

Medizinische Fakultät der Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg

**Effekte verschiedener Emulsionstypen auf die Barrierefunktion des
Stratum corneum**

Dissertation
zur Erlangung des akademischen Grades
Doktor der Medizin (Dr. med.)

vorgelegt
der Medizinischen Fakultät
der Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg

von Pia Dorothea Oltmanns (geb. Gran)

geboren am 9.9.1988 in Köln

Betreuer: apl. Prof. Dr. med. habil. Johannes Wohlrab

Gutachter:

1. Apl. Prof. J. Wohlrab
2. Prof. M. Metz (Berlin)
3. Prof. T. Eigentler (Tübingen)

09.07.2019

06.07.2020

Für meine Familie.

Referat

Ziel der Arbeit war es die Effekte zweier kosmetischer Cremezubereitungen in Abhängigkeit von der Phasenlage (O/W versus W/O) auf die Barrierefunktion der Hornschicht zu untersuchen. Der Schwerpunkt lag dabei insbesondere auf der Validierung des zeitlichen Effektverlaufs sowohl bei Anwendung auf gesunder als auch bei Barriere-geschädigter Haut. Dazu wurde ein Single-Application-Test durchgeführt, dessen Ergebnisse Aussagen zum Effektmaximum ermöglichen sollten. Die Studie verfolgte ein prospektives, monozentrisches, randomisiertes, prüferverblindetes Design und wurde GCP-konform als Kosmetikstudie durchgeführt. Dazu wurden 27 gesunde Probanden rekrutiert, die sich nach Aufklärung und Einverständniserklärung einem Stripping-Verfahren unterzogen, um eine Halbseitenvergleichsuntersuchung zu ermöglichen. Beide Prüfzubereitungen wurden randomisiert aufgetragen und die Ergebnisse der Corneometrie sowie Evaporimetrie nach 10, 20, 30, 40, 50, 60, 90, 120 und 180 Minuten im Vergleich zu Baseline bewertet. Die Ergebnisse zeigten für beide Prüfzubereitungen nach ca. 20 Minuten auf gesunder Haut die stärksten Effekte. Auf gestrippter Haut fanden sich im Vergleich der O/W- und W/O-Emulsion keine relevanten Unterschiede. Die O/W-Emulsion führte allerdings auf geschädigter Haut zu einem verlängerten Effekt. Die Studie macht zudem erwartungsgemäß deutlich, dass die Evaporimetrie im Vergleich zur Corneometrie das sensitivere Messverfahren darstellt. Die bereits nach kurzer Dauer eintretenden Barriere-protectiven Effekte beider Prüfzubereitungen machte die Eigenwirkung des Vehikels deutlich und begründet die Sinnhaftigkeit des Einsatzes derartiger Zubereitungen im Rahmen der Basistherapie chronisch entzündlicher Hauterkrankungen. Relevante Unterschiede lassen sich nur in der Effektdauer mit Vorteilen der O/W-Zubereitung nachweisen. Dies kann durch die stärkeren Okklusionseffekte der lipophilen Rückstandsphase an gesunder und geschädigter Haut erklärt werden. Von praktischer Relevanz ist zudem, dass die Effekte, in Abhängigkeit von der Vorschädigung, nur zwischen 40 und 180 Minuten nachweisbar sind. Es ist also davon auszugehen, dass eine effektive Basistherapie im Rahmen des Therapiemanagement von Hauterkrankungen mehrfach täglich (ca. alle 3 Stunden) erfolgen müsste, was praktisch unrealistisch ist. Zudem wird deutlich, dass für die Bestimmung von kumulativen Effekten nach wiederholter Applikation die Definition des Abstands des Meßzeitpunktes von der letzten Applikation der Prüfpräparate entscheidend für eine Bewertung der Ergebnisse ist.

Oltmanns, Pia Dorothea: Effekte verschiedener Emulsionstypen auf der Barrierefunktion des Stratum corneums, Halle (Saale), Univ., Med. Fak., Diss., 63 Seiten, Jahr 2020

Inhaltsverzeichnis

| | Seite |
|---|-----------|
| Referat | |
| Inhaltsverzeichnis | I |
| Verzeichnis der Abkürzungen und Symbole | IV |
| 1 Einleitung | 1 |
| 1.1 Aufbau der Haut | 1 |
| 1.1.1 <i>Stratum corneum</i> | 3 |
| 1.1.2 <i>Lipide des Stratum corneum</i> | 4 |
| 1.2 Barrierefunktion | 6 |
| 1.2.1 <i>Lipidmembransysteme</i> | 7 |
| 1.3 Hydrierung des Stratum corneum | 9 |
| 1.4 Sensitive Haut | 10 |
| 1.4.1 <i>Sensitive Haut und ihre Barrierefunktion</i> | 11 |
| 1.5 Vehikelsysteme | 11 |
| 1.5.1 <i>O/W-Emulsionen</i> | 11 |
| 1.5.2 <i>W/O-Emulsionen</i> | 12 |
| 1.5.3 <i>Emulgatoren</i> | 13 |
| 1.5.4 <i>Konservierungsstoffe</i> | 14 |
| 1.5.5 <i>Okklusion</i> | 15 |
| 1.5.6 <i>Begründung für die Durchführung der Studie</i> | 15 |
| 2 Zielstellung | 17 |
| 3 Material und Methoden | 18 |
| 3.1 Prüfpopulation | 18 |
| 3.1.1 <i>Rekrutierung</i> | 18 |
| 3.1.2 <i>Einschlusskriterien</i> | 18 |
| 3.1.3 <i>Ausschlusskriterien</i> | 18 |
| 3.1.4 <i>Vorzeitiger Abbruch</i> | 19 |
| 3.1.5 <i>Unerwünschte Wirkungen</i> | 19 |
| 3.2 Untersuchungsmethoden | 20 |

| | | |
|----------|---|----|
| 3.2.1 | <i>Corneometrie</i> | 20 |
| 3.2.2 | <i>Evaporimetrie</i> | 20 |
| 3.2.3 | <i>Umgebungsbedingungen</i> | 21 |
| 3.3 | Prüfpräparate | 21 |
| 3.3.1 | <i>Hersteller</i> | 21 |
| 3.3.2 | <i>Inhaltsstoffe der O/W- und W/O-Emulsion</i> | 21 |
| 3.4 | Studienbeschreibung | 21 |
| 3.4.1 | <i>Studiendesign und Zielparameter</i> | 21 |
| 3.4.2 | <i>Studienablauf</i> | 22 |
| 3.4.3 | <i>Testareale</i> | 22 |
| 3.4.4 | <i>Durchführung des Stripping-Verfahrens</i> | 24 |
| 3.4.5 | <i>Randomisierung und Verblindung</i> | 24 |
| 3.4.6 | <i>Nutzen-Risiko-Abschätzung</i> | 24 |
| 3.5 | Dateneingabe und Datenmanagement | 25 |
| 3.6 | Archivierung | 25 |
| 3.7 | Ethische und rechtliche Aspekte | 25 |
| 4 | Ergebnisse | 26 |
| 4.1 | Biometrische Auswertung | 26 |
| 4.2 | Datenauswertung | 26 |
| 4.2.1 | <i>Probanden</i> | 26 |
| 4.2.2 | <i>Unerwünschte Ereignisse</i> | 27 |
| 4.2.3 | <i>Leerkontrolle</i> | 27 |
| 4.3 | Vergleich O/W- und W/O-Emulsion | 29 |
| 4.3.1 | <i>Corneometrie</i> | 29 |
| 4.3.2 | <i>Evaporimetrie</i> | 32 |
| 5 | Diskussion | 35 |
| 5.1 | Die Wichtigkeit eines SAT für nachfolgende RAT | 35 |
| 5.1.1 | <i>Single-Application-Test (SAT)</i> | 35 |
| 5.1.2 | <i>Repeated-Application-Test (RAT)</i> | 36 |
| 5.2 | Wirkungselemente der Emulsionen | 37 |
| 5.2.1 | <i>Pharmakokinetik der Emulsionen</i> | 37 |
| 5.2.2 | <i>Penetrationswege von Wirkstoffen, Wasser und Lipiden</i> | 38 |
| 5.2.3 | <i>Wirkungen von Emulgatoren</i> | 41 |

| | | |
|----------|---|------|
| 5.2.4 | <i>Wirkung des p-Wertes</i> | 41 |
| 5.3 | Tape Stripping | 43 |
| 5.4 | Sensitive Haut | 46 |
| 5.5 | Messmethoden Corneometrie und Evaporimetrie | 47 |
| 5.6 | Weitere Einflüsse auf das Straum corneum | 49 |
| 6 | Zusammenfassung | 53 |
| | Literaturverzeichnis | 54 |
| | Thesen | 63 |
| | Selbstständigkeitserklärung | V |
| | Erklärung über frühere Promotionsversuche | VI |
| | Tabellarischer Lebenslauf | VII |
| | Danksagung | VIII |

Verzeichnis der Abkürzungen und Symbole

| Abkürzung | Bedeutung |
|--------------|--|
| AE | Adverse Event |
| CHOL | Cholesterol |
| CE | Cornified Cell Envelope |
| CER | Ceramide |
| CRF | Case Report Form |
| CS | Cholesterolsulphat |
| DMARD | Disease modifying anti-rheumatic drug |
| DMSO | Dimethylsulphoxide-Test |
| FFS | Freie Fettsäure |
| FS | Fettsäure |
| GCP | Good Clinical Practice |
| ICH | International Conference on Harmonization |
| LAST | Lactic acid sting test |
| LKP | Leiter der klinischen Prüfung |
| NMF | Natural Moisturizing Factor |
| OTC | Over the counter |
| O/W-Emulsion | Öl-in-Wasser-Emulsion (Hydrolotio) |
| RAT | Repeated Application Test |
| SAE | Serious Adverse Event |
| SAT | Single Application Test |
| SC | Stratum corneum |
| SL | Stratum lucidum |
| SLS | Sodium lauryl sulphat |
| TEWL | Transepidermal water loss |
| W/O-Emulsion | Wasser-in-Öl-Emulsion (Lipolotio) |
| ZKSD | Zentrum für Klinische Studien Dermatologie |
| A | Jahre |
| Abb. | Abbildung |
| Tab. | Tabelle |

1 Einleitung

Mit trockener Haut ist eine Barrierefunktionsstörung gemeint, deren Pathogenese sehr heterogen ist. Die Barrierefunktionsstörung betrifft vor allem das Stratum corneum, welches funktionelle und sehr differente Veränderungen aufweist. Trockene Haut ist dennoch ein klinisches Symptom. Es tritt einzeln auf oder als Teil einer komplexeren Störung, wie wir sie von Dermatosen kennen. Systemerkrankungen, die einen direkten oder indirekten Einfluss auf die Barrierefunktion haben, können sich ebenfalls durch trockene Haut äußern. Die Funktionsdefizite der Haut sind erworben oder angeboren. Sind sie angeboren, so führen funktionsstrukturelle Veränderungen dazu, dass trockene Haut entsteht. Beispiele dafür sind die Atopische Dermatitis oder die Psoriasis. Weiterhin können Funktionsdefizite unter physiologischen Bedingungen entstehen und sind Hauttyp-assoziiert oder entstehen durch bestimmte exogene physikalische oder chemische Triggerfaktoren.

Möchten wir nun individuell bewerten wie trockene Haut entsteht, ist die Kenntnis der funktionellen Komponenten des SC von Bedeutung.

Das SC bildet ein sehr komplexes System von Membranstrukturen. Diese basieren auf besonderen physikochemischen Eigenschaften. Zur Entstehung von trockener Haut gehört dabei in jedem Fall, dass eine oder mehrere Wasserphasen innerhalb des Systems Defizite aufweisen.

1.1 Aufbau der Haut

Die Haut ist die äußere Begrenzung des menschlichen Körpers. Sie umfasst eine Gesamtfläche von 1,5 – 2 m² und ein Gewicht von 3,5 – 10 kg. Damit ist sie das größte Organ des Menschen (Moll et al., 2016). Gleichzeitig zeigt sie eine Feinstruktur, die einzigartig aufgebaut ist. Diese Feinstruktur befähigt die Haut dazu lebenswichtige Funktionen zu erfüllen. Aufgeteilt werden diese Funktionen in Schutz- und Barrierefunktion. Die Haut bietet den Hauptschutz vor exogenen physikalischen und chemischen Einflüssen sowie vor dem Eindringen mikrobieller Erreger. Dazu realisiert sie einen Schutz vor exzessivem Wasserverlust. Um diese Schutzfunktionen zu erfüllen verfügt die Haut über eine physikalische, chemische/biochemische und eine adaptiv immunologische Barriere. Einzelne Funktionsbereiche basieren auf Besonderheiten des strukturellen Aufbaus der Haut. Daran hat die äußerste Schicht, das SC, den größten Anteil (Proksch et al., 2008).

Aufgeteilt werden die Hautschichten in Epidermis (Oberhaut), Dermis (Lederhaut) und Subkutis (Unterhaut). In die Haut sind Hautanhangsgebilde (Adnexen) wie Schweißdrüsen,

Talgdrüsen, Haare und Nägel integriert (Neubert et al. 2001b). Diese sind verantwortlich für die Austauschfunktionen Wärmeabgabe und Wasserabgabe. Die Haut ist zudem für den Tastsinn verantwortlich. Dafür besitzt sie different spezialisierte Rezeptorstrukturen (Meissner-Körperchen, Pinkus-Haarscheiben, Pacini- und Ruffini-Körperchen), die unterschiedlich schnell von verschiedenen Lokalisationen aus ihre Rezeptorqualitäten entfalten. Der Temperatursinn wird dabei über Wärme- und Kälterezeptoren realisiert, das Schmerzempfinden über Nozizeptoren (Moll et al., 2016).

Die Subcutis besteht aus subkutanem Fettgewebe und ist eingebettet in bindegewebige Septen. Hier befinden sich einzelne Lymphgefäße und in Bündeln angeordnete Venen, Arterien und Nerven. Die Hautanhangsgebilde reichen bis in die Subkutis hinein (Kerl and Audring, 2003). So dient die Subcutis der Wärmeisolierung, als mechanisches Schutzpolster und als Energiespeicher. Über die bindegewebigen Septen kommuniziert sie mit der Dermis (Fritsch, 2009).

Die Dermis wird vor allem aus kollagenem und elastischem Bindegewebe gebildet. Dieses ist eingebettet in eine mukopolysaccharide Grundsubstanz zusammen mit Bindegewebszellen wie Fibroblasten, Histozyten und verschiedenen ortsständigen Entzündungszellen wie z.B. Mastzellen, Lymphozyten und dendritische Zellen. Hier liegen weiterhin Gefäße, Talg- und Schweißdrüsen, glatte Muskulatur und Haarbälge. Aufgeteilt wird die Dermis in das Stratum reticulare und das Stratum papillare. Die tiefere retikuläre Dermis steht mit der Subcutis in Verbindung. Sie beinhaltet die Anastomosen des Gefäßplexus, der bis in das Stratum papillare hineinreicht. Das lockere Bindegewebe der papillären Dermis mit seinen dermalen Papillen spielt eine wichtige Rolle bei Entzündungsprozessen der Haut (Kerl and Audring, 2003; Neubert et al. 2001b).

Die Dermo-epidermale Junctionszone (Basalmembranzzone) befindet sich zwischen Dermis und Epidermis. Sie ist äußerst komplex aufgebaut, da sie zum einen für die mechanische Festigkeit verantwortlich ist und zum anderen für Elastizität sorgt. Sie kontrolliert weiterhin den Austausch von Zellen und Molekülen zwischen den Geweben und versorgt damit die gefäßfreie Epidermis mit Nährstoffen (Braun-Falco et al., 2005; Moll et al. 2016).

Mehr als 90 % der Epidermis bestehen aus Keratinozyten, die sich im Verlauf zu Korneozyten umwandeln (Fritsch, 2009). Die weiterhin in der Epidermis vorhanden Melanozyten schirmen die Haut vor ultravioletter Strahlung durch die Bildung von Melanin ab. Langerhans-Zellen (Antigen-präsentierende Zellen) bieten immunologischer Schutz und Merkel-Zellen dienen durch ihre Mechanorezeptoren als Sinnesorgan. Der Einfluss von Sonnenlicht sorgt für die Synthese von Vitamin D3 (Junqueira and Mayerhofer, 2005).

Die Epidermis schließlich gliedert sich in verschiedene Schichten: Stratum basale, Stratum spinosum, Stratum granulosum und als äußerste Schicht das Stratum corneum (Welsch et al., 2014). Der Desquamationsprozess der 30 - 160 µm dicken Epidermis dauert in etwa 28 - 30 Tage (Neubert et al. 2001b).

Das Stratum basale besteht aus kleinen, zylindrischen Zellen, die mit der dermoepidermalen Junktionszone über Hemidesmosomen verbunden sind. Hier findet die Zellteilung statt. Die Tochterzellen differenzieren sich weiter zum mehrlagigen Stratum spinosum. Dabei wird das Zytoplasma größer, die Syntheseaktivität steigt an und sie nehmen eine stachelzellartige Form an. Im Weiteren flachen die Zellen ab, sodass im Stratum granulosum die Umwandlung zu kernlosen Korneozyten von statten geht. Die stark abflachende Form der Zellen wird durch eine bestimmte Anordnung von Filaggrin und Keratin realisiert. Die Zellen des Stratum granulosum bilden lipidhaltige Granula (Odland-Körperchen). Diese werden bei Bedarf an das Stratum Corneum zur Regeneration der Barriere abgegeben. Verbunden sind die Korneozyten über barrierebildende Desmosomen und gap junctions (Kerl and Audring, 2003, Fritsch 2009).

1.1.1 Stratum corneum

Das Stratum corneum wird häufig als Zwei-Kompartiment Model oder „Brick and Mortar Model“ beschrieben. Dabei stellen die Korneozyten als terminal differenzierte Zellen die sog. Ziegel und die umgebende Lipidmatrix den Mörtel der Ziegelsteinmauer dar. Verbunden sind die Korneozyten untereinander durch Korneodesmosomen (Elias, 1983). Diese sind ein Teil der Barrierefunktion. Sie werden im Laufe des Desquamationsprozesses abgebaut, damit die Korneozyten sich lösen können. Die Korneozyten selber haben eine hexagonale Form mit einem Durchmesser von 30 – 40 µm und einer Breite von 0.3 – 1 µm. Diese anukleären, terminal differenzierten Zellen sind gefüllt mit Keratin, Filament-assoziiertem Filaggrin, Natural Moisturizing Factor (NMF) sowie weiteren Proteinen (Björklund et al., 2014; Garidel et al., 2010). Um die Korneozyten befindet sich das Cornified Cell Envelope (CE), das aus einer Proteinhülle und einer Lipidhülle besteht. Die Proteinhülle ist ein festes Konstrukt aus unterschiedlichen Proteinen (Involucrin, Loricrin, Envoplakin, Periplakin und kleinen Prolinreichen Proteinen). Durch die Transglutaminase 1 werden diese Proteine über sehr stabile Isopeptidbrücken verbunden. Das Besondere der Proteinhülle ist die sehr geringe Wasserdurchlässigkeit. So liegt der größte Anteil des Wassers in den Korneozyten gebunden vor. Um die Proteinhülle bildet sich eine Lipidhülle. Diese besteht aus nichtveresterten ω-Hydroxyceramiden. Sie sind kovalent an die Proteinhülle gebunden und dienen als Baugerüst für extrazelluläre Lipidschichten. Dafür überziehen sie die Korneozyten und verbinden sich mit

den interzellulären Lipidlamellen (Nishifuji and Yoon, 2013; Ananthapadmanabhan et al., 2013; Janssens et al., 2009). Umgeben sind die Kerneozyten von einer multilamellaren Lipidmatrix. Diese besteht aus Ceramiden, Cholesterin, Cholesterinderivaten, Triglyceriden sowie freien und gebundenen Fettsäuren (FS). Gebildet werden die Lipide in der nukleären Epidermis. Im Stratum spinosum und Stratum granulosum werden sie durch den Golgi-Apparat zu sog. „lamellar bodies“ (Odland-Körper) verpackt. Während der Keratinozytendifferenzierung bewegen sich diese „lamellar bodies“ Richtung Apex der granulären Zellen, verschmelzen mit der Plasmamembran und sezernieren ihren Inhalt in den extrazellulären Raum zwischen Stratum granulosum und Stratum corneum. Diese formieren sich schließlich zu Lipiddoppelmembranen und bilden das morphologische Äquivalent der physikalischen Barrierefunktion des Stratum corneum (Nishifuji and Yoon, 2013).

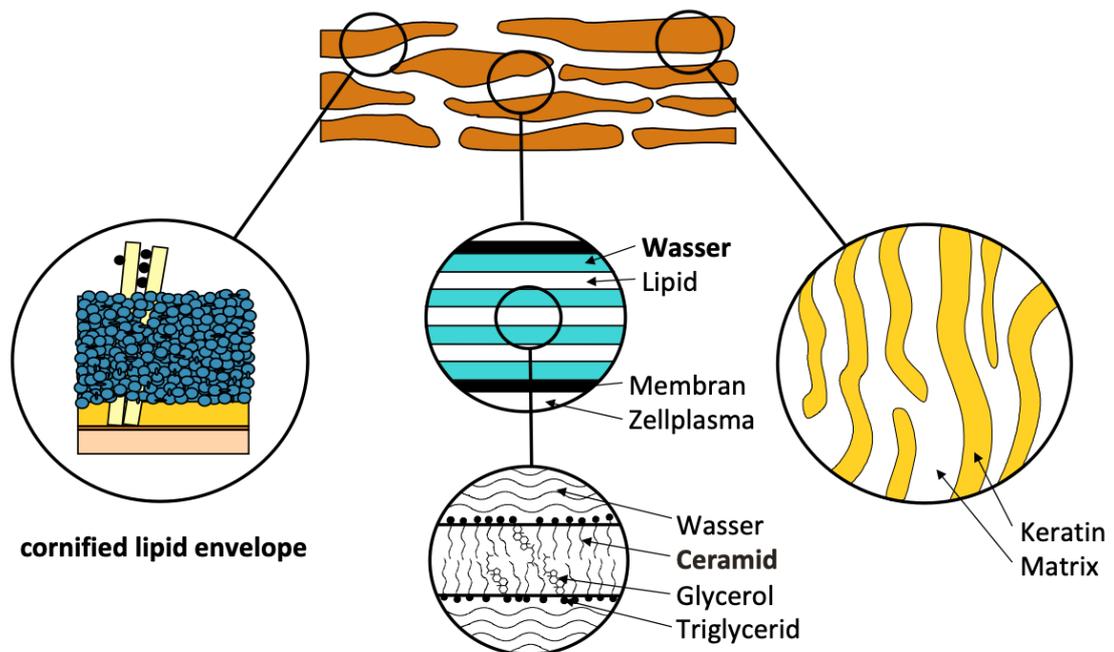


Abb. 1 : Darstellung des Stratum corneum

1.1.2 Lipide des Stratum corneum

Die Lipide des SC werden zusammengesetzt aus ca. 50% Ceramiden (CER), 25% Cholesterol (CHOL) und Cholesterol-Derivaten, ca. 15% aus freien Fettsäuren (FFS) und an Glycerin gebundene FS sowie ca. 10% Cholesterolester (Ananthapadmanabhan et al., 2013).

Daraus wird deutlich, dass die Hauptgruppe der Lipide aus CER zusammengesetzt wird, die für den Aufbau der Hautbarriere verantwortlich sind. Mittlerweile wurden eine Vielzahl von CER

und deren Variationen entdeckt, deren einzelne Funktionen größtenteils unbekannt sind (t'Kindt et al., 2012). CER bestehen aus einer Sphingoidbase und einer FS, die über eine Amidverbindung verbunden sind (Farwanah et al., 2005). Um die CER einteilen und beurteilen zu können, hat Motta et al. 1993 eine Nomenklatur erarbeitet, die bis heute Gültigkeit besitzt. Eingeteilt werden CER hierbei nach ihrer Sphingoidbase und ihrer FS. Die Einteilung erfolgt anhand von Buchstaben. Damit gibt die Kombination der Buchstaben die Zusammensetzung der CER wieder. Die Sphingoidbasis wird aufgeschlüsselt in S = Sphingosin, P = Phytosphingosin, H = 6-Hydroxysphingosin, DS = Dihydrosphingosin und die Fettsäuren werden eingeteilt in A = α -Hydroxyfettsäure, N= Nicht Hydroxyfettsäure und O = ω -Hydroxyfettsäure. Zusätzlich kann Linolsäure verestert an der ω -Hydroxyfettsäure vorkommen. In diesem Fall werden die Verbindungen um ein E erweitert. Kombiniert kommen so z.B. CER [AP] (α -Hydroxyfettsäure verbunden mit einem Phytosphingosin) oder verestert CER[EOS], CER [EOH] und CER [EOP] vor (Motta et al., 1993). Ergänzt wurde diese Nomenklatur durch Rabionet et al. Sie benannten das T für Dihydroxy-Sphinganine und entdeckte die 1-O-Acylceramide (1-O-ENS und 1-O-EAS), die sowohl an der N- als auch 1-O-Position lange bis sehr lange Acylketten tragen. Diese CER bilden möglicherweise Blöcke in den extrazellulären Lipidlamellen und können zu deren Stabilität beitragen. Da diese CER die meisten hydrophoben Eigenschaften der Epidermis aufweisen, haben sie zusätzlich einen Einfluss auf die Wasserpermeabilität des SC. Weiterhin definierte Rabionet et al. die CER, die an der Proteinhülle des CE der Korneozyten über eine ω -Hydroxyfettsäure gebunden sind, durch ein P. Geschrieben wird es vor die Base und die Fettsäurekette. Sie dienen als Ausgangspunkt der Bildung von Lipidschichten im SC (Rabionet et al., 2013, 2014). Wir kennen mittlerweile 3 kovalent gebundene CER auf der Korneozytenoberfläche: ω -Hydroxyacylsphingosine (CER [POS]), ω -Hydroxyacyl-6-Hydroxysphingosine (CER [POH]) und ω -Hydroxyacylphytosphingosine (CER [POP]) (Hill et al., 2006). Alle ω -Hydroxyceramide des Lipidvelopes sind mit den Proteinen des CE kovalent über ihre ω -Hydroxylgruppe verbunden. Durch die gebundenen Lipide entsteht eine komplette Lipidmonoschicht auf der Oberfläche jedes Korneozyten. Die sehr langen Ketten der CER sind dabei so angeordnet, dass sie eine Wasserbarriere um jeden Korneozyten bilden (Moore and Rawlings, 2017). Nicht nur die Ceramidsubklassen, sondern auch die Kettenlängen der Ceramide (C14 - C32) spielen bei der Barrierefunktionalität durch ihre Verankerung und Stabilisierung in den Lipidschichten eine wesentliche Rolle (van Smeden et al., 2014).

CHOL modifiziert, wie in jeder Phospholipidmembran, die Eigenschaften der SC-Membranen. Es dient bei starker Fluidität zur Stabilisierung und verhilft einer rigiden Membran zu mehr Fluidität. CHOL kann nicht nur frei, sondern auch an FS verestert oder als essenzielles

Sterolderivat vorkommen (Ananthapadmanabhan et al., 2013). Zu den Sterolderivaten gehören CHOL, Cholesterolsulfat (CS) und Sterolester. Eine besondere Bedeutung besitzt hierbei das amphipathische, polare Lipid CS, das nur in einer geringen Menge im SC enthalten ist (2-5%). Es moduliert zusammen mit Kalzium den Desquamationsprozess, die Kohäsion, das Mischungsverhältnis der Lipide, die Lipidordnung, das Phasenverhalten der Lipide und damit die Barrierepermeabilität (Lampe et al., 1983; Arseneault and Lafleur, 2007). CS und Kalzium dienen beispielsweise als Gegenspieler bei der Ausschüttung lipidgefüllter Vesikel im Stratum granulosum, wobei Kalzium die Ausschüttung initiiert und CS Kalzium inhibiert (Arseneault und Lafleur, 2007). Zudem wurde eine regional unterschiedliche Verteilung von Sterolen beschrieben. Es zeigte sich, dass plantar mehr freie Sterole vorkommen als an Beinen, Gesicht oder Abdomen (Lampe et al., 1983). Welche Bedeutung dies für die Barrierefunktion, Lipidbiosynthese und vieles mehr hat, ist bisher unklar.

Im SC befinden sich FFS sowie gebundene FS in Triglyceriden, Phospholipiden, Glycosylceramiden und CER. Die Kettenlängen variieren von C12 bis C24. Gesättigte und einfach gesättigte FS werden in der Epidermis gebildet. Ungesättigte FS müssen mit der Nahrung aufgenommen werden (Proksch et al., 2008). Am häufigsten kommen im SC FFS mit einer Kettenlänge von 22, 24 und 26 Kohlenstoffatomen vor (Oguri et al., 2014). ω -Hydroxyceramide weisen eine Fettsäurekettenlänge von C30 - C34 auf, da sie zusätzlich über ihre ω -Hydroxygruppe mit Linolsäure (C18:2) verestert sind (Lampe et al., 1983). Besonders die veresterte Linolsäure scheint ein wichtiger Baustein bei der Bildung von multilamellaren Membranen zu sein, da sie durch ihre lange Fettsäureketten als Verankerung in den verschiedenen Membranen dienen kann (Feingold und Elias, 2014).

Im Gegensatz zu Zellmembranen spielen Phospholipide für den Aufbau der Barriere des SC eine untergeordnete Rolle. Sie werden über „lamellar bodies“ sezerniert und anschließend durch eine Phospholipase zu FFS und Glycerol gespalten. Die gespaltenen FFS tragen zum sauren pH-Wert des SC (pH von 5-5,5) und damit zur Regulation der Aktivität einiger Schlüsselenzyme bei. Das Glycerol sorgt als hygroskopische Substanz für die Befeuchtung der Haut, reguliert die epidermale DNA-Synthese und inhibiert darüber hinaus Inflamationsprozesse (Feingold und Elias, 2014).

1.2 Barrierefunktion

Die fortlaufenden lamellaren Doppelschichten der meisten biologischen Membranen bestehen aus Lipiden, die sich vorwiegend in flüssigkristallinen Zustand befinden. In diesem Zustand zeigen die Lipidketten eine deutliche Unordnung der intramolekularen Konformation, wodurch

eine laterale Beweglichkeit in der Ebene ermöglicht wird. Diese aliphatisch flüssigkristalline Formgebung der Lipide kann dabei auch reversibel in die lamellare Gel-phase übergehen. In dieser Gel-Phase zeigen die Lipidketten eine full-extended all-trans Konformation auf, wodurch sie eine 2-dimensionale hexagonale Anordnung einnehmen. Diese erlaubt einen begrenzten Rotationsfreiraum entlang der Kettenachse.

Gesättigte lange Lipidketten können sich auch in lamellaren Doppelschichten anordnen. Sie nehmen durch ihre Konformation eine 2-dimensionalen orthorhombischen Anordnung an, die sehr dicht und kristallin ist. Auch sie besitzen einen Rotationsfreiraum (Moore and Rawlings, 2017).

Auf biochemischer Ebene sind zwei Eigenschaften wichtig für die Ausbildung des flüssigkristallinen Zustandes: die Anisotropie und die Fließfähigkeit. Die Anisotropie erreichen die Lipide über ihre hydrophile Kopfgruppe und lipophilen Ketten, die Fließfähigkeit über ihre 2-dimensionale Anordnung. Eine Besonderheit der CER im SC sind die variablen Konformationsstellungen der Lipidketten (hairpin-, full-extended sowie V-Konformation) sowie die sehr langen Ketten durch ω -veresterte Linolsäure. Dies bedingt die Option der Ausbildung multilamellarer Membranen (Kiselev et al., 2005, 2007; Small, 1984).

1.2.1 Lipidmembransysteme

Die Forschung der Lipidmembranen ist bis heute abhängig von geeigneten Untersuchungsmethoden. So war die Entdeckung der Gefrierbruchmikroskopie 1973 ein großer Meilenstein. Endlich konnte man ein hochgeordnetes multilamellares System im Interzellularraum bildlich darstellen (Breathnach et al., 1973). Rutheniumtetroxid (RuO₄) als Fixierungsagens brachte eine trilamellare Wiederholungseinheit mit Broad-Narrow-Broad-Sequenzen im elektronenmikroskopischen Bild zum Vorschein (Madison et al., 1987). Diese Erkenntnis führte zur Entstehung des ersten Lipidmembranmodells.

Swartzendruber et al. formulierte 1989 das Stacked Monolayer Model. Es beschreibt eine lamellare molekulare Anordnung für die interzelluläre Lipidmatrix des SC. Das erstmals Besondere war, dass sie von einem ineinandergreifen der Alkylketten der CER durch eine langgestreckte ausgebreitete Kettenkonformation ausgingen. Zwei Doppelmembranen sind nach diesem Modell durch eine halbe Doppelmembran über ihre Alkylketten verbunden. Weitere Lipide wie CHOL ordnen sich durch ihre hydrophilen und lipophilen Anteile, wie in bekannten Phospholipidmembranen, an. Diese Lipidorganisation erklärte die interzelluläre Broad-Narrow-Broad Anordnung, die elektronenmikroskopisch beschrieben wurde (Swartzendruber et al., 1989).

Erste Erkenntnisse über Lipide und Lipidzusammensetzungen zeigten sich Anfang der 90er Jahre in der Röntgen-Weitwinkel-, (Wide Angle X-ray Scattering-WAXS) und Röntgen-Kleinwinkeldiffraktion (Small Angle X-ray Scattering-SAXS) in Tierexperimenten (Pilgram et al., 1999). Dies führte zu einem weiteren Lipidmembranmodell.

Forslind et al. formulierten 1994 das Domain Mosaik Model. Sie gingen, im Gegensatz zu Swartzendruber et al., von multilamellaren Lipiddoppelmembranen aus, die ein 2-Phase-System aufbauen. Bisher wurde von einem kontinuierlichen flüssig-kristallinen Zustand ausgegangen. Die langen Fettsäureketten der Lipide waren jedoch mit diesem Zustand nicht vereinbar. So gingen sie davon aus, dass diskontinuierliche lamellare kristalline Domänen in die kontinuierliche flüssigkristalline Domäne eingebettet sind. Diese Strukturen werden umgeben von sogenannten „gain borders“, die aus Lipiden im flüssig kristallinen Zustand bestehen. Diffusion von hydrophilen und hydrophoben Substanzen durch die Barriere wird durch den fluiden Charakter der „gain borders“ ermöglicht (Forslind, 1994).

Bouwstra et al. zeigten durch das Einsetzen von humanem SC die Bedeutung von CER [EOS] und freien Fettsäuren für den Membranaufbau. Daraus entstand das Sandwich Model. Hier befinden sich die Domänen in separaten Schichten mit einer dreischichtigen Anordnung, entsprechend der Broad-Narrow-Broad Sequenzen. Eine flüssige Schicht befindet sich mittig. Sie wird gebildet durch ungesättigte Linolsäurehälften der Acylceramide (CER [EOS], CER [EOP], CER [EOH], CHOL). Die zwei Nachbarschichten zeigen kristalline Eigenschaften auf. Diese kristallinen Eigenschaften steigen graduell mit dem steigenden Anteil weniger mobiler, langer und gesättigter Hydrokarbonketten der Lipide. Substanzen, die das SC penetrieren, müssen zuerst die kristallinen Lipidschichten passieren. Durch diese dick verpackten Lipidregionen können sie jedoch nur zum Teil diffundieren. Dieser Effekt beeinflusst die Barriereigenschaften (Bouwstra et al., 2000).

Nachfolgend gab das Domain Mosaik Model von Forslind et al. Norlen den Anlass zur Entwicklung eines weiteren Modells. Das Single-gel-phase-model postuliert, dass die Hautbarriere durch eine einfach kohärente lamellare Gelstruktur im interzellulären Raum des SC gebildet wird. Die Barrierestruktur zeigt keine Phasenseparation, weder zwischen flüssigkristallin und Gelphasen noch zwischen verschiedenen kristallinen Phasen mit hexagonaler und orthorhombischer Kettenanordnung. Die einfache Lipidstruktur besitzt durch die dichte Anordnung der einzelnen Lipide einen geringen Wasseranteil, einen niedrigen Grad an Beweglichkeit und eine niedrige Wasserpermeabilität. Dieses Model bezieht als einziges eine full-extended Konformation der CER mit ein (Norlen, 2001).

Seit 2004 werden Röntgendiffraktionsstudien mit synthetischen CER durchgeführt um eine bessere Struktur-Wirkungs-Beziehung herauszufinden. Mittlerweile wird die

Neutronenstreuung (bekannt aus der Untersuchung mit Phospholipidmembranen) auch auf die Lipidmembransysteme angewandt, mit dem Vorteil der Berührungsfreiheit und der besseren Analyse der inneren Struktur der multilamellaren Membranen (Kucerka et al., 2004). Dass die CER wesentlich zum Membranaufbau beitragen und je nach Wassergehalt unterschiedliche Konformationen einnehmen können, erkannten auch Kessner und Kiselev als sie ein unabhängiges Modell entwickelten: das Amature reinforcement Modell. Dabei kommt dem Wassergehalt eine entscheidende Aufgabe bei der Konformationsänderung zu. Bei geringer intermembranärer Hydratation liegen die CER in full-extended Konformation vor und können so die unterschiedlichen Lipidschichten verbinden. Bei einem Wasserüberschuss kommt es durch die sog. Chain-flip-transition zur Hairpin-Konformation (Kessner et al., 2008). Diese unterschiedlichen Membranmodelle zeigen die Komplexität des SC auf, machen aber auch gleichzeitig deutlich, dass alle bekannten Aspekte der physikochemischen Interaktionen durch keines der Modelle ausreichend wiedergegeben werden. Dieser Umstand legt die Vermutung nahe, dass die tatsächlichen Verhältnisse deutlich heterogener sind, als bislang vermutet wurde.

1.3 Hydrierung des Stratum corneum

Eine der wichtigsten Funktionen von Wasser im SC ist die Beeinflussung vieler hydrolytischer, enzymkatalysierter Prozesse, die für eine normale Desquamation notwendig sind. Sinkt der Wasseranteil unter ein kritisches Level, führt dies zu Korneozytenadhäsion und -akkumulation auf der Hautoberfläche. Dies ist erkennbar an trockener, rauer Haut. Die Hauptfraktion des Wassers liegt intrakorneozytär, mit Keratin interagierend vor (Verdier-Sévrain und Bonté, 2007). Weiteres intrazelluläres Wasser ist an NMF (Natural Moisturizing Factor = Abspaltprodukt des Filaggrins) und extrazellulären wasserbindenden Komponenten wie Zucker, Hyaluronsäure, Urea und spezifische Laktate gebunden (Rawlings und Harding, 2004). Gebildet wird Filaggrin in der Epidermis, während die anderen Komponenten in Schweißdrüsen (z.B. Urea) und Talgdrüsen (z.B. Triglyceride/ Glycerin) produziert werden (Verdier-Sévrain und Bonté, 2007). Viele Faktoren beeinflussen den NMF-Gehalt des SC und damit den Wassergehalt: tägliche Reinigung, Trockenheit, UV-Strahlung sowie Alter (Verdier-Sévrain und Bonté, 2007). Es ist weithin bekannt, dass die SC-Hydrierung in Relation zum Transepidermalen Wasserverlust (TEWL = transepidermal water loss) steht. Somit kann der TEWL als Parameter der Barrierefunktion gelten. Hoher TEWL zeigt eine niedrige Hydrierung des SC an (Proksch et al., 2008). Daraus lässt sich schlussfolgern, dass die Barrierefunktion von der Wasserhydrierung

abhängt. Weitere mögliche Faktoren, die die Barrierefunktion beeinflussen, sind der pH-Wert und die Temperatur, da diese Faktoren auch die Verteilung des Wassers beeinflussen.

1.4 Sensitive Haut

Eine allgemein akzeptierte Definition der sensitiven Haut existiert bis heute nicht. Die Kosmetikindustrie definierte Sensitive Haut als Hauttyp, der Probleme nach Benutzung von Kosmetika entwickelt. Sensitive Haut kann aber auch als subjektives Symptom definiert werden, das ein stechendes, brennendes oder juckendes Missempfinden ohne prävalente Hautläsionen nach variablen Stimuli einbezieht. Oder es wird als objektiver Begriff mit subjektiven Symptomen definiert, gefolgt von Erythema, Quaddeln, Papeln, Vesikeln, Pusteln oder Narben. Allerdings werden die Hautläsionen oft als allergische Kontaktdermatitis, irritative, seborrhoische oder atopische Dermatitis diagnostiziert (Cho et al., 2012). Die genannten Symptome sind alle sehr unspezifisch. Sie werden assoziiert mit dem Menstruationszyklus und weiteren Triggern wie Wetter, Klimatisierung, Reinigungsprodukten, Körperpflegeprodukten oder Kleidung. Epidemiologische Daten zeigen eine hohe Prävalenz von eigener wahrgenommener Sensitiver Haut in der ganzen industrialisierten Welt (Berardesca et al., 2013). Die geschätzte Prävalenz in Japan, Europa und United States beträgt 50% bei Frauen und 30% bei Männern (Escalas-Taberner et al., 2011). Aufgrund des schwer definierbaren Zustandes der Haut ist eine Diagnostik nur beschränkt möglich. Unterschiedliche Test-Verfahren wurden dazu eingesetzt: Stinging Test, LAST (Lactic acid sting test), Capsaicin stinging test, DMSO-Test (Dimethylsulphoxide-Test), Nicotinate und Sodium lauryl sulphate (SLS) occlusion test, Evaluation von Juckreiz, Waschen und übertriebenen Immersions Test, Behind-the-knee-Test (Berardesca et al., 2013). Dennoch gibt es keine standardisierte Methode zur Definition von Sensitiver Haut (Cho et al., 2012). Auch die Pathogenese wird in vielen Aspekten diskutiert: Zum einen wird die Entstehung eines Ungleichgewichts der zellulären Lipide des SC angenommen. Möglicherweise ist es aber auch eine Veränderungen des Nervensystems und/oder Struktur der Epidermis. Eine weit diskutierte Entstehungsursache ist die neurogene Inflammation durch ein Freiwerden von Transmittern wie Substanz P, Calcitonin, vasoaktives intestinales Peptid (VIP) und daraus folgende Vasodilatation mit Mastzelldegranulation. Beschrieben wurde zudem eine unspezifische Entzündungsreaktion durch Interleukine (IL-1, IL-8, Prostaglandin E2, Prostaglandin F2 und TNF- α) sowie eine sensorische Hyperaktivität des Transient receptor potential, vanilloid family 1 (TRPV1) (Berardesca et al., 2013). Exogene Faktoren werden ebenso diskutiert: Kosmetische Formulierungen wie Alkohol, Propylenglycol, Butylenglycol, Cocamidopropylbetaine,

Triethanolamine, Resorcine, Trichloroacetylsäure und α -Hydroxysäure zeigen je nach Konzentration irritative Effekte auf und können zu Sensitiver Haut führen. Weitere exogene Faktoren sind topische Kortikosteroide, UV-Exposition, chirurgische oder nichtchirurgische kosmetische Prozeduren wie Phototherapie, Dermabrasion, Laser Resurfacing oder Facelifts (Escalas-Taberner et al., 2011). Es ergibt sich damit ein heterogenes Erscheinungsbild Sensitiver Haut mit sehr starker individueller Variation.

Um dieses Bild zu sortieren wurde eine Einteilung nach Typus und entsprechenden physiologischen Parametern vorgenommen: Typ I wurde definiert als Gruppe mit geringer Barrierefunktion, während Typ II als Entzündungsgruppe zählt. Sie zeigt eine normale Barrierefunktion und inflammatorische Veränderungen auf. Typ III wird schließlich als pseudogesunde Gruppe vorgestellt mit normaler Barrierefunktion und keinen inflammatorischen Veränderungen (Berardesca et al., 2013). Therapeutische Interventionen sind eine Veränderung der topischen Therapie und ein Benutzen von milden, nicht irritativen Inhaltsstoffen in Kosmetika. Zusätzlich sollten individuelle Triggerfaktoren vermieden werden (Misery et al., 2016).

1.4.1 Sensitive Haut und ihre Barrierefunktion

Verschiedene Studien haben eine Verbindung zwischen Sensitiver Haut und der Störung der epidermalen Barrierefunktion postuliert. Ein Faktor dabei ist die festgestellte verminderte Anzahl an neutralen Lipiden mit vermehrtem Vorkommen von Sphingolipiden. Diese wiederum gehen mit einer verminderten Barriestabilität einher. Es ergibt sich eine gestörte Barriere mit erleichterter Penetration von Reizstoffen oder Allergenen, einen verminderten Schutz von Nervenenden und einem gesteigerten TEWL mit Anzeichen von Trockener Haut. Die gestörte Barrierefunktion wird mit Trockener Haut in Verbindung gebracht und somit einem erhöhten Vorkommen von Atopischer Dermatitis (Misery et al., 2016).

1.5 Vehikelsysteme

1.5.1 O/W-Emulsionen

O/W-Emulsionen sind mehrphasige Systeme, bestehend aus einem grobdispersen System vom Typ flüssig/flüssig. Um eine Dispergierung zu erhalten wird ein Emulgator benötigt, der die Grenzflächenspannung herabsetzt und eine stabile Emulsion ermöglicht. Dafür besitzen Emulgatoren tensidische Eigenschaften mit Anteilen sowohl einer lipophilen als auch einer

hydrophilen Komponente. Klassische Öl-in-Wasser Emulsion zeigen eine Verteilung des Öls als innere offene Phase (dispers) im Wasser als äußere kohärente und geschlossene Phase (Dispersionsmittel). In dieser äußeren Phase löst sich auch der Emulgator. Cremes (oder auch Linimente) sind die dickflüssigen Emulsionen zur äußeren Anwendung. Damit bestehen Öl-in-Wasser Emulsionen meistens aus einem hohen Wasseranteil. Die lipophile Komponente wird typischerweise gebildet aus Triglyceriden (Miglyol), Fettsäureester (z.B. Oleyloleat) und Isopropylpalmitat. Alkylsulphate oder hydrophile nichtionogene Emulgatoren sind typische Emulgatoren. Der hohe Wasseranteil der O/W – Emulsionen führt zu einer Kühlung auf der Haut und lässt sich an bestimmten Körperstellen besser als Cremes anwenden (z.B. Gesicht, behaarte Stellen). In der Kosmetik werden O/W – Emulsionen oft als Hautmilch (oder Lotion) bezeichnet (Korting, 1995; Neubert et al. 2001a).

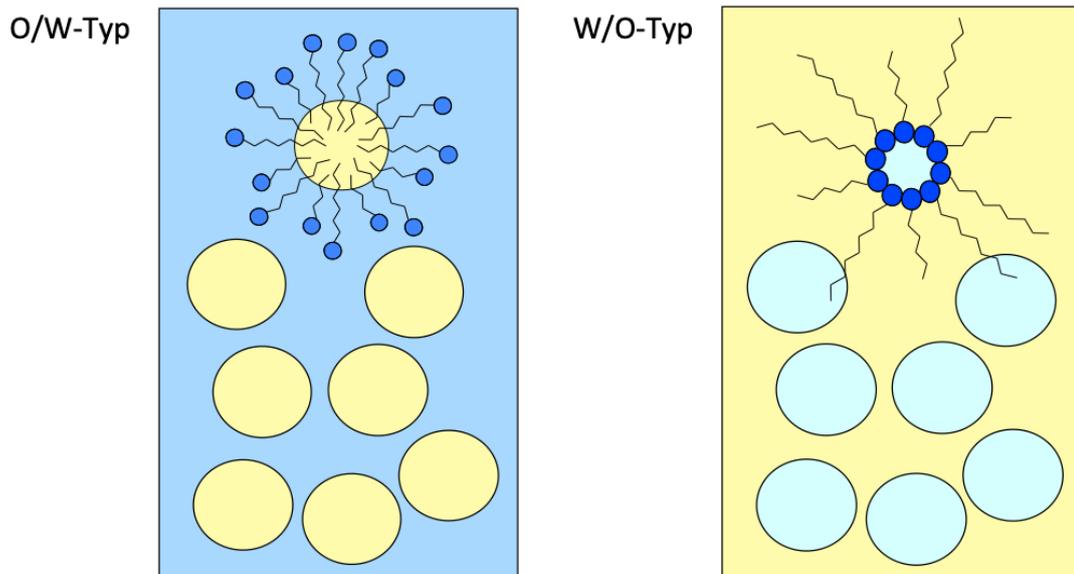
Die Wirkung von O/W-Emulsionen ist vielfach untersucht. Sie können Wasser abgeben, den Hydratationsgrad erhöhen und zu einem geringen Anstieg der Hautpermeabilität führen (Daniels and Knie, 2007). Zudem wirken sie kühlend, lassen sich auf bestimmte Hautareale besser applizieren (z.B. behaarte Haut) und eignen sich bei seborrhoischer Haut. Ihre breite Anwendung entsteht vor allem durch ihre gute Verträglichkeit in allen Stadien eines Ekzems, ein gutes Eindringen in die Haut und ein rasches Abgabevermögen des Wirkstoffs bei einer guten Verfügbarkeit. Kosmetisch entsteht meist keine Rückstandsphase, die als Fettglanz auf der Haut sichtbar wird (Gloor et al., 2000). Weiterhin werden häufig Humectants, wasserbindende Hilfsstoffe wie Glycerol oder/und Harnstoff integriert. O/W-Emulsionen ohne Glycerol zeigen einen geringeren Effekt bezüglich einer Hydratisierung. Vielmehr können sie, insbesondere bei wiederholter Anwendung, eine Barriereirritation oder gar einen Barrieredefekt induzieren. Wird jedoch Glycerol hinzugefügt kommt es zu einer Verringerung dieser negativen Effekte (Gloor, 2004).

1.5.2 W/O-Emulsionen

Hierbei dient das Wasser als Dispers im Dispersionsmittel Öl und die Emulgatoren befinden sich in der Öl-Phase. Bei Wasser-in-Öl-Emulsionen werden oftmals Gemische lipophiler nichtionogener Emulgatoren (Sorbitanfettsäureester, Fettalkohole, Cholesterol, Glycerolfettsäureester u.a.) zur Herstellung verwendet. Die äußere Phase weist dabei eine hohe Viskosität auf und erhöht die Stabilität des Vehikelsystems.

Auch die Wirkung von W/O-Emulsionen sind untersucht worden. Hierbei zeigte sich, dass die Emulsion zu einer Reduzierung des Wasserverlustes, eine Erhöhung des Hydratationsgrads sowie einem Anstieg der Hautpermeabilität führt (Daniels and Knie, 2007). W/O-Emulsionen

sind fettende Salben besonders für trockene Haut. Sie sind nicht abwaschbar und besitzen einen typischen Fettglanz. Zusätzlich enthalten sie häufig Antioxidantien und müssen im Gegensatz zu O/W-Emulsionen nicht zwangsläufig konserviert werden. Ihre rückfettende Wirkung sowie die Erhöhung des Hydratationsgrades begründen den häufigen Einsatz, auch in der Kosmetik (Gloor et al., 2000).



Legende:

gelb = lipophile Anteile der Emulsion, blau = hydrophile Anteile der Emulsion

Abb. 2: Darstellung der Emulsionstypen

1.5.3 Emulgatoren

Emulgatoren sind grenzflächenaktive Substanzen, die sich bevorzugt an der Grenzfläche zwischen Öl- und Wasserphase aufhalten und damit die Grenzflächenspannung reduzieren. Sie erleichtern damit schon in niedrigen Konzentrationen die Emulsionsbildung und verbessern die Stabilität der Emulsion. Die Bancroft-Regel besagt, dass diejenige Phase zur äußeren, kontinuierlichen Phase wird, in der sich der Emulgator bei der Dispersion besser löst (Korting and Sterry, 2001).

Emulsionssysteme können allein stabil sein, wenn zumindest eine Lipidkomponente selbst Emulgatoreigenschaften hat wie dies z.B. bei Wollwachs bzw. Wollwachsalkoholen, mit den Inhaltsstoffen Stearylalkohol bzw. Cholesterol, der Fall ist. Das fettlösliche Cholesterol ist farb- und geruchlos und eignet sich als W/O-Emulgator in Haut- und Haarpflegeprodukten. Ein

weiterer häufig eingesetzter O/W-Emulgator ist Polyethylenglycol (PEG), ein Sorbitanfettsäureester, der besonders verträglich ist.

Die meisten Emulgatoren gehören in ihrem physikochemischen Verhalten zur Stoffklasse der Tenside, die sich durch ihren amphiphilen Charakter auszeichnen. Sie bilden Mizellen oder lamellare Flüssigkristalle und können anhand ihres Ladungszustandes des grenzflächenaktiven Moleküls in anionische, kationische, amphotere und nichtionische Tenside eingeteilt werden.

Die physiologische Verträglichkeit von Emulgatoren hängt primär von der chemischen Struktur ab, insbesondere von der hydrophilen Kopfgruppe. Darüber hinaus sind vor allem die Emulgatoranteile von Bedeutung, die keine Mizellen mehr bilden, da sie im Überschuss vorhanden sind (Korting and Sterry, 2001). In Zusammenhang mit sensibler Haut muss darauf geachtet werden, dass einige Emulgatoren Kontaktallergien hervorrufen können, denen zusätzlich eine mögliche Beeinträchtigung der Barrierefunktion der Haut zugesprochen wird (Korting, 1995). Zu den Emulgatoren, die häufiger als andere zu einer Sensibilisierung führen gehören: Cetylstearylalkohol, Sorbitansesquiöleat, Polyoxyethylensorbitan-Monopalmitat, Polyoxyethylensorbitan-Monoöleat und Amerchol L101 (Tosti et al., 1990). Reines Wollwachs bzw. reine Wollwachsalkohole scheinen kaum eine allergene Potenz zu besitzen (Korting and Sterry, 2001).

1.5.4 Konservierungsstoffe

Konservierungsstoffe haben als wichtige Aufgabe die Begrenzung der Keimentwicklung und damit die Verhinderung von gesundheitlichen Schäden sowie frühzeitigen Verderben der Produkte. Zugelassen sind laut Kosmetik-Verordnung 53 Konservierungsstoffe. Die wichtigsten Substanzen lassen sich einer der folgenden 6 Klassen zuordnen: aliphatische und aromatische Alkohole, Carbonsäuren, Phenole und Phenolderivate, Formaldehyd und Formaldehyd-abbauende Substanzen, quartäre Ammoniumverbindungen, organische Quecksilberverbindungen. Die Aktivität der Konservierungsstoffe hängt von der Konzentration, dem pH-Wert, dem Verteilungsverhalten, der Temperatur und der chemischen Stabilität ab. Um dies zu gewährleisten, muss die Prüfung eines Topikums auf mikrobiologische Stabilität durchgeführt werden. Häufig werden auch Konservierungs-Mischungen eingesetzt, um das Wirkspektrum und die Wirksamkeit zu erweitern. Im Gegensatz zu den unkonserverten Kosmetika gelten konservierungsreife Kosmetika als Kosmetika, deren überwiegende Zweckbestimmung nicht die mikrobiologische Produktstabilisierung ist. Auch die Konservierungsstoffe können allergenes Potenzial besitzen. Zu den allergenen Substanzen gehören u.a. bestimmte Parabene-Derivate, Chlormethylisothiazolinon-Methylisothiazolinon-Mischungen, Thiomersal und Formaldehyd.

Darüber hinaus werden relevante Allergisierungsraten (Reaktionsfrequenz > 1%) auch bei Thiomersal, Benalkoniumchlorid, Chloracetamid, Phenylquecksilberacetat, Diazolidinylnharnstoff beobachtet (Korting and Sterry, 2001).

1.5.5 Okklusion

Unter Okklusion versteht man in der Galenik das luft- und wasserundurchlässige Abdecken von Hautarealen. Diese werden z.B. durch Pflaster, transdermale therapeutische Systeme, lipophilen Salbe (z.B. Vaseline) oder W/O-Emulsionen hervorgerufen. Sie verhindern den TEWL. Dies führt zur Aufweichung der Haut sowie einem zeitlich befristeten Wasserstau im SC. Der Diffusionswiderstand wird dadurch gegenüber eindringenden Substanzen gesenkt. Gleichzeitig kann der Wassergehalt von 5-15% auf 50% gesteigert werden. Dabei wird das Wasser vor allem durch die Hautproteine gebunden (Hafeez und Maibach, 2013). Der Okklusionszustand ist zeitlich sehr begrenzt wirksam. Durch Lackage kommt es dann zum raschen Verdunsten des angesammelten Wassers. Bei wiederholtem Auftragen von stark okklusiven Zubereitungen in hoher Frequenz kann es somit zu einer Art Pumpphänomen kommen, aus dem eine negative Wasserbilanz für das SC resultiert.

Sollten Okklusionsbedingungen erwünscht sein, so ist es möglich den Hydrierungszustand durch Zugabe von hygroskopischen Substanzen (z.B. Harnstoff oder Glycerol) zu erhöhen. Welchen direkten Einfluss eine höhere Hydrierung auf die Anordnung der SC Lipide hat ist bis heute weitgehend ungeklärt (Hafeez and Maibach, 2013).

1.5.6 Begründung für die Durchführung der Studie

All diese vielen unterschiedlichen funktionsstrukturellen Komponenten können Defizite aufweisen und zur Entstehung von Trockener Haut beitragen. Es kann somit keine einheitliche Konzeption der Substitutionstherapie existieren, die die zum Teil sehr individuellen Defizite ausgleicht. Eine galenische Zubereitung ist daher nicht ausreichend, um alle veränderten Konstellationen in gleicher Weise zu einem optimalen Ergebnis zu bringen. Grundsätzlich ist nach heutigem Kenntnisstand von Bedeutung, welche der Emulsionsphasen die äußere, kohärente Phase darstellt. Es wird dabei zwischen einem O/W-Typ und einem W/O-Typ unterschieden. Um die Barriere-protectiven Eigenschaften dieser galenischen Grundprinzipien herauszufinden ist es notwendig, galenische Präparate mit vergleichbaren Inhaltsstoffen mit unterschiedlichem Emulsionstyp an gesunder und standardisierter geschädigter Haut im direkten Vergleich zu untersuchen. Vor diesem Hintergrund sollen im vorliegenden

Studiendesign wirkstofffreie Grundlagen (Kosmetika), die den o.g. Ausgangsbedingungen entsprechen, vergleichend an hautgesunden Probanden mittels etablierter Hautfunktionsmessungen charakterisiert werden.

2. Zielstellung

Das Ziel dieser Studie war die Charakterisierung und Quantifizierung von Effekten auf die Barrierefunktion der Hornschicht nach Einmalapplikation von Modellpräparationen (vom W/O- und O/W-Typ).

Als primärer Zielparameter wurde der transepidermale Wasserverlust im zeitlichen Verlauf (AUC im intraindividuellem Vergleich für W/O-Emulsion, O/W-Emulsion sowie Leerkontrolle) untersucht. Die Messzeitpunkte waren: Baseline (vor Applikation), 10, 20, 30, 40, 50, 60, 120, 180 min nach der Applikation. Gesunde und geschädigte Haut wurden getrennt bewertet.

Als sekundärer Zielparameter wurde der Wassergehalt des SC (Corneometrie) im zeitlichen Verlauf (AUC im intraindividuellem Vergleich für W/O-Emulsion, O/W-Emulsion sowie Leerkontrolle) untersucht. Die Messzeitpunkte waren Baseline (vor Applikation), 10, 20, 30, 40, 50, 60, 120 und 180 min nach Applikation. Gesunde und geschädigte Haut wurden getrennt bewertet.

Zusätzlich wurde die Verträglichkeit anhand der Häufigkeit des Auftretens unerwünschter Ereignisse erfasst.

Insbesondere wurden folgende Fragen formuliert:

- Sind die Ergebnisse eines Single-Application-Test (SAT) für die Planung eines Repeated-Application-Test (RAT) hilfreich?
- Sind die Messabstände nach Applikation gut gewählt, um den Verlauf der Barriereeffekte über die Zeit zu verfolgen?
- Welche Fehlerquellen und Einflussgrößen auf die Messungen weist das Konzept aus?

3 Material und Methodik

3.1 Prüfpopulation

3.1.1 Rekrutierung

27 freiwillige Probanden wurden über die Datenbanken des (Zentrum für Klinische Studien Dermatologie) ZKSD rekrutiert. Davon schlossen 25 Probanden die Studie gemäß Prüfplan ab.

3.1.2 Einschlusskriterien

- Vorliegen der nach Aufklärung über Wesen, Risiken und Tragweite der Studie unterschriebenen und datierten Einverständniserklärung
- Probanden müssen in der Lage sein, die Tragweite, Risiken und das Wesen der Studie zu verstehen und selbstständig über ihre Teilnahme zu entscheiden.
- Männliche und weibliche Probanden zwischen 18 und 65 Jahren
- Kaukasier
- Nichtraucher

3.1.3 Ausschlusskriterien

- Teilnahme an einer anderen klinischen Prüfung ab 4 Wochen vor Einschlussdatum
- Starke Behaarung im Bereich des volaren Unterarms
- Erosive, ulzeröse oder stark entzündliche Läsionen im Bereich der Messareale
- Einnahme von
 - Retinoiden
 - Lipidsenkern
 - Diuretika
- Applikation von entzündungshemmenden topischen oder systemischen Präparaten während der Studie:
 - Calcineurininhibitoren
 - Glukokortikoide
 - Nichtsteroidale Antiphlogistika
 - DMARDs
 - Phytopharmaka
- Verwendung vasoaktiver OTC-Produkte, z.B.
 - Antihistaminika

- OTC-Erkältungsprodukte, die Antihistaminika oder Phenylpropanolamin bzw. Phentolamin enthalten, welche die Barrierefunktion der Haut während der Studie beeinträchtigen.
- Verwendung von Kosmetika, Pflegeprodukten oder Medizinprodukten im Bereich der volaren Unterarme während der Studie
- Unverträglichkeit oder Überempfindlichkeit gegen einen der Inhaltsstoffe der Emulsionen
- Übermäßiger Koffeingenuss während der Studie

3.1.4 Vorzeitiger Abbruch

Den Probanden war es jederzeit ohne Nennung von Gründen sowie ohne Nachteilsentstehung möglich, das Einverständnis zur Teilnahme zurückzuziehen. Des Weiteren sollte die Studie durch den Leiter der klinischen Prüfung (LKP) unverzüglich abgebrochen werden, sobald während der Durchführung eine unvorhergesehene Gefahr für den Probanden bzw. den Prüfarzt offensichtlich war. Der Leiter der Studie konnte die Studie bzw. die Teilnahme eines Probanden vorzeitig unterbrechen. Allgemein sollte ein Abbruch erfolgen bei

- Auftreten schwerwiegender unerwünschter Ereignisse
- Wunsch des Probanden
- Schwerwiegende Protokollverletzungen, die insbesondere die Sicherheit des Probanden betrifft

3.1.5 Unerwünschte Wirkungen (ICH – GCP – Richtlinie von 1996):

Als unerwünschtes Ereignis (Adverse Event, AE) wird jedes nachteilige Vorkommen definiert, das während einer Studie einer/m Probandin/en widerfährt. Dieses Ereignis muss nicht notwendigerweise im Zusammenhang mit den Präparaten, die während der Studie Verwendung fanden, stehen. Dazu gehört jedes nachteilige und unbeabsichtigte Zeichen, Symptom oder Erkrankung, die zeitlich im Zusammenhang mit dem medizinischen Produkt stehen (International Conference on Harmonisation 1996).

Ein schwerwiegend unerwünschtes Ereignis (Serious Adverse Event, SAE) ist ein Ereignis, das zum Tode führt oder lebensbedrohlich ist. Es kann zu bleibender oder schwerwiegender Behinderung führen sowie zur Invalidität. Weiterhin kann es eine stationäre Behandlung oder die Verlängerung einer stationären Behandlung erforderlich machen. Auch angeborene Missbildungen oder Geburtsfehler können aus einem SAE entstehen. Es ist möglicherweise

auch aus anderen Gründen medizinisch bedeutsam (medizinische Intervention wird notwendig). (International Conference on Harmonisation 1996).

3.2 Untersuchungsmethoden

3.2.1 *Corneometrie*

Der Feuchtigkeitsgehalt der Hornschicht wurde mit einem Corneometer (CM 820, Courage & Khazaka) ermittelt und als dimensionsloser Wert aufgezeichnet. Da man annimmt, dass die Hautfeuchtigkeit Einfluss auf die Ausbildung des spezifischen Wasser-Fett-Films der Haut hat, ist eine möglichst genaue Messung der Hautfeuchtigkeit von wissenschaftlichem Interesse. Gemessen wurde in dieser Studie die Kapazität über dem Stratum corneum. Der Messkondensator reagiert beim Auflegen auf die Hautoberfläche auf Kapazitätsänderungen innerhalb seines Messvolumens. Um ein gutes Messergebnis zu erzielen, sollte der Messkopf möglichst plan auf der Haut anliegen. Dies wird durch die geringe Größe von 7x7 mm gewährleistet. Eine zweite Voraussetzung ist ein möglichst konstanter Andruck des Messkopfes. Für den konstanten Andruck von 3,5 N sorgt eine in dem Messkopf liegende Feder. Um Schwankungen der Werte durch hohe Luftfeuchtigkeit und Okklusionseffekte zu vermeiden, werden die Messungen ebenfalls nach einer Akklimatisierungszeit unter konstanten Umgebungsbedingungen durchgeführt. (Courage und Khazaka, 2019)

3.2.2 *Evaporimetrie (misst den Transepidermale Wasserverlust = TEWL)*

Die Messung des durch die Haut diffundierenden Wasserdampfes wurde mittels Evaporimetrie Delfin Technologies vorgenommen und in g/m²h angegeben. Die Messungen wurden gemäß EEMCO Guidance for the Assessment of Transepidermal Water Loss in Cosmetic Sciences durchgeführt.

Die Wasserverlustrate ist ein guter Indikator für die Barrierefunktion der Haut. Durch den TEWL lassen sich jeglicher Einfluss von Lifestyle und kosmetischen Anwendungen auf die Barrierefunktion feststellen. Dafür eignet sich als Messgerät die Evaporimetrie. Eine Evaporimetrie besteht aus einer Kammer mit Sensoren für die Messung der relative Feuchtigkeit und Temperatur. Feuchtigkeit und Temperatur werden vor Hautkontakt und mit Hautkontakt gemessen. Der Unterschied (Transepidermale Wasserverlust) wird anschließend berechnet. Zwischen den Messungen wird die Kammer passiv ventiliert. Für die Messung ist eine Akklimatisierung sowie ein konstante Umgebungstemperatur und Luftfeuchtigkeit in einem geschlossenen Raum notwendig. (Kraus, 2014)

3.2.3 Umgebungsbedingungen

Die Messungen wurden bei einer Raumtemperatur von 20°C und einer relativen Luftfeuchtigkeit von 55% durchgeführt.

3.3 Prüfpräparate

3.3.1 *Hersteller*: ALLERGIKA GmbH, Bürgermeister-Seidl-Str. 8, 82515 Wolfratshausen

3.3.2 *Inhaltsstoffe der O/W- und W/O-Emulsion*

| O/W-Emulsion: Hydrolotio sensitive | W/O-Emulsion: Lipolotio sensitive |
|--|--|
| Aqua | Aqua |
| Glycerin | Glycerin |
| Tocopheryl Acetate | Butylene Glycol |
| Caprylic Capric Triglyceride | Isopropyl Myristate |
| Decyl Oleate | Caprylic/Capric Triglyceride |
| Laureth-9 | Paraffinum Liquidum |
| Tocopheryl Acetate | Cetyl PEG/PPG-10/1 Dimethicone |
| Glyceryl Stearate | Sodium Chloride |
| Ceteth-20 | Tocopheryl Acetate |
| Stearete-10 | Cera Alba |
| Stearete-7 | Hydrogenated Caster Oil |
| Dimethicone | Bisabolol |
| Acrylates/C10-30 Alkyl Acrylate Crosspolymer | |
| Caprylyl Glycol | |
| p-Anisic Acid | |
| Sodium Hydroxide | |
| Citric Acid | |
| Tocophenol | |
| Hydrogenated Palm Glycerides Citrate | |

Tab. 1: Inhaltsstoffe der Emulsionen

3.4 Studienbeschreibung

3.4.1 Studiendesign und Zielparameter

Es handelte sich um eine prospektive, monozentrische, randomisierte, prüferverblindete Kosmetikstudie mit intraindividuellem Vergleich.

3.4.2 Studienablauf

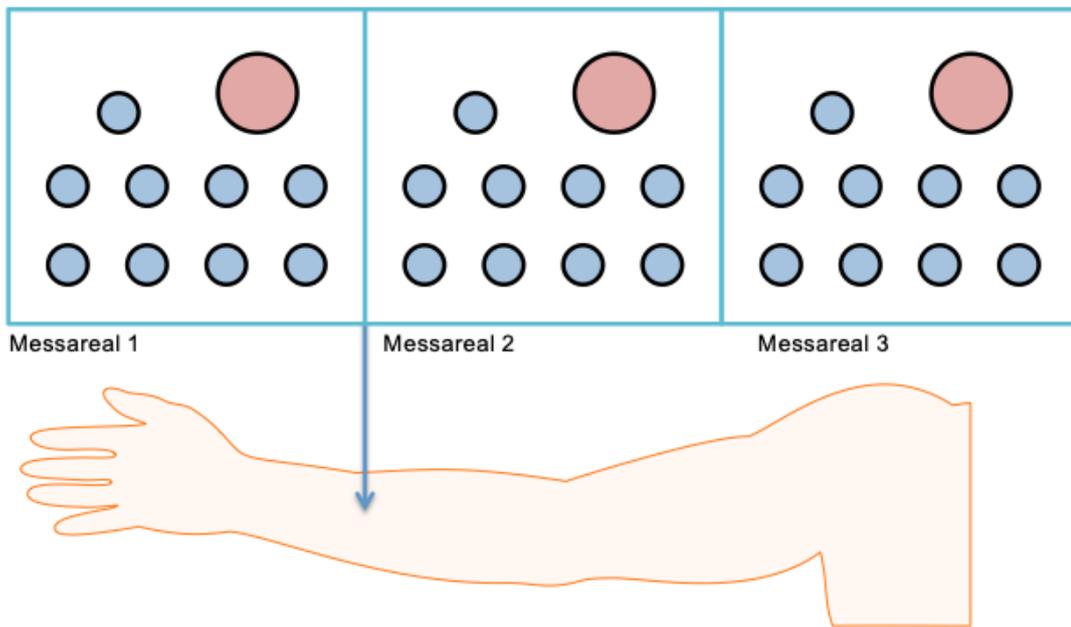
Die Untersuchungsdauer betrug je Proband 1 Tag. Studienbeginn war der 06.05.2015 und Studienende der 15.05.2015.

Zunächst wurden die Probanden aufgeklärt, die Ein- und Ausschlusskriterien überprüft und die Probandeninformation und -einwilligung unterzeichnet. Es erfolgte weiterhin die Markierung der Testareale mittels Schablone sowie eine Nummerierung (1-3) dieser, durch die unverblindete Study Nurse, laut Randomisierungsplan. Es erfolgte die Präparierung der Areale des linken Unterarmes durch Klebebandabrisse. Anschließend konnte eine Corneometrie- und Evaporimetrie-Messung an beiden Unterarmen durchgeführt werden. Mit der Applikation der Emulsionen, entsprechend des Randomisierungsplans, auf die Testareale durch die unverblindete Study Nurse, begannen die regelmäßigen Corneometrie- und Evaporimetrie-Messungen an den markierten Arealen nach 10, 20, 30, 40, 50, 60, 120, 180 Minuten. Für die Messungen der Corneometrie wurde jeweils ein eigenes Areal verwendet, um eventuelle Abstriche der Emulsionen durch den Sondenkontakt auszuschließen. Die gemessenen Werte wurden per Hand in den Papier-Case Report Form (CRF) eingetragen.

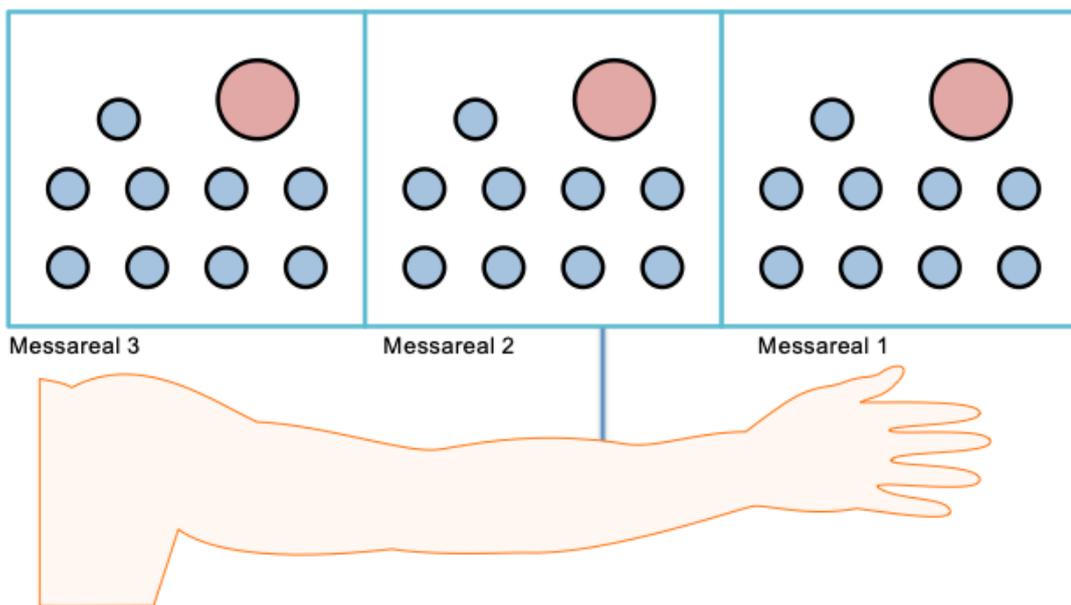
3.4.3 Testareale

Es wurden 6 Testareale auf den volaren Unterarmen festgelegt. Davon gab es drei gestrippte (links) und 3 ungestrippte (rechts) Areale (Siehe Abb. 3). Jedes Testareal wurde mit 10 Kreisen gekennzeichnet, 9 Kreise für die Corneometrie und einen Kreis für die Evaporimetrie. Das Stripping wurde gemäß der im Prüfplan dargelegten standardisierten Methode durchgeführt.

Volärer UA rechts, gesunde Haut (Abb. 1)



Volärer UA links, gestrippte Haut (Abb. 2)



Legende:

Areal für TEWL-Messung:

Areale für Corneometrie-



messungen (je 1 pro



Messzeitpunkt):

Abb. 3 : Darstellung der Applikations- und Messareale

3.4.4 Durchführung des Stripping-Verfahrens

Ziel des Stripping-Verfahrens ist es durch wiederholte Applikation von geeignetem Klebeband auf demselben Hautareal das SC weitgehend zu entfernen und damit eine Barrierestörung zu simulieren. Nach vollständiger Entfernung des SC wird das Stratum lucidum (SL) sichtbar durch eine glänzende, trockene Hautoberfläche, die ggf. leicht gerötet ist. Diese Abrissprozedur ist schmerzfrei und leicht standardisiert durchführbar.

Die Anzahl der Wiederholungen an Klebebandabrissen ist individuell und richtet sich nach der Anzahl der Schichten des SC sowie der Hautbeschaffenheit. Um die Anzahl zu bestimmen werden am Oberarm einige Klebebandabriss durchgeföhrt bis das SL sichtbar wird (≥ 3 glänzende Punkte). Diese werden mit einem Korrekturfaktor $cf = 11/26 = 0,42$ multipliziert. Schließlich wird die so errechnete Anzahl an Klebebandabrissen an den Testarealen durchgeföhrt. In unserem Fall benutzten wir 3M™ - Blenderm™ - Klebestreifen (50 mm breit). Zu beachten ist bei der Durchführung, dass die Klebestreifen ohne Spannung und nur mit leichtem Fingerdruck auf den Unterarm aufgeklebt werden sowie in einem spitzen Winkel von 45° zur Kleberichtung abgezogen werden. Jeder Abriss benötigt einen neuen Klebebandstreifen (Dickel et al. 2004).

3.4.5 Randomisierung und Verblindung

Die randomisierte Zuordnung von O/W-Emulsion / W/O-Emulsion / Leerkontrolle zu den nummerierten Testarealen wurde durch das Programm Research Randomizer festgelegt (Urbaniak und Plous, 2013). Die Zuordnung erfolgte symmetrisch für beide Arme. Die Emulsionen wurden räumlich getrennt vom Prüfarzt und unverblindeten Study Nurse appliziert.

3.4.6 Nutzen-Risiko-Abschätzung

Beide Emulsionen beinhalten bekannte Substanzen, die häufig in Kosmetika verwendet werden, der Kosmetikordnung entsprechen und sich bereits im Markt bewährt haben. Die Produkte wurden als sehr gut verträglich eingestuft, es waren bei der geplanten Anwendung keine irritativen Effekte zu erwarten. Im Einzelfall konnte jedoch nicht ausgeschlossen werden, dass Unverträglichkeitsreaktionen wie Juckreiz oder Rötungen, auftreten konnten.

3.5 Dateneingabe und Datenmanagement

Die erhobenen Daten dieser Studie wurden in einen Papier-CRF eingetragen. Die Daten wurden doppelt, zeitlich und personell getrennt in eine Exceltabelle übertragen und von einer dritten Person abgeglichen. Die bereinigten Datensätze wurden entsprechend dem Randomisierungsplan zugeordnet und zur biometrischen Auswertung verwendet.

3.6 Archivierung

Alle wesentlichen Unterlagen der Studie werden mindestens 10 Jahre lang aufbewahrt und entsprechend den gesetzlichen Bestimmungen archiviert.

3.7 Ethische und rechtliche Aspekte

Die Studie unterlag den Bestimmungen der Kosmetikverordnung (2011). Auch wenn keine gesetzlichen Vorgaben diesbezüglich bestanden, wurde die Studie zur Erhöhung der Qualität und Aussagekraft entsprechend den ICH-GCP-Richtlinien (1996), der Deklaration von Helsinki (2008) sowie den Vorschriften der GCP-Verordnung (2006) durchgeführt.

Mit ihrem Votum vom 30.04.2015 erklärte die Ethikkommission der Medizinischen Fakultät der Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg, dass keine Bedenken gegen die Durchführung der Studie bestünden.

Alle Probanden erklärten nach Aufklärung durch den Prüfarzt schriftlich ihre Einwilligung zur Teilnahme.

4 Ergebnisse

4.1. Biometrische Auswertung

Die Biometrische Auswertung erfolgte anhand der einfaktoriellen Varianzanalyse (Analysis of variance = ANOVA). Es sollten die Mittelwerte mehrerer unabhängiger Gruppen verglichen werden, die lediglich durch den Einfluss eines Faktors definiert werden. Die einfaktorielle Varianzanalyse bietet eine Möglichkeit verschiedene normalverteilte Variablen zu vergleichen. Der Levene-Test untersucht dahingegen die Varianzhomogenität zwischen den Stichproben, die notwendig ist für eine Durchführung der Varianzanalyse. Der Post-hoc-Test zeigte am Schluss der Varianzanalyse signifikante Unterschiede in den Faktorstufen auf. Bei der durchgeführten einfaktoriellen Varianzanalyse mit Messwiederholungen konnten mehrere Messzeitpunkte verglichen werden. In dieser Studie handelt es sich dabei um die Mittelwertsunterschiede derselben Person zu unterschiedlichen Messzeitpunkten, sodass hier die Streuung der Stichproben nicht von Interesse ist. Die Unterschiede von verschiedenen Personen wiederum schon. Dabei muss eine sogenannte Sphärizität vorliegen, d.h. die Korrelationen zwischen den Varianzen einzelner Faktoren sollen homogen sein. Die Residualstreuung gibt weiterhin die individuellen Unterschiede der einzelnen Personen bei Messwiederholungen an. Sie müssen mit einer theoretischen F-Verteilung verglichen werden. Unter Mitbeachtung der α -Inflation wurde zum Schluss das Signifikanzniveau durch die Anzahl der durchgeführten Testungen korrigiert. Der H-Test schließlich sollte anzeigen, ob unabhängige Stichproben einer gemeinsamen Population entstammen. Es konnten signifikante Ergebnisse eruiert werden.

4.2 Datenauswertung

4.2.1 Probanden

27 Probanden wurden rekrutiert. Darunter befanden sich männliche und weibliche Probanden im Alter von 18 bis 55 Jahren. Zwei Probanden wurden ausgeschlossen. Ein Proband zeigte unvollständige Messdaten auf und bei einem Probanden tauchte ein technischer Gerätedefekt auf. Somit gingen 25 vollständige Datensätze in die Auswertung mit ein, 7 männliche und 18 weibliche Probanden im mittleren Alter von 28,3 Jahren.

4.2.2 Unerwünschte Ereignisse

Während der Studiendauer traten keine schwerwiegenden unerwünschten Ereignisse auf. Nach der Stripping-Prozedur wurde erwartungsgemäß ein Reflexerythem bei einigen Probanden sichtbar sowie eine leichte Missempfindung. Eine Intervention wurde nicht notwendig und die Symptome verschwanden innerhalb von Minuten.

4.2.3 Leerkontrolle

Die Wirkung des Stripping-Verfahrens wurde durch Messungen der nicht behandelten Haut herausgefunden. Hierfür wurde auf einer Seite nach Durchführen des Stripping-Verfahrens und auf der anderen Seite die intakte Haut gemessen.

Für die Corneometrie zeigten sich, verglichen mit der Leerkontrolle, sowohl auf ungestrippter als auch auf gestrippter Haut keine relevanten Ergebnisse.

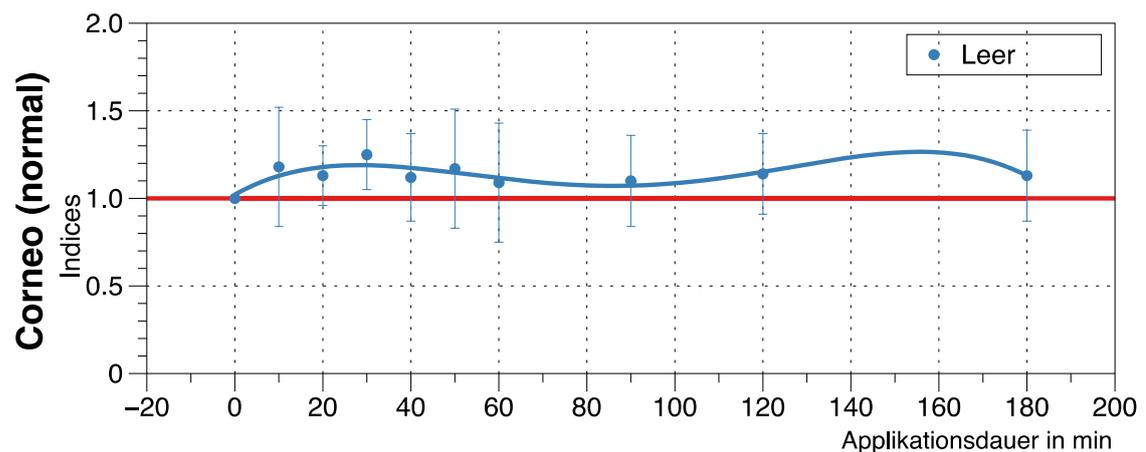


Abb. 4: Effektkurve der Leerkontrolle Corneometrie auf intakter Haut

Die Effektkurve in Abb. 4 zeigt die Messungen durch das Corneometer auf intakter Haut. Dabei fallen Schwankungen der Hauthydrierung über dem gesamten Zeitraum der Messungen auf.

Die Effektkurve in Abb. 5 zeigt die Messungen durch das Corneometer auf gestrippter Haut. Diese Werte zeigen über dem gesamten Messzeitraum einen unwesentlichen Anstieg der Hydrierung auf. Eine signifikante Veränderung ist nicht festzustellen.

Die Evaporimetrie zeigte ähnliche Ergebnisse der Leerkontrollen mit größeren Schwankungen der Messungen. Es ergab sich kein relevanter Unterschied nach dem Stripping-Verfahren. Damit zeigte sich nach standardisiertem Stripping-Verfahren kein Effekt auf die Hautbarriere.

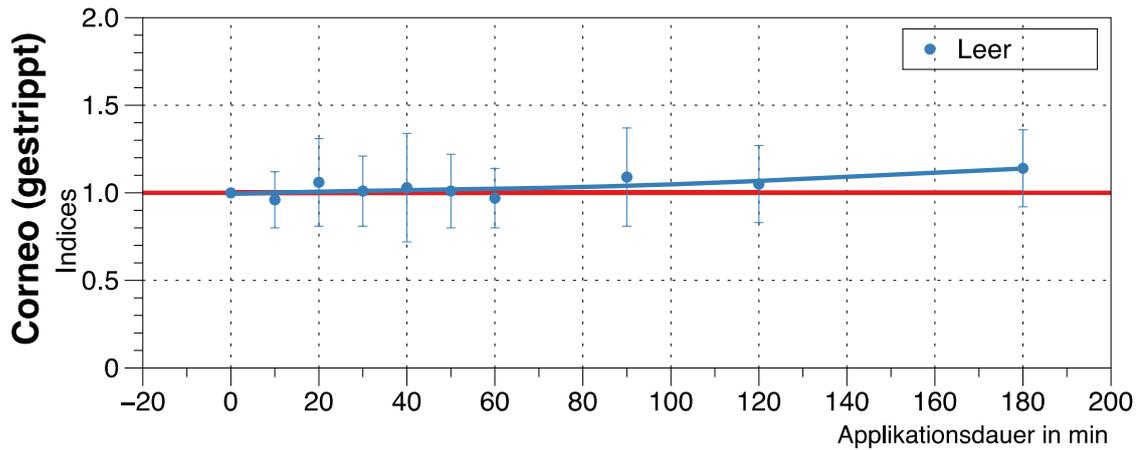


Abb. 5: Effektkurve der Leerkontrolle Corneometrie auf gestrippter Haut

Abb. 6 zeigt die starken Schwankungen der Messungen der Leerkontrolle auf intakter Haut. Auffallend ist ein leichter Anstieg am Ende des Messzeitraumes, der jedoch nicht signifikant ist.

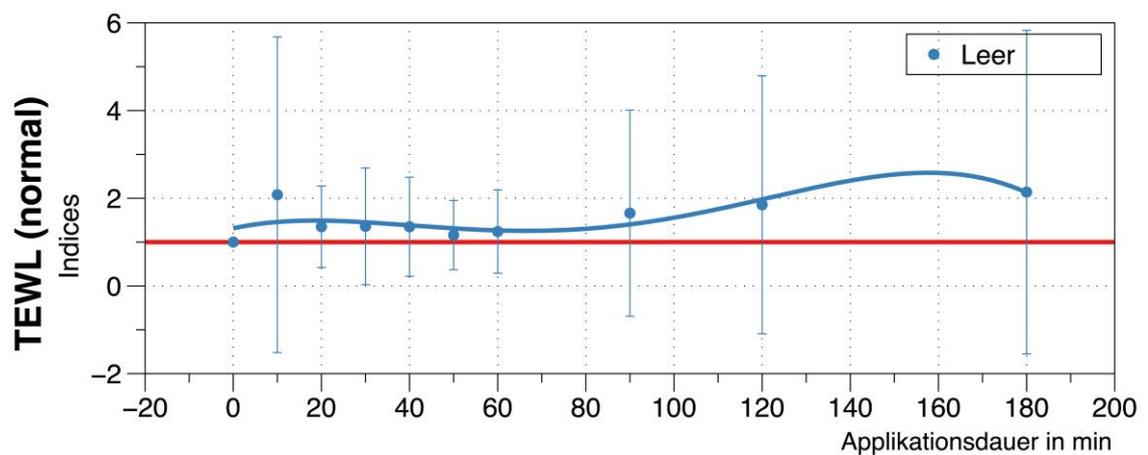


Abb. 6: Effektkurve der Leerkontrolle Evaporimetrie auf intakter Haut

Das Ergebnis des Stripping-Verfahrens sieht man im Vergleich von Abb. 6 und Abb. 7. Die Schwankungen sind eher weniger ausgeprägt. Ein relevanter transepidermaler Wasserverlust ist daraus nicht festzustellen.

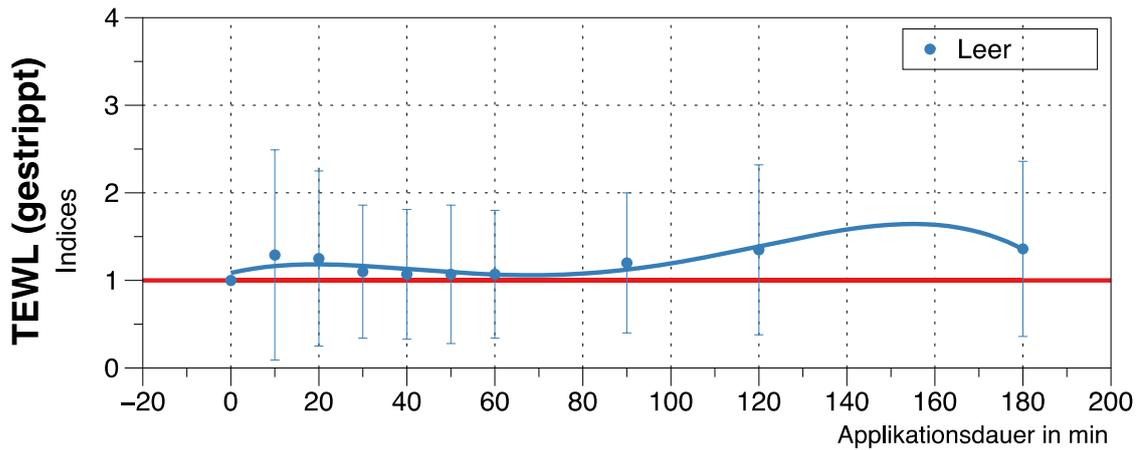
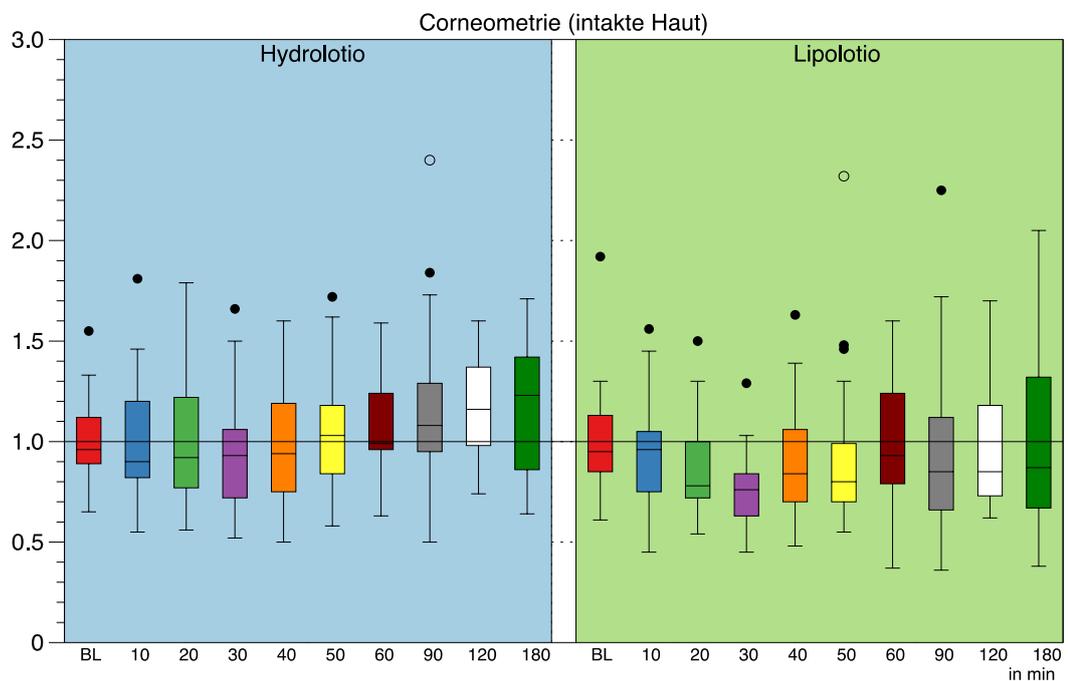


Abb. 7: Effektkurve der Leerkontrolle Evaporimetrie auf gestrippter Haut

4.3 Vergleich O/W- und W/O-Emulsion

4.3.1 Corneometrie

O/W-Emulsion und W/O-Emulsion zeigten auf intakter Haut im Vergleich zur Leerkontrolle keine relevanten Effekte ($p = < 0,001$). Zur besseren Darstellung sahen wir uns dies in Effektkurven an, die das gleiche Ergebnis brachten.



Legende:

Boxplot: von unten nach oben: 5%, 25%, 50%, 75%, 95% der Probanden; ● = Ausreißer; ○ = starke Ausreißer

Abb. 8: Darstellung der corneometrischen Messungen auf intakter Haut

Die Abb. 8 zeigt im Vergleich zur Leerkontrolle keine relevanten Effekte der corneometrischen Messungen von O/W-Emulsion und W/O-Emulsion auf intakter Haut. In der graphischen Darstellung sieht man zudem größtenteils starke Schwankungen der Messungen zu den jeweiligen Zeitpunkten. Die Boxplots ziehen sich zum Teil stark in die Länge und zeigen damit die große Messvariabilität innerhalb einer Gruppe und eines Zeitraumes.

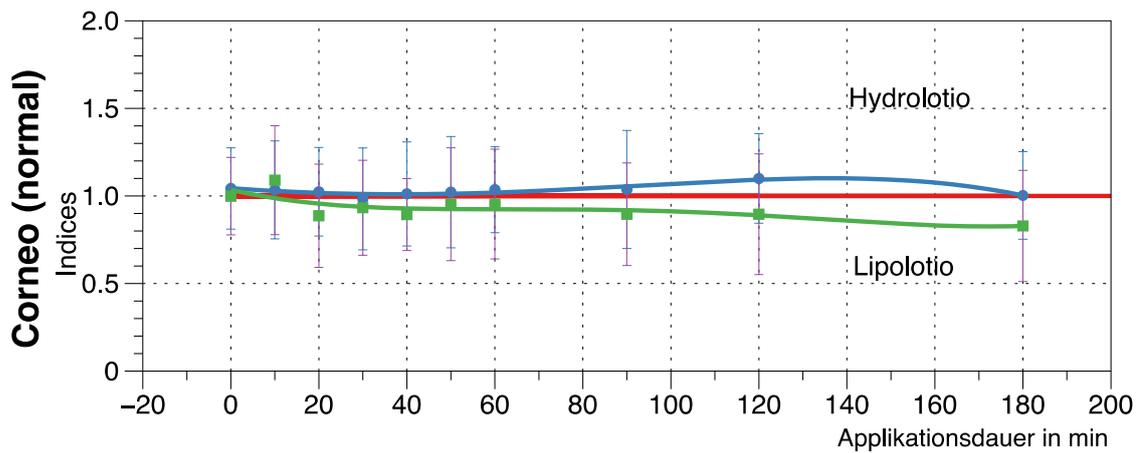
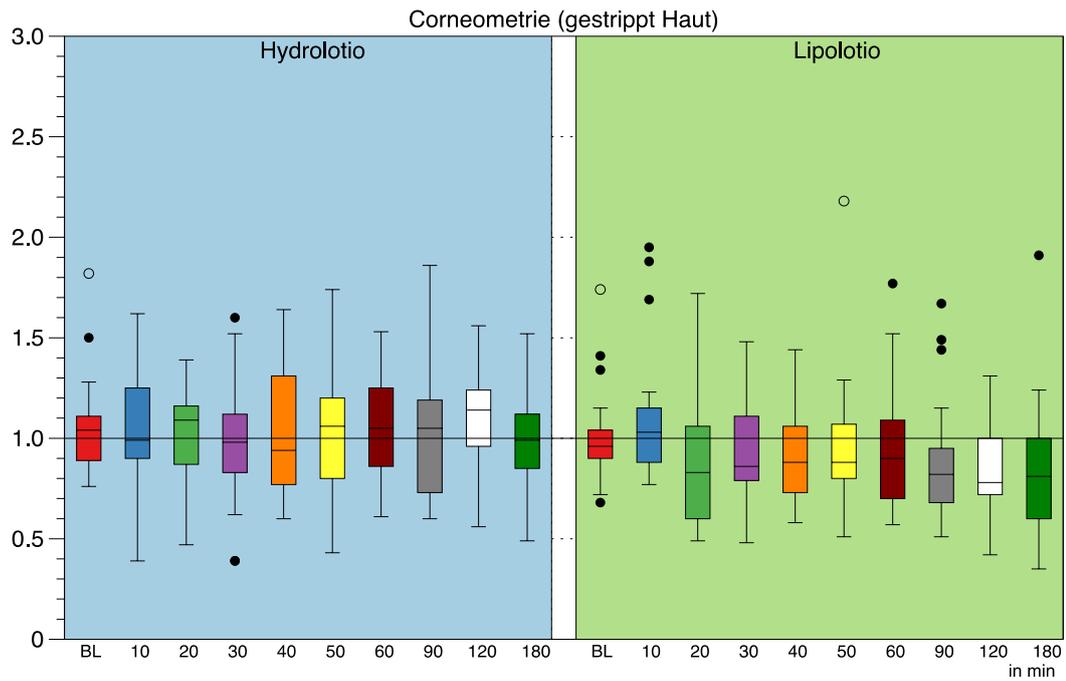


Abb. 9: Effektkurven corneometrischer Messungen auf intakter Haut

Die Effektkurven der Abb. 9 dagegen machen deutlich, dass bei der Anwendung der Emulsionen auf intakter Haut keine relevanten Effekte corneometrisch messbar sind.

Auf geschädigter Haut dagegen zeigen O/W-Emulsion und W/O-Emulsion im Vergleich zur Leerkontrolle ebenfalls keine relevanten Effekte der corneometrischen Messungen. Auch hier führten wir eine graphische Darstellung in Form von Effektkurven durch. Diese zeigten dasselbe Ergebnis. (Abb. 10 und 11)



Legende:

Boxplot: von unten nach oben: 5%, 25%, 50%, 75%, 95% der Probanden; ● = Ausreißer; ○ = starke Ausreißer

Abb. 10: Darstellung der corneometrischen Messungen auf gestrippter Haut

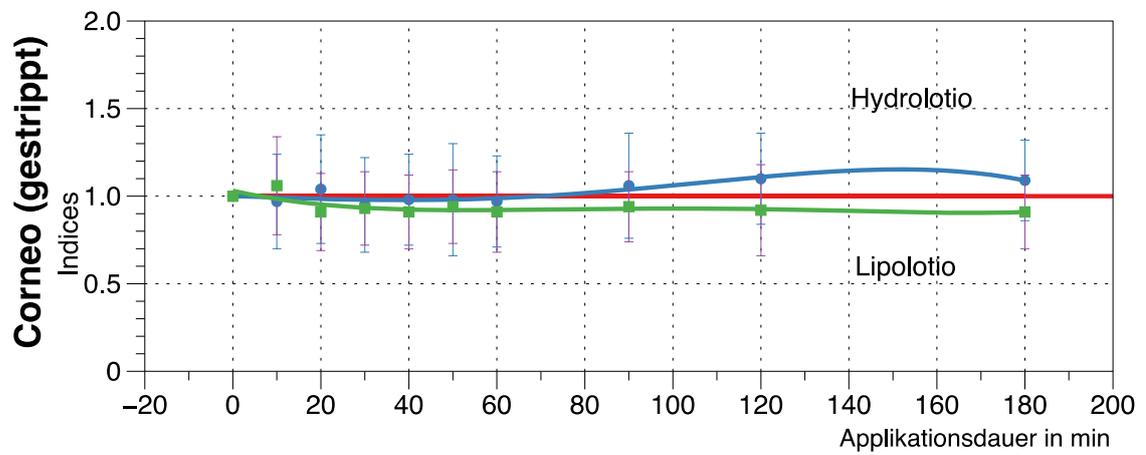
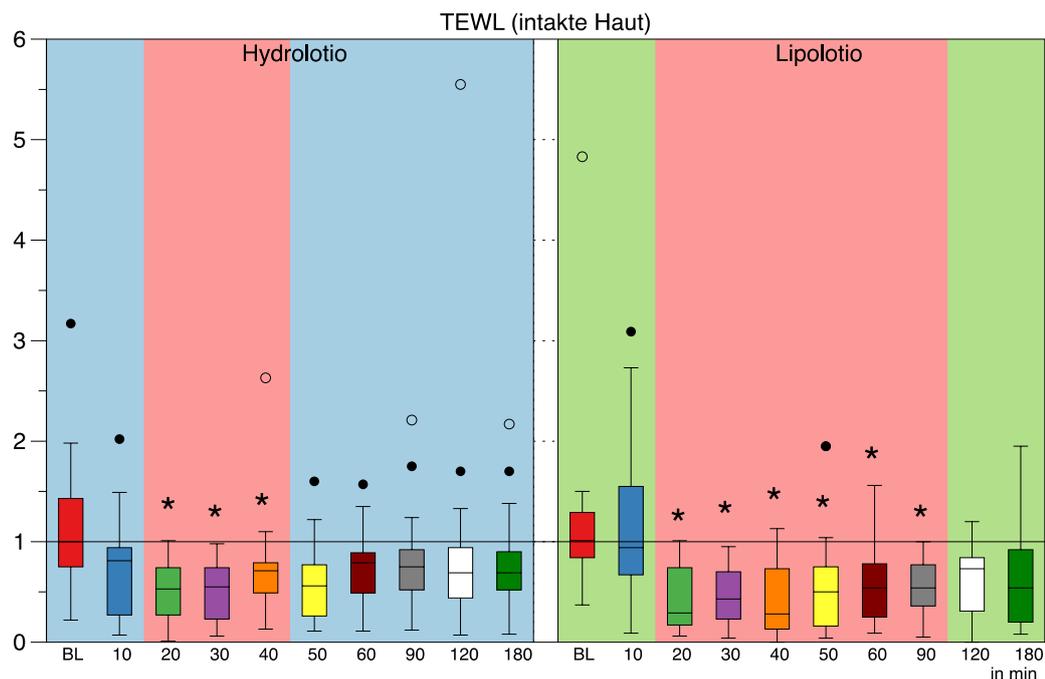


Abb. 11: Effektkurven corneometrischer Messungen auf gestrippter Haut

4.3.2 Evaporimetrie

Die Messungen mittels Evaporimetrie (Delfin Technologies Ltd, Kuopio, Finnland) zeigten im Vergleich zu den Messungen der Corneometrie relevante Unterschiede auf. Es zeigten sich zeitabhängige Effekte auf intakter Haut von W/O-Emulsion und W/O-Emulsion im Vergleich zur Leerkontrolle. Bei der O/W-Emulsion baute sich durch die lipophile Rückstandsphase und die Hydrierung des SC ein Barriereeffekt auf, der von 20 bis 40 min nach Applikation signifikant war. Die W/O-Emulsion zeigte vergleichbare, aber länger anhaltende Barriereeffekte.



Legende:

Boxplot: siehe Abb. 8, 10; ● = Ausreißer; ○ = starke Ausreißer, * = unterm Signifikanzniveau < 0,01

Abb. 12: Darstellung des TEWL intakter Haut

Die Abb. 12 zeigt im Vergleich zur Abb. 10 und Abb. 8 deutlich weniger Schwankungen der Messungen innerhalb einer Gruppe. Die Boxplots imponieren durch ihre kompakte Form, welche die Signifikanz verdeutlicht.

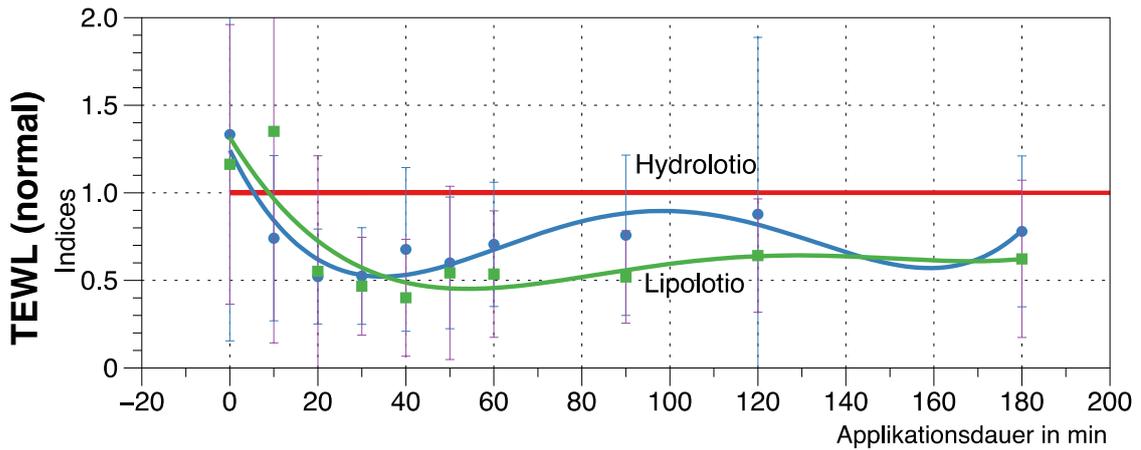
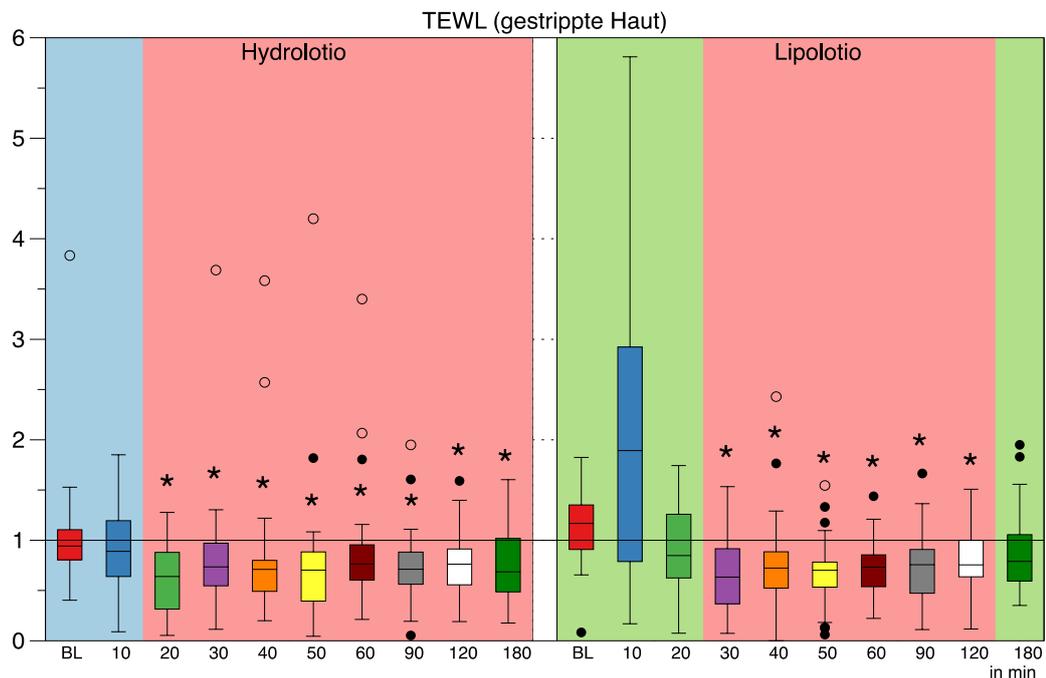


Abbildung 13: Effektkurven des TEWL intakter Haut

Im Vergleich zeigt sich für beide Präparate ein ausgeprägter Barriereeffekt, die für die W/O-Emulsion ca. doppelt so lange nachweisbar ist. Die Abb. 13 zeigt die sehr lang anhaltende Wirkung der W/O-Emulsion.



Legende:

Boxsplot: siehe Abb. 8, 10; ● = Ausreißer; ○ = starke Ausreißer, * = unterm Signifikanzniveau <math>< 0,01</math>

Abb. 14: Darstellung des TEWL gestrippter Haut

In Abb. 14 zeigten O/W-Emulsion und W/O-Emulsion auf geschädigter Haut ebenfalls relevante Barriereeffekte auf. Durch die artifizielle Barrierestörung wurden die Unterschiede der

Effektdauer angeglichen. Die O/W-Emulsion zeigte einen Effekt sogar über längere Zeit als die W/O-Emulsion. Auch hier imponierten die kompakten Boxplots und die wenigen Außreißer in der Abbildung.

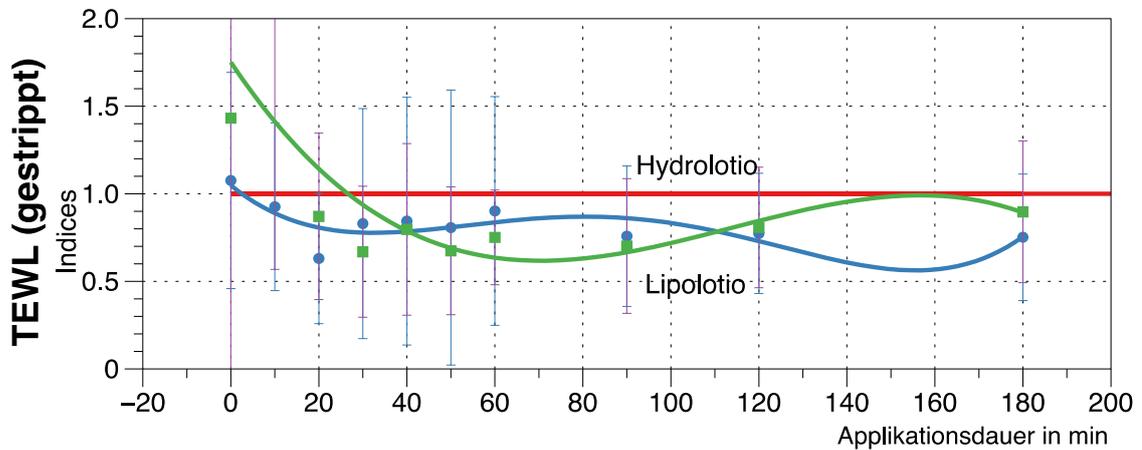


Abb. 15: Effektkurven des TEWL gestrippter Haut

Die Effektkurven der Abb. 15 verdeutlichen das Ergebnis. Es zeigt sich eine Schnittstelle zwischen beiden Emulsionen und eine länger anhaltende Wirkung der O/W-Emulsion.

Ein Vorzeitiger Abbruch der Studie hat nicht stattgefunden. Während der Durchführung der Studie wurde keine unvorhergesehene Gefahr für den Probanden bzw. den Prüfarzt offensichtlich, sodass die Studie laut Plan durchgeführt werden konnte. Die Teilnahme eines Probanden musste nicht vorzeitig durch den Leiter der Studie unterbrochen oder abgebrochen werden. Es traten auch keine schwerwiegenden unerwünschten Ereignisse, kein Abbruch auf Wunsch eines Probanden und keine schwerwiegenden Protokollverletzungen, die die Sicherheit des Probanden betreffen könnten, auf.

5 Diskussion

5.1 Die Wichtigkeit eines SAT für nachfolgende RAT

5.1.1 *Single-Application-Tests (SAT)*

Der Single-Application-Test ist ein vielfach genutztes Verfahren in der Dermatologie zur Testung von Verträglichkeit und Wirkung von Emulsionen mit bestimmten Inhaltsstoffen (Atrux-Tallau et al., 2008; Jacobi et al., 2011; Wiedersberg et al., 2009). Es erfolgt eine einmalige Applikation auf die Haut mit Untersuchungen in einem bestimmten Zeitfenster. Dieses Zeitfenster ist abhängig von der zu erwartenden Wirkdauer des applizierten Mediums und liegt oftmals in Minuten bis Stundenbereich. Als Anwendungsort bieten sich die volaren Unterarme an, da sie gut zugänglich sind und wenig behaarte Stellen bieten. Dazu kann ein Arm als Vergleich zum anderen Arm mittels Irritationsverfahren vorbehandelt werden. Das Tape-Stripping-Verfahren (als Irritationsverfahren) ist leicht anzuwenden und bietet sich so für einen SAT an. Mittlerweile werden standardisiert der TEWL und die SC-Hydrierung gemessen.

Die Ergebnisse unserer Studie zeigen einen signifikanten Effekt von O/W- und W/O-Emulsionen auf das SC innerhalb des Zeitfensters von 180 Minuten. Die Hydrierungsparameter steigen erstmals signifikant nach 20 Minuten an und dies sowohl bei O/W- als auch W/O-Emulsionen. Durch die Lipophile Rückstandphase wird ein Barriereeffekt aufgebaut, der sich in der Dauer für die einzelnen Emulsionen unterscheidet: 20 Minuten bei der O/W-Emulsion und 50 Minuten bei der W/O-Emulsion (Siehe Abb. 12). Diese Erkenntnisse decken sich mit denen von Blichmann et al. In deren Studie über 360 Minuten mit der Anwendung einer O/W-Emulsion zeigten sich vergleichbare Effekte auf die Hautbarriere. Dabei trat ein biphasisches Verhalten der Hydrierungsparameter auf. Sie unterteilten dieses in die Evaporationsphase und Lipidationsphase. Die Evaporationsphase beginnt sofort nach Applikation und hält nicht länger als 15 Minuten an. In dieser Phase verdunstet das Wasser der Emulsion mit einer starken Erhöhung der Hydrierungsparameter. Die Lipidationsphase kann mehrere Stunden andauern und wird dominiert durch das Öl der Emulsion und seine allmähliche Absorption. Sie wird begleitet von einem geringeren Anstieg der epidermalen Hydrierungsparameter (elektrische Kapazität, elektrische Konduktion und Evaporation). Die gemessene Evaporationsphase findet in den ersten 15 Minuten statt und hat ihren Hydrierungs-Peak in den ersten 5 Minuten (Blichmann et al., 1989). Da die Evaporationsphase die Verdunstung des Wassers und nicht den Barriereeffekt auf die Haut zeigt, ist sie für unsere Studie unbedeutend. Der zeitliche Verlauf der Lipidationsphase ist durch seine Wirkung auf die Barrierefunktion allerdings interessant. Vergleicht man in diesem Zusammenhang die Studie von Blichmann et al. mit

unserer, so lässt sich ein ähnlicher Zeitrahmen festmachen. Der Beginn der Lipidationsphase liegt zwischen 10 - 20 Minuten Einwirkzeit einer O/W- oder W/O-Emulsion auf gesunder Haut. Blichmann et al. führte seine Messungen der Hydrierungsparameter in der ersten Stunde nach nur 3-5, 15, 30 und 60 Minuten durch. Sie ergaben eine kontinuierlich Erhöhung der Hydrierungskurven über den gesamten Messzeitraum (Blichmann et al., 1989). Verfolgt man dagegen zeitlich die Lipidationsphase in unserer Studie so sind die stärksten Schwankungen der Hydrierungsparameter in der ersten Stunde ersichtlich. Eine kontinuierliche Messung über die erste Stunde ist also notwendig, um die Effektwirkung auf die Barriere festzustellen. Die Messabstände in unserer Studie waren daher gut gewählt. Gerade in der Zeit, in der Blichmann et al. keine Messungen durchführte, zeigten wir einen Maximaleffekt, der nach ca. 30 Minuten bei der O/W-Emulsion und nach ca. 40 Minuten bei der W/O-Emulsion auftrat (siehe Abb. 13). Nehmen wir die Lipidationsphase als gewünschten längerfristigen Effekt der Emulsionen und den Maximaleffekt als Ziel unserer Emulsionsbehandlung, so sollte spätestens zu diesem Zeitpunkt eine Reapplikation erfolgen, um möglichst zuverlässig den gewünschten längerfristigen Hydrierungseffekt zu erzielen. Zusätzlich zeigten sich zwischen den zwei Studien Unterschiede in der Länge der Effektwirkung. Eine Erhöhung der Hydrierungsparameter war bei Blichmann et al. über den gesamten Zeitraum von 360 Minuten nachweisbar, während in unserer Studie diese Zeiten zwischen 20 und 50 Minuten liegen. Die Effektwirkung einzelner Emulsionen ist also unterschiedlich. Zur Abschätzung und Validierung längerfristige Effekte insbesondere nach wiederholter Applikation muss daher ein RAT erfolgen.

5.1.2 Repeated-Application-Test (RAT)

Der Repeated-Application-Test beinhaltet die wiederholte Anwendung von Emulsionen, um kumulative Effekte bzw. Langzeiteffekte erfassen zu können. Die Emulsion wird täglich über einen definierten Zeitraum, der mehrere Tage bis Monate betragen kann, angewendet. Zeitpunkt, Menge und Anwendungsweise der Emulsion werden vorgegeben. Auch hier bieten sich die volaren Unterarme als Anwendungsort an. Als Irritationsverfahren werden neben dem Tape-Stripping-Verfahren auch zeitlich aufwendigere Verfahren wie die Behandlung mit Sodium Lauryl sulphate (SLS) angewendet. Die Zeitpunkte für Irritation und Messungen im Tagesverlauf sind vorgegeben und standardisiert wird die SC-Hydrierung wie der TEWL gemessen.

In einem RAT-Verfahren baute Serup et al. auf der Studie von Blichmann et al. auf. Er wendete dabei dieselbe Emulsion 2x täglich (morgens nach dem Waschen und abends vor dem zu Bett

gehen) über 7 Tage an und führte Messungen bis 14 Tage nach der ersten Anwendung durch. Dabei zeigte sich ein signifikantes Ansteigen der Hydrierung mit einem Plateau am 2. Tag nach der ersten Anwendung und einem anhaltenden Hydrierungseffekt bis 7 Tage nach der letzten Anwendung (Serup et al., 1989). Es ist also möglich, durch regelmäßige Anwendung der Emulsion einen Effekt zu erzielen, der über die Anwendungsdauer hinausgeht. Aufgrund der kürzeren Wirkdauer der Emulsionen bei unserem SAT (gegenüber Blichmann et al.) sollten womöglich häufigere Anwendungen während des Zeitraumes und/oder eine mögliche initial vermehrte Reapplikation in den ersten Tagen bis zur gewünschten Hydrierung mit anschließender Erhaltung des Hydrierungsstandes in einem weiteren RAT erfolgen. Um dafür die pharmakokinetischen Wirklängen einer Emulsion herauszufinden, lohnt es sich einen SAT einem RAT voranzustellen.

5.2 Wirkungselemente der Emulsionen

5.2.1 Pharmakokinetik der Emulsionen

Pharmakokinetische Eigenschaften einer Emulsion bestimmen den Wirkbeginn und die Wirklänge. Dabei zeigt sich eine gegenseitige Beeinflussung von physikochemischen Charakteristika des Wirkstoffes, den Eigenschaften des Vehikelsystems sowie den Bedingungen des Akzeptors Haut. (Otto et al., 2009; Wohlrab 2016). Es wird schnell deutlich, dass die drei Drehschrauben der pharmakokinetischen Eigenschaften individuellen Voraussetzungen angepasst werden müssen, um ein optimales individuelles Ergebnis zu erzielen. Wünschenswert ist es, die Emulsion immer dem aktuellen Zustand der Haut anzupassen. Sobald eine Emulsion appliziert wird, zeigt sich eine Pharmakokinetik, die man in drei ineinander funktionell überlappende Abläufe unterteilen kann: Liberation, Penetration und Permeation. Während der Liberation werden aktive Inhaltsstoffe, gelöste und suspendierte Wirkstoffe, aus der Emulsion freigesetzt. Nur die freigesetzten Stoffe können bioverfügbar werden. Die Penetration ist ein Verteilungsprozess, der Stoffe innerhalb einer Vielzahl von Mikrokompartimenten in den verschiedenen Hautschichten diffundieren lässt. Erklärt wird die Penetration mittels Fickschen Diffusionsgesetzes:

$$J = DK (C_v - C_r)/h$$

J = Steady state ($\mu\text{g}/\text{cm}^2\text{xh}$), D = Diffusionskoeffizient (cm^2/h), $C_v - C_r$ = Konzentrationsgradient ($\mu\text{g}/\text{cm}^3$) in den meisten Umständen $c_r \ll c_v$, h = Diffusionsstrecke (cm), K = Trennkoeffizient zwischen SC und Emulsion. Es ergibt sich, dass die Diffusion durch die Haut durch Steigerung der Konzentrationsunterschiede, der Diffusionsfläche und des

Diffusionskoeffizienten (Eigenschaften der Kompartimente) sowie durch eine Minderung der Diffusionsstrecke verbessert wird (Otto et al. 2009; Wohlrab 2016). Weitere physikochemische Parameter, die einen Einfluss auf die Diffusion haben sind: Hydratationszustand des SC, Temperatur und behandelte Oberfläche. So kann die Penetration durch physikalische Methoden wie Okklusionsbedingungen, Iontophorese, Ultraschall oder Enhancer (Penetrationsverbesserer) gesteigert werden (Trommer und Neubert, 2006). Zusätzlich spielt die Konvektion in Abhängigkeit des Druckgradienten (Hagen-Poiseuillesches Gesetz) eine Rolle. Als Permeation schließlich wird der Prozess bezeichnet, bei dem der Wirkstoff einige oder alle Hautschichten durchdrungen hat und in tiefere Gewebsschichten eindringt. Es wird ersichtlich, dass die Permeation gleichzeitig von den pharmakodynamischen Eigenschaften des Wirkstoffes abhängen. Zusätzlich kann es sein, dass der Wirkstoff in einer lipidreichen Emulsion gut löslich ist, für die Regeneration des SC aber eine Emulsion auf Wasserbasis erforderlich ist. Die pharmakodynamischen Eigenschaften müssen also nicht unbedingt zu der erforderlichen Emulsion passen, sodass der Therapeut abwägen muss, was nun vordergründig angemessen ist (Wohlrab, 2016). Wir untersuchten den Wirkbeginn und die Wirklänge von Emulsionen ohne weitere Wirkstoffe. Nach Auftragen der Emulsion erfolgte die Liberation und Penetration. Erst als eine bestimmte Menge der Emulsion penetriert war, änderten sich die Hydrierungsparameter. In unserer Studie erreichten wir diesen Zustand nach 20 Minuten (siehe Abb. 12). Es ist gut möglich, dass dies nicht der exakte Zeitpunkt ist und wir in unserer Studie die Messabstände noch zu groß wählten. Ebenso hängt diese Zeit auch von der Hautbeschaffenheit (Diffusionsstrecke und Kompartimente) ab, so dass individuelle Schwankungen dieser Zeit möglich sind. Für die Praxis bedeutet dies, dass einige Zeit vergehen muss ehe die Wirkung beginnt. In dieser Zeit ist es notwendig, für eine ungehinderte Diffusion und Verteilung, die Emulsion unangetastet auf der Haut zu lassen, um damit Konzentrationsunterschiede aufzubauen.

5.2.2 Penetrationswege von Wirkstoffen, Wasser und Lipiden

Es gibt verschiedene Passagewege eines Wirkstoffes durch die Haut: Entweder durch das SC oder über die Hautanhangsgebilde. Der transglanduläre und transfollikuläre Weg scheinen trotz ihres geringen Anteils (0,1 – 1%) an der Gesamtoberfläche für die Penetration von Bedeutung zu sein, da sie ihren Diffusionskoeffizienten um das 10-fache steigern können und somit einen Porenweg durch das SC darstellen (Trommer and Neubert, 2006). Über das SC kann der Weg transzellulär sowie interzellulär erfolgen. Die Korneozyten besitzen dicht gepacktes Keratin, äußerst stabile Zellmembranen, lipophile und hydrophile Substanzen, die überwunden werden

müssen. Interzellulär befinden sich vor allem die Lipide und allen voran die Ceramide, welche durch ihre Wechselwirkung eine wesentliche Rolle bei der Penetration von Molekülen spielen. Der interzelluläre Transportweg bietet einen geringeren Widerstand zur Diffusion und ist der Hauptpenetrationsweg von Stoffen über das SC (Trommer and Neubert, 2006; Kasting et al., 2003). Dabei bieten die Lipide über ihre hydrophile Kopfgruppe hydrophilen Substanzen und über ihre lipophile Ketten den lipophilen Substanzen Passagemöglichkeiten.

Sieht man sich nun die Emulsion an, so besteht diese aus drei Phasen: eine wässrige, eine ölige und eine emulgierende Phase. Je nach äußerer Phase wird somit unterschieden zwischen einer O/W-(hydrophile äußere Phase), einer W/O-(lipophile äußere Phase) und einer amphiphilen Emulsion mit O/W- und W/O-Bestandteilen (Wohlrab, 2016). Optimaler Weise werden der lipophile und der hydrophile Penetrationsweg genutzt. Wasser ist dabei ein elementarer Baustein in den Emulsionen und in der Haut. Es ist bekannt, dass Wasser in der Membran für Elastizität und Flexibilität sorgt, durch enzymatische Prozesse die Desquamation unterstützt und die Wärmeregulation über Verdunstung mitreguliert (Alonso et al., 1996; Verdier-Sevrain and Bonte, 2007). Es liegen ca. 90-100% des Wassers intrazellulär vor (Norlen, 2006). Das Wasser kommt im SC in drei Konfigurationen vor: Zum einen fest gebunden an SC-Strukturen und hygroskopischen Proteinen (<9%), weniger fest gebunden an festgebundenen Wassermolekülen und freie Wassermoleküle (9-28%), die Hydrogenbindungen mit Nachbarmolekülen aufbauen und abbauen können (ca. 33%) (Boireau-Adamezyk et al., 2014b; Alonso et al., 1996). Es zeigt sich ein Wassergradient über dem SC, wobei die äußeren Schichten weniger Wasser aufweisen als die inneren. Zusätzlich zeigt sich ein Konzentrationsgradient der wasserbindenden Moleküle des NMF mit der höchsten Konzentration in den äußeren Schichten. Somit ist das Wasser in den äußeren Schichten des SC weniger vorhanden als in den inneren Schichten. Das Wasser in den äußeren Schichten des SC ist dafür zu einem größeren Teil fest gebunden im Gegensatz zu dem Wasser der inneren Schichten des SC (Boireau-Adamezyk et al., 2014b). Für die Anwendung von Emulsionen heißt dies: Wenn man möchte, dass das Wasser in den äußeren Schichten des SC bleibt und nicht verdunstet, muss man der Emulsion wasserbindende Moleküle zuführen (z.B. Glycerin, Lipide). Unsere Studie zeigt, wie wichtig das Wasser als Bestandteil der Haut und der Emulsion ist. Es zeigte sich auf gestrippter und ungestrippter Haut ein Barriereeffekt nach 20 Minuten bei der Anwendung einer O/W-Emulsion (siehe Abb. 12). Dagegen war bei der W/O-Emulsion, nach dem Stripping-Verfahren, erst nach 30 Minuten ein signifikanter Effekt messbar. Während das Wasser gut durch gestrippte und ungestrippte Haut diffundiert, müssen die Lipide erst in die Membranen integriert werden bis ein Barriereeffekt entstehen kann. Dennoch stellen Lipide einen wichtigen Faktor für den Aufbau der Barriere dar. Bei der Wahl der Lipide sollte jedoch

darauf geachtet werden, dass je nach Hautzustand, Alter, Geschlecht etc. ein unterschiedlicher Lipidanteil einzelner Lipide im SC vorhanden ist und benötigt wird (Denda et al., 1993; Cho et al., 2012). Die Lipidkomposition, sowie der Wasseranteil haben eine deutliche Wirkung auf die Haut und müssen angepasst werden. Zusätzlich dazu finden nach Applikation weitere Stoffwechselprozesse im SC statt, die bedacht werden sollten. Brod et al. zeigte dabei in seiner Studie, dass Fettsäuren nach einigen wenigen wiederholten Applikationen in dem betroffenen Gewebe akkumulieren können, obwohl sie nur eine kleine Komponente der Emulsion ausmachen. Zusätzlich können sie von mehrfach ungesättigten Fettsäuren zu polyoxyl acyl Lipiden mittels Lipoxygenase moduliert werden (Brod et al., 1988). Den Wirkungseffekt von Lipiden konnten wir in unserer Studie auf gesunder Haut zeigen (siehe Abb. 12). Es machte sich deutlich bemerkbar, ob eine O/W- oder eine W/O-Emulsion angewandt wurde. Der TEWL war zeitlich bei der W/O-Emulsion länger erniedrigt als bei der O/W-Emulsion. Es ist also anzunehmen, dass auf gesunder Haut das Wasser der O/W-Emulsion zu einem großen Teil verdunstet oder in Kerneozyten aufgenommen wird, während der Hydratationseffekt durch die wasserbindenden Lipide der W/O-Emulsion aufgebaut wird. Gloor und Gehring schlussfolgerten: Da sich die W/O-Emulsion auf der Haut entmischt, zeigt sich eine relativ geringe Okklusivität. Die Lipidschicht, die sich auf der Haut bildet, sei vielfach durchlöchert durch die Entstehung von Wasserbläschen, die verdunsten. Der Hydratationseffekt dürfte teilweise durch Einlagerung von Wasser bedingt sein, das aus der Emulsion frei wird. Der Barriereeffekt der W/O-Emulsionen ist mit dauerhaft erniedrigtem TEWL langfristig messbar (Gloor and Gehring, 2001; 2003). Sparr et al. äußerten dazu, dass W/O-Emulsionen und O/W-Emulsionen auf der Haut eine äußere Phase bilden. Diese weist eine unterschiedliche Resistenz auf und vermittelt dadurch okklusive bzw. semiokklusive Effekte (Sparr et al., 2013). Nach einer bestimmten Zeit lässt der Barriereeffekt allerdings nach. Möglich ist eine Erklärung mittels lateraler Verteilung der Emulsionen. Laut Jacobi et al. findet sowohl laterale Verteilung als auch eine Diffusion in die Tiefen statt. Dabei bieten tiefe Furchen vorwiegend die Möglichkeit sich weiter lateral auszubreiten. Die Tiefe der Furchen ist je nach Körperregion unterschiedlich (Jacobi et al., 2011). Dies könnte ein Aufbrechen der Lipidschicht erklären, welches wiederum zum Anstieg des TEWL führt. In unserer Studie tritt dieser Effekt der O/W-Emulsion nach 40 Minuten und der W/O-Emulsion nach 90 Minuten auf (siehe Abb. 12, 13). Interessant dabei ist, dass in unserer Studie der Hydrierungseffekt bei beschädigter Haut (gestrippter Haut) länger anhält. Ob dies an der Minderung der Furchen und damit schwierigeren Verteilungsmöglichkeit liegt, bleibt offen.

5.2.3 Wirkungen von Emulgatoren

Neben Wasser und Lipiden stellt schließlich der Emulgator einen entscheidenden Faktor der Emulsionen dar. Es gibt in O/W-Emulsionen Emulgatoren mit hydrophiler Komponente und in W/O-Emulsionen Emulgatoren mit lipophiler Komponente. Dabei ist nicht ganz klar auf welche Weise Emulgatoren wirken. Bei der Wirkung hydrophiler Emulgatoren ist eine partielle Entfernung der Hornschichtlipide denkbar, die zu einer Exsikkose und einer Barrierestörung des SC führen (Gloor and Gehring, 2003). Bei lipophilen Emulgatoren dagegen ist eine Einlagerung von Emulgatoren in die SC-Lipidlamellen möglich. Dadurch müssen sich die Lipide neu orientieren und Lipidschichten neu aufgebaut werden. Dies führt zu einer Verbesserung der Permeabilität der Lipidlamellen und zu einer Steigerung der Penetration (Gloor and Gehring, 2003; Trommer und Neubert, 2006). Möglich ist zudem eine Störung der Differenzierung der Keratinozyten (Willis et al., 1989). Auch die Filaggrinsynthese könnte dadurch gestört werden und damit die Möglichkeit wasserbindende Faktoren zu bilden. Ebenso wurde bereits eine keratolytische Aktivität von Mikroemulsionen herausgefunden, die am ehesten auf die Einwirkung von Emulgatoren zurückzuführen ist (Gloor et al., 2003). Um dem Austrocknen der Haut durch Emulgatoren entgegenzuwirken, wäre eine Anwendung von hygroskopischen Substanzen (neben den Lipiden) sinnvoll. Diese sorgen dafür, dass das Wasser im SC gebunden bleibt (Loden, 2012). Wohlrab et al. untersuchte in einer Studie den Einfluss von hygroskopischen Substanzen und fand heraus, dass diese wiederum nur eine geringe Bedeutung beim Einsatz von W/O-Emulsionen spielen und die Effekte vielmehr auf Okklusionsphänomenen der lipophilen Phase beruhen. Die innere hydrophile Phase hat trotzdem Anteil an der Bioaktivität. Hygroskopische Zusätze in W/O-Emulsionen sollten dabei eine geringere Bedeutung besitzen als in O/W-Emulsionen und nur in niedrigen Konzentrationen verwendet werden (Wohlrab et al., 2016). Zu diesem Schluss kommen auch Gloor und Gehring, die zusätzlich O/W – Emulsionen mit Glycerin und Harnstoff testeten. Allerdings schränkten sie die barriereverbessernde Wirkung ein, da sie aus ihrer Sicht nur als Verbesserung der Barriereregeneration gedeutet werden kann, bei unbekanntem Mechanismus (Gloor and Gehring, 2003). Wie stark der Einfluss der Emulgatoren auf das SC ist hängt schließlich davon ab, in welcher Konzentration sie vorhanden sind und welche genauen Emulgatoren eingesetzt wurden.

5.2.4 Wirkung des pH-Wertes

Der natürliche pH-Wert der gesunden Haut liegt durchschnittlich bei 4,7. Haut mit einem pH-Wert < 5,0 ist in besserer Kondition als Haut mit einem pH-Wert von > 5,0 (Lambers et al.,

2006). Eine große Aufgabe des pH-Wertes ist die Regulation der Barrierehomöostasis durch die Kontrolle enzymatischer Prozesse. Es handelt sich dabei um Enzyme, die postsekretorische Lipidvorläufermoleküle abbauen. Diese arbeiten überwiegend bei einem sauren pH-Wert (Mauro et al., 1998). Eines dieser Enzyme ist die saure Sphingomyelinase, welches das pH-abhängige Enzym Cathepsin D (Asparat Protease) reguliert. Cathepsin D wiederum ist involviert in die Aktivierung der Keratinozyten Transglutaminase 1, die die CE-Protein Expression während der epidermalen Differenzierung reguliert (Egberts et al., 2004). Die saure β -Glucocerebrosidase ist ein weiteres Enzym, das normalerweise in den Lysosomen lokalisiert ist und die (Glucosyl-) Ceramide für den Aufbau der Barriere des SC in Ceramide umwandelt. Es hat sich gezeigt, dass im SC die β -Glucocerebrosidase zum großen Teil extrazellulär vorhanden ist und dem Einfluss des extrazellulären pH-Wertes ausgesetzt ist (van Smeden et al., 2017). Damit ist der Aufbau der Barriere, sowie die Differenzierung und Desquamation, pH-Wert-abhängig. Mit der Nutzung von zwei unverbundenen Superbasen, welche selektiv den pH-Wert im SC (ohne den Beweis einer Toxizität oder Inflammation) erhöhen, konnte Hachem et al. zeigen, dass die Homöostase der kutanen Permeabilität und die SC Integrität und Kohäsion, durch Erhöhung des pH-Wertes beeinflusst werden (Hachem et al., 2003). Der pH-Wert reguliert die Aktivität der Serine Protease Chymotryptischer Enzyme (Kallikrein 7), welche beteiligt sind bei dem Zerfall von Korneodesmosomen und der Desquamation (Furio et al., 2014). Ein weiterer Faktor, der pH-Wert abhängig reguliert wird, ist die Hautbesiedlung mit Bakterien. *S. epidermidis* wächst unter in-vitro sauren pH-Wert-Konditionen (pH 4,7) mit Lactat besser als bei neutralem pH-Wert. Dagegen zeigt das Wachstum von *S. aureus* eine starke Inhibition unter diesen sauren Konditionen. Ein saurer pH-Wert erhält die bakterielle Hautflora, ein alkalischer pH-Wert führt zur Abweichung der normalen Hautflora (Lambers et al., 2006). Es zeigt sich daher eine Notwendigkeit dafür zu sorgen, dass die Emulsionen für die Erhaltung des physiologischen Haut-pH-Wertes einen sauren pH-Wert besitzen. Schreml et al. untersuchte den Einfluss des pH-Wertes auf die Haut mittels 10%iger Glycol-Säure enthaltenen O/W-Emulsion mit einem pH-Wert von 4. Die Emulsion führte zu einem Abfall des pH-Wertes auf der Hautoberfläche und in der Haut bereits nach 10 Minuten und hielt über drei Stunden an (Schreml et al., 2012). In einer Langzeitstudie konnten diese Ergebnisse geteilt werden. Mit einer O/W-Emulsion mit einem pH-Wert von 4 (ohne Ceramide) und Pflanzenölen konnte nicht nur der Haut-pH-Wert gesenkt, sondern auch der Ceramidlevel gehoben werden (Blaak et al., 2017). Diese Studien wurden jedoch nur an O/W-Emulsionen durchgeführt. Die zwei unterschiedlichen Emulsionstypen (W/O und O/W) zeigen unterschiedliche Eigenschaften und unterscheiden sich somit in Hinsicht der Beeinflussung des pH-Wertes. Im Falle einer W/O-Emulsion muss die angesäuerte innere Wasserphase freigesetzt werden, welche stark von der

Stabilität der Emulsion abhängt. Eine stabile W/O-Emulsion könnte die Freisetzung von H⁺ Ionen verlangsamen und im Vergleich zu O/W-Emulsionen zu einem verspäteten pH-Wert-erniedrigenden Effekt führen. Langzeitstudien mit W/O-Emulsionen und einem pH-Wert von 4 zeigten nicht nur einen Anstieg der Hauthydratation, sondern auch eine signifikante Senkung des pH-Wertes schon nach 14 Tagen, die bis zu 28 Tagen anhielt (Behm et al., 2015). Diese Ergebnisse lassen schlussfolgern, dass die Hauthydratation mit der Beeinflussung des pH-Wertes einhergeht. Somit lässt sich sagen, dass eine gute Hauthydratation nicht nur für enzymatische Prozesse, sondern auch für die Ansäuerung, für die Hautflora und den Aufbau der Hautbarriere einen wichtigen Faktor spielt. Dies sollte in weiteren Studien mehr Beachtung finden.

5.3 Tape Stripping

Das Stripping soll eine dünne Haut mit geschädigter Hautbarriere, weniger Lipiden und dem Aufbrechen des Wassergradienten über dem SC simulieren. Es wird angenommen, dass solch eine wiederholte Irritation der Haut als eine Ursache für eine atopische Dermatitis oder irritative Kontaktdermatitis darstellt (Raney und Hope, 2006). Wir nehmen an, dass das SC eine makrobiologische Membran ist, die den bidirektionalen Transport von Wasser, Ionen und Makromolekülen reguliert. Änderungen der Membranfunktionen zerstören den Ionengradienten über der Membran und die Fähigkeit das Wasser und die Makromoleküle zu transportieren (Smith, 1999). So ist es nicht erstaunlich, dass eine Extraktion der Lipide zu einem Anstieg des TEWL führt. Extern applizierte Stoffe können nun relativ frei in die Haut penetrieren (Gao et al., 2013). Eine Störung der Membran kann schließlich dazu führen, dass Signale ausgesendet werden (Cytokine), die für die Mobilisierung des epidermalen und dermalen Metabolismus sorgen. Eine Freisetzung von Cytokinen führt zu einem Hauterythem und der Freisetzung von proliferativen Cytokinen, die wiederum die DNA-Synthese der Basalzellen und die Produktion von Lipiden stimuliert (Smith, 1999). In seiner Studie fand Gao et al. heraus, dass der TEWL signifikant nach sequentiellem Tape Stripping steigt, dass die Tendenz von drei anatomischen Stellen unterschiedlich ist und dass sobald die Hautbarriere gestört wird, der TEWL erst langsam und dann dramatisch steigt. Mit steigendem Wasserverlust wird die Haut gleichzeitig rau und trocken. Dies geschieht je nach anatomischer Stelle unterschiedlich. Weiterhin zeigte er: je mehr Strips entfernt werden und je größer der Barrierschaden ist, desto stärker halten die Kerneozyten zusammen. Die interkorneozytäre Adhäsion steigt mit der Tiefe des SC. Schließlich postulierte er drei Phasen anhand des TEWL nach/durch das Stripping-Verfahren:

1. Phase: 1. – 10. Tape:

Durch den Verlust der superfiziellen SC Zellen, beginnt die Schädigung der Hautbarriere, der TEWL steigt sichtbar aber verschlechtert sich nur allmählich.

2. Phase: 10. – 20. Tape:

Das SC wird weiterhin gestriipt, die Hautbarriere wird weiterhin gestört, aber die Störung bleibt ausgeglichen durch eigene Gegenregulationen. Der TEWL wird kleiner und stabil.

3. Phase: 20. – letzter Tape:

Die Störung der Hautbarriere steigert sich. Die Haut kann den TEWL nicht mehr ausgleichen und der TEWL fängt an stark zu steigen (Gao et al., 2013).

Allerdings ergibt sich eine individuelle Differenz in der Anzahl der Strips, die benötigt werden, damit sich der TEWL verändert. Dickel et al. untersuchte dies in seiner Studie und fand heraus, dass die Anzahl der benötigten Strips individuell verschieden sind bis das glitzernde Stratum lucidum (SL) erscheint und der mediane TEWL individuell durch das Stripping steigt. Er errechnete daraufhin einen Korrekturfaktor von 0,4. Es ergab sich die Formel: $a = A \times \frac{11}{26} \cong A \times 0,4$; A = individuelle Anzahl der Strips bis zum Erscheinen des SL; a = individuelle Anzahl der Strips bis zu einem signifikanten Anstieg der TEWL (Dickel et al., 2004). Dagegen allerdings spricht, dass Jacobi et al. keine Korrelation zwischen der Anzahl des Tape Strips und der Tiefe des SC herausfinden konnte. Er zeigte zudem, dass unterschiedlich viel SC entfernt wurde, je nach Vorbehandlung der Haut (Jacobi et al., 2003). Dies deckt sich mit der Erkenntnis von Kalia et al., dass erst eine Entfernung von ca. 6-8 μm den TEWL steigen lässt und mit der Studie von Weigmann et al. Er stellte fest, dass vor allem die ersten 3 – 5 Strips der äußersten Hautschicht die entscheidenden für die Aufnahme und Penetration von Emulsionen sind (Kalia et al., 1996; Weigmann et al., 2005). Nach der Durchführung des Stripping-Verfahrens nach Dickel et al. konnten wir keinen signifikanten Anstieg des TEWL im Vergleich zur unbehandelten Haut feststellen (siehe Abb. 6,7). Auch mittels Corneometer konnten wir keinen deutlichen Unterschied feststellen (siehe Abb. 4,5). Erklärt werden kann dies möglicherweise durch die Arbeit von Gao et al. mit der 2. Phase, in der die Hautbarriere beschädigt und dennoch fähig ist den TEWL auszugleichen. Möglicherweise lag es auch an technischen Details, dass die Durchführung nicht das entsprechende Ergebnis brachte. So gibt es Studien, die um ein gleich starkes Andrücken des Tapes zu gewährleisten, einen gewichteten Roller benutzen oder einen steel force applicator. (Atrux-Tallau et al., 2008; Wiedersberg et al., 2009) Um einen minimalen Einfluss von Furchen und Falten zu gewährleisten sowie die Hautoberfläche zu stretchen, wurde z.B. das Stripping mittels Metallstange durchgeführt. (Roussel et al., 2015). Auch ein

Markieren des Areal mittels Klebefolie oder Polypropylen-Folie mit einem definierten Loch zur Verhinderung von lateraler Verteilung wurde schon probiert (Jacobi et al., 2011; Wiedersberg et al., 2009). Dass der TEWL in unserer Studie nach Auftragen der Emulsion auf gestrippter Haut signifikant und deutlich im Vergleich zur unbehandelten, gestrippten Haut anstieg, spricht gegen einen Verfahrensfehler. Wir gehen also davon aus, dass die gesunde Haut der jungen Teilnehmer den Barrierschaden gut kompensieren konnte. Bashir et al. stellten ebenfalls in ihrer Studie keine Phase und keine lokalisationsbezogenen Unterschiede des TEWL nach dem Stripping-Verfahren auf der Haut fest. Sie fanden eine Erklärung darin, dass der TEWL durch den Verlust der Masse ansteigt. Die Tapes haben unterschiedliche Adhäsionskräfte und können womöglich unterschiedlich viel Masse entfernen. Dies führte bei ihnen nicht zu einer ausreichenden Störung der Hautbarriere (Bashir et al., 2001). Die Wirkung der Tapes hängt auch von der Hautbeschaffenheit sowie der Dicke des SC ab. Diese wiederum unterscheidet sich je nach Hautlokalisierung sowohl im SC als auch in der zellulären Epidermis (Sandby-Moller et al., 2003). Damit hat die Lokalisation des Stripping Verfahrens einen Einfluss auf die Wirkung jedes einzelnen Tapes auf die Haut und damit auf den Anstieg des TEWL (Loffler et al., 2004). Weiterhin gibt es wenige Angaben darüber wie fest das Tape aufgedrückt werden und mit welcher Geschwindigkeit es wieder gelöst werden sollte (Bashir et al., 2001). Laut Loffler et al. zeigt sich bei einer Andruckdauer von 10s ein größerer Effekt als bei einer Andruckdauer von 2s (Loffler et al., 2004). Neben diesen Ungenauigkeiten gibt es weitere Zeichen einer Schädigung des SC: Eine inflammatorische Reaktion sowie die Aktivierung von Signalen zur Proliferation. So zeigte sich 40 h nach Störung der Barriere ein Anstieg von Ki-67-positiven Zellen in den tieferen Schichten des SC (van Erp et al., 1989). Ebenso wurde dies für Keratin 16 herausgefunden (Mare et al., 1989). Bei einem wiederholten Stripping entsteht ein „Plateau“, spätestens nach 2 Tagen für alle Marker, das sich dann nach dem letzten Stripping in 5 Tagen zurückbildet (nukleäre Bindung zu Ki-67, Keratin 10 und 16). Die Expression von Filaggrin und Involucrin bleiben dagegen in dieser „Plateau“-Phase. Das Filaggrin ist nach einem Single-Tape-Stripping erniedrigt und erhöht sich nach 7 Tagen signifikant bei wiederholtem Stripping (Gerritsen et al., 1994). Smith zeigte in seiner Studie, dass das Tape-Stripping-Verfahren zu einem Anstieg des TEWL für 24 h führt (Smith, 1999). Somit ist der TEWL wieder im Normbereich, während die Expression von Molekülen zur Proliferation erst später beginnt. Dieser Zusammenhang wurde jedoch noch nicht gemeinsam untersucht und steht noch offen.

In unserer Studie zeigte sich auch ein deutlicher Unterschied der Wirkungen zwischen gestrippter und ungestrippter Haut. Sowohl die O/W- als auch die W/O-Emulsion zeigen eine länger anhaltende Erniedrigung des TEWL nach Auftragung der Emulsion (siehe Abb. 14,15).

Der Zeitraum, in denen bei beiden Emulsionen ein signifikant niedriger TEWL vorliegt gleicht sich an (Vergleich zu Abb.12, 13). Somit zeigt sich nach dem Stripping-Verfahren und der Schädigung der Barriere, dass sowohl die O/W- als auch die W/O-Emulsion effektiv den TEWL verhindern, während dies bei gesunder Haut durch die W/O-Emulsion gezeigt wurde. Eine lipidreiche Emulsion ist somit sowohl bei geschädigter als auch gesunder Haut barriereprotektiv. Dagegen zeigt die O/W-Emulsion bei geschädigter Haut länger anhaltende Vorteile. Dies gleicht den Erkenntnissen von Gloor. Er beschreibt, dass bei einer gestörten Barriere mit dehydrierter Hornschicht entweder eine PEG-Salbe, eine W/O-Emulsion oder eine Glycerol-enhaltende Emulsion (O/W oder W/O) angewendet werden sollte. Die O/W-Emulsion sollte dafür nicht weniger als 8,5 % Glycerol enthalten (z.B. nicht-ionische hydrophile Creme DAB). In diesem Fall wäre für eine O/W-Emulsion der Anteil der Lipide mit 20 % relativ hoch. Dies ist zu bevorzugen, da z.B. auch die atopische Hornschicht wenig Fett enthält (Gloor, 2004). Natürlich lässt der Effekt nach einiger Zeit nach und eine wiederholte Gabe sollte erfolgen. Dabei werden die meisten langen Studien über einen Monat (28 Tage Zyklus der Haut) durchgeführt und es ist wenig bekannt über Monate und Jahre andauernde Anwendungen.

5.4 Sensitive Haut

Sensitive Haut ist in unserer Gesellschaft weit verbreitet. Eine der ersten Zeichen für Sensitive Haut sind sensorische Beschwerden der Haut. Weiterhin ist Sensitive Haut assoziiert mit trockener Haut und der Neigung zur Rötung. Beides kann zu Barrierebeeinträchtigung, erhöhter vaskulärer Reaktivität, erhöhtem pH-Wert und erhöhtem TEWL führen. Dies tritt gehäuft als unerwünschtes Ereignis nach Anwendung von kosmetischen Produkten auf (Willis et al., 2001; Bornkessel et al., 2005). Zum Beispiel steigt nach der Benutzung einer unangemessenen Waschemulsion sowohl der Hautoberflächen-pH als auch der TEWL. (Bornkessel et al. 2005) Weitere Ursachen sind Sonnenexposition, psychologischer Stress und vieles mehr (Jeong et al., 2016). Eine Störung der Membran führt, ähnlich einer gestrippten Haut, zur Entzündung und zur Produktion von Zytokinen, die eine Reparatur initiieren (Tsai et al., 1994). Auch eine Erhöhung der Prostaglandine und Leukotriene als Zeichen einer Inflammation wurden schon untersucht, sowie eine erhöhte Permeabilität des SC für einige Substanzen (Issachar et al., 1998). Vergleichend führt auch das Stripping-Verfahren zu einer inflammatorischen Reaktion und einer erhöhten Permeabilität. Zeigt eine Emulsion schon nach dem Stripping-Verfahren eine deutliche Besserung mit guter Verträglichkeit, so ist es möglich diese ohne weiteres an sensibler Haut zu testen. In unserer Studie verwendeten wir

Emulsionen, die explizit für sensitive Haut hergestellt wurden. Zur Vorbeugung jeglicher Inflammation sind sie hypoallergen. Für beide Emulsionen konnten wir gute Verträglichkeiten auf der gestrippten Haut feststellen. Dabei zeigte sich nach der Barrierschädigung sowohl für die O/W- als auch für die W/O-Emulsion ein erniedrigter TEWL (siehe Abb.14). Sie wirken auf geschädigte Haut barriereprotektiv und bieten damit sensitiver Haut eine sinnvolle Anwendung. Es ist allerdings möglich, dass die Wirkungen unserer Emulsionen sich über einen längeren Zeitraum verändern. Beispielhaft untersuchte Jeong et al. zwei unterschiedliche Emulsionen, wobei bei einer Emulsion nach 2 Wochen Anwendung der TEWL stieg. Warum die Wirksamkeit der einen Emulsion sich von der anderen unterschied ist unklar. Möglich wäre dabei andere molare Menge der Lipide, andere Zusammensetzung der Lipide oder eine Anwendung von verschiedenen Antioxidantien und Hyaluronaten in den Emulsionen (Jeong et al., 2016). Auch der Glycerolgehalt kann einen Einfluss nehmen (Gloor, 2004). Jedoch ist es schwierig anhand der Verpackung der kosmetischen Produkte die molaren Verhältnisse der Lipide zu erkennen, da diese Angaben nicht gemacht werden. Ebenso ist es auch nicht möglich den prozentualen Anteil von Glycerin und weiteren Inhaltsstoffen zu eruieren. Die unterschiedlich zugeführten Lipide gliedern sich unterschiedlich in die Membran ein. Zum Beispiel zeigte sich bei chemisch hergestellten Ceramiden eine gute Penetration in die tieferen Schichten des SC mit einer Erhöhung des TEWL, sowohl in der Kurzzeitstudie als auch in der Langzeitstudie (Lintner et al., 1997). Es sollte also eine weitere Studie auf unsere Studie folgen, um die Langzeitwirkungen der Emulsionen zu eruieren.

5.5 Messmethoden Corneometrie und Evaporimetrie

Ein letzter Aspekt, der sich aus unserer Studie ablesen lässt, ist der Unterschied zwischen den Messmethoden Corneometrie und Evaporimetrie. Eine Corneometrie misst elektrische Kapazitätsänderungen über der Haut nach Anlegen einer planen 14 mm² großen Messsonde mit einem Andruck von 3,5 N. Das Plane Anlegen sowie der konstante Druck sind unabdingbar für ein gutes Messergebnis. Eine Corneometrie soll damit den Feuchtigkeitsgehalt der Haut messen, der durch einen Wasser-Fett-Film entsteht (Courage und Khazaka, 2019). Ein genaues planes Anlegen ist nicht immer möglich, da die Haut Furchen und Unebenheiten besitzt. Auch ein Abrutschen der Messsonde ist möglich, trotz genau dosiertem Andruck. Weiterhin sollte man beachten, dass ein elektrisches Signal nicht spezifisch Wasser misst. Durch jede polare Substanz oder chemisches Mittel, das auf die Hautoberfläche aufgetragen wird, kann ein elektrisches Signal gemessen und als Wasser verkannt werden. Damit kann das Outcome falsch

positiv ausfallen. Dies gilt vor allem für Feuchthaltemittel oder andere polare Substanzen (Berardesca et al., 2018).

Wir benutzen eine Evaporimetrie mit einer geschlossenen Kammer, in der mit Sensoren die relative Feuchtigkeits- und Temperaturänderungen gemessen werden (Kraus, 2014). Im Gegensatz zu einer Evaporimetrie mit einer offenen Kammer ist die von uns benutzte Evaporimetrie unempfindlich gegenüber der Umgebungsluft und Temperaturschwankungen. Sie ist auch unempfindlich gegenüber dem unmittelbar direkten Wasserdunstmantel der Haut. Zusätzlich kann Wasserdunst in der Kammer akkumulieren und die Diffusion des Wassers aus der Haut beeinflussen. Somit interferiert die geschlossene Kammer mit dem Wasser in der physiologischen Hautbarriere und kann damit nicht den direkten physiologischen TEWL messen (Berardesca et al., 2018). In Studien mit gestörter Hautbarriere wurde deutlich, dass die Evaporimetrie mit einer offenen Kammer sensitiver und/oder diskriminativer ist und deutlich kleinere Differenzen messen kann als die Evaporimetrie mit einer geschlossenen Kammer (Paepe et al., 2005; Rosado et al., 2005). Schließlich kann man nicht davon ausgehen, dass zwei Evaporimetrien oder Corneometrien genau die gleichen Messzahlen bei möglichen Unterschieden in der Kalibrierung erbringen (Berardesca et al., 2018). Somit haben wir pro Person nur jeweils ein Messinstrument über die gesamte Zeit angewendet. In unserer Studie konnten wir nun Corneometrie und Evaporimetrie direkt vergleichen. Die Messungen mittels Corneometrie ergaben keinen signifikanten Unterschied zwischen gestrippter Haut und ungestrippter Haut (siehe Abb. 8, 10). Weiterhin zeigte sich kein signifikanter Unterschied zwischen O/W-Emulsion, W/O-Emulsion und unbehandelter Haut. Dagegen ließen sich signifikante Ergebnisse mittels Evaporimetrie erfassen (siehe Abb. 12, 14). Dies unterscheidet sich stark von der Studie Blichmann et al. Der Aufbau seiner Studie ähnelte stark dem Aufbau unserer Studie. Er konnte mittels Corneometrie und Evaporimetrie zeigen, dass nach Applikation der Emulsion eine deutliche Steigerung der Hydrierung und eine unmittelbare Erhöhung des TEWL möglich war. Bei ihm verhielten sich die Messungen mittels Corneometrie und Evaporimetrie ähnlich. Zudem zeigte er, dass über einen längeren Zeitraum der TEWL sinkt, während die Hydrierung gesteigert wird (Blichmann et al., 1989). Dies gleicht den Ergebnissen von Lee and Son. Sie nahmen die Messungen 3x hintereinander an der gleichen Stelle durch und verwendeten den Mittelwert zur Auswertung sowohl der Corneometrie als auch der Evaporimetrie (Lee und Son, 2011). In unserer Studie jedoch zeigten sich die Messungen der Evaporimetrie sensitiver als die Messungen der Corneometrie. Es ist möglich, dass die corneometrisch gemessenen Werte stark schwanken und dementsprechend ein Mittelwert mehrerer Messungen eine Annäherung an den tatsächlichen Wert ermöglichen könnte. Wir haben uns jedoch dazu entschlossen nur einen Wert zu messen, da durch ein

planes Anlegen der Corneometrie gleichzeitig ein Teil der Emulsion an dem Gerät verbleibt. Dadurch kann das Ergebnis verfälscht werden. Allerdings ist es möglich, dass die Emulsion polare Substanzen enthält, die zu Schwankungen der Messungen führen. Eine Mehrfachmessung mit möglichem Abtragen der Emulsion könnte dadurch eher eine Annäherung an das eigentliche Ergebnis bringen, zumal zu jedem Messzeitpunkt wieder ein anderer Ort zur Messung gewählt wurde. Außerdem nutzten die Autoren offene Kammern bei der Messung des TEWL, sodass auch Schwankungen in Hinsicht geschlossener und offener Kammer möglich sind. Normalerweise sollen Corneometrie und Evaporimetrie ergänzende Verfahren darstellen (Berardesca et al., 2018). Es ist unwahrscheinlich, dass die Hauthydrierung keine Änderung zeigt, während der TEWL deutliche, signifikante Änderungen vorweist. Somit lassen sich aus unseren corneometrischen Messungen keine signifikanten Schlüsse ziehen.

5.6 Weitere Einflüsse auf das Stratum corneum

Weitere Limitierungen der Studie neben den Messmethoden, dem Stripping-Verfahren, den Emulsionen und den zeitlichen Messungen, zeigen sich z.B. in der kleinen Kohorte, die wir gewählt haben. Sie repräsentiert nicht das Spektrum an SC-Variationen, an individuellen Penetrationsmöglichkeiten von Emulsionen sowie die individuellen Reaktionen auf Irritationen. So ist die perkutane Absorption individuell und nach Roskos et al. abhängig von mind. 3 Faktoren: dem Hydrierungsstatus des SC, der SC-Lipidmasse und Lipidtypen und der kapillären Mikrozirkulation der Haut (Roskos et al., 1989). Der Wassergehalt des äußeren SC wird durch die Dicke des SC, der Schweiß- und Talgsekretion sowie durch physikochemische Eigenschaften des SC selbst beeinflusst (Ya-Xian et al., 1999). Die perkutane Absorption bestimmt schließlich die Wirkung von Emulsionen. Unterschiede in den drei Punkten sind sowohl beim Geschlecht, Alter und Rasse zu finden.

Auch wenn wir hormonelle Einflüsse auf das SC ausschließen wollten und keine schwangeren und stillenden Frauen eingeschlossen haben, sind wir jedoch auf geschlechtsspezifische Unterschiede zur Probandenrekrutierung nicht eingegangen. Geschlechtsspezifische Unterschiede im SC sind zum Beispiel: hormoneller Einfluss auf die Vaskularisation und die nervale Innervation der Haut, hormonell beeinflusste Schweiß- und Talgproduktion, unterschiedliche Korneozytengröße bei prä- und postmenopausalen Frauen, zyklusabhängige Schwankungen des TEWL, geschlechtsspezifische Unterschiede in der Menge einzelner Aminosäuren bei gleicher Menge Proteine, Lipidveränderungen präpubertal zu postpubertal. Außerdem wird die Haut von Frauen im Alter dünner als die von Männern (Escoffier et al.,

1989; Harvell et al., 1992; Denda et al., 1993; Tur, 1997; Ya-Xian et al., 1999; Fluhr et al., 2001; Jacobi et al., 2005). Diese Faktoren haben dementsprechend Einfluss auf die perkutane Absorption und damit auf die Wirkung von Emulsionen. Es bietet sich also an, im Gegensatz zu uns, die kosmetischen Studien geschlechtsspezifisch durchzuführen.

Lokale Unterschiede des TEWL und der SC-Hydrierung haben wir versucht durch eine festgelegte Lokalisation zu vermeiden (Cua et al., 1990). Die Unterarme boten sich dazu an, da sie leicht zugänglich und wenig behaart sind. Zusätzlich lässt sich der rechte gut mit dem linken Unterarm vergleichen. Dabei sind Unterschiede zwischen dem rechten und linken Arm nicht auszuschließen und werden dazu verwendet intrinsisches Altern der Haut von lichtgealterter Haut zu unterscheiden (Boireau-Adamezyk et al., 2014a). D.h. je jünger die Probanden, desto besser lassen sich die Arme vergleichen. Eine weitere Möglichkeit wäre es den Unterarm gegen den Oberarm zu randomisieren um regionale Nähe zu gewährleisten.

Einfluss nimmt auch das Alter auf die Hautfunktionen. Mit zunehmendem Alter sinkt der TEWL, die SC-Dicke nimmt zu, die Lipid/Protein Ratio, der totale Wassergehalt, der Cholesterolgehalt und der Ceramidgehalt nehmen ab und die Talgdrüsensekretion lässt nach (Pochi et al., 1979; Cua et al., 1990; Boireau-Adamezyk et al., 2014a). Man unterscheidet dazu auch intrinsisch gealterte Haut von lichtgealterter Haut, wobei sich die Haut je nach Hautphototyp unterschiedlich verhält (Jacobi et al., 2011; Boireau-Adamezyk et al., 2014a). Auch diese Faktoren haben damit einen Einfluss auf die perkutane Absorption und die Penetration. Somit ist es sinnvoll die Altersspanne möglichst klein zu halten. Unsere Altersspanne von 18 – 55 Jahren zeigt damit schon eine hohe Variabilität auf.

Ein weiterer genereller Faktor ist die Rasse. Je nach Rasse unterscheiden sich der TEWL, die SC-Hydrierung und der Oberflächen pH-Wert der Haut (Fujimura et al., 2018; Young et al., 2018). Weiterhin zeigten sich je nach Rasse eine unterschiedliche Geschwindigkeit des Desquamationsprozesses, eine unterschiedliche Komposition interzellulärer Komponenten, ein unterschiedlicher Ceramidlevel und eine unterschiedliche Aktivität von Talgdrüsen (Darlenski und Fluhr, 2012). So wurden zu unserer Studie nur Kaukasier zugelassen, um diesem Einfluss vorzubeugen.

Weitere Einflussfaktoren wie z.B. die Einnahme von Kaffee und Medikamenten und ihre Wirkung auf die Haut wurden schon in zahlreichen weiteren Studien belegt (Chambin-Remoussenard et al., 1993; Ibrahim et al., 2018). Wir haben versucht möglichst viele Medikamente, die einen Einfluss auf die Haut haben können, auszuschließen. Dazu gehören allgemeine Medikamente wie Retinoide, Lipidsenker und Diuretika, sowie entzündungshemmende Medikamente und vasoaktive Medikamente (Nicolakis und Zouboulis, 2014; Riahi et al., 2016; Layton et al., 2017; Yang et al., 2017; Schaper-Gerhardt et al., 2018). Auch eine

Überempfindlichkeit gegenüber Inhaltsstoffen, wie sie bei sensibler Haut angenommen werden, haben wir versucht auszuschließen (Berardesca et al., 2013). Medikamente werden häufig über einen längeren Zeitraum eingenommen, sodass eine Langzeitwirkung auch nach Absetzen der Medikamente angenommen werden muss. Gesunde Probanden sind daher unerlässlich für Studien dieser Art.

Auch die tägliche Anwendung von kosmetischen Produkten hat ihre Wirkung auf die Haut. Serup et al. zeigte in seiner Studie eine anhaltende Wirkung von Emulsionen sogar 7 Tage nach der letzten Anwendung (Serup et al., 1989). Es sollte also eine Auswaschphase von mind. 7 Tagen erfolgen, um ein mögliches Überschneiden von Wirkungen auszuschließen. Möglicherweise hält die Wirkung sogar über die 7 Tage hinaus an bei einer Regenerationszeit von 28 Tagen. Dies gilt allerdings nicht nur für die Anwendung von Emulsionen, sondern auch für die Anwendung von Waschlotionen, Seifen und Wasser. Ein Überschneiden von Wirkungen unterschiedlicher kosmetischer Produkte ist damit nicht auszuschließen.

Schließlich ist es bekannt, dass saisonale Effekte auf die Haut einwirken. Im Winter sinken die SC-Lipide, die SC-Hydrierung, der TEWL, sowie NMF und weitere Faktoren (Engebretsen et al., 2016). Es zeigt sich also eine Differenzierung je nach Jahreszeit, die sich auch auf die perkutane Absorption auswirken kann. Unsere Studie wurde in der kälteren Jahreszeit durchgeführt. Möglicherweise sind die Effekte in der warmen Jahreszeit weniger stark. Inwieweit diese Aspekte jedoch wirklich Einfluss haben, ist unklar.

Das Auftragen der Emulsion sollte möglichst gleichmäßig erfolgen und gleich dick aufgetragen werden, um vergleichbare Ergebnisse zu erzielen. Die genaue Menge haben wir allerdings nicht notiert. Somit ist es möglich, dass unterschiedlich viel Emulsion an dem aufgetragenen Ort vorhanden war und damit unterschiedlich viel Penetrationsmöglichkeit gegeben wurde. Zum gleichmäßigeren Auftragen wäre zum Beispiel das Nutzen einer Spritze möglich, die sogar gewogen werden kann (Atrux-Tallau et al., 2008; Jacobi et al., 2011).

Eine Akklimatisierungszeit von 15-30 Minuten wurde nach der EEMCP-Guideline durchgeführt, wobei die Probanden möglichst entspannt bleiben sollten. Es ist jedoch schwierig festzustellen, ob die Probanden nun wirklich entspannt sind oder nicht. Physikalischer Stress lässt sich noch überprüfen, während mentaler Stress kaum nachvollziehbar ist. Ein zusätzlicher Faktor ist das Klima während der Messung, das möglichst konstant bleiben sollte. Jedoch erfolgten die Messungen in relativ kurzen Abständen, sodass mögliche Klimaveränderungen durch Bewegung und Reden eingeschränkt, jedoch nicht vollständig verhindert werden konnte. Dies kann auch kein abgeschlossener, klimatisierter Raum ohne Fenster vollständig verhindern.

Aus all dem lässt sich sagen, dass der Hautzustand ein entscheidender Faktor für die perkutane Penetration ist. Da die Hauthydrierung von sehr heterogenen Faktoren abhängig ist, muss eine sehr genaue Probandenwahl durchgeführt werden.

6 Zusammenfassung

Zusammenfassend lässt sich sagen, dass die Applikation von Emulsionen signifikante Effekte auf die Hydrierung des SC für einen bestimmten Zeitraum hat. Das Nachlassen der Effekte im zeitlichen Verlauf macht eine Reapplikation notwendig, welche jedoch praktischer Weise nicht alle drei Stunden erfolgen kann. Unterschiedlich lang anhaltende Effekte der beiden Emulsionstypen zeigen deutlich, dass nur ein Teil des Wassers weitgehend im SC gehalten werden kann und ein großer Teil über der Haut verdunstet.

Nach Auftragen der Emulsionen ergaben sich unterschiedlich lang anhaltende Hydrierungseffekte je nach Emulsion, die sich auf gestrippter Haut anglichen. Es ist anzunehmen, dass das Wasser über den Barrierschaden besser penetrieren kann, aber durch die verminderte Wasserbindungskapazität des SC auch wieder abgegeben wird.

Barriereprotektive Effekte wurden bei gesunder Haut durch W/O-Emulsionen erreicht und auf gestrippter Haut durch O/W-Emulsionen. Dies rechtfertigt die spezifische Anwendung der Vehikel in der Basistherapie chronisch entzündlicher Erkrankungen.

Der SAT als Testverfahren ergibt zudem eine emulsionsspezifische Wirkdauer. Eine Reapplikation, wie sie bei einem RAT angewendet wird, sollte sich nach dieser Wirkdauer richten. Für ein möglichst optimales Ergebnis mit einem zielgerichteten kumulativen Effekt auf die Barriere sollte daher ein SAT einem RAT vorangestellt werden.

Weiterhin zeigte sich ein Maximaleffekt der Emulsionen in der ersten Stunde nach Applikation. Unsere Messabstände haben sich daher als sinnvoll erwiesen. Eine minutengenaue Darstellung der Effekte bringt in diesem Zusammenhang keinen Mehrgewinn an Informationen oder zusätzliche therapeutische Möglichkeiten.

Darüber hinaus zeigte sich als Nebeneffekt eine erhöhte Sensitivität der Evaporimetrie im Gegensatz zur Corneometrie. Eine, in der Literatur beschriebene, Ergänzung der Methoden war nicht festzustellen, sodass der mögliche Grund in der Anwendung oder der Methodik an sich zu suchen ist.

Schließlich ist die perkutane Penetration ein komplexes Geschehen, das von vielen Faktoren abhängig ist. Grundsätzlich sollte bei der Anwendung von Emulsionen auf den Hautzustand, die Emulsionskomponenten und die Hauthydrierung geachtet werden. Nebenfaktoren wie Alter, Ethnie, Geschlecht und Haut-pH-Wert nehmen zusätzlich Einfluss auf den Hydrierungszustand der Haut. Eine individuelle Abwägung bei der Emulsionswahl ist unablässig.

Unsere Studie beruht auf Kurzzeiteffekten und zeigt keine langjährige emulsionsspezifische Beobachtung auf. Diese Kurzzeiteffekte allerdings rechtfertigen eine hautspezifische

Behandlung. Wie sich die Emulsionen auf langer Sicht auf der Haut verhalten und wann bzw. wie Emulsionen im Verlauf angepasst werden sollten, steht für die weitere Forschung offen.

Literaturverzeichnis

- Alonso A, Meirelles NC, Yushmanov VE, Tabak M (1996) Water increases the fluidity of intercellular membranes of stratum corneum: correlation with water permeability, elastic, and electrical resistance properties. *J Invest Dermatol* 106:1058–1063.
- Ananthapadmanabhan KP, Mukherjee S, Chandar P (2013) Stratum corneum fatty acids: Their critical role in preserving barrier integrity during cleansing. *Int J Cosmet Sci* 35:337–345.
- Arseneault M, Lafleur M (2007) Cholesterol sulfate and Ca(2+) modulate the mixing properties of lipids in stratum corneum model mixtures. *Biophysical Journal* 92:99–114.
- Atrux-Tallau N, Huynh NTT, Gardette L, Paillet-Mattei C, Zahouani H, Viviant E, Hirsch H, Marek H, Falson F, Pirot F (2008) Effects of physical and chemical treatments upon biophysical properties and micro-relief of human skin. *Arch Dermatol Res* 300:243–251.
- Bashir SJ, Chew AL, Anigbogu A, Dreher F, Maibach HI (2001) Physical and physiological effects of stratum corneum tape stripping. *Skin Res Technol* 7:40–48.
- Behm B, Kemper M, Babilas P, Abels C, Schreml S (2015) Impact of a Glycolic Acid-Containing pH 4 Water-in-Oil Emulsion on Skin pH. *Skin Pharmacol Physiol* 28:290–295.
- Berardesca E, Farage M, Maibach H (2013) Sensitive skin: an overview. *Int J Cosmet Sci* 35:2–8.
- Berardesca E, Loden M, Serup J, Masson P, Rodrigues LM (2018) The revised EEMCO guidance for the in vivo measurement of water in the skin. *Skin Res Technol* 24:351–358.
- Björklund S, Andersson JM, Pham QD, Nowacka A, Topgaard D, Sparr E (2014) Stratum corneum molecular mobility in the presence of natural moisturizers. *Soft Matter* 10:4535.
- Blaak J, Dahnhardt D, Dahnhardt-Pfeiffer S, Bielfeldt S, Wilhelm K, Wohlfart R, Staib P (2017) A plant oil-containing pH 4 emulsion improves epidermal barrier structure and enhances ceramide levels in aged skin. *Int J Cosmet Sci* 39:284–291.
- Blichmann CW, Serup J, Winther A (1989) Effects of single application of a moisturizer: evaporation of emulsion water, skin surface temperature, electrical conductance, electrical capacitance, and skin surface (emulsion) lipids. *Acta Derm Venereol* 69:327–330.
- Boireau-Adamezyk E, Baillet-Guffroy A, Stamatas GN (2014a) Age-dependent changes in stratum corneum barrier function. *Skin Res Technol* 20:409–415.
- Boireau-Adamezyk E, Baillet-Guffroy A, Stamatas GN (2014b) Mobility of water molecules in the stratum corneum: effects of age and chronic exposure to the environment. *J Invest Dermatol* 134:2046–2049.
- Bornkessel A, Flach M, Arens-Corell M, Elsner P, Fluhr JW (2005) Functional assessment of a washing emulsion for sensitive skin: mild impairment of stratum corneum hydration, pH, barrier function, lipid content, integrity and cohesion in a controlled washing test. *Skin Res Technol* 11:53–60.

- Bouwstra JA, Dubbelaar FE, Gooris GS, Ponc M (2000) The lipid organisation in the skin barrier. *Acta Derm Venereol Suppl (Stockh)* 208:23–30.
- Braun-Falco O, Burgdorf WH, Landthaler M, Plewig G, Wolff HH (2005) *Dermatologie und Venerologie*, 5. Aufl. Springer-Verlag, s.l., S.3-12.
- Breathnach AS, Goodman T, Stolinski C, Gross M (1973) Freeze-fracture replication of cells of stratum corneum of human epidermis. *J Anat* 114:65–81.
- Brod J, Traitler H, Studer A, Lacharriere O (1988) Evolution of lipid composition in skin treated with blackcurrant seed oil. *Int J Cosmet Sci* 10:149–159.
- Chambin-Remoussenard O, Treffel P, Bechtel Y, Agache P (1993) Surface recovery and stripping methods to quantify percutaneous absorption of caffeine in humans. *J Pharm Sci* 82:1099–1101.
- Cho HJ, Chung BY, Lee HB, Kim HO, Park CW, Lee CH (2012) Quantitative study of stratum corneum ceramides contents in patients with sensitive skin. *J Dermatol* 39:295–300.
- Courage + Khazaka electronic GmbH Corneometer CM 820 Information und Bedienungsanleitung:1–9.
- Cua AB, Wilhelm KP, Maibach HI (1990) Frictional properties of human skin: relation to age, sex and anatomical region, stratum corneum hydration and transepidermal water loss. *Br J Dermatol* 123:473–479.
- Daniels R, Knie U (2007) Galenik der Dermatika ? : Grundlagen, Eigenschaften, Freisetzung. *JDDG* 5:---. doi: 10.1111/j.1610-0387.2007.06321_supp.x.
- Darlenski R, Fluhr JW (2012) Influence of skin type, race, sex, and anatomic location on epidermal barrier function. *Clin Dermatol* 30:269–273.
- Denda M, Koyama J, Hori J, Horii I, Takahashi M, Hara M, Tagami H (1993) Age- and sex-dependent change in stratum corneum sphingolipids. *Arch Dermatol Res* 285:415–417.
- Dickel H, Bruckner TM, Erdmann SM, Fluhr JW, Frosch PJ, Grabbe J, Loffler H, Merk HF, Pirker C, Schwanitz HJ, Weisshaar E, Brasch J (2004) The "strip" patch test: results of a multicentre study towards a standardization. *Arch Dermatol Res* 296:212–219.
- Egberts F, Heinrich M, Jensen J, Winoto-Morbach S, Pfeiffer S, Wickel M, Schunck M, Steude J, Saftig P, Proksch E, Schutze S (2004) Cathepsin D is involved in the regulation of transglutaminase 1 and epidermal differentiation. *J Cell Sci* 117:2295–2307. *IAS PM* (1983) Epidermal lipids, barrier function, and desquamation. *J Invest Dermatol* 80:44s–49.
- Engelbrechtsen KA, Johansen JD, Kezic S, Linneberg A, Thyssen JP (2016) The effect of environmental humidity and temperature on skin barrier function and dermatitis. *J Eur Acad Dermatol Venereol* 30:223–249.
- Escalas-Taberner J, Gonzalez-Guerra E, Guerra-Tapia A (2011) Sensitive skin: a complex syndrome (La piel sensible: un síndrome complejo). *Actas Dermosifiliogr* 102:563–571.
- Escoffier C, Rigal J de, Rochefort A, Vasselet R, Leveque JL, Agache PG (1989) Age-related mechanical properties of human skin: an in vivo study. *J Invest Dermatol* 93:353–357.

- Farwanah H, Raith K, Neubert RHH, Wohlrab J (2005) Ceramide profiles of the uninvolved skin in atopic dermatitis and psoriasis are comparable to those of healthy skin. *Arch Dermatol Res* 296:514–521.
- Feingold KR, Elias PM (2014) Role of lipids in the formation and maintenance of the cutaneous permeability barrier. *Biochim Biophys Acta* 1841:280–294.
- Fluhr JW, Pelosi A, Lazzarini S, Dikstein S, Berardesca E (2001) Differences in corneocyte surface area in pre- and post-menopausal women. Assessment with the noninvasive videomicroscopic imaging of corneocytes method (VIC) under basal conditions. *Skin Pharmacol Appl Skin Physiol* 14 Suppl 1:10–16.
- Forslind B (1994) A domain mosaic model of the skin barrier. *Acta Derm Venereol* 74:1–6.
- Fritsch P (2009) *Dermatologie und Venerologie für das Studium*. Springer-Lehrbuch. Springer Berlin Heidelberg, Berlin, Heidelberg, S. 7- 34.
- Fujimura T, Miyauchi Y, Shima K, Hotta M, Tsujimura H, Kitahara T, Takema Y, Palungwachira P, Laohathai D, Chanthothai J, Nararatwanchai T (2018) Ethnic differences in stratum corneum functions between Chinese and Thai infants residing in Bangkok, Thailand. *Pediatr Dermatol* 35:87–91.
- Furio L, Veer S de, Jaillet M, Briot A, Robin A, Deraison C, Hovnanian A (2014) Transgenic kallikrein 5 mice reproduce major cutaneous and systemic hallmarks of Netherton syndrome. *J Exp Med* 211:499–513.
- Gao Y, Wang X, Chen S, Li S, Liu X (2013) Acute skin barrier disruption with repeated tape stripping: an in vivo model for damage skin barrier. *Skin Res Technol* 19:162–168.
- Garidel P, Fölting B, Schaller I, Kerth A (2010) The microstructure of the stratum corneum lipid barrier: mid-infrared spectroscopic studies of hydrated ceramide:palmitic acid:cholesterol model systems. *Biophys Chem* 150:144–156.
- Gerritsen MJ, van Erp PE, van Vlijmen-Willems IM, Lenders LT, van de Kerkhof, P C (1994) Repeated tape stripping of normal skin: a histological assessment and comparison with events seen in psoriasis. *Arch Dermatol Res* 286:455–461.
- Gloor M, Fluhr J, Thoma K (eds) (2000) *Dermatologische Externotherapie*. Springer Berlin Heidelberg, Berlin, Heidelberg: S. 46-50.
- Gloor M (2004) How do dermatological vehicles influence the horny layer? *Skin Pharmacol Physiol* 17:267–273.
- Gloor M, Gehring W (2001) Increase in hydration and protective function of horny layer by glycerol and a W/O emulsion: are these effects maintained during long-term use? *Contact Dermatitis* 44:123–125.
- Gloor M, Gehring W (2003) Effects of emulsions on the stratum corneum barrier and hydration (Eigenwirkungen von Emulsionen auf die Hornschichtbarriere und -hydratation). *Hautarzt* 54:324–330.
- Gloor M, Haus G, Keipert S (2003) Keratolytic activity of microemulsions. *Skin Pharmacol Appl Skin Physiol* 16:151–155.

- Hachem J, Crumrine D, Fluhr J, Brown BE, Feingold KR, Elias PM (2003) pH directly regulates epidermal permeability barrier homeostasis, and stratum corneum integrity/cohesion. *J Invest Dermatol* 121:345–353.
- Hafeez F, Maibach H (2013) Occlusion effect on in vivo percutaneous penetration of chemicals in man and monkey: partition coefficient effects. *Skin Pharmacol Physiol* 26:85–91.
- Harvell J, Hussona-Saeed I, Maibach HI (1992) Changes in transepidermal water loss and cutaneous blood flow during the menstrual cycle. *Contact Dermatitis* 27:294–301.
- Hill J, Paslin D, Wertz PW (2006) A new covalently bound ceramide from human stratum corneum -omega-hydroxyacylphytosphingosine. *Int J Cosmet Sci* 28:225–230.
- Ibrahim ZA, Hassan GF, Elgendy HY, Al-Shenawy HA (2018) Evaluation of the efficacy of transdermal drug delivery of calcipotriol plus betamethasone versus tacrolimus in the treatment of vitiligo. *J Cosmet Dermatol*.
- International Conference on Harmonisation (1996) ICH guideline for good clinical practice (E6). Barnett International/Parexel Clinical Training Group, Media, PA.
- Issachar N, Gall Y, Borrel MT, Poelman MC (1998) Correlation between percutaneous penetration of methyl nicotinate and sensitive skin, using laser Doppler imaging. *Contact Dermatitis* 39:182–186.
- Jacobi U, Meykadeh N, Sterry W, Lademann J (2003) Effect of the vehicle on the amount of stratum corneum removed by tape stripping. *J Dtsch Dermatol Ges* 1:884–889.
- Jacobi U, Gautier J, Sterry W, Lademann J (2005) Gender-related differences in the physiology of the stratum corneum. *Dermatology* 211:312–317.
- Jacobi U, Schanzer S, Weigmann H, Patzelt A, Vergou T, Sterry W, Lademann J (2011) Pathways of lateral spreading. *Skin Pharmacol Physiol* 24:231–237.
- Janssens M, Gooris GS, Bouwstra JA (2009) Infrared spectroscopy studies of mixtures prepared with synthetic ceramides varying in head group architecture: Coexistence of liquid and crystalline phases. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Biomembranes* 1788:732–742.
- Jeong S, Lee SH, Park BD, Wu Y, Man G, Man M (2016) Comparison of the Efficacy of Atopalm((R)) Multi-Lamellar Emulsion Cream and Physiogel((R)) Intensive Cream in Improving Epidermal Permeability Barrier in Sensitive Skin. *Dermatol Ther (Heidelb)* 6:47–56.
- Junqueira LCU, Mayerhofer A (eds) (2005) *Histologie: Mit 500 Abbildungen in 618 Einzeldarstellungen und 17 Tabellen*, 6., neu übers., überarb. und aktualisierte Aufl. Springer-Lehrbuch. Springer Medizin, Heidelberg. S. 306-318.
- Kalia YN, Pirot F, Guy RH (1996) Homogeneous transport in a heterogeneous membrane: water diffusion across human stratum corneum in vivo. *Biophysical Journal* 71:2692–2700.
- Kasting GB, Barai ND, Wang T, Nitsche JM (2003) Mobility of water in human stratum corneum. *J Pharm Sci* 92:2326–2340.
- Kerl H, Audring H (eds) (2003) *Histopathologie der Haut: Mit 402 Tabellen*. Springer, Berlin, S. 73-84.

- Kessner D, Ruettinger A, Kiselev MA, Wartewig S, Neubert RHH (2008) Properties of ceramides and their impact on the stratum corneum structure. Part 2: stratum corneum lipid model systems. *Skin Pharmacol Physiol* 21:58–74.
- Kiselev MA (2007) Conformation of ceramide 6 molecules and chain-flip transitions in the lipid matrix of the outermost layer of mammalian skin, the stratum corneum. *Crystallogr. Rep.* 52:525–528.
- Kiselev MA, Ryabova NY, Balagurov AM, Dante S, Hauss T, Zbytovska J, Wartewig S, Neubert RHH (2005) New insights into the structure and hydration of a stratum corneum lipid model membrane by neutron diffraction. *Eur Biophys J* 34:1030–1040.
- Korting HC (1995) *Dermatotherapie: Ein Leitfaden*. Springer Berlin Heidelberg, Berlin, Heidelberg. S.67-86.
- Korting HC, Sterry W (eds) (2001) *Therapeutische Verfahren in der Dermatologie: Dermatika und Kosmetika ; mit 124 Tabellen*. Blackwell Wissenschaft. Blackwell Wiss.-Verl., Berlin.
- Kraus M. und R. (2014) *Vapometer User Manual*:S. 4-10.
- Kucerka N, Kiselev MA, Balgavy P (2004) Determination of bilayer thickness and lipid surface area in unilamellar dimyristoylphosphatidylcholine vesicles from small-angle neutron scattering curves: a comparison of evaluation methods. *Eur Biophys J* 33:328–334.
- Lambers H, Piessens S, Bloem A, Pronk H, Finkel P (2006) Natural skin surface pH is on average below 5, which is beneficial for its resident flora. *Int J Cosmet Sci* 28:359–370.
- Lampe MA, Burlingame AL, Whitney J, Williams ML, Brown BE, Roitman E, Elias PM (1983) Human stratum corneum lipids: characterization and regional variations. *J Lipid Res* 24:120–130.
- Lee KG, Son SW (2011) Efficacy of korean red ginseng in the treatment of atopic dermatitis. *J Ginseng Res* 35:149–154.
- Lintner K, Mondon P, Girard F, Gibaud C (1997) The effect of a synthetic ceramide-2 on transepidermal water loss after stripping or sodium lauryl sulfate treatment: an in vivo study. *Int J Cosmet Sci* 19:15–26.
- Loden M (2012) Effect of moisturizers on epidermal barrier function. *Clin Dermatol* 30:286–296. doi: 10.1016/j.clindermatol.2011.08.015.
- Loffler H, Dreher F, Maibach HI (2004) Stratum corneum adhesive tape stripping: influence of anatomical site, application pressure, duration and removal. *Br J Dermatol* 151:746–752.
- Madison KC, Swartzendruber DC, Wertz PW, Downing DT (1987) Presence of intact intercellular lipid lamellae in the upper layers of the stratum corneum. *J Invest Dermatol* 88:714–718.
- Mare S de, van Erp PE, van de Kerkhof, P C (1989) Epidermal hyperproliferation assessed by the monoclonal antibody Ks8.12 on frozen sections. *J Invest Dermatol* 92:130–131.
- Mauro T, Holleran WM, Grayson S, Gao WN, Man MQ, Kriehuber E, Behne M, Feingold KR, Elias PM (1998) Barrier recovery is impeded at neutral pH, independent of ionic effects: implications for extracellular lipid processing. *Arch Dermatol Res* 290:215–222.

- Misery L, Loser K, Stander S (2016) Sensitive skin. *J Eur Acad Dermatol Venereol* 30 Suppl 1:2–8. doi: 10.1111/jdv.13532.
- Moll I, Augustin M, Jung EG (2016) *Dermatologie*, 8. vollständig überarbeitete Auflage. Duale Reihe. S. 15-20. Moore DJ, Rawlings AV (2017) The chemistry, function & (patho)physiology of stratum corneum barrier ceramides. *Int J Cosmet Sci*.
- Motta S, Monti M, Sesana S, Caputo R, Carelli S, Ghidoni R (1993) Ceramide composition of the psoriatic scale. *Biochim Biophys Acta* 1182:147–151.
- Neubert R, Wohlrab WA, Marsch W (2001a) *Dermatopharmazie: Vehikel - Wirkstoffe - Pharmakologie ; mit 29 Tabellen*. Wiss. Verl.-Ges, Stuttgart: 3-17.
- Neubert R, Wohlrab WA, Marsch W (2001b) *Dermatopharmazie: Vehikel - Wirkstoffe - Pharmakologie ; mit 29 Tabellen*. Wiss. Verl.-Ges, Stuttgart: 3-17.
- Nikolakis G, Zouboulis CC (2014) Skin and glucocorticoids: effects of local skin glucocorticoid impairment on skin homeostasis. *Exp Dermatol* 23:807–808. doi: 10.1111/exd.12519.
- Nishifuji K, Yoon JS (2013) The stratum corneum: the rampart of the mammalian body. *Vet Dermatol* 24:60-72.e15-6.
- Norlen L (2001) Skin barrier structure and function: the single gel phase model. *J Invest Dermatol* 117:830–836.
- Norlen L (2006) Stratum corneum keratin structure, function and formation - a comprehensive review. *Int J Cosmet Sci* 28:397–425.
- Oguri M, Gooris GS, Bito K, Bouwstra JA (2014) The effect of the chain length distribution of free fatty acids on the mixing properties of stratum corneum model membranes. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Biomembranes* 1838:1851–1861. doi: 10.1016/j.bbamem.2014.02.009.
- Otto A, Du Plessis J, Wiechers JW (2009) Formulation effects of topical emulsions on transdermal and dermal delivery. *Int J Cosmet Sci* 31:1–19.
- Paepe K de, Houben E, Adam R, Wiesemann F, Rogiers V (2005) Validation of the VapoMeter, a closed unventilated chamber system to assess transepidermal water loss vs. the open chamber Tewameter. *Skin Res Technol* 11:61–69.
- Pilgram GS, Engelsma-van Pelt AM, Bouwstra JA, Koerten HK (1999) Electron diffraction provides new information on human stratum corneum lipid organization studied in relation to depth and temperature. *J Invest Dermatol* 113:403–409.
- Pochi PE, Strauss JS, Downing DT (1979) Age-related changes in sebaceous gland activity. *J Invest Dermatol* 73:108–111.
- Proksch E, Brandner JM, Jensen J (2008) The skin: An indispensable barrier. *Exp Dermatol* 17:1063–1072.
- Rabionet M, Bayerle A, Marsching C, Jennemann R, Grone H, Yildiz Y, Wachten D, Shaw W, Shayman JA, Sandhoff R (2013) 1-O-acylceramides are natural components of human and mouse epidermis. *J Lipid Res* 54:3312–3321.

- Rabionet M, Gorgas K, Sandhoff R (2014) Ceramide synthesis in the epidermis. *Biochim Biophys Acta* 1841:422–434. doi: 10.1016/j.bbali.2013.08.011.
- Raney SG, Hope MJ (2006) The effect of bilayer and hexagonal H(II) phase lipid films on transepidermal water loss. *Exp Dermatol* 15:493–500.
- Rawlings AV, HARDING CR (2004) Moisturization and skin barrier function. *Dermatol Ther* 17:43–48.
- Riahi RR, Bush AE, Cohen PR (2016) Topical Retinoids: Therapeutic Mechanisms in the Treatment of Photodamaged Skin. *Am J Clin Dermatol* 17:265–276. doi: 10.1007/s40257-016-0185-5.
- Rosado C, Pinto P, Rodrigues LM (2005) Comparative assessment of the performance of two generations of Tewameter: TM210 and TM300. *Int J Cosmet Sci* 27:237–241.
- Roskos KV, Maibach HI, Guy RH (1989) The effect of aging on percutaneous absorption in man. *J Pharmacokinet Biopharm* 17:617–630.
- Roussel L, Gilbert E, Salmon D, Serre C, Gabard B, Haftek M, Maibach HI, Pirot F (2015) Measurement, analysis and prediction of topical UV filter bioavailability. *Int J Pharm* 478:804–810.
- Sandby-Moller J, Poulsen T, Wulf HC (2003) Epidermal thickness at different body sites: relationship to age, gender, pigmentation, blood content, skin type and smoking habits. *Acta Derm Venereol* 83:410–413.
- Schaper-Gerhardt K, Rossbach K, Nikolouli E, Werfel T, Gutzmer R, Mommert S (2018) The role of the Histamine H4 receptor in atopic dermatitis and psoriasis. *Br J Pharmacol*.
- Schreml S, Meier RJ, Albert MG, Seidl U, Zeller V, Behm B, Landthaler M, Abels C, Babilas P (2012) The impact of 10% alpha-hydroxy acid emulsion on skin pH. *Skin Pharmacol Physiol* 25:34–38.
- Serup J, Winther A, Blichmann CW (1989) Effects of repeated application of a moisturizer. *Acta Derm Venereol* 69:457–459.
- Small DM (1984) Lateral chain packing in lipids and membranes. *J Lipid Res* 25:1490–1500
- Smith W (1999) Stratum corneum barrier integrity controls skin homeostasis. *Int J Cosmet Sci* 21:99–106.
- Sparr E, Millecamps D, Isoir M, Burnier V, Larsson A, Cabane B (2013) Controlling the hydration of the skin through the application of occluding barrier creams. *J R Soc Interface* 10:20120788.
- Swartzendruber DC, Wertz PW, Kitko DJ, Madison KC, Downing DT (1989) Molecular models of the intercellular lipid lamellae in mammalian stratum corneum. *J Invest Dermatol* 92:251–257.
- t'Kindt R, Jorge L, Dumont E, Couturon P, David F, Sandra P, Sandra K (2012) Profiling and characterizing skin ceramides using reversed-phase liquid chromatography-quadrupole time-of-flight mass spectrometry. *Anal Chem* 84:403–411.

- Trommer H, Neubert RHH (2006) Overcoming the stratum corneum: the modulation of skin penetration. A review. *Skin Pharmacol Physiol* 19:106–121.
- Tsai JC, Feingold KR, Crumrine D, Wood LC, Grunfeld C, Elias PM (1994) Permeability barrier disruption alters the localization and expression of TNF alpha/protein in the epidermis. *Arch Dermatol Res* 286:242–248.
- Tur E (1997) Physiology of the skin--differences between women and men. *Clin Dermatol* 15:5–16.
- Urbaniak, G. C., und Plous, S. (2013). Research Randomizer (Version 4.0), retrieved on May 05, 2015 from <http://www.randomizer.org/>.
- van Erp PE, Mare S de, Rijzewijk JJ, van de Kerkhof, P C, Bauer FW (1989) A sequential double immunoenzymic staining procedure to obtain cell kinetic information in normal and hyperproliferative epidermis. *Histochem J* 21:343–347.
- van Smeden J, Janssens M, Gooris GS, Bouwstra JA (2014) The important role of stratum corneum lipids for the cutaneous barrier function. *Biochim Biophys Acta* 1841:295–313.
- van Smeden J, Dijkhoff IM, Helder RWJ, Al-Khakany H, Boer DEC, Schreuder A, Kallemeijn WW, Absalah S, Overkleef HS, Aerts, Johannes M F G, Bouwstra JA (2017) In situ visualization of glucocerebrosidase in human skin tissue: zymography versus activity-based probe labeling. *J Lipid Res* 58:2299–2309.
- Verdier-Sevrain S, Bonte F (2007) Skin hydration: a review on its molecular mechanisms. *J Cosmet Dermatol* 6:75–82.
- Verdier-Sévrain S, Bonté F (2007) Skin hydration: A review on its molecular mechanisms. *J Cosmet Dermat* 6:75–82.
- Weigmann H, Ulrich J, Schanzer S, Jacobi U, Schaefer H, Sterry W, Lademann J (2005) Comparison of transepidermal water loss and spectroscopic absorbance to quantify changes of the stratum corneum after tape stripping. *Skin Pharmacol Physiol* 18:180–185.
- Welsch U, Deller T, Kummer W (2014) *Lehrbuch Histologie*, 4. Aufl. Elsevier Urban & Fischer, München, S. 564-582. Wiedersberg S, Leopold CS, Guy RH (2009) Dermatopharmacokinetics of betamethasone 17-valerate: influence of formulation viscosity and skin surface cleaning procedure. *Eur J Pharm Biopharm* 71:362–366.
- Willis CM, Stephens CJ, Wilkinson JD (1989) Epidermal damage induced by irritants in man: a light and electron microscopic study. *J Invest Dermatol* 93:695–699.
- Willis CM, Shaw S, Lacharriere O de, Baverel M, Reiche L, Jourdain R, Bastien P, Wilkinson JD (2001) Sensitive skin: an epidemiological study. *Br J Dermatol* 145:258–263.
- Wohlrab J (2016) Topika und deren Einsatz in der Dermatologie. *J Dtsch Dermatol Ges* 14:1061–1071.
- Wohlrab J, Richter C, Stauder S (2016) Präklinische und klinische Validierung der kutanen Bioverfügbarkeit der hydrophilen Phase einer W/O-Emulsion. *JDDG: Journal der Deutschen Dermatologischen Gesellschaft* 14:698–706.

Yang K, Marley A, Tang H, Song Y, Tang JY, Han J (2017) Statin use and non-melanoma skin cancer risk: a meta-analysis of randomized controlled trials and observational studies. *Oncotarget* 8:75411–75417.

Ya-Xian Z, Suetake T, Tagami H (1999) Number of cell layers of the stratum corneum in normal skin - relationship to the anatomical location on the body, age, sex and physical parameters. *Arch Dermatol Res* 291:555–559.

Young MM, Franken A, Du Plessis JL (2018) Transepidermal water loss, stratum corneum hydration, and skin surface pH of female African and Caucasian nursing students. *Skin Res Technol*.

Thesen

1. Zur Basistherapie im Rahmen der Hautpflege bei chronisch-entzündlichen Dermatosen ist die Anwendung von Emulsionen gängig.
2. Durch galenische Variationen können neben bikontinuierlichen Cremes W/O- (Lipolotio) und O/W-Emulsionen (Hydrolotio) unterschieden werden.
3. Für die Krankheitsphasen-gerechte Anwendung der Emulsionstypen sind Kenntnisse zu deren Effekten und zur Effektdynamik von großer Bedeutung. Dazu werden verschiedene Validierungsstrategien propagiert, die sich in single-application-tests (SAT) und repeated-application-tests (RAT) unterteilen lassen.
4. Zur aussagekräftigen Durchführung eines RAT ist im Vorfeld ein SAT notwendig, um die Effektdynamik der jeweiligen Emulsion abschätzen und kumulative Effekte validieren zu können.
5. Im SAT lassen sich die maximale Effekthöhe, die Dauer bis zum Eintritt Barriere- protektiver Effekte und die Geschwindigkeit des Abklingens validieren.
6. Nach der Applikation einer Emulsion kommt es zur Metamorphose und teilweisen Entmischung der Emulsion auf der Haut. Durch die Verdunstung von volatilen Anteilen der Emulsion kommt es kurzfristig zu einer Wasserabgabe. Im Anschluss wird durch Okklusionseffekte der lipophilen Rückstandsphase eine Barriereprotektion vermittelt. Diese entspricht im Ausmaß und der Dynamik den gewünschten Effekten.
7. Auf gesunder Haut zeigen sich verlängerte Effekte bei W/O-Emulsionen im Vergleich zu O/W-Emulsionen, die möglicherweise auf die Liberationsdynamik der hydrophilen Phase und die davon abhängige Aufnahme von Wasser im SC zurückzuführen ist.
8. Auf geschädigter Haut lassen sich Okklusionsphänomene in größerem Ausmaß darstellen, sodass sich die Effekte von O/W- und W/O-Emulsionen insgesamt angleichen.
9. Ein verzögerter Effektbeginn der W/O-Emulsion auf geschädigter Haut ist womöglich auf die gute Penetrationsrate von Wasser aus der O/W-Emulsion in die geschädigte Haut zu erklären.
10. Die Evaporimetrie stellt im Vergleich zur Corneometrie das deutlich sensitivere Verfahren dar.

Selbstständigkeitserklärung

Ich, Pia Dorothea Oltmanns, erkläre ehrenwörtlich, dass ich die der Medizinischen Fakultät der Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg zur Promotionsprüfung eingereichte Arbeit mit dem Titel „Effekte verschiedener Emulsionstypen auf der Barrierefunktion des Stratum corneums“ unter der Leitung von Prof. Dr. med. habil. Wohlrab selbst durchgeführt und bei der Abfassung der Arbeit keine anderen als die in der Dissertationsschrift aufgeführten Hilfsmittel benutzt habe. Die aus anderen Quellen direkt oder indirekt übernommenen Daten und Konzepte sind unter Angabe der Quelle gekennzeichnet. Die Regeln zur Sicherung guter wissenschaftlicher Praxis wurden beachtet (Amtsblatt der MLU Nr. 5, 02.07.09).

Ich versichere, dass ich für die inhaltliche Erstellung der vorliegenden Arbeit nicht die entgeltliche Hilfe von Vermittlungs- und Beratungsdiensten (Promotionsberater oder andere Personen) in Anspruch genommen habe. Niemand hat von mir unmittelbar oder mittelbar geldwerte Leistungen für Arbeiten erhalten, die im Zusammenhang mit dem Inhalt der vorgelegten Dissertation stehen.

Halle (Saale), den

31.08.2020 Pia Oltmanns

Erklärung über frühere Promotionsversuche

Ich habe bisher an keiner in- oder ausländischen Universität ein Gesuch um Zulassung zur Promotion eingereicht, noch die vorliegende oder eine andere Arbeit als Dissertationsschrift vorgelegt.

Halle (Saale), den

31.08.2020 Pia Oltmanns

Lebenslauf

Name: Pia Dorothea Oltmanns (geb. Gran)

Geboren: 09.09.1988 in Köln

Familienstand: verheiratet, 1 Kind

Schulbildung: Hollenberg Gymnasium Waldbröl

20.06.2008 Reifezeugnis (Abitur)

Studium: 13.10.2009 – 31.07.2017

Humanmedizin an der Martin-Luther-Universität
Halle-Wittenberg

Beruf: 16.11.2015 – 25.09.2016

Praktisches Jahr

Tertial 1 Städtisches Klinikum in Dessau

Tertial 2 Evangelisches Krankenhaus Paul Gerhardt Stift in Wittenberg

Tertial 3 BG-Klinikum Bergmannstrost in Halle (Saale)

20.02.2017 Approbation als Arzt/Ärztin

2017 – 2018 Elternzeit

01.03. – 31.05.19 Weiterbildung für Physikalische und Rehabilitative Medizin
im BG-Klinikum Bergmannstrost in Halle (Saale)

01.06. – 21.11.19 Weiterbildung für Innere Medizin in der geriatrischen Klinik
im Diakoniekrankenhaus in Halle (Saale)

Seit 01.02.2020 Ärztin im Gesundheitsamt der Stadt Chemnitz

Halle (Saale), den

31.08.2020 Pia Oltmanns

Danksagung

Mein besonderer Dank gilt meinem akademischen Lehrer, Herrn Professor Wohlrab, der mir durch die Überlassung des Themas diese Dissertation überhaupt ermöglicht hat. Ganz besonders danke ich Ihm für seine Hilfestellung, seinen Rat, für die langjährige Verbundenheit, seinen Zuspruch und nicht zuletzt für seine Geduld.

Danken möchte ich auch Frau Dr. Wohlrab für die Unterstützung bei der Durchführung der Studie.

Zu Dank verpflichtet bin ich auch der wissenschaftlichen Mitarbeiterin Andrea Stennett für ihre Organisation, der gemeinsamen Durchführung der Studie und ihre liebevolle Art mir Mut zuzusprechen.

Mein Dank gilt aber auch der Fa. Allergika für die Bereitstellung der Emulsionen, der rechtlichen Absicherungen und ihr Dienen als Sponsor.

Nicht zuletzt möchte ich mich bei meiner Familie, insbesondere bei meinen Eltern und Ehemann bedanken.