

# Hudpenetration af pesticider

**- en undersøgelse af effekten af hjælpestoffer,  
kombinationseffekter, handsker, samt lettere  
beskadiget hud**

Jesper Bo Nielsen  
Syddansk Universitet

Miljøstyrelsen vil, når lejligheden gives, offentliggøre rapporter og indlæg vedrørende forsknings- og udviklingsprojekter inden for miljøsektoren, finansieret af Miljøstyrelsens undersøgelsesbevilling.

Det skal bemærkes, at en sådan offentliggørelse ikke nødvendigvis betyder, at det pågældende indlæg giver udtryk for Miljøstyrelsens synspunkter.

Offentliggørelsen betyder imidlertid, at Miljøstyrelsen finder, at indholdet udgør et væsentligt indlæg i debatten omkring den danske miljøpolitik.

# Indhold

<b>INDHOLD</b>	<b>3</b>
<b>FORORD</b>	<b>5</b>
<b>SAMMENFATNING OG KONKLUSION</b>	<b>7</b>
PROJEKTETS FORMÅL	7
HJÆLPESTOFFERS EGNEFFEKT	7
KOMBINATIONSEFFEKTER	7
HANDSKERS BESKYTTELSESEVNE MOD HUDPENETRATION	8
PENETRATION AF PESTICIDER GENNEM LETTERE BESKADIGET HUD	8
KONKLUSIONER	9
PROBLEMSTILLINGER OG PERSPEKTIVER FOR FORTSATTE STUDIER	10
<b>SUMMARY AND CONCLUSIONS</b>	<b>11</b>
BACKGROUND	11
EFFECT OF DETERGENTS ON SKIN INTEGRITY AND PENETRATION	11
EFFECTS OF MIXTURES OF PESTICIDES ON DERMAL PENETRATION	12
EFFECT OF GLOVES ON DERMAL PENETRATION OF PESTICIDES	12
PENETRATION OF PESTICIDES THROUGH SLIGHTLY DAMAGED SKIN	13
CONCLUSIONS AND FUTURE PERSPECTIVES	13
<b>1 INDLEDNING</b>	<b>15</b>
1.1 FORMÅL	16
1.2 BAGGRUND	16
1.3 RELEVANS	17
<b>2 METODE</b>	<b>19</b>
2.1 IN VITRO MODEL	19
2.2 EKSPERIMENTELT DESIGN	20
2.3 VARIABILITET OG STATISTIK	21
2.4 KEMISKE ANALYSER	21
2.5 DELSTUDIER	21
2.5.1 <i>Delstudie 1 – Hjælpestoffers egeneffekt</i>	<i>21</i>
2.5.2 <i>Delstudie 2 - Kombinationseffekter</i>	<i>21</i>
2.5.3 <i>Delstudie 3 – Handskers beskyttelseseffekt</i>	<i>22</i>
2.5.4 <i>Delstudie 4 – Penetration gennem beskadiget hud</i>	<i>22</i>
<b>3 DELSTUDIE 1 - HJÆLPESTOFFERS EGNEFFEKT</b>	<b>23</b>
3.1 BAGGRUND	23
3.2 FORMÅL	23
3.3 VALG AF HJÆLPESTOFFER	23
3.4 EKSPERIMENTEL MODEL	23
3.5 PRAKTISK FORSØGSFORLØB	24
3.6 GENNEMFØRTE FORSØG	24
3.7 RESULTATER	24
3.8 RESULTAT-OVERSIGT	25
3.9 KONKLUSION PÅ HJÆLPESTOFFERS EGNEFFEKT	25
<b>4 DELSTUDIE 2 – KOMBINATIONSEFFEKTER</b>	<b>27</b>

4.1	AKTIVSTOFFER	27
4.2	AKTIVSTOFFER + HJÆLPESTOFFER	27
4.3	KOMBINATIONSEFFEKTER MELLEM AKTIV- OG HJÆLPESTOFFER	29
4.3.1	<b>Resultater af kombinationsforsøg</b>	<b>30</b>
4.4	KONKLUSION PÅ KOMBINATIONSFORSØG	33
4.5	AKTIVSTOFFER I SALGSFORMULERINGER	33
4.5.1	<b>MesuroI</b>	<b>33</b>
4.5.2	<b>PirimorG</b>	<b>35</b>
4.6	KONKLUSION PÅ EFFEKT AF SALGSFORMULERINGER	36
4.7	EFFEKT AF DOSIS PÅ DERMAL PENETRATION	36
4.8	KONKLUSION PÅ DOSIS-FORSØG	37
5	<b>DELSTUDIE 3 – HANDSKERS BESKYTTELSESEFFEKT</b>	<b>39</b>
5.1	UNDERSØGELSESVARIABLER	39
5.2	UNDERSØGELSESPARAMETRE	39
5.3	EKSPERIMENTELT DESIGN	39
5.4	RESULTATER	39
5.4.1	<b>Methiocarb</b>	<b>39</b>
5.4.2	<b>Pirimicarb</b>	<b>42</b>
5.5	KONKLUSION PÅ HANDSKEFORSØG	43
6	<b>DELSTUDIE 4 – PENETRATION Gennem BESKADIGET HUD</b>	<b>45</b>
6.1	METODE	45
6.2	EKSPERIMENTELT DESIGN	45
6.3	RELEVANS	46
6.4	RESULTATER	46
6.4.1	<b>Delstudie 4-1</b>	<b>46</b>
6.4.2	<b>Delstudie 4-2</b>	<b>48</b>
6.4.3	<b>Delstudie 4-3</b>	<b>51</b>
6.5	KONKLUSION PÅ DELSTUDIE MED LETTERE BESKADIGET HUD.	53
7	<b>KONKLUSIONER OG PERSPEKTIVER</b>	<b>57</b>
7.1	KONKLUSIONER	57
7.2	VIDENSKABELIGE OG REGULERINGSMÆSSIGE PERSPEKTIVER	58
8	<b>REFERENCER</b>	<b>59</b>

# Forord

Mange års forebyggende indsats for at nedbringe luftvejseksposeringen for bekæmpelsesmidler i gartneri og landbrug betyder, at hudeksponering nu er den dominerende eksponeringsvej. En række faktorer kan ændre på bekæmpelsesmidlers evne til at trænge gennem huden. Det drejer sig dels om de anvendte aktivstoffers og hjælpestoffers fysiske-kemiske egenskaber, men i lige så høj grad om hvorvidt huden er beskadiget med smårifter, irritation eller lignende. Endvidere drejer det sig om, hvorvidt de handsker man anvender yder den forventede beskyttelse. Dette projekts overordnede mål er at tilvejebringe viden, der kan anvendes til sikring og forbedring af arbejdsmiljøet inden for gartneri og landbrug. Fokus i denne undersøgelse er hudpenetration og betydningen af interaktion mellem aktiv- og hjælpestoffer, handskers beskyttelsesgrad samt betydningen af en lettere beskadiget hud.

Undersøgelsen er finansieret af Miljøstyrelsens midler til bekæmpelsesmiddelforskning, og nærværende afrapportering dækker projekterne 'Hudpenetration af pesticider – kombinationseffekter mellem aktiv- og hjælpestoffer' og 'Penetration af pesticider gennem lettere beskadiget hud'. Forfatteren har modtaget konstruktive kommentarer fra den af Miljøstyrelsen nedsatte følgegruppe bestående af repræsentanter for Miljøstyrelsen (Susanne Hougaard, Jørn Kirkegaard), Arbejdstilsynet (Flemming Lander), Arbejdsmiljøinstituttet (Mari-Ann Flyvholm) samt Odense Universitetshospital (Klaus E Andersen).

Endelig skal laborant Franziska Lind takkes for omhyggelig og professionel gennemførelse af undersøgelsens praktiske dele.

Januar 2004.

Jesper Bo Nielsen



# Sammenfatning og konklusion

## Projektets formål

Formålet med projektet var at tilvejebringe viden om

- hjælpestoffers effekt på hudpenetration af aktivstoffer
- udvalgte aktivstoffers kombinationseffekter på hudens barrierefunktion
- forskellige handskematerialers indflydelse på aktivstoffers hudpenetration
- betydningen af lettere beskadiget hud for hudpenetration af pesticider

Projektet har taget udgangspunkt i de aktivstoffer, der anvendes i Danmark. De koncentrationer af aktivstoffer, der er anvendt i de enkelte delstudier, har været umiddelbart sammenlignelige med de anbefalede koncentrationer af aktivstof ved anvendelse i gartneri/landbrug. De udvalgte pesticider var methiocarb og pirimicarb, der begge er carbamater, samt svampemidlet prochloraz, væksthæmmeren paclobutrazol, samt insektmidlet dimethoat. Endvidere anvendtes salgsformuleringerne af methiocarb (Mesurol fra Bayer) og pirimicarb (PirimorG fra Zeneca).

Projektets anvendelsesmæssige mål var at generere konkrete data med umiddelbar anvendelighed i farlighedsvurderingen af de undersøgte hjælpestoffer og relevante blandinger. Denne information kan bruges som basis for substitution til mindre skadelige hjælpestoffer og ved udarbejdelse af sikkerhedsanvisninger omkring brug af beskyttelseshandsker. Endvidere skulle projektet give viden om interaktioner mellem aktivstoffer. Det afsluttende delprojekt omkring lettere beskadiget hud har relevans for den del af regelsætningen vedrørende pesticider, der måtte basere sig på lag-time og flux – to faktorer som en lettere beskadigelse af huden potentielt vil kunne påvirke. Projektet har således haft både grundvidenskabelige og anvendelsesorienterede mål.

## Hjælpestoffers egeneffekt

Tre hyppigt anvendte hjælpestoffers effekt på hudens barrierefunktion er undersøgt og sammenlignet med såvel positive som negative kontrolstoffer. Hverken ethylenglycol, propylenglycol eller lignosulfonsyre ødelagde hudens integritet efter 48 timers eksponering for op til 10 mM af stofferne.

## Kombinationseffekter

De tre anvendte hjælpestoffer synes generelt at nedsætte den samlede penetration af de udvalgte pesticider over 48 timer, om end effekten er begrænset. De observerede små effekter er betinget af en kombination af en lettere nedsat maksimal flux af de testede pesticider sammen med en til tider svagt nedsat lag-time.

To udvalgte pesticiders penetrationskarakteristika i salgsopløsninger er inddraget. Penetrationen af pesticiderne i salgsopløsninger afviger klart fra de rene stoffers penetrationsegenskaber. Mest markant er en signifikant nedsat lag-time. Både Mesurol (aktivstof – methiocarb) og PirimorG (aktivstof – pirimicarb) har en lag-time på 2 timer i modsætning til de rene aktivstoffers lag-time på omkring 10 timer. Samlet ses en signifikant større penetration af aktivstofferne i salgsopløsning over 48 timer i forhold til aktivstofferne alene. Det er imidlertid ikke denne forskel, der ud fra et praktisk synspunkt er mest interessant. Det er derimod den ganske betydelig kortere lag-time, der betyder, at man under normale arbejdsbetingelser vil risikere absorption af methiocarb eller pirimicarb langt hurtigere end oprindeligt antaget på basis af undersøgelse af aktivstoffet alene. De fundne resultater vurderes at have umiddelbar anvendelse i relation til råd og vejledning omkring hygiejne og anvendelse af handsker ved omgang med disse pesticider.

Kombinationsforsøgene med aktivstoffer viser, at de to carbamater ikke i betydende omfang påvirker hinandens penetrationskarakteristika. Paclobutrazol synes heller ikke at påvirke penetration, flux, eller lag-time for de to carbamater, mens begge carbamater påvirker penetrationen af paclobutrazol. Samlet må det konkluderes, at kombinationseffekter eksisterer og kan resultere i såvel øget som nedsat penetration. Eftersom den nugældende regelsætning kun forholder sig til enkeltstoffer, antyder disse resultater, at området burde have mere bevågenhed.

#### Handskers beskyttelsesevne mod hudpenetration

Handskematerialers indflydelse på aktivstoffers hudpenetration er undersøgt med to pesticider (methiocarb samt pirimicarb). Tre forskellige handsker er undersøgt; to nitril-handsker samt en latex-handske. Fra handskeforsøgene rapporteres "break-through-time", der er den tid, det tager et stof at gennembrænge såvel handsken som den underliggende hud og således på sin vis analog med lag-time fra de rene hud-forsøg. Herudover beregnes penetrationshastigheden.

Penetrationen gennem latex handsker og nitrilhandsker i de første 12 timer er ikke signifikant forskellig, hvorimod man ser klare forskelle ved senere måletidspunkter. Ingen af de undersøgte handskematerialer øgede tiden, inden pesticiderne kunne måles i receptorkammeret på undersiden af huden. Derimod nedsatte både nitril- og latexhandsker signifikant penetrationshastigheden af de to anvendte pesticider. Denne penetrationsbegrænsende effekt holdt sig hele forsøgsperiodens 48 timer for nitrilhandsker, mens beskyttelseseffekten ikke var betydende for latexhandsker efter 24 timer.

#### Penetration af pesticider gennem lettere beskadiget hud

Ved undersøgelse af fremmedstoffers penetrationsegenskaber gøres oftest en betydelig indsats for at sikre, at den undersøgte hud er intakt, ensartet og med optimale barriereegenskaber. Imidlertid kendetegnes virkeligheden hos den enkelte medarbejder ofte af en hudstatus der er markant ringere i forhold til intakte barriereegenskaber.

Lettere beskadiget hud fås ved forbehandling af intakt hud med natrium lauryl sulfat (SLS), der er kendt for at kunne inducere en delvis nedbrydning af



hudens barrierefunktion via påvirkning af stratum corneum (7, 16). Forsøgene består således af en præbehandlingsfase på 3 timer, hvorunder huden udsættes for SLS, efterfulgt af eksponering for teststof i 24-30 timer.

En diskussion af den konceptionelle model for hudpenetration konkluderer, at en påvirkning af hudens barriereegenskaber ikke nødvendigvis påvirker både flux, lag-time samt reservoir.

På basis af de opnåede resultater kan det konkluderes, at man ved en lettere beskadiget hud opnår en markant nedsat lag-time. Konsekvensen heraf er en forøget penetration. For eksponeringsperioder af en varighed omkring den oprindelige lag-time for de to modelstoffer vil den relative forøgelse af mængden af penetreret modelstof kunne være ganske stor. For et stof med en lag-time på 6 timer ved optimal hud vil en nedsættelse af lag-time til 2/3 (4 timer), hvilket svarer til vore resultater, resultere i en fordobling af den penetrerede mængde stof i løbet af en 8 timers eksponeringsperiode. Dette resultat har klare implikationer for den vejledning, der gives omkring anvendelse af pesticider og handsker.

## Konklusioner

Projektet har opfyldt dets hovedformål og leveret viden af både grundvidenskabelig og anvendelsesorienteret værdi.

Under anvendelse af en velvalideret eksperimentel model er det vist, at de udvalgte hjælpestoffer kun i begrænset omfang påvirker hudens barrierefunktion samt penetrationen af tre udvalgte pesticider.

Såfremt pesticiderne derimod anvendes i salgsopløsninger, ses i forhold til de rene stoffer en markant reduktion i den tid, der går, før pesticiderne kan måles på undersiden af huden. Salgsformuleringerne reducerer altså lag-time. Dette kan have konsekvenser for den regelsætning, der alene baseres på undersøgelser af rene stoffer. Endvidere indikerer det, at man ved alternative hjælpestoffer potentielt kan få produkter med sundhedsmæssigt mere fordelagtige penetrationsegenskaber. Formulering af salgsprodukter vil dog altid være en afvejning af tekniske såvel som sundhedsfaglige egenskaber.

Kombinationsforsøg med 3 pesticider viser, at kombinationseffekter eksisterer og kan resultere i såvel øget som nedsat penetration. Da regelsætningen kun forholder sig til eksponering for enkeltstoffer, peger disse undersøgelser på et problemfelt, der kunne kræve større bevågenhed.

Ingen af de undersøgte handskematerialer øgede den tid, det tog, før pesticiderne kunne måles på undersiden af huden. Derimod nedsatte både nitril og latex signifikant penetrationshastigheden af de to pesticider. Denne penetrationsbegrænsende effekt holdt sig hele forsøgsperiodens 48 timer for nitrilhandsker, mens beskyttelseeffekten ikke var betydende for latexhandsker efter 24 timer.

På basis af de opnåede resultater med lettere beskadiget hud kan det konkluderes, at man ved en lettere beskadiget hud opnår en markant nedsat lag-time. Konsekvensen heraf er en forøget penetration. For et stof med en lag-time på 6 timer ved optimal hud vil en nedsættelse af lag-time til 2/3 (4 timer) resultere i en fordobling af den penetrerede mængde stof i løbet af en 8 timers eksponeringsperiode. Denne viden vil sammen med resultaterne fra

undersøgelser af handskematerialer have betydning for de råd og den vejledning, der gives omkring anvendelse af såvel produkterne som værnemidler mod eksponering.

På basis af undersøgelser af fem modelstoffer konkluderes, at opløseligheden har betydning for stoffernes penetrationsegenskaber. De gennemførte undersøgelser viser, at både en for høj og en for lav lipofilitet begrænser hudpenetrationen. Endvidere indikerer eksperimenterne med beskadiget hud, at den beskadigelse, der jo sker fra oversiden af huden, primært har effekt på passagen fra donor og ind i huden, hvilket illustreres ved de markant ændrede penetrationsforhold for den meget hydrofile dimethoat.

Man må endvidere forholde sig til, at en beskadiget hud potentielt giver anledning til en øget ophobning af stof i huden (reservoir effekt). Betydningen af denne deponering og hvorvidt den vil lede til en øget men forsinket penetration er hid til kun meget sparsomt belyst.

Projektet har således påpeget betydningen af reservoir-effekten samt tilstedeværelsen af hjælpestoffer i færdigformuleringer. Begge områder har betydning i relation til arbejdsmiljøforhold samt generel regelsætning på pesticidområdet, men den nuværende viden bør udbygges.

Problemstillinger og perspektiver for fortsatte studier

Et fremadrettet perspektiv vil være en nærmere undersøgelse af betydningen af såvel molvægt som opløselighed for reservoir-effekten. Dette indebærer analyse af den mængde modelstof, der persisterer i huden ved eksponerings- og forsøgsophør, og som efterfølgende fortsat vil kunne absorberes selvom den dermale eksponering er stoppet. Diskussioner med andre hudpenetrations-laboratorier viser, at dette er ganske vanskeligt at gøre reproducerbart uden brug af isotoper. Reservoir-effekten vil derfor lettest kunne belyses ved studier med radioaktivt mærkede modelstoffer. Her vil man af pris og leveringsmæssige årsager sandsynligvis som udgangspunkt anvende modelstoffer, der ikke er pesticider, men som repræsenterer samme fysisk-kemiske karakteristika i forhold til molvægt og opløselighed. Herved vil muligheden for analogi-slutninger over til relevante pesticider fortsat være mulig.

Et andet felt, der vil kræve fremtidig fokus, er effekten af hjælpestoffer på den dermale penetration. Nærværende undersøgelse understreger ikke alene betydningen af at anvende undersøgelser af salgsprodukter som vurderingsgrundlag ved regelsætning, men også at revurderinger ved substitution af hjælpestoffer i allerede godkendte pesticider kræver en nærmere vurdering. I Miljøstyrelsens nuværende vurderingsgrundlag (fra 1999) står der ikke andet end at Miljøstyrelsen vurderer den dermale absorption, men ikke hvordan man gør. Baggrunden herfor er mangel på viden omkring hjælpestoffers effekt på den dermale penetration af aktivstoffer. En mangel på umiddelbar tilgængelig viden bør imidlertid ikke få Miljøstyrelsen til at ignorere denne problemstilling.

# Summary and conclusions

## Background

Pesticides are among the few substances distributed into our environment with the intent to harm biological systems. The selectivity of pesticides varies and many of the toxicological endpoints that pesticides target also make humans a potential target. Toxicity may involve systemic as well as local effects, depending on the route of exposure. The primary occupational exposure to pesticides is dermal, and occurs during mixing and spraying, and in green houses during re-entry activities, i.e. activities related to handling recently treated plants.

The purpose of the project was to study:

- Effect of detergents on skin integrity and penetration
- Effects of mixtures of pesticides on dermal penetration
- Effects of gloves on dermal penetration of pesticides
- Penetration of pesticides through slightly damaged skin

The present study examined the in-vitro percutaneous penetration of five pesticides widely used in agriculture and green houses. The five pesticides were the fungicides methiocarb, pirimicarb, and prochloraz, the growth retardant paclobutrazol and the insecticide dimethoate. An experimental model with static diffusion cells mounted with human breast or abdominal skin was used, and pesticide concentrations were quantified by HPLC. The pesticides covered a wide range of solubilities, as well as different molecular weights, which allowed discussion of penetration characteristics of the single pesticides as well as comparisons between penetration characteristics as influenced by product formulation and selected detergents. Further, the degree of protection that different glove materials offered against dermal penetration of pesticides was studied. Finally, the degree to which a slightly damaged dermal barrier would affect penetration characteristics of the five pesticides was evaluated.

An overall aim was to generate data that could feed directly into the hazard assessment process for the selected detergents, pesticides and their mixtures. This information could be used as a basis for substituting to less hazardous detergents, when writing safety data sheets, and when giving recommendations on the use of gloves during work with pesticides. The sub-project on slightly damaged skin was to specifically question the guidelines based on penetration data from skin with full integrity.

## Effect of detergents on skin integrity and penetration

Pesticides are not used commercially as pure chemicals, but are mixed with different detergents to change solubility characteristics and in some cases increase the penetration into leaves of plants. The three detergents included in

this study were chosen on the basis of their use in several product formulations and an expected low dermal toxicity.

None of the three detergents (ethylene glycol, propylene glycol and lignosulfonic acid) damaged the skin integrity significantly following 48 hours exposure to 10 mM.

The three detergents (ethylene glycol, propylene glycol and lignosulfonic acid) only marginally affected the dermal penetration of methiocarb, pirimicarb and paclobutrazol. The detergents used in the sales formulations of methiocarb (Mesurol) and pirimicarb (PirimorG) did, however, change penetration characteristics significantly compared to the pure pesticides. The time between application of the pesticides on the apical side of the skin and appearance below the skin (the lag-time) was significantly reduced for both pesticides, which caused a significantly increased total penetration during the experimental period. The reduced lag-time demonstrated the range of effects that different detergents may have on penetration of pesticides, and suggests that regulatory agencies consider these data when evaluating pesticides resubmitted for approval after a change in formulation. At present, the Danish EPA does not require updated penetration data when re-evaluating known pesticides in changed formulations.

#### Effects of mixtures of pesticides on dermal penetration

Pesticides may be used as mixtures or distributed one at a time on plant cultures with very short time intervals. In both cases, employees handling these recently treated cultures will potentially be exposed to a mixture of pesticides. Knowledge on interactions between pesticides is scarce, and often focuses on toxicity in animals following oral exposure. The present study used three pesticides to evaluate whether one pesticide would change penetration characteristics of another pesticide when applied together. The experiments demonstrated that interactions do occur, and may cause increased as well as decreased penetration depending on the pesticides mixed. As regulatory guidelines only relate to single pesticides, the present results suggest that this area might deserve a higher focus.

#### Effect of gloves on dermal penetration of pesticides

When dermal exposure to pesticides cannot be avoided through prolonged re-entry intervals, gloves are used to prevent dermal absorption. We have evaluated the penetration of methiocarb and pirimicarb through a double layer consisting of human skin plus glove. Gloves made of nitrile or latex were used in this study. None of the gloves reduced significantly the break-through time, i.e. the time from application of the pesticide on top of the glove to appearance below the skin. Both glove materials significantly reduced the pesticide penetration during the initial 12 hours exposure compared to unprotected skin. The protection offered by latex gloves was not significant after 24 hours. During a 48 hours observation period the nitrile gloves offered significantly better protection against pesticide penetration than gloves made of latex. As both glove materials apparently offer equal protection during short-term exposure, it would be more important from a preventive perspective to avoid re-using gloves instead of focusing on the glove material being latex or nitrile. An important caveat to these studies is, however, that they only included pure pesticides and not the sales formulations, which

potentially may affect results for penetration through the different glove materials.

Penetration of pesticides through slightly damaged skin

International guidelines for experimental studies on dermal penetration require full integrity of the dermal barrier. However, workplace experience and occupational epidemiology repeatedly describes sub-optimal skin conditions for many employees. It was therefore prudent to study whether a slightly damaged skin would change penetration characteristics of pesticides.

Sodium Lauryl Sulfate (SLS) is known to affect the barrier integrity of the skin. Slightly damaged skin is achieved through three hours' exposure to 0.1% or 0.3% SLS. Following this pre-treatment, SLS is removed, the skin is washed, and pesticides applied.

The lag-time for the pesticides included in the study was significantly reduced and the total amount of pesticide penetrating the skin during a specified period increased significantly. These findings will have clear implications as to the guidance of workers exposed to pesticides and their use of gloves.

Conclusions and future perspectives

The pesticides included in the present study covered a wide range of lipophilicities with  $\log P_{ow}$  values ranging from 0.7 to 4.4. Comparison between penetration characteristics of the five pesticides demonstrated that neither a too low, nor a too high  $\log P_{ow}$  is optimal for dermal penetration. The experiments with slightly damaged skin demonstrated a significantly reduced lag-time for the pesticides tested; knowledge that ought to be considered in future guidelines related to dermal exposure to pesticides. Further, these studies indicated that the apical damage introduced mainly affects the passage from donor and into the skin and will have largest consequences for the most hydrophilic pesticides. The study on gloves included gloves made of nitril and gloves made of latex. As both glove materials apparently offer equal protection during short-term exposure, it would be more important from a preventive perspective to avoid re-using gloves instead of focusing on the glove material being latex or nitrile.

An important area for further research will be to study the fate of the pesticides that enter the skin compartment, which acts as a reservoir for further absorption, and whether this reservoir is emptied on the apical side or absorbed. This problem would be especially relevant for the pesticides with prolonged lag-times. A further implication of the prolonged lag-times, which may extend beyond exposure time at the workplace, is that biological monitoring of workers through blood samples will be compromised if this factor is not considered.



# 1 Indledning

Den dominerende eksponeringsvej for pesticider i landbrug og gartneri er dermal (1,2). Eksponeringen sker hyppigst under re-entry aktiviteter, hvor planter håndteres kort tid efter at de er blevet behandlet med pesticider. Medarbejderne har her direkte kontakt til blade, stængler og jord, på hvis overflade pesticiderne stadig befinder sig. Behandlingshyppigheder er afhængig af de dyrkede kulturer og varierer meget. Undersøgelser fra Fynske gartnerier viser, at behandlingshyppigheden i visse perioder kan være 3-5 gange om ugen. Afhængig af pesticid vil aktivstoffet kunne genfindes på overflader i kortere eller længere tid efter udbringning. Den hyppige behandling med flere forskellige midler, fx svampemidler og retarderingsmidler, gør derfor, at samtidig dermal eksponering for flere stoffer kan være hyppig. Den pulmonære og den orale eksponering er mere begrænset, om end utilsigtet oral eksponering kan forekomme. Viden om pesticiders hudabsorption er begrænset, og har hidtil primært fokuseret på aktivstoffers penetrationsevne. Virkeligheden er imidlertid, at de produkter, som man eksponeres for, er blandingsprodukter, der ud over aktivstoffer indeholder en række bærestoffer, fortykningsmidler, dispergeringsmidler og blødgørere; stoffer der under ét betegnes detergenter eller hjælpestoffer. Som en konsekvens af eksponeringssituationen foreskriver de seneste EU-guidelines for evaluering af hudpenetration og dermal toksicitet (EC Directive 91/414) da også testning af såvel aktivstoffer som salgsprodukt. At den humane eksponering så ofte omfatter mere end ét pesticid med deraf følgende mulighed for yderligere kombinationseffekter mellem aktivstoffer er kun ganske sparsomt undersøgt. Relevansen af sådanne undersøgelser er imidlertid betydelig, eftersom praktiske erfaringer viser, at svampemidler for eksempel ofte anvendes i kombination og eventuelt samtidig med insekticider eller retarderingsmidler.

Hjælpestoffernes funktion er at muliggøre opblanding af vandopløselige (hydrofile) og fedtopløselige (lipofile) enkeltstoffer, men også at facilitere hydrofile stoffers passage af lipidmembraner. Sidstnævnte virkning udnyttes indenfor farmaci, men også i relation til for eksempel pesticiders penetration og absorption i planter er hjælpestofferne af betydning. Det er således ikke alene hjælpestoffernes egen dermale toksicitet, der er væsentlig, men måske i endnu højere grad deres evne til at øge absorptionen af andre stoffer med potentielt langt alvorligere og systemiske effekter. Forebyggelse heraf kan ske ved hensigtsmæssig substitution eller sekundært ved anvendelse af værnemidler i form af egnede handsker.

Det er imidlertid ikke alene forskellige stoffers kemiske profil eller diverse handskematerialers egenskaber, der bestemmer graden af dermal absorption. Det gør også hudens egen status. De fleste hidtidige undersøgelser tilsigter optimal og intakt hud ved undersøgelse af penetration. Virkeligheden er imidlertid ofte, at hudens barrierefunktion er mere eller mindre kompromiteret som følge af smårifter, hudirritation, etc.

## 1.1 Formål

Formålet med dette projekt er derfor at tilvejebringe viden om

- hjælpestoffers effekt på hudpenetration af aktivstoffer
- udvalgte aktivstoffers kombinationseffekter på hudens barrierefunktion
- forskellige handskematerialers indflydelse på aktivstoffers hudpenetration
- betydningen af lettere beskadiget hud for hudpenetration af pesticider

Denne viden vil på længere sigt give konkret mulighed for en sundhedsbaseret substitution af hjælpestoffer, hvilket vil indebære fordele af arbejdsmiljømæssig karakter. Endvidere vil viden om kombinationseffekter mellem aktivstoffer på absorptionsniveau samt effekt af værnemidler på hudpenetration kunne danne videnskabelig baggrund for en diskussion af gældende regler på bekæmpelsesmiddelområdet.

## 1.2 Baggrund

Risikovurdering for pesticider må omfatte dels aktiv- og hjælpestoffernes egen toksicitet, dels deres funktion som mediatorer af andre stoffers absorption og potentielle toksicitet. Rollen som mediator effektueres dels ved en direkte facilitering af andre stoffers absorption, altså en øget biotilgængelighed for disse stoffer (3), men også gennem en direkte effekt på hudens barrierefunktion (4,5). Selv om nogle hjælpestoffer udviser en egen toksicitet, er det normalt rollen som mediator, der er den væsentligste.

Hjælpestoffer er en stor gruppe af kemiske stoffer med den fælles egenskab, at de nedsætter overfladespændingen på vandige opløsninger i kraft af non-polære såvel som polære grupper. Den non-polære gruppe er hyppigt en længere alifatisk kulbrintekæde, medens den polære gruppe kan være enten kationisk, anionisk eller nonionisk. Disse to kemiske grupper med forskellige opløselighedskarakteristika vil tillade lipofile stoffer at opblandes i vandige opløsninger og hydrofile stoffer at passere lipidmembraner.

Anvendelsen af specifikke hjælpestoffer i pesticider er betinget af tekniske egenskaber i relation til produktets umiddelbare anvendelse. Hjælpestoffer med identiske eller sammenlignelige tekniske egenskaber kan imidlertid have helt forskellige toksiske egenskaber (6,7). Der synes således ikke at være en umiddelbar sammenhæng mellem den kvantitative evne til at nedsætte overfladespændingen og potentialet for skade af hudbarrieren (8).

Vi har tidligere undersøgt 4 hjælpestoffers effekt på hudens barrierefunktion. Barrierefunktionen blev vurderet i forhold til penetration af tritieret vand. Resultaterne viste for tre hjælpestoffer en øget penetration men ingen ødelæggelse af hudens barrierefunktion, medens det fjerde hjælpestof kraftigt øgede hudpenetrationen og samtidig ødelagde barrierefunktionen (9). Resultaterne fra disse publicerede forsøg er særdeles spændende og antyder, at hjælpestofferne virker gennem forskellige mekanismer, udviser forskellig dermal toksicitet, og at vort forsøgsdesign tillader såvel vurdering af penetrationshastigheder som studier af effekter på hudens barrierefunktion.

Netop afsluttede eksperimenter med tre hyppigt anvendte aktivstoffer i danske pesticider (Methiocarb, Paclobutrazol, Pirimicarb) har vist klart forskellige karakteristika med hensyn til hudpenetrationshastighed. Endvidere fandtes, at



aktivstoffer trods identiske opløseligheder kan have en signifikant forskellig hudpenetration (10). Dette fund kan potentielt få betydelige implikationer for gældende regelsætning, hvor man oftest alene anvender opløselighedsmål som indikator for hudpenetration.

### 1.3 Relevans

Projektet har taget udgangspunkt i de aktivstoffer, der anvendes i Danmark. De koncentrationer af aktivstoffer, der anvendes i de enkelte delstudier, er sammenlignelige med de anbefalede koncentrationer af aktivstof ved anvendelse i gartneri/landbrug. Oplysninger om disse koncentrationer er indhentet dels fra producent og dels fra brugerne af færdigprodukterne. Projektet sigte var at generere konkrete data, der er umiddelbart anvendelige i farlighedsvurderingen af de undersøgte hjælpestoffer og relevante blandinger. Denne information kan bruges som basis for substitution til mindre skadelige hjælpestoffer og ved udarbejdelse af sikkerhedsanvisninger omkring brug af beskyttelseshandsker. Endvidere vil projektet give værdifuld viden om interaktioner mellem aktivstoffer. Det afsluttende delprojekt omkring lettere beskadiget hud har relevans for den del af regelsætningen vedrørende pesticider, der måtte basere sig på lag-time og flux – to faktorer som en lettere beskadigelse af huden potentielt vil kunne påvirke. Projektet har således både grundvidenskabelige og anvendelsesorienterede mål.



## 2 Metode

Effekten af hjælpestoffer og aktivstoffer på såvel barrierefunktion som penetration af huden undersøges i en in vitro diffusionscellemodel ved anvendelse af human hud. Modellen er beskrevet i OECD's guidelines for undersøgelse af hudpenetration (11) og er særdeles relevant for denne type undersøgelser, idet hudens barrierefunktion overvejende er bestemt af det epidermale lag af døde celler, stratum corneum (12). Den eksperimentelle model tillader kvantitering og sammenligning af både transport igennem og temporær deposition i huden. Modellen er tidligere anvendt og valideret overfor enkelte udvalgte hjælpestoffer (13) og har vist en god overensstemmelse med in vivo hudpenetrationsforsøg på mennesker (11,14). Modellen er den bedste eksperimentelle mulighed for at tilvejebringe systematisk viden. Der er udvalgt relevante hjælpestoffer og et mindre antal aktivstoffer, som er evalueret alene og i kombination.



Figur 1. Diffusionscelle af glas til penetrationsforsøg.

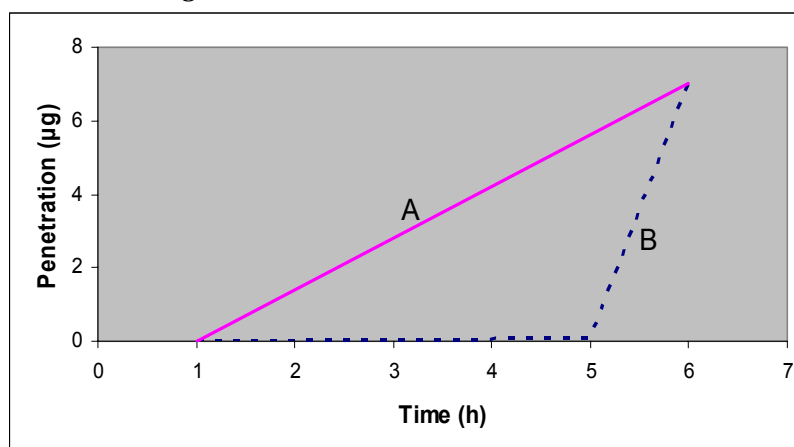
### 2.1 In vitro model

Diffusionscellerne er af håndblæst glas og består af et donorkammer og et receptorkammer (figur 1). Huden, der stammer fra abdominalplastikker eller brystreduktioner foretaget på Odense Universitets-hospitals plastikkirurgiske afdeling, præpareres (se appendix 1), monteres på et stål gitter og placeres mellem de to kamre med stratum corneum vendende mod donorkammeret. Der er i samtlige forsøg anvendt fuldhud med en tykkelse på 0,7-1,0 mm. Udtørring af huden ved fordampning undgås ved at dække donorcellen med parafilm. Receptorvæsken der fylder receptor-kammeret omrøres konstant (magnetomrøring) for at undgå en koncentrationsgradient mellem top og bund i receptorkammeret. Receptorvæsken er 50 % ethanol i alle forsøg bortset fra forsøgene med lettere beskadiget hud, hvor receptorvæsken var isotonisk saltvand. Diffusionscellerne placeres i vandbad (35°C) for at sikre en temperatur på omkring 32°C på hudoverfladen, svarende til normal hudtemperatur. Hudens integritet sikres ved kapacitansmåling før forsøg påbegyndes.

## 2.2 Eksperimentelt design

Et fast volumen af hjælpestof, aktivstof eller blanding heraf appliceres på huden i donorkammeret. Der udtages med fastsatte intervaller prøver fra receptorkammeret af de applicerede stoffer. Det udtagne volumen erstattes med frisk receptorvæske, således at receptorvolumen holdes konstant. Koncentrationen af hjælpestof og aktivstof måles i de udtagne prøver. Ved gentagne udtagninger over tid vil fluxen af hjælpestof og aktivstof kunne bestemmes. Under forsøgene er der udtaget prøver efter typisk 3, 6, 24, 30, og 48 timer. I de seneste forsøg er der dog også taget prøver efter 12 timer med henblik på en bedre bestemmelse af specielt lag-time. De i receptorvæsken målte pesticid-koncentrationer danner basis for penetrationskurver ud fra hvilke, den totale penetration over 48 timer samt penetrationshastigheden (fluxen) kan bestemmes. Kurveforløbene i nærværende forsøg kan beskrives ved en initial periode (lag-fase), hvor der endnu ikke kan observeres nogen penetration. Lag-fasens udstrækning er ikke et udtryk for, at der ikke trænger pesticid ind i huden, men et udtryk for hvor lang tid der går, før pesticidet trænger gennem huden. Efter lag-fasen observeres en penetration resulterende i stadig stigende koncentration af pesticid i receptorvæsken og dermed i de udtagne prøver. En kurve over penetrationen over tid har et tilnærmelsesvis sigmoidt forløb. Hældningen på den kurve er udtryk for penetrationshastigheden og betegnes fluxen. Da lag-fasens udstrækning varierer både mellem donorer og mellem pesticider, vil det kun sjældent være muligt at udtage prøver præcis ved den første gennemtrængning af hudmembranen. Lag-fasens udstrækning estimeres ved at ekstrapolere penetrations-kurverne baglæns. Den rapporterede flux er den maksimale flux observeret gennem forsøgsperioden.

Alle tre mål har relevans i vurderingen af penetrationskarakteristika for et givet stof. Den totale mængde penetreret over en bestemt periodes eksponering, fx 48 timer, anvendes ofte som basis for risikovurdering eller anbefalinger i relation til anvendelse af handsker i arbejdsmiljøsituationer. Tallet bør dog, som det fremgår af nedenstående figur (figur 2) ikke stå alene, men suppleres med de to kinetiske mål, flux samt lag-time. Figuren viser således, at samme totale penetration kan fremkomme på basis af to helt forskellige penetrationskurver. I arbejdsmiljø sammenhænge vil der således ikke være tvivl om, hvilket stof man ville foretrække ved en eksponeringstid under 4-5 timer, medens anbefalingen muligvis ville ændres ved eksponeringstider omkring 6 timer eller længere.



Figur 2. Teoretiske penetrationskurver for to stoffer med identisk totalpenetration efter 6 timer, men forskellig lag-time og flux.

## 2.3 Variabilitet og statistik

Anvendelsen af hud fra forskellige donorer betinger en naturlig heterogenitet med deraf følgende interindividuel variation. Den intraindividuelle variation er imidlertid mere begrænset, og ved at sikre repræsentation af samme donor i både eksperimentel og kontrolgruppe kan man opnå valide resultater med gruppestørrelser på 6-8 diffusionsceller per stof (9,10). Tidligere forsøg har vist, at huden opretholder fuld barrierefunktion i over 72 timer, hvilket muliggør både kortere og længere eksponeringsperioder. Grundet gruppestørrelsen og en erfaringsmæssig venstreforskydning af fordelingskurven anvendes som udgangspunkt non-parametrisk statistik.

## 2.4 Kemiske analyser

Måling af mængden af pesticid i en prøve sker ved spektrofotometrisk måling i forhold til en standardkurve efter en primær separation ved hjælp af et HPLC apparatur (9). Separationen på HPLC sker, ved at stofferne presses gennem en kolonne, hvor stofferne tilbageholdes i forskellig grad afhængig af deres polaritet. Såfremt to stoffer ligner hinanden kemisk, vil de derfor potentielt kunne interferere ved HPLC analyse. Ved analyse af kombinationsforsøgene viste det sig vanskeligt at adskille to af pesticiderne ved den hidtidige anvendte separation på HPLC, hvorfor der måtte anvendes en del ressourcer (=tid) på ændring og optimering af HPLC gradient/løbevæske for at muliggøre valid måling af begge pesticider. Det er således alene separationen, der er ændret, medens kvantificeringen af de tre pesticider er identisk med tidligere forsøg (9).

Tabel 1. Kemiske karakteristika for anvendte modelstoffer.

Modelstof	Mol-vægt (g/mol)	Log P <sub>ow</sub>	Opløselighed (g/L vand)	Retentionstid på HPLC (min)
Dimethoate	229.2	0.7	23.8	3.45
Pirimicarb	238.3	1.7	3.0	3.41
Paclobutrazol	293.8	3.2	0.026	4.50
Methiocarb	225.3	3.34	0.027	5.17
Prochloraz	376.7	4.4	0.034	4.96

## 2.5 Delstudier

### 2.5.1 Delstudie 1 – Hjælpestoffers egen effekt

I dette delstudie sammenlignes tre udvalgte hjælpestoffer med betydelig anvendelse i Danmark med nonylphenolethoxylat med hensyn til effekt på hudens barrierefunktion og på medierende effekt over for udvalgte modelstoffer.

### 2.5.2 Delstudie 2 - Kombinationseffekter

Folk, der arbejder i væksthuse, eksponeres ofte for pesticider ved almindelig håndtering af pesticidbehandlede planter. Pesticiderne anvendes og udlægges i en formulering, der bl.a. indeholder hjælpestoffer. Disse hjælpestoffers potentielle mulighed for at øge absorptionen af det aktive pesticid er generelt ukendt. I delstudie 2 undersøges et antal pesticider med relevans for danske forhold i deres tekniske salgsformulering, som aktivt stof alene og desuden i kombination med forskellige hjælpestoffer og andre aktivstoffer. De alternative hjælpestoffer er udvalgt på basis af resultaterne fra delstudie 1.

### 2.5.3 Delstudie 3 – Handskers beskyttelseeffekt

Arbejdsprocedurer ved håndtering af pesticider foreskriver ofte brug af handsker. Hjælpestoffers evne til at øge handskegennemtrængeligheden af forskellige humanrelevante kemiske forbindelser er stort set ikke undersøgt bortset fra et enkelt studie af permeabiliteten over for natrium lauryl sulfat (16). I delstudie 3 vil handskemateriale blive placeret ovenpå stratum corneum og den integrerede barrierefunktion vurderet efter eksponering til aktivstoffer og hjælpestoffer eller kombinationer heraf. Relevante handskematerialer (latex og nitril) undersøges.

### 2.5.4 Delstudie 4 – Penetration gennem beskadiget hud

Undersøgelser af penetrationsegenskaber og mulige effekter på hudens mere generelle barrierefunktion gennemføres både in vivo og in vitro på mennesker såvel som forsøgsdyr. I alle tilfælde gøres en betydelig indsats for at sikre at den undersøgte hud er intakt, ensartet og med optimale barriereegenskaber. Imidlertid kendetegnes virkeligheden hos den enkelte medarbejder ofte af en hudstatus, der er markant ringere i forhold til intakte barriereegenskaber. Der kan således være tale om at længere tids arbejde med fugtige planter, at vand har opblødt hænderne, eller tilstedeværelse af smårifter og irriteret hud. Denne virkelighed afspejles ikke i hidtidige guidelines (9) samt gennemførte eksperimentelle studier, og betydningen i kvantitative termer for mængden af absorberet fremmedstof er stort set ukendt, men generelle skøn nævner muligheden for en 2-9 ganges forøget penetration (17). I delstudie 4 er en eksperimentel model med lettere beskadiget hud valideret og anvendt til belysning af betydningen af en beskadiget hud for dermal penetration af udvalgte pesticider.

# 3 Delstudie 1 - hjælpestoffers egenerffekt

## 3.1 Baggrund

Visse hjælpestoffer vides at påvirke hudens barrierefunktion. Ved substitution er det således væsentligt at anvende stoffer, der ikke i sig selv nedsætter hudens barrierefunktion.

## 3.2 Formål

Formålet med dette delstudie var at sammenligne udvalgte hjælpestoffers egenerffekt over for hudens barriereegenskaber. Referencerammen er vand, som vides ikke at påvirke barrieren, SLS (natrium lauryl sulfat; Sigma; MW = 288.4g/mol), som vides at kompromittere barriereintegriteten, samt nonylphenoethoxylat (12 æter-grupper; Promochem GmbH; MW= 748 g/mol), der hidtil har været anvendt i betydeligt omfang som hjælpestof i salgsformuleringen af flere bekæmpelsesmidler.

## 3.3 Valg af hjælpestoffer

De to hyppigst anvendte hjælpestoffer, propylenglycol (Fluka; MW = 76.1 g/mol) og ethylenglycol (Prolabo; MW = 62.1 g/mol), samt lignosulfonsyre (Aldrich; højmolekylært polymerprodukt med MW = 18,000-52,000 g/mol) er anvendt i nærværende undersøgelse. Valget af hjælpestoffer er baseret på oplysninger fra Miljøstyrelsens pesticidkontor (via Pia Berthelsen, Fødevarerdirektoratet) om forbrugsmønster for hjælpestoffer i Danmark. Alle tre hjælpestoffer er på den prioriterede liste for stoffer, om hvilke man ønsker EU-risikovurdering. Denne undersøgelse fokuserer på hjælpestoffernes påvirkning af hudens barriereegenskaber, medens en diskussion af hjælpestoffernes potentielle helbredseffekter kan findes hos Tobiassen et al. (18,19).

## 3.4 Eksperimentel model

Den i indledningen beskrevne model (pkt. 3.4) samt eksperimentelle design (pkt. 3.5) er anvendt. Hudbarrierens integritet er således vurderet ved måling af kapacitansændringer over tid samt ved måling af penetration af tritieret vand. De to metoder har tidligere vist sig kvalitativt at stemme overens i forhold til information om hudens integritet, hvorfor kommende delstudier involverende pesticidanalyser primært vil anvende kapacitansmålet som indikation for den initiale status for hudens barrierefunktion.

### 3.5 Praktisk forsøgsforløb

Dag 1 opsættes celler med human hud. Efter 16-20 timer kontrolleres hudens integritet ved kapacitansmåling. Anvendelige celler tilsættes donorstof. Der måles kapacitans og udtages prøver på fastlagte tidspunkter i løbet af de følgende 48 timer. Herefter afsluttes forsøget, og udtagne prøver fra receptorkammeret måles (beta-tæller). En forsøgsserie strækker sig således over knap 4 arbejdsdage plus analysetid.

### 3.6 Gennemførte forsøg

Nedenfor fremgår de undersøgte stoffer samt de anvendte koncentrationer, der er valgt således, at den højeste er større end de i færdigprodukter normalt anvendte koncentrationer.

	Nonyl-phenol-ethoxylat	Natrium lauryl sulfat (SLS)	Ethylen-glycol	Propylen-glycol	Ligno-sulfonsyre
Konc.	2.5 mM	0.2% (7mM)	2.5 mM	2.5 mM	1.0% (-0.25mM)
Konc.	10 mM	1.0% (35mM)	10 mM	10 mM	4.0% (~1mM)

### 3.7 Resultater

Der er en meget begrænset variation mellem de gennemsnitlige kapacitanser til tiden  $t=0$  (tabel 2). Resultaterne viser således en høj grad af ensartethed i forhold til udgangspunktet for vore eksperimentelle undersøgelser. Kapacitansen på celler udsat for SLS øges signifikant med tiden, ligesom dosis også ses at have indflydelse. Penetrationen af tritieret vand i SLS-behandlede celler når 300-400% af kontrollen (tabel 2). Som det eneste blandt de øvrige hjælpestoffer, der er anvendt, øger nonylphenol-ethoxylat markant kapacitansen, dog kun ved den højeste koncentration. De resterende hjælpestoffer synes således ikke at påvirke integriteten af hudbarrieren målbart. Trods bevaret integritet ses dog en næsten fordoblet penetration af tritieret vand efter behandling med flere af hjælpestofferne. Som eneste af de testede hjælpestoffer synes lignosulfonsyre faktisk at stabilisere barrierefunktionen, således at den tidsrelaterede nedsættelse af hudens integritet i forsøgsopstillingen udskydes (tabel 2). Denne længere tids opretholdelse af fuldt intakt barriere resulterer da også i en mindre penetration end i kontrollerne med rent vand (tabel 2).



Tabel 2. Resultater fra undersøgelse af hjælpestoffers egeneffekt på hudens integritet. Kapacitans er målt ved forsøgets begyndelse, efter knapt et døgn samt ved forsøgsafslutning medens penetration af tritieret vand er opgjort over 48 timer.

Hjælpestof		Kapacitans (nF)			Penetration af H <sub>2</sub> O (% af vand)
Navn	Konc. (mM)	t = 0 timer	t = 21 timer	t = 48 timer	
Vand (neg. kontrol)		40	43	65	100
SLS (pos. kontrol)	7 (0.2%)	46	345	840	340
	35 (1.0%)	27	461	7180	410
Ethanol (24%)		34	40	46	180
Nonyl-phenol-ethoxylat	2.5	37	44	58	190
	10	47	109	124	220
Ethylen-glycol	2.5	44	53	57	220
	10	42	44	52	110
Propylen-glycol	2.5	55	61	74	290
	10	43	46	50	110
Lignosulfonsyre	0.25	33	34	35	66
	1.0	41	44	47	89

### 3.8 Resultat-oversigt

- vand:** fungerer som negativ kontrol, og viser da også intakt barrierefunktion efter 48 timer.
- SLS:** positiv kontrol, og resultater viser en dosis- og tidsafhængig nedbrydelse af hudens barrierefunktion. Den mest markante og følsomme effektparameter er kapacitansmålingen.
- Ethanol:** hyppigt anvendt opløsningsmiddel mhp øget vandblandbarhed. Øger penetrationen af tritieret vand (180%) uden at påvirke kapacitansen signifikant.
- Nonylphenol:** 2.5 mM påvirker ikke kapacitans, hvorimod penetration af tritieret vand næsten fordobles. Den højere koncentration (10 mM) fordobler såvel kapacitans som mængden af tritieret vand, der penetrerer i løbet af 48 timer.
- Ethylenglycol:** påvirker ikke kapacitansen, medens penetrationen af tritieret vand er fordoblet ved den lave koncentration.
- Propylenglycol:** påvirker ikke kapacitansen, medens penetrationen af tritieret vand er tredoblet ved den lave koncentration.
- Lignosulfonsyre:** påvirker ikke kapacitans eller penetration af tritieret vand ved hverken høj eller lav koncentration.

### 3.9 Konklusion på hjælpestoffers egeneffekt

De tre undersøgte hjælpestoffer (ethylenglycol, propylenglycol, lignosulfonsyre) er velegnede da de ikke synes at øge kapacitansen. Imidlertid øger begge glycoler penetrationen af vand markant. Efter diskussion i følgegruppen besluttedes at begrænse efterfølgende delstudier til anvendelse af to hjælpestoffer: ethylenglycol samt propylenglycol.



## 4 Delstudie 2 – kombinationseffekter

### 4.1 Aktivstoffer

Variabiliteten i hudpenetration mellem enkeltindivider beskrives ofte som værende omkring 50 %, hvorfor man normalt tilstræber, at flere donorer indgår i et eksperimentelt setup, ligesom antallet af celler per gruppe typisk er 8-10. Nedenstående data (Tabel 3-5) demonstrerer denne variabilitet, men understøtter også, at det ved anvendelse af tilstrækkeligt antal celler er muligt at opnå en rimelig datakvalitet. Andre publicerede undersøgelser beskriver en lag-time for pirimicarb på 18 timer, hvilket svarer til nærværende data (Tabel 5). Sammenlignes methiocarb og pirimicarb ses markante forskelle både hvad angår lag-time og flux. Lag-time er således halv så lang for methiocarb (Tabel 8), ligesom flux'en er noget større. Samlet set, giver det en ganske betydelig større hudpenetration over 48 timer. Årsagen til forskellene mellem de to pesticiders penetrationsegenskaber skal ikke findes i deres størrelse, idet molvægtene er ret ens (225 kontra 238 g/mol), men derimod i deres opløseligheder, hvor methiocarb har en  $\log P_{ow}$  på 3.3 sammenlignet med pirimicarbs 1.7.  $\log P_{ow}$  er et mål for forholdet mellem opløseligheden i octanol og i vand, og en lavere  $\log P_{ow}$  betyder altså en højere grad af vandopløselighed og dermed en under normale omstændigheder dårligere evne til at passere membraner. De praktiske resultater synes således at stemme overens med de teoretiske overvejelser.

Det bør endvidere bemærkes, at flere opslagsværker beskriver hudabsorptionen af disse to pesticider som særdeles begrænset. Det kunne formodes, at denne konklusion var baseret på studier med observationsperioder under 8 timer. Begge pesticider har i den anvendte eksperimentelle opsætning en lag-time omkring 8-15 timer, hvilket betyder, at forebyggende tiltag i form af regelmæssig håndvask burde have en virkning. Imidlertid tager lag-time for de rene pesticider ikke højde for den mængde stof, der potentielt er absorberet i huden, men endnu ikke er penetreret. En undersøgelse af dette aspekt vil kræve et forsøgs-design, der anvender en begrænset eksponeringstid efterfulgt af en længere observationsperiode. Forsøg af denne karakter er under gennemførelse i forbindelse med det parallelt forløbende EU-projekt. Herudover vil der, som der vil fremgå senere, kunne findes ganske betydelige forskelle mellem resultater opnået med rene stoffer og resultater opnået med brugsopløsninger. En manglende penetration af rene stoffer over 8 timer kan således ikke umiddelbart tages til indtægt for, at penetrationen under normale arbejdsforhold er fraværende og anvendelsen af handsker unødvendig.

### 4.2 Aktivstoffer + hjælpestoffer

Den perkutane penetration af de tre pesticider er undersøgt under tilstedeværelse af de to hjælpestoffer (ethylenglycol og propylenglycol). Kemiske analyser er gennemført for samples fra forsøgene med pirimicarb og methiocarb. Resultaterne fra forsøgene med pirimicarb viser, at de to hjælpestoffer øger fluxen lidt, ligesom lag-time nedsættes med 10-20 %. Samlet giver tilstedeværelse af ethylenglycol anledning til en 20 % forøget

mængde penetreret pirimicarb i løbet af 48 timer, medens den tilsvarende forøgelse med propylenglycol er omkring 40 %. For methiocarb er effekten betydeligt mere begrænset, idet en hjælpestof-betinget forøget flux opvejes af en lettere forøget lag-time, der samlet giver anledning til næsten uændrede absorptionsdata over en 48 timer periode.

Det er her væsentligt at bemærke de ændringer, som sker med lag-time, hvor man ved methiocarb ser en øgning, medens man ved pirimicarb ser en nedsættelse. Årsagen til netop denne parameters betydning er, at eksponeringstiden under normal anvendelse af produkterne er af kortere varighed.

Set i lyset af de to hjælpestoffers neutrale egenskaber over for hudens barrierefunktion (delstudie 1) er de om end små effekter, der ses i nærværende delstudie, spændende, da de indikerer en facilitering af absorptionen af pirimicarb enten ved forøget passiv diffusion eller via binding mellem pesticid og hjælpestof. For methiocarb ses denne effekt ikke, men methiocarb er jo også i forvejen lettere absorberbart som følge af højere lipofilitet (lavere vandopløselighed).

Tabel 3. Effekt af ethylenglycol (EG; 10mM) og propylenglycol (PG; 10mM) på flux af pirimicarb (0.2mM) gennem human hud. Flux er udtrykt som medianværdier i enheden nmol/time x cm<sup>2</sup>.

	Antal celler/gruppe	Pirimicarb	Pirimicarb + EG	Pirimicarb + PG
Forsøg 8	6	0.284	0.256	0.143
Forsøg 8½	6	0.263	0.320	0.352
Forsøg 13	6	0.406	0.417	0.368
Total median	18	0.284	0.320	0.352

Tabel 4. Effekt af ethylenglycol (EG; 10mM) og propylenglycol (PG; 10mM) på penetreret mængde af pirimicarb (0.2mM) gennem human hud i løbet af 48 timer kontinuerlig eksponering. Mængden er udtrykt som medianværdier i enheden nmol/cm<sup>2</sup>.

	Antal celler/gruppe	Pirimicarb	Pirimicarb + EG	Pirimicarb + PG
Forsøg 8	6	10.0	9.8	5.6
Forsøg 8½	6	8.9	12.1	14.2
Forsøg 13	6	15.6	15.3	14.4
Total median	18	10.0	12.1	14.2

Tabel 5. Effekt af ethylenglycol (EG; 10mM) og propylenglycol (PG; 10mM) på lag-time for pirimicarb (0.2mM) gennem human hud. Lag-time er udtrykt som medianværdier i enheden timer.

	Antal celler/gruppe	Pirimicarb	Pirimicarb + EG	Pirimicarb + PG
Forsøg 8	6	16.2	12.7	13.5
Forsøg 8½	6	16.7	14.7	12.9
Forsøg 13	6	17.1	16.6	13.9
Total median	18	16.7	14.7	13.5

Tabel 6. Effekt af ethylenglycol (EG; 10mM) og propylenglycol (PG; 10mM) på flux af methiocarb (0.2mM) gennem human hud. Flux er udtrykt som medianværdier i enheden nmol/time x cm<sup>2</sup>.

	Antal celler/gruppe	Methiocarb	Methiocarb + EG	Methiocarb + PG
Forsøg 16	6	0.683	0.692	0.680
Forsøg 17	6	0.565	0.758	0.710
Forsøg 19	6	0.698		
Total median		0.683	0.725	0.695

Tabel 7. Effekt af ethylenglycol (EG; 10mM) og propylenglycol (PG; 10mM) på penetreret mængde af methiocarb (0.2mM) gennem human hud i løbet af 48 timer kontinuerlig eksponering. Mængden er udtrykt som medianværdier i enheden nmol/cm<sup>2</sup>.

	Antal celler/gruppe	Methiocarb	Methiocarb + EG	Methiocarb + PG
Forsøg 16	6	42.5	33.7	37.7
Forsøg 17	6	20.5	31.2	30.9
Forsøg 19	6	36.0		
Total median		36.0	32.5	34.3

Tabel 8. Effekt af ethylenglycol (EG; 10mM) og propylenglycol (PG; 10mM) på lag-time for methiocarb (0.2mM) gennem human hud. Lag-time er udtrykt som medianværdier i enheden timer.

	Antal celler/gruppe	Methiocarb	Methiocarb + EG	Methiocarb + PG
Forsøg 16	6	5	5	5
Forsøg 17	6	10-12	10-12	10-12
Forsøg 19	6	6		
Total median		6	8-10	8-10

#### 4.3 Kombinationseffekter mellem aktiv- og hjælpestoffer

Erfaringer fra flere projekter med relation til danske gartnerier tilsiger, at flere bekæmpelsesmidler ofte optræder samtidig i samme kulturer, enten fordi man anvender dem samtidig, eller fordi man med ganske korte intervaller anvender dels bekæmpelsesmidler og dels retarderingsmidler. Derfor gennemføres en række eksperimenter med det mål at studere, hvorvidt den samtidige tilstedeværelse af pesticid-2 påvirker penetration, flux, og lag-time af pesticid-1 og omvendt. Alle tre pesticider (methiocarb, pirimicarb, paclobutrazol) anvendes alene eller parvis. Herudover undersøges, hvorvidt tilstedeværelsen af hjælpestoffer (SLS, ethylenglycol, propylenglycol) yderligere påvirker penetration og flux af de to pesticider i blandingen.

Pesticiderne er anvendt i samme koncentration i forsøg med enkeltstoffer såvel som i kombinationsforsøgene. Man kunne argumentere for, at man i kombinationsforsøg burde sigte mod anvendelse af samme totalkoncentration af pesticid, hvilket ville betyde, at man i kombinationsforsøg med to pesticider skulle halvere koncentrationen af aktivstof. Vi har imidlertid valgt at bibeholde de oprindelige koncentrationer også i kombinationsforsøgene. Baggrunden herfor er, at man brugssituationen på gartnerier vil anvende midlerne med forskellige formål (fx paclobutrazol til retardering og methiocarb som bekæmpelsesmiddel), hvorfor man ikke vil sænke koncentrationerne. Koncentrationen af pesticiderne er således 0.2mM i alle forsøg, medens koncentrationen af hjælpestofferne propylenglycol, SLS, og ethylenglycol er henholdsvis 10mM, 7mM, og 10mM.

### 4.3.1 Resultater af kombinationsforsøg

Overordnet dokumenterer resultaterne en metode med en ganske tilfredsstillende reproducerbarhed, der kommer til udtryk i de begrænsede variationer. Det skal i den forbindelse påpeges, at der i tabellerne er anvendt SEM-værdier. SEM beregnes ved at dele SD med kvadratroden af antallet af observationer, og anvendes i tilfælde, hvor man frem for sammenligning af enkeltværdier ønsker sammenligning af grupper alene. Da vi ved, at den individuelle variation mellem donorer er betydelig, er det alene sammenligninger på gruppebasis, der sigtes imod.

#### 4.3.1.1 Methiocarb

Undersøgelserne med methiocarb viser, at hverken pirimicarb eller paclobutrazol influerer betydende på penetration af methiocarb (Tabel 9). Flux af methiocarb nedsættes med knap 20 % ved samtidig eksponering for pirimicarb eller paclobutrazol, men ændringerne er ikke statistisk signifikante. Ligeledes ses en tilsyneladende nedsat lag-time for methiocarb ved samtidig tilstedeværelse af pirimicarb (Tabel 7). Samlet er det begrænset, hvor meget den dermale penetration af methiocarb påvirkes af tilstedeværelse af pirimicarb eller paclobutrazol.

Tilstedeværelse af enten propylenglycol, ethylenglycol, eller SLS synes ikke at ændre på fraværet af markant indflydelse fra pirimicarb eller paclobutrazol på den dermale penetration af methiocarb (Tabel 9). Overordnet set, er der en tendens til, at de valgte hjælpestoffer mindsker den samlede dermale penetration af methiocarb over forsøgsperiodens 48 timer. Statistisk signifikans opnås dog kun for ethylenglycols indflydelse sammen med paclobutrazol på penetrationen af methiocarb. Effekterne er imidlertid begrænsede, idet en nedsat flux oftest er modsvaret af en nedsat lag-time, således at den samlede penetration over 48 timer er stort set uændret. SLS synes i begge kombinationsforsøg at reducere lag-time, mens ethylenglycol som det eneste af de anvendte hjælpestoffer ikke synes at påvirke de målte penetrations-karakteristika for methiocarb.

Tabel 9. Effekt af kombineret eksponering for pirimicarb (0.2mM) eller paclobutrazol (0.2mM), samt effekt af tre hjælpestoffer på den dermale penetration og flux af methiocarb (0.2mM). Resultaterne på penetration gennem 48 timer og flux er givet som mean  $\pm$  SEM.

Pesticid eksponering	Hjælpe-stof	N	Penetration af methiocarb efter 48 t (nmol/cm <sup>2</sup> )	Flux af methiocarb (nmol/cm <sup>2</sup> /h)	Lag-time (timer)
Methiocarb (meth.)	-	11	27.17 $\pm$ 4.03	0.97 $\pm$ 0.14	10.6
Meth.+ pirimicarb	-	10	26.98 $\pm$ 3.26	0.80 $\pm$ 0.08	7.4
Meth.+ paclobutrazol	-	11	25.22 $\pm$ 2.39*	0.81 $\pm$ 0.12	10.6
Meth.+ pirimicarb	PG	10	25.27 $\pm$ 1.71	0.82 $\pm$ 0.09	8.7
Meth.+ pirimicarb	SLS	10	22.89 $\pm$ 2.62	0.67 $\pm$ 0.13	4.7
Meth.+ pirimicarb	EG	10	21.29 $\pm$ 1.95	0.66 $\pm$ 0.06	9.5
Meth.+ paclobutrazol	PG	10	22.33 $\pm$ 2.89	0.65 $\pm$ 0.06	5.7
Meth.+ paclobutrazol	SLS	9	22.05 $\pm$ 3.02	0.62 $\pm$ 0.08	6.0
Meth.+ paclobutrazol	EG	9	18.87 $\pm$ 1.49*	0.62 $\pm$ 0.06	10.5

PG – Propylenglycol (10mM); SLS - Natrium Lauryl Sulfat (7mM);

EG - Ethylenglycol (10mM)

\* - signifikant forskellige; Students t-test, p<0.05.

Sammenlignes penetration over 48 timer, flux, samt lag-time for methiocarb med tilsvarende resultater fra de tidligere forsøg (Tabel 6, 7, 8) ses, at der er forskelle. Årsagen er sandsynligvis, at der i de tidlige forsøg ikke blev udtaget prøver efter 12 timer, men først efter 24 timer. Herved har man ikke mulighed for at få den nedre del af den sigmoide penetrationskurve præsenteret. For et stof med en relativ kort lag-time og relativ høj flux betyder det, at man efter 24 timer har passeret sigmoidkurvens vendepunkt og derfor vil undervurdere den maksimale flux (idet den vil være til stede initialt inden 24 timer). Dette stemmer overens med, at der i de seneste forsøg, hvor der er datapunkter under 24 timer, findes en markant større maksimal-flux (Tabel 6 versus Tabel 9). Lag-time er ikke markant forskellig mellem de to forsøgsserier, og ligger mellem 6 og 10 timer.

#### 4.3.1.2 Pirimicarb

Hverken methiocarb eller paclobutrazol ændrer betydende på penetration, flux, eller lag-time for pirimicarb (Tabel 10). Alle tre hjælpestoffer synes at nedsætte den dermale penetration samt den maksimale flux af pirimicarb i kombinationsforsøgene med methiocarb eller paclobutrazol (Tabel 10). Mest markant, og statistisk signifikant, er den 40 % nedsatte penetration af pirimicarb efter samtidig eksponering for methiocarb og ethylenglycol. Effekten er betinget af en nedsat flux, idet den øgede lag-time kun bidrager ganske lidt til den samlede penetration over 48 timer (Tabel 10). Det bemærkes, at SLS i lighed med andre undersøgelser forårsager en nedsat lag-time også i disse forsøg, mens ethylenglycol tilsyneladende øger lag-time.

Tabel 10. Effekt af kombineret eksponering for methiocarb (0.2mM) eller paclobutrazol (0.2mM), samt effekt af tre hjælpestoffer på den dermale penetration og flux af pirimicarb (0.2mM). Resultaterne på penetration gennem 48 timer og flux er givet som mean ± SEM.

Pesticid eksponering	Hjælpestof	N	Penetration af pirimicarb efter 48 h (nmol/cm <sup>2</sup> )	Flux af pirimicarb (nmol/cm <sup>2</sup> /h)	Lag-time (timer)
Pirimicarb (piri)	-	12	19.50 ± 1.36	0.56 ± 0.05	10.1
Piri+ methiocarb	-	11	19.52 ± 2.51*	0.56 ± 0.09	9.6
Piri+ paclobutrazol	-	12	18.55 ± 1.29	0.49 ± 0.02	8.8
Piri+ methiocarb	PG	10	14.57 ± 1.57	0.40 ± 0.05	9.6
Piri+ methiocarb	SLS	10	13.83 ± 2.93	0.39 ± 0.10	7.4
Piri+ methiocarb	EG	9	11.41 ± 2.02*	0.35 ± 0.06	12.5
Piri+ paclobutrazol	PG	9	15.77 ± 1.71	0.45 ± 0.03	9.5
Piri+ paclobutrazol	SLS	10	17.73 ± 2.21	0.42 ± 0.05	6.2
Piri+ paclobutrazol	EG	10	17.21 ± 2.90	0.50 ± 0.11	11.2

PG - Propylenglycol (10 mM); SLS - Natrium Lauryl Sulfat (7 mM);

EG - Ethylenglycol (10mM)

\* - signifikant forskellige; Students t-test, p<0.05.

Sammenlignes penetration over 48 timer, flux, samt lag-time for pirimicarb med tilsvarende resultater fra de tidligere forsøg (Tabel 3,4,5) ses, at der er forskelle. Årsagen er sandsynligvis, at vi i de tidlige forsøg ikke udtog prøver efter 12 timer, men først efter 24 timer. Herved har man ikke mulighed for at få den nedre del af den sigmoide penetrationskurve præsenteret. For et stof med relativ kort lag-time og relativ lav maksimal-flux betyder det, at man ikke har passeret sigmoidkurvens vendepunkt og derfor hyppigt vil overestimere lag-time. Lag-time vurderes da også til knap 17 timer i de første delforsøg,

mens de senere eksperimenter viste en estimeret lag-time på omkring 10 timer.

#### 4.3.1.3 Paclobutrazol

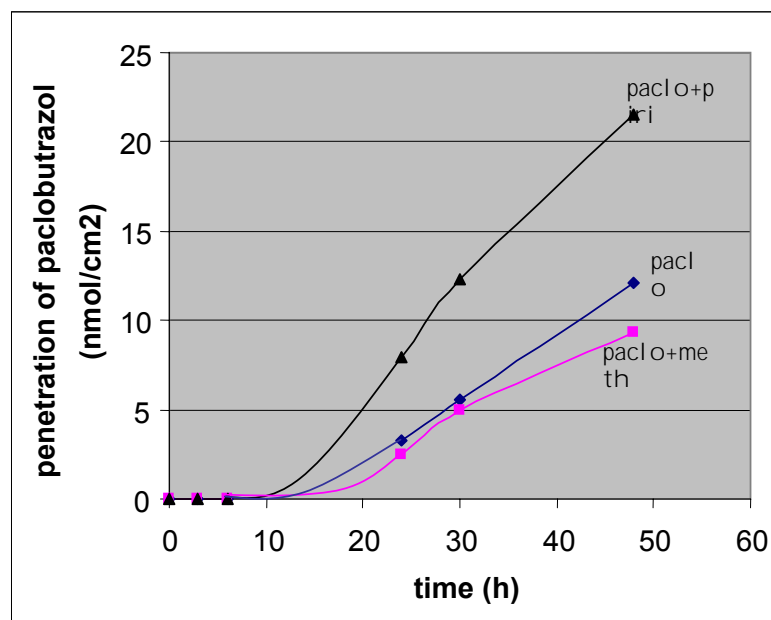
I modsætning til methiocarb og pirimicarb synes penetration og flux af paclobutrazol klart påvirket af den samtidige tilstedeværelse af methiocarb eller pirimicarb. Således reducerer samtidig eksponering med methiocarb penetrationen af paclobutrazol med næsten 25 %, medens samtidig pirimicarb-eksponering signifikant øger penetrationen af paclobutrazol med knap 80 % (Tabel 11, Figur 3).

Tabel 11. Effekt af kombineret eksponering for methiocarb (0.2mM) eller pirimicarb (0.2mM), samt effekt af tre hjælpepestoffer på den dermale penetration og flux af paclobutrazol (0.2mM). Resultaterne på penetration gennem 48 timer og flux er givet som mean  $\pm$  SEM.

Pesticid eksponering	Hjælpestof	N	Penetration af paclobutrazol efter 48 h (nmol/cm <sup>2</sup> )	Flux af paclobutrazol (nmol/cm <sup>2</sup> /h)	Lag-time (hours)
Paclobutrazol (paclo)	-	17	12.09 $\pm$ 1.57*	0.37 $\pm$ 0.04*	15.3
paclo+ methiocarb	-	11	9.28 $\pm$ 0.96	0.38 $\pm$ 0.06	17.0
Paclo+ pirimicarb	-	11	21.51 $\pm$ 1.47*	0.73 $\pm$ 0.09*	13.1
Paclo+ methiocarb	PG	10	11.08 $\pm$ 1.23	0.35 $\pm$ 0.03	10.1
Paclo+ methiocarb	SLS	9	10.12 $\pm$ 0.94	0.34 $\pm$ 0.05	12.9
Paclo+ methiocarb	EG	9	9.39 $\pm$ 0.83	0.28 $\pm$ 0.05	11.8
Paclo+ pirimicarb	PG	9	18.13 $\pm$ 1.65	0.65 $\pm$ 0.08	13.5
Paclo+ pirimicarb	SLS	10	18.55 $\pm$ 1.77	0.56 $\pm$ 0.07	10.9
paclo+ pirimicarb	EG	10	19.78 $\pm$ 2.73	0.58 $\pm$ 0.10	11.7

PG - Propylenglycol (10mM); SLS - Natrium Lauryl Sulfat (7mM); EG - Ethylenglycol (10mM)

\* - signifikant forskellige; Students t-test,  $p < 0.001$ .



Figur 3. Penetration af paclobutrazol (paclo) alene eller i kombination med enten pirimicarb (piri) eller methiocarb (meth). Koncentration af pesticiderne var initielt 0.2mM i donorkammeret. Hvert punkt på kurven repræsenterer gennemsnitsværdien fra 11-17 celler.

Den markant forøgede penetration af paclobutrazol over 48 timer ved samtidig eksponering for pirimicarb er primært begrundet i en fordoblet flux (Tabel 11). Resultater fra forsøgene med hjælpestoffer antyder ikke, at disse i



sig selv betinger yderligere ændringer af paclobutrazols flux (Tabel 11). Derimod synes hjælpestofferne i relation til paclobutrazol at nedsætte lag-time - i kombinationsforsøgene med paclobutrazol og methiocarb ganske markant. Den nedsatte lag-time og ændrede flux i disse forsøg resulterer da også i en lidt forøget penetration over 48 timer (Tabel 11).

#### 4.4 Konklusion på kombinationsforsøg

Kombinationsforsøgene med aktivstoffer viser, at de to carbamater ikke i betydende omfang påvirker hinandens penetrationskarakteristika. Paclobutrazol synes heller ikke at påvirke penetration, flux, eller lag-time for de to carbamater, mens begge carbamater påvirker penetrationen af paclobutrazol. Samlet må det konkluderes, at kombinationseffekter eksisterer og kan resultere i såvel øget som nedsat penetration.

Denne konklusion er i overensstemmelse med tidligere undersøgelser med insekticidet diethyl-m-toluamide (DEET), der i nogen studier postuleres at øge penetrationen af andre stoffer (20), medens andre og nyere studier har vist, at DEET nedsætter den dermale absorption af både permethrin og carbaryl (21).

De tre anvendte hjælpestoffer synes generelt at nedsætte den samlede penetration over 48 timer, om end effekten er begrænset. De observerede små effekter er betinget af en kombination af en lettere nedsat maksimal flux af de testede pesticider sammen med en til tider svagt nedsat lag-time. De ikke særlig markante effekter af etylenglycol og propylenglycol er i overensstemmelse med forudgående forsøg af dels penetration af enkeltstoffer sammen med hjælpestoffer og dels de indledende undersøgelser, der påpegede disse hjælpestoffers neutralitet over for hudbarrierens integritet.

#### 4.5 Aktivstoffer i salgsformuleringer

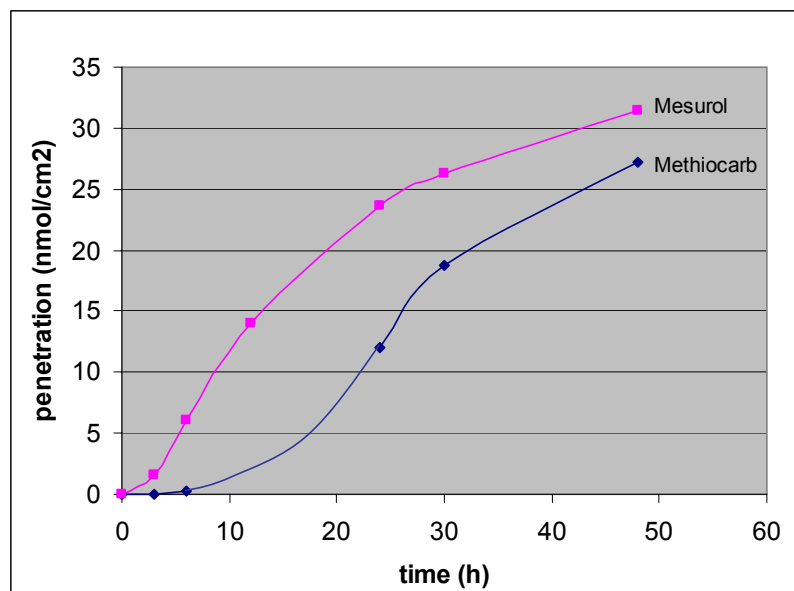
Hovedparten af undersøgelser over pesticiders dermale penetration gennemføres på aktivstofferne alene, og det er ofte disse undersøgelser, der lægges til grund for godkendelser samt anbefalinger vedrørende brug af værnemidler. I den forbindelse er det imidlertid salgsformuleringerne, der er interessante, idet disse består af blandinger af aktivstof og en række additiver/hjælpestoffer.

I ovenstående afsnit har vi undersøgt dels effekten af udvalgte og barriereneutrale hjælpestoffers betydning for penetration af 3 aktivstoffer, dels betydningen af blandingseksposering. De tre aktivstoffer anvendes i en række produkter, hvoraf to er udvalgt til videre undersøgelse for hudpenetration i den opstillede in vitro model. Det drejer sig om Mesurol, der er en sneglegift og produceres af Bayer (nu Syngenta) og indeholder aktivstoffet methiocarb, samt PirimorG, der er et insektmiddel og produceres af Zeneca og har aktivstoffet pirimicarb. Begge produkter er testet alene og i kombination med et andet produkt. Undersøgellesdesign samt metode er identisk med tidligere beskrevne, idet vi dog har lagt et ekstra målepunkt ind efter 12 timer, da vi forudså en muligere hurtigere penetration end aktivstofferne alene.

##### 4.5.1 Mesurol

Mesurol må anvendes til bekæmpelse af snegle i prydplanter og grønsager i væksthuse, og udstrøs som et granulat. Koncentrationen af aktivstof i granulatet er 1 %. Den koncentration, som man udsættes for under arbejde, er

selvsagt vanskelig at beregne eksakt, idet koncentrationen vil være maksimal på ydersiden af granulatet og herefter falde med afstanden grundet almindelig fortynding. Produktet anbefales brugt i en mængde af 10 g/m<sup>2</sup>, svarende til 0,1 g aktivstof per kvadratmeter. Med en molvægt på 225,4 gram, svarer det til 44 nmol/cm<sup>2</sup>. Penetrationscellerne i vores forsøgsopstilling har et areal på 2,12 cm<sup>2</sup>, hvorfor den anbefalede mængde svarer til 94 nmol/celle. Med et donorkammeret i hver celle på 600 uL, svarer det til en koncentration i donorkammeret på 0,16 mM. Derfor vurderes en testkoncentration på 0,2 mM, svarende til den der er anvendt for aktivstoffet alene, som relevant.



Figur 4. Penetration af Mesurol og dets aktivstof methiocarb. Både Mesurol og methiocarb er appliceret i donorkammeret med en methiocarb-koncentration på 0,2 mM. Datapunkterne repræsenterer et gennemsnit af 9-11 enkel tværdier.

Penetrationskurven for Mesurol adskiller sig markant fra aktivstoffet alene (Figur 4). Der er tale om en reduktion af lag-time fra omkring 10 timer for aktivstoffet til kun 2 timer i salgsformuleringen (Tabel 12), ligesom fluxen også er forøget. Samlet resulterer det i en signifikant større penetration over 48 timer. Det er imidlertid ikke denne forskel, der ud fra et praktisk synspunkt er mest interessant. Det er derimod den ganske betydelig kortere lag-time, der betyder, at man under normale arbejdsbetingelser vil risikere absorption af methiocarb langt hurtigere end oprindeligt antaget på basis af undersøgelse af aktivstoffet alene. De fundne resultater vurderes at have umiddelbar anvendelse i relation til råd og vejledning omkring hygiejne og anvendelse af handsker ved omgang med dette pesticid.

Kombinationsforsøget med PirimorG viser, at en eventuel interaktion mellem de to produkter ikke har nogen indflydelse på penetrationen af methiocarb fra Mesurol (Tabel 12). Denne observation svarer udmærket overens med undersøgelsen af aktivstofferne alene.

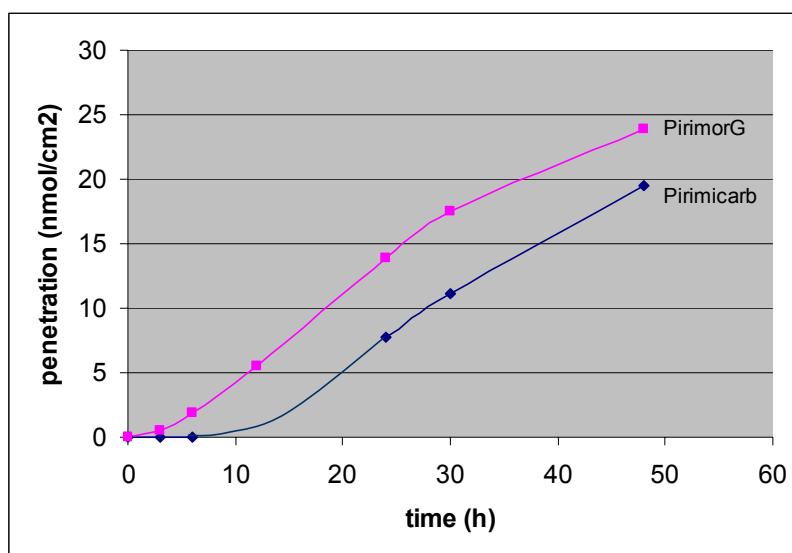
Tabel 12. Dermal penetration af Mesurol målt som methiocarb samt effekten af kombineret eksponering med PirimorG. Resultaterne på penetration gennem 48 timer og flux er givet som mean ± SEM.

Pesticid	N	Penetration af Mesurol efter 48 h (nmol/cm <sup>2</sup> )	Flux af Mesurol (nmol/cm <sup>2</sup> /h)	Lag-time (timer)
Mesurol	9	31.44 ± 2.46	1.39 ± 0.22	1.9
Mesurol + PirimorG	12	32.51 ± 1.16	1.25 ± 0.15	3.4

#### 4.5.2 PirimorG

PirimorG anvendes til bekæmpelse af bladlus i landbrug, gartneri, frugtavl og planteskoler. Koncentration af aktivstof i produktet er 50 %, og det udbringes på gartnerier i en mængde af 150 gram/1000 m<sup>2</sup>, svarende til 75 gram aktivstof per 1000 m<sup>2</sup>. Analog med beregningerne for Mesurol, svarer det med en molvægt for pirimicarb på 238,3 til en koncentration på 31,5 nmol/cm<sup>2</sup>. Med et celleareal på 2,12 cm<sup>2</sup> og et donorkammeret på 0,6 mL svarer det til 0,11 mM. Derfor vurderes en testkoncentration på 0,2 mM, svarende til den der er anvendt for aktivstoffet alene, som relevant.

PirimorG har en lag-time på omkring 2 timer, hvilket er signifikant mindre end aktivstoffets godt 10 timer (Figur 5, Tabel 13). Penetrationshastigheden er derimod rimelig ens for aktivstof og salgsvare, hvorfor der i løbet af 48 timer kun trænger knap 25 % mere aktivstof gennem huden ved anvendelse af salsformuleringen i forhold til det rene aktivstof. Imidlertid gør samme forhold som for Mesurol sig gældende i forhold til relevansen af den stærkt nedsatte lag-time.



Figur 5. Penetration af PirimorG og dets aktivstof pirimicarb. Både PirimorG og pirimicarb er appliceret i donorkammeret i med en pirimicarb-koncentration på 0,2 mM. Datapunkterne repræsenterer gennemsnit af 9-12 enkel tværdier.

Hvor PirimorG tilsyneladende ikke påvirker den dermale penetration, flux eller lag-time for methiocarb fra Mesurol, viser kombinationsforsøget, at Mesurol ganske tydeligt ændrer penetrationsforholdene for Pirimicarb. Vi finder således en 40 % øget flux af pirimicarb i kombinationsforsøget (Tabel 11), hvilket resulterer i en samlet penetration over 48 timer, der er øget med knap 30 %. Dette fund er i modsætning til kombinationsforsøget med aktivstofferne alene, hvilket indikerer, at effekten sandsynligvis skyldes de hjælpestoffer, der er til stede i salgsprodukterne, hvor man jo også så en ganske stor ændring mellem methiocarb alene og i salgsformulering.

Tabel 13. Dermal penetration af PirimorG samt effekten af kombineret ekponering med Mesurol. Resultaterne på penetration gennem 48 timer og flux er givet som mean  $\pm$  SEM.

Pesticid	N	Penetration af PirimorG efter 48 h (nmol/cm <sup>2</sup> )	Flux af PirimorG (nmol/cm <sup>2</sup> /h)	Lag-time (timer)
PirimorG	9	23.86 $\pm$ 2.80*	0.69 $\pm$ 0.11	2.1
PirimorG + Mesurol	12	30.64 $\pm$ 1.47*	0.95 $\pm$ 0.08	4.7

\* - signifikant forskellige; Students t-test, p<0.05.

#### 4.6 Konklusion på effekt af salgsformuleringer

Den betydelige effekt af salgsformuleringerne på penetrationen af aktivstoffer er i overensstemmelse med studier gennemført med atrazine, arachlor og trifluralin, hvor der observeredes en signifikant forøget dermal penetration af de tre pesticider, når de blev administreret i deres salgsformuleringer (22).

Den ganske betydelig kortere lag-time observeret for begge pesticider i dette studie betyder, at man under normale arbejdsbetingelser vil risikere absorption af pirimicarb og methiocarb langt hurtigere end oprindeligt antaget på basis af undersøgelse af aktivstoffet alene. De fundne resultater vurderes at have umiddelbar anvendelse i relation til råd og vejledning omkring hygiejne og anvendelse af handsker ved omgang med disse pesticider.

#### 4.7 Effekt af dosis på dermal penetration

Nærværende undersøgelse er gennemført under anvendelse af samme koncentration af pesticid i alle delstudier, hvilket maksimerer muligheden for sammenligninger mellem forsøg. Forsøgene med salgsformuleringer er således også gennemført ved samme koncentrationer i donorcellerne. Imidlertid er det væsentligt at dokumentere det omfang, som dosis indvirker på de målte penetrations-parametre. Der er derfor gennemført et forsøg med pirimicarb i tre koncentrationer.

Tabel 14. Effekt af dosis på dermal penetration, flux, og lag-time for pirimicarb. Resultaterne på penetration gennem 48 timer og flux er givet som mean  $\pm$  SEM.

Dosis (mM)	N	Penetration af pirimicarb over 48 timer. (nmol/cm <sup>2</sup> )	Flux of Pirimicarb (nmol/cm <sup>2</sup> /h)	Lag-time (timer)	Kp (cm/h)
0,1	5	7,09 $\pm$ 0,57*	0,20 $\pm$ 0,03*	9,2	0,0020
0,4	5	29,57 $\pm$ 3,68*	1,01 $\pm$ 0,16*	6,0	0,0025
1,0	4	69,65 $\pm$ 8,03*	2,32 $\pm$ 0,24*	3,5	0,0023

\* - signifikant forskellige; Students t-test, p<0.01.

Resultaterne viser, at man ved stigende dosis mindsker lag-time og signifikant øger den maksimale flux. Dette giver samlet set anledning til en signifikant større penetration over observationsperiodens 48 timer (Tabel 14).

Diffusionen over den dermale membran anses for at være passiv og følge Ficks lov. Det betyder, at mængden af stof, der penetrerer huden, skal være proportional med gradienten mellem donor og receptor; i tilfældet med uendelig receptor altså proportional med koncentrationen i donor.

Resultaterne dokumenterer meget fint denne sammenhæng, idet en 4 eller 10 ganges forøget koncentration i donor resulterer i en henholdsvis 4,2 og 9,8 gange større penetration over 48 timer (Tabel 14). Den eksperimentelle undersøgelse af hudpenetration tager sit afsæt i Fick's lov, der under ideelle forhold foreskriver en ligefremproportionalitet mellem flux og koncentration. I tilfælde med en uendelig donor vil penetrations-koefficienten (Kp) kunne

beregnes som forholdet mellem maksimal flux og koncentrationen i donor.  $K_p$  skal således være uafhængig af koncentrationen anvendt i et konkret eksperiment. De næsten identiske  $K_p$ -værdier (Tabel 14) underbygger således den eksperimentelle metodes validitet.

#### 4.8 Konklusion på dosis-forsøg

Resultaterne understøtter vores eksperimentelle model og de forudsætninger, som den anvendes under. Endvidere understreger dette eksperiment det væsentlige i, at man ved vurderinger af penetrationsegenskaber for stoffer, der anvendes i arbejdslivet, anvender relevante koncentrationer i eksponeringsforsøg, idet man trods tilnærmelsesvis identiske  $K_p$ -værdier kan observere forskelle i lag-time.



# 5 Delstudie 3 – Handskers beskyttelseseffekt

## 5.1 Undersøgel sesvariabler

Handskematerialers indflydelse på aktivstoffers hudpenetration er undersøgt med to pesticider (methiocarb samt pirimicarb). Tre forskellige handsker er undersøgt; to nitril-handsker samt en latex-handske (Conform+ powder free). De to handsketyper, nitril og latex, er valgt ud fra en viden om hvilke materialer, der i hverdagen på arbejdspladser er alternativer. Der er inkluderet to nitril-handsker (blå nitril – TNT™ Blue, powder free, Ansell; grøn nitril – Touch N Tuff™, powder free, Ansell Edmont) for at belyse, hvorvidt man ved anbefalinger alene behøver at fæstne sig ved materialet. Herudover er inkluderet undersøgelse af to hjælpestoffers (SLS og propylenglycol) indflydelse på ovennævnte pesticiders penetration af handsker og hud.

## 5.2 Undersøgel sesparametre

Fra handskeforsøgene rapporteres en kombineret ”break-through-time”, der er den tid, det tager et stof at gennemtrænge såvel handsken som den underliggende hud og således på sin vis analog med lag-time fra de rene hud-forsøg. Herudover beregnes fluxen, der i de situationer, hvor denne ændrer sig markant i løbet af forsøgsperioden, rapporteres for såvel de første 12 timer efter break-through som for det andet døgn. Relevansen af fluxen i den sidste periode er primært i relation til de situationer, hvor brugeren, trods information om at handskerne er engangshandsker, anvender dem gentagne gange, og derved reelt genoptager en afbrudt eksponeringssituation.

## 5.3 Eksperimentelt design

Den samme eksperimentelle model som tidligere beskrevet (kap. 2) anvendes også til dette delstudie, idet der dog er modificeret på den tid, som forsøgsopstillingen henstår, før eksperimenter påbegyndes ligesom opsætning af membranen af indlysende grunde er ændret, således at der ovenpå den humane hud monteres et stykke handske. Det er således ikke en undersøgelse af gennemtrængeligheden af forskellige handsker, der er fokus i dette delstudie, men den samlede penetrationen af både handske og underliggende hud.

## 5.4 Resultater

### 5.4.1 Methiocarb

Break-through-time (BT) for methiocarb var 7,5 timer for såvel latex som blå nitril, mens BT var 10,5 timer for grøn nitril (Tabel 15). Da lag-time fra tidligere forsøg er fundet til mellem 6 og 10 timer, indikerer det, at handsker som sådan ikke nedsætter den tid, det tager, før methiocarb optræder på

undersiden af huden. Resultaterne antyder dog, at den grønne nitrilhandske yder en lidt bedre beskyttelse, hvis man alene hæfter sig ved BT. Tallene fra Tabel 16-18 viser imidlertid, at fluxen af methiocarb er markant mindre i de forsøg, hvor der er anvendt en handskemembran. Det betyder, at handskerne, selvom de ikke øger den tid, det tager, før methiocarb kan måles under huden, signifikant nedsætter den efter-følgende penetrationshastighed, hvorved handskerne virker klart reducerende på absorptionen efter samme eksponering. Sammenlignes resultaterne fra forsøgene med latexhandsker og grønne nitril-handsker (Tabel 16 og Tabel 17) ses, at fluxen er næsten identisk i det første og andet døgn for nitril-handsken, mens fluxen mere end fordobles for latexhandsken i det andet døgn. Dette indikerer, at nitrilhandskens barriere-funktion forbliver intakt over 48 timer, mens latexhandskens med tiden nedsættes. I det andet døgn nærmer fluxen sig således situationen uden handsker indikerende en meget begrænset beskyttelsesgrad.

Tabel 15. Breakthrough times for methiocarb og pirimicarb gennem handske og hudbarriere.

	Breakthrough time* for methiocarb	Breakthrough time* for pirimicarb
Latex	7.5	9 <sup>§</sup>
Nitril (blå)	7.5	-
Nitril (grøn)	10.5	12

\* Back-extrapolation fra penetrationskurver

§ SLS nedsatte svagt BT (BT ~ 6h) og propylenglycol forøgede BT (BT~ 12 h)

Tabel 16. Effekt af SLS og propylenglycol på flux af methiocarb gennem latexhandsker. Flux udtrykkes i nmol/cm<sup>2</sup>/h.

	Flux (12-24 h)		Flux (24-48 h)	
	N	Mean (SEM)	N	Mean (SEM)
Control	16	0.22 (0.04)	8	0.53 (0.07)
+ SLS	13	0.27 (0.09)	8	0.51 (0.07)
+ propylenglycol	17	0.18 (0.02)	8	0.27 (0.06)*

\* signifikant forskellig fra control (Students t-test; p<0.05)

Tabel 17. Effekt af SLS og propylenglycol på flux af methiocarb gennem nitril handsker (grøn nitril). Flux angives som mean værdier med SEM og udtrykkes i nmol/cm<sup>2</sup>/h.

	Flux (12-24 h)		Flux (24-48 h)	
	N	Mean (SEM)	N	Mean (SEM)
Control	10	0.16 (0.03)	7	0.19 (0.02)
+ SLS	11	0.14 (0.02)	9	0.14 (0.01)*
+ propylenglycol	15	0.17 (0.02)	5	0.17 (0.02)

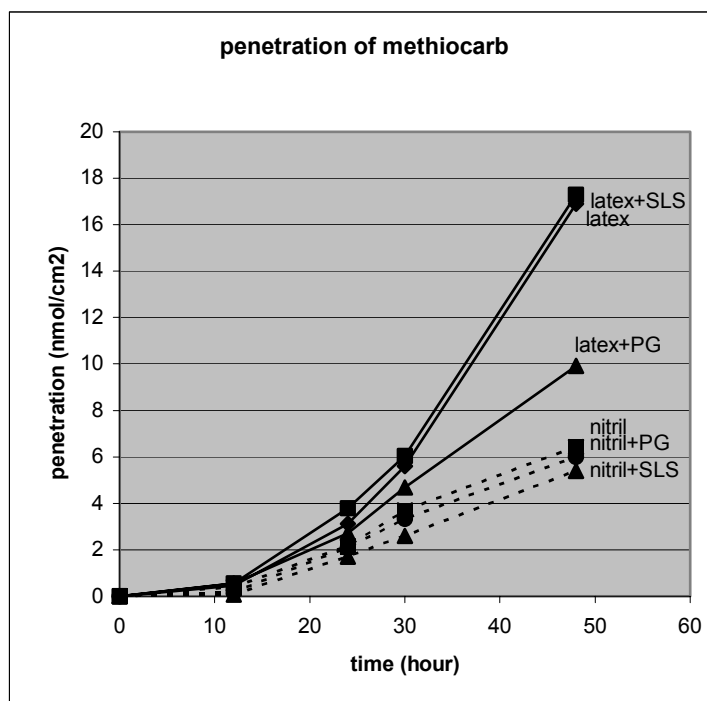
\* signifikant forskellig fra control (Students t-test; p<0.05)

Tabel 18. Effekt af SLS og propylenglycol på flux af methiocarb gennem nitril handsker (blå nitril).

Flux angives som mean værdier med SEM og udtrykkes i nmol/cm<sup>2</sup>/h.

	Flux (16-36 h)	
	N	Mean (SEM)
Control	3	0.56 (0.03)
+ SLS	5	0.56 (0.13)
+ propylenglycol	5	0.76 (0.08)

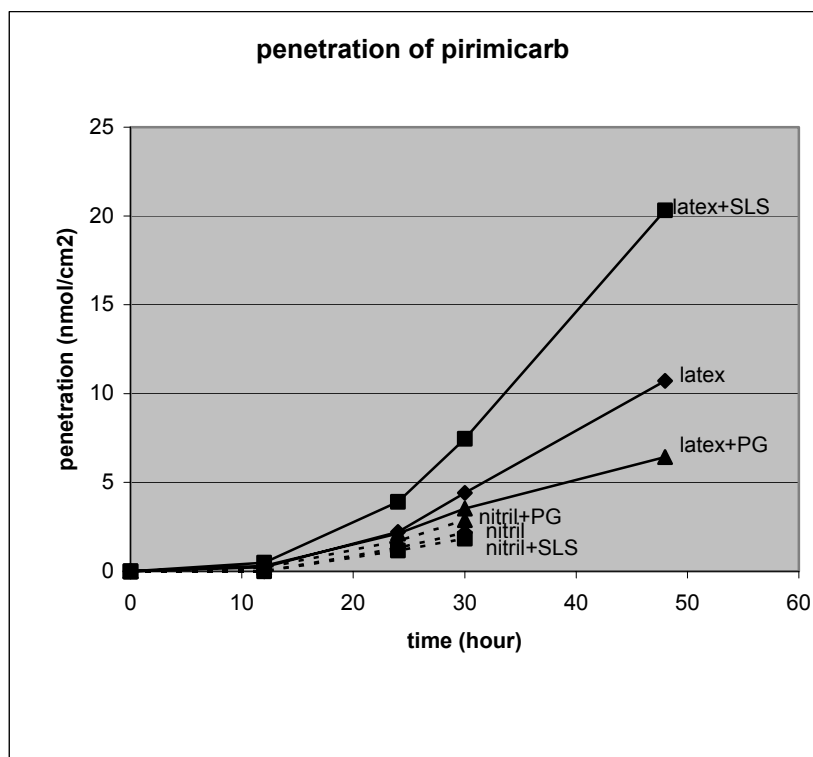




Figur 6. Effekt af hjælpestofferne SLS og propylenglycol (PG) på den dermale penetration af methiocarb gennem handsker af henholdsvis latex og nitril (grøn nitril).

Forskellen på penetrationskarakteristika er også tydelig i Figur 6, hvor penetrationen gennem latexhandsker og nitrilhandsker i de første 12 timer ikke er mærkbar forskellig, mens man ser klare forskelle ved senere måletidspunkter. Inden for de første 24 timers eksponering har de to testede hjælpestoffer, SLS og propylenglycol, ingen betydende effekt over for fluxen af methiocarb (Tabel 16-18). Efter 48 timer er penetrationen af methiocarb gennem latexhandsker samt underliggende hud dog nedsat signifikant i gruppen hvor propylenglycol er til stede (Tabel 16 og Figur 6).

Den samme effekt af hjælpestoffer er ikke set i forsøgene med nitrilhandsker, men i lighed med denne observation for methiocarbs penetration af latex, ser man et analogt billede for pirimicarb, hvor propylenglycol ligeledes efter 48 timer signifikant nedsætter fluxen af pesticid gennem latexhandske og underliggende hud (Tabel 19 og Figur 7).



Figur 7. Effekt af hjælpestofferne SLS og propylenglycol (PG) på den dermale penetration af pirimicarb gennem handsker af henholdsvis latex og nitril (grøn nitril).

#### 5.4.2 Pirimicarb

Breakthrough-time for pirimicarb var 12 timer i forsøgene med grøn nitril og 9 timer i forsøgene med latex (Tabel 15). Idet lag-time fra tidligere forsøg med pirimicarb er fundet til omkring 10 timer, indikerer også forsøgene med pirimicarb, at handskerne ikke signifikant reducerer tiden fra eksponering til målbar mængde under huden. Forsøgene med SLS viser, at dette hjælpestof tilsyneladende både nedsætter BT for pirimicarb samt signifikant øger fluxen af pirimicarb i forsøget med latex (Tabel 15 og Tabel 19), hvilket resulterer i en signifikant øget samlet penetration af pirimicarb over 48 timer (Figur 7). Den samme effekt af SLS på fluxen af pirimicarb ses ikke ved forsøgene med nitrilhandske (Tabel 20). For pirimicarb ses en lavere flux i forsøg med nitril end i forsøg med latex (Tabel 19 og Tabel 20). Fluxen af pirimicarb er mærkbart reduceret ved anvendelse af både latex og nitril i forhold til forsøgene uden handskemembran (Tabel 19, Tabel 20, Tabel 10).

Tabel 19. Effekt af SLS og propylenglycol på flux af pirimicarb gennem latex handsker. Flux angives som mean værdier med SEM og udtrykkes i nmol/cm<sup>2</sup>/h.

	Flux (12-24 h)		Flux (24-48 h)	
	N	Mean (SEM)	N	Mean (SEM)
Control	9	0.16 (0.03)	6	0.35 (0.07)
+ SLS	9	0.28 (0.06)	6	0.66 (0.05)*
+ propylenglycol	13	0.15 (0.03)	6	0.18 (0.02)*

\* signifikant forskellig fra control (Students t-test; p<0.05)

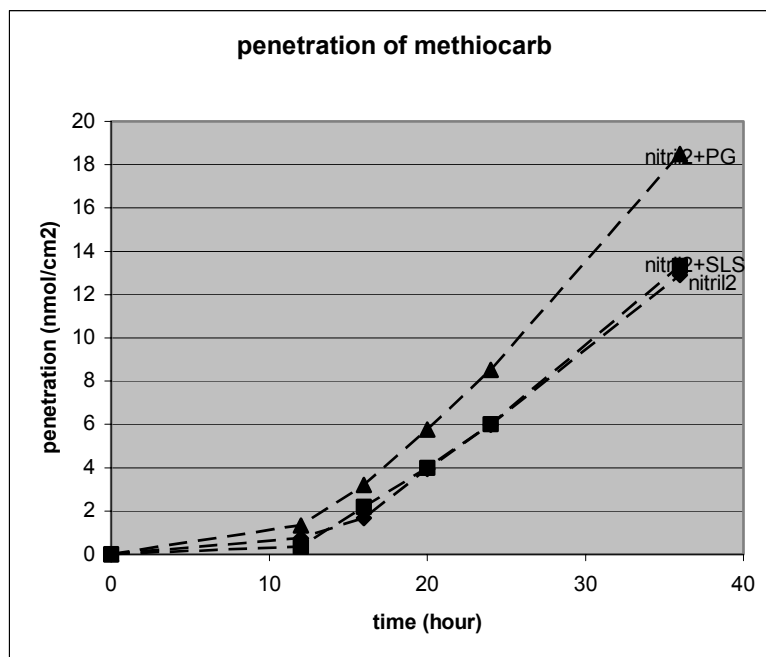
Tabel 20. Effekt af SLS og propylenglycol på flux af pirimicarb gennem nitril handsker (grøn nitril).

Flux angives som mean værdier med SEM og udtrykkes i nmol/cm<sup>2</sup>/h.

	Flux (12-30 h)	
	N	Mean (SEM)
Control	11	0.12 (0.01)
+ SLS	10	0.10 (0.01)
+ propylenglycol	11	0.15 (0.02)

## 5.5 Konklusion på handskeforsøg

Ingen af de undersøgte handskematerialer øgede den tid, det tog, før pesticiderne kunne måles i receptorkammeret på undersiden af huden. Derimod nedsatte både nitril og latex signifikant penetrationshastigheden af de to pesticider. Denne penetrationsbegrænsende effekt holdt sig hele forsøgsperiodens 48 timer for nitrilhandsker, mens beskyttelseseffekten ikke var betydende for latexhandsker efter 24 timer. Hjælpestofferne syntes ikke at påvirke penetration eller BT i forsøg med nitril, mens propylenglycol både i forsøg med pirimicarb og forsøg med methiocarb nedsatte fluxen af pesticid gennem latex og underliggende hud.



Figur 8. Effekt af hjælpestofferne SLS og propylenglycol (PG) på den dermale penetration af methiocarb gennem handsker af nitril (blå nitril).



## 6 Delstudie 4 – Penetration gennem beskadiget hud

Ved undersøgelse af fremmedstoffers penetrationsegenskaber gøres oftest en betydelig indsats for at sikre, at den undersøgte hud er intakt, ensartet og med optimale barriereegenskaber. Imidlertid kendetegnes virkeligheden hos den enkelte medarbejder ofte af situationer med markant ringere hudstatus i forhold til intakte barriereegenskaber. Således er hudproblemer den største enkeltstående årsag til arbejdsfravær i flere lande, samtidig med at epidemiologiske undersøgelser indikerer, at kun 4-9 % af personer med arbejdsrelaterede hudproblemer rent faktisk lader sig sygemelde (23). En dansk undersøgelse beskriver en incidens af erhvervsrelaterede hudsygdomme på 17.700 ud af en arbejdsstyrke på omkring 2.6 millioner (24). Hvorvidt en eksponering af lettere beskadiget hud resulterer i øget absorption af fremmedstoffer vides ikke. Formålet med dette delstudie er derfor:

- 1) at videreudvikle en eksisterende eksperimentel model for in vitro penetration af human hud, således at man reproducerbart kan inducere en specificeret beskadigelse af hudens barrierefunktion.
- 2) At anvende denne model til undersøgelse af betydningen af en lettere beskadiget hud for udvalgte bekæmpelsesmidlers hudpenetration.
- 3) At undersøge hvorvidt absorptionen af lipofile og hydrofile stoffer i samme grad påvirkes af anvendelsen af lettere beskadiget hud.

Den viden, der vil kunne opnås gennem nærværende delstudie, vil have stor betydning for den kvantitative risikovurdering ved dermal eksponering for bekæmpelsesmidler. Der kan endvidere blive tale om en opregulering af default-værdien for dermal absorption anvendt i det seneste draft fra EU til "Guidance document on dermal absorption" der i dette udkast er foreslået fastsat til 10 %.

### 6.1 Metode

Samme eksperimentelle in vitro model, som er anvendt ved tidligere delstudier, er også anvendt i dette delstudie. Der er anvendt to relevante hjælpestoffer og et mindre antal aktivstoffer. Lettere beskadiget hud fås ved forbehandling af intakt hud med SLS, der er kendt for at kunne inducere en delvis nedbrydning af hudens barrierefunktion via påvirkning af stratum corneum (9, 25). Forsøgene består således af en præbehandlingsfase på 3 timer, hvorunder huden udsættes for SLS, efterfulgt af eksponering for teststof i 26 timer.

### 6.2 Eksperimentelt design

**Delstudie 4-1.** Der opstilles en model for hudens integritet som funktion af eksponeringstid samt koncentration af SLS. På baggrund heraf udvælges to

scenarier, der resulterer i to forskellige grader af hudbeskadigelse. Reproducerbarheden af den graduerede beskadigelse undersøges og beskrives. Egne tidligere studier har vist, at beskadigelsen stiger ved forøgelse af SLS koncentrationen fra 0,2 % til 2 % efter 72 timer (9). Hudens tilstand efter 72 timer og 2 % SLS er imidlertid for dårlig til at kunne anvendes i modellen, hvorfor der sigtes imod anvendelse af lavere koncentrationer af SLS, eventuelt med en kortere forbehandlingsperiode. Efter forbehandling tømmes og vaskes donorkammeret før modelstofferne appliceres.

**Delstudie 4-2.** I tidligere delstudier under dette hovedprojekt er penetrationskarakteristika for to hyppigt anvendte bekæmpelsesmidler undersøgt. Disse delstudier har anvendt intakt ubeskadiget hud. I delstudie 4-2 vil methiocarb og pirimicarb blive anvendt som modelstoffer for sammenligning af penetration gennem ubeskadiget og lettere beskadiget hud.

**Delstudie 4-3.** Kemiske stoffers vandopløselighed vides at være af betydning for deres penetrationsegenskaber gennem intakt hud (12). Normalt anses hydrofile stoffer for at have ringere penetration end lipofile stoffer. I hvilken grad en lettere beskadigelse af stratum corneum ændrer herpå vides ikke med sikkerhed. Delstudie 4-3 vil belyse denne problemstilling ved applicering af en række modelstoffer dækkende et spektrum af opløseligheder på lettere beskadiget hud.

### 6.3 Relevans

Jo bedre man får beskrevet den ideelle og optimale situation, jo vigtigere bliver kendskabet til undtagelserne. Nærværende delstudie udspringer af studiet af kombinationseffekter mellem aktiv- og hjælpestoffer. I disse delstudier er intakt og ubeskadiget hud søgt anvendt. Disse studier er nødvendige og særdeles relevante for at muliggøre sammenligninger og fastsættelse af generelle retningslinier for anvendelse. Da virkeligheden hos den enkelte medarbejder, der eksponeres for kemiske stoffer, imidlertid ofte afviger fra idealet, er det vigtigt at få beskrevet, i hvilket omfang en nedsat hudintegritet påvirker absorptionen af pesticider såvel som andre fremmedstoffer. Såfremt en øget absorption gennem den lettere beskadigede hud kan dokumenteres, vil det som umiddelbar konsekvens nødvendiggøre en overvejelse i relation til de default-værdier, der anvendes reguleringsmæssigt for dermal absorption.

### 6.4 Resultater

#### 6.4.1 Delstudie 4-1

Målet med dette delstudie var etablering af en reproducerbar lettere skade på hudens barrierefunktion. Tilgangen til dette delstudie var gennem en kortere tids eksponering for SLS at inducere en lettere beskadigelse. Herefter fjernes SLS, cellerne vaskes, hvorefter man gennemfører et traditionelt penetrationsforsøg. En simpel beskadigelse af huden er således ikke nok, idet man for at kunne anvende modellen eksperimentelt også må have en vis sikkerhed for, at skaden forbliver uændret gennem forsøgsperioden. Hudens barrierefunktion er vurderet på basis af penetrationen af tritieret vand gennem hudmembranen. Der er indledningsvis gennemført en mindre serie kontrolforsøg med ubeskadiget hud for at vurdere modellens reproducerbarhed (Tabel 21).

Tabel 21. Flux af tritieret vand gennem hudmembraner forbehandlet med natrium Lauryl Sulfate (SLS) i tre timer. Resultater er givet i DPM/time og udtrykt som mean + SEM.

Forsøg	Control		0.1% SLS		0.3% SLS	
	N	Flux	N	Flux	N	Flux
B02-1	3	513 + 56				
B02-2	2	526 + 27				
B02-3	3	575 + 168			8	2302 + 324
B02-4	4	432 + 47	8	1192 + 142	8	1686 + 246
B02-5	3	508 + 83	8	1387 + 134	8	1944 + 176
B03-1	3	404 + 192	7	916 + 62	7	1223 + 77
B03-2	2	777 + 249	8	2328 + 204	8	3030 + 115

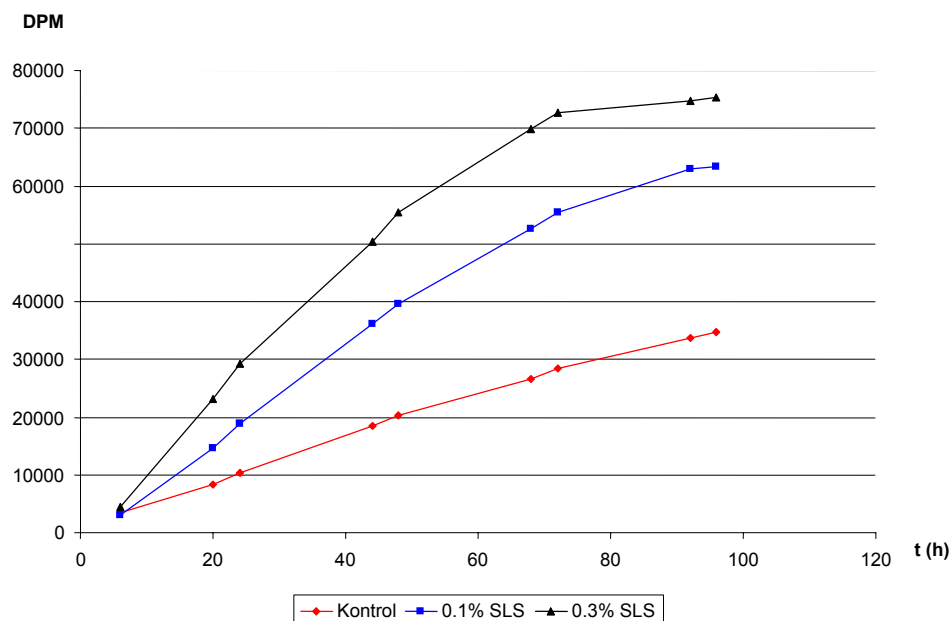
Som det fremgår af Tabel 21, er der generelt tale om en udmærket reproducerbarhed antallet af celler taget i betragtning. Efter en række indledende forsøg fandtes, at det optimale design for den eksperimentelle model er en 3-timers eksponering for SLS efterfulgt af fjernelse af SLS ved vask af donorkammer. Endvidere viste disse indledende forsøg, at man ved koncentrationer af SLS på 0,1 % og 0,3 % kunne inducere en målbar og reproducerbar skade. Højere koncentrationer af SLS inducerede også skade, men i dette tilfælde ikke en stabil, men en progredierende skade (fluxen steg med tiden). Resultaterne i Tabel 21 viser, at der trods generel god reproducerbarhed stadig er forskel fra forsøg til forsøg. Det er forventeligt, idet forskellige humane donorer kan forventes at have forskellige/afvigende barrierefunktion. Forsøgsdesignet er imidlertid sådan, at man fordeler de forskellige donorer på de forskellige forsøgsgrupper, med det formål, at eventuelle forskelle donorerne imellem ikke slår så stærkt igennem ved sammenligninger inden for hvert enkelt forsøg. Derfor kan man med rimelighed udtrykke fluxen i de eksperimentelle grupper som procent af kontrollerne. Det er gjort for de to forsøgsserier med SLS (Tabel 22).

Som det fremgår, fås hermed en ganske udmærket reproducerbarhed med hensyn til flux af tritieret vand gennem huden, hvorfor ønsket om reproducerbarhed i den eksperimentelle model synes opfyldt.

Tabel 22. Flux af tritieret vand gennem hudmembraner forbehandlet med Natrium Lauryl Sulfate (SLS) i tre timer. Resultater er givet som procent af kontrol, og udtrykt som means (total er givet med SEM).

Forsøg	0.1% SLS		0.3% SLS	
	N	Flux (pct af control)	N	Flux (pct af control)
B02-3			8	400
B02-4	8	276	8	390
B02-5	8	273	8	383
B03-1	7	227	7	303
B03-2	8	300	8	390
Total	31	270 + 13	39	374 + 16

Kravet, om at den inducerede skade skal være stabil over en periode, der tillader gennemførelse af penetrationsforsøg efter fjernelse af SLS, synes ligeledes at være opfyldt, idet penetrationskurverne for celler forbehandlede i tre timer med henholdsvis 0,1 % SLS og 0,3 % SLS udviser pæn linearitet i over 48 timer (Figur 9).



Figur 9. Penetration af tritieret vand efter forbehandling i tre timer med SLS i koncentrationerne 0,1 % samt 0,3 %. Koncentrationen af tritieret vand er udtrykt som disintegrationer per minut (DPM).

#### 6.4.2 Delstudie 4-2

Målet med dette delstudie er en undersøgelse af betydningen af lettere beskadiget hud for penetrationen af de to bekæmpelsesmidler methiocarb og pirimicarb.

##### 6.4.2.1 Methiocarb

SLS medfører en forøget kapacitans og en forøgelse af fluxen af tritieret vand, der er analog med det forventede fra de indledende forsøg. Således ses en  $^3\text{H}_2\text{O}$  flux på henholdsvis 206 % og 357 % af kontrollen for 0.1 % SLS og 0.3 % SLS (Tabel 23).

Tabel 23. Hudens integritet samt flux, lag-time og total penetration af methiocarb gennem henholdsvis ubeskadiget og lettere beskadiget hud. Lettere beskadiget hud er opnået ved 3 timers forbehandling med SLS (0.1% eller 0.3%). Resultater er udtrykt som mean med angivelse af SEM for penetrationsegenskaberne.

		Kontrol (n=3)	0.1 % SLS (n=8)	0.3 % SLS (n=8)
Kapacitans (nF)	t = 0 timer	30	35	34
	t = 26 timer	30	142	215
Flux af $^3\text{H}_2\text{O}$	DPM/time	403 (112)	830 (85)	1440 (187)
	% af kontrol		206	357
Flux af methiocarb	nmol/cm <sup>2</sup> x t	0.53 (0.15)	0.56 (0.09)	0.67 (0.07)
	% af kontrol		106	126
Lag-time	Timer	9.8 (1.4)	8.2 (0.5)	6.6 (1.1)
	% af kontrol		84	67
Total penetration på 26 timer	nmol/cm <sup>2</sup>	8.7 (3.2)	10.0 (1.7)	13.1 (1.7)
	% af kontrol		115	151

Med stigende beskadigelse af huden ses en øget penetrationshastighed (flux) af methiocarb, ligesom lag-time nedsættes til 84 % ved 0.1 % SLS og 67 % ved 0.3 % SLS. Påvirkningen med SLS synes primært at påvirke lag-time idet fluxen kun øges med omkring 25 %, hvilket samlet giver en 50 % forøget



penetration af methiocarb over 26 timer. Resultatet fra kontrolgruppen er næsten identisk med resultatet fra det i delprojekt 2 gennemførte forsøg (2001-17; Tabel 6, 7, 8).

#### 6.4.2.2 Pirimicarb

Forsøgene med pirimicarb (Tabel 24) er gennemført med hud, der ikke helt lever op til de stipulerede kvalitetsmål med hensyn til kapacitans ved forsøgets begyndelse. Konsekvensen er en åbenlys forøget  $^3\text{H}_2\text{O}$  flux og en i forhold til tidligere forsøg med pirimicarb alt for høj flux i kontrollerne samt en ekstrem kort lag-time (Tabel 24). Ikke desto mindre ses også her en markant reduktion af lag-time efter præbehandling med SLS, ligesom også flux af pirimicarb er forøget med omkring 50 % (Tabel 24).

Tabel 24. Hudens integritet samt flux, lag-time og total penetration af pirimicarb gennem henholdsvis ubeskadiget og lettere beskadiget hud. Lettere beskadiget hud er opnået ved 3 timers forbehandling med SLS (0.1% eller 0.3%). Resultater er udtrykt som mean med angivelse af SEM for penetrationsegenskaberne.

		Kontrol (n=8)	0.1 % SLS (n=15)	0.3 % SLS (n=15)
Kapacitans (nF)	t = 0 timer	75	71	68
	t = 26 timer	109	822	1073
Flux af $^3\text{H}_2\text{O}$	DPM/time	893 (130)	2017 (162)	2514 (167)
	% af kontrol		226	282
Flux af pirimicarb	nmol/cm <sup>2</sup> x t	0.88 (0.14)	1.39 (0.14)	1.37 (0.10)
	% af kontrol		158	156
Lag-time	Timer	4.5 (0.4)	2.7 (0.3)	2.6 (0.3)
	% af kontrol		60	58
Total penetration på 26 timer	nmol/cm <sup>2</sup>	17.6 (2.2)	30.0 (2.8)	30.0 (1.7)
	% af kontrol		170	170

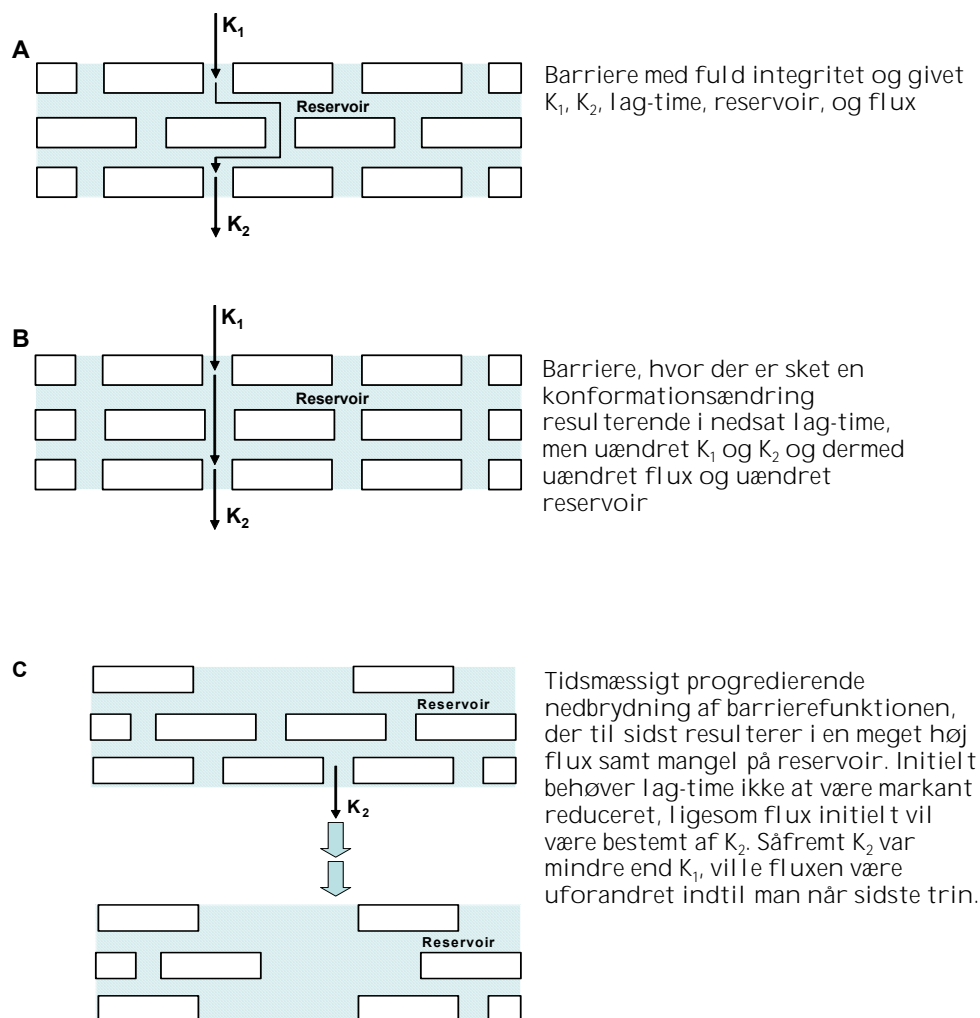
#### 6.4.2.3 Diskussion

På basis af de opnåede resultater kan det konkluderes, at man ved en lettere beskadiget hud opnår en markant nedsat lag-time. Konsekvensen heraf er en forøget penetration. For eksponeringsperioder af en varighed omkring den oprindelige lag-time for de to modelstoffer vil den relative forøgelse af mængden af penetreret modelstof kunne være ganske stor. For et stof med en lag-time på 6 timer ved optimal hud vil en nedsættelse af lag-time til 2/3 (4 timer), hvilket svarer til ovenstående resultater, resultere i en fordobling af den penetrerede mængde stof i løbet af en 8 timers eksponeringsperiode. I dette eksempel er alene set på betydningen af lag-time, og der er ikke taget højde for ændret reservoir effekt eller for en samtidig forøget penetrationshastighed.

Der findes flere teoretiske modeller til beskrivelse af et molekyles transport gennem stratum corneum. En af de første brugbare modeller blev udviklet og visualiseret som 'brick and mortar' modellen (26). Senere er svenskeren Bo Forslind fremkommet med en lidt mere udbygget model ('the domain mosaic model'), der inddrog den seneste viden om stratum corneums opbygning (27).

Som en visualiserbar og mere lettilgængelig forklaringsmodel for de observerede ændringer i penetrationskarakteristika som følge af den lettere beskadigelse af hudens barrierefunktion med SLS kan man imidlertid godt tage udgangspunkt i den traditionelle 'brick and mortar' model (Figur 10). Her forestiller man sig, at stoffer, der skal penetrere huden enten kan passere tværs gennem murstenene eller ved passiv diffusion passere mellem stenene, hvor mørtlen sidder. Penetrationsforøgere, som for eksempel en lang række hjælpestoffer/detergenter, vil virke ved enten en konformationsændring, hvor murstenene forskydes, således at de ikke længere ligger forbandt, eller ved at fjerne hele mursten fra barrierevæggen (Figur 10). Førstnævnte

konformations-ændring vil forventes at være rimelig reversibel ved eksponeringsophør, medens den anden effekttype vil efterlade mere permanente eller længerevarende effekter, og ved fortsat eksponering give anledning til et progredierende tab af barrierefunktion. Eksempler på disse effektvarianter er tidligere beskrevet for et mindre antal hjælpestoffer (7).



Figur 10 A, B, C. Skematisk model for hudpenetration (brick and mortar modellen) samt effekt af hjælpestoffer.

De tre effektvariables (flux, lag-time, reservoir) indbyrdes relationer og afhængighed af hastighedskonstanterne for diffusion henholdsvis ind i huden fra donorsiden ( $K_1$ ) og ud af huden til receptoren ( $K_2$ ) kan opgøres således:

- Lag-time:** Forøgelse af  $K_1$  medfører nedsat lag-time.  
Short-cut (konformationsændring) vil medføre nedsat lag-time.  
Uafhængig af reservoir-effekt.
- Reservoir-effekt:** Eksisterer kun når  $K_1 > K_2$ .  
Uafhængig af lag-time.  
På lang sigt uafhængig af størrelsen på flux, men reservoirets aktuelle størrelse vil afhænge af hvor meget  $K_1$  er større end  $K_2$  samt hvor lang tid eksponeringen har været.

Flux: Uafhængig af lag-time.  
Uafhængig af reservoir-effekt.  
Er lig med den langsomste af  $K_1$  og  $K_2$ .

Generelt gælder, at  $K_1$  og  $K_2$  samt reservoirets potentielle max-størrelse vil være forskellig fra stof til stof og afhænge af stoffernes størrelse (MW), steriske konformation, og opløselighed. Endvidere vil fluxen, såfremt koncentrationen eller mængden af teststof i donor og receptor ikke kan ligestilles med en uendelig donor situation, reduceres, idet den koncentrationsgradient, der driver stoffet gennem huden, mindskes.

Delprojekt 4-1 indikerer, at man ved 3 timers behandling med SLS ikke får en progredierende beskadigelse, med derimod en stabil beskadigelse. At fluxen ikke entydigt og markant øges i forhold til de ubeskadigede kontroller indikerer billedligt, at den påførte skade fra SLS ikke gør hullerne i barrieren, hvorigennem teststofferne skal passere, større, men derimod betinger konformationsændringer medførende en nedsat lag-time og eventuelt en nedsat reservoir-effekt. Reservoir-effekten kan forstås som et reservoir i huden, der ved eksponeringens begyndelse først skal fyldes op, før der opnås den maksimale flux.

Denne problemstilling og mulige konsekvenser for regelsætningen omkring dermale eksponeringer er væsentlig og særdeles relevant også i arbejdsmiljøsammenhænge, og ville kunne undersøges ved eksponering i en kortere (fx 6 timer) periode efterfulgt af en længere observationsperiode samtidig med, at man også analyserer den stofmængde, der resterer i huden ved forsøgsophør.

#### 6.4.3 Delstudie 4-3

I dette delstudie gennemføres undersøgelse af penetrationen af yderligere tre bekæmpelsesmidler gennem lettere beskadiget hud. De tre bekæmpelsesmidler er udvalgt som modelstoffer for at få en bredere baggrund for en diskussion af betydningen af modelstofferne vandopløselighed for penetration gennem lettere beskadiget hud. De tre bekæmpelsesmidler er paclobutrazol, dimethoat, og prochloraz. Som det fremgår af Tabel 1 (side 19) dækker disse stoffer sammen med methiocarb og pirimicarb en variation i molvægt fra 225 g/mol til 376 g/mol og en forskel i vandopløselighed udtrykt ved  $\log P_{ow}$  fra 0.7 til 4.4.

##### **6.4.3.1 Paclobutrazol**

Forbehandling med SLS giver den forventede graduerede beskadigelse af hudens barriereegenskaber illustreret gennem den stigende kapacitans såvel som flux af  $^3\text{H}_2\text{O}$  ved stigende koncentration af SLS (Tabel 25).

Tabel 25. Hudens integritet samt flux, lag-time og total penetration af paclbutrazol gennem henholdsvis ubeskadiget og lettere beskadiget hud. Lettere beskadiget hud er opnået ved 3 timers forbehandling med SLS (0.1% eller 0.3%). Resultater er udtrykt som mean med angivelse af SEM for penetrationsegenskaberne.

		Kontrol (n=8)	0.1 % SLS (n=15)	0.3 % SLS (n=15)
Kapacitans (nF)	t = 0 timer	43	47	55
	t = 26 timer	70	184	404
Flux af $^3\text{H}_2\text{O}$	DPM/time	587 (54)	1275 (160)	1892 (173)
	% af kontrol		217	322
Flux af paclbutrazol	nmol/cm <sup>2</sup> x t	0.49 (0.06)	0.51 (0.07)	0.51 (0.06)
	% af kontrol		104	104
Lag-time	Timer	17.1 (2.4)	8.8 (0.9)	8.2 (0.9)
	% af kontrol		51	48
Total penetration på 26 timer	nmol/cm <sup>2</sup>	5.1 (1.2)	10.1 (1.0)	9.9 (1.4)
	% af kontrol		198	194

Effekten af den lettere beskadigelse af huden som følge af forbehandling med SLS på paclbutrazols penetration er en signifikant nedsat lag-time, men en uændret flux (Tabel 25). Denne effekt er meget analog med effekten af forbehandling med SLS på penetrationen af methiocarbs (Tabel 23), der jo også har identisk opløselighed (Tabel 1).

#### 6.4.3.2 Dimethoat

Dimethoat er medtaget grundet stoffets meget høje opløselighed i vand samtidig med en molvægt, der er sammenlignelig med pirimicarb og methiocarb. Resultaterne fra dimethoat skulle således danne baggrund for en indledende diskussion af, hvorvidt en højere vandopløselighed resulterer i markant anderledes penetrationsegenskaber. Resultaterne fra måling af kapacitans og flux af tritieret vand viser, at såvel hudens egenskaber som den ønskede grad af lettere beskadigelse var som ønsket (Tabel 25).

Dimethoat havde ved penetration gennem ubeskadiget hud (kontrolgruppen i Tabel 26) en markant lavere maximal flux, en længere lag-time og en lavere total penetration over 24 timer end såvel methiocarb, pirimicarb som paclbutrazol (Tabel 23, Tabel 24, Tabel 25, Tabel 26). Disse resultater er i overensstemmelse med forventningerne om at et stærkt hydrofilt stof vanskeligt vil penetrere den intakte hudbarriere. I en del af de anvendte penetrationsceller observeres således slet ingen penetration efter 24 timer, hvilket afspejles i de relativt store spredninger på data. Undersøgelser gennemført i EU-regi i laboratoriet viser analoge resultater (28). Disse undersøgelser er dog udført over en anden tidsperiode og med en anden receptor væske, men viser en total mangel på penetration af dimethoat gennem huden efter såvel 24 som 48 timer, ligesom 98 % af det applicerede stof kan genfindes i donorvæsken efter 24 timer. Disse data indikerer således, at dimethoat grundet den høje vandopløselighed stort set ikke kommer ind i huden, endsig gennemtrænger den.

Effekten af den graduerede beskadigelse af hudens barrierefunktion på penetrationen af dimethoat er signifikant. Selv en lettere beskadigelse gennem 3 timers behandling med 0.1 % SLS resulterer i en halvering af lag-time, en 172 % forøget flux samt en 3½ gang så stor total penetration over 24 timer (Tabel 26). Ved en stærkere beskadigelse af huden progredierer disse ændringer, således at lag-time reduceres til en tredjedel og fluxen øges til 448 % af kontrollerne (Tabel 26).

Tabel 26. Hudens integritet samt flux, lag-time og total penetration af dimethoat gennem henholdsvis ubeskadiget og lettere beskadiget hud. Lettere beskadiget hud er opnået ved 3 timers forbehandling med SLS (0.1% eller 0.3%). Resultater er udtrykt som mean med angivelse af SEM for penetrationsegenskaberne.

		Kontrol (n=6)	0.1 % SLS (n=6)	0.3 % SLS (n=6)
Kapacitans (nF)	t = 0 timer	47	43	43
	t = 30 timer	60	464	557
Flux af $^3\text{H}_2\text{O}$	DPM/time	580 (78)	1206 (189)	1734 (196)
	% af kontrol		208	299
Flux af dimethoat	nmol/cm <sup>2</sup> x t	0.29 (0.13)	0.79 (0.25)	1.30 (0.28)
	% af kontrol		272	448
Lag-time	Timer	20.6 (3.1)	10.6 (2.9)	7.8 (3.9)
	% af kontrol		51	38
Total penetration på 24 timer	nmol/cm <sup>2</sup>	3.6 (1.7)	12.9 (4.2)	20.3 (5.2)
	% af kontrol		358	564

Resultaterne viser, at for et stof med ringe penetration gennem intakt hud (grundet lav lipofilitet) vil selv en begrænset beskadigelse af hudbarrieren have betydelige konsekvenser for såvel den tid, der går før stoffet når cirkulationen (lag-time), som for den hastighed, hvormed stoffet diffunderer over huden.

#### 6.4.3.3 Prochloraz

Prochloraz er placeret i den modsatte ende af opløselighedsspektret i forhold til dimethoate. Med en  $\log P_{ow}$ -værdi på 4.4 har prochloraz således en mere end 1000 gange højere lipofilitet end dimethoate med en  $\log P_{ow}$ -værdi på bare 0.7 (Tabel 1). Resultater fra kapacitansmåling og  $^3\text{H}_2\text{O}$  flux viser en funktional model (Tabel 27). Imidlertid er data for penetration af prochloraz overraskende. Vi observerer et næsten totalt fravær af penetration trods stoffets lipofilitet. En nedsat flux og eventuelt en øget lag-time ville være forventeligt og i overensstemmelse med analoge studier af prochloraz i EU-regi (26), der dog havde en mere lipofil receptorvæske. Kendetegnende for disse undersøgelser af prochloraz var en 90 % genfindning af prochloraz i huden, medens intet resterede i donorvæsken. At der i EU-forsøgene observeredes prochloraz i receptorvæsken kan hænge sammen med at receptorvæsken i EU-forsøgene var tilsat serum albumin for at øge lipofiliteten.

Tabel 27. Hudens integritet samt flux, lag-time og total penetration af prochloraz gennem henholdsvis ubeskadiget og lettere beskadiget hud. Lettere beskadiget hud er opnået ved 3 timers forbehandling med SLS (0.1% eller 0.3%). Flux af tritieret vand er udtrykt som mean med angivelse af SEM medens penetrationsegenskaber for prochloraz er udtrykt som medianer med antal let af celler med positiv flux og penetration i parentes.

		Kontrol (n=6)	0.1 % SLS (n=6)	0.3 % SLS (n=6)
Kapacitans (nF)	t = 0 timer	42	40	43
	t = 30 timer	52	332	421
Flux af $^3\text{H}_2\text{O}$	DPM/time	552 (78)	1281 (221)	2032 (364)
	% af kontrol		232	368
Flux af prochloraz	nmol/cm <sup>2</sup> x t	0 (1 / 6)	0 (2 / 6)	0 (2 / 6)
Lag-time	Timer	> 30	> 30	> 24
Total penetration på 24 timer	nmol/cm <sup>2</sup>	0 (1 / 6)	0 (2 / 6)	0 (2 / 6)

## 6.5 Konklusion på delstudie med lettere beskadiget hud.

Delstudiet viser, at det er muligt at etablere en eksperimentel model til studiet at penetration af fremmedstoffer gennem lettere beskadiget hud. Modellen er

reproducerbar i og med, at den inducerede skade kan verificeres som blivende igennem hele den eksperimentelle periode, og at graden af skade kan gentages fra forsøg til forsøg med en variation, der ikke i betydelig grad overstiger den altid eksisterende inter-eksperimentelle forskel, der er betinget af forskellige donorer.

Delstudiet viser endvidere, at penetrationskarakteristika for de anvendte modelstoffer klart ændres ved anvendelse af lettere beskadiget hud. Mest markant ses en nedsat lag-time, men også flux og den samlede penetrerede mængde stof i løbet af forsøgsperioden er øget. For eksponeringsperioder af en varighed omkring den oprindelige lag-time vil den relative forøgelse af mængden af penetreret stof kunne være ganske stor.

En diskussion af den konceptionelle model for hudpenetration konkluderer, at en påvirkning af hudens barriereegenskaber ikke nødvendigvis påvirker både flux, lag-time samt reservoir.

Den passive diffusion fra den hydrofile donor og ind i huden begünstiges af en vis grad af lipofilitet. Denne lipofilitet har dimethoat ikke, hvorfor man i den ubeskadigede hud kun observerer en meget begrænset penetration og at hovedparten af den administrerede dimethoat kan genfindes i donorvæsken ved forsøgsafslutning. Når et stof er trængt ind i huden skal det videre til den generelle cirkulation, hvilket indebærer diffusion fra et lipofilt miljø til en væske, der overvejende er hydrofil. I den anvendte eksperimentelle model svarer det til transporten fra huden og ned i receptorvæsken. Denne diffusion faciliteres af en ikke for høj lipofilitet, idet en sådan vil betinge, at stoffet vil have en klar præference for at blive i huden. Det er sandsynligvis denne effekt, der ses ved forsøgene med prochloraz, hvor man trods høj lipofilitet ikke genfinder betydelige mængder pesticid i receptorvæsken. Analog med denne konklusion beskriver også Brand og Mueller (22), at de i en undersøgelse af tre pesticider observerer, at det mest lipofile pesticid har den dårligste penetration, men den største akkumulering i stratum corneum.

De gennemførte undersøgelser viser således, at både en for høj og en for lav lipofilitet begrænser hudpenetrationen. Endvidere indikerer eksperimenterne med beskadiget hud, at den beskadigelse, der jo sker fra oversiden af huden, primært har effekt på passagen fra donor og ind i huden, hvilket illustreres ved de markant ændrede penetrationsforhold for den meget hydrofile dimethoat.

Arbejdsmiljømæssigt har fundene potentiel betydning idet huden hos en stor andel af alle arbejdstagere og måske gartneriarbejdere mere specifikt ofte er kompromiteret grundet fysisk belastning og/eller vådt arbejde. Det betyder, at regulering på basis af undersøgelser med intakt hud skal overvejes og ovenstående resultater medinddrages ved vurdering af specielt de mest hydrofile stoffer.

Man må endvidere forholde sig til, at en beskadiget hud potentielt giver anledning til en øget ophobning af stof i huden (reservoir effekt). Reservoir effekten er tidligere blevet diskuteret (29) og anvendt som en del af forklaringen på det forskellige penetrationsmønster for hydrofile og lipofile stoffer. Betydningen af denne deponering og hvorvidt den vil lede til en øget men forsinket penetration er hid til kun meget sparsomt belyst. En undersøgelse af betydningen af opløselighed for reservoir-effekten indebærer en analyse af den mængde stof, der persisterer i huden ved eksponerings- og forsøgsophør, og som efterfølgende fortsat vil kunne absorberes. En enkelt

helt ny undersøgelse i rotter har imidlertid vist, at man ved testning af 19 forskellige pesticider observerede en fortsat absorption efter at pesticiderne var vasket af huden for 17 af de 19 stoffer (30). Den fortsatte penetration af disse stoffer gav imidlertid i kun halvdelen af tilfældene anledning til en forøget systemisk koncentration (30), hvilket sandsynligvis er betinget af rotters hurtige metabolisme. Da betydelige forskelle eksisterer mellem penetration gennem rottehud og human hud, ligesom metaboliseringshastigheder er vanskelige at sammenligne direkte, er der et påtrængende behov for også at få denne problemstilling belyst i en eksperimentel human model.





# 7 Konklusioner og perspektiver

## 7.1 Konklusioner

Projektet har opfyldt dets hovedformål og leveret viden af både grundvidenskabelig og anvendelsesorienteret værdi.

Under anvendelse af en velvalideret eksperimentel model er det vist, at de udvalgte hjælpestoffer kun i begrænset omfang påvirker hudens barrierefunktion samt penetrationen af tre udvalgte pesticider.

Såfremt pesticiderne derimod anvendes i salgsopløsninger, ses i forhold til de rene stoffer en markant reduktion i den tid, der går, før pesticiderne kan måles på undersiden af huden. Salgsformuleringerne reducerer altså lag-time. Dette kan have konsekvenser for den regelsætning, der alene baseres på undersøgelser af rene stoffer. Endvidere indikerer det, at man ved alternative hjælpestoffer potentielt kan få produkter med sundhedsmæssigt mere fordelagtige penetrationsegenskaber. Formulering af salgsprodukter vil dog altid være en afvejning af tekniske såvel som sundhedsfaglige egenskaber.

Kombinationsforsøg med 3 pesticider viser, at kombinationseffekter eksisterer og kan resultere i såvel øget som nedsat penetration. Da regelsætningen kun forholder sig til eksponering for enkeltstoffer, peger disse undersøgelser på et problemfelt, der kunne kræve større bevågenhed.

Ingen af de undersøgte handskematerialer øgede den tid, det tog, før pesticiderne kunne måles på undersiden af huden. Derimod nedsatte både nitril og latex signifikant penetrationshastigheden af de to pesticider. Denne penetrationsbegrænsende effekt holdt sig hele forsøgsperiodens 48 timer for nitrilhandsker, mens beskyttelseeffekten ikke var betydende for latexhandsker efter 24 timer.

På basis af de opnåede resultater med lettere beskadiget hud kan det konkluderes, at man ved en lettere beskadiget hud opnår en markant nedsat lag-time. Konsekvensen heraf er en forøget penetration. For et stof med en lag-time på 6 timer ved optimal hud vil en nedsættelse af lag-time til  $2/3$  (4 timer) resultere i en fordobling af den penetrerede mængde stof i løbet af en 8 timers eksponeringsperiode. Denne viden vil sammen med resultaterne fra undersøgelser af handskematerialer have betydning for de råd og den vejledning, der gives omkring anvendelse af såvel produkterne som værnemidler mod eksponering.

På basis af undersøgelser af fem modelstoffer konkluderes at såvel molvægt som opløselighed har betydning for stoffernes penetrationsegenskaber.

Projektet har påpeget betydningen af reservoir-effekten samt tilstedeværelsen af hjælpestoffer i færdigformuleringer. Begge områder har betydning i relation til arbejdsmiljøforhold samt generel regelsætning på pesticidområdet, men den nuværende viden bør udbygges.

## 7.2 Videnskabelige og reguleringsmæssige perspektiver

Et fremadrettet perspektiv vil være en nærmere undersøgelse af betydningen af såvel molvægt som opløselighed for reservoir-effekten. Dette indebærer analyse af den mængde modelstof, der persisterer i huden ved eksponerings- og forsøgsophør, og som efterfølgende fortsat vil kunne absorberes selvom den dermale eksponering er stoppet. Diskussioner med andre hudpenetrations-laboratorier viser, at dette er ganske vanskeligt at gøre reproducerbart uden brug af isotoper. Reservoir-effekten vil derfor lettest kunne belyses ved studier med radioaktivt mærkede modelstoffer. Her vil man af pris og leveringsmæssige årsager sandsynligvis som udgangspunkt anvende modelstoffer, der ikke er pesticider, men som repræsenterer samme fysisk-kemiske karakteristika i forhold til molvægt og opløselighed. Herved vil muligheden for analogi-slutninger over til relevante pesticider fortsat være mulig.

Et andet felt, der vil kræve fremtidig fokus, er effekten af hjælpestoffer på den dermale penetration. Nærværende undersøgelse understreger ikke alene betydningen af at anvende undersøgelser af salgsprodukter som vurderingsrundlag ved regelsætning, men også at revurderinger ved substitution af hjælpestoffer i allerede godkendte pesticider kræver en nærmere vurdering. I Miljøstyrelsens nuværende vurderingsgrundlag (fra 1999) står der ikke andet end at Miljøstyrelsen vurderer den dermale absorption, men ikke hvordan man gør. Endvidere er praksis, at man oftest blot ekstrapolerer fra produkt til produkt hvis aktivstoffet er det samme og således ikke forholder sig til en ændret formulering. Baggrunden for denne praksis er sandsynligvis en mangel på viden omkring hjælpestoffers effekt på den dermale penetration af aktivstoffer. En mangel på umiddelbar tilgængelig viden bør imidlertid ikke få Miljøstyrelsen til at ignorere denne problemstilling.

## 8 Referencer

1. Archibald BA, Solomon KR, Stephenson GR. Estimating pirimicarb exposure to greenhouse workers using video imaging. *Arch Environ Contam Toxicol*. 1994; 27: 126-129.
2. Benford DJ, Cocker J, Sartorelli P, Schneider T, van Hemmen J, Firth JG. Dermal route in systemic exposure. *Scand J Work Environ Health*. 1999; 25: 511-520.
3. Sartorelli P, Aprea C, Bussani R, Novelli MT, Orsi D, Sciarra G. In vitro percutaneous penetration of methyl-parathion from a commercial formulation through the human skin. *Occup Environ Med* 1997; 54: 524-525.
4. Tupker RA. The influence of detergent on the human skin. Thesis. University of Groningen, Netherlands, 1990: 1-104.
5. Treffel P, Gabard B. Vehicle influence on the in vitro skin penetration of ultra-violet filters used in sun screen formulations. In: Prediction of percutaneous penetration. Vol. 4B (Brain KR, James VI, Walters KA eds.), STS Publishing Ltd., Cardiff, 1996: 178-181.
6. Scheuplein RJ, Bronaugh RL. Percutaneous absorption. In: Biochemistry and physiology of the skin (Goldsmith LA ed.), Oxford University Press, Oxford, 1983: 1255-1295.
7. Dick IP, Blain PG, Williams FM. The percutaneous absorption and skin distribution of lindane in man. I. In vivo studies. *Hum Exp Toxicol* 1997; 16: 645-651.
8. Klaassen CD (ed). Casarett & Doull's Toxicology, 5. edition. McGraw-Hill, New York, 1996: 529-546
9. Nielsen JB. Effects of four detergents in the in-vitro barrier function of human skin. *Int J Occup Environ Health* 2000; 6: 143-147.
10. Nielsen JB, Nielsen F. Dermal in vitro penetration of methiocarb, paclobutrazol and pirimicarb. *Occup Environ Med* 2000; 57:734-737.
11. OECD 428. OECD guidelines for testing of chemicals. Skin absorption: in vitro method. 2003.
12. Grandjean P. Skin penetration. Hazardous chemicals at work. Taylor & Francis, London, 1990: 1-187.
13. Nielsen GD, Nielsen JB, Andersen KE, Grandjean P. Effects of industrial detergents on the barrier function of human skin. *Int J Occup Environ Health* 2000; 6: 138-142.
14. Ramsey JD, Woollen BH, Auton TR, Scott RC. The predictive accuracy of in vitro measurements for the dermal absorption of a lipophilic penetrant (fluazifop-butyl) through rat and human skin. *Fundam Appl Toxicol* 1994; 23: 230-236.
15. Pallesen K, Stengaard V, Kaysen O. Kortlægning af anvendelsen af alkylphenol-ethoxylater og alkylphenoler. Miljøstyrelsen. Rapport nr 1, 1996: 1-27.
16. Ramsing DW, Fullerton A. Permeability of protective gloves to sodium lauryl sulphate. Released chambers used as in vitro system. *Skin Res Technology* 1996; 2: 37-39.
17. Andersen KE. Systemic toxicity from percutaneous absorption. In: Occupational skin disease (Adams RM, editor), W.B. Saunders Comp, Philadelphia, 2000: 69-85.

18. Tobiassen LS, Nielsen E, Nørhede P, Ladefoged O. Report on the health effects of selected pesticide coformulants. Bekæmpelsesmiddelforskning fra Miljøstyrelsen 2003; Rapport nr. 80.
19. Tobiassen LS, Nielsen E, Nørhede P, Ladefoged O. Appendices 1-18 to: Report on the health effects of selected pesticide coformulants. Arbejdsrapport fra Miljøstyrelsen 2003; Rapport nr. 51.
20. Windheuser JJ, Haslam JL, Caldwell L, Shaffer RD. The use of N,N-diethyl-m-toluamide to enhance dermal and transdermal delivery of drugs. *J Pharm Sci* 1982; 71: 1211-1213.
21. Baynes RE, Halling KB, Riviere JE. The influence of diethyl-m-toluamide (DEET) on the percutaneous absorption of permethrin and carbaryl. *Tox Appl Pharm* 1997; 144: 332-339.
22. Brand RM, Mueller C. Transdermal penetration of atrazine, alachlor, and trifluralin: effect of formulation. *Tox Sci* 2002; 68: 18-23.
23. Diepgen TL. Occupational skin-disease data in Europe. *Int Arch Occup Environ Health* 2003; 76: 331-338.
24. Halkier-Sørensen L. Occupational skin diseases. *Contact Dermatitis* 1996; 35 (suppl 1): 1-120.
25. Singer MM, Tjeerdema RS. Fate and effects of the surfactants sodium dodecyl sulphate. *Rev Environ Contam Toxicol* 1993; 133: 95-149.
26. Elias PM. Epidermal lipids, barrier function, and desquamation. *J Invest Dermatol* 1983; 80: 44S-49S.
27. Forslind B, Engström S, Engblom J, Norlén. A novel approach to the understanding of human skin barrier function. *J Dermatol Sc* 1997; 14: 115-125.
28. Nielsen JB, Nielsen F, Sørensen JA. In vitro percutaneous penetration of five pesticides – effects of molecular weight and solubility characteristics. *J Occup Environ Med* 2004, submitted.
29. Cnubben NHP, Elliott GR, Hakkert BC, Meuling WJA, van de Sandt JJM. Comparative in vitro-in vivo percutaneous penetration of the fungicide ortho-phenylphenol. *Reg Toxicol Pharmacol* 2002; 35: 198-208.
30. Zendzian RP. Pesticide residue on/in the washed skin and its potential contribution to dermal toxicity. *J Appl Toxicol* 2003; 23: 121-136.

## Præparation af hud til forsøg

Efter den kirurgiske fjernelse af huden fra bryst- eller abdominalregionen skæres subcutis fra og huden nedfryses herefter ved  $-20^{\circ}\text{C}$  senest en time efter indgrebet. Dette er også opbevaringstemperaturen for huden indtil den skal anvendes til forsøgsformål. Huden optøs ved stuetemperatur en time inden den klargøres til montering i forsøgsopstillingen.

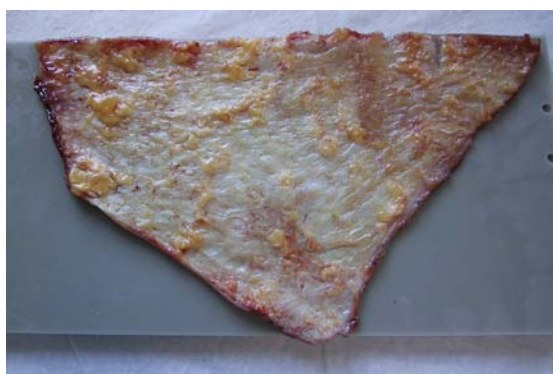


Fig. 1 Billedet viser huden efter optøning. Der ses tydelige rester af fedtlaget, der fjernes inden huden benyttes. Huden undersøges ligeledes for evt. skader eller arvæv, som det eksempelvis ses i øvre højre hjørne af fig. 1.

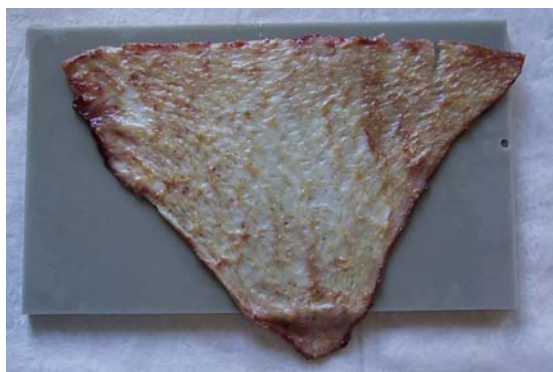


Fig. 2 Billedet viser huden efter fjernelse af fedtresterne ved afskrabning med skalpel. Fedtresterne fjernes omhyggeligt uden at huden beskadiges.

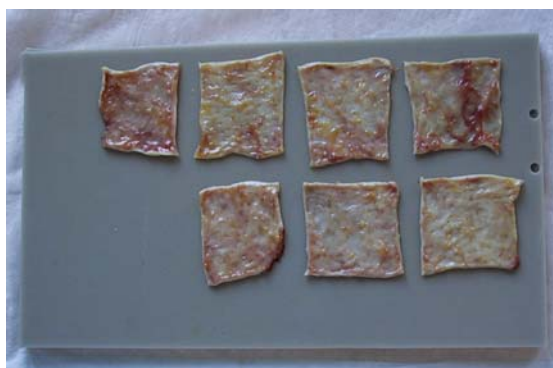


Fig. 3 Billedet viser huden inden montering i cellerne. Huden er udskåret i passende stykker med skalpel. Hudstykkerne placeres under en serviet vædet med fysiologisk saltvand for at forhindre udtørring inden montering.

