39: 8-13.
- 90 Ghadially R, Brown BE, Sequeira Martin SM, Feingold KR, Elias PM (1995) The aged epidermal permeability barrier. Structural, functional, and lipid biochemical abnormalities in humans and a senescent murine model. *J Clin Invest* 95: 2281-90.
- 91 Gibbs S, Vietsch H, Meier U, Ponc M (2002) Effect of skin barrier competence on SLS and water-induced IL-1alpha expression. *Exp Dermatol* 11: 217-23.
- 92 Gioia F, Celleno L (2002) The dynamics of transepidermal water loss (TEWL) from hydrated skin. *Skin Res Technol* 8: 178-86.

- 93 Glombitza B, Muller-Goymann C (2002) Influence of different ceramides on the structure of in vitro model lipid systems of the stratum corneum lipid matrix. *Chem Phys Lipids* 117: 29.
- 94 Gloor M, Thoma K, Fluhr J (2000) *Dermatologische Externtherapie*. Springer-Verlag, Berlin, 52-9.
- 95 Gobrecht A (1990) Molekularphysik. In: Bergmann L, Schäfer C (Hrsg.) *Lehrbuch der Experimentalphysik: Mechanik, Akustik, Wärme; Band 1*. De Gruyter Verlag, Berlin, 762.
- 96 Goh CL, Chia SE (1988) Skin irritability to sodium lauryl sulphate--as measured by skin water vapour loss - by sex and race. *Clin Exp Dermatol* 13: 16-9.
- 97 Golden GM, Guzek DB, Kennedy AH, McKie JE, Potts RO (1987) Stratum corneum lipid phase transitions and water barrier properties. *Biochemistry* 26: 2382-8.
- 98 Gollhausen R (1992) Corneometrie und Evaporimetrie zur Untersuchung der Hornschicht-Funktion. In: Klaschka F (Hrsg.) *Empfindliche Haut*. Diesbach-Verlag, Berlin, 76-91.
- 99 Graves CJ, Edwards C, Marks R (1995) The occlusive effects of protective gloves on the barrier properties of the stratum corneum. *Curr Probl Dermatol* 23: 87-94.
- 100 Grice K, Bettley FR (1967) The effect of skin temperature and vascular change on the rate of transepidermal water loss. *Br J Dermatol* 79: 582-8.
- 101 Grice K, Sattar H, Baker H, Sharratt M (1975) The relationship of transepidermal water loss to skin temperature in psoriasis and eczema. *J Invest Dermatol* 64: 313-5.
- 102 Grunewald AM, Gloor M, Gehring W, Kleesz P (1995) Damage to the skin by repetitive washing. *Contact Dermatitis* 32: 225-32.
- 103 Hammarlund K, Nilsson GE, Oberg PA, Sedin G (1979) Transepidermal water loss in newborn infants. II. Relation to activity and body temperature. *Acta Paediatr Scand* 68: 371-6.
- 104 Hannuksela A, Hannuksela M (1995) Irritant effects of a detergent in wash and chamber tests. *Contact Dermatitis* 32: 163-6.
- 105 Harvell J, Hussona-Saeed I, Maibach HI (1992) Changes in transepidermal water loss and cutaneous blood flow during the menstrual cycle. *Contact Dermatitis* 27: 294-301.
- 106 Held E, Mygind K, Wolff C, Gyntelberg F, Agner T (2002) Prevention of work related skin problems: an intervention study in wet work employees. *Occup Environ Med* 59: 556-61.

- 107 Henry F, Goffin V, Maibach HI, Pierard GE (1997) Regional differences in stratum corneum reactivity to surfactants. Quantitative assessment using the corneorosometry bioassay. *Contact Dermatitis* 37: 271-5.
- 108 Hinnen U, Elsner P, Burg G (1995) Assessment of skin irritancy by 2 short tests compared to acute irritation induced by sodium lauryl sulfate. *Contact Dermatitis* 33: 236-9.
- 109 Holst R, Möller H (1975) One hundred twin pairs patch tested with primary irritants. *Br J Dermatol* 93: 145-9.
- 110 Hunziker T, Brand CU, Kapp A, Waelti ER, Braathen LR (1992) Increased levels of inflammatory cytokines in human skin lymph derived from sodium lauryl sulphate-induced contact dermatitis. *Br J Dermatol* 127: 254-7.
- 111 Imokawa G, Akasaki S, Hattori M, Yoshizuka N (1986) Selective recovery of deranged water-holding properties by stratum corneum lipids. *J Invest Dermatol* 87: 758-761.
- 112 Imokawa G, Akasaki S, Minematsu Y, Kawai M (1989) Importance of intercellular lipids in water-retention properties of the stratum corneum: induction and recovery study of surfactant dry skin. *Arch Dermatol Res* 281: 45-51.
- 113 Imokawa G, Kuno H, Kawai M (1991) Stratum corneum lipids serve as a bound-water modulator. *J Invest Dermatol* 96: 845-51.
- 114 John SM (2001) *Klinische und experimentelle Untersuchungen zur Diagnostik in der Berufsdermatologie*. Hans Joachim Schwanitz-Verlag, Osnabrück, 96-8.
- 115 Kalia YN, Pirot F, Guy RH (1996) Homogeneous transport in a heterogeneous membrane: water diffusion across human stratum corneum in vivo. *Biophys J* 71: 2692-700.
- 116 Klein G, Grubauer G, Fritsch P (1992) The influence of daily dish-washing with synthetic detergent on human skin. *Br J Dermatol* 127: 131-7.
- 117 Kligman A (1996) Hydration injury to the skin. In: Van der Valk P, Maibach HI (Hrsg.) *The Irritant Contact Dermatitis*. CRC Press, Boca Raton, Florida, 187-94.
- 118 Kligman AM, Wooding WM (1967) A method for the measurement and evaluation of irritants on human skin. *J Invest Dermatol* 49: 78-94.
- 119 Kolbe L, Kligman AM, Stoudemayer T (1998) The sodium hydroxide erosion assay: A revision of the alkali resistance test. *Arch Dermatol Res* 290: 382-7.

- 120 Kompaore F, Marty JP, Dupont C (1993) In vivo evaluation of the stratum corneum barrier function in blacks, Caucasians and Asians with two noninvasive methods. *Skin Pharmacol* 6: 200-7.
- 121 Kosswig H, Stache H (1993) *Die Tenside*. Carl Hauser Verlag, München, 112-38.
- 122 Kühl M, Klaschka F (1990) *Berufsdermatosen*. Urban und Schwarzenberg Verlag, München, 44-46.
- 123 Lachapelle JM (1992) Histopathological and immunohistopathological features of irritants. In: Rycroft RCG, Menné T, Frosch PJ, Benezra C (Hrsg.) *Textbook of irritant contact dermatitis*. Springer Verlag, Berlin, 94-102.
- 124 Lamke LO, Nilsson GE, Reithner HL (1977) Insensible perspiration from the skin under standardized environmental conditions. *Scand J Clin Lab Invest* 37: 325-31.
- 125 Lammintausta K, Maibach HI (1988) Exogenous and endogenous factors in skin irritation. *Int J Dermatol* 27: 213-222.
- 126 Lammintausta K, Maibach HI (1990) Contact dermatitis due to irritation. In: Adams RM (Hrsg.) *Contact dermatitis*. W.B. Saunders Company, Philadelphia, 1-15.
- 127 Lammintausta K, Maibach HI, Wilson D (1987) Human cutaneous irritation: induced hyporeactivity. *Contact Dermatitis* 17: 193-198.
- 128 Lammintausta K, Maibach HI, Wilson D (1987) Irritant reactivity in males and females. *Contact Dermatitis* 17: 276-80.
- 129 Lammintausta K, Maibach HI, Wilson D (1988) Susceptibility to cumulative and acute irritant dermatitis: An experimental approach in human volunteers. *Contact Dermatitis* 19: 84-90.
- 130 Lee CH, Maibach HI (1994) Study of cumulative irritant contact dermatitis in man utilizing open application on subclinically irritated skin. *Contact Dermatitis* 30: 271-5.
- 131 Lee CH, Maibach HI (1995) The sodium lauryl sulfate model: An overview. *Contact Dermatitis* 33: 1-7.
- 132 Lee JY, Effendy I, Maibach HI (1997) Acute irritant contact dermatitis: Recovery time in man. *Contact Dermatitis* 36: 285-90.
- 133 Lee M, Schalkwijk J, Siegenthaler G, van de Kerkhof PC, Veerkamp JH, van der Valk PG (1996) Changes in keratinocyte differentiation following mild irritation by sodium dodecyl sulphate. *Arch Dermatol Res* 288: 684-90.

- 134 Lehmann P, Helbig S, Hölzle E, Plewig G (1988) Bestrahlung mit UV-A oder UV-B wirkt protektiv gegenüber Irritantien. *Zbl Haut* 154: 686-692.
- 135 Leveque JL, Corcuff P, de Rigal J, Agache P (1984) In vivo studies of the evolution of physical properties of the human skin with age. *Int J Dermatol* 23: 322-9.
- 136 Leveque JL, de Rigal J, Saint-Leger D, Billy D (1993) How does sodium lauryl sulfate alter the skin barrier function in man? A multiparametric approach. *Skin Pharmacol* 6: 111-5.
- 137 Lindberg M, Farm G, Scheynius A (1991) Differential effects of sodium lauryl sulphate and non-anionic acid on the expression of CD1a and ICAM-1 in human epidermis. *Acta Derm Venereol* 71: 384-8.
- 138 Locher G (1962) Permeability determination of the skin of eczematous and healthy subjects for the new indicator Nitrazine Yellow "Geigy", modification of the alkali resistance test, pH course in the depth of the horny layer. *Dermatologica* 124: 159-82.
- 139 Loden M (1990) The simultaneous penetration of water and sodium lauryl sulfate through isolated human skin. *J Soc Cosmet Chem* 41: 227-233.
- 140 Loden M (1997) Barrier recovery and influence of irritant stimuli in skin treated with a moisturizing cream. *Contact Dermatitis* 36: 256-60.
- 141 Loden M, Hagforsen E, Lindberg M (1995) The presence of body hair influences the measurement of skin hydration with the Corneometer. *Acta Derm Venereol* 75: 449-50.
- 142 Loden M, Olsson H, Axell T, Linde YW (1992) Friction, capacitance and transepidermal water loss (TEWL) in dry atopic and normal skin. *Br J Dermatol* 126: 137-41.
- 143 Löffler H, Effendy I (1997) Crescendo reactions to sodium lauryl sulfate and retinoic acid in irritant patch tests. *Contact Dermatitis* 37: 47-8.
- 144 Löffler H, Effendy I (1999) Skin susceptibility of atopic individuals. *Contact Dermatitis* 40: 239-42.
- 145 Löffler H, Effendy I, Happle R (1996) Natriumlaurylsulfat-Test: Eine nichtinvasive Funktionsprüfung der Hautempfindlichkeit. *Hautarzt* 47: 832-838.
- 146 Löffler H, Effendy I, Happle R (1999) Patch testing with sodium lauryl sulfate: benefits and drawbacks in research and practice. *Hautarzt* 50: 769-78.
- 147 Löffler H, Pirker C, Aramaki J, Frosch PJ, Happle R, Effendy I (2001) Evaluation of skin susceptibility to irritancy by routine patch testing with sodium lauryl sulfate. *Eur J Dermatol* 11: 416-9.

- 148 Lotte C, Rougier A, Wilson DR, Maibach HI (1987) In vivo relationship between transepidermal water loss and percutaneous penetration of some organic compounds in man: effect of anatomic site. *Arch Dermatol Res* 279: 351-6.
- 149 Madison KC, Swartzendruber DC, Wertz PW, Downing DT (1987) Presence of intact intercellular lipid lamellae in the upper layers of the stratum corneum. *J Invest Dermatol* 88: 714-8.
- 150 Malten KE, Thiele FA (1973) Evaluation of skin damage. II. Water loss and carbon dioxide release measurements related to skin resistance measurements. *Br J Dermatol* 89: 565-9.
- 151 Mathias CG, Wilson DM, Maibach HI (1981) Transepidermal water loss as a function of skin surface temperature. *J Invest Dermatol* 77: 219-20.
- 152 Mikulowska A (1990) Reactive changes in the Langerhans' cells of human skin caused by occlusion with water and sodium lauryl sulphate. *Acta Derm Venereol* 70: 468-73.
- 153 Minolta Co. (2000) Gebrauchsanweisung des Minolta Chroma-Meter. In: *Chroma-Meter CR-300*. Osaka, Japan, 1-37.
- 154 Miyazawa K, Ogawa M, Mitsui T (1984) The physico-chemical properties and protein denaturation potential of surfactant mixtures. *Int J Cosmet Science* 6: 33-46.
- 155 Nilsson GE (1977) Measurement of water exchange through skin. *Med Biol Eng Comput* 15: 209-18.
- 156 Nilsson GE, Tenland T, Oberg PA (1980) Evaluation of a laser Doppler flowmeter for measurement of tissue blood flow. *IEEE Trans Biomed Eng* 27: 597-604.
- 157 Norlen L (2001) Skin barrier structure and function: the single gel phase model. *J Invest Dermatol* 117: 830-6.
- 158 Norlen L, Emilson A, Forslind B (1997) Stratum corneum swelling. Biophysical and computer assisted quantitative assessments. *Arch Dermatol Res* 289: 506-13.
- 159 Oestmann E, Lavrijsen AP, Hermans J, Ponc M (1993) Skin barrier function in healthy volunteers as assessed by transepidermal water loss and vascular response to hexyl nicotinate: intra- and inter-individual variability. *Br J Dermatol* 128: 130-6.
- 160 Panisset F, Treffel P, Faivre B, Lecomte PB, Agache P (1992) Transepidermal water loss related to volar forearm sites in humans. *Acta Derm Venereol* 72: 4-5.

- 161 Park KB, Eun HC (1995) A study of skin responses to follow-up, rechallenge and combined effects of irritants using non-invasive measurements. *J Dermatol Sci* 10: 159-65.
- 162 Patil S, Singh P, Sarasour K, Maibach HI (1995) Quantification of sodium lauryl sulfate penetration into the skin and underlying tissue after topical application: Pharmacological and toxicological implications. *J Pharm Sci* 84: 1240-4.
- 163 Pinnagoda J, Tupker RA, Agner T, Serup J (1990) Guidelines for transepidermal water loss (TEWL) measurement: A report from the Standardization Group of the European Society of Contact Dermatitis. *Contact Dermatitis* 22: 164-78.
- 164 Pinnagoda J, Tupker RA, Coenraads PJ, Nater JP (1989) Comparability and reproducibility of the results of water loss measurements: A study of 4 evaporimeters. *Contact Dermatitis* 20: 241-6.
- 165 Pinnagoda J, Tupker RA, Coenraads PJ, Nater JP (1989) Prediction of susceptibility to an irritant response by transepidermal water loss. *Contact Dermatitis* 20: 341-6.
- 166 Pinnagoda J, Tupker RA, Coenraads PJ, Nater JP (1989) Transepidermal water loss with and without sweat gland inactivation. *Contact Dermatitis* 21: 16-22.
- 167 Pinnagoda J, Tupker RA, Smit JA, Coenraads PJ, Nater JP (1989) The intra- and inter-individual variability and reliability of transepidermal water loss measurements. *Contact Dermatitis* 21: 255-9.
- 168 Pirot F, Kalia YN, Stinchcomb AL, Keating G, Bunge A, Guy RH (1997) Characterization of the permeability barrier of human skin in vivo. *Proc Natl Acad Sci U S A* 94: 1562-7.
- 169 Plewig G, Jansen T, Schurer NY (1997) Stratum corneum. *Hautarzt* 48: 510-21.
- 170 Potts RO, Francoeur ML (1991) The influence of stratum corneum morphology on water permeability. *J Invest Dermatol* 96: 495-9.
- 171 Proksch E (1992) Regulation der epidermalen Permeabilitätsbarriere durch Lipide und durch Hyperproliferation. *Hautarzt* 43: 331-8.
- 172 Proksch E, Brasch J, Sterry W (1996) Integrity of the permeability barrier regulates epidermal Langerhans cell density. *Br J Dermatol* 134: 630-8.
- 173 Proksch E, Feingold KR, Man MQ, Elias PM (1991) Barrier function regulates epidermal DNA synthesis. *J Clin Invest* 87: 1668-73.
- 174 Ramsing DW, Agner T (1996) Effect of glove occlusion on human skin (II). Long-term experimental exposure. *Contact Dermatitis* 34: 258-62.

- 175 Ramsing DW, Agner T (1996) Effect of glove occlusion on human skin. (I). short-term experimental exposure. *Contact Dermatitis* 34: 1-5.
- 176 Ramsing DW, Agner T (1997) Effect of water on experimentally irritated human skin. *Br J Dermatol* 136: 364-7.
- 177 Ramsing DW, Agner T (1997) Preventive and therapeutic effects of a moisturizer. An experimental study of human skin. *Acta Derm Venereol* 77: 335-7.
- 178 Rawlings AV, Harding CR (2004) Moisturization and skin barrier function. *Dermatol Ther* 17 Suppl 1: 43-8.
- 179 Rawlings AV, Scott IR, Harding CR, Bowser PA (1994) Stratum corneum moisturization at the molecular level. *J Invest Dermatol* 103: 731-41.
- 180 Redelmeier T, Schaefer H (1999) Pharmacokinetics and Topical Applikations of Drugs. In: Freedberg I, Eisen A, Wolff K, Austen K, Goldsmith L, Katz S, Fitzpatrick T (Hrsg.) *Fitzpatrick's Dermatology in General Medicine*. Fifth Edition. McGraw-Hill, New York, 2702-2706.
- 181 Reed JT, Ghadially R, Elias PM (1995) Skin type, but neither race nor gender, influence epidermal permeability barrier function. *Arch Dermatol* 131: 1134-8.
- 182 Reiche L, Willis C, Wilkinson J, Shaw S, de Lacharriere O (1998) Clinical morphology of sodium lauryl sulfate (SLS) and nonanoic acid (NAA) irritant patch test reactions at 48 h and 96 h in 152 subjects. *Contact Dermatitis* 39: 240-3.
- 183 Rhein LD, Robbins CR, Fernee K, Cantore R (1986) Surfactant structure effects on swelling of isolated stratum corneum. *J Soc Cosmet Chem* 37: 125-139.
- 184 Rhein LD, Simion FA, Hill RL, Cagan RH, Mattai J, Maibach HI (1990) Human cutaneous response to a mixed surfactant system: role of solution phenomena in controlling surfactant irritation. *Dermatologica* 180: 18-23.
- 185 Ribaud C, Garson JC, Lévêque JL (1991) In vitro study of the barrier function of human stratum corneum in relation to the organization of intercellular lipids and their thermal properties. *J Invest Dermatol* 96: 617.
- 186 Rogiers V (2001) EEMCO guidance for the assessment of transepidermal water loss in cosmetic sciences. *Skin Pharmacol Appl Skin Physiol* 14: 117-28.
- 187 Ryatt KS, Mobayen M, Stevenson JM, Maibach HI, Guy RH (1988) Methodology to measure the transient effect of occlusion on skin penetration and stratum corneum hydration in vivo. *Br J Dermatol* 119: 307-12.

- 188 Sawada Y, Sone K (1992) Hydration and occlusion treatment for hypertrophic scars and keloids. *Br J Plast Surg* 45: 599-603.
- 189 Schaefer H, Redelmeier TE (1996) Skin Barrier Principle of Percutaneous Absorption. Karger Verlag, Basel, 77-92.
- 190 Schäfer P, Bewick-Sonntag C, Capri MG, Berardesca E (2002) Physiological changes in skin barrier function in relation to occlusion level, exposure time and climatic conditions. *Skin Pharmacol Appl Skin Physiol* 15: 7-19.
- 191 Scheuplein RJ, Blank IH (1971) Permeability of the skin. *Physiol Rev* 51: 702-47.
- 192 Schuklenk U, Ashcroft R (2000) International research ethics. *Bioethics* 14: 158-72.
- 193 Schwindt DA, Wilhelm KP, Maibach HI (1998) Water diffusion characteristics of human stratum corneum at different anatomical sites in vivo. *J Invest Dermatol* 111: 385-9.
- 194 Seitz JC, Whitmore CG (1988) Measurement of erythema and tanning responses in human skin using a tri-stimulus colorimeter. *Dermatologica* 177: 70-5.
- 195 Serup J, Agner T (1990) Colorimetric quantification of erythema--a comparison of two colorimeters (Lange Micro Color and Minolta Chroma Meter CR-200) with a clinical scoring scheme and laser-Doppler flowmetry. *Clin Exp Dermatol* 15: 267-72.
- 196 Smeenk G (1969) The influence of detergents on the skin (a clinical and biochemical study). *Arch Clin Exp Dermatol* 235: 180-91.
- 197 Smit HA, Pinnagoda J, Tupker RA, Burema J, Coenraads PJ, Nater JP (1990) Variability in transepidermal water loss of the skin: evaluation of a method to assess susceptibility to contact dermatitis in epidemiological studies. *Int Arch Occup Environ Health* 62: 509-12.
- 198 Stender IM, Blichmann C, Serup J (1990) Effects of oil and water baths on the hydration state of the epidermis. *Clin Exp Dermatol* 15: 206-9.
- 199 Stillman MA, Maibach HI, Shalita AR (1975) Relative irritancy of free fatty acids of different chain length. *Contact Dermatitis* 1: 65-9.
- 200 Suetak T, Sasai S, Zhen YX, Tagami H (2000) Effects of silicone gel sheet on the stratum corneum hydration. *Br J Plast Surg* 53: 503-7.
- 201 Swartzendruber DC, Wertz PW, Kitko DJ, Madison DK, Downing DT (1989) Molecular models of the intercellular lipid lamellae in mammalian stratum corneum. *J Invest Dermatol* 92: 251-257.

- 202 Swartzendruber DC, Wertz PW, Madison KC, Downing DT (1987) Evidence that the corneocyte has a chemically bound lipid envelope. *J Invest Dermatol* 88: 709-13.
- 203 Takiwaki H, Overgaard L, Serup J (1994) Comparison of narrow-band reflectance spectrophotometric and tristimulus colorimetric measurements of skin color. Twenty-three anatomical sites evaluated by the Dermaspectrometer and the Chroma Meter CR-200. *Skin Pharmacol* 7: 217-25.
- 204 Treffel P, Gabard B (1995) Stratum corneum dynamic function measurements after moisturizer or irritant application. *Arch Dermatol Res* 287: 474-9.
- 205 Treffel P, Gabard B (1996) Measurement of sodium lauryl sulfate-induced skin irritation. *Acta Derm Venereol* 76: 341-3.
- 206 Tsai TF, Maibach HI (1999) How irritant is water? An overview. *Contact Dermatitis* 41: 311-4.
- 207 Tsuruta D, Green K, Getsios S, Jones J (2002) The barrier function of skin: how to keep a tight lid on water loss. *Trends Cell Biol* 12: 355.
- 208 Tupker RA, Bunte EE, Fidler V, Wiechers JW, Coenraads PJ (1999) Irritancy ranking of anionic detergents using one-time occlusive, repeated occlusive and repeated open tests. *Contact Dermatitis* 40: 316-22.
- 209 Tupker RA, Coenraads PJ, Fidler V, De Jong MC, van der Meer JB, De Monchy JG (1995) Irritant susceptibility and weal and flare reactions to bioactive agents in atopic dermatitis: I. Influence of disease severity. *Br J Dermatol* 133: 358-64.
- 210 Tupker RA, Coenraads PJ, Fidler V, De Jong MC, van der Meer JB, De Monchy JG (1995) Irritant susceptibility and weal and flare reactions to bioactive agents in atopic dermatitis: II. Influence of season. *Br J Dermatol* 133: 365-70.
- 211 Tupker RA, Coenraads PJ, Pinnagoda J, Nater JP (1989) Baseline transepidermal water loss (TEWL) as a prediction of susceptibility to sodium lauryl sulphate. *Contact Dermatitis* 20: 265-9.
- 212 Tupker RA, Pinnagoda J, Coenraads PJ, Nater JP (1989) The influence of repeated exposure to surfactants on the human skin as determined by transepidermal water loss and visual scoring. *Contact Dermatitis* 20: 108-14.
- 213 Tupker RA, Pinnagoda J, Coenraads PJ, Nater JP (1990) Susceptibility to irritants: role of barrier function, skin dryness and history of atopic dermatitis. *Br J Dermatol* 123: 199-205.

- 214 Tupker RA, Pinnagoda J, Nater JP (1990) The transient and cumulative effect of sodium lauryl sulphate on the epidermal barrier assessed by transepidermal water loss: Interindividual variation. *Acta Derm Venereol* 70: 1-5.
- 215 Tupker RA, Willis C, Berardesca E, Lee SH, Fartasch M, Agner T, Serup J (1997) Guidelines on sodium lauryl sulfate (SLS) exposure testing. *Contact Dermatitis* 37: 53-69.
- 216 Uter W, Pfahlberg A, Gefeller O, Schwanitz HJ (1999) Hand dermatitis in a prospectively-followed cohort of hairdressing apprentices: final results of the POSH study. *Prevention of occupational skin disease in hairdressers. Contact Dermatitis* 41: 280-6.
- 217 van de Kerkhof PC, de Mare S, Arnold WP, van Erp PE (1995) Epidermal regeneration and occlusion. *Acta Derm Venereol* 75: 6-8.
- 218 van der Valk PG, Maibach HI (1989) Post-application occlusion substantially increases the irritant response of the skin to repeated short-term sodium lauryl sulfate (SLS) exposure. *Contact Dermatitis* 21: 335-8.
- 219 van der Valk PG, Maibach HI (1989) Potential for irritation increases from the wrist to the cubital fossa. *Br J Dermatol* 121: 709-12.
- 220 van der Valk PG, Nater JP, Bleumink E (1984) Skin irritancy of surfactants as assessed by water vapor loss measurements. *J Invest Dermatol* 82: 291-3.
- 221 van der Valk PG, Nater JP, Bleumink E (1985) The influence of low concentrations of irritants on skin barrier function as determined by water vapour loss. *Derm Beruf Umwelt* 33: 89-91.
- 222 van Hal DA, Jeremiasse E, Junginger HE, Spies F, Bouwstra JA (1996) Structure of fully hydrated human stratum corneum: a freeze-fracture electron microscopy study. *J Invest Dermatol* 106: 89-95.
- 223 van Neste D (1990) In vivo evaluation of unbound water accumulation in stratum corneum. The influence of acute skin irritation induced by sodium laurylsulfate. *Dermatologica* 181: 197-201.
- 224 van Neste D, de Brouwer B (1992) Monitoring of skin response to sodium lauryl sulphate: clinical scores versus bioengineering methods. *Contact Dermatitis* 27: 151-6.
- 225 Varani J, Fligiel SE, Perone P, Inman DR, Voorhees JJ (1993) Effects of sodium lauryl sulfate on human skin in organ culture: Comparison with all-trans-retinoic acid and epidermal growth factor. *Dermatology* 187: 19-25.

- 226 Velkova V, Lafleur M (2002) Influence of the lipid composition on the organization of skin lipid model mixtures: An infrared spectroscopy investigation. *Chem Phys Lipids* 117: 63.
- 227 von den Driesch P, Fartasch M, Huner A, Ponec M (1995) Expression of integrin receptors and ICAM-1 on keratinocytes in vivo and in an in vitro reconstructed epidermis: Effect of sodium dodecyl sulphate. *Arch Dermatol Res* 287: 249-53.
- 228 Walker AI, Brown VK, Ferrigan LW, Pickering RG, Williams DA (1967) Toxicity of sodium lauryl sulphate, sodium lauryl ethoxysulphate and corresponding surfactants derived from synthetic alcohols. *Food Cosmet Toxicol* 5: 763-9.
- 229 Warner RR, Boissy YL, Lilly NA, Spears MJ, McKillop K, Marshall JL, Stone KJ (1999) Water disrupts stratum corneum lipid lamellae: damage is similar to surfactants. *J Invest Dermatol* 113: 960-6.
- 230 Warner RR, Stone KJ, Boissy YL (2003) Hydration disrupts human stratum corneum ultrastructure. *J Invest Dermatol* 120: 275-84.
- 231 Welzel J, Metker C, Wolff HH, Wilhelm KP (1998) SLS-irritated human skin shows no correlation between degree of proliferation and TEWL increase. *Arch Dermatol Res* 290: 615-620.
- 232 Welzel J, Wilhelm KP, Wolff HH (1996) Skin permeability barrier and occlusion: no delay of repair in irritated human skin. *Contact Dermatitis* 35: 163-168.
- 233 Werner Y, Lindberg M (1985) Transepidermal water loss in dry and clinically normal skin in patients with atopic dermatitis. *Acta Derm Venereol* 65: 102-5.
- 234 Wertz PW, Swartzendruber DC, Kitko DJ, Madison KC, Downing DT (1989) The role of the corneocyte lipid envelopes in cohesion of the stratum corneum. *J Invest Dermatol* 93: 169-72.
- 235 Widmer J, Elsner P, Burg G (1994) Skin irritant reactivity following experimental cumulative irritant contact dermatitis. *Contact Dermatitis* 30: 35-9.
- 236 Wigger-Alberti W, Krebs A, Elsner P (2000) Experimental irritant contact dermatitis due to cumulative epicutaneous exposure to sodium lauryl sulphate and toluene: single and concurrent application. *Br J Dermatol* 143: 551-6.
- 237 Wigger-Alberti W, Rougier A, Richard A, Elsner P (1998) Efficacy of protective creams in a modified repeated irritation test: Methodological aspects. *Acta Derm Venereol* 78: 270-3.
- 238 Wilhelm KP (1995) Effects of surfactants on skin hydration. *Curr Probl Dermatol* 22: 72-9.

- 239 Wilhelm KP, Cua AB, Maibach HI (1991) Skin aging. Effect on transepidermal water loss, stratum corneum hydration, skin surface pH, and casual sebum content. *Arch Dermatol* 127: 1806-9.
- 240 Wilhelm KP, Cua AB, Wolff HH, Maibach HI (1993) Surfactant-induced stratum corneum hydration in vivo: prediction of the irritation potential of anionic surfactants. *J Invest Dermatol* 101: 310-5.
- 241 Wilhelm KP, Freitag G, Wolff HH (1994) Surfactant-induced skin irritation and skin repair: Evaluation of a cumulative human irritation model by noninvasive techniques. *J Am Acad Dermatol* 31: 981-7.
- 242 Wilhelm KP, Maibach HI (1989) Skin color reflectance measurements for objective quantification of erythema in human beings. *J Am Acad Dermatol* 21: 1306-8.
- 243 Wilhelm KP, Pasche F, Surber C, Maibach HI (1990) Sodium hydroxide-induced subclinical irritation. A test for evaluating stratum corneum barrier function. *Acta Derm Venereol* 70: 463-7.
- 244 Wilhelm KP, Saunders JC, Maibach HI (1990) Increased stratum corneum turnover induced by subclinical irritant dermatitis. *Br J Dermatol* 122: 793-8.
- 245 Wilhelm KP, Surber C, Maibach HI (1989) Quantification of sodium lauryl sulfate irritant dermatitis in man: Comparison of four techniques: Skin color reflectance, transepidermal water loss, laser Doppler flow measurement and visual scores. *Arch Dermatol Res* 281: 293-5.
- 246 Williams ML, Elias PM (1987) The extracellular matrix of stratum corneum: role of lipids in normal and pathological function. *Crit Rev Ther Drug Carrier Syst* 3: 95-122.
- 247 Williams ML, Elias PM (1993) From basket weave to barrier. Unifying concepts for the pathogenesis of the disorders of cornification. *Arch Dermatol* 129: 626-9.
- 248 Willis CM, Stephens CJ, Wilkinson JD (1989) Epidermal damage induced by irritants in man: A light and electron microscopic study. *J Invest Dermatol* 93: 695-9.
- 249 Willis CM, Stephens CJ, Wilkinson JD (1990) Differential effects of structurally unrelated chemical irritants on the density and morphology of epidermal CD1+ cells. *J Invest Dermatol* 95: 711-6.
- 250 Willis CM, Stephens CJ, Wilkinson JD (1991) Selective expression of immune-associated surface antigens by keratinocytes in irritant contact dermatitis. *J Invest Dermatol* 96: 505-11.

- 251 Willis CM, Stephens CJ, Wilkinson JD (1992) Differential effects of structurally unrelated chemical irritants on the density of proliferating keratinocytes in 48 h patch test reactions. *J Invest Dermatol* 99: 449-53.
- 252 Willis CM, Stephens CJ, Wilkinson JD (1993) Differential patterns of epidermal leukocyte infiltration in patch test reactions to structurally unrelated chemical irritants. *J Invest Dermatol* 101: 364-70.
- 253 Wilmer JL, Burleson FG, Kayama F, Kanno J, Luster MI (1994) Cytokine induction in human epidermal keratinocytes exposed to contact irritants and its relation to chemical-induced inflammation in mouse skin. *J Invest Dermatol* 102: 915-22.
- 254 Wilson D, Berardesca E, Maibach HI (1988) In vitro transepidermal water loss: differences between black and white human skin. *Br J Dermatol* 119: 647-652.
- 255 Wilson DR, Maibach HI (1980) Transepidermal water loss in vivo. Premature and term infants. *Biol Neonate* 37: 180-5.
- 256 Zhai H, Poblete N, Maibach HI (1998) Stripped skin model to predict irritation potential of topical agents in vivo in humans. *Int J Dermatol* 37: 386-9.

## Danksagung

Danken möchte ich Herrn PD Dr. med. I. Effendy für die freundliche Überlassung des Themas und die herzliche Aufnahme in die Arbeitsgruppe der Hautphysiologie. Mein besonderer Dank gilt Herrn PD Dr. med. Löffler, der mich zu jeder Zeit tatkräftig unterstützt hat und dessen Ratschläge und konstruktive Kritik zum Gelingen dieser Arbeit wesentlich beigetragen haben. Die Zusammenarbeit mit ihm hat mir nicht nur sehr viel Freude bereitet sondern mich auch in meiner klinischen Arbeit entscheidend beeinflusst.

Herrn Dr. P. Zöfel vom Hochschulrechenzentrum der Philipps-Universität Marburg , der leider inzwischen verstorben ist, danke ich für die stets geduldige und ausführliche statistische Beratung.

Danken möchte ich ebenfalls allen Mitarbeiterinnen und Mitarbeitern der allergologischen Ambulanz und des hautphysiologischen Labors, die mich bei der Durchführung der Testungen unterstützt haben. Besonders bedanke ich mich auch bei allen Probanden, die sich für die Testungen unentgeltlich zur Verfügung gestellt haben.

Für die sorgfältige Durchsicht des Manuskriptes danke ich meinen Eltern, Frau Nathalie Stutz und Herrn Jürgen Fleck.

## **Verzeichnis der akademischen Lehrer**

Meine akademischen Lehrer waren die folgenden Damen und Herren Professoren und Dozentinnen/Dozenten:

### **- in Mainz –**

Benkert, Bhakdi, Brockerhoff, Dick, Eysel, Faust, Gerhardt, Haffner, Halmagyi, Hoffmann, Hopf, Huppmann, Junginger, Kilbinger, Kirkpatrick, Knop, Kutzner, Lieb, Löffelholz, Maurer, Michaelis, Mohr-Kahaly, Müller-Esterl, Ohler, Pfeiffer, Prellwitz, Romer, Schmidt, Schönhense, Schopf, Schramm, Schuhmann, Schulte, Spranger, Thüroff, Vaupel, Vollrath, Wanitschke, Zeile

### **-in Koblenz -**

Albers, Baumgaertel, Benner, Böhm, Brambring, Dormeyer, Elger, Hissen,  
Hülse, Kersting, Kaul, Kupp, Schmitz-Valckenberg

### **-in Stellenbosch/Südafrika-**

Cilliers, Jordaan, Louw, Muton, Swart

### **-in Marburg (Lahn) -**

Effendy, Happle, Hertl, König, Krause, Löffler, Paul