

**Ergebnisbericht zu dem Projekt**  
**„Hautirritationen durch Endotoxine in Kühl-Schmierstoffen“**  
**PD. Dr. D. Becker, Universitäts-Hautklinik Mainz**

**Stand der Wissenschaft**

Die Irritabilität gebrauchter wassergemischter Kühlschmierstoff (KSS) Emulsionen nimmt erfahrungsgemäß mit Zunahme der bakteriellen Besiedlung zu. Durch die bakterielle Kontamination können Endotoxine freigesetzt werden. Während die mögliche biologische Wirkung auf die Atmungsorgane aus anderen Arbeitsbereichen heraus abgeschätzt werden kann, finden sich in der Literatur keine konkreten Daten zu den direkten Wirkungen von Endotoxinen auf die menschliche Haut. Es ist daher bisher unklar, ob und in welchem Ausmaß auch eine krankheitsauslösende Wirkung auf das Hautorgan zu befürchten ist. So könnte die proinflammatorische Wirkung der Endotoxine Entzündungsreaktionen auslösen, die zur Entstehung eines irritativen Handekzems beitragen oder ein vorbestehendes Ekzem verschlimmern.

**Ziel des Projektes**

Die Ergebnisse dieses Projektes sollten die Bewertung zulassen, ob von einer möglichen Endotoxin-Belastung wassergemischter KSS eine Gefährdung der Haut ausgehen kann. Hieraus leitet sich ab, ob eine entsprechende Überwachung des Endotoxingehalts aus dermatologischer Sicht erforderlich ist oder diesbezüglich kein Handlungsbedarf besteht.

**Prinzip der Studie**

Es sollte untersucht werden, ob Endotoxin in einer Menge, die sicher über der in KSS vorkommenden Konzentration liegt, auf gesunder und irritativ vorgeschädigter Haut eine Entzündungsreaktion auslösen kann. Diese Aussage sollte sowohl für Atopiker als auch Nicht-Atopiker getroffen werden. Die Vorschädigung mit dem anionischen Detergenz Natriumlaurylsulfat (NLS) soll die bei Beschäftigten in der spanabhebenden Metallindustrie häufig vorkommende subklinische oder klinisch manifeste Hautschädigung simulieren. Die Endotoxinwirkung in Aqua wird mit der in einer gängigen KSS Emulsion verglichen, um einen möglichen Einfluß des KSS zu erfassen. Nach Vorschädigung mit NLS wurde für zwei Versuchstage auch das proinflammatorische Zytokin Tumor Nekrose Faktor- $\alpha$  aufgetragen, um die Durchlässigkeit der epidermalen Barriere für ein Makromolekül darzustellen.

**Versuchsablauf**

Die Versuche wurden auf gesunder sowie vorgeschädigter Haut, bei Atopikern und Nichtatopikern durchgeführt. Es nahmen insgesamt 30 Probanden teil, davon 15 Atopiker (8

männlich, 7 weiblich) und 15 Nichtatopiker (7 männlich,8 weiblich), im Alter zwischen 22-33 Jahren (Durchschnitt 26,4). Als Kriterium für die Gruppe der Atopiker wurde ein Punktwert > 14 im standardisierten Atopiescore nach Diepgen gefordert. In die Gruppe der Nichtatopiker wurden nur Probanden mit einem Atopiescore < 3 aufgenommen.

Auf dem Rücken der Probanden wurden jeweils 6 Felder rechts und links paravertebral in Größe der später verwendeten Epikutan-Testpflaster ( Large Finn Chambers ) markiert. Jeweils 6 der Hautfelder wurden am Tag vor dem eigentlichen Versuchsbeginn mit einer 10%igen Lösung des anionischen Detergenz Natriumlaurylsulfat ( NLS) für durchschnittlich 3 Stunden ( 2,5- 4 h) behandelt, um eine Vorschädigung der Haut zu erzielen. SDS wird in der Literatur als gängigste Substanz zur Auslösung einer irritativen Hautreaktion beschrieben. Die Verteilung der Hautfelder mit NLS-Vorbehandlung wurde für jeden Probanden individuell anhand eines randomisierten Aufklebeschemas (siehe weiter unten) festgelegt.

24 Stunden später wurden die Ausgangs-Meßwerte erhoben.

Dokumentiert wurde für alle 12 Hautfelder (6 mit NLS-Vorbehandlung, 6 unbehandelt):

1. Die visuelle Bewertung der Reaktionen nach den Ablesekriterien für Epikutantestungen als Maß für das klinische Erscheinungsbild der Haut.
2. Die Messung der Hautdurchblutung (Flow) mit Hilfe des Laser Blood Flow Dopplers DRT4 der Firma Moore Instruments als Maß für ein entzündliches Erythem.
3. Die Messung des transepidermalen Wasserverlustes (TEWL) mit dem Tewameter 210 der Firma Courage und Khazaka als Maß für die Schädigung der epidermalen Barriere.

Die Messungen wurden bei einer kontrollierten Umgebungstemperatur von konstant 20°C durchgeführt. Weiterhin wurde darauf geachtet, während der TEWL-Messungen die Luftkonvektion möglichst gering zu halten.

Im Anschluß an die Messungen wurden die zu testenden Substanzen -nach doppelblinder Kodierung der Ansätze durch eine dritte, nicht weiter am Versuch beteiligte Person- auf Epikutantestpflaster aufgebracht und auf die umrandeten Felder der Probanden an vier aufeinanderfolgenden Tagen nach dem folgenden, im Bezug auf die Anordnung der Testfelder individuell randomisierten Aufklebeschema appliziert.

	Vorbehandlung SDS ( -24h)	00h	24h	48h	72h
Feld 1	unbehandelt	Kontrolle	Kontrolle	Kontrolle	Kontrolle
Feld 2	unbehandelt	Kontrolle	Kontrolle	Kontrolle	Kontrolle
Feld 3	unbehandelt	Aqua	Aqua	Aqua	Aqua
Feld 4	unbehandelt	Aqua+LPS	Aqua+LPS	Aqua+LPS	Aqua+LPS
Feld 5	unbehandelt	KSS	KSS	KSS	KSS

Feld 6	unbehandelt	KSS+ LPS	KSS+ LPS	KSS+ LPS	KSS+ LPS
Feld 7	NLS	Kontrolle	Kontrolle	Kontrolle	Kontrolle
Feld 8	NLS	TNF	TNF	unbehandelt	unbehandelt
Feld 9	NLS	Aqua	Aqua	Aqua	Aqua
Feld 10	NLS	Aqua+LPS	Aqua+LPS	Aqua+LPS	Aqua+LPS
Feld 11	NLS	KSS	KSS	KSS	KSS
Feld 12	NLS	KSS+ LPS	KSS+ LPS	KSS+ LPS	KSS+ LPS

NLS = Natriumlaurylsulfat 10%

Kontrolle = unbehandeltes Kontrollfeld

KSS = wassergemischter Kühlschmierstoff, (Castrol, 5 % in Leitungswasser)

LPS = Lipopolysaccharid; Endotoxin (> 5000U/μl)

Aqua = steriles Wasser für Injektionszwecke

TNF = Tumor Nekrose Faktor  $\alpha$  ( $10^6$  U/ml)

Die Epikutantestpflaster wurden nach 6 Stunden wieder entfernt.

In der Zwischenzeit durften die Probanden weder körperlich anstrengenden Betätigungen, wie z. B. Sport, nachgehen, noch durften die Pflaster in Kontakt mit Wasser kommen (kein Duschen, Baden etc.).

Nach 24 Stunden wurden alle 12 Testfelder erneut nach Epikutantestkriterien visuell bewertet, sowie Messungen der Hautdurchblutung (Flow) und des transepidermalen Wasserverlustes (TEWL) durchgeführt. Anschließend wurden wiederum die Testsubstanzen nach bekanntem Aufklebeschema für 6 Stunden aufgebracht.

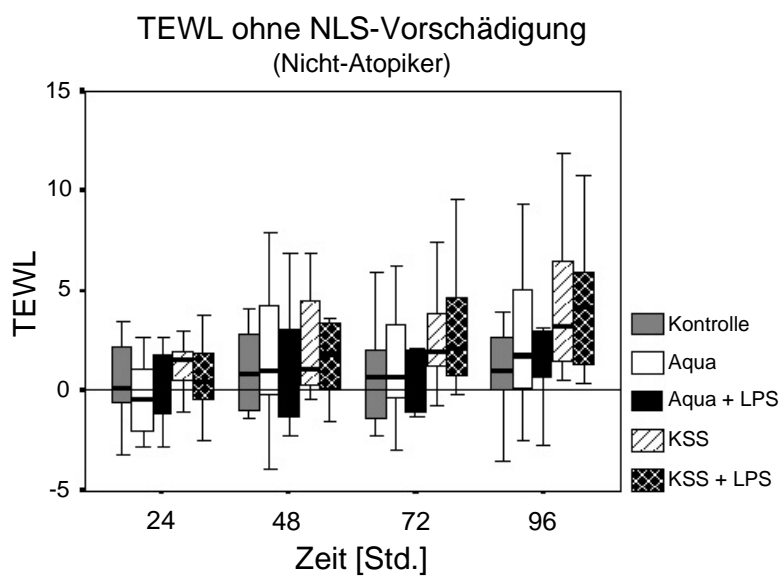
48 Stunden später erfolgte wieder die visuelle Bewertung und Messung des Flow und TEWL sowie das Aufkleben der entsprechenden Testsubstanzen für 6 Stunden. Das gleiche Vorgehen wiederholte sich nach 72 Stunden. Nach 96 Stunden wurde nur gemessen, da das Versuchsende erreicht war.

Die Meßwerte der Parameter visuelle Bewertung, Flow und TEWL nach 24, 48, 72 und 96 Stunden wurden zunächst für jeden einzelnen Probanden in Bezug zu seinem persönlichen Ausgangswert für das jeweilige Testfeld gesetzt. Das heißt, es wurden Differenzen gebildet zwischen dem Meßwert für z.B. Feld 8 nach 48 h und dem Ausgangs-Meßwert. Die Daten wurden mit dem Programm SPSS unter Einsatz des Wilcoxon-Test (nicht-parametrisch) für zwei verbundene Stichproben statistisch ausgewertet und in Boxplot-Graphiken dargestellt.

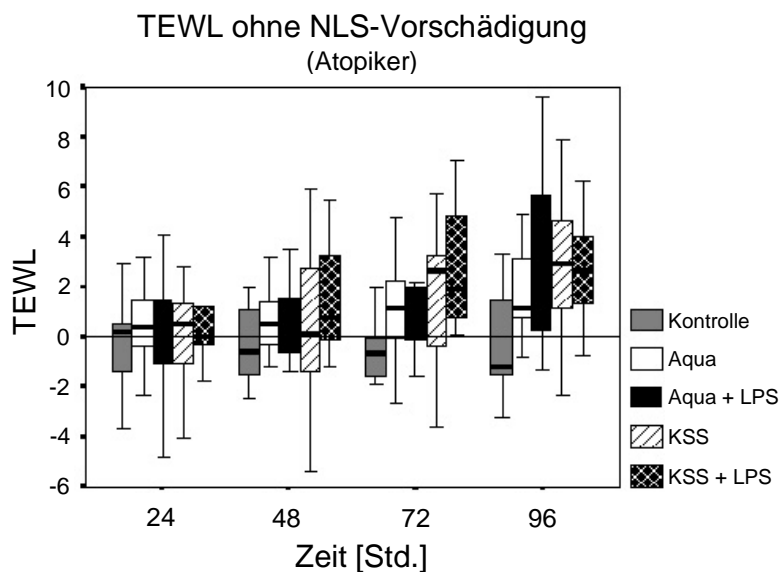
## Ergebnisse

Der transepidermalen Wasserverlust zeigte auf nicht vorgeschädigter Haut eine geringfügige Zunahme über die Zeit sowohl bei Atopikern als auch Nicht-Atopikern. Eine signifikante

Auswirkung ( $p < 0,05$ ) von LPS wurde weder bei Applikation in Aqua noch KSS festgestellt (Abb. 1+2). Auch die im Doppler bestimmte Durchblutung und der visuelle Score zeigten keine signifikanten Unterschiede (nicht graphisch dargestellt). Nach Vorschädigung mit NLS ergab sich eine drastischer Zunahme des TEWL im Vergleich zum Ausgangswert. Die nachfolgenden Applikationsintervalle führten zu einer stetigen Abnahme des TEWL als Ausdruck der zurückgehenden Schädigung der epidermalen Barriere. Diese Tendenz wurde auch durch LPS in Aqua oder KSS nicht signifikant beeinflusst (Abb 3 und 4). Auch die Durchblutungswerte und der visuelle Score wurden durch Endotoxin nicht verändert (nicht graphisch dargestellt).



**Abb. 1**



**Abb. 2**

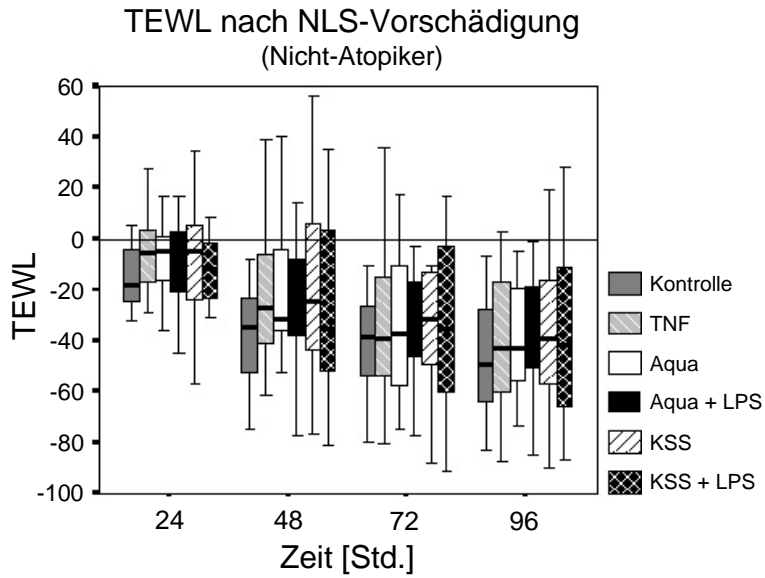


Abb. 3

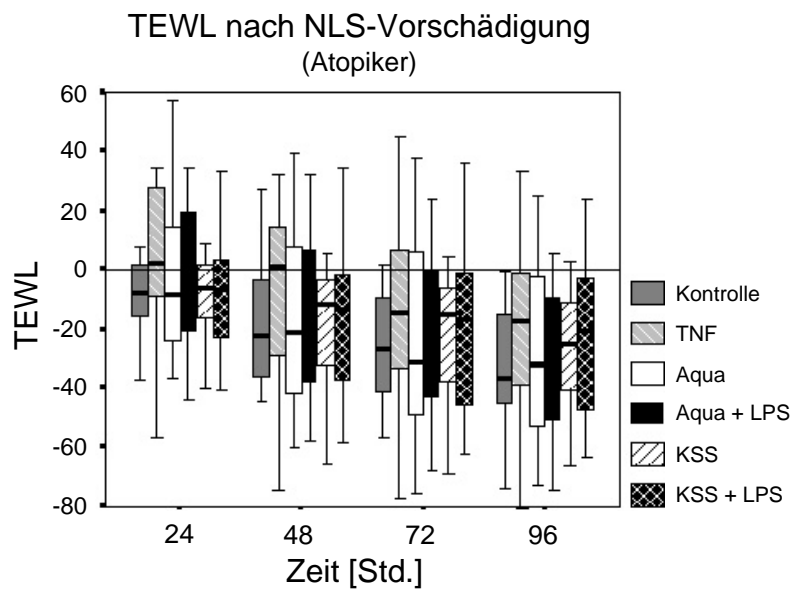


Abb.4

**Statistische Auswertung der TEWL-Messungen, Flow-Doppler und visuellen Scores an Atopikern und Nicht-Atopikern:**

Keine signifikanten Unterschiede im Vergleich von:

- Aqua mit und ohne LPS
- SDS/Aqua mit und ohne LPS
- KSS mit und ohne LPS
- SDS/ KSS mit und ohne LPS

Signifikante Unterschiede ergaben sich für den TEWL Wert und die Flow-Doppler Werte zwischen SDS/TNF und SDS/Kontrolle nach 24 und 48 h, d.h. die Rekonstitution des TEWL Wertes wird durch die Auswirkung von TNF- $\alpha$  deutlich verzögert, bzw. die TNF $\alpha$  behandelten Felder zeigten höhere Werte für die Hautdurchblutung. Ein messbarer Einfluss auf den visuellen Score war nicht erkennbar.

## **Diskussion**

Folgende Schlussfolgerungen können gezogen werden:

- Endotoxin erzeugt bei Exposition zur Haut über einen Zeitraum, der einer typischen täglichen Exposition entspricht (6Std.) über vier Tage keine Entzündungsreaktion der Haut.
- Dies trifft für gesunde als auch vorgeschädigte Haut zu, Endotoxin hat also weder eine primäre hautschädigende Wirkung noch einen additiven Effekt durch eine Wirkung auf Entzündungszellen oder verbesserte Penetration in vorgeschädigte Haut.
- Die Wirkung in KSS weicht nicht von der in Wasser ab, KSS alleine hat im Vergleich zu Wasser auch keinen signifikanten schädigenden Einfluß auf die Barrierefunktion.
- Die geschädigte epidermale Barriere ist permeabel für Makromoleküle, da TNF- $\alpha$  die Rekonstitution der Barriere-Funktion deutlich verzögerte.

Hieraus ergibt sich die Aussage, dass eine Kontamination von KSS mit Endotoxin keine erhöhte Hautirritation bedingt. Die Überwachung des Endotoxin-Gehalts und Festlegung eines Grenzwerts wird daher keinen Beitrag zum Hautschutz in der spanabhebenden Metallindustrie leisten können.