

Regenerative und anti-entzündliche Effekte von Betulin-Emulsionen bei gestörter epidermaler Barrierefunktion*

Regenerative and Anti-Inflammatory Effects of Betulin-Emulsions on Defective Epidermal Barrier

Autoren

M. N. Laszczyk¹, I. Reitenbach-Blindt², W. Gehring²

Institute

¹ Birken GmbH, Niefern-Öschelbronn

² Hautklinik am Klinikum der Stadt Karlsruhe gGmbH

Bibliografie

DOI <http://dx.doi.org/10.1055/s-0029-1214725>
 Online-Publikation: 23. 6. 2009
 Akt Dermatol 2010; 36: 24–28 © Georg Thieme Verlag KG Stuttgart · New York
 ISSN 0340-2541

Korrespondenzadresse

Prof. Dr. Wolfgang Gehring
 Direktor der Hautklinik am Klinikum der Stadt Karlsruhe gGmbH
 Moltkestraße 120
 76133 Karlsruhe
 W.M.Gehring@t-online.de

Zusammenfassung

▼
 Betulin-Emulsionen sind emulgatorfreie W/O-Emulsionen, die bei trockener empfindlicher Haut mit gestörter epidermaler Barrierefunktion eingesetzt werden. Nach experimenteller Schädigung der Hautbarriere mittels eines repetitiven Waschvorgangs mit 0,1% Natrium-Laurylsulfat (NLS)-Lösung, wurde der Effekt der Betulin-Emulsion im Vergleich zur wasserhaltigen hydrophilen Creme NRF auf die Regeneration der geschädigten Hautbarriere und auf die begleitende entzündliche Irritation untersucht. Nach einwöchiger Anwendung wurde eine gegenüber unbehandelter Haut signifikante Erhöhung der Hornschichtfeuchtigkeit bei gleichzeitiger Verminderung des transepidermalen Wasserverlustes gemessen. Diese Ergebnisse waren vergleichbar mit der als Kontrolle ebenfalls geprüften wasserhaltigen

hydrophilen Creme NRF. Ein positiver Einfluss auf die durch den Waschtest hervorgerufene entzündliche Begleitreaktion, die als Anstieg der koronalen Durchblutung dokumentiert werden konnte, war nur durch die Betulin-Emulsionen möglich. Es konnte eine signifikant raschere Normalisierung des Blutflusses durch die beiden getesteten Betulin-Emulsionen im Gegensatz zur unbehandelten und zu der mit wasserhaltiger hydrophiler Creme NRF behandelten Fläche gezeigt werden. Daraus lässt sich eine anti-inflammatorische Wirkung der Betulin-Emulsionen ableiten, was sie deutlich von der Vergleichsformulierung unterscheidet. Aufgrund der nachgewiesenen regenerativen und anti-entzündlichen Wirkung der untersuchten Betulin-Emulsionen bietet sich eine neue Alternative für den Einsatz in der Hautpflege und im Hautschutz bei reduzierter epidermaler Barrierefunktion.

Einleitung

▼
 Ziel dieser Untersuchungen war es, den regenerierenden Effekt von Betulin-Emulsionen bei gestörter epidermaler Barrierefunktion zu untersuchen. Zusätzlich wurde die Beeinflussung der NLS-bedingten Entzündungsreaktion durch die Betulin-Emulsionen beurteilt. Als Vergleichsformulierung wurde die nichtionische hydrophile Creme NRF eingesetzt.

Betulin-Emulsionen werden erst seit kurzer Zeit im Bereich der medizinischen Hautpflege und des Hautschutzes eingesetzt. Betulin-Emulsionen sind W/O-Emulsionen basierend auf einem Triterpentrockenextrakt des Birkenkorks [1]. Betulin ist mit ca. 80% seine Hauptkomponente. Daneben enthält der Extrakt weitere dem Betulin nahe verwandte pentazyklische Triterpenoide wie Betu-

linsäure (3%), Oleanolsäure (1%), Lupeol (2%) und Erythrodiol (1%) [2]. Für die einzelnen Extraktkomponenten sind in der Literatur vielfältige biologische Wirkungen beschrieben. Sie zeichnen sich durch eine ganze Reihe von Effekten als hautpflegende und hautschützende Substanzen aus. Neben anti-bakteriellen, anti-mykotischen und anti-viralen [3–5] Effekten sind sowohl *in vitro* als auch im Tiermodell anti-inflammatorische [6–9] und differenzierungsfördernde Wirkungen [10] an der Haut bekannt.

Galenisch betrachtet gehören die Betulin-Emulsionen in die Kategorie der emulgatorfreien feststoffstabilisierten Emulsionen (Pickering-Emulsionen) [1]. So sind auch keine tensidischen Emulgatoren enthalten, deren Einsatz gerade bei einer gestörten Hautbarriere vermehrt kritisch gesehen wird, da sie zu einer zusätzlichen Störung der epidermalen Barrierefunktion führen können [11]. Tenside können sich in das Stratum corneum einlagern und gehen zahlreiche Wech-

* Herrn Prof. Dr. Max Gloor zu seinem 70. Geburtstag gewidmet.

selwirkungen mit der Hautbarriere ein. Sie können z. B. hauteigene Lipide emulgieren und unterstützen damit beim Waschvorgang die Entfettung, wodurch die Barrierefunktion gestört wird. Des Weiteren kann in den Rezepturen der Betulin-Emulsionen aufgrund anti-bakterieller und anti-mykotischer Wirksamkeit des Betulins und seiner nahen Verwandten auf Konservierungsstoffe verzichtet werden, die gerade im Falle einer barrieregestörten Haut ein nicht zu unterschätzendes Sensibilisierungs- und Irritationspotenzial besitzen [12].

Durch einen repetitiven Waschtest mit 0,1 % Natrium-Laurylsulfat-(NLS)-Lösung [13] wird ein Zustand eingestellt, der mit den Gegebenheiten bei trockener und empfindlicher Haut vergleichbar ist [14] und sich durch einen Verlust an Hornschichtfeuchtigkeit und einen erhöhten transepidermalen Wasserverlust (TEWL) auszeichnet. Repetitive Waschungen bringen außerdem einen kumulativ irritativen Effekt mit sich, der individuell unterschiedlich in eine irritativ-toxische Kontaktdermatitis münden kann [13]. Nach einwöchiger Durchführung des repetitiven Waschtests wird eine maximale Störung der epidermalen Barrierefunktion erreicht, die geeignet ist, Präparate zu untersuchen, von denen eine regenerative Wirkung an der epidermalen Barriere zu erwarten ist [15].

Material und Methoden

Prüfformulierungen

Als erste Prüfformulierung wurde die Betulin-Emulsion PUR (Im-lan® Creme Pur) eingesetzt. Sie besteht aus Wasser (*Aqua*), Jojobaöl (*Simmondsia Chinensis Oil*) und einem Triterpentrockenextrakt aus Birkenkork mit der Hauptkomponente Betulin (*Betula alba bark extract*). Parallel wurde die Betulin-Emulsion PLUS (Im-lan® Creme Plus) geprüft, die zusätzlich 3 % Harnstoff (*Urea*) und 3 % Bienenwachs (*Cera alba*) enthält. Als Vergleichsformulierung wurde die nichtionische hydrophile Creme SR (NRF S.26), verwendet, die bezüglich des Feuchtigkeitsgehaltes mit den Prüfformulierungen vergleichbar ist. Die nichtionische hydrophile Creme SR (NRF S.26) setzt sich wie in **Tab. 1** beschrieben zusammen.

Probandenkollektive

Die Prüfformulierungen wurden bei 25 gesunden freiwilligen Probanden untersucht. In die Studie wurden Probanden mit einem Mindestalter von 18 Jahren nach dem Zufallsprinzip eingeschlossen. Akute Hauterkrankungen oder die Verwendung von Externa im Bereich der Testareale innerhalb der letzten drei Wochen galten als Ausschlusskriterium. Ebenso konnten schwangere und stillende Frauen nicht an der Studie teilnehmen. Alle Probanden waren über den Testablauf genau unterrichtet und hatten ihr ausdrückliches Einverständnis erklärt.

Repetitiver Waschtest

Die Untersuchungen erfolgten an der Volarseite beider Unterarme, die zuvor mit einem nicht abwaschbaren Marker in zwei Quadranten eingeteilt worden ist. Somit standen insgesamt vier Testfelder zur Verfügung, die jeweils eine Größe von etwa 24 cm² (6 cm × 4 cm) hatten.

Die Waschungen wurden an sieben aufeinander folgenden Tagen fünf Mal täglich mit 0,1 % NLS durchgeführt. Zur Standardisierung des Waschvorganges benutzten die Probanden einen Schaumstoffroller, der eine Schwammwalze mit einem Durchmesser von 3,5 cm und einer Länge von 5 cm trägt. Der Hohlstiel des Rol-

Tab. 1 Zusammensetzung der nichtionischen hydrophilen Creme SR (NRF S.26).

Nichtionische emulgierende Alkohole	21,0
2-Ethylhexyllauromyristat	10,0
Glyzerol 85 %	5,0
Kaliumsorbat	0,14
Wasserfreie Zitronensäure	0,07
Gereinigtes Wasser	63,79

lers ist mit Blei ausgefüllt, so dass der Schaumstoffroller ein Gewicht von 200 g besitzt. Für die Waschung wurde der Schwamm in die Waschlösung getaucht und anschließend die Rolle mit dem Auflagedruck ihres Eigengewichtes 50 Mal über die Testfelder hin und her gerollt.

Anwendung der Prüfpräparate

An die einwöchige Waschphase schloss sich eine ebenfalls einwöchige Behandlungsphase an. Auf die definierten Testfelder wurden drei Mal täglich jeweils 200 µl der Prüfformulierungen appliziert. Ein benachbartes Testfeld blieb als Kontrollfeld unbehandelt. Zur Erleichterung der Dosierung waren die Testsubstanzen in durchsichtigen 5 ml Plastikspritzen mit Skalierung abgefüllt, wobei ein Teilstrich 200 µl entsprach. Diese Menge wurde gleichmäßig durch leichte Massagebewegungen auf das gesamte Testfeld verteilt. Dabei waren die Probanden gehalten, bei jedem Prüfpräparat einen anderen Finger zu verwenden, um Vermischungen der Testformulierungen zu vermeiden.

Beurteilung der Testreaktionen

Vor der ersten Waschung (T0), vor der ersten Anwendung der Prüfpräparate (T7) und nach der Anwendung (T14) wurden in jedem Feld die Hornschichtfeuchtigkeit mit dem Corneometer CM 820 (Courage und Khasaka) und der TEWL mit dem Tewameter TM 210 (Courage und Khasaka) bestimmt.

Das Messprinzip der Corneometrie basiert auf einer kapazitiven Bestimmung der unterschiedlichen Dielektrizitätskonstanten von Wasser und anderen Stoffen. Zur Messung wird die Membran eines axial beweglichen Messkopfes durch eine Feder mit einem konstanten Anpressdruck von 3,5 N auf die Hautoberfläche gedrückt. Je nach Feuchtigkeitsgrad des Stratum corneums ändert sich die Leitfähigkeit dieses geschlossenen Systems [16]. Der transepidermale Wasserverlust gilt als ein wichtiger Parameter für die epidermale Barrierefunktion. Das Messprinzip beruht darauf, dass ein hautnah aufgebracht Messkopf zwei Fühlerpaare enthält, von denen eines die Feuchtigkeit und das andere die Temperatur misst. Daraus wird der Partialdruck des Wasserdampfes für die zwei verschiedenen übereinanderliegenden Ebenen jedes Fühlerpaares und über den Gradienten des Partialdruckes die Verdunstungsrate bestimmt. Die Messwerte drücken die Verdunstungsrate in g/m² h aus [17–19].

Um die durch den Waschvorgang hervorgerufene Entzündungsreaktion zu erfassen, wurde die Laser-Doppler-Flowmetrie (LDF) (Periflux, Fa. Servomed) ebenfalls an den Tagen T0, T7 und T14 eingesetzt. Die LDF-Messung ist ein Maß für die Hautdurchblutung und ist zur Beurteilung aller Faktoren geeignet, von denen ein Einfluss auf die Hautdurchblutung zu erwarten ist. Sie eignet sich somit zur Beurteilung von Entzündungsreaktionen. Ein Laserstrahl (Helium-Neon-Laser der Wellenlänge 632,8 nm) tritt mit niedriger Leistung (Ausgangsleistung: 2 mW) in die Haut ein. Der Brenn- und Messpunkt des Laserstrahls liegt in 0,5–1,0 mm Tiefe. Die Messung basiert auf dem Prinzip der Doppler-

verschiebung, d.h. der Frequenz- bzw. Wellenlängenänderung, wenn das Licht von vorbeiströmenden Teilchen reflektiert wird. In diesem Fall spiegelt die LDF die Strömungsgeschwindigkeit der Erythrozyten wider und gibt aufgrund ihrer Eindringtiefe Aufschluss über den relativen Grad der Durchblutung bis etwa zum mittleren Korium [22,23].

Statistische Auswertung

Die Ergebnisse wurden nach vorheriger Varianzanalyse mit dem Friedman-Test nach dem Wilcoxon-Test für verbundene Stichproben statistisch ausgewertet. Die Fragestellung wurde zweiseitig formuliert. Die Darstellung der Ergebnisse in den Abbildungen bezieht sich auf die Mittelwerte. Die jeweiligen Signifikanzen sind in den Abbildungen wie folgt gekennzeichnet: $p < 0,05$ (*); $p < 0,01$ (**); $p < 0,001$ (***)

Ergebnisse

Die repetitiven Waschungen über einen Zeitraum von einer Woche führten zum Zeitpunkt T7 zu einem Verlust an Hornschichtfeuchtigkeit (T0: 52 – 54 Skalenteile [SKT]; T7: 43 – 46 SKT; $n = 25$) (Abb. 1) und als Zeichen der epidermalen Barrierschädigung zu einer statistisch signifikanten Steigerung des transepidermalen Wasserverlustes (T0: 8 – 10 g/hm²; T7: 13 – 15 g/hm²; $n = 25$) (Abb. 2).

Gleichzeitig kam es zu einem Anstieg der korialen Durchblutung (T0: 35 – 37%; T7: 61 – 70%; $n = 25$) (Abb. 3), die die Entzündungsreaktion widerspiegelt, die durch das irritative Potenzial des NLS induziert wurde.

In der Behandlungsphase führten alle Prüfformulierungen gegenüber der unbehandelten Kontrolle zu einer statistisch signifikanten Rehydrierung der Hornschicht, die mit der Ausgangssituation T0 vergleichbar war (T7: 43 – 46 SKT; T14: 47 SKT [unbehandelt]; 53 – 58 SKT [behandelt]; $n = 25$) (Abb. 1). Dabei war die wasserhaltige hydrophile Creme NRF den Betulin-Emulsionen gegenüber statistisch signifikant ($p > 0,05$) überlegen. Gleichzeitig zeigte sich eine, statistisch jedoch nur tendenzielle, Überlegenheit der Betulin-Emulsion PLUS zur Basisformulierung PUR.

Als Zeichen für die Wiederherstellung der epidermalen Barrierefunktion senkte sich der transepidermale Wasserverlust innerhalb der Behandlungsphase für alle Testfelder ab (T7: 13 – 15 g/hm²; T14: 13 g/hm² [unbehandelt]; 10 – 12 g/hm² [behandelt]; $n = 25$) (Abb. 2). Im Vergleich zum unbehandelten Versuchsfeld verminderte sich jedoch für alle behandelten Areale der TEWL signifikant. Statistische Unterschiede zwischen den Prüfformulierungen ließen sich nicht erkennen.

Über die Laser-Doppler-Flowmetrie wurde für beide Varianten der Betulin-Emulsion eine signifikante Erniedrigung des korialen Blutdurchflusses nachgewiesen (Abb. 3). Die Reduktion des Blutflusses durch die Betulin-Emulsionen erwies sich außerdem gegenüber der erreichten Reduktion durch die Anwendung der hydrophilen Creme NRF als signifikant stärker (T7: 61 – 70%; T14: 53% [unbehandelt]; 38 – 39% [Betulin-Emulsionen]; 42% [NRF-Creme]; $n = 25$). Zwischen den beiden Betulin-Emulsionen PUR und PLUS existiert kein signifikanter Unterschied.

Diskussion

Im Rahmen der vorliegenden Untersuchungen wurden die Prüfpräparate in einem Modell untersucht, das den Gegebenheiten

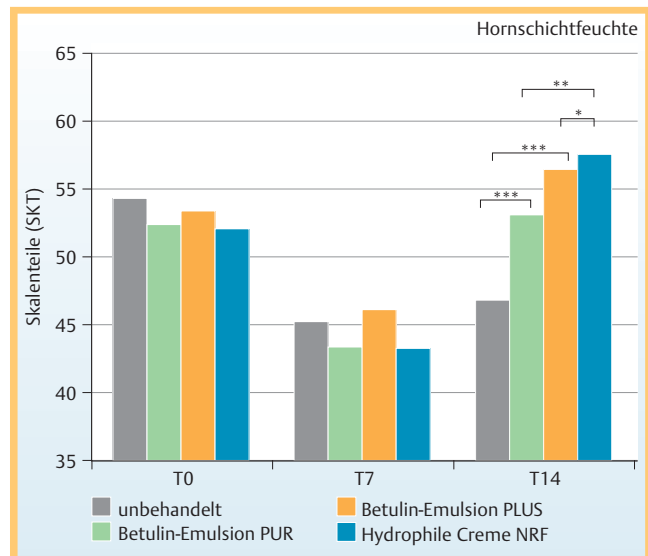


Abb. 1 Messung der Hornschichtfeuchte mittels des Corneometers ($n = 25$) jeweils vor Beginn des repetitiven Waschtests (T0) nach einwöchiger Wachphase (T7) und nach der Behandlungsphase (T14).

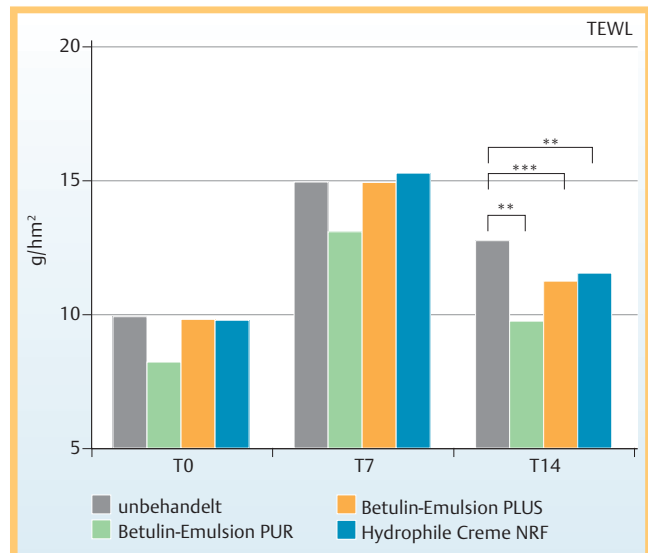


Abb. 2 Bestimmung transepidermalen Wasserverlustes mittels Tewameter ($n = 25$) vor Beginn der Waschungen (T0), nach einwöchigem repetitiven Waschttest (T7) und nach einwöchiger Behandlungsphase (T14).

bei trockener empfindlicher Haut mit gestörter epidermaler Barrierefunktion entspricht. Der standardisierte repetitive Waschttest mit 0,1% NLS-Lösung führt zu einer reversiblen Schädigung der Hautbarriere, die zur Untersuchung der unterstützend regenerativen Wirkung von Externa geeignet ist. Die erreichte Schädigung der Hautbarriere zeigte sich durch die verminderte Hornschichtfeuchte sowie den signifikant gesteigerten transepidermalen Wasserverlust nach Abschluss der einwöchigen Waschphase. Gleichzeitig wurde der erwartete irritative Effekt durch den Anstieg der korialen Durchblutung beobachtet.

Bei einer gestörten Hautbarriere kann die Regeneration durch die Behandlung mit Externa beschleunigt und unterstützt werden. Hierfür eignet sich vor allem der W/O-Emulsionstyp, zu dem auch die Betulin-Emulsionen gehören. Beide hier geprüften Betulin-Formulierungen PUR und PLUS sowie die Vergleichsformulie-

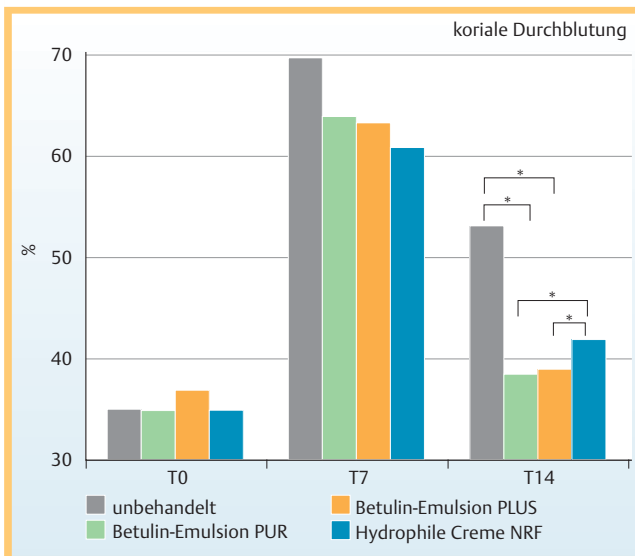


Abb. 3 Bestimmung der corialen Durchblutung mittels Laser-Doppler-Messung (n = 25) vor Beginn der Waschungen (T0), nach einwöchigem repetitiven Waschtest (T7) und nach einwöchiger Behandlungsphase (T14).

Die Rehydratisierung der Hornschicht erkennen, die das Niveau des Startwertes (T0) erreichte. Als deutliches Zeichen für die Regeneration der epidermalen Barrierefunktion senkte sich bei allen Prüfformulierungen der TEWL-Wert während der Behandlungsphase ab. Im Gegensatz zur Hornschichtfeuchte erwiesen sich die Betulin-Emulsionen und die nichtionische hydrophile Creme NRF hier als gleichwertig. Die tendenzielle Überlegenheit der Betulin-Emulsion PLUS gegenüber der PUR bezüglich der Hornschichtfeuchte kann auf den Harnstoffzusatz zurückgeführt werden. Harnstoff gehört zu den natürlichen Feuchthaltefaktoren der Haut. Er stammt aus dem Schweiß und aus dem Argininabbau des Verhornungsprozesses [24].

Neben der gezielten Störung der epidermalen Barrierefunktion hat der repetitive Waschtest eine entzündliche Irritation der Haut zur Folge. Die Entzündungsreaktion wurde durch die Messung der corialen Durchblutung quantifiziert.

Während hinsichtlich der Regeneration der Hautbarriere vergleichbare Ergebnisse von den Betulin-Emulsionen und der nicht-ionischen hydrophilen Creme NRF erzielt wurden, zeigte sich im inhibitorischen Effekt auf die coriale Durchblutung eine signifikante Überlegenheit der Betulin-Emulsionen. Aus diesen Untersuchungsergebnissen kann eine anti-entzündliche Wirkung abgeleitet werden. Da zwischen beiden Betulin-Emulsionen kein Unterschied beobachtet wurde, kann davon ausgegangen werden, dass die wirkbestimmenden Komponenten Jojobaöl und/oder der Betulin-basierte Triterpenextrakt sind. Eine anti-entzündliche Wirkung von Jojobaöl wurde bisher nur bei rektaler Gabe untersucht [25]. Es zeigte sich in verschiedenen Mausmodellen ein inhibitorischer Einfluss auf die Carrageenan-induzierte Prostaglandin vermittelte Entzündungsreaktion. Daneben wurde auch die primär Zytokin-vermittelte durch LPS (mikrobielle Lipopolysaccharide) induzierte Entzündung durch Jojobaöl gehemmt. Für die anti-inflammatorische Wirkung der in der Betulin-Emulsion enthaltenen Triterpene liegen zahlreiche In-vitro- und In-vivo-Untersuchungen vor [6–9]. Der genaue Mechanismus ist bisher allerdings nicht geklärt. Auch hier wurden inhibitorische Effekte auf Prostaglandin und Zytokin vermittelte Re-

aktionen beobachtet [26,27]. Die Untersuchungen zeigen einen inhibitorischen Einfluss der Triterpene auf die Prostaglandinsynthese [28], der durch die Hemmung der Cyclooxygenase 2-Aktivität oder deren Expression vermittelt werden könnte [28–30]. Bei der Beeinflussung der Zytokinsynthese durch Triterpene ist der für die Expressionsregulation verschiedener Zytokine verantwortliche Transkriptionsfaktor NF- κ B in den Fokus gerückt [31]. NF- κ B gilt als interessantes Target im Bezug auf die Entzündungsreaktion, u.a. da es auch bei der Expression von Cyclooxygenase 2 eine Rolle spielt. Ein klares Bild der Triterpenwirkung auf die unterschiedlichen Entzündungsmediatoren ist noch nicht gegeben. Die bisher kontroversen Daten lassen vermuten, dass die Wirkung durch das jeweilige Milieu beeinflusst wird.

Aufgrund der vorliegenden Untersuchungen empfehlen sich Betulin-Emulsionen für die Behandlung trockener und empfindlicher Haut mit gestörter epidermaler Barrierefunktion. Neben der regenerativen Wirkung muss der anti-entzündliche Effekt betont werden.

Abstract

Regenerative and Anti-Inflammatory Effects of Betulin-Emulsions on Defective Epidermal Barrier

Betulin emulsions are emulsifier-free water/oil emulsions which can be used on dry, sensitive skin with a damaged epidermal barrier function. After experimental damage of the skin barrier by means of a repetitive washing procedure with 0.1% sodium lauryl sulphate (SLS) solution, the effect of betulin emulsion, compared with that of aqueous hydrophilic cream NRF, on the regeneration of the damaged skin barrier and its accompanying inflammatory irritation was investigated. After one week's application, compared with untreated skin, there was a significant increase in the hydration of the stratum corneum at the same time as a reduction of the transepidermal water loss. These results were comparable with those of the aqueous hydrophilic cream NRF tested in the same way as a control. Only with betulin emulsions was it possible to obtain a positive influence on the accompanying inflammatory reaction induced by the washing test, which can be documented as a rise in corial blood flow. We were able to demonstrate a significantly quicker normalisation of blood flow with the two betulin emulsions tested, compared with the untreated areas and those treated with the aqueous hydrophilic cream NRF. From this, we conclude that betulin emulsions have an anti-inflammatory effect, which clearly distinguishes them from the preparation used for comparison. On the basis of the demonstrated regenerative and anti-inflammatory effect of the betulin emulsions investigated, a new alternative is offered for application in skin care and skin protection in cases of reduced epidermal barrier function.

Literatur

- 1 Daniels R, Laszczyk MN. Betulin für tensidfreie Emulsionen. Pharm Ztg 2008; 11: 34–36
- 2 Laszczyk M, Jäger S, Simon-Haarhaus B, Scheffler A, Schempp CM. Physical, chemical and pharmacological characterization of a new oleogel-forming triterpene extract from the outer bark of birch (betulae cortex). Planta Med 2006; 72: 1389–1395
- 3 Weigenand O, Hussein AA, Lall N et al. Antibacterial activity of Napthoquinones and triterpenoids from euclea natalensis root bark. J Nat Prod 2004; 67: 1936–1938

- 4 *Kuiate JR, Mouokeu S, Wabo HK, Tane P.* Antidermatophytic triterpenoids from *Syzygium jambos* (L.) Alston (Myrtaceae). *Phytother Res* 2007; 21: 149–152
- 5 *Alakurtti S, Makela T, Koskimies S, Yli-Kauhahuoma J.* Pharmacological properties of the ubiquitous natural product betulin. *Eur J Pharm Sci* 2006; 29: 1–13
- 6 *de la Puerta R, Martinez-Dominguez E, Ruiz-Gutierrez V.* Effect of minor components of virgin olive oil on topical antiinflammatory assays. *Z Naturforsch [C]* 2000; 55: 814–819
- 7 *Fernandez MA, de las Heras B, Garcia MD, Saenz MT, Villar A.* New insights into the mechanism of action of the anti-inflammatory triterpene lupeol. *J Pharm Pharmacol* 2001; 53: 1533–1539
- 8 *Manez S, Recio MC, Giner RM, Rios JL.* Effect of selected triterpenoids on chronic dermal inflammation. *Eur J Pharmacol* 1997; 334: 103–105
- 9 *Recio MC, Giner RM, Manez S et al.* Investigations on the steroidal anti-inflammatory activity of triterpenoids from *Diospyros leucomelas*. *Planta Med* 1995; 61: 9–12
- 10 *Galgon T, Wohlrab W, Dräger B.* Betulinic acid induces apoptosis in skin cancer cells and differentiation in normal human keratinocytes. *Exp Dermatol* 2005; 14: 736–743
- 11 *Gloor M, Hauth A, Gehring W.* O/W-Emulsions Compromise the Stratum Corneum Barrier and Improve Drug Penetration. *Pharmazie* 2003; 58: 709–715
- 12 *Maihol C, Lauwers-Cances V, Rancé F, Paul C, Giordano-Labadie F.* Prevalence and risk factors for allergic contact dermatitis to topical treatment in atopic dermatitis: a study in 641 children. *Allergy* 2009; im Druck:
- 13 *Branco N, Lee I, Zhai H, Maibach HI.* Long-term repetitive sodium lauryl sulfate-induced irritation of the skin: an in vivo study. *Contact Derm* 2005; 53: 78–84
- 14 *Gehring W, Gloor M, Kleesz P.* Predictive washing test for evaluation the individual eczema risk. *Contact Derm* 1998; 39: 8–13
- 15 *Gehring W, Gloor M.* Effect of topically applied dexpanthenol on epidermal barrier function and stratum corneum hydration. Results of a human in vivo study. *Drug Res* 2000; 50: 659–663
- 16 *Berardesca E.* EEMCO guidance for the assessment of stratum corneum hydration: electrical methods. *Skin Res Tech* 1997; 3: 126–132
- 17 *Nilsson GE.* Measurement of water exchange through skin. *Med & Biol & Eng & Comput* 1977; 15: 209–212
- 18 *Pinnagoda J, Tupker RA, Agner T, Serup J.* Guidelines for transepidermal water loss (TEWL) measurement. *Contact Derm* 1990; 22: 164–178
- 19 *Rogiers V.* EEMCO guidance for the assessment of transepidermal water loss in cosmetic sciences. *Skin Pharmacol Appl Skin Physiol* 2001; 14: 117–128
- 20 *Borelli C, Gassmueller J, Fluhr JW et al.* Activity of different desoximetasone preparations compared to other topical corticosteroids in the vasoconstriction assay. *Skin Pharmacol Physiol* 2008; 21: 181–187
- 21 *Westerhof W, van Hasselt BA, Kammeijer A.* Quantification of UV-induced erythema with a portable computer controlled chromameter. *Photodermatol* 1986; 3: 310–314
- 22 *Bircher A, De Boer EM, Agner T, Wahlburg E, Serup J.* Guidelines for measurement of cutaneous blood flow by laser Doppler flowmetry. *Contact Derm* 1994; 30: 65–72
- 23 *Nilsson GE, Otto U, Wahlberg JE.* Assessment of skin irritancy in man by laser-doppler-flowmetry. *Contact Derm* 1982; 8: 401–406
- 24 *Raab W, Kindl U.* *Pflegekosmetik*. 3. Aufl. Stuttgart: Wissenschaftliche Verlagsgesellschaft, 1999
- 25 *Habashy RR, Abdel-Naim AB, Khalifa AE, Al-Azizi MM.* Anti-inflammatory effects of jojoba liquid wax in experimental models. *Pharmacol Res* 2005; 51: 95–105
- 26 *Bani S, Kaul A, Khan B et al.* Suppression of T lymphocyte activity by lupeol isolated from *Crataeva religiosa*. *Phytother Res* 2006; 20: 279–287
- 27 *Marquez-Martin A, De La Puerta R, Fernandez-Arche A, Ruiz-Gutierrez V, Yaqoob P.* Modulation of cytokine secretion by pentacyclic triterpenes from olive pomace oil in human mononuclear cells. *Cytokine* 2006; 36: 211–217
- 28 *Reyes CP, Nunez MJ, Jimenez IA et al.* Activity of lupane triterpenoids from *Maytenus* species as inhibitors of nitric oxide and prostaglandin E2. *Bioorg Med Chem* 2006; 14: 1573–1579
- 29 *Saleem M, Afaq F, Adhami VM, Mukhtar H.* Lupeol modulates NF- κ B and PI3K/Akt pathways and inhibits skin cancer in CD-1 mice. *Oncogene* 2004; 23: 5203–5214
- 30 *Yun Y, Han S, Park E et al.* Immunomodulatory activity of betulinic acid by producing pro-inflammatory cytokines and activation of macrophages. *Arch Pharm Res* 2003; 26: 1087–1095
- 31 *Takada Y, Aggarwal BB.* Betulinic acid suppresses carcinogen-induced NF- κ B activation through inhibition of I κ B kinase and p65 phosphorylation: abrogation of cyclooxygenase-2 and matrix metalloproteinase-9. *J Immunol* 2003; 171: 3278–3286