

Lipid- und strahlungsinduzierte Störungen des
humanen epidermalen *Stratum corneums*

Habilitationsschrift



zur Erlangung des akademischen Grades

Dr. rer. nat. habil.

vorgelegt der

Mathematisch-Naturwissenschaftlich-Technischen Fakultät
der Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg

von

Herrn Dr. rer. nat. Sebastian Zellmer

geb. am: 29. Mai 1962 in Bad-Nauheim

Gutachter/in

1. Prof. Dr. R. Ulbrich-Hofmann
2. Prof. Dr. J. Lasch
3. Prof. Dr. G. Plewig

Halle (Saale), 10.01.2001

1. ZUSAMMENFASSUNG	1
2. EINLEITUNG UND FRAGESTELLUNG	3
3. GRUNDLAGEN	6
3.1. Das Organ Haut	6
3.2. Die Epidermis	7
3.3. Das Stratum corneum	11
3.4. Die Lipide des Stratum corneums	13
3.4.1. Die Ceramide des <i>Stratum corneums</i>	15
3.4.2. Die Fettsäuren des <i>Stratum corneums</i>	16
3.4.3. Die Sterole des <i>Stratum corneums</i>	17
3.4.4. Die Struktur der multilamellaren Lipidschichten	18
3.5. Die strahlungsinduzierte Oxidation der Lipide	21
3.6. Der Einfluß extern applizierter Lipide auf das Stratum corneum	26
3.7. Das 3-dimensionale Zellkulturmodell der Epidermis	30
3.8. Die Lipasen des Stratum corneums	32
4. MATERIAL UND METHODEN	33
5. ERGEBNISSE UND INTERPRETATION	36
5.1. Die humanen Stratum corneum Lipide	36
5.1.1. Die chromatographische Trennung der Lipide	36
5.1.2. Die Zusammensetzung der <i>Stratum corneum</i> Lipide	37
5.1.3. Zusammenfassung	39
5.2. Liposomen als Modellsystem der Barriere	40
5.2.1. Der Einfluß von Ionen auf Suspensionen aus <i>Stratum corneum</i> Lipiden	41
5.2.2. Das Phasenverhalten der <i>Stratum corneum</i> Lipide	42
5.2.3. Strukturuntersuchungen an <i>Stratum corneum</i> Lipiden	45
5.2.4. Die Membranfusion der <i>Stratum corneum</i> Lipidvesikel (SCV)	48
5.2.5. Zusammenfassung	51

5.3. Der Einfluß von UV-Strahlung auf die Stratum corneum Lipide	52
5.3.1. Zusammenfassung	57
5.4. Die rekonstituierte humane Epidermis	58
5.4.1. Der Aufbau der rekonstituierten Epidermis	59
5.4.2. Die Penetration durch die rekonstituierte Epidermis	59
5.4.3. Die Verteilung topisch applizierter Vesikel in der Hautkultur	60
5.4.4. Die Penetration liposomaler Lipide durch das intakte <i>Stratum corneum</i>	61
5.4.5. Zusammenfassung	64
5.5. Der Einfluß topisch applizierter Lipide auf das intakte Stratum corneum	65
5.5.1. Infrarot-spektroskopische Untersuchungen am isolierten <i>Stratum corneum</i>	65
5.5.2. Kalorimetrische Untersuchungen am isolierten <i>Stratum corneum</i>	68
5.5.3. Zusammenfassung	71
5.6. Die Phospholipase A₂-Aktivität des nativen Stratum corneums	72
5.6.1. Zusammenfassung	77
5.7. Schlußfolgerung und Ausblick	78
5.7.1. Unterstützung der epidermalen Barriere	78
5.7.2. Penetration durch die epidermalen Barriere	79
5.7.3. Penetration in das <i>Stratum corneum</i>	80
6. VERZEICHNIS DER ABKÜRZUNGEN	81
7. VERZEICHNIS DER ABBILDUNGEN UND TABELLEN	82
8. LITERATUR	83
9. ANHANG	94

1. Zusammenfassung

Das humane *Stratum corneum* bildet die entscheidende Barriere innerhalb der Epidermis. Ziel der vorliegenden Arbeit war es, lipid- und strahlungsinduzierte Störungen dieser Barriere zu untersuchen. Dazu haben wir drei verschiedene Modellsysteme entwickelt bzw. eingesetzt: (i) Vesikel aus *Stratum corneum* Lipiden (SCV), (ii) die rekonstituierte humane Epidermis (ReHE) und (iii) das isolierte *Stratum corneum*.

1. Zur Herstellung der SCV wurden die humanen plantaren *Stratum corneum* Lipide extrahiert. Zur Quantifizierung haben wir erstmals die automatische Mehrfachentwicklung (AMD) von HPTLC Platten eingesetzt (**Anhang 1**). Durch eine anschließende massenspektrometrische Analyse ließ sich die Zusammensetzung der Ceramide weiter aufklären (**Anhang 2**). Aus den extrahierten Lipiden haben wir *Stratum corneum* Vesikel (SCV) hergestellt, die ein einfaches System der Lipidbarriere des *Stratum corneums* darstellen. Es zeigte sich, daß die SCV-Membranen mehrere Phasenübergänge aufwiesen, die auch im isolierten *Stratum corneum* vorkamen. Die Hauptumwandlung lag zwischen 49,2 und 49,7 °C. Cholesterol lag bei Raumtemperatur in einer separaten kristallinen Phase vor. Zweiwertige Ionen (Ca^{2+} , Mg^{2+}) reduzierten die kolloidale Stabilität der Vesikel, induzierten laterale Phasenseparation und förderten unter erhöhten Temperaturen ($> 32,5$ °C) die Membranfusion. Dabei entstanden multilamellare Lipidschichten, wie sie auch im nativen *Stratum corneum* vorhanden sind (**Anhang 4** und **Anhang 5**).

Liposomen werden seit Beginn der 80er Jahre als Penetrationsverstärker an der Haut verwendet. Die Wechselwirkungen zwischen topisch (auf die Hautoberfläche) applizierten Liposomen und dem *Stratum corneum* ist aber nur unzureichend aufgeklärt. Deshalb wurden die Wechselwirkungen zwischen den SCV (als Modellsystem der *Stratum corneum* Lipid-Barriere) und Liposomen aus synthetischen Lipiden untersucht. Liposomen aus Phosphatidylcholin (PC) zeigten keine Wechselwirkung und keine Fusion mit den SCV, während Liposomen aus Phosphatidylserin (PS) bzw. Gemische mit Cholesterolhemisuccinat eine starke Wechselwirkung aufwiesen und schnell mit den SCV fusionierten (**Anhang 4**).

Wir setzten die SCV weiterhin ein, um die UV-induzierte Lipidperoxidation der *Stratum corneum* Lipide zu untersuchen. Die Oxidationsprodukte (Malondialdehyd, Cholesterol- und andere Lipidhydroperoxide) wurden quantifiziert (**Anhang 6**). Wir konnten zeigen, daß Singulett-Sauerstoff ($^1\text{O}_2$) an der Lipidperoxidation nicht beteiligt ist (**Anhang 7**). Das im *Stratum corneum* vorhandene Cholesterol wird fast vollständig zum 7α - oder 7β -Cholesterolhydroperoxid oxidiert. Daraus folgte, daß Cholesterol innerhalb des *Stratum corneums* keine antioxidative Wirkung hat. Durch die UV-induzierte Lipidperoxidation wurde die Barriereeigenschaft der Membran verringert und es kam zu einer erhöhten Penetration von kleinen hydrophilen Molekülen.

2. Anschließend haben wir aus humanen epidermalen Keratinozyten das 3-dimensionale Modell der rekonstituierten Epidermis (ReHE) hergestellt und Störungen untersucht, die topisch applizierte liposomale Lipide bewirken (**Anhang 8**). Die Applikation von Phosphatidylcholin-Liposomen (PC) führte innerhalb von 4 h zu mikroskopisch sichtbaren Veränderungen und Störungen innerhalb der ReHE, während Liposomen aus Phosphatidylserin (PS) auf der Oberfläche der ReHE

aggregierten, mit den Lipiden des *Stratum corneums* fusionierten und die Struktur der ReHE nicht beeinflussten. Die Penetrationsgeschwindigkeit von PS Liposomen betrug nur $0,073 \text{ ng Lipid h}^{-1} \text{ cm}^{-2}$, während PC-Liposomen mit einer Geschwindigkeit von $1,38 \text{ ng Lipid h}^{-1} \text{ cm}^{-2}$ penetrierten. Die unterschiedliche Verteilung liposomaler Lipide in den Schichten der ReHE 4 h nach der Applikation konnten wir fluoreszenzmikroskopisch bestätigen.

3. In einem dritten Schritt wurden mit der FT-IR Spektroskopie und der Kalorimetrie untersucht, welche Störungen topisch applizierte Liposomen im isolierten *Stratum corneum* (SC) bewirkten. Es zeigte sich, daß PC-Liposomen eine Membranstörung (**Anhang 9**) und -fluidisierung innerhalb des *Stratum corneums* bewirkten. PS-Liposomen hatten keinen Einfluß. PC-Liposomen erleichterten die Penetration einer verkapselten und/oder der Modellsubstanz Carboxyfluorescein.
4. Wir haben die Lipasen des *Stratum corneums* charakterisiert. Das Temperaturoptimum der untersuchten Phospholipase A₂ liegt zwischen 30 - 35 °C. Enzymsubstrate sind Phosphatidylcholin, Phosphatidylethanolamin und Phosphatidylglycerol. Weder Phosphatidylserin noch Phosphatidsäure werden hydrolysiert. Die Aktivität ließ sich durch Zugabe von Detergentien oberhalb der kritischen mizellaren Konzentration und durch Kalziumionen steigern. Kupferionen und die Komplexbildung freier Kalziumionen durch EDTA reduzierte die Hydrolysegeschwindigkeit.

2. Einleitung und Fragestellung

Die humane Haut hat ein Gewicht von ca. 3 kg und bedeckt eine Fläche von 2 m². Sie besteht aus der Subcutis, der Dermis und der nach außen hin abschließenden Epidermis. Die äußerste Schicht der Epidermis ist das *Stratum corneum* (SC). Durch seinen Aufbau aus abgestorbenen Hornzellen (Korneozyten), die in multilamellare Lipidschichten eingebettet sind, stellt das *Stratum corneum* eine sehr effektive Barriere dar. Es schützt den Organismus vor unkontrolliertem Wasserverlust und dem Eindringen körperfremder Substanzen. Ohne die Barriere des *Stratum corneums* würde der Mensch täglich 20 Liter Wasser transepidermal verlieren ⁽¹²⁰⁾. Der tatsächliche Wasserverlust durch das intakte SC beträgt aber nur 0,4 mg h⁻¹ cm⁻² ⁽⁹⁶⁾.

Das *Stratum corneum* ist als äußerste Grenzschicht unterschiedlichen Störfaktoren ausgesetzt. Die solare UV-Strahlung trifft auf alle exponierten Körperregionen auf und dringt, in Abhängigkeit von der Wellenlänge, in das *Stratum corneum* ein ⁽³¹⁾. Die UV-Strahlung bewirkt die Oxidation der *Stratum corneum* Lipide. Es kommt zu einer Störung der Lipidbarriere des *Stratum corneum*, die sich unter anderem in einem erhöhten transepidermalen Wasserverlust widerspiegelt ⁽⁷⁴⁾. Der Mechanismus der strahlungsinduzierten Lipidperoxidation ist bisher nur unzureichend verstanden. Nicht geklärt ist weiterhin, ob Cholesterol, das im SC in hohen Konzentrationen vorkommt, ein natürliches Antioxidanz ist.

Das *Stratum corneum* ist neben der Strahlung auch natürlichen und anthropogenen Substanzen ausgesetzt. Diese können ebenfalls in das SC eindringen. So werden seit vielen Jahren Liposomen (Lipidvesikel mit wäßrigem Inhalt) auf das SC aufgetragen, da sie das Eindringen von mitapplizierten Wirkstoffen in und durch das SC erleichtern. Sie werden deshalb als Penetrationsverstärker bezeichnet. Dabei sind die Faktoren, die die Penetration beeinflussen, nur zum Teil verstanden. Unklar ist, wie die Zusammensetzung der Liposomen die Penetration beeinflusst, ob die Liposomen intakt oder nur die liposomalen Lipide penetrieren und welche Störungen aus der Penetration resultieren. Über die enzymatische Hydrolyse der penetrierten liposomalen Lipide liegen ebenfalls keine Untersuchungen vor.

Zur Klärung dieser Fragen wurden verschiedene neue Versuchsansätze gewählt, wobei bewußt der Bogen vom einfachen Modellsystem der *Stratum corneum* Vesikel

(SCV), über die rekonstituierte humane Epidermis (ReHE) zum intakten humanen *Stratum corneum* (SC) gespannt wurde:

Das Modellsystem der *Stratum corneum* Vesikel (SCV):

Die Lipide des humanen plantaren SC wurden extrahiert und quantifiziert. Aus den Lipiden wurden in Anlehnung an Lasch und Mitarbeiter ⁽⁹⁸⁾ die SCV hergestellt. Diese stellen ein einfaches Modellsystem der **Lipid**barriere des *Stratum corneums* dar.

Die SCV wurden physikochemisch charakterisiert. Die Wechselwirkung der SCV mit Liposomen aus synthetischen Lipiden wurden untersucht und die Parameter, die diese Wechselwirkung bestimmen, charakterisiert.

Die SCV erlaubten es strahlungsinduzierte Oxidationsvorgänge zu untersuchen. Die Lipidperoxidationsprodukte wurden isoliert, quantifiziert und die Funktion des Cholesterol als Antioxidants der Hornschicht bestimmt.

Aus den Befunden dieses ersten Abschnittes wurde folgende Arbeitshypothese entwickelt: topisch applizierte Lipide können, abhängig von ihrer Zusammensetzung, mit den interzellulären Lipiden des *Stratum corneums* entweder keine Wechselwirkung eingehen oder nach einer starken Wechselwirkung mit diesen fusionieren. Durch die Fusion werden die Vesikel in den obersten *Stratum corneum* Schichten aufgehalten, verbleiben dort und mischen sich mit den *Stratum corneum* Lipiden. Dadurch verstopfen sie Penetrationswege, die von Menon und Elias ⁽¹²¹⁾, sowie von Schätzlein und Cevc ⁽¹⁶³⁾ nachgewiesen wurden. Daraus folgt, daß Liposomen, die eine starke Wechselwirkung aufweisen, eine niedrige Penetrationsrate aufweisen sollten und Liposomen die keine Wechselwirkung zeigen, schnell in das SC penetrieren sollten. Um diese Arbeitshypothese zu überprüfen, wurden Untersuchungen an der rekonstituierte humane Epidermis (ReHE) und am isolierten *Stratum corneum* durchgeführt.

Die rekonstituierte humane Epidermis (ReHE):

Es sollte geklärt werden, ob die spezifischen Wechselwirkungen, die zwischen den SCV und Liposomen aus synthetischen Lipiden auftreten, auch im Zellverband der ReHE nachweisbar sind. Die Störungen, die topisch applizierte liposomale Lipide in der ReHE induzieren, wurden bestimmt. An ausgewählten

Lipiden wurde untersucht, ob die spezifische Wechselwirkung zwischen den topisch applizierten liposomalen Lipiden und den SC Lipiden einen Einfluß auf die Penetrationsgeschwindigkeit hat.

Das intakte *Stratum corneum* (SC):

Ziel des Komplexes war es, die am Modell der SCV und der ReHE gewonnenen Befunde auf das intakte SC zu übertragen. Dazu wurden ausgewählte Lipide auf das SC appliziert und die daraus resultierenden Störungen im SC kalorimetrisch und infrarot-spektroskopisch untersucht. Weiterhin wurde die Penetration von Liposomen bzw. liposomalen Lipiden und koapplizierten Modellsubstanzen durch das isolierte SC gemessen. Da im SC verschiedene Hydrolasen vorkommen, wurde die Aktivität der dort vorhandenen Phospholipase A₂ (PL A₂) erstmals genauer untersucht. Ziel war es, die Hydrolyse topisch applizierter (liposomaler) Lipide einzuschätzen.

Die vorliegende Arbeit erlaubt einerseits einen Einblick in den Mechanismus der strahlungsinduzierten Lipidperoxidation des humanen epidermalen *Stratum corneums*. Weiterhin wird gezeigt, welchen Einfluß die Lipidzusammensetzung von Liposomen auf die Penetration in das *Stratum corneum* hat und es werden die daraus resultierenden Störungen bestimmt.

3. Grundlagen

3.1. Das Organ Haut

Die Haut ist mit ca. 2 m² und einem Gewicht von ca. 3 kg das größte Organ des Menschen. Anhand ihres Aufbaus kann man sie in 3 Schichten unterteilen: die Subcutis, die Dermis und die apikal liegende Epidermis. Ihre Stärke beträgt 1,5 bis 4 mm, wobei 0,1 mm auf die Epidermis entfallen. In die Haut eingebunden sind verschiedene Hautanhangsgebilde, wie z. B. die Nägel und die Haare, sowie die Schweiß- und Talgdrüsen.

Die einzelnen Schichten der Haut erfüllen vielfältige Aufgaben. Die Subcutis besteht zum größten Teil aus Lipozyten und Bindegewebe. Sie dient der Thermoregulation und ist Energiespeicher. Die Dermis bildet durch ihre Fasern aus Kollagen, Elastin und Retikulin einen effektiven mechanischen Schutz. Sie ist für die Elastizität zuständig, stark durchblutet und der Sitz der Nervenfasern. Der apikal liegenden Epidermis kommt eine besondere Bedeutung zu. Sie besteht aus Keratinozyten in unterschiedlichen Differenzierungsstadien. Die Differenzierung endet mit der Bildung des *Stratum corneums*, das aus enddifferenzierten Keratinozyten (Korneozyten) besteht. Diese sind in multilamellare Lipidschichten eingebettet. Das *Stratum corneum* schützt den Organismus vor körperfremden Substanzen, eindringenden Mikroorganismen und unkontrolliertem Wasserverlust.

Weitere Zellen in der Epidermis sind die Melanozyten, die Melanin synthetisieren und dadurch die schädigende solare UV-Strahlung absorbieren, die Langerhans-Zelle mit Makrophagenfunktion und die Merkelzelle, die als Sensor bei der Übertragung von Berührungseizen dient.

3.2. Die Epidermis

Die Epidermis ist die äußerste Schicht der Haut und läßt sich histologisch in verschiedene Schichten einteilen (Abb. 1). Über 90 % der Zellen sind Keratinozyten, die in der Epidermis in unterschiedlichen Differenzierungsstadien vorliegen. In diesen Stadien unterscheiden sich die Keratinozyten immunhistochemisch, physiologisch und in der Anzahl und Funktion ihrer Organellen. Die Differenzierung der Keratinozyten endet mit der Stratifizierung, der Ausbildung der Hornschicht, deren Zellschuppen durch Abschilferung verloren gehen.

Alle Keratinozyten gehen aus einem Stammzellsystem hervor, das aus Keratinoblasten besteht. Dieses ist an der Grenze zwischen Epidermis und Dermis im *Stratum basale* lokalisiert. Die Zellen des Stammzellsystems bilden ein einschichtiges, säulenförmiges Epithel und sind über Hemidesmosomen mit der darunter liegenden Basalmembran verbunden. Untereinander stehen die Zellen über Desmosomen in Kontakt.

Die Zellen des epidermalen Stammzellsystems lassen sich immunhistochemisch durch die Expression der Keratine K5/K14 und spezieller Integrine charakterisieren. Die Integrine sind Heterodimere und bestehen aus einer α - und einer β -Untereinheit. Innerhalb der undifferenzierten Zellen des *Stratum basale* treten Integrine mit einer β_1 -Untereinheit in hoher Konzentration auf. Immunhistochemisch kann das $\alpha_2\beta_1$ - (Ligand: Kollagen und Laminin 1), das $\alpha_3\beta_1$ - (Ligand: Laminin 5, Laminin 1), das $\alpha_5\beta_1$ - (Ligand: Fibronectin), sowie das $\alpha_8\beta_1$ - und $\alpha_9\beta_1$ -Integrin nachgewiesen werden ⁽⁸⁷⁾. Nur im Bereich der basalen Zellmembran tritt außerdem das $\alpha_6\beta_4$ -Integrin auf, das mit hemidesmosomalen Proteinen der Basalmembran assoziiert ist.

Die direkt aus den epidermalen Stammzellen hervorgehenden Keratinozyten (transient amplifizierende Zellen ⁽¹⁹²⁾) können sich noch 4 - 5mal teilen. Die Tochterzellen der transient amplifizierenden Zellen, die Übergangszellen, exprimieren kein $\alpha_6\beta_4$ -Integrin mehr und verlieren den Kontakt mit der Basalmembran. Es beginnt ein terminaler Differenzierungsprozess, der mit der Bildung des Korneozyten endet.

Keratinozyten, die in die Differenzierungsphase eintreten und das *Stratum basale* verlassen, wandern in apikaler Richtung in das 2 - 4 Zell-Lagen dicke *Stratum spinosum*, das sie individuell und aktiv innerhalb von 14 Tagen durchqueren. Es

kommt zu einer Zunahme des plasmatischen Volumens und der Organellen. Da die Zellen durch Desmosomen weiterhin miteinander verbunden sind, besitzen sie ein stachelförmiges Aussehen, nach der diese Zellschicht benannt ist. Charakteristisch für dieses Differenzierungsstadium ist die Expression des Keratinpaares K1/K10.

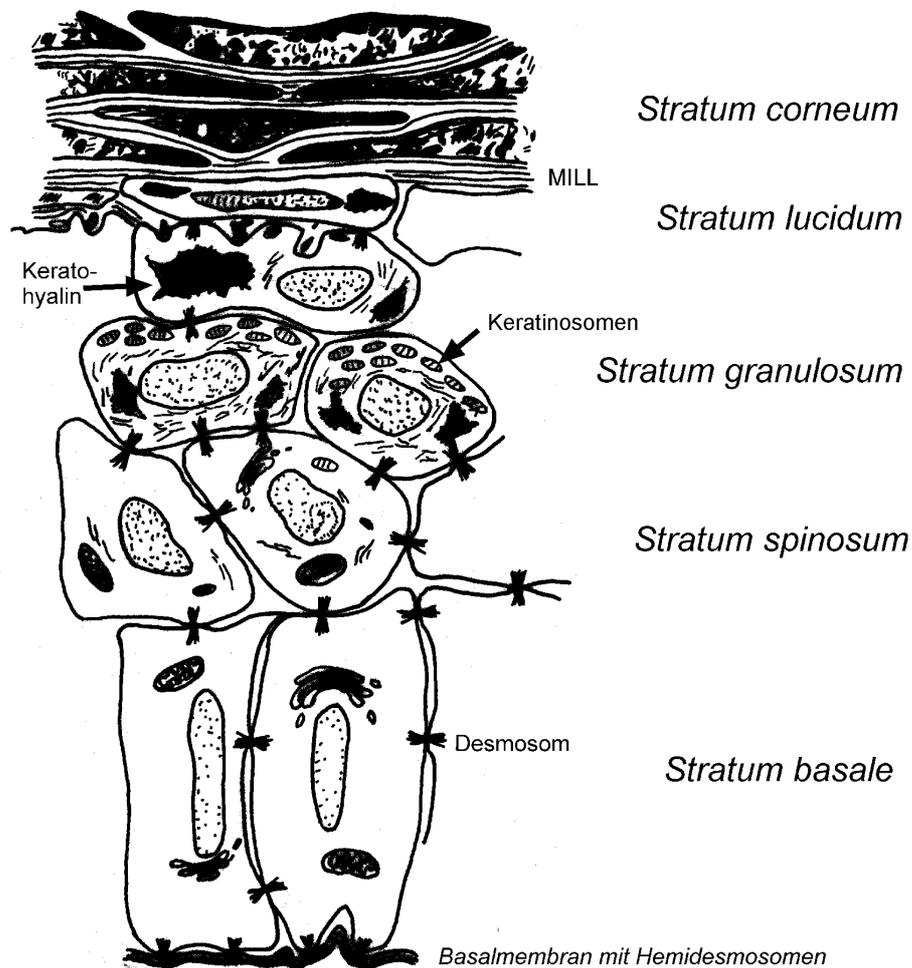


Abbildung 1:

Schematischer Querschnitt durch die humane Epidermis. Im *Stratum basale* stehen die Zellen säulenförmig auf der Basalmembran und sind über Hemidesmosomen mit dieser verbunden. Über Desmosomen stehen die Zellen untereinander in Kontakt. Nach dem Beginn der Differenzierung wandern die Keratinozyten in das *Stratum spinosum* und das *Stratum granulosum*. Es kommt zur Synthese von Keratohyalin und zur Bildung von Keratinosomen. Das *Stratum corneum* besteht aus multilamellaren interzellulären Lipidschichten (MILL), in die die ausdifferenzierten Keratinozyten (Korneozyten) eingebettet sind. Modifiziert nach Fritsch ⁽⁶⁵⁾.

Im sich apikal anschließenden *Stratum granulosum* kommt es zur Bildung von Keratohyalingranula, in denen Profilaggrin und Keratinfilamente aggregieren. In Folge weiterer Differenzierungsvorgänge kommt es zur Expression der Keratine K2e/K9, zur Bildung von Filaggrin, das die Vernetzung der Keratinfilamente fördert und zur Bildung von Involukrin, das den später entstehenden Korneozyten stabilisiert. Außerdem treten im *Stratum granulosum* in apikaler Richtung zuneh-

ment intrazelluläre Organellen, die Keratinosomen auf. Für diese Organellen werden synonym die Begriffe "epidermal lamellar body", "Odland bodies" (nach ihrem Erstbeschreiber), "membrane coating granules" (da sie von einer trilamellaren Membran umgeben sind) oder "Cementosomen" verwendet. Diese 0,2 - 0,5 µm großen sekretorischen Vesikel stammen aus dem Golgi-Apparat und enthalten neben geordneten, lamellaren Lipiddoppelschichten ⁽¹²³⁾ alle für die Ausbildung einer intakten Hornschicht notwendigen Komponenten. Dazu gehören neben Lipiden (z. B. Ceramide, Fettsäuren, Sterole und deren Derivate) auch eine Vielzahl von Hydrolasen (z. B. Lipasen und Proteasen).

Apikal an das physiologisch sehr aktive *Stratum granulosum* schließt sich das physiologisch inaktive (tote) *Stratum corneum*, die Hornschicht, an. Es besteht aus enddifferenzierten Keratinozyten, den Korneozyten, die in multilamellare Lipidschichten eingelagert sind. An der scharfen Grenze beider Strata entsteht eine Übergangszone, in der es zu einem massiven Umbau innerhalb der Keratinozyten kommt. Proteasen und Nucleasen bauen fast alle Zellorganellen, die RNA und die DNA des Keratinozyten ab. Durch Sekretion wird der Inhalt der Keratinosomen in den extrazellulären Raum ausgeschüttet ⁽⁵³⁾. Es kommt zur Bildung von multilamellaren Lipidschichten, in die die Korneozyten eingebunden sind. Je nach Körperregion hat das *Stratum corneum* eine Stärke von 10 - 80 µm und kann aus bis zu 20 aufeinanderliegenden Schichten aus Korneozyten und interzellulären multilamellaren Lipidschichten bestehen. Als *Stratum corneum conjunctum* bezeichnet man den basal liegenden, eng gepackten Teil der Hornschicht (3 - 5 Lagen stark), während der apikal sehr locker aufgebaute Bereich das *Stratum corneum disjunctum* bildet. Von diesem wird ungefähr alle 24 h die oberste Schicht der Korneozyten abgeschilfert.

Der gesamte Differenzierungsvorgang der Keratinozyten vom *Stratum basale* bis zur Abschilferung der Hornzellen dauert einen Monat. Die Abschilferung ist ein enzymatisch kontrollierter Vorgang, der durch eine Serinproteinase ^(51,111,175) kontrolliert wird. Der Einfluß der Sterolsulfatase ⁽⁵⁷⁾ an diesem Prozeß ist umstritten. Mehrere externe Faktoren beeinflussen die Differenzierung des Keratinozyten. Dazu gehören der epidermale Wachstumsfaktor EGF ⁽¹⁴⁶⁾, der Tumornekrosefaktor TNF- α , der transformierende Wachstumsfaktor TGF- β ⁽⁶⁷⁾, die Vitamine A, C und D ⁽¹⁴⁹⁾, die Temperatur ⁽¹⁴⁶⁾ und die Kalziumkonzentration ⁽⁵⁶⁾.

Die genaue extrazelluläre Kalziumkonzentration ist nicht bekannt. Sie ist im *Stratum basale* niedrig, nimmt in apikaler Richtung zu und erreicht am *Stratum granulosum/Stratum corneum* Übergang das Maximum. Im *Stratum corneum disjunctum* konnte weder intra- noch extrazellulär Ca^{2+} nachgewiesen werden ⁽¹²⁴⁾. Die Kalziumkonzentration innerhalb der Epidermis unterliegt einer genauen Regulation ⁽¹²²⁾. Wahrscheinlich liegt die epidermale Kalziumkonzentration im millimolaren Bereich, da die Differenzierung der Keratinozyten in vitro 10 mM Ca^{2+} benötigt ⁽¹⁶⁰⁾.

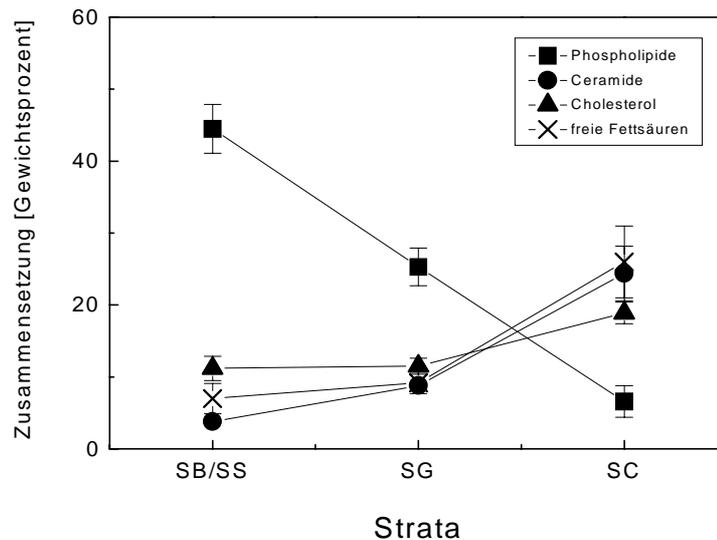


Abbildung 2:

Veränderung der Lipidzusammensetzung innerhalb der humanen Epidermis von den basalen Zellschichten (*Stratum basale*, SB und *Stratum spinosum*, SS) über das *Stratum granulosum* (SG) zum apikalen *Stratum corneum* (SC) (modifiziert nach Elias und Menon⁽⁵⁴⁾).

Parallel mit der Differenzierung der Keratinozyten vom *Stratum basale* bis zur Ausbildung des *Stratum corneums* ändert sich die Lipidzusammensetzung innerhalb der einzelnen Strata ⁽⁹⁵⁾. Von basal nach apikal kommt es zu einer Abnahme der Phospholipide und einer Zunahme der freien Fettsäuren. Auch die Konzentration der Ceramide nimmt zu (Abb. 2). In einer sehr groben Näherung kann man davon ausgehen, daß die freien Fettsäuren, die Ceramide und das Cholesterol in equimolaren Mengen im *Stratum corneum* vorhanden sind.

3.3. Das *Stratum corneum*

Das apikal liegende *Stratum corneum* bildet durch seinen spezifischen Aufbau die entscheidende Barriere der Epidermis. Ohne das *Stratum corneum* würde der Mensch täglich 20 Liter Wasser transepidermal verlieren ⁽¹²⁰⁾. Bei intakter Barriere beträgt der Verlust nur $0,4 \text{ mg h}^{-1} \text{ cm}^{-2}$ ⁽⁹⁶⁾. Das entspricht 0,16 Liter pro Tag. Das *Stratum corneum* besteht aus Hornschuppen (Korneozyten), die in multilamellare Lipidschichten eingebettet sind. Die Stärke des *Stratum corneums* wird durch die Anzahl der aufeinander gestapelten Korneozyten bedingt und variiert je nach Körperregion und Jahreszeit zwischen 10 und $80 \mu\text{m}$ ⁽¹⁴³⁾. Für große hydrophile Moleküle gibt es keine direkten Penetrationswege durch das *Stratum corneum*. Lipophile und sehr kleine hydrophile Substanzen (z. B. Wassermoleküle) können nur entlang der multilamellaren Lipidschichten diffundieren. Der Penetrationsweg verläuft "mäanderförmig" um die Korneozyten ⁽³⁶⁾ und beträgt ca. $500 \mu\text{m}$, ein Vielfaches der Stärke des *Stratum corneums*.

Ein ähnliches Prinzip der Diffusionsbarriere haben die höheren Pflanzen entwickelt, die sich ebenfalls vor unkontrolliertem Wasserverlust schützen müssen. Auf der pflanzlichen Epidermis ist eine Kutikula aufgelagerte, die aus Wachsen besteht. Diese weisen über weite Bereiche kristalline Struktur auf. Die Penetration hydrophiler Moleküle durch die Kutikula ist ebenfalls nur mäanderförmig an der Grenzfläche zwischen kristallinen fluiden bzw. amorphen Bereichen möglich ⁽¹⁵⁷⁾.

Als charakteristische physikalische Meßgröße des intakten *Stratum corneums* wird oft der transepidermale Wasserverlust (TEWL) verwendet. Dieser nimmt bei einer akuten Störung der Barriere stark zu. Eine teilweise Extraktion der Lipide durch Azeton oder Natriumdodecylsulfat (SDS) erhöht den transepidermalen Wasserverlust von $9 \text{ ppm cm}^{-2} \text{ h}^{-1}$ um den Faktor 30 - 100 ⁽⁷²⁾.

Neuere Untersuchungen zeigen jedoch, daß der TEWL an einzelnen Körperteilen variiert und einem zirkadianen Rhythmus unterliegt ⁽²⁰²⁾. Die Autoren zeigten, daß der TEWL an der Stirn um Mitternacht $29 \text{ g m}^{-2} \text{ h}^{-1}$ beträgt und dann über 12 h auf $10,4 \text{ g m}^{-2} \text{ h}^{-1}$ abfällt. In den nächsten 12 h steigt er dann wieder an. Das bedeutet, daß die Diffusionsbarriere des *Stratum corneums* über den Tag nicht konstant ist.

Zur Strukturbeschreibung des *Stratum corneums* wurde der Begriff des "Backstein-Mörtel"-Modells von Elias ⁽⁵²⁾ eingeführt. Neuere Untersuchungen belegen, daß

dieses Modell zu stark vereinfacht. Das *Stratum corneum* ist in sich sehr heterogen. Bonté und Mitarbeiter ⁽¹⁷⁾ zeigten, daß die Phospholipidkonzentration von basal nach apikal abnimmt. Die Konzentration der freien Fettsäuren und der Ceramide nimmt in der gleichen Richtung zu. Ebenso verändert sich die Konzentration der Kalium-, Natrium- und Chlorid-Ionen innerhalb des *Stratum corneums* ⁽¹⁹¹⁾. Die Kalziumkonzentration nimmt von basal nach apikal ab ⁽¹²⁴⁾. Phosphat kommt nur in sehr geringer Konzentration vor.

Über das *Stratum corneum* besteht ein ausgeprägter pH-Gradient ⁽¹³⁸⁾. Im apikalen *Stratum corneum* disjunctum beträgt der pH- Wert bei Männern 4,5 und bei Frauen 5,3 und nimmt bis zum oberen *Stratum granulosum* auf 6,9 zu. Das entspricht einem Sprung von 2 pH-Einheiten über 10 - 15 µm.

Innerhalb des *Stratum corneums*, außerhalb der Korneozyten, kommen verschiedene Proteine und Enzyme vor, die sich in ihrer Konzentration und Aktivität unterscheiden: Proteinasen ^(32,51,111), Lipasen ^(55,114,125), β-Glukocerebrosidasen, Ceramidasen ^(81,86) und Sphingomyelinasen ⁽¹²⁵⁾.

Diese Untersuchungen belegen, daß das *Stratum corneum* keine homogene Matrix bildet, in sich sehr heterogen ist und neben den Korneozyten und den multilamellaren Lipidschichten eine Vielzahl weiterer biologisch aktiver Substanzen enthält.

3.4. Die Lipide des Stratum corneums

Die Zusammensetzung der *Stratum corneum* Lipide wurde erstmals von Lampe und Mitarbeitern ⁽⁹⁴⁾ aufgeklärt. Frühere Versuche von Nieminen und Mitarbeitern ⁽¹³²⁾ waren nicht erfolgreich. Die Autoren beschrieben, daß die multilamellaren Lipidschichten des *Stratum corneums* im wesentlichen aus Ceramiden, freien Fettsäuren und Sterolen bestehen (Abb. 3). Der Anteil an ungesättigten Fettsäuren ist im *Stratum corneum* sehr niedrig. Die Analysen zeigten außerdem, daß die Zusammensetzung des *Stratum corneums* zwischen verschiedenen Körperregionen variiert (Tab. 1).

Tabelle 1:
Zusammensetzung der *Stratum corneum* Lipide unterschiedlicher Körperregionen nach Lampe und Mitarbeitern ⁽⁹⁴⁾. Die Angaben sind in Gewichtsprozent.

Lipidfraktion	Gesicht	Bauch	Beine	Fußsohlen
Phospholipide	3,3	4,9	5,2	3,2
Glykosylceramide	6,7	2,6	3,4	6,4
Cholesterolsulfat	2,7	1,5	6	3,4
freie Fettsäuren	19,7	19,3	13,9	9
Ceramide	19,9	15,5	22,6	28,4
freie Sterole	17,3	14	20,1	32,8
Triacylglycerole	13,5	25,2	20,1	5,9
Sterolester	6,2	6,1	4,6	7,1
Squalen	6,9	6,5	3,6	2,9
n-Alkane	2,8	3,7	3	2,9

Lavrijsen und Mitarbeiter ⁽¹⁰⁵⁾ fanden Unterschiede in der Lipidzusammensetzung des *Stratum corneums* bei fünf untersuchten Individuen. Die relativen Anteile der Di- bzw. Triacylglycerole variierte zwischen 10,5 - 75,9 %, die der Ceramide zwischen 5,3 - 36,4 % und die der freien Fettsäuren zwischen 2,4 - 12,3 %. Rogers und Mitarbeiter ⁽¹⁵⁹⁾ zeigten, daß die Konzentration aller *Stratum corneum* Lipide einem jahreszeitlichen Gang unterliegt. Sie ist im Winter niedriger als im Sommer und nimmt mit steigendem Alter ab. Untersuchungen von Denda und Mitarbeiter ⁽⁴⁶⁾ zeigten, daß sich bei Frauen die Zusammensetzung der Ceramidfraktionen mit dem Alter ändert.

Neuere Studien von Bonté und Mitarbeitern ⁽¹⁷⁾ belegten, daß die Lipidzusammensetzung auch innerhalb des *Stratum corneum* variiert. Die Autoren zeigten mit der AMD unterstützten HPTLC Analytik, daß die Konzentration der freien Fettsäuren, der

Sterole und der Ceramide von den basalen Bereichen des *Stratum corneums* in Richtung *Stratum corneum disjunctum* zunimmt, während die Konzentration der Phospholipide abnimmt. Gleichzeitig nimmt das Verhältnis der freien Fettsäuren zum Cholesterol (FA/Ch) und das Verhältnis der freien Fettsäuren zu den Ceramiden ab. Diese Veränderungen stehen wahrscheinlich mit der Abschilferung der Hornzellen in engem Zusammenhang.

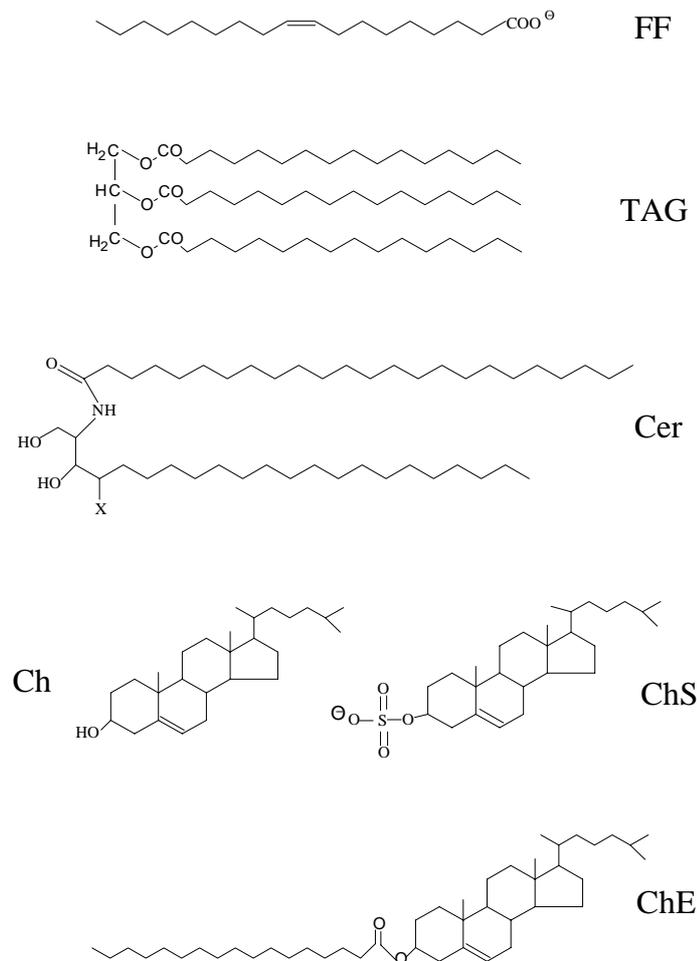


Abbildung 3:

Die Grundstrukturen der wichtigsten *Stratum corneum* Lipide: freie Fettsäuren (FF, z. B. Ölsäure), Cholesterol (Ch), Cholesterolsulfat (ChS), Ceramide (Derivate des Sphingosins (Cer) und des Phytosphingosins (X= -OH)), Triacylglycerole (TAG), Sterolester (ChE).

Obwohl die Zusammensetzung der *Stratum corneum* Lipide nicht einheitlich ist, ist eine Variation in der Zusammensetzung nur in engem Rahmen möglich. Inhibiert man nämlich die Schlüsselenzyme der für diese Lipide spezifischen Synthesewege, so kommt es zu einem starken Anstieg des transepidermalen Wasserverlustes und zu morphologischen Veränderungen im Aufbau des *Stratum corneums*. Das konnte durch spezifische Hemmung der Acetyl-CoA Carboxylase ⁽¹¹³⁾, der HMG-CoA

Reduktase ⁽⁶⁰⁾ und der Serin-Palmitoyl Transferase ⁽⁸⁰⁾, den Schlüsselenzymen der Fettsäure-, Cholesterol- und Sphingolipidbiosynthese nachgewiesen werden.

3.4.1. Die Ceramide des *Stratum corneums*

Ceramide sind Derivate des Sphingosins oder des Phytosphingosins (Abb. 3), die mit einer Fettsäure säureamidartig verestert sind. In den ersten Studien wurden die Ceramide des SC nach ihrem chromatographischen Trennverhalten in 6 Gruppen eingeteilt (1, 2, 3, 4/5, 6I und 6II) ⁽¹⁹⁵⁾. Auf Grund der sich aber abzeichnenden Heterogenität der *Stratum corneum* Ceramide wurde von Robson und Mitarbeitern ⁽¹⁵⁸⁾ eine neue Nomenklatur vorgeschlagen, die insbesondere die molekulare Struktur berücksichtigt. Diese Nomenklatur differenziert zwischen Derivaten des Phytosphingosins und des Sphingosins, ob die ω -Hydroxygruppe der amidartig gebunden Fettsäure verestert ist und ob die Ceramide in α -Stellung hydroxyliert sind. Durch die Veresterung der ω -Hydroxygruppe mit Linolsäure ⁽¹⁹⁴⁾ entsteht eine Acylkette aus bis zu 32 Kohlenstoffatomen. Dieses Ceramid 1 kann auf Grund der Kettenlänge zwei Lipidmonoschichten durchspannen ⁽¹⁹⁵⁾ und die multilamellaren Lipidschichten des *Stratum corneums* miteinander "vernieten" ⁽²⁾. Deshalb ist das Ceramid 1 für die Stabilität und Struktur der Lipidlamellen von großer Bedeutung ⁽²³⁾.

Einige Ceramide sind über die ω -Hydroxygruppe kovalent mit den Hüllproteinen der Korneozyten verknüpft ⁽⁴⁰⁾. Diese sogenannten nicht-extrahierbaren Ceramide (Ceramid A, Ceramid B) bilden mit den Hüllproteinen (Involukrin, Lorikrin und SPRP ("small proline rich protein")) der Korneozyten den "lipid-envelope" ⁽¹⁷²⁾. Die Hüllproteine der Korneozyten weisen eine β -Faltblatt Struktur auf. Deshalb ist die Packungsdichte der an sie gebunden Lipide sehr hoch ⁽¹⁰⁶⁾.

Zusätzlich zu den Ceramiden findet man im *Stratum corneum* auch reine Sphingosine, wie z. B. das 6-Hydroxysphingosin mit einer Kettenlänge von 18 - 20 Kohlenstoffatomen und Dihydrosphingosine (Sphinganine) mit einer Kettenlänge aus bis zu 26 Kohlenstoffatomen ⁽¹⁷³⁾.

Die Fettsäuren des *Stratum corneums*

Die multilamellaren Lipidschichten des *Stratum corneums* enthalten einen großen Anteil an freien Fettsäuren (Abb. 3), deren Acylketten aus 14 - 22 Kohlenstoffatomen bestehen. Dabei überwiegt der Anteil an C_{16:0}- und C_{18:1}-Ketten⁽⁹⁴⁾. Untersuchungen von Ongpipatanakul und Mitarbeitern⁽¹³⁷⁾ zeigten, daß im enddifferenzierten *Stratum corneum* Ölsäure (C_{18:1}) in einer separaten Phase vorkommt. Diese koexistiert mit der geordneten Phase der *Stratum corneum* Lipide.

Unklar ist, ob die im *Stratum corneum* vorkommenden freien Fettsäuren neu synthetisiert, oder aus Membranlipiden hervorgehen⁽¹²⁰⁾. Eine am *Stratum granulosum/Stratum corneum* Übergang und in den basalen Schichten des *Stratum corneums* vorhandene Phospholipase A₂⁽¹¹⁶⁾ deutet aber darauf hin, daß freie Fettsäuren aus vorhandenen Lipiden hervorgehen können. Dieser Vorstellung wird durch Befunde von Mao-Quiang und Mitarbeitern⁽¹¹⁴⁾ gestützt. Die Autoren behandelten murine Haut mit Bromphenylacylbromid, einem spezifischen PL A₂ Inhibitor. In der Folge sank die Konzentration der freien Fettsäuren im *Stratum corneum* von 18,8 µg/mg SC auf 10 µg/mg SC. Gleichzeitig stieg der transepidermale Wasserverlust um den Faktor 2.

Die ungesättigten Fettsäuren, insbesondere die essentiellen, sind für den Aufbau und Erhalt der Barriere entscheidend. Dabei kommt der Linolsäure (C_{18:2}; n-6) eine besondere Bedeutung zu. Sie ist mit der endständigen ω-Hydroxyfettsäure der Ceramide verestert. Dadurch entsteht das Ceramid 1, das die multilamellaren Lipidschichten miteinander vernietet. Unter Linolsäure-Mangel kommt es zu einer charakteristischen Störungen des epidermalen Lipidstoffwechsels mit typischen Verhornungsstörungen und einem erhöhten transepidermalen Wasserverlust⁽¹²⁰⁾. Steht dem Organismus Linolsäure nicht in ausreichender Menge zur Verfügung, so wird sie durch Ölsäure (C_{18:1}) ersetzt und diese mit der ω-Hydroxygruppe der Ceramide verestert. Dieses Acylceramid-Derivat hat aber nicht die stabilisierende Wirkung des Ceramid 1. Schon innerhalb des *Stratum granulosums* kommt es zu einem Zerfall der Keratinosomen. Eine topische Applikation von Linolsäure oder γ-Linolensäure kann die mit diesem Mangel verbundenen Verhornungsstörung reduzieren⁽¹²⁰⁾.

3.4.2. Die Sterole des *Stratum corneums*

Im *Stratum corneum* kommen im wesentlichen drei Sterolderivate vor (Abb. 3): Cholesterol, Cholesterolsulfat und Sterolester. Insgesamt findet in der menschlichen Epidermis 21 % der gesamten Cholesterolsynthese statt ⁽⁶⁰⁾. Die epidermale Synthese ist unabhängig von der hepatischen, da die Keratinozyten keinen LDL-Rezeptor exprimieren. Änderungen der Cholesterolkonzentration im Blut haben deshalb keinen Einfluß auf die Cholesterolsynthese in der Epidermis. Die Synthese wird durch die β -Hydroxy-methyl-glutaryl-CoA (HMG-CoA) Reduktase reguliert. Sowohl die Aktivität als auch die Konzentration des Enzymes erhöht sich in der Epidermis, wenn es zu einer Störung der Barriere durch Azeton oder Natriumdodecylsulfat (SDS) kommt ⁽¹⁵²⁾.

Die Cholesterolkonzentration innerhalb des *Stratum corneums* unterliegt sowohl einer individuellen, als auch einer körperregionalen Variation. Für Cholesterol wurden Werte zwischen 5,9 % ⁽¹⁶⁾, 23 % ⁽¹⁰⁵⁾ und 35 % ^(94,120) nachgewiesen. Eigene Untersuchungen ⁽²⁰⁹⁾ an plantarem *Stratum corneum* ergaben individuelle Konzentrationsunterschiede im Bereich zwischen 37,5 % und 54,2 % (n = 6) und eine mittlere Cholesterolkonzentration von $43,5 \pm 3$ % (n > 100). Neuere Untersuchungen von Bonté und Mitarbeitern ⁽¹⁷⁾ belegen, daß außerdem innerhalb des *Stratum corneums* die Cholesterolkonzentration zwischen 2,5 - 4 $\mu\text{g}/\text{cm}^2$ (12,2 - 17,4 %) variiert.

Cholesterolsulfat (ChS) gehört zu den polarsten *Stratum corneum* Lipiden. Die Konzentration ist im *Stratum corneum* sehr niedrig und liegt zwischen 1,2 und 2,3 %. In den tieferen Hornhautschichten ist die Konzentration höher. Cholesterolsulfat entsteht durch Sulfatierung von Cholesterol mit 3'-Phosphoadenosin-5'-Phosphosulfat (PAPS) und spielt wahrscheinlich bei der Abschilferung der Hornzellen (Desquamation) eine Rolle. Es wurde postuliert, daß das negativ geladene Cholesterolsulfat mit positiv geladenen Kalzium-Ionen eine Stabilisierung der multilamellaren Lipidschichten bewirkt. Eine im *Stratum corneum* vorhandene Steroidsulfatase katalysiert die Hydrolyse des ChS in Cholesterol und Sulfat-Ionen. Dadurch soll es zu einer Destabilisierung der Lipidschichten und einer erleichterten Abschilferung kommen.

Unterstützt wurde diese Vermutung durch Untersuchungen von Long und Mitarbeitern ⁽¹¹⁰⁾. Die Autoren zeigten, daß die Cholesterolsulfat-Konzentration in

abgeschilferten Korneozyten wesentlich niedriger ist, als im *Stratum corneum*. Bekannt ist auch, daß bei der X-chromosomalen rezessiven Ichthyose (RXLI), einer Desquamationsstörung, die Cholesterolsulfatkonzentration im *Stratum corneum* erhöht ist, da keine Steroidsulfatase-Aktivität vorhanden ist. Dieser Befund unterstützt die Hypothese, daß Cholesterolsulfat direkt den Zusammenhalt der Korneozyten verstärkt und die Steroidsulfatase die Desquamation beeinflusst.

Neuere Untersuchungen sind mit dieser Modellvorstellung nicht vereinbar. Die Desquamationsstörung der RXLI könnte auch darauf beruhen, daß Cholesterolsulfat im SC vorhandene Proteinase hemmt ⁽¹⁹⁶⁾. Die Proteinase sind ebenfalls an der Desquamation beteiligt. Sie hydrolysieren z. B. die Desmosomen, die die Hornschuppen zusammenhalten ^(51,111). So führte die topische Applikation von ChS zu einer RXLI-ähnlichen Desquamationsstörung mit erhöhter Desmoglein-Konzentration, einem desmosomalen Protein ⁽¹⁶¹⁾. Die Autoren zeigten weiterhin, daß Proteasen des Trypsin- und Chymotrypsin-Typs, die ebenfalls im *Stratum corneum* vorkommen, durch Cholesterolsulfat inhibiert werden. Auch Zettersten und Mitarbeiter ⁽²¹⁴⁾ zeigten, daß die topische Applikation von Cholesterolsulfat zu einer Störung innerhalb der multilamellaren Lipidschichten des SC führt.

Die Vermutung, daß Cholesterolsulfat nicht direkt die Stabilität des *Stratum corneums* beeinflusst, wird durch Lipidanalysen von Serizawa und Mitarbeitern ⁽¹⁶⁸⁾ zusätzlich gestützt. Die Autoren zeigten, daß bei hautgesunden Personen keine Korrelation zwischen der Stabilität des *Stratum corneums* und der Cholesterolsulfat-Konzentration besteht. Trotz identischer Cholesterolsulfat-Konzentrationen weist das *Stratum corneum* der Handfläche eine 7fach höhere Stabilität auf, als das *Stratum corneum* des Oberarms.

Bis heute ist die physiologische Funktion des Cholesterolsulfat im *Stratum corneum* nicht abschließend geklärt. Es bleibt offen, ob die Kohäsion des *Stratum corneums* durch ChS und die Aktivität der Steroidsulfatase bestimmt wird, oder ob ChS regulierend auf Proteinase wirkt, die die Desquamation maßgeblich beeinflussen.

3.4.3. Die Struktur der multilamellaren Lipidschichten

Obwohl die Lipidzusammensetzung des *Stratum corneums* innerhalb bestimmter Grenzen variiert, sind die Lipide hochgradig organisiert. Ihre Synthese findet in den Keratinosomen statt ⁽⁹⁶⁾. Nach Exozytose des Keratinosomeninhaltes an der *Stratum*

granulosum/Stratum corneum Grenze ⁽⁵³⁾ fusionieren die Lipide zu multilamellaren Lipidschichten. Dieser Vorgang wird durch freie Fettsäuren und die hohe extrazelluläre Ca^{2+} Konzentration begünstigt.

Mit Hilfe elektronenmikroskopischer Untersuchungen und Röntgenbeugungsexperimenten läßt sich die Struktur der multilamellaren Lipidschichten bestimmen. Sie sind parallel zur Oberfläche orientiert und treten in sich wiederholenden Einheiten auf ⁽¹⁷⁶⁾.

Es wurde postuliert, daß die Ausrichtung der Lipidschichten durch die an die Keratinozyten kovalent gebundenen Ceramide A und B, den "lipid envelope" ⁽¹⁷⁷⁾ (Kapitel 3.4.1) beeinflußt wird. Im Gegensatz dazu zeigten Studien von Kuempel und Mitarbeitern ⁽⁹²⁾, daß sich die *Stratum corneum* Lipide auch in Abwesenheit von Korneozyten in multilamellare Lipidschichten organisieren. Es bleibt zu klären, ob der "lipid envelope" für die Organisation der multilamellaren Lipidschichten wichtig ist oder ob er nur eine stabilere Einbindung der Korneozyten in die multilamellaren Lipidschichten ermöglicht.

Röntgenstrukturstudien ergaben, daß die multilamellaren Lipidschichten zwei voneinander unabhängige Schichtabstände aufweisen: einen großen mit 13,4 nm und einen kleinen mit 6,4 nm Abstand. Neuere Untersuchungen in Verbindung mit Elektronendichteprofilen erlaubten eine Zuordnung der Schichtabstände zu der wahrscheinlichen molekularen Anordnung der Lipide ⁽²³⁾. Der kleine Schichtabstand entsteht aus vollständig interdigitierten lamellaren Lipidschichten der kurzkettigen Ceramide 2, 3, 4, 6 und Cholesterol. Der große Schichtabstand wird durch langkettige Ceramide des Typs 2, 3, 4, 6 bestimmt. Eine zusätzliche Stabilisierung wird durch den vernietenden Effekt des Ceramid 1 ⁽²⁾ sowie das Ceramid 5 und Cholesterol erreicht. In dieser Modellvorstellung sind alle Acylketten parallel zueinander in eine Richtung orientiert und die Kopfgruppen in die entgegengesetzte. Ältere Modellvorstellungen von Swartzendruber und Mitarbeitern ⁽¹⁷⁶⁾ gehen davon aus, daß die Ceramide spagatförmige angeordnet sind. Beide Modellvorstellungen unterstützen aber den vernietenden Einfluß des Ceramid 1.

Der Ordnungsgrad der Lipidlamellen wird durch die Hydratation des *Stratum corneums* bestimmt ⁽²⁵⁾. Die Autoren zeigten, daß eine erhöhte Hydratation kein Anschwellen der Lipidlamellen zur Folge hat. Der große Schichtabstand von 13,4 nm

bleibt unverändert erhalten. Ursache ist, daß das Ceramid 1 die multilamellaren Lipidschichten miteinander vernietet und ein auseinanderweichen verhindert.

Die Struktur der multilamellaren Lipidlamellen wird weiterhin von der Temperatur beeinflusst. Bei 23 °C liegen die Lipide innerhalb der Lamellen in einer orthorhombisch-kristallinen Phase vor^(24,41). Bei 55 °C kommt es zu einem Übergang in eine hexagonale Packung. Ab 70 °C findet ein weiteres sukzessives Aufschmelzen der Lipide statt und bei 90 °C liegen alle Lipide in einer flüssig-kristallinen Phase vor.

Hervorzuheben ist, daß sowohl im intakten *Stratum corneum*⁽²⁴⁾, als auch in Liposomen aus allen *Stratum corneum* Lipiden (SCV)⁽²¹³⁾, Cholesterolanteile in einer separaten kristallinen Phase vorhanden sind. Das bedeutet, daß die Lipide unter physiologischen Temperaturen nicht in einer einzigen homogenen Phase organisiert sind, sondern laterale Inhomogenitäten auftreten. Diese Befunde werden durch FT-IR spektroskopische Messungen von Moore und Mitarbeitern⁽¹²⁹⁾ an Mischungen aus Ceramid III (aus Rinderhirn), Cholesterol und Palmitinsäure gestützt.

3.5. Die strahlungsinduzierte Oxidation der Lipide

Das humane *Stratum corneum* ist als äußerste Schicht direkt der natürlichen UV-Strahlung ausgesetzt. Die UV-Strahlung wird in 3 Wellenlängenbereiche eingeteilt: UV-C ($\lambda < 280$ nm), UV-B (280 - 320 nm) und UV-A (320 - 400 nm). Die kurzwellige UV-C Strahlung wird in den obersten Schichten der Atmosphäre absorbiert und erreicht die Erdoberfläche nicht. UV-B Strahlung erreicht die Erdoberfläche nur in geringer Intensität. Die Intensität der UV-A ist auf der Erdoberfläche sehr hoch.

Die Transmission des SC für UV-A und UV-B wurde von Bruels und Mitarbeitern ⁽³¹⁾ bestimmt (Abb. 4). Sie beträgt bei einer mittleren Dicke des SC 14 % für $\lambda = 290$ nm (UV-B). Die langwellige UV-A Strahlung dringt tiefer in die Epidermis ein. Die Autoren zeigten, daß bei einer Wellenlänge von $\lambda = 365$ nm 64 % der auftreffenden Strahlung das *Stratum corneum* durchdringen.

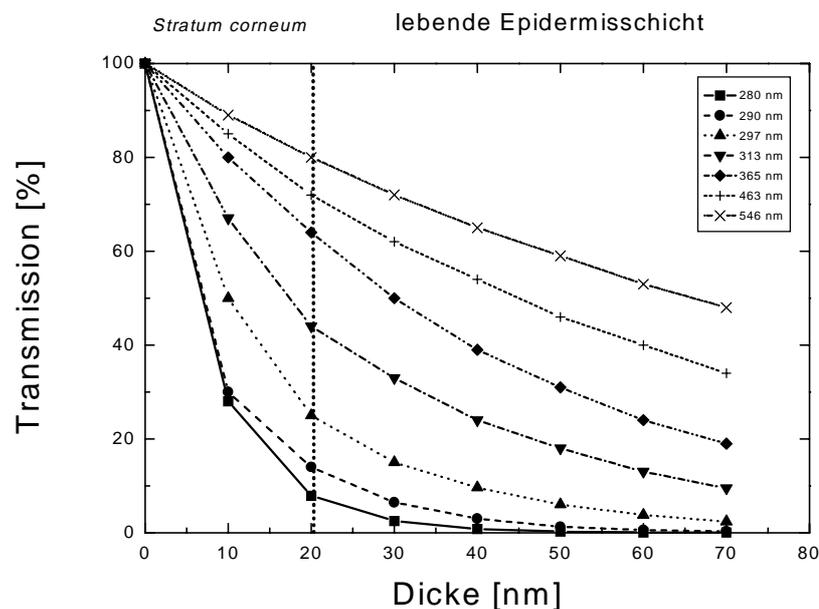


Abbildung 4:

Penetrationstiefe von UV-Strahlung in das *Stratum corneum* und die lebenden Epidermisschichten in Abhängigkeit von der Wellenlänge. Es wurde eine *Stratum corneum* Dicke von 20 μ m angenommen (modifiziert nach Bruels und Mitarbeitern ⁽³¹⁾).

UV Strahlung wirkt auf verschiedenen zellulären Ebenen und kann sowohl positive als auch schädigende (im Extremfall mutagene und/oder letale) Effekte aufweisen. So wird zum Beispiel das lebensnotwendige Vitamin D₃ (Calcio) durch UV-B

Strahlung aus seiner Vorstufe, dem Provitamin D₃ in der Epidermis gebildet. Andererseits kommt es aber unter hohen UV Dosen auch zu Störungen im zellulären Stoffwechsel^(11,45): es werden Zytokine freigesetzt⁽⁴³⁾, die Differenzierung der Keratinozyten wird gestört^(10,13), Enzymaktivitäten in der Epidermis werden beeinflusst^(83,88,153,154), die Lipidsynthese nimmt zu^(82,193), Änderungen in der Genexpression treten auf⁽¹⁰⁹⁾ und es kommt zur Verdickung der Epidermis⁽¹⁰³⁾. Äußerlich sichtbar sind Erythembildung⁽¹⁴⁰⁾ und Entzündungsprozesse⁽¹¹⁾. Die Wirkungen der UV-Strahlung auf zellulärer Ebene sind vielfältig, zum Teil unverstanden und sollen hier nicht weiter ausgeführt werden.

UV-Strahlung hat einen Einfluß auf die Barriereigenschaften des *Stratum corneums*. Nach Bestrahlung nimmt die Penetration von kleinen polaren Molekülen zu⁽¹¹⁷⁾. Holleran und Mitarbeiter⁽⁸²⁾ zeigten, daß es nach einer einmaligen UV-Bestrahlung zu einer unvollständigen Ausbildung der Keratinosomen im *Stratum granulosum* mit einer gestörten Lipidsynthese⁽¹⁹³⁾ kommt. Insbesondere der Umsatz der Serin-Palmitoyl-Transferase (SPT), dem Schlüsselenzym der Ceramidsynthese, nimmt zu⁽⁸²⁾. Es kommt zu einer erhöhten Synthese der SPT-mRNA und einem Anstieg in der SPT Konzentration 48 h nach der Bestrahlung⁽⁵⁸⁾. Die multilamellaren Lipidschichten können sich auf Grund der gestörten Lipidsynthese nicht richtig ausbilden und es kommt zu einem Anstieg des transepidermalen Wasserverlustes⁽⁷⁴⁾. Die Synthese der Sterole, der freien Fettsäuren und der Phospholipide nimmt ebenfalls zu⁽⁸²⁾. Ungefähr 120 - 140 h nach der Bestrahlung sind keine Störungen in der Barriere mehr nachweisbar, da dann intakte Keratinosomen das SC erreicht haben.

UV Strahlung stört auch unmittelbar die Zusammensetzung der multilamellaren Lipidschichten. Thiele und Mitarbeiter⁽¹⁸⁵⁾ zeigten in vivo, daß eine einmalige UV-Bestrahlung die Lipide des *Stratum corneums* oxidiert. Es kommt zu einem Anstieg von Malondialdehyd (MDA), einem Oxidationsprodukt der Acylketten⁽¹⁸⁴⁾. Gleichzeitig nimmt die Konzentration an Vitamin E, einem lipophilen Antioxidants des *Stratum corneums* ab. MDA verringert die Barriereigenschaften von Lipidmembranen⁽¹⁸⁷⁾. Werden Liposomen mit UV-A bestrahlt, so kommt es zu einem dosisabhängigen Anstieg von MDA und zu einer erhöhten Penetration verkapselter Substanzen⁽¹⁸⁾.

Die Epidermis schützt sich durch verschiedene Mechanismen vor der oxidierenden Wirkung der solaren UV-Strahlung. Schutz vor der Oxidation bieten einerseits die

epidermalen Vitamine E und C ^(184,186), sowie eventuell die *trans*-Urokaninsäure (*t*-UCA), ein Abbauprodukt des Histidins ^(134,135).

Es ist bis heute nicht geklärt, ob eine der oben aufgeführten Substanzen als die entscheidende Antioxidanz der Epidermis wirkt, oder ob alle Substanzen zusammen wirken. Denn da das *Stratum corneum* physiologisch weitgehend inaktiv ist, können oxidierte Substanzen nur langsam oder überhaupt nicht regeneriert werden. Das *Stratum corneum* kann sich deshalb verändernden Strahlungsbedingungen nicht unmittelbar anpassen.

Weder die UV-A noch die UV-B Strahlung sind energiereich genug, um Lipide direkt zu oxidieren. Sie können aber von den natürlichen Pigmenten der Epidermis und des *Stratum corneums* absorbiert werden. Das Pigmentmolekül geht dadurch vom Grundzustand (⁰S) in den angeregten Zustand (¹S) über, von dem es in den langlebigen Triplett-Zustand (³S) wechseln kann (Abb. 5). Die Energie des Pigmentmoleküls im angeregten Zustand kann eine Lipidperoxidation auslösen.

Beim "Typ II"-Mechanismus reicht die Energie des ³S Zustandes zur Bildung von Singulett-Sauerstoff (¹O₂) aus. Dieser reagiert mit ungesättigten Lipiden (LH) zu Lipidhydroperoxiden (LOOH). Beim "Typ I"- Mechanismus ist die Energie des ³S Zustandes ausreichend, ein Wasserstoffatom aus ungesättigten Lipiden zu abzuspalten. Dadurch kommt es zur Bildung eines Alkylradikals (Lσ) und eines anionischen Pigmentradikals (Sσ⁻). Bei mehrfach ungesättigten Lipiden ist das Lσ ein Pentadienylradikal, bei dem ein Elektron über 5 Kohlenstoffatome delokalisiert ist ⁽⁶⁹⁾. Nach Reaktion mit O₂ entsteht dann z. B. aus Linolsäure ein 9- oder 13-Peroxyradikal (LOOσ), das nach Wasserstoffabstraktion aus LH zu einem Hydroperoxid (LOOH) reagiert. Aus dem LH entsteht hierbei ein neues Alkylradikal (Lσ), das weitere radikalische Reaktionen auslöst.

Aus dem in der initialen Reaktion entstandenen anionischen Pigmentradikal Sσ⁻ entsteht durch Reaktion mit O₂ das Superoxidanion (O₂⁻) und das Pigment fällt in seinem Grundzustand ⁰S zurück. Aus dem Superoxidanion entsteht Wasserstoffperoxid (H₂O₂), aus dem das sehr reaktive Hydroxylradikal (HOσ) hervorgehen kann. Auch dieses kann mit ungesättigten Lipiden zu Alkylradikalen reagieren, aus denen dann erneut Lipidhydroperoxide (LOOH) entstehen können.

Typ I Typ II

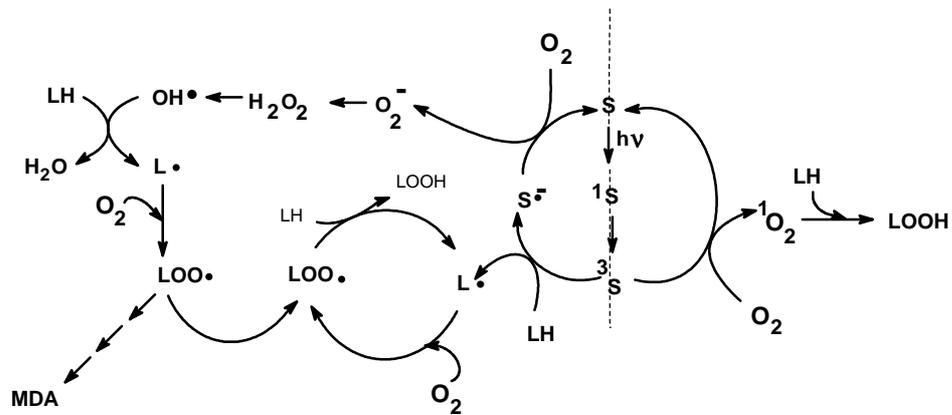


Abbildung 5:

Schema der strahlungsinduzierten Lipidperoxidation. Nach Absorption von Strahlung geht das Pigment in den angeregten Tripletzustand (3S) über. Es kann nach dem "Typ II"-Mechanismus seine Energie direkt auf O_2 unter Bildung von Singulett-Sauerstoff (1O_2) übertragen, welcher mit ungesättigten Lipiden (LH) zu Lipidhydroperoxiden (LOOH) reagiert. Im "Typ I"-Mechanismus entsteht aus dem 3S unter Bildung eines Alkylradikals ein anionisches Pigmentradikal ($S^{\sigma-}$), das zur Entstehung eines Superoxidradikals führt (verändert nach Girotti ⁽⁶⁹⁾).

Abbildung 6 zeigt den Reaktionsverlauf der Lipidperoxidation und die daraus resultierende Bildung von MDA. Durch Abspaltung eines Wasserstoffatoms ($H\sigma$) aus einem ungesättigten Lipid entsteht ein Alkylradikal (Initiationsphase). Nach Reaktion mit O_2 entsteht daraus ein Peroxylradikal, das unter Bildung eines neuen Alkylradikals zu einem Lipidhydroperoxid reagieren kann. Das neue Alkylradikal steht für weitere Reaktionen zur Verfügung (Propagationsphase). Das Peroxylradikal kann aber auch zyklisieren und es entsteht das Endprodukt Malondialdehyd (MDA), sowie ein verkürztes Alkylradikal. Diese Kettenreaktionen werden beendet, wenn zwei Radikale miteinander reagieren (Termination).

3.5. Die strahlungsinduzierte Oxidation der Lipide

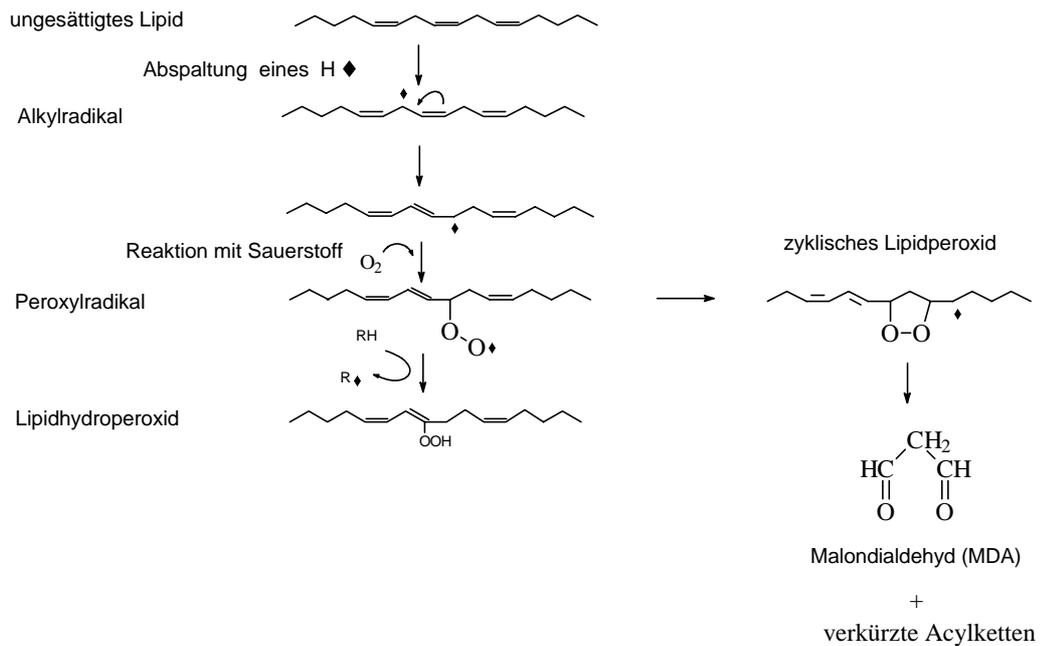


Abbildung 6:
Radikalinduzierte Oxidation von ungesättigten Lipiden zu Lipidhydroperoxiden (LOOH) und Malondialdehyd (MDA).

Der Anteil an ungesättigten Lipiden im *Stratum corneum*, welche das Oxidationsprodukt MDA bilden können, ist sehr niedrig ^(94,195). Trotzdem kann die Oxidation einiger weniger ungesättigter Fettsäuren, z. B. der Linolsäure (C_{18:2}; n-6), weitreichende Folgen für die Barriereeigenschaft haben. Linolsäure ist ein Bestandteil des Ceramid 1, das auf Grund der Acylkettenlänge zwei Lipidmonoschichten durchspannen kann und die multilamellaren Lipidschichten miteinander vernietet (Kapitel 3.4.1 und Kapitel 3.4.3). Dadurch kommt diesem Ceramid eine entscheidende strukturegebende Funktion zu ^(2,23). Wird die Linolsäure oxidiert, kommt es zu einer Verkürzung der Acylkette und eine Störung der Integrität der multilamellaren Lipidschichten ist zu erwarten. Die Vermutung wird durch Befunde des Linolsäure-Mangels gestützt. Unter Linolsäure-Mangel kommt es zu Verhornungsstörungen und einem erhöhten transepidermalen Wasserverlust ⁽¹²⁰⁾.

3.6. Der Einfluß extern applizierter Lipide auf das Stratum corneum

Mit den Studien von Mezei und Gualeskham ⁽¹²⁶⁾ begann 1980 das wissenschaftliche Interesse an den Wechselwirkungen zwischen Liposomen und der Epidermis. Die Autoren zeigten, daß liposomale Formulierungen die Akkumulation von Wirkstoffen in der Epidermis und der Dermis um das 3 - 5fache erhöhen. Lasch und Wohlrab ⁽¹⁰⁰⁾ belegten, daß eine liposomale Kortisol Formulierung den Wirkstoff besser in die Haut transportiert als eine vergleichbare Wasser/Öl Emulsion. Diese Befunde wurden von Artmann und Mitarbeitern ⁽⁶⁾ bestätigt. Die Autoren zeigten, daß Liposomen aus der Lipidmischung Nat 106 (85 % PC, 10 % PE und 5 % saure Phospholipide) die Penetration eines verkapselten Antikörpers und radioaktiver Substanzen in den Organismus erhöhen. Detaillierte Studien von Schubert und Mitarbeitern ⁽¹⁶⁷⁾ konnten zeigen, daß Liposomen aus reinem Eilecithin nicht intakt in das *Stratum corneum* penetrieren und die verkapselten Substanzen auf der *Stratum corneum* Oberfläche freigesetzt werden.

Moloney ⁽¹²⁸⁾ untersuchte den Einfluß unterschiedlicher Phospholipide auf die Epidermis und zeigte, daß eine mehrfache topische Applikation den transepidermalen Wasserverlust (TEWL) und die Absorption von Hydrokortison erhöht. Nach Behandlung mit Dioleoylphosphatidylcholin stieg der TEWL von $1,3 \pm 0,3 \text{ g h}^{-1} \text{ cm}^{-2}$ auf $3,4 \pm 0,9 \text{ g h}^{-1} \text{ cm}^{-2}$. Das entspricht einer Steigerung um das 2,6fache. Rigide Phosphatidylcholone und fluide Phosphatidylglycerole hatten keinen so starken Effekt. Daß Phospholipide in geringem Maß in die lebenden Schichten der Epidermis penetrieren, läßt sich auch aus einer Studie von Thiele und Mitarbeitern ⁽¹⁸³⁾ schließen. Topische Applikation der Phospholipidmischung Nat 106 reduzierte die Erythembildung nach UV-Bestrahlung signifikant. Die Ursache dafür wurde auf zellulärer Ebene nicht geklärt, läßt aber vermuten, daß die liposomalen Lipide in die Epidermis eindringen. Hofland und Mitarbeiter ⁽⁷⁹⁾ zeigten, daß das Lipidgemisch Nat 106 strukturelle Veränderungen in den multilamellaren Lipidschichten bewirkt. Aus parallel durchgeführten Röntgenbeugungstudien wurde geschlossen, daß sich die Lipide der topisch applizierten Nat 106 Liposomen mit den *Stratum corneum* Lipiden mischen. Vesikel mit einem geringeren Anteil an Phosphatidylcholin blieben auf der Oberfläche des *Stratum corneums* liegen und bewirkten keine strukturellen Veränderungen im *Stratum corneum*.

Im Rahmen einer umfangreichen Untersuchung zeigten Ganesan und Mitarbeiter ⁽⁶⁶⁾, daß die erhöhte Penetration von liposomalen Lipiden (verglichen zu dem frei applizierten Wirkstoff) auf Unterschieden in der thermodynamischen Aktivität der liposomalen und der wäßrigen Kontrollformulierung beruhen.

Bis heute bleibt die Frage strittig, ob Liposomen zum Teil auch intakt in das *Stratum corneum* penetrieren können oder ob sie auf der Oberfläche zerfallen und nur die liposomalen Lipide penetrieren. Weiterhin ist unklar, welchen Einfluß die Lipidzusammensetzung topisch applizierter Liposomen auf die Penetration hat. Als relativ gesichert für liposomale Formulierungen gilt der mäanderförmige Penetrationsweg innerhalb der multilamellaren Lipidschichten ⁽³⁴⁾. Sowohl penetrierende liposomale Lipide, als auch intakte Liposomen, können die Struktur der multilamellaren Lipidschichten im *Stratum corneum* verändern. Beides hätte eine erhöhte Penetration koapplizierter Wirkstoffe zur Folge. Trotz intensiver Forschung konnte nicht eindeutig geklärt werden in welcher Form topisch applizierte Liposomen penetrieren ⁽¹⁶⁶⁾. Ursache dafür sind die verschiedenen experimentellen Versuchsansätze, Untersuchungen an intakter Haut bzw. isoliertem *Stratum corneum* und die Verwendung von Material unterschiedlicher Organismen (Mensch, Schwein, Maus).

Die in der Literatur beschriebenen Experimente zeigen, daß die Fluidität der Acylkette einen starken Einfluß auf die Penetration bzw. Wechselwirkung der Lipide mit den *Stratum corneum* Lipiden hat. Die topische Applikation von fluiden Lipiden (aus Ei, Soja oder in Form von DOPC) stört die Organisation der multilamellaren Lipidschichten stärker ^(6,79,128,167), als entsprechende Lipide mit rigider Acylkette. Yokomizu und Mitarbeiter ⁽²⁰¹⁾ zeigten mit Hilfe der FT-IR Spektroskopie, daß die multilamellaren interzellulären Lipidschichten des *Stratum corneums* nach Applikation von fluiden liposomalen Lipide selbst fluid werden und Kirjavainen und Mitarbeitern ⁽⁹⁰⁾ belegten, daß liposomale Lipide aus rigiden Phospholipiden schlechter in die humane Epidermis penetrieren, als fluide Lipide.

Die Entwicklung von Vesikeln aus fluidem Phosphatidylcholin und Detergentien, die eine extrem flexible Membran besitzen ⁽³⁵⁾, eröffnete die Möglichkeit, Substanzen effektiv durch das *Stratum corneum* in die lebenden Schichten der Epidermis zu transportieren. Dadurch ergeben sich für Peptide wie z. B. Insulin ^(33,37), Narkotika ⁽¹⁴²⁾ oder auch Antikörper ⁽¹⁴¹⁾ neue Applikationsformen ⁽³⁴⁾. Bislang ungeklärt

ist aber der Einfluß, den diese penetrierenden Lipid/Tensid Gemische auf die Struktur, Funktion und Organisation der *Stratum corneum* Lipide haben. Ein von Cevc und Mitarbeitern bestimmter Fluß von $> 0,1 \text{ mg Lipid h}^{-1} \text{ cm}^{-2}$ ⁽³⁹⁾ durch das *Stratum corneum* läßt eine massive Störung der Barriere vermuten.

In den letzten Jahren wurden auch kolloidale Träger aus lipidbeschichteten Öltröpfchen entwickelt, die nur 20 - 30 nm groß sind und lipophile Substanzen in tiefere Hautschichten transportieren ⁽⁹⁾. Diese kolloidalen Träger sind, anders als Liposomen, gegen Detergentien relativ stabil und können lipophile Substanzen in hohen Konzentrationen aufnehmen. Auf Grund ihrer geringen Größe können sie besser durch natürlich vorhandene Defekte ^(121,163) in das *Stratum corneum* eindringen als die mindestens doppelt so großen Liposomen.

Um den Einfluß topisch applizierter Substanzen auf das SC zu erfassen wurden drei verschiedene Meßmethoden eingesetzt: die Kalorimetrie, die FT-IR Spektroskopie und die Röntgenbeugung.

Schon 1975 konnte Van Duzee durch kalorimetrische Messungen zeigen, daß bei 40 °C und bei 75 °C eine Strukturveränderung in den multilamellaren Lipidschichten des *Stratum corneums* auftritt und daß bei 85 °C die Keratine und bei 107 °C die nicht-fibrillären Proteine denaturieren. Diese Temperaturangaben können zwischen einzelnen *Stratum corneum* Proben um einige Grad variieren, was mit eigenen Befunden übereinstimmt ⁽²¹⁰⁾. Trotzdem lassen sich im *Stratum corneum* charakteristische Übergangstemperaturen bestimmen, die mit physikochemischen Veränderungen korrelieren (Tabelle 2).

Die kalorimetrisch bestimmten Übergangstemperaturen lassen sich mit FT-IR Spektroskopie bestätigen. Sowohl ein lateraler orthorhombischer Übergang zwischen 37 °C und 50 °C und das Aufschmelzen der Lipide zwischen 55 °C und 80 °C wurde an intaktem *Stratum corneum* gemessen ^(91,136). Golden und Mitarbeiter ⁽⁷⁰⁾ zeigten, daß das Schmelzen der Lipide bei 70 °C eine Zunahme des transepidermalen Wasserverlustes zur Folge hat. Auch an isolierten *Stratum corneum* Lipiden ⁽¹³⁷⁾ und an Modellmischungen aus typischen *Stratum corneum* Lipiden wurden Phasenübergänge in diesen Temperaturbereichen gefunden ⁽¹²⁹⁾.

Die von Bouwstra und Mitarbeitern ⁽²⁷⁾ durchgeführten umfangreichen Röntgenbeugungsexperimente untermauern die FT-IR spektroskopischen und die kalorimetrischen Befunde. Die Autoren zeigen, daß im humanem *Stratum corneum*

3.6. Der Einfluß extern applizierter Lipide auf das *Stratum corneum*

ein Übergang aus einer lateralen kristallinen in eine laterale hexagonale Anordnung stattfindet und zwischen 60 °C und 75 °C die Lipide schmelzen. Diese Studien konnten die Struktur der multilamellaren Lipidschichten erstmals aufklären.

Mit diesen 3 Methoden wurde auch der Einfluß verschiedener Substanzen auf die Organisation der *Stratum corneum* Lipide untersucht. Die Studien konnten nachweisen, daß Azon ^(27,75), Ethanol ⁽¹⁸¹⁾, Ölsäure ⁽¹³⁶⁾ und Terpene ^(7,42) die Organisation der *Stratum corneum* Lipide nachhaltig stören.

So bewirkte die Applikation von Nonan-, Decan- und Undecansäure eine erhöhte Penetration des Markers *para*-Aminobenzoesäure durch das *Stratum corneum*. Gleichzeitig verschob sich die Lage der endothermen Maxima des SC und es veränderte sich dessen Enthalpie ⁽¹⁸⁰⁾. Ursache ist wahrscheinlich, daß sich diese Fettsäuren im *Stratum corneum* lösen. Auch einfach ungesättigte (Ölsäure) und mehrfach ungesättigte Fettsäuren (Linolsäure, Linolensäure) haben einen starken Einfluß auf die Barriereeigenschaft. Dabei scheint sich die Ölsäure nicht vollständig mit den *Stratum corneum* Lipiden zu mischen ⁽¹⁸⁰⁾. Es kommt zur lokalen Anreicherung und Domänenbildung ⁽¹³⁶⁾.

Tabelle 2:

Endotherme Übergänge innerhalb des humanen *Stratum corneums* und die damit verbundenen Strukturveränderungen. Zusammenfassung aus Naik et al. ⁽¹³⁰⁾ und Tanojo et al. ⁽¹⁷⁹⁾.

Temperatur (°C)	Komponente innerhalb des <i>Stratum corneums</i>
-10	Schmelzen der Lipide mit niedrigem Schmelzpunkt
35 - 45	rigider/fluidier Phasenübergang innerhalb eng begrenzter Bereiche
55	lateralen Phasenübergang der Lipide von orthorhombisch nach hexagonal
70	Aufschmelzen der multilamellaren interzellulären Lipide
80	Schmelzen der proteinassoziierten Lipide und fibrillärer Proteine
100	Denaturierung nichtfibrillärer Proteine

3.7. Das 3-dimensionale Zellkulturmodell der Epidermis

Das humane *Stratum corneum* setzt sich aus Korneozyten zusammen, die in multilamellare Lipidschichten eingebettet sind. Einfache Modellsysteme aus diesen Lipiden erlauben, die Eigenschaft der Lipidbarriere zu charakterisieren (siehe Kapitel 5.2). Das *Stratum corneum* ist jedoch ein dynamisches, in sich heterogenes System (siehe Kapitel 3.3). In die multilamellaren Lipidschichten sind nicht nur die Korneozyten, sondern auch Proteine eingebunden. Dabei handelt es sich sowohl um funktionsfähige Enzyme, als auch um strukturgebende Proteine bzw. Proteina-ggregate (z. B. Desmosomen). Die Wechselwirkungen und die Störungen, die exogen zugeführte synthetische Lipide im *Stratum corneum* induzieren, dürfen deshalb nicht nur an einfachen Modellsystemen aus *Stratum corneum* Lipiden untersucht werden. Wichtig ist es, die Befunde auch an komplexen gewebeanalogen Modellsystemen zu überprüfen.

Vor einigen Jahren gelang es Rheinwald ⁽¹⁵⁶⁾, das Stammzellsystem der Epidermis ex vivo so zu kultivieren, daß sich die Zellen terminal differenzieren. Unter geeigneten Kulturbedingungen entsteht ein der Epidermis ähnliches multizelluläres Häutchen, die rekonstituierte humane Epidermis (ReHE). Rosdy und Mitarbeiter ⁽¹⁶⁰⁾ zeigten, daß dieses Häutchen auch ohne Zusatz dermalen Faktoren generiert werden kann. So ist es möglich, aus relativ wenigen epidermalen Zellen eine ReHE zu erzeugen, die z. B. als autologes Transplantat verwendet werden kann ⁽¹⁹⁸⁾.

Weiterhin bietet die ReHE die Möglichkeit, die Wechselwirkungen der Keratinozyten mit den dermalen Fibroblasten zu studieren oder Differenzierungsvorgänge innerhalb der Epidermis zu untersuchen ^(14,107,144,182,189). Die Expression typischer Differenzierungsmarker kann in der rekonstituierten humanen Epidermis mit Immunfluoreszenz-Techniken überprüft werden ^(127,144,160). Die ReHE läßt sich außerdem für pharmakologische Studien einsetzen ^(8,47,102,127,145), da sie ein gut definiertes Modellsystem ist.

Aufbau, Struktur ^(26,59,89,127,162,169,189) und Lipidzusammensetzung ^(26,89,127,144) der ReHE wurden von verschiedenen Arbeitsgruppen mit der "normalen" Epidermis verglichen. Einige dieser Studien weisen darauf hin, daß ein deutlicher Unterschied zwischen der "normalen" Haut und der ReHE in Bezug auf die Lipidzusammensetzung (siehe Kapitel 3.4) besteht. Insbesondere der Gehalt an

Glykosylceramiden, Ceramiden und freien Fettsäuren ist im *Stratum corneum* der ReHE niedriger als im nativen *Stratum corneum* ⁽¹⁴⁸⁾. Andere Arbeitsgruppen konnten das nicht bestätigen. Das beruht zum Teil darauf, daß die native Epidermis in ihrer Stärke und Zusammensetzung individuellen Schwankungen unterliegt und die Lipidzusammensetzung des *Stratum corneums* zwischen verschiedenen Körperregionen variiert (siehe Kapitel 3.4). Es existiert also keine "normale", standardisierbare Epidermis, die als Kontrolle herangezogen werden kann.

Als weiteren Faktor muß man berücksichtigen, daß die Differenzierung der Keratinozyten in eine ReHE von verschiedenen Kulturbedingungen beeinflusst wird. Dabei haben Hormone (z. B. EGF), die Inkubationstemperatur ⁽¹⁴⁶⁾, Vitamine ⁽¹⁴⁹⁾, Lipide und Kalziumionen einen starken Einfluß auf die Struktur der ReHE und deren *Stratum corneum*. Weiterhin beeinflussen die relative Feuchte, das Vorhandensein von 1,25-Dihydroxy-Vitamin D₃ und die Unterlage, auf der die Zellen wachsen, die Differenzierung und auch die Permeabilität der ReHE ⁽¹¹²⁾. Bis heute sind die Faktoren, die die Differenzierung der Keratinoblasten steuern, nicht vollständig aufgeklärt. Es zeichnet sich aber ab, daß unter geeigneten Kulturbedingungen eine ReHE hergestellt werden kann, die in der Lipidzusammensetzung, der Struktur der multilamellaren Lipidschichten und der morphologischen Erscheinung einer "normalen" Epidermis sehr ähnlich ist ⁽¹⁴⁹⁾. Eine solche ReHE kann sowohl auf einer Filtermembran als auch auf einer toten Dermis kultiviert werden.

3.8. Die Lipasen des Stratum corneums

Im *Stratum corneum* kommen verschiedene hydrolytische Enzyme vor. Sie stammen aus den Keratinosomen. Freinkel und Traczyk⁽⁶⁴⁾ waren die Ersten, die die Existenz einer sauren Lipase, einer Glykosidase, einer Phospholipase A und einer Sphingomyelinase in den Keratinosomen der fetalen Rattenepidermis nachwiesen. Grayson und Mitarbeiter⁽⁷¹⁾ bestätigten diese Befunde an muriner Epidermis. Menon und Mitarbeiter⁽¹²⁵⁾ konnten eine neutrale und eine saure Lipase in den interzellulären Bereichen des *Stratum corneums* lokalisieren. Ebenso wurde Sphingomyelinase-Aktivität in subzellulären Fraktionen der humanen Epidermis von Bowser und Gray⁽³⁰⁾ biochemisch charakterisiert. Die Autoren vermuteten aus ihren Untersuchungen die Existenz einer extrazellulären Phospholipase A₁ (PL A₁) oder PL A₂. Die Aktivität dieses Enzyms konnte von Elias und Mitarbeitern⁽⁵⁵⁾ im *Stratum corneum* lokalisiert werden. Die höchste Konzentration kommt im *Stratum compactum* vor und nimmt in apikaler Richtung ab. In den äußersten Schichten des *Stratum corneums* ist die Aktivität am niedrigsten. Die PL A₂-Aktivität wurde auch in Keratinozytenkulturen⁽¹¹⁸⁾ nachgewiesen. Neuere Untersuchungen zeigen, daß sowohl eine cytosolische, als auch mehrere sekretorische PL A₂-Aktivitäten mit unterschiedlicher Substratspezifität existieren⁽¹⁰⁸⁾.

Eine normale PL A₂ Aktivität ist für den Aufbau und Erhalt der *Stratum corneum* Barriere sehr wichtig⁽¹¹⁴⁾. Nach Hemmung der PL A₂ Aktivität durch topische Applikation spezifischer Inhibitoren steigt der transepidermale Wasserverlust von $< 2 \text{ g m}^{-2} \text{ h}^{-1}$ auf $6 - 8 \text{ g m}^{-2} \text{ h}^{-1}$. Gleichzeitig nimmt die Konzentration der freien Fettsäuren und der neutralen Lipide im *Stratum corneum* ab⁽⁵⁵⁾. Die Autoren zeigten, daß sich diese Effekte durch Koapplikation von Palmitinsäure aufheben lassen.

4. Material und Methoden

Der Material und Methodenteil dieser Arbeit wurde zu großen Teilen schon publiziert und soll deshalb hier nicht nochmals aufgeführt werden. Die **Lipidextraktion und Analytik** ist im Anhang 1 beschrieben. Die **Strahlungsbedingungen** und die Analyse der daraus resultierenden **Lipidperoxidationsprodukte** kann im Anhang 6 und im Anhang 7 nachgelesen werden.

Die Präparation von humanen *Stratum corneum Vesikeln* (SCV) steht im Anhang 4. Die Herstellung der **Liposomen** aus synthetischen Lipiden ist im Anhang 8, sowie im Anhang 9 beschrieben. Für die physikochemische Charakterisierung der Vesikel wurden **Röntgenstrukturuntersuchungen** (in Kooperation mit Frau Dr. I. Zimmermann und Herrn Dr. G. Förster) und **fourier-transformierte Infrarot-Spektroskopie** (in Kooperation mit Herrn Dr. C. Selle und Herrn Dr. W. Pohle) verwendet, die in Anhang 4 beschrieben sind. Dort sind auch die **elektronenmikroskopische** Darstellung der Vesikelsuspensionen (in Kooperation mit Frau Dr. B. Sternberg), sowie die experimentellen Bedingungen der **Fusionsmessungen** von fluoreszenzmarkierten Vesikelsuspensionen beschrieben. Für die **fluoreszenzspektroskopische** Bestimmung der Phasenübergangstemperaturen wurden die Liposomen mit 5 % Octadecylrhodamin (Molecular Probes, Eugene, Oregon) markiert (siehe Anhang 4) und die Veränderung der Fluoreszenzintensität bei einer Aufheiz- und Abkühlgeschwindigkeit von 1 K/min mit einem Hitachi F-4500 Fluoreszenzspektrometer registriert ⁽²⁰⁴⁾. Für die **kalorimetrischen Untersuchungen** (in Kooperation mit Prof. W. Pfeil) an den SCV wurden die Vesikel wie in Anhang 4 beschrieben hergestellt. Die Lipidkonzentration betrug 50 mg/ml. Die Meßbedingungen waren die gleichen wie in Anhang 9 beschrieben. Für **Penetrationsstudien** durch die SCV Membran wurden die Vesikel in Anwesenheit von 1 M β -Glukose hergestellt und die nichtverkapselte Glucose durch Gelfiltration (Sephadex-Säule, 12 x 3 cm) abgetrennt. Die Lipidkonzentration betrug danach ca. 1 mg/ml. Die Vesikel wurden wie im Anhang 6 beschrieben bestrahlt und die durch die Membran penetrierte Glucosekonzentration wurde mit einer Glucoseoxidase-Enzymelektrode (ESAT 6660, Medingen, Dresden) quantifiziert.

Die Untersuchungen an der rekonstituierten humanen Epidermis (ReHE) sind im Anhang 8 dargestellt und wurden durch die Kooperation mit Prof. D. Reißig ermöglicht.

Kalorimetrische Studien am intakten humanen *Stratum corneum* sind in Anhang 9 beschrieben. Die Probenpräparation für die bisher nicht veröffentlichten FT-IR spektroskopischen Untersuchungen am intakten SC wurden auf die gleiche Weise durchgeführt. Achtzehn Stunden nach Applikation der liposomalen Suspensionen wurden die SC-Proben über Phosphorpentoxid getrocknet und ein FT-IR Spektrum wie in Anhang 4 beschrieben aufgenommen. Für die **Penetrationsstudien** durch das intakte SC wurden 3 µl fluoreszenzmarkierte Liposomensuspension (50 mg/ml Lipid) auf die physiologische Außenseite aufgetragen. Die Penetrationskammer ist in Anhang 9 beschrieben. Die Fluorophorkonzentration (Rho-PE) betrug 5 %. Nach 18 h und 48 h wurde die Konzentration des Fluoreszenzmarkers mit einem Hitachi F-2000 Spektrometer bestimmt.

Die Untersuchungen zur Phospholipase A₂-Aktivität sind bisher nur auf Tagungen vorgestellt worden ^(206,208,211). Deshalb soll die Methode hier ausführlicher beschrieben werden. Humanes plantares *Stratum corneum* wurde über Nacht bei 4 °C in Anwesenheit von 0,1 % NaN₃ in 0,1 M KCl oder 0,1 M HEPES (pH 7,3) inkubiert. Nach Zentrifugation und Sterilfiltration (0,2 µm Filter) wurde der Extrakt lyophilisiert und bei -18 °C aufbewahrt. Das fluoreszenzmarkierte PL A₂ Substrat NBD-C₆-PC (2-(6-(7-Nitrobenz-2-oxa-1,3-diazol-4-yl)hexanoyl-1-hexadecanoyl-sn-glycero-3-phosphocholin) wurde von Molecular Probes (Eugene, OR) bezogen. Die anderen fluoreszenzmarkierten Substrate waren Produkte von Avanti Polar Lipids. Alle Substrate wurden in Ethanol gelöst (5 mg/ml). Die enzymkinetischen Messungen wurden in Mikrotiterplatten in PBS bei 30 °C durchgeführt. Die Proteinkonzentration in einem Meßansatz betrug 0,25 mg/ml, das Meßvolumen 250 µl und die Substratkonzentration wurde zwischen 0 und 20 µg/ml variiert. Alle Messungen erfolgten über 4 h im Doppelansatz. Die Fluoreszenzintensität wurde im Minutenabstand bestimmt. Bei niedrigen Substratkonzentrationen ergab sich eine lineare Korrelation zwischen der Fluoreszenzintensität und der Endproduktkonzentration des NBD-C₆, die für die Berechnung Umsatzgeschwindigkeit verwendet wurden.

Die Temperaturabhängigkeit der Hydrolyse und der Einfluß von Ionen auf die Hydrolyserate wurde mit einem Hitachi F-4500 Fluoreszenzspektrometer bestimmt. Die Anregungswellenlänge lag bei 465 nm und die Emissionswellenlänge bei 543 nm. Jede Hydrolyse wurde über 30 min verfolgt und aus dem linearen Anstieg der Fluoreszenzintensität die Hydrolyserate bestimmt.

Für die **dünnschichtchromatographische Analyse** der Hydrolyseprodukte wurden Liposomen mit einer Lipidkonzentration von 10 mg/ml wie in Anhang 9 beschrieben hergestellt. Ein wäßriger SC-Extrakt wurde aus 1 g SC in 10 ml PBS wie oben beschrieben hergestellt. Über 20 h wurden 200 µl des Extraktes mit den Liposomen in einem Gesamtvolumen von 1 ml bei Raumtemperatur inkubiert. Anschließend wurden die Lipide mit 100 µl Chloroform extrahiert, auf eine HPTLC Platte aufgetragen und in einer Horizontalkammer (Camag, Muttenz, Schweiz) mit Chloroform/Methanol (65/35; v/v) und 3 % konz. Ammoniaklösung aufgetrennt. Nach Derivatisierung der Lipide mit CuSO₄-Lösung bei 180 °C (Anhang 1) fand eine Quantifizierung mit dem Densitometer (Scanner II, Camag) und der Software CATS3 statt.

5. Ergebnisse und Interpretation

5.1. Die humanen Stratum corneum Lipide

Die Lipidbarriere des humanen epidermalen *Stratum corneums* besteht im wesentlichen aus Ceramiden, Cholesterol und freien Fettsäuren in unterschiedlichen Anteilen (Kapitel 3.4). Ziel der Arbeit ist es, die strahlungs- und lipidinduzierten Störungen in der Barriere zu beschreiben. Dazu mußte zuerst eine effiziente, reproduzierbare Methode zur Analyse der *Stratum corneum* Lipide etabliert werden.

5.1.1. Die chromatographische Trennung der Lipide

Mit der HPLC ist es bisher nicht gelungen, alle *Stratum corneum* Lipide mit einem Lösungsmittelgradienten zu trennen. Weiterhin existierte bis vor wenigen Jahren kein geeignetes Detektionssystem für die heterogen zusammengesetzten *Stratum corneum* Lipide. Möglicherweise eröffnen die jetzt kommerziell verfügbaren Lichtstredetektoren einen alternativen Weg der Quantifizierung. Erste erfolgversprechende Methoden wurden von Gildenast und Lasch ⁽⁶⁸⁾ veröffentlicht.

Standardmäßig werden deshalb die *Stratum corneum* Lipide mit sequentieller Dünnschichtchromatographie (HPTLC) getrennt. Die mobile Phase muß idealerweise aus bis zu 8 verschiedenen Laufmittelgemischen bestehen ⁽¹⁴⁷⁾, da die Zusammensetzung der Lipide sehr heterogen ist (Abb. 3). Das polarste Molekül ist das Cholesterolsulfat und die unpolarsten sind die Sterolester. Die charakteristischen *Stratum corneum* Lipide lassen sich minimal in 3 Entwicklungsschritten nach einem System von Melnik ⁽¹²⁰⁾ trennen.

Alle manuellen, sequentiellen Techniken haben jedoch den Nachteil, daß die Entwicklung mehrfach unterbrochen werden muß und der Übergang von einer mobilen Phase zur nächsten abrupt stattfindet. Dieses beeinflußt die Qualität der Trennung. Um diese Nachteile zu minimieren haben wir erstmals eine neue Auftrennung der SC Lipide mit Hilfe der AMD unterstützten HPTLC entwickelt ⁽²⁰⁷⁾. Im Gegensatz zu dem später von Bonté und Mitarbeitern ⁽¹⁶⁾ eingesetzten Lösungsmittelgradienten gelang es uns, die im humanen *Stratum corneum* wichtigen Ceramide und die freien Fettsäuren basislinien-genau zu trennen (**Anhang 1**). Die mit dieser Methode getrennten Ceramidfraktionen haben wir einer Massenspektroskopie unterworfen (**Anhang 4**). Dadurch ist es möglich, die

Massenverteilung der einzelnen Ceramidfraktionen zu bestimmen. Durch eine nachgeschaltete Fragmentierung der Ceramide kann die Sphingosinbase und die mit ihr veresterte Fettsäure identifiziert werden ⁽¹⁵⁵⁾.

Auch ohne chromatographische Auftrennung ist eine Quantifizierung der Ceramidgesamtkonzentration coulometrisch möglich (**Anhang 3**). Dazu werden die Lipide verascht und der in der Probe vorhandene Stickstoff, der nur aus der Ceramidfraktion stammt, wird elektrochemisch nachgewiesen ⁽²⁰⁵⁾.

5.1.2. Die Zusammensetzung der *Stratum corneum* Lipide

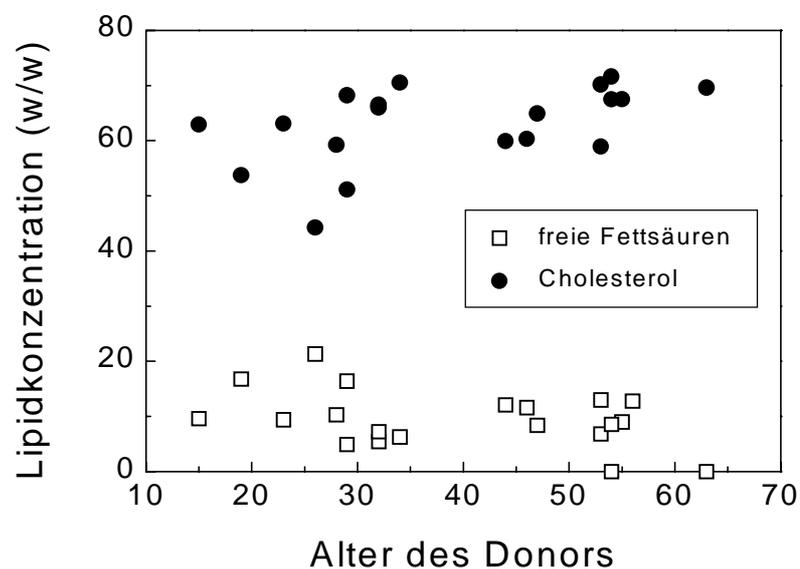


Abbildung 7:

Abhängigkeit zwischen dem Alter des Spenders und der Cholesterol- bzw. freien Fettsäurekonzentration im plantaren *Stratum corneum*. Mit steigendem Alter nimmt die Konzentration an freien Fettsäuren ab. Die Werte der Regressionsgeraden sind 15,3 für den Ordinatenschnittpunkt und 0,14 für den Regressionskoeffizienten ($r = 0,4$). Die Konzentration des Cholesterols nimmt zu (Ordinatenschnittpunkt: 53,3; Koeffizient: 0,25; $r = 0,48$). Alle Proben wurden im Jahr 1994 gesammelt. Experimentelle Bedingungen im Anhang 1.

Das plantare *Stratum corneum* weist einen sehr niedrigen Lipidgehalt auf. Im Mittel konnten wir 2,2 % (w/w) Gesamtlipid extrahieren (**Anhang 1**). Dieses entspricht den Befunden von Egelrud und Mitarbeiter ⁽⁵⁰⁾. Auf Grund der hohen Empfindlichkeit der Methode waren 50 mg *Stratum corneum* für eine statistisch abgesicherte Analyse ausreichend. Dadurch konnten wir mit der von uns entwickelten AMD unterstützten HPTLC Analytik die Lipidzusammensetzung des plantaren *Stratum corneums* von verschiedenen Individuen quantifizieren.

Die Tabelle 3 zeigt die relative Lipidzusammensetzung unterschiedlicher SC Proben. In Übereinstimmung mit den Untersuchungen von Lampe und Mitarbeitern ⁽⁹⁴⁾ ist Cholesterol das mengenmäßig häufigste Lipid (Tabelle 1). Wir fanden individuelle Unterschiede zwischen 37,4 und 54,2 Gewichtsprozent Cholesterol.

Tabelle 3:

Zusammensetzung der mengenmäßig häufigsten Lipide des humanen plantaren *Stratum corneums* in Gewichtsprozent. Die Trennung fand mit der AMD unterstützten HPTLC statt. Experimentelle Bedingungen in Anhang 1.

Lipide	R _f	Mittelwert n > 100	min ^a	max ^b
Phospholipide	n. best.	< 1	n. best.	n. best.
Cholesterolsulfat	0,13	2 ± 0,1	1,2	2,3
freie Fettsäuren	0,18	20,1 ± 1,1	12	25,8
Ceramide (Typ III/Typ IV) ^b	0,46/0,53	20,2 ± 0,6	12,7	20
Cholesterol	0,69	43,5 ± 3	37,4	54,2
Triacylglycerol	0,73	4,5 ± 0,5	3,4	5,9
Sterolester	0,93	9,4 ± 0,6	8	18,9

^a niedrigster und ^b höchster Wert in allen untersuchten Proben

^b Typ III: Sphingosin-Derivate, Typ IV: Phytosphingosin-Derivate

Abbildung 7 zeigt die Veränderung der Fettsäure- und der Cholesterolkonzentration mit zunehmendem Alter des Spenders. Es besteht keine signifikante Korrelation.

Im Gegensatz dazu konnten wir erstmals zeigen, daß eine signifikante Korrelation ($r = 0,823$, $p < 0,01$) zwischen der Konzentration der freien Fettsäuren und den Sterolen besteht (Anhang 1). Das bedeutet, daß Individuen mit einer hohen Cholesterolkonzentration im plantaren *Stratum corneum* eine niedrige Konzentration an freien Fettsäuren aufweisen. Korrelationen zwischen dem Ceramidgehalt und Alter, wie sie von anderen Autoren beschrieben wurde ^(46,159), konnten wir nicht bestätigen.

Lavrijsen und Mitarbeiter ⁽¹⁰⁴⁾ zeigten, daß das Verhältnis der freien Fettsäuren zum Cholesterol bei Patienten mit lamellarer Ichthyose deutlich niedriger ist, als bei hautgesunden Personen. Die von uns analysierten Proben stammten aber von gesunden Personen, so daß die Korrelation zwischen den freien Fettsäuren und den Sterolen eine andere Ursache haben muß.

Es ist bekannt, daß sich der Sterolstoffwechsel und der Fettsäurestoffwechsel der Haut gegenseitig beeinflussen. Wird die Sterolbiosynthese der Haut durch den kompetitiven Inhibitor Lovastatin gehemmt, so steigt die Konzentration der freien

Fettsäuren um 61 % an ⁽⁶²⁾. Williams und Mitarbeiter ⁽¹⁹⁷⁾ fanden ähnliche Effekte in Keratinozytenzellkulturen. Auch Nacktmäuse, die unter essentiellen Fettsäuremangel aufgezogen werden ("fatty-acid deficient"), weisen eine erhöhte Sterolbiosynthese auf ⁽⁶¹⁾. Die Ursache für diese Zusammenhänge sind nicht geklärt. Es ist möglich, daß die Hydroxymethylglutaryl-CoA (HMG-CoA) Reduktase, das Schlüsselenzym in der Sterolbiosynthese, für diese Effekte verantwortlich ist. Das Enzym wird durch Acetyl-CoA gehemmt, welches sowohl Ausgangssubstanz der Fettsäurebiosynthese als auch Endprodukt der β -Oxidation ist. Eine erhöhte Acyl-CoA Konzentration könnte zu einer erhöhten Fettsäurebiosynthese führen und die Cholesterolbiosynthese hemmen.

5.1.3. Zusammenfassung

Mit der AMD unterstützten HPTLC ist es möglich, die palmo-plantaren *Stratum corneum* Lipide im analytischen Maßstab aufzutrennen und zu quantifizieren. Der von uns entwickelte Lösungsmittelgradient ist auf die Trennung der Ceramide und der freien Fettsäuren ausgelegt (**Anhang 1**).

Durch Kombination der AMD/HPTLC-Technik mit einer anschließender massenspektroskopischer Analyse läßt sich die Struktur der Ceramide (Sphingosinbase und säureamidartig gebundene Fettsäure) bestimmen (**Anhang 2**).

Eine Quantifizierung der Ceramidkonzentration ist auch coulometrisch möglich (**Anhang 3**).

Die Zusammensetzung der *Stratum corneum* Lipide unterliegt einer individuellen Variation. Die Konzentration der freien Fettsäuren und der Sterole weist eine signifikante Korrelation auf (**Anhang 1**).

5.2. Liposomen als Modellsystem der Barriere

Die Lipide sind eine entscheidende Komponenten in der Barriere des *Stratum corneums*. Deshalb wurden in der Vergangenheit von verschiedenen Arbeitsgruppen Liposomen aus typischen *Stratum corneum* Lipiden hergestellt und als Modellsystem der Barriere untersucht. Da die natürlichen *Stratum corneum* Lipide für experimentelle Untersuchungen meistens nicht in ausreichender Menge zur Verfügung stehen, wurden Vesikel aus kommerziellen Ceramiden, einer gesättigten Fettsäure, Cholesterol und Cholesterolsulfat hergestellt. Die Ceramide wurden aus Sphingomyelin (aus Rinderhirn) durch enzymatische Hydrolyse gewonnen. Sie unterscheiden sich in ihrer Struktur deutlich von den Ceramiden des *Stratum corneums*, da sie kürzere Acylketten mit mehr Doppelbindungen aufweisen. Deshalb sind liposomale Modellsysteme des *Stratum corneums*, die aus diesen Ceramiden bestehen, in ihrer Aussagekraft begrenzt. Die Befunde physikochemischer Charakterisierungen lassen sich nur bedingt auf die Lipide des humanen epidermalen *Stratum corneums* übertragen.

Um diese Limitierung zu umgehen, verwendeten Abraham und Downing^(1,48), sowie Bouwstra und Mitarbeiter^(20,22) Ceramide, die aus dem *Stratum corneum* des Schweines stammten. Diesen Lipidmischungen fehlten trotzdem noch all die Komponenten, die im nativen *Stratum corneum* in Spuren vorkommen und einen starken Einfluß auf die Eigenschaften haben können.

Wir haben einen anderen Ansatz zur Herstellung von Modellsystemen des humanem *Stratum corneums* verwendet. Dazu wurden die Lipide aus humanen plantaren *Stratum corneum* extrahiert und die Zusammensetzung des Extraktes mit der AMD unterstützten HPTLC Technik analysiert (**Anhang 1**). Aus diesen Lipiden wurden die humane *Stratum corneum* Lipid Liposomen (SCV) nach Lasch et al.⁽⁹⁸⁾ hergestellt (**Anhang 4**), deren Zusammensetzung genau definiert war. Diese SCV enthielten, im Gegensatz zu den in anderen Untersuchungen hergestellten Modellsystemen, nicht nur die epidermalen Ceramide in der natürlich vorkommenden Zusammensetzung, sondern auch die Fettsäuren und solche Lipide, die nur in Spuren im *Stratum corneum* vorkommen (z. B. Di- und Triacylglycerole⁽⁹⁴⁾, Spingenine⁽¹⁵⁸⁾, Sterolester). Die SCV wurden mit FT-IR Spektroskopie, mit Röntgenklein- und weitwinkelstreuung (SAXS, WAXS), mit Fluoreszenzspektroskopie und mit

Elektronenmikroskopie physikochemisch charakterisiert (**Anhang 4**). Diese und weitere Befunde werden im folgenden dargestellt.

5.2.1. Der Einfluß von Ionen auf Suspensionen aus *Stratum corneum* Lipiden

Abbildung 8 zeigt, daß zweiwertige Ionen, insbesondere die physiologisch wichtigen Ca^{2+} - und Mg^{2+} -Ionen die kolloidale Stabilität von Suspensionen aus *Stratum corneum* Lipiden reduzieren. Es kommt zur Vesikelaggregation. Einwertige Na^+ - und K^+ -Ionen haben keinen Einfluß. Wir konnten zeigen, daß die kritische Konzentration für eine Vesikelaggregation 3,3 mM Ca^{2+} und 9,8 mM Mg^{2+} beträgt (**Anhang 4**). Abraham und Mitarbeiter ⁽³⁾ zeigten elektronenmikroskopisch, daß Vesikel aus Lipiden in *Stratum corneum* ähnlicher Zusammensetzung nach Zugabe von 50 mM Ca^{2+} aggregieren und innerhalb von 2 Wochen fusionieren. Wie Abbildung 8 zeigt, liegt die kritische Konzentration wesentlich niedriger. Ursache könnte sein, daß in unseren Experimenten Vesikel aus allen *Stratum corneum* Lipiden (SCV) verwendet wurden.

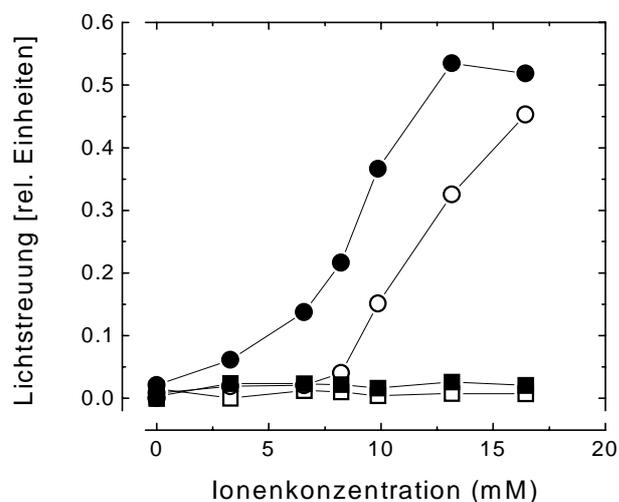


Abbildung 8:

Der Einfluß von Ca^{2+} - (●), Mg^{2+} - (○), K^+ - (■) und Na^+ - (□) Ionen auf die kolloidale Stabilität von humanen *Stratum corneum* Vesikel (SCV). Kalziumionen (> 3,3 mM) und Magnesiumionen (> 9,8 mM) bewirken eine Liposomenaggregation, während Kalium- und Natriumionen keinen Einfluß haben. Experimentelle Bedingungen in Anhang 4.

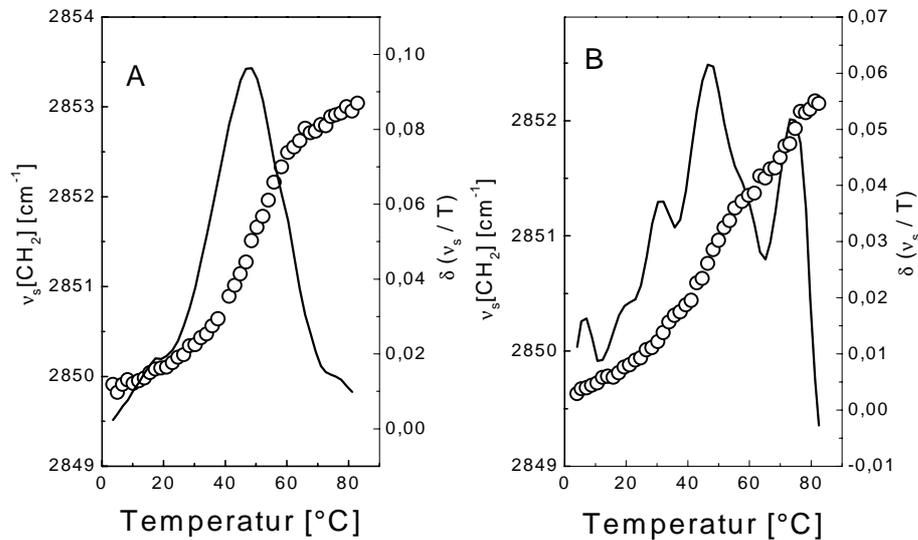
5.2.2. Das Phasenverhalten der *Stratum corneum* Lipide

Abbildung 9:

Einfluß der Temperatur auf die symmetrische Streckschwingung $\nu_s[\text{CH}_2]_n$ (O) von humanen *Stratum corneum* Lipid Vesikel. Die Hauptumwandlung liegt bei 49,2 °C und verschiebt sich in Anwesenheit von 10 mM Kalzium zu 47,2 °C. Es treten zwei weiteren Maxima auf. Die erste Ableitung der Meßkurve (—) erlaubt es, die genaue Lage der Maxima genauer zu bestimmen. Experimentelle Bedingungen in Anhang 4.

Zum genaueren Verständnis der *Stratum corneum* **Lipid**barriere untersuchten wir das Phasenverhalten der SCV. Es wird durch zweiwertige Ionen und durch die Temperatur beeinflusst. Die Phasenübergangstemperatur läßt sich z. B. infrarotspektroskopisch bestimmen¹. Mit steigender Temperatur nehmen die Molekülschwingungen in den SCV zu, die im Infrarot-Bereich absorbieren. Mit steigender Schwingungsfrequenz verschiebt sich die Absorption in den langwelligeren Bereich. Phasenübergänge, wie z. B. das Schmelzen einer Lipidmembran sind im Infrarotspektrum durch einen sprunghaften Anstieg in der Wellenzahl der symmetrischen CH_2 -Streckschwingung ($\nu_s[\text{CH}_2]_n$) charakterisiert.

Abbildung 9 A zeigt den temperaturinduzierte Phasenübergang der SCV. Die Hauptumwandlung, bestimmt über die erste Ableitung der Meßkurve, liegt bei 49,2 °C. Der Übergang ist auf Grund der heterogenen Lipidzusammensetzung der Gemische sehr breit. Nach Zugabe von Kalziumionen (10 mM, Abb. 9 B) verschiebt

¹ Infrarot-Strahlung wird von Molekülen absorbiert und bewirkt Molekülschwingungen. Jedes Molekül und jede Bindung absorbiert Strahlung einer genau definierten Wellenlänge. Dadurch lassen sich über

sich die Hauptumwandlung auf 47,2 °C und es treten zwei neue Übergänge bei 31,3 °C und 73,3 °C auf (**Anhang 4**).

In einem weiteren Experiment haben wir die Umwandlungstemperatur der SCV fluoreszenzspektroskopisch bestimmt (Abb. 10 A) und mit der von DPPC und DMPC Liposomen verglichen. Dazu wurde der Fluorophor Octadecylrhodamin B-chlorid in die Membran der Vesikel inkorporiert und die Veränderung der Fluoreszenzintensität in Abhängigkeit von der Temperatur bestimmt. Mit diesem Meßansatzes konnten wir schon in der Vergangenheit die Phasenübergangstemperaturen von synthetischen Membranlipiden bestimmen ^(203,204).

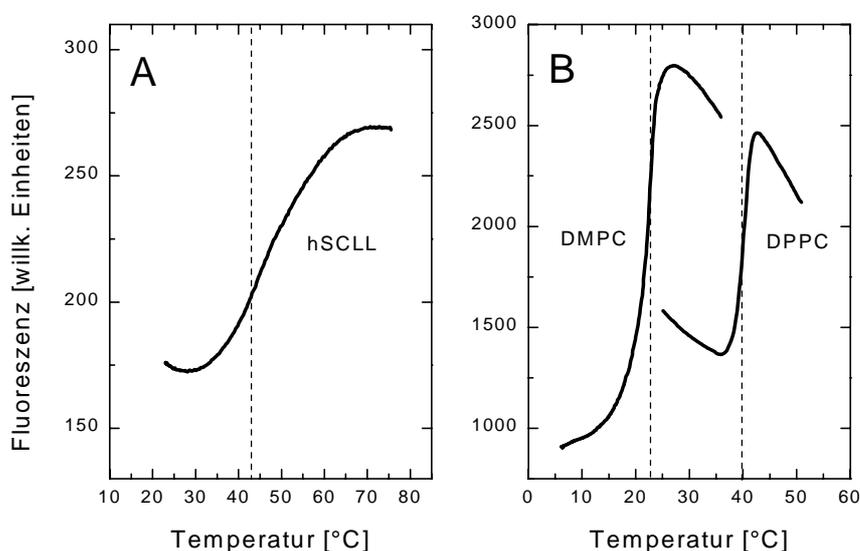


Abbildung 10:

Fluoreszenzspektroskopisch bestimmte Kettenschmelztemperatur von Octadecylrhodamin-markierten humanen *Stratum corneum* Vesikeln (SCV). Mit steigender Temperatur verändert sich die Fluoreszenzintensität. Der Wendepunkt der Meßkurve (---) entspricht der Umwandlungstemperatur der SCV (A) bzw. der Kettenschmelztemperatur der synthetischen Lipide DMPC und DPPC (B). Experimentelle Bedingungen in Kapitel 4.

Die erste Ableitung der Meßkurve ergab für DMPC und DPPC Liposomen Hauptumwandlungen bei 23 °C und 40 °C. Bei den SCV lag die Hauptumwandlungstemperatur bei 43,5 °C (Abb. 10 A). Die mit dieser Methode bestimmte Kettenschmelztemperatur für DPPC (40 °C) ist niedriger, als der aus der Literatur bekannte Wert von 42,5 °C ⁽³⁸⁾. Auch die Umwandlungstemperatur für die SCV (43,5 °C) ist niedriger als der mit der störungsfreien FT-IR Spektroskopie

das Infrarot-Spektrum Molekülbindungen identifizieren. Veränderungen in den Molekülbindungen oder in deren lokaler Umgebung verschieben die charakteristischen Absorptionsbanden ⁽⁷⁷⁾.

bestimmten Wert von 49,2 °C (Abb. 9). Ursache dafür ist, daß der Fluorophor selbst eine Membranstörung erzeugt, die zu einer Erniedrigung der Umwandlungstemperatur führt. Daraus ergibt sich, daß die fluoreszenzspektroskopische Bestimmung der Phasenübergangstemperatur nicht exakt ist und ein Korrekturfaktor eingeführt werden muß ⁽²⁰⁴⁾.

Die zusätzlich durchgeführte kalorimetrische Untersuchung ergab eine Umwandlungstemperatur von 49,7 °C für die SCV (Abb. 11). Dieser entspricht dem FT-IR spektroskopisch bestimmten Wert (Abb. 9 A). Nach Zugabe einwertiger Natrium und Chloridionen verändert sich das Profil der kalorimetrischen Meßkurve. Es traten weitere Übergänge bei 40,3 °C und 22,1 °C auf. Es deutet darauf hin, daß auch einwertige Ionen eine laterale Phasenseparation in den SCV induzieren können. Eine Vesikelaggregation findet aber nicht auftritt (Abb. 8).

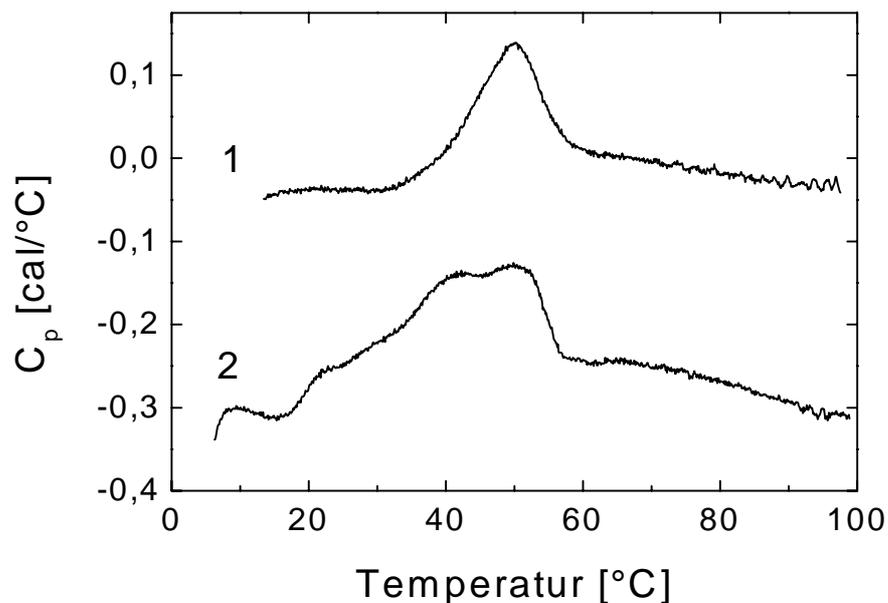


Abbildung 11:

Kalorimetrische Bestimmung der Umwandlungstemperatur von humanen *Stratum corneum* Vesikeln (SCV). In 10 mM Phosphatpuffer (pH 7,3) liegt das Maximum der Umwandlung bei 49,7 °C (1). In phosphatgepufferter physiologischer Kochsalzlösung (145 mM) treten weitere Umwandlungstemperaturen bei 40,3 °C und bei 22,1 °C auf (2). Experimentelle Bedingungen in Kapitel 4.

Lipidmischungen in *Stratum corneum* ähnlicher Zusammensetzung weisen verschiedene Phasenübergänge auf. Abraham und Downing ⁽¹⁾ vermuteten aus ihren NMR spektroskopischen Messungen einen Übergang aus einer lamellaren in eine hexagonale Phase bei Temperaturen oberhalb von 60 °C. Kalorimetrische Untersuchungen von Blume und Mitarbeitern ⁽¹⁵⁾ belegten einen Übergang im

Temperaturbereich von 40 °C bis 80 °C mit einem Maximum bei 70 °C. Die Autoren vermuteten einen lamellar-kubischen Übergang oberhalb von 37 °C. Hatfield und Fung ⁽⁷⁶⁾ berichteten ebenfalls von einem Phasenübergang zwischen 65 °C und 70 °C an *Stratum corneum* Modellmembranen. Diese hohen Umwandlungstemperaturen konnten wir an den SCV nicht bestätigen (**Anhang 4** und Abb. 11). Die Ursache für diese Unterschiede liegen in der Zusammensetzung der verwendeten Suspensionen. Insbesondere die Struktur der Ceramide und der freien Fettsäuren waren in diesen Suspensionen anders als in den von uns eingesetzten SCV. Die Ceramide in den Literaturdaten waren meistens Derivate des Spingomyelins aus Rinderhirn und es wurde nur eine gesättigte Fettsäure verwendet. Mattai und Mitarbeiter ⁽¹¹⁵⁾ zeigten, daß *Stratum corneum* ähnliche Lipidmischungen, die Fettsäuren mit verschiedenen Kettenlängen enthalten, eine Umwandlungstemperatur von nur 52 °C aufweisen. Daraus läßt sich schließen, daß eine Zunahme verschiedener Lipide in den SC-Modellsystemen die Phasenübergangstemperatur senkt.

Nichtlamellare Phasen konnten wir im Temperaturbereich von 20 °C bis 60 °C auch elektronenmikroskopisch nicht nachweisen. Die Suspensionen zeigten in Anwesenheit von Ca²⁺ einen Übergang in multilamellare Schichten (**Anhang 4**). Unsere Messungen der Phasenübergangstemperaturen entsprechen den Befunden von Fenske und Mitarbeitern ⁽⁶³⁾ an Suspensionen aus equimolaren Mengen von Ceramiden, langkettigen Fettsäuren und Cholesterol. Die Autoren fanden einen Übergang aus einer gel-artigen in eine flüssige Phase.

5.2.3. Strukturuntersuchungen an *Stratum corneum* Lipiden

Um die Struktur der SCV Membran genauer aufzuklären, haben Röntgenbeugungsexperimente² durchgeführt (Abb. 12). Es wurde insbesondere der Einfluß der Temperatur und in Anwesenheit von Ca²⁺-Ionen analysiert, da beide Faktoren einen Einfluß auf die Organisation der Membran haben (Abb. 8 und Abb. 9). Die Befunde wurden elektronenmikroskopisch überprüft (**Anhang 4**).

² Die Röntgenstrahlen werden an den atomare Elektronenwolken der Probe gebeugt. Es kommt zu konstruktiven und destruktiven Interferenzen, die auf den Phasenunterschieden der gestreuten Strahlen beruhen. Sich wiederholenden strukturelle Einheiten, die einen kleinen Abstand zueinander haben, erzeugen Reflexe im Weitwinkelbereich (z. B. kristalline Bereiche der Membran). Strukturelle Einheiten mit großem Abstand (z. B. multilamellare Lipidschichten) ergeben Reflexe im Kleinwinkelbereich ⁽²⁷⁾. Der Abstand der Kleinwinkelreflexe zueinander wird durch die Struktur der Lipidschichten (lamellar, hexagonal, etc.) bestimmt. Lamellare Schichten erzeugen Reflexe im Abstand 1:2.

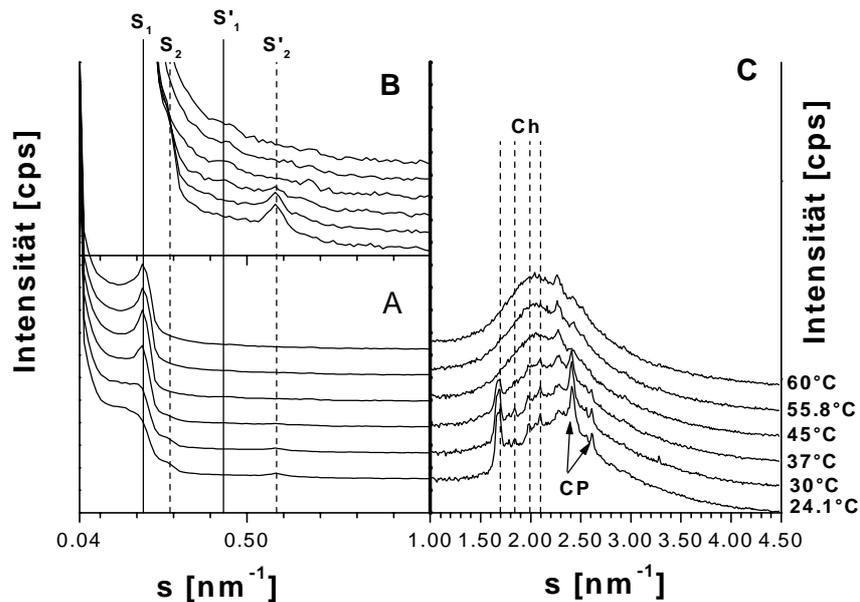


Abbildung 12:

Strukturelle Veränderungen in SCV-Membranen in Anwesenheit von 50 mM Ca^{2+} während des Erwärms. Bei 24,1 °C existiert im Kleinwinkelbereich nur ein Reflex (s_1), da eine vesikuläre Suspension vorliegt. Die Acylketten in der Membran sind teilweise rigide, was durch Reflexe (CP) im Weitwinkelbereich belegt wird. Kristallines Cholesterol (Ch) ist vorhanden und verursacht Reflexe erster (s_2) und zweiter (s'_2) Ordnung. Mit steigender Temperatur kommt es zu einem Aufschmelzen der Kettenlipide und des Cholesterols. Die Reflexe im Weitwinkelbereich werden kleiner. Bei $T > 37$ °C findet eine Umwandlung der vesikulären Suspensionen in multilamellare Lipidschichten statt. Dadurch entsteht im Kleinwinkelbereich neben dem Reflex s_1 ein Reflex s'_1 (2ter Ordnung). Die geordneten Kettenreflexe (CP) treten im Temperaturbereich von 24,1 - 60 °C auf. A: Kleinwinkelbereich, B: Kleinwinkelbereich mit 20fach vergrößerter Ordinate, C: Weitwinkelbereich. Experimentelle Bedingungen in Anhang 4.

Bei 24,1 °C fanden wir in den SCV in Anwesenheit von 50 mM Ca^{2+} im Kleinwinkelbereich zwei voneinander unabhängige Reflexe s_1 und s_2 (Abb. 12). Der Reflex s_1 wies keine Signale höherer Ordnung auf, belegt die vesikuläre Struktur der Suspension. Im Gegensatz dazu hatte der Reflex s_2 (bei $0,29 \text{ nm}^{-1}$) einen Reflex höherer Ordnung s'_2 (bei $0,58 \text{ nm}^{-1}$). Er wird durch kristallines Cholesterol hervorgerufen⁽⁴⁴⁾, das in der Suspension in einer separaten Phase vorliegt. Die Cholesterolkristalle sind kleiner als 10 nm, da sie auf den bisher vorliegenden elektronenmikroskopischen Untersuchungen nicht zu sehen sind (**Anhang 4**). Die Cholesterolreflexe (Ch) traten zusätzlich im Weitwinkelbereich auf (Abb. 12).

Durch Erwärmung der Suspension wurden die Cholesterolreflexe kleiner und verschwanden bei 45 °C. Das bedeutet, daß sich das kristalline Cholesterol in den Lipidschichten der Vesikel löst. Bouwstra und Mitarbeiter wiesen ebenfalls

kristallines Cholesterin in Lipidextrakten ⁽²²⁾ und intaktem *Stratum corneum* ⁽¹⁹⁾ nach. Weitere Reflexe traten in den SCV bei $s = 2,415 \text{ nm}^{-1}$ und $s = 2,617 \text{ nm}^{-1}$ auf und konnten den Acylketten zugeordnet werden (CP).

Oberhalb von $37 \text{ }^\circ\text{C}$ erschien im Kleinwinkelbereich ein neuer Reflex s_1' bei $0,346 \text{ nm}^{-1}$. Da die Lage der Reflexe s_1 und s_1' in einem ein Verhältnis von 1/2 auftraten, deutet das auf einen Übergang aus einer vesikulären Suspension in multilamellare Lipidschichten hin. Die SCV fusionieren unter diesen Bedingungen in multilamellare Lipidschichten. Die Bildung von multilamellaren Schichten durch Erwärmung aus SCV konnten wir elektronenmikroskopisch bestätigen (Anhang 4).

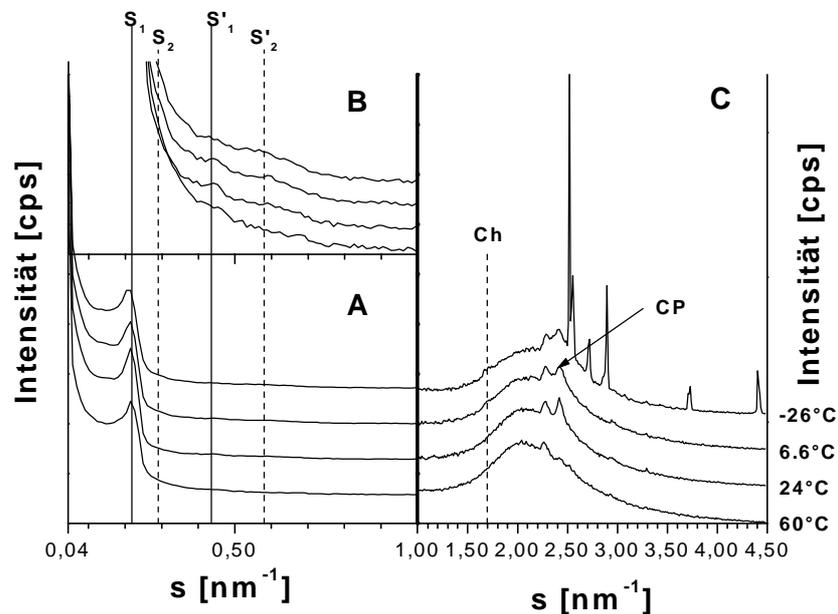


Abbildung 13:

Strukturelle Veränderungen in den SCV-Membranen in Anwesenheit von 50 mM Ca^{2+} während des Abkühlens von $60 \text{ }^\circ\text{C}$ auf $-26 \text{ }^\circ\text{C}$. Die bei $60 \text{ }^\circ\text{C}$ vorhandenen multilamellaren Lipidschichten bleiben bestehen, da sich die Reflexe s_1 (1. Ordnung) und s_1' (2. Ordnung) beim Abkühlen nicht verändern. Die Kettenreflexe (CP) nehmen mit sinkenden Temperaturen zu, was auf eine zunehmende Kristallisation der Lipide hinweist. Bei $6,6 \text{ }^\circ\text{C}$ treten Reflexe des kristallinen Cholesterols (Ch) auf. A: Kleinwinkelbereich, B: Kleinwinkelbereich mit 20fach vergrößerter Ordinate, C: Weitwinkelbereich.

In einer sich anschließenden Abkühlungsphase (Abb. 13) von $60 \text{ }^\circ\text{C}$ auf $-26 \text{ }^\circ\text{C}$ blieben die Reflexe bei s_1 und s_1' bestehen. Das bedeutet, daß die in der Aufheizphase durch Fusion entstandenen multilamellaren Schichten erhalten bleiben. Bei $6,6 \text{ }^\circ\text{C}$ kristallisierte das Cholesterin wieder aus, da die Reflexe s_2 und s_2' erneut auftraten. Es bildete sich neben den multilamellaren Lipidschichten eine kristalline Cholesterinphase aus. Die neu auftretenden Reflexe bei $2,523 \text{ nm}^{-1}$, $2,556 \text{ nm}^{-1}$,

2,723 nm⁻¹, 2,893 nm⁻¹, 3,728 nm⁻¹ und 4,408 nm⁻¹ stammten aus der entstandenen Eisphase bei -26 °C.

Die Röntgenstrukturdaten zeigen, daß die SCV-Membranen bei Raumtemperatur kristalline und fluide Bereiche aufweisen. Mit steigender Temperatur kommt es zu einem sukzessiven Aufschmelzen der Lipide und der Cholesterolkristalle. In Anwesenheit von Ca²⁺ fusionieren die Vesikel in multilamellare Lipidschichten.

5.2.4. Die Membranfusion der *Stratum corneum* Lipidvesikel (SCV)

Die Fusion der SCV ist ein wichtiger Vorgang und entspricht der Bildung der multilamellaren Lipidschichten aus den Keratinosomenlipiden (Kapitel 3.4.3). Er findet natürlicherweise an der *Stratum granulosum/Stratum corneum* Grenze statt (Abb. 1). Durch Exozytose werden die in den Keratinosomen gespeicherten Lipide in den extrazellulären Raum transportiert ⁽⁵³⁾. Dort fusionieren sie zu den multilamellaren Lipidschichten, die dann den "Mörtel" des *Stratum corneums* bilden. Die Fusion wird durch Ca²⁺-Ionen und freie Fettsäuren erleichtert (Kap. 3.2 und Kap. 3.4).

Wir haben erstmals die Temperaturabhängigkeit des Fusionsvorganges genauer untersucht (**Anhang 4**). Dazu wurden fluoreszenzmarkierte und nicht-markierte SCV bei unterschiedlichen Temperaturen inkubiert und die Vesikelfusion durch die Erhöhung der Kalziumkonzentration ausgelöst (Abb. 14 A). Die in Abbildung 8 dargestellte Vesikelaggregation ist eine Voraussetzung für die Membranfusion ⁽¹²⁾. Findet eine Membranfusion statt, so nimmt die Fluoreszenzintensität zu ⁽⁷⁸⁾. Die Parameter der Fusionskinetik wurden mit der Exponentialfunktion

$$\frac{F(t) - F(0)}{F(\infty) - F(0)} = 1 - e^{-\frac{t}{\tau}}$$

bestimmt und die Fusionseffizienz FE = F(∞) - F(0) berechnet (Abb. 14 B).

Abbildung 14 A zeigt, daß die Membranfusion mit steigender Temperatur zunimmt. Die Fusionseffizienz (FE) der SCV beträgt unterhalb von 32,5 °C nur 12 % (Abb. 14 B). Oberhalb von 32,5 °C, der physiologischen Temperatur der Hautoberfläche, steigt die Fusionseffizienz stark an. Sie erreicht 50 % bei 45 °C (Abb. 14 B). Es bilden sich multilamellare Schichten, die mit Röntgenbeugung (Abb. 12) und elektronenmikroskopisch (**Anhang 4**) dargestellt wurden.

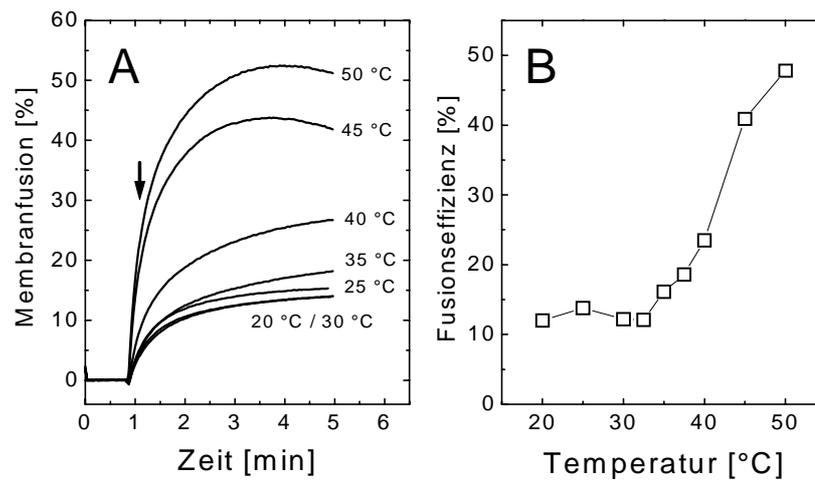


Abbildung 14:

Einfluß der Temperatur auf die Membranfusion von SCV. Mit steigender Temperatur nimmt die Ca^{2+} -induzierte Membranfusion zu (A). Der Pfeil markiert die Zugabe von Kalziumchlorid (Endkonzentration 9,8 mM). Die Fusions-effizienz (B) bleibt bis 32,5 °C konstant, um dann mit steigender Temperatur zuzunehmen.

Abraham und Mitarbeiter ⁽³⁾ untersuchten *Stratum corneum* ähnliche Lipidgemische (25 % Cholesterol, 10 % Cholesterolsulfat, 25 % freie Fettsäuren und 40 % Ceramide). Sie zeigten, daß die Vesikel innerhalb von 14 Tagen bei 37 °C in Anwesenheit von 50 mM Ca^{2+} fusionieren. Unsere Ergebnisse bestätigen diese Befunde (Abb. 14). Sie zeigen darüber hinaus, daß die für die Fusion kritische Ca^{2+} -Konzentration wesentlich niedriger sein kann, die Fusion eine starke Temperaturabhängigkeit aufweist und im Minutenbereich stattfindet.

Das Modellsystem der SCV erlaubt nicht nur die Fusion der SC Lipide in multilamellare Lipidschichten zu untersuchen. Es eignet sich auch, die Wechselwirkung zwischen den SCV und Liposomen aus synthetischen Lipiden zu charakterisieren. Damit lassen sich die Folgen abschätzen, die die topische Applikation von Liposomen auf das *Stratum corneum* haben. Dazu haben wir verschiedene fluoreszenzmarkierte Liposomen definierter Zusammensetzung mit SCV bei unterschiedlichen Temperaturen inkubiert und nach Ca^{2+} -Zugabe die Veränderung der Fluoreszenzintensität registriert.

Wechselwirken die SCV mit den Liposomen aus synthetischen Lipiden und kommt es zu einer Membranfusion, so läßt sich diese durch einen Anstieg in der Fluoreszenzintensität verfolgen. Da die Temperatur einen starken Einfluß auf den Phasenzustand der SCV hat (Abb. 10 und Abb. 12) und bei 32,5 °C ein Übergang aus

einer vesikulären in eine multilamellare Phase stattfindet, wurden die Untersuchungen bei 25 °C und 45 °C durchgeführt.

Wir ⁽¹⁰¹⁾ konnten zeigen, daß Liposomen aus dem Soja-Phospholipid-Gemisch PL 90 (93 % Phosphatidylcholin und 3 % Lysolipid) keine Wechselwirkung mit den SCV aufweisen. Im Temperaturbereich zwischen 25 °C und 40 °C fand keine meßbare Membranfusion zwischen den zwei Vesikelpopulationen statt (**Anhang 5**). Auch Liposomen aus den Lipidmischungen DPPC/DPPE (7/3), DPPC/Ölsäure (7/3) und DPPC/lyso-Acylphosphatidylcholin (7/3) fusionieren nicht mit den SCV (Fig. 15 A). Auch nicht bei 45 °C, oberhalb der kritischen Fusionstemperatur der SCV (Abb. 14 B).

Im Gegensatz dazu fusionierten Liposomen aus Phosphatidylserin im Temperaturbereich von 20 °C bis 45 °C immer mit den SCV (Fig. 15 A).

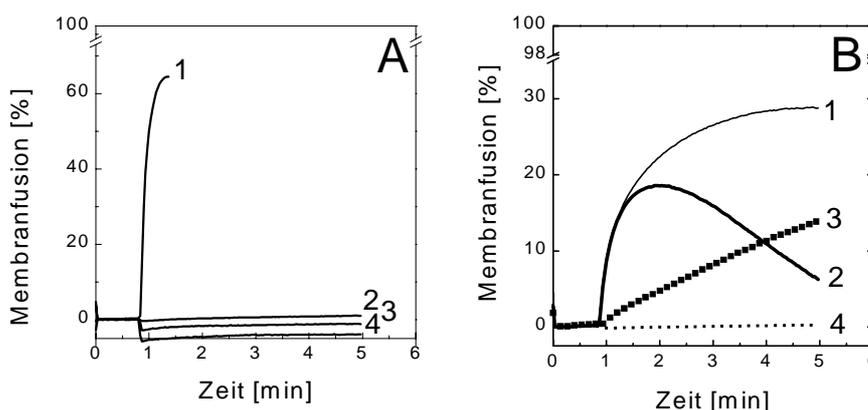


Abbildung 15:

Fusion zwischen humanen *Stratum corneum* Vesikeln (SCV) und Liposomen aus synthetischen Lipiden. **A:** Fusion von SCV mit Liposomen aus Phosphatidylserin (**1**), aus DPPC/Ölsäure (7/3; **2**), aus DPPC/lyso-PC (7/3; **3**), aus DPPC/DPPE (7/3; **4**) bei 45 °C. **B:** (von oben nach unten) Fusion von SCV mit Liposomen aus DPPE/Cholesterolhemisuccinat (7/3, **1**) und aus DPPC/Cholesterolhemisuccinat (7/3, **2**) bei 20 °C und bei 45 °C (**3**, DPPE/CHEMS; **4**, DPPC/CHEMS). Experimentelle Bedingungen in Anhang 4.

Wir konnten weiterhin zeigen, daß es liposomale Lipidmischungen gibt, die eine temperaturabhängige Fusion mit den SCV aufweisen (**Anhang 4**). Dazu gehören Suspensionen, die Cholesterolhemisuccinat (CHEMS) enthalten (Fig. 15 B). Liposomen aus DPPC/CHEMS im Verhältnis 7/3 fusionieren erst bei Temperaturen oberhalb von 45 °C mit den SCV. Ersetzt man DPPC durch das unter physiologischen Bedingungen ungeladene DPPE, so ändert sich das Fusionsverhalten. Diese Vesikel fusionieren sowohl bei 20 °C als auch 45 °C mit den

SCV. Ursache ist, daß das DPPE die Vesikelaggregation und die Bildung von nicht-lamellaren Phasen erleichtert.

Kirjavainen und Mitarbeiter ⁽⁹⁰⁾ zeigten, daß Liposomen aus DOPE/CHEMS (3/2) ebenfalls mit Vesikeln in *Stratum corneum* ähnlicher Zusammensetzung fusionieren. Die Autoren zeigten, daß diese Liposomen nicht in tiefere Regionen der Haut penetrieren. Auch Bouwstra und Mitarbeiter ⁽²⁹⁾ zeigten, daß Liposomen, die CHEMS enthielten, nicht in die lebenden Schichten der Epidermis penetrieren.

5.2.5. Zusammenfassung

Liposomen aus der Gesamtheit aller *Stratum corneum* Lipide (SCV) eignen sich gut als Modellsystem der Lipidbarriere.

Die SCV-Membran besteht aus fluiden und rigiden Bereichen. Beim Erwärmen kommt es zu einem sukzessiven Aufschmelzen. Kristallines Cholesterol löst sich beim Erwärmen in der Membran. Die Hauptumwandlung der SCV Membran liegt im Bereich von 49 - 50 °C. Sie verschiebt sich in Anwesenheit von Ca²⁺ zu niedrigeren Temperaturen (**Anhang 4**).

Ionen induzieren laterale Phasenseparation in den SCV-Membranen. Eine Ca²⁺-Konzentrationen oberhalb von 3,9 mM induziert Vesikelaggregation (**Anhang 4**).

Bei Temperaturen oberhalb von 32,5 °C fusionieren die SCV in Anwesenheit von Ca²⁺ in multilamellare Lipidschichten (**Anhang 4** und **Anhang 5**).

Die Wechselwirkung und Membranfusion zwischen den SCV und Liposomen aus synthetischen Lipiden wird durch die Lipidzusammensetzung, die Temperatur und die Ionenkonzentration bestimmt. Liposomen, die Cholesterolemisuccinat enthalten, zeigen eine temperaturabhängige Fusion mit den SCV (**Anhang 4** und **Anhang 5**).

5.3. Der Einfluß von UV-Strahlung auf die Stratum corneum Lipide

Während im vorhergehenden Kapitel der Einfluß von Temperatur und Ionen auf die Struktur der SCV Membran, sowie die Wechselwirkung mit extern zugegeben Lipiden beschrieben wurde, soll im folgenden der Einfluß von UV-Strahlung auf die SCV-Membran untersucht werden. Es stehen insbesondere Fragen der UV-vermittelten Lipidperoxidation und die daraus resultierenden Störungen im Vordergrund.

Durch die Oxidation verändert sich die Zusammensetzung der Lipidbarriere und es treten Störungen in der Barriere auf (siehe Kapitel 3.5). Durch UV-Bestrahlung oxidieren hauptsächlich die ungesättigten Lipide und es entstehen eine Vielzahl unterschiedlicher Endprodukte. Die bekanntesten sind Hydroxynonenal und Malondialdehyd (MDA) ⁽⁸⁵⁾. Wir haben MDA in Form von thiobarbitursäure-reaktiven Substanzen (TBARS) nachgewiesen (**Anhang 6**). Zusätzlich wurden die Lipidhydroperoxide (LOOH) und die Menge des während der Oxidation verbrauchten Sauerstoffs quantifiziert (**Anhang 7**).

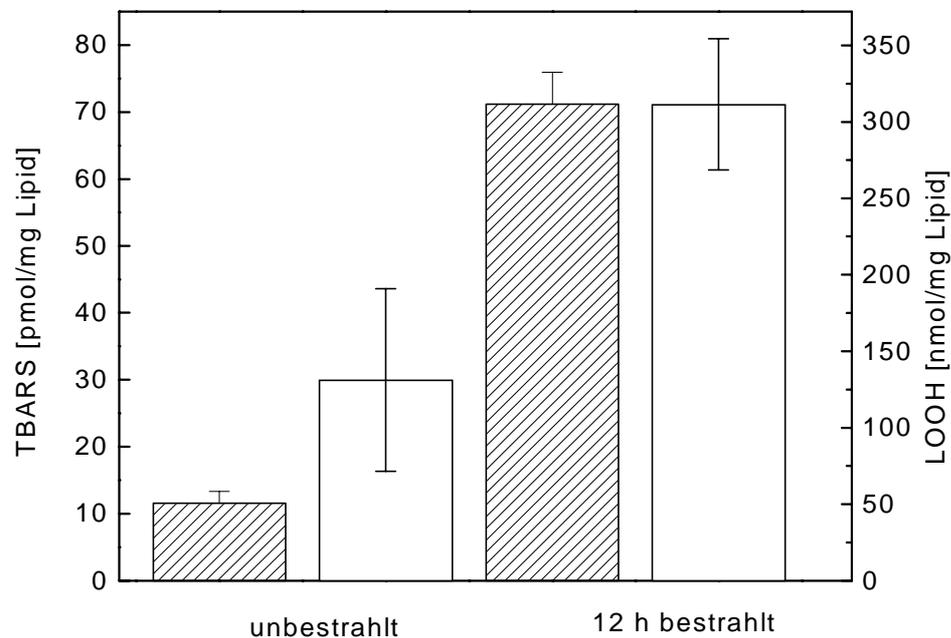


Abbildung 16:

Zunahme der Lipidperoxidationsprodukte TBARS (///) und LOOH (□) nach 12stündiger Bestrahlung von *Stratum corneum* Vesikeln (SCV) mit Sonnenlicht ($47,4 \text{ J/m}^2$ UV-A; $0,75 \text{ J/m}^2$ UV-B). Jeder Meßpunkt repräsentiert den Mittelwert aus 3 Einzelbestimmungen.

Von Smith ⁽¹⁷¹⁾ wurde eine antioxidative Wirkung des Cholesterol postuliert. Verschiedenen Arbeitsgruppen konnten diese Hypothese durch Messungen an Modellmembranen bestätigen ^(73,84,139,178). Neben Cholesterol können auch dessen Derivate, wie z. B. die natürlichen Östrogene, eine antioxidative Wirkung entfalten ^(133,174). Mit den hier vorgestellten Untersuchungen sollte geklärt werden, ob Cholesterol, das im *Stratum corneum* in hohen Konzentrationen vorkommt (Kapitel 3.4) antioxidativ wirkt.

Die Bildung von MDA und Lipidhydroperoxiden (LOOH) konnten wir in SCV unter natürlichen Strahlungsbedingungen nachweisen (**Anhang 7**). Abb. 16 zeigt, daß die Konzentration von TBARS in den SCV während einer 12stündigen Sonnenbestrahlung um das 6fache auf 71,2 pmol/mg Lipid ansteigt. Die Gesamtkonzentration der TBARS war jedoch sehr gering, da die *Stratum corneum* Lipide nur wenige ungesättigte Lipide enthalten (siehe Kapitel 3.4). Diese Befunde stimmen mit Messungen von Thiehle und Mitarbeiter ⁽¹⁸⁴⁾ überein, die zeigten, daß in der murinen Epidermis MDA unter UV-Bestrahlung entsteht. Unsere Untersuchungen zeigen, daß die Konzentration aller Lipidhydroperoxide (LOOH) nach dem Strahlungstag um das 2,5fache anstieg und 311,5 $\mu\text{mol/mg}$ Lipid betrug ⁽¹⁶⁵⁾.

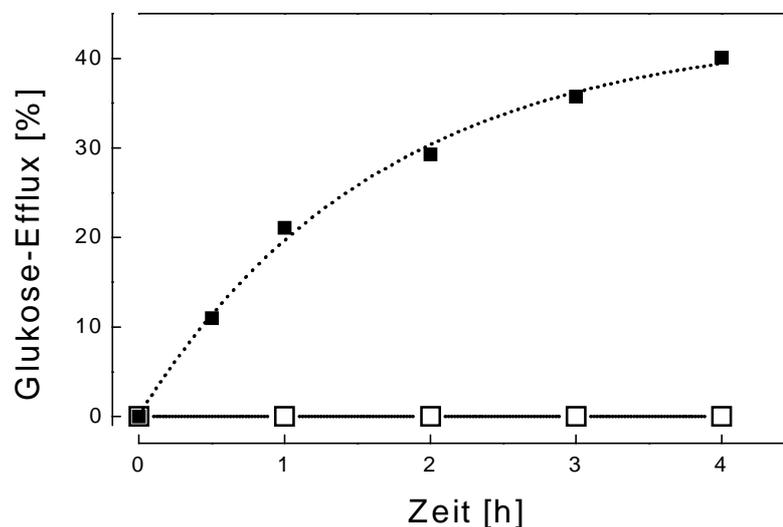


Abbildung 17:

Penetration von Glucose durch SCV-Membran während der UV-Bestrahlung (■). Bei fehlender Bestrahlung ist die Membran für Glucose undurchlässig (□). Experimentelle Bedingungen in Kapitel 4.

Wir ⁽⁹⁹⁾ konnten zeigen, daß UV-Strahlung auch aus schon natürlich vorhandenen Lipidhydroperoxiden (LOOH) Radikale erzeugen kann. So wird die UV-vermittelte

5.3. Der Einfluß von UV-Strahlung auf die Stratum corneum Lipide

Oxidation des gesättigten Lipides DMPC erst durch Zugabe von 1,5 % Lipidhydroperoxide ermöglicht ⁽¹⁶⁴⁾. In Abwesenheit von LOOH findet keine UV-vermittelte Lipidperoxidation statt. Wir vermuten, daß durch UV Strahlung aus dem LOOH ein Alkyldradikal ($L\sigma$) und ein Hydroxylradikal ($HO\sigma$) entsteht. Beide Radikale können die Oxidation gesättigter Lipide, die im SC in hoher Konzentration vorkommen, initiieren. Der von uns postulierte Reaktionsweg ist in **Anhang 6** dargestellt.

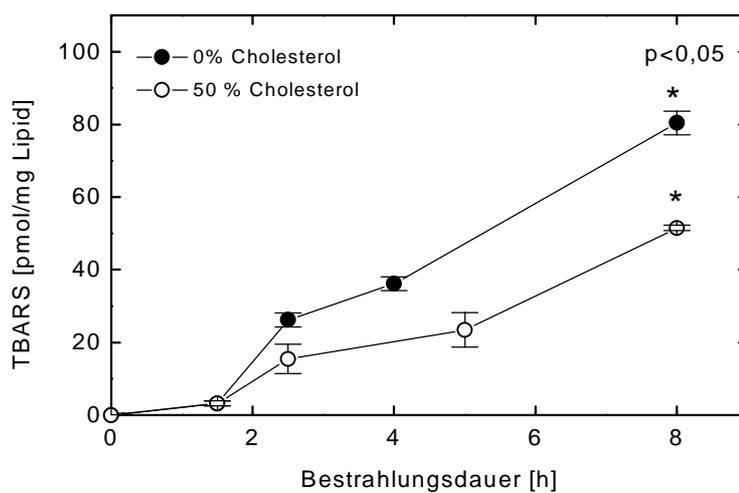


Abbildung 18:

Die Bildung von thiobarbitursäure-reaktiven Substanzen (TBARS) in Vesikeln aus *Stratum corneum* typischen Lipiden während einer UV-Bestrahlung (UV A: 52,1 mW/cm²; UV B: 0,21 mW/cm²). In Vesikeln mit 50 % Cholesterol (O) werden weniger TBARS gebildet als in Vesikeln ohne Cholesterol (●). Signifikanz mit t-Test nach Student überprüft. Experimentelle Bedingungen in Anhang 6.

Die Lipidperoxidationsprodukte MDA und LOOH stören die Struktur von Biomembranen. Es ist bekannt, daß MDA mit den Kopfgruppen der Lipide reagieren kann. Die Bildung von LOOH führt polare Gruppen in den lipophilen Bereich der Membranen ein (Abb. 6). Diesen störenden Effekt haben wir mit Penetrationsstudien verfolgt ⁽¹⁶⁴⁾. Dazu wurde Glucose in SCV verkapselt. Werden die SCV nicht bestrahlt findet keine Penetration der Glukosemoleküle durch die Membran statt (Abb. 17). Unter UV-Bestrahlung penetrierten in der gleichen Zeit 40 % der eingeschlossenen Glukosemoleküle durch die Membran ($\tau = 1,65 \pm 0,2$ h). Diese Befunde korrelieren mit den Untersuchungen von McAuliffe und Blank ⁽¹¹⁷⁾, die zeigten, daß die Penetration kleiner polarer Moleküle durch das *Stratum corneum* unter UV-Bestrahlung zunimmt. Auch Bose und Chatterjee ⁽¹⁸⁾ zeigten, daß die UV-induzierte Oxidation von Membranen aus Eilezithin den Eflux von Glucose durch die Membran

erhöht. Aus diesen Befunden wird deutlich, daß die UV-vermittelte Oxidation von SCV-Membranen deren Permeabilität für kleine polare Moleküle erhöht.

Um zu klären, ob Cholesterol, das in hoher Konzentration im *Stratum corneum* vorkommt, antioxidativ wirkt, haben wir Liposomen aus typischen *Stratum corneum* Lipiden mit 50 % bzw. ohne Cholesterol hergestellt und diese dann definierter UV-Strahlung ausgesetzt. Die Bildung von MDA, LOOH (**Anhang 6**) und der Sauerstoffverbrauch (**Anhang 7**) wurde gemessen. Abbildung 18 zeigt, daß in Liposomen mit 50 % Cholesterol die Bildung von MDA niedriger ist, als in Liposomen ohne Cholesterol. Da MDA ein Oxidationsprodukt aus Lipiden mit Acylketten ist (Abb. 6) und nicht aus Cholesterol entstehen kann, ist dieses Ergebnis zu erwarten. Es kann aber anhand dieser Messungen nicht ausgeschlossen werden, daß Cholesterol partiell antioxidativ wirkt.

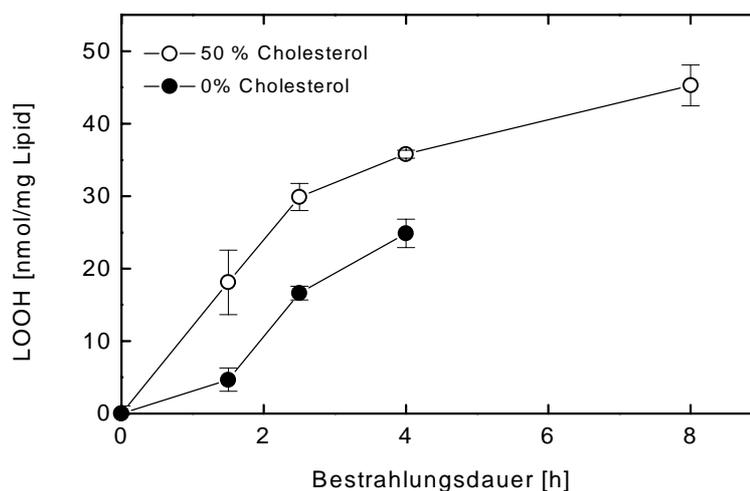


Abbildung 19:

Die Bildung von Lipidhydroperoxiden (LOOH) in Vesikeln aus *Stratum corneum* typischen Lipiden während einer UV-Bestrahlung (Dosis wie in Abb. 18). In Vesikeln mit 50 % Cholesterol (○) werden mehr LOOH gebildet als in Vesikeln ohne Cholesterol (●). Experimentelle Bedingungen in Anhang 6.

Deswegen haben wir die Konzentration der Lipidhydroperoxide bestimmt, die während der UV-Bestrahlung auch aus Cholesterol entstehen können. Die Konzentration der LOOH sind in Vesikeln mit Cholesterol höher als in den Vesikeln ohne (Abb. 19). Dieses Ergebnis spricht gegen eine antioxidative Wirkung des Cholesterol, da sonst in Anwesenheit einer hohen Cholesterolkonzentration auch weniger LOOH hätte gebildet werden müssen. Wir haben die Experimente mit getrockneten Lipidfilmen wiederholt ⁽¹⁶⁴⁾. Auch in diesen hatte Cholesterol keinen meßbaren antioxidativen Effekt.

5.3. Der Einfluß von UV-Strahlung auf die Stratum corneum Lipide

Um mit einem weiteren Versuchsansatz abzusichern, daß Cholesterol im *Stratum corneum* keine antioxidative Wirkung hat, haben wir den Sauerstoffverbrauch gemessen, der während der Bestrahlung stattfindet (**Anhang 7**). Abb. 20 zeigt, daß während einer 25minütigen Bestrahlung die O₂-Konzentration in beiden Vesikelsuspensionen (mit und ohne Cholesterol) in ähnlichem Maß abnimmt. Dieses untermauert die Befunde, daß Cholesterol keinen wirksamen antioxidativen Schutz in der humanen Hornschicht darstellt.

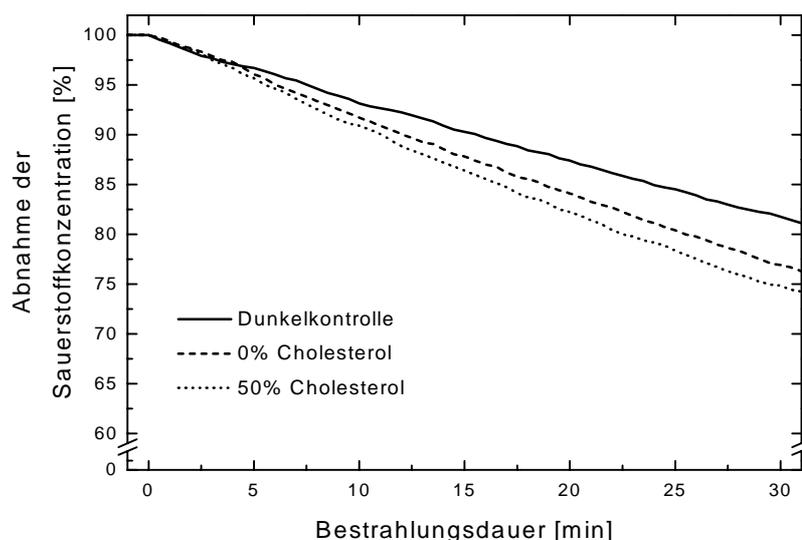


Abbildung 20:

Abnahme der Sauerstoffkonzentration in Suspensionen aus *Stratum corneum* ähnlichen Lipiden während einer UV-Bestrahlung. In Vesikeln mit und ohne Cholesterol ist der Sauerstoffverbrauch fast identisch. Dieses weist darauf hin, daß Cholesterol keine direkte antioxidative Funktion im *Stratum corneum* hat. Experimentelle Bedingungen in Anhang 7.

Durch die Analyse der Cholesteroloxidationsprodukte konnten wir den Reaktionsmechanismus (Abb. 5) aufklären. Bei der Cholesteroloxidation durch den "Typ I"-Mechanismus kommt es zu einem radikalischen Angriff in α -Stellung der C=C Doppelbindung des Cholesterols (Abb. 3) und es entsteht das 7α - und 7β -Cholesterolhydroperoxid. Im Gegensatz dazu entsteht während der Oxidation durch den "Typ II"-Mechanismus, bei dem Singulett-Sauerstoff beteiligt ist, das 5α -Cholesterolhydroperoxid.

Unsere Untersuchungen ⁽¹⁶⁵⁾ zeigten, daß durch künstliche und durch solare UV-Strahlung nur 7α - und 7β -Hydroxy-Cholesterol in trockenen Lipidfilmen ⁽¹⁶⁴⁾ und in Vesikeln aus *Stratum corneum* Lipiden entstehen (**Anhang 7**). Das bedeutet, daß Singulett Sauerstoff bei der Oxidation der *Stratum corneum* Lipide keine wesentliche

Rolle spielt. Der UV-vermittelte Oxidationsmechanismus findet in den *Stratum corneum* Vesikeln (SCV) und in trockenen SC-Lipidfilmen nach dem "Typ I"-Mechanismus statt. Es ist daher zu vermuten, daß dieses auch im nativen *Stratum corneum* der Fall ist.

Dieses eröffnet die Möglichkeit, gezielt die Oxidation der SC Lipide durch Radikalfänger (z. B. α -Tocopherol) zu reduzieren. Die Verwendung von Substanzen, die die Konzentration von Singulett Sauerstoff ($^1\text{O}_2$) reduziert (Quencher) ist nicht sinnvoll, da $^1\text{O}_2$ bei der UV-vermittelten Oxidation keine wesentliche Rolle spielt.

5.3.1. Zusammenfassung

Die solare und künstliche UV-Strahlung oxidieren die *Stratum corneum* Lipide. Dabei entstehen Malondialdehyd (MDA) und Lipidhydroperoxide (**Anhang 6**). Die Lipidperoxidation stört die Integrität der SCV-Membran und erhöht die Permeabilität für kleine polare Moleküle.

Cholesterol wirkt im *Stratum corneum* nicht als Antioxidanz (**Anhang 6**).

Die Oxidation der *Stratum corneum* Lipide findet nach dem "Typ I"-Mechanismus statt. Singulett Sauerstoff tritt nicht intermediär auf. Es entstehen hauptsächlich das 7α - und das 7β - Hydroxy-Cholesterol (**Anhang 7**).

5.4. Die rekonstituierte humane Epidermis

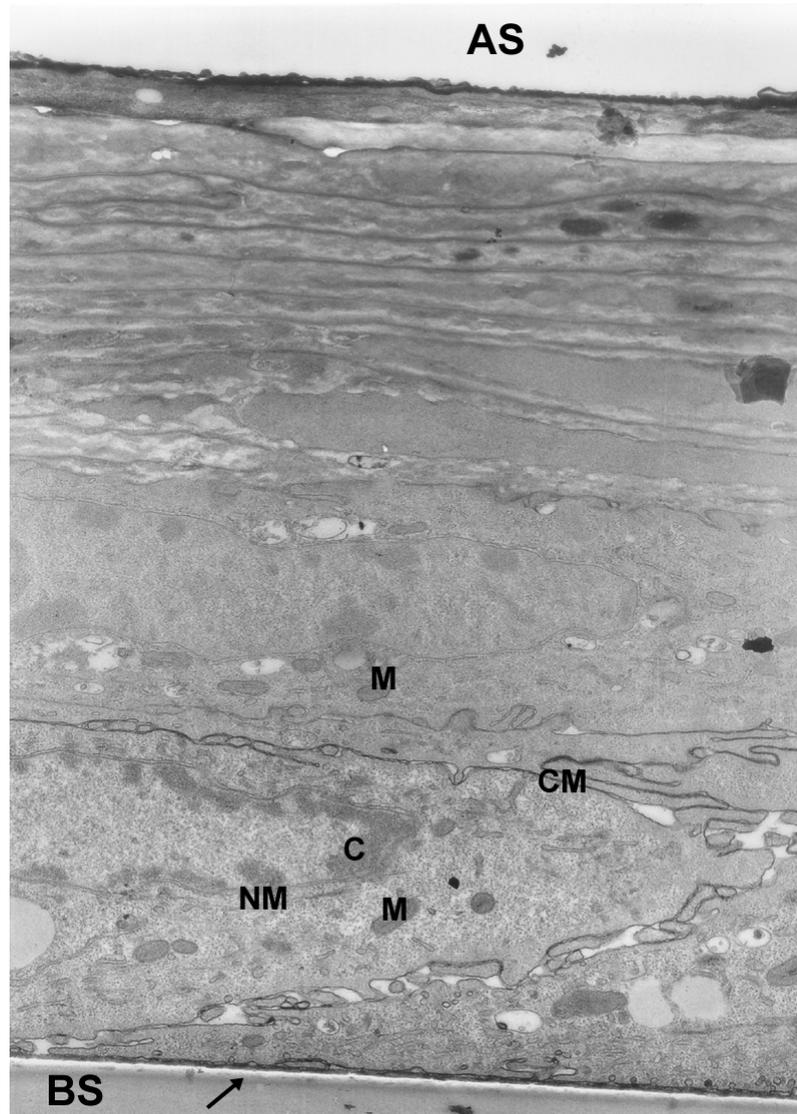


Abbildung 21:
Struktur der rekonstituierten humanen Epidermis (ReHE) unter Zellkulturbedingungen. Der Pfeil markiert die Membran, auf der die Kultur wächst. AS: apikale Seite, BS: basale Seite, C: Chromatin, CM: Zellmembran, M: Mitochondrien NM: Kernmembran. Vergrößerung: 7000fach. Experimentelle Bedingungen in Anhang 8.

Wir haben das 3-dimensionale Modell der rekonstituierten humanen Epidermis (ReHE) eingesetzt, um die Störungen zu untersuchen, die topisch applizierte Lipide in der Epidermis bewirken. Elektronenmikroskopisch wurden die Veränderungen festgehalten, die verschiedene liposomale Suspensionen nach topischer Applikation in der ReHE verursachen. Zusätzlich wurde die Penetration ausgesuchter Liposomensuspensionen durch die ReHE gemessen (**Anhang 8**). Ziel war es, die eingangs (Kapitel 2) aufgestellte Arbeitshypothese zu überprüfen, ob Liposomen, die mit den *Stratum corneum* Lipiden fusionieren (z. B. PS Liposomen) in den obersten

Schichten des SC aufgehalten werden und langsamer in tiefere Schichten penetrieren, als Liposomen, die keine Fusionsneigung aufweisen (z. B. PC Liposomen). Zusätzlich sollte festgehalten werden, welche Störungen topisch applizierte Lipide in der ReHE auslösen.

5.4.1. Der Aufbau der rekonstituierten Epidermis

Der Querschnitt durch die rekonstituierte humane Epidermis (Abb. 21) zeigt einen der nativen Epidermis ähnlichen Aufbau (Abb. 1). Auf dem basalen Filternetz befinden sich zwei Schichten aus Keratinoblasten/Keratinocyten, die eine intakte Zellmembran, eine Kernmembran mit Chromatin, Mitochondrien und Zellorganellen besitzen. Die weiter apikal liegenden Schichten weisen eine zunehmende Differenzierung auf. Dort fehlen die für lebende Zellen typischen Organellen (Mitochondrien, Nucleus, etc.). Es sind bis zu acht übereinanderliegende *Stratum corneum* ähnliche Schichten zu sehen. Eine genauere Analyse der interzellulären Zwischenräume belegt die Existenz von multilamellaren interzellulären Lipidschichten (Abb. 22), wie sie auch im nativen *Stratum corneum* vorkommen.

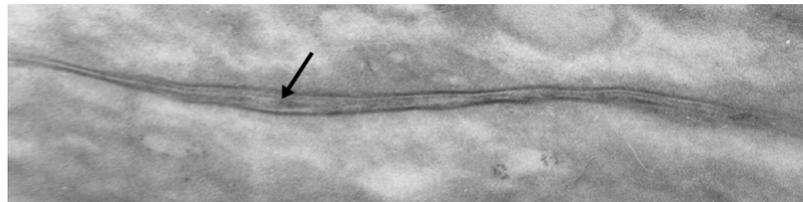


Abbildung 22:
Darstellung der multilamellaren Lipidschichten in der rekonstituierten humanen Epidermis. Sie treten, wie im nativen *Stratum corneum*, zwischen den Keratinozyten auf (Pfeil). Vergrößerung: 12000fach

5.4.2. Die Penetration durch die rekonstituierte Epidermis

Wir haben Liposomen aus Phosphatidylserin (PS), aus humanen *Stratum corneum* Lipiden (SCV) und aus Phosphatidylcholin (PC) mit einem Durchmesser von 50 nm fluoreszenzmarkiert, auf die apikale Seite der ReHE aufgetragen und über 4 h die Penetration verfolgt (Abb. 23). Nach einer Verzögerung von 60 min (für PC-Liposomen) stellte sich ein konstanter Fluß der fluoreszenzmarkierten liposomalen Lipide ein. Die daraus berechnete Penetrationsgeschwindigkeit betrug für PC-Liposomen $1,38 \text{ ng Lipid h}^{-1} \text{ cm}^{-2}$, für PS-Liposomen nur $0,073 \text{ ng Lipid h}^{-1} \text{ cm}^{-2}$ und für die SCV $0,55 \text{ ng Lipid h}^{-1} \text{ cm}^{-2}$ (Anhang 8).

Diese Studie zeigt, daß die Zusammensetzung der liposomalen Lipide einen starken Einfluß auf die Penetrationsgeschwindigkeit hat. Sie unterstützt die eingangs (Kapitel

2) aufgestellte Arbeitshypothese, daß Liposomen, die gut mit den SCV fusionieren (z. B. PS-Liposomen) langsamer durch die ReHE penetrieren, als Liposomen, die schlecht mit den SCV fusionieren (Abb. 15).

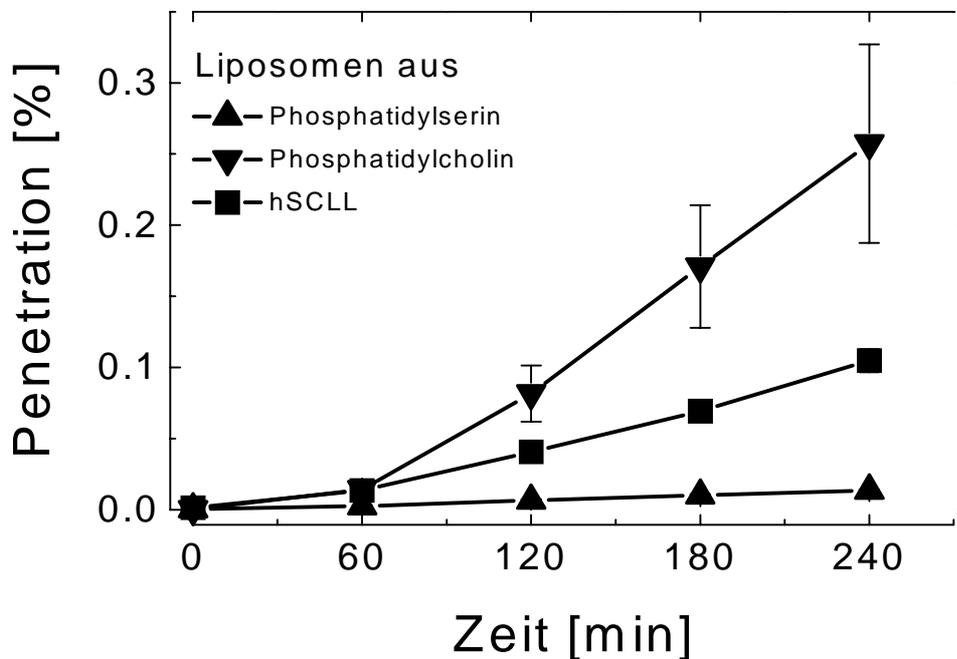


Abbildung 23:

Penetration von fluoreszenzmarkierten Liposomen ($\varnothing = 50$ nm) unterschiedlicher Zusammensetzung durch die rekonstituierte humane Epidermis, bezogen auf die topisch applizierte Menge Gesamtlipid. Experimentelle Bedingungen in Anhang 8.

5.4.3. Die Verteilung topisch applizierter Vesikel in der Hautkultur

Wir konnten am Modell der ReHE zeigen, daß die von uns verwendeten Liposomen innerhalb des *Stratum corneum disjunctum* zwischen den Korneozyten entlang der multilamellaren Lipidschichten penetrieren (**Anhang 8**). Deformierte Vesikel befanden sich unter der obersten Lage der Hornzellen ⁽²¹²⁾. Um zu klären, ob die Zusammensetzung der liposomalen Lipide die Verteilung innerhalb der ReHE beeinflusst, haben wir die Liposomen mit Rho-PE fluoreszenzmarkiert.

Die Untersuchungen zeigen, daß die PC-Liposomen 4 h nach der Applikation gleichmäßig auf der Oberfläche und in tieferen Schichten der ReHE angereichert sind (Abb. 24). Elektronenmikroskopisch konnten wir belegen (**Anhang 8**), daß sich in tieferen Schichten der ReHE der Zellverband auflöst und es zur Bildung von Vakuolen kommt. Im Gegensatz dazu bilden die PS-Liposomen und die SCV auf der

Oberfläche und in tieferen Schichten Aggregate (Abb. 24). Die PS-Liposomen lösen keine Strukturveränderungen in den tieferen Schichten der ReHE aus ⁽²¹²⁾.

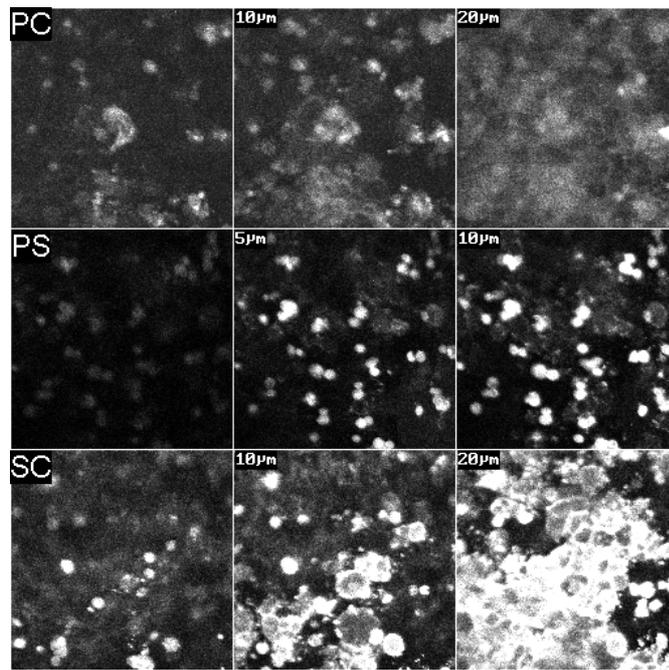


Abbildung 24:

Optischer Tangentialschnitt (x-y-Ebene) durch die rekonstituierte Epidermis (ReHE) in 0, 10 und 20 µm Tiefe 4 h nach topischer Applikation von fluoreszenzmarkierten Phosphatidylcholin- (PC) und Phosphatidylserin-Liposomen (PS), bzw. *Stratum corneum* Vesikeln (SC). Nach topischer Applikation von PC-Liposomen sind diese bis in 20 µm Tiefe gleichmäßig verteilt. PS-Liposomen und SCV bilden sowohl an der *Stratum corneum* Oberfläche, als auch in tieferen Schichten Aggregate. Experimentelle Bedingungen in Anhang 8.

Diese mikroskopischen Untersuchungen ergänzen die Penetrationsstudien an der ReHE (Abb. 23) und unterstützen in Verbindung mit den Fusionsmessungen (Kapitel 5.2.4) die eingangs in Kapitel 2 aufgestellte Arbeitshypothese. PC-Liposomen zeigen keine Wechselwirkung (Fusion) mit den Lipiden des SC (Abb. 15), sind in der ReHE homogen verteilt (Abb. 24) und penetrieren mit einer hohen Geschwindigkeit durch die Barriere (Kapitel 5.4.2).

Im Gegensatz dazu aggregieren und fusionieren Liposomen aus PS oder aus *Stratum corneum* Lipiden mit den SCV (Abb. 14 und Abb. 15) Diese Liposomen aggregieren auch in den obersten Schichten der rekonstituierten Epidermis (Abb. 24) und penetrieren deshalb langsamer, als die PC-Liposomen (Abb. 23).

5.4.4. Die Penetration liposomaler Lipide durch das intakte *Stratum corneum*

Mak und Mitarbeiter ⁽¹¹²⁾ zeigten, daß die ReHE für H₂O eine geringere Barriere darstellt als die intakte Epidermis. Die Autoren wiesen aber auch nach, daß die Kulturbedingungen der rekonstituierten Epidermis einen starken Einfluß auf die

Penetrationsgeschwindigkeit haben. Wahrscheinlich fanden deshalb Michel und Mitarbeiter ⁽¹²⁷⁾ keinen Unterschied für die Penetrationsgeschwindigkeit von Hydrokortison zwischen der ReHE und der nativen Epidermis. Wir haben exemplarisch die Penetration liposomaler Lipide durch das isolierte *Stratum corneum* untersucht und mit den Penetrationsstudien an der ReHE verglichen. Unsere Untersuchungen zeigten, daß die Penetration der Vesikel durch das isolierte *Stratum corneum* vergleichbar mit der durch die rekonstituierte Epidermis ist. Durch die ReHE penetrierten 0,25 % der applizierten liposomalen Lipide innerhalb von 4 h. Durch das isolierte *Stratum corneum* nur 0,76 % in 18 h (Abb. 25 A). Das entspricht der 3fachen Menge in der 4fachen Zeit. Innerhalb von 42 h (der 10fachen Zeit) penetrierten 2,8 % (die 11fache Menge) der topisch applizierten Lipide durch das isolierte *Stratum corneum* (Abb. 25 A)

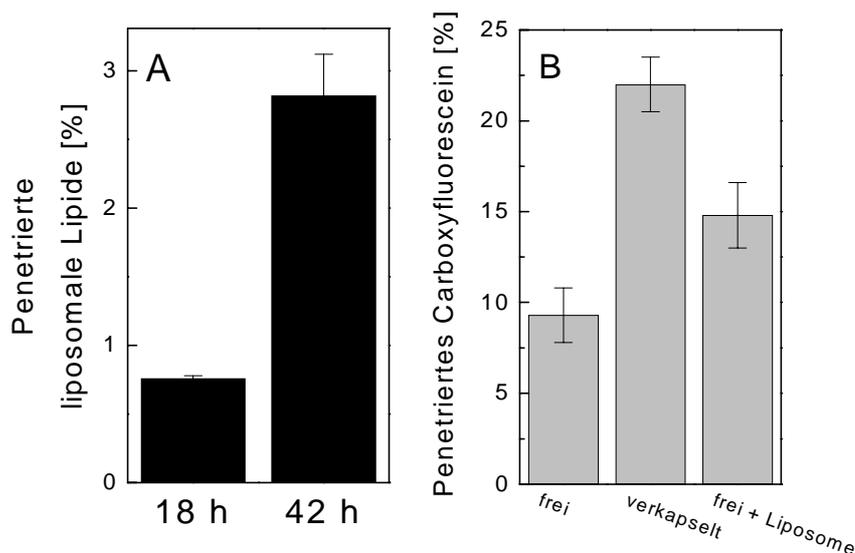


Abbildung 25:

A: Penetration liposomaler Lipide durch das isolierte humane *Stratum corneum* über 18 h und 42 h. **B:** Penetration von Carboxyfluorescein (CF) durch das SC über 42 h in freier und in DMPC-Liposomen verkapselter Form, sowie nach gleichzeitiger Applikation von freiem CF und leeren Liposomen. Experimentelle Bedingungen in Kapitel 4.

Da nur die Penetration der fluoreszenzmarkierten Lipide erfaßt wurde, bleibt es unklar, ob die Liposomen intakt penetrierten oder ob sie zerfallen und nur die einzelnen Lipide durch das SC dringen. Beide Modellvorstellungen werden in der Literatur diskutiert (siehe Kapitel 3.6). Deshalb haben wir den hydrophilen Fluorophor Carboxyfluorescein (CF) in Liposomen eingeschlossen und die penetrierte Menge nach 42 h gemessen. Wenn die Liposomen auf der Oberfläche des

Stratum corneum zerfallen, dann sollte freies und verkapseltes CF genauso schnell durch das *Stratum corneum* penetrieren.

Wurde freies CF auf das *Stratum corneum* appliziert, so penetrierten $9,3 \pm 1,5$ % (0,08 nmol) der applizierten Menge innerhalb von 42 h (Abb. 25 B). Wurde die gleiche Konzentration in Liposomen verkapselt und dann auf das *Stratum corneum* appliziert, so penetrierten $22 \pm 1,2$ % (0,19 nmol) durch das *Stratum corneum*. Bei Applikation von unverkapseltem CF zusammen mit leeren Liposomen penetrierten $14,8 \pm 1,8$ % durch das SC.

Dieses Experiment zeigt, daß Liposomen die Penetration kleiner hydrophiler Moleküle (z. B. CF) erleichtern. Die Penetration ist war mit verkapseltem CF am stärksten. Sie war deutlich erhöht, wenn leere Liposomen zusammen mit der hydrophilen Substanz appliziert wurden (Abb. 25 B). Das zeigt, daß Wirkstoffe nicht notwendigerweise verkapselt sein müssen, sondern auch schon erleichtert unter Anwesenheit von Liposomen penetrieren.

Wir schließen aus unseren Befunden, daß Liposomen in die obersten Schichten des *Stratum corneums* eindringen (**Anhang 8**), dabei ihre Struktur verändern, sich deformieren und ihren Inhalt freisetzen. Die Penetration von PC-Liposomen wird durch ihre geringe Wechselwirkung mit den *Stratum corneum* Lipiden erhöht (**Anhang 4** und **Anhang 5**). In der Folge kommt es zu Störungen innerhalb des SC, die schon Bouwstra und Mitarbeiter ^(28,97) am intakten *Stratum corneum* und wir erstmals an der ReHE ⁽²¹²⁾ nachgewiesen haben. Diese Störungen können die Penetration von hydrophilen Substanzen erleichtern, wenn sie entweder in die Liposomen eingeschlossen waren oder gleichzeitig appliziert wurden.

5.4.5. Zusammenfassung

Die rekonstituierte humane Epidermis (ReHE) hat den gleichen histologischen Aufbau wie die native Epidermis.

PC-Liposomen penetrieren schneller durch die ReHE als PS-Liposomen. Ursache ist die spezifische Wechselwirkung zwischen den Liposomen und den Lipiden des *Stratum corneums* (**Anhang 8**).

In tieferen Schichten der ReHE kommt es 4 h nach Applikation der PC-Liposomen zu strukturellen Veränderungen. PS-Liposomen bewirken keine Veränderung (**Anhang 8**).

Die Penetrationsgeschwindigkeit von liposomalen Lipiden durch das isolierte *Stratum corneum* ist vergleichbar mit der durch die rekonstituierte Epidermis. Hydrophile Modellsubstanzen penetrieren erleichtert durch das *Stratum corneum*, wenn sie vor der Applikation in die Liposomen eingeschlossen werden oder gleichzeitig mit leeren Liposomen appliziert werden.

5.5. Der Einfluß topisch applizierter Lipide auf das intakte Stratum corneum

Unsere Untersuchungen am Modellsystem der *Stratum corneum* Vesikel (SCV) zeigten, daß die Wechselwirkung von Liposomen mit den Lipiden des *Stratum corneums* durch die Kopfgruppe bestimmt wird (Kapitel 5.2.4). PS-Liposomen zeigten im Gegensatz zu PC-Liposomen eine starke Wechselwirkung (und Fusion) mit den SCV (Abb. 15 und **Anhang 4**). Es wurde eingangs die Arbeitshypothese aufgestellt (Kapitel 2), daß diese Wechselwirkung die Penetrationsgeschwindigkeit beeinflußt. Diese Hypothese konnte am Modell der ReHE bestätigt werden (Kapitel 5.4.2 und **Anhang 8**). PS-Liposomen penetrierten auf Grund der starken Wechselwirkung und Fusion nur langsam in und durch die ReHE (Abb. 23). PC-Liposomen, die nur eine geringe Wechselwirkung aufweisen, penetrierten schnell durch die ReHE. Im folgenden Abschnitt sollen die Studien am intakten *Stratum corneum* fortgesetzt werden.

Mit der FT-IR Spektroskopie und der Kalorimetrie (**Anhang 9**) haben wir untersucht, welche Störung topisch applizierte liposomale Lipide in den multilamellaren Lipidschichten des isolierten *Stratum corneum* bewirken. Wie in Kapitel 5.2.2 haben wir die Veränderungen in der CH₂-Streckschwingungen untersucht.

5.5.1. Infrarot-spektroskopische Untersuchungen am isolierten *Stratum corneum*

Abbildung 26 zeigt das FT-IR Spektrum des isolierten humanen *Stratum corneums*. Auf Grund der komplexen Zusammensetzung aus verhornten Zellen, die in multilamellare Lipidschichten eingebettet sind, findet man Absorptionen aus dem Lipid- und dem Proteinbereich. Die asymmetrische und die symmetrische Streckschwingung ($\nu[\text{CH}_2]_n$) der multilamellaren Lipidschichten ergeben zwei Signale bei 2960 cm^{-1} und 2850 cm^{-1} . Die Amide ergeben zwei scharf begrenzte Banden (A I und A II) ⁽⁷⁷⁾, die im wesentlichen von dem Proteinanteil der Korneozyten stammen. Die Intensität der Carbonylbande ($\nu[\text{C=O}]$), die wahrscheinlich von den freien und veresterten Fettsäuren stammt, variiert in ihrer Intensität.

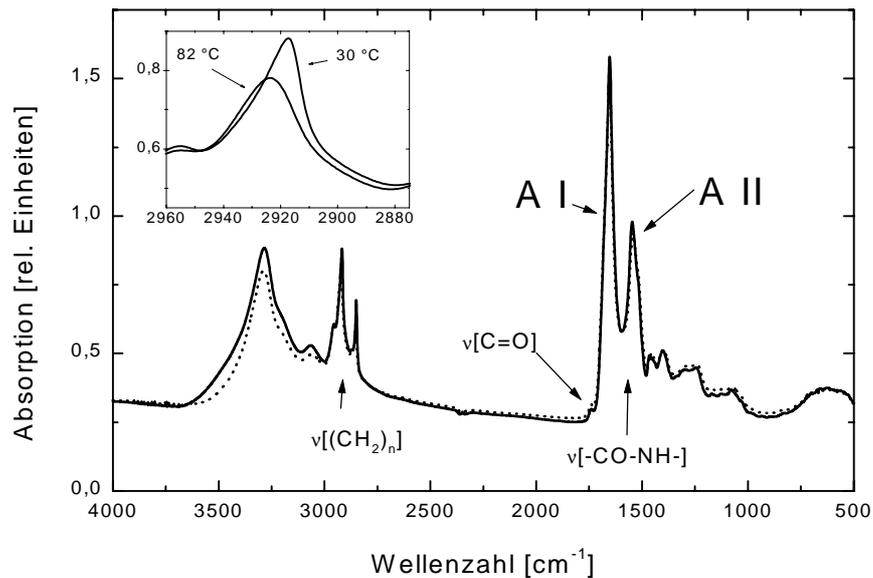


Abbildung 26:

FT-IR Spektrum des isolierten *Stratum corneum*s bei 30 °C (—) und bei 82 °C (...) im dehydratisierten Zustand. Charakteristische Banden sind die symmetrische und die asymmetrische CH₂-Streckschwingung der Acylketten ($\nu[\text{CH}_2]_n$), die Amid I- und Amid II-Bande der Proteine ($\nu[-\text{CO}-\text{NH}-]$) und die Carbonylbande ($\nu[\text{C}=\text{O}]$) der freien und veresterten Fettsäuren. **Einsatz:** Durch einen Temperaturanstieg von 30 °C auf 82 °C verschieben sich die Banden der ($\nu_a[\text{CH}_2]_n$)-Schwingungen zu größeren Wellenzahlen, da die Fluidität der Lipide in den multilamellaren Schichten zunimmt. Experimentelle Bedingungen in Kapitel 4.

Die Absorptionsbande der $\nu[\text{CH}_2]_n$ verschiebt sich mit steigender Temperatur zu höheren Wellenzahlen: bei 30 °C liegt das Maximum der asymmetrischen Streckschwingung ($\nu_a[\text{CH}_2]_n$) bei 2917 cm⁻¹ und verschiebt sich bei Erwärmung auf 82 °C zu 2933 cm⁻¹ (Abb. 26).

Abbildung 27 zeigt, daß sich auch die symmetrische Streckschwingung ($\nu_s[\text{CH}_2]_n$) bei Temperaturerhöhung zu höheren Wellenzahlen verschiebt. Die Verschiebung der beiden Streckschwingungen beruht auf der Fluidisierung der Acylketten. Die erste Ableitung dieser Meßkurve ergibt Phasenübergänge im Bereich von 36 - 39 °C, 46 - 49 °C und 66 - 96 °C (Abb. 27), die wir auch bei den SCV nachweisen konnten, nämlich bei 31,3 °C, 49,2 °C und 73,3 °C (Abb. 9).

Yokomizo ⁽²⁰⁰⁾ zeigte, daß topisch applizierte Substanzen nur eine geringfügig Verschiebung der Absorptionsbanden bewirken, wenn die Messungen bei konstanter Temperatur durchgeführt werden. Im Gegensatz dazu konnten wir zeigen, daß sich der Betrag der temperaturinduzierten $\nu_s[\text{CH}_2]_n$ -Verschiebung sehr stark von topisch applizierten Substanzen beeinflußt wird. Dazu wurde die Verschiebung der $\nu_s[\text{CH}_2]_n$ -

5.5. Der Einfluß topisch applizierter Lipide auf das intakte Stratum corneum

Bande nach Temperaturerhöhung von 25 °C auf 82 °C bestimmt. Sie betrug bei unbehandelten *Stratum corneum* Proben 3,2 Wellenzahlen. Nach Behandlung mit PS-Liposomen betrug die temperaturinduzierte Verschiebung ebenfalls nur 3,2 Wellenzahlen. Die Behandlung mit PC-Liposomen hatte eine signifikante Verschiebung (um 3,86 cm⁻¹) zu höheren Wellenzahlen zu Folge (Abb. 28).

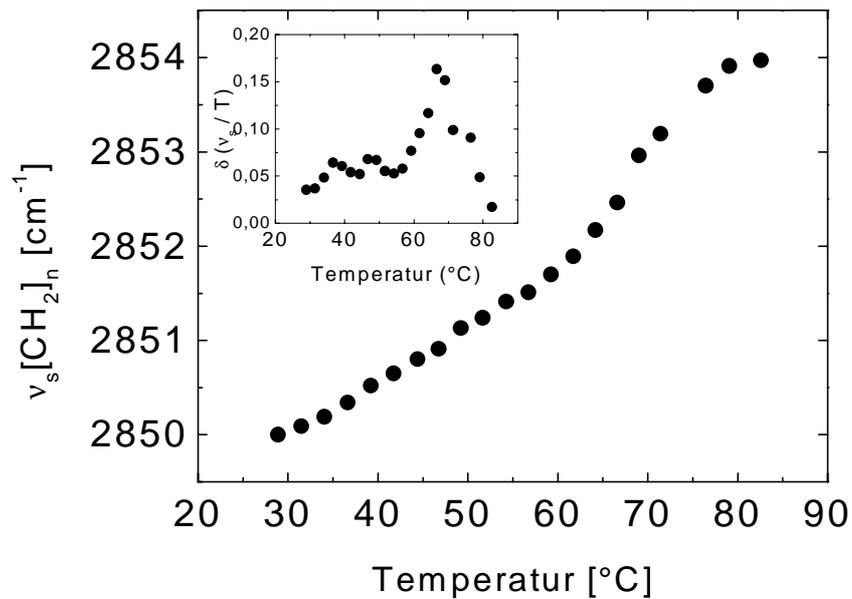


Abbildung 27:

Einfluß der Temperatur auf die Lage der Absorptionsbande der symmetrischen CH₂-Streckschwingung ($\nu_s[\text{CH}_2]_n$) im isolierten *Stratum corneum*. Mit steigender Temperatur verschiebt sich das Maximum zu höheren Wellenzahlen. **Einsatz:** Die Phasenübergänge in nativem *Stratum corneum*, wurden aus der ersten Ableitung der Meßkurve bestimmt. Experimentelle Bedingungen im Kapitel 4.

Diese Befunde stimmen mit den Untersuchungen von Ongpipattanakul et al. ⁽¹³⁶⁾ überein. Die Autoren zeigten, daß die $\nu_s[\text{CH}_2]_n$ -Bande von ölsäurebehandeltem und unbehandeltem *Stratum corneum* bei 30 °C ihr Maximum bei 2850,1 cm⁻¹ hat. Durch eine Temperaturerhöhung auf 90 °C verschob sich das Maximum der unbehandelten Proben um nur 3,2 Wellenzahlen, während es sich bei ölsäurebehandeltem *Stratum corneum* um 3,9 Wellenzahlen auf 2854,2 cm⁻¹ verschob. Ursache für diesen zusätzlichen Betrag in der Verschiebung ist eine durch die eingedrungene Ölsäure hervorgerufen Fluidisierung der multilamellaren Lipidschichten.

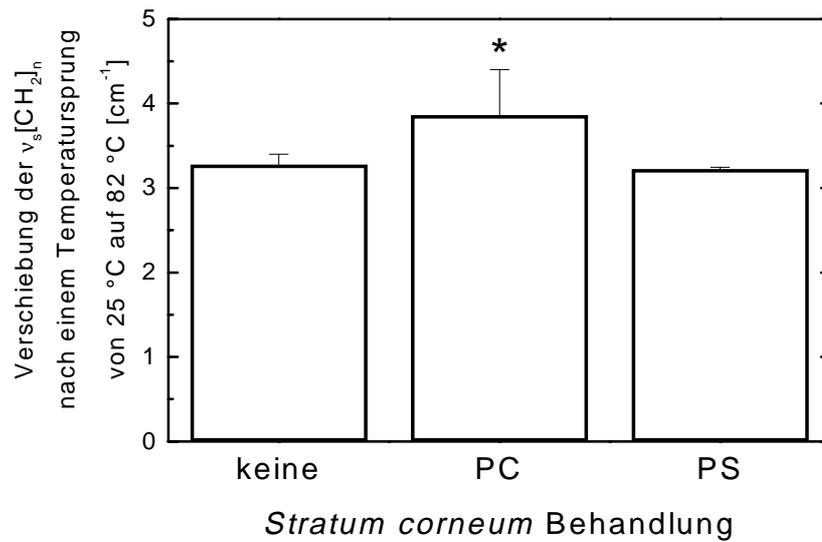


Abbildung 28:

Einfluß von topisch, nicht-okklusiv applizierten Phosphatidylcholin (PC) oder Phosphatidylserin (PS) Liposomen auf die Fluidität der multilamellaren Lipidschichten des isolierten humanen *Stratum corneums*. Es wurde die temperaturinduzierte Verschiebung der symmetrischen CH_2 -Streckschwingung ($\nu_s[\text{CH}_2]_n$) 18 h nach Applikation ausgewertet. PC-Liposomen bewirken eine signifikant stärkere Verschiebung der $\nu_s[\text{CH}_2]_n$, während PS-Liposomen keinen Einfluß haben ($n = 4$, $p < 0,01$, t-Test).

Unsere FT-IR spektroskopischen Untersuchungen zeigen, daß topisch applizierte PC-Liposomen eine größere Störung im *Stratum corneum* bewirken als PS-Liposomen. Nach Applikation von PC-Liposomen kommt es zu einer Fluidisierung innerhalb der multilamellaren Lipidschichten.

5.5.2. Kalorimetrische Untersuchungen am isolierten *Stratum corneum*

Während mit der FT-IR Spektroskopie Veränderungen an einzelnen Molekülbindungen untersucht werden können und somit detaillierte Informationen zu einzelnen Gruppen gewonnen werden können, erlaubt die Kalorimetrie, thermodynamische Veränderungen des Gesamtsystems zu erfassen. Auf Grund der starken Absorption der Wassermoleküle, mußten die FT-IR Spektren am dehydratisierten *Stratum corneum* aufgenommen werden. Im Gegensatz dazu ließen sich die kalorimetrischen Untersuchungen an vollständig hydratisierten Proben durchführen (**Anhang 9**).

Van Duzee⁽¹⁸⁸⁾ konnte als einer der Ersten das kalorimetrische Meßprofil den einzelnen Komponenten des humanen *Stratum corneum* zuordnen. Er fand Übergänge bei 40 °C, 75 °C, 85 °C und 107 °C. Die ersten beiden Maxima sind bei Aufheiz- und Abkühlvorgängen reversibel und wurden deshalb den Lipiden zugeordnet. Die anderen

5.5. Der Einfluß topisch applizierter Lipide auf das intakte Stratum corneum

Übergänge spiegeln Veränderungen innerhalb der Proteine wider und sind nicht-reversibel. Ähnliche Studien wurden an Epidermen von Maus und Schwein durchgeführt ⁽¹⁵⁰⁾. Durch neuere Messungen ⁽¹⁷⁹⁾, insbesondere durch die Kombination von Kalorimetrie und Röntgenstreuung ⁽²¹⁾ oder von Kalorimetrie und FT-IR Spektroskopie ⁽¹³⁰⁾ ergeben sich die in der Tabelle 2 zusammengestellten Übergangstemperaturen und die damit einhergehenden Strukturveränderungen im SC.

Wir haben mit Hilfe der Kalorimetrie den Einfluß von topisch, nicht-okklusiv aufgetragenen PC-Liposomen auf das *Stratum corneum* untersucht (**Anhang 5** und **Anhang 9**). PC-Liposomen wurden verwendet, da die infrarotspektroskopischen Messungen am isolierten *Stratum corneum* (Abb. 28) und die Untersuchungen an der ReHE vermuten lassen, daß diese Liposomen im Gegensatz zu PS-Liposomen gut in und durch das *Stratum corneum* penetrieren.

Das unbehandelte *Stratum corneum* zeigte Enthalamaxima (Tab. 4), die mit denen in der Literatur beschriebenen (Tab. 2) bei 35 - 40 °C, 55 °C, 70 °C und 80 °C gut übereinstimmen.

Tabelle 4:

Lage der endothermen Maxima des isolierten *Stratum corneum*s vor und nach Behandlung mit DMPC Liposomen, sowie die Veränderung der Umwandlungsenthalpie, bezogen auf die der Proteindenaturierung bei 81 °C. Experimentelle Bedingungen in Anhang 9.

Lage des endothermen Maximum [°C] des unbehandelten SC	Lage des endothermes Maximum [°C] nach Behandlung mit DMPC-Liposomen	relative Veränderung der Enthalpie, bezogen auf das Maximum bei 81 °C
10,4 ± 0,5	10,7 ± 0,6	↓
34,3 ± 1,0	35,5 ± 1,6	↑/± ^a
51,6 ± 2,0	48,7 ± 1,4	↑
62,4 ± 1,6	63,0 ± 1,7	↑
72,1 ± 1,2	74,5 ± 2,2	↑
81,2 ± 0,7	82,7 ± 2,0	↑

^a bei einigen Proben keine eindeutige Veränderung

Eine Erwärmung des *Stratum corneum*s auf 100 °C führte, wie in der Literatur mehrfach beschrieben ^(70,130,150), zu einer starken Änderung des endothermen Profils. Das Maximum bei 81 °C konnte nur in der 1. Heizphase detektiert werden, da es auf die Denaturierung der Proteine zurückzuführen ist. Im Gegensatz dazu war das Maximum

5.5. Der Einfluß topisch applizierter Lipide auf das intakte Stratum corneum

bei 62,4 °C, das seinen Ursprung im Schmelzen der interzellulären Lipide hat, reversibel und blieb über mehrere Heiz- und Kühlzyklen erhalten.

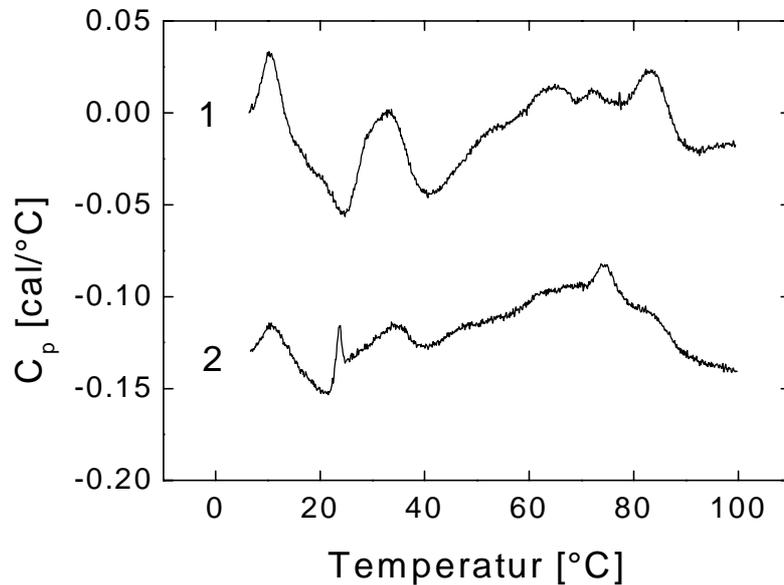


Abbildung 29:

Endothermes Profil des unbehandelten humanen *Stratum corneums* vor (1) und nach (2) der Applikation von 3 µl DMPC Liposomen (50 mg/ml Lipid). Experimentelle Bedingungen in Anhang 9.

Nach Applikation von PC-Liposomen traten in der 1. Heizphase die für das humane *Stratum corneum* typischen lokalen Maxima bei 35 °C, bei 55 °C, bei 65 °C und bei 81 °C auf (Abb. 29). Zusätzlich war das scharf begrenzte Maximum des topisch applizierten Phosphatidylcholins (DMPC) bei 23 °C zu sehen.

Anders als nach der Behandlung mit freien Fettsäuren ⁽¹⁸⁰⁾ kam es in den von uns durchgeführten Experimenten nach der Behandlung mit PC-Liposomen zu keiner signifikanten Verschiebung der endothermen Maxima (Tab. 4). Im kalorimetrischen Profil sind auch keine neuen Maxima meßbar (Abb. 29). Die Umwandlungsenthalpien, die auf der Organisation der *Stratum corneum* Lipide beruhen, nehmen aber zu (Tab. 4). Dadurch kommt es zu einer Veränderung des Profils. Wir schießen daraus, daß das topisch applizierte DMPC teilweise in das *Stratum corneum* penetriert und daraus eine Störung in der Struktur und der Organisation der multilamellaren Lipidschichten resultiert.

In der 2. Heizphase überlappte das Signal des Phospholipides teilweise mit der Umwandlung bei 35 °C, die auf einem rigiden/fluiden Phasenübergang zurückzuführen ist (Tab. 2). Das deutet darauf hin, daß das topisch applizierte Lipid und die *Stratum*

5.5. Der Einfluß topisch applizierter Lipide auf das intakte Stratum corneum

corneum Lipide eine Mischphase gebildet haben. Das breite Maximum bei 65 °C, das auf dem Aufschmelzen der multilamellaren interzellulären Lipide beruht, blieb auch in der 2. Heizphase erhalten (**Anhang 9**).

Die hier vorgestellten Befunde unterstützen die FT-IR spektroskopischen Untersuchungen im vorhergehenden Kapitel. PC-Liposomen dringen in das isolierte *Stratum corneum* ein und verändern die Organisation der multilamellaren Lipidschichten. Diese Befunde gleichen denen von Hofland und Mitarbeiter ⁽⁷⁹⁾, sowie von Bouwstra und Mitarbeiter ⁽²⁸⁾ die solche Effekte nach Applikation von Soja-Lipid Liposomen mit Hilfe von Röntgenbeugungsstudien nachwiesen.

5.5.3. Zusammenfassung

Mit der FT-IR Spektroskopie und der Kalorimetrie lassen sich Störungen nachweisen, die durch topisch applizierte Lipide in den multilamellaren Lipidschichten des humanen SC induziert werden.

Nach topischer Applikation von PC-Liposomen beträgt die temperaturinduzierte Verschiebung 3,9 Wellenzahlen, während bei von PS-Liposomen keine zusätzliche Verschiebung auftritt. Das deutet darauf hin, daß PC-Liposomen besser als PS-Liposomen in das *Stratum corneum* eindringen und dort eine größere Störung verursachen.

Die topische Applikation von PC-Liposomen führt auch zu einer Veränderung des endothermen Profils des isolierten *Stratum corneums* (**Anhang 9**).

5.6. Die Phospholipase A₂-Aktivität des nativen Stratum corneums

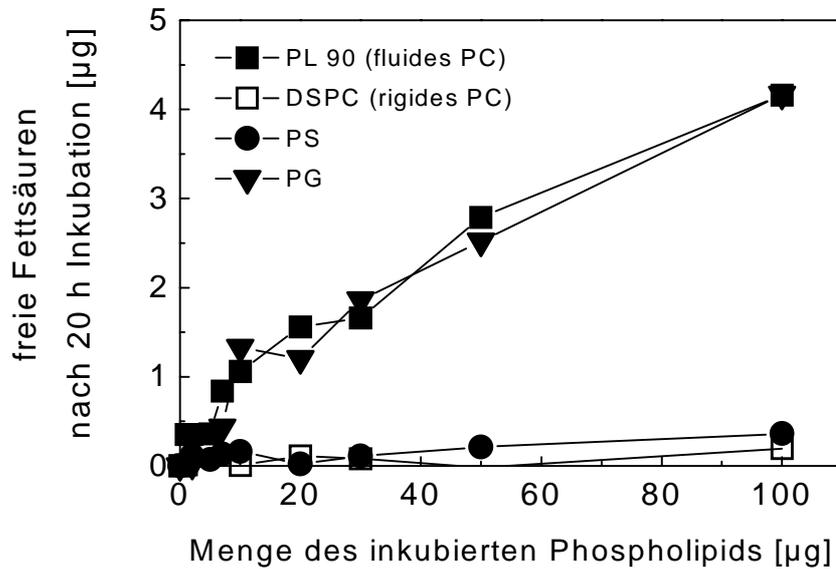


Abbildung 30:

Dünnschichtchromatographische Bestimmung der Zusammensetzung liposomaler Lipide nach 20stündiger Inkubation mit dem wäßrigen Extrakt des humanen *Stratum corneums*. Fluides Phosphatidylcholin (PL 90) und Phosphatidylglycerol (PG) unterliegen einer Hydrolyse und es kommt zu einer Freisetzung von Fettsäuren. Rigides Phosphatidylcholin (DSPC) und Phosphatidylserin (PS) werden nicht hydrolysiert. Experimentelle Bedingungen in Kapitel 4.

Da im *Stratum corneum* eine PL A₂-Aktivität vorhanden ist (siehe Kapitel 3.8), vermuten wir, daß topisch applizierte Lipide, die in das *Stratum corneum* penetrieren, einer Hydrolyse unterliegen. Das hätte weitreichende Konsequenzen für dermale und transdermale Applikationen. So belegen Modellrechnungen, daß die Verteilung und die Penetration topisch applizierter Substanzen durch ihre Hydrolyse im apikalen SC stark beeinflusst wird ⁽¹⁵¹⁾. In diesem Kapitel werden erstmals Untersuchungen zur Substratspezifität und zum Temperaturoptimum der PL A₂-Aktivität, die im epidermalen humanen *Stratum corneum* lokalisiert ist, vorgestellt ^(206,208,211).

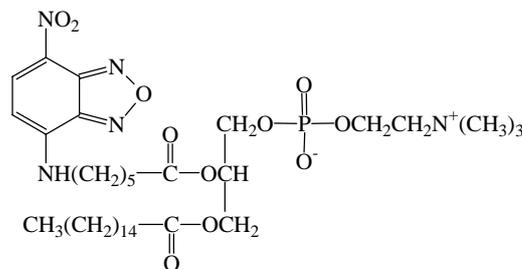


Abbildung 31:

Struktur des verwendeten Phospholipase A₂ Substrates NBD-C₆-PC. In der *sn*-2 Position ist das Molekül mit NBD markierten. Die Phospholipase spaltet NBD-C₆ ab.

Wir haben Liposomen verschiedener Zusammensetzung in einem wässrigen Extrakt des humanen *Stratum corneums* über 20 h inkubiert und dann die Zusammensetzung der liposomalen Lipide dünn-schichtchromatographisch analysiert. Liposomale Lipide aus dem fluiden Soja-Phosphatidylcholin (PL 90) oder aus fluidem Diacylphosphatidylglycerol (PG) werden hydrolysiert (Abb. 30). Die Konzentration abgespaltener freier Fettsäuren nimmt mit steigender Lipidkonzentration zu. Liposomen aus Distearoylphosphatidylcholin (DSPC) oder Diacylphosphatidylserin (PS) unterliegen keiner Hydrolyse. Die PL A₂-Aktivität des *Stratum corneums* besitzt demnach eine Substratspezifität für fluide Lipide aus PG oder PC.

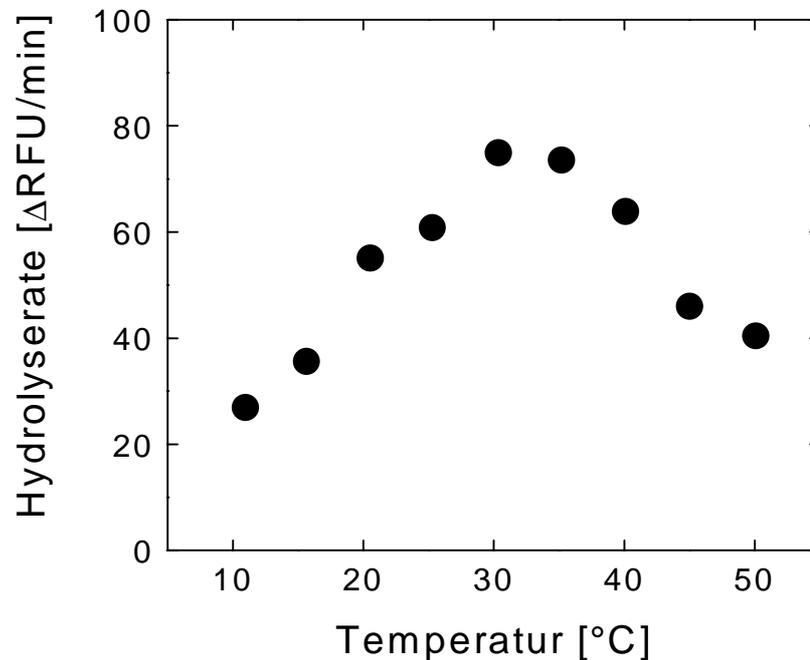


Abbildung 32:

Temperaturabhängigkeit der *Stratum corneum* spezifischen Phospholipase A₂-Aktivität. Als Substrat wurde NBD-C₆-PC (25 µg/ml) verwendet. Die Proteinkonzentration des *Stratum corneum*-Extraktes betrug 1,6 mg/ml. Experimentelle Bedingungen in Kapitel 4.

Um die Enzymaktivität genauer zu charakterisieren, haben wir ein fluoreszenzmarkiertes Phosphatidylcholin als Substrat eingesetzt. Dieses war in der *sn*-2 Position mit dem Fluorophor NBD markiert (Abb. 31). Die Abspaltung des Fluorophors NBD-C₆ bewirkte einen Anstieg in der Fluoreszenzintensität. Zwischen 0 und 5 nmol NBD-C₆ bestand eine lineare Korrelation zwischen der Fluoreszenzintensität und der Konzentration des NBD-C₆ (Abb. 33).

5.6. Die Phospholipase A₂-Aktivität des nativen *Stratum corneum*s

Mit dem Substrat NBD-C₆-PC (Abb. 31) haben wir erstmals die Temperaturabhängigkeit der PL A₂-Aktivität des SC-Extraktes charakterisiert (Abb. 32). Die Hydrolyserate weist zwischen 30 °C und 35 °C ein Maximum auf. Dieses ist die Temperatur auf der Hautoberfläche, so daß das Enzym im *Stratum corneum* im Temperaturoptimum aktiv ist.

Tabelle 5:

Einfluß verschiedener Faktoren auf die PL A₂-Aktivität des humanen plantaren *Stratum corneum* Extraktes. Als Substrat diente NBD-C₆-PC (25 µg/ml). Die Proteinkonzentration betrug 1,6 mg/ml). Experimentelle Bedingungen in Kapitel 4.

Zusatz	Hydrolyserate
ohne	100 %
0,2 mM Natriumdeoxycholat	121 %
2 mM Natriumdeoxycholat	244 %
20 mM CaCl ₂	150 %
20 mM EDTA	55 %
20 mM CuSO ₄	22 %

Eine Besonderheit aller PL A₂-Aktivitäten ist die Präferenz für Substrataggregate ⁽⁵⁾. Einzelne gelöste Substratmoleküle werden schlecht hydrolysiert, während Lipide in Monoschichten, in Mizellen oder Liposomen gute Substrate bilden. Die PL A₂-Aktivität des humanen plantaren *Stratum corneum* steigt an, wenn die Substrate in mizellarer Form angeboten werden (Tab. 5). Wird Natriumdeoxycholat unterhalb der kritischen mizellaren Konzentration (CMC: 2 - 6 mM) ⁽¹³¹⁾ zugesetzt, so verändert sich die Hydrolyserate nicht. Liegt die Konzentration im Bereich der CMC, so erhöht sich die Hydrolyserate um das 2,5fache. Dieser Befund bestätigt daß NBD-C₆-PC durch eine *Stratum corneum* spezifische PL A₂-Aktivität und nicht durch unspezifische Esterasen gespalten wird ^(71,125). Die Aktivität der Esterasen ist im allgemeinen unabhängig von der CMC ⁽⁵⁾. Eine Steigerung der von uns untersuchten PL A₂-Aktivität findet auch durch die Zugabe von Ca²⁺-Ionen statt, während EDTA und Cu²⁺-Ionen hemmend wirken (Tabelle 5).

Wir haben erstmals Untersuchungen zur Substratspezifität der PL A₂-Aktivität durchgeführt. Abb. 33 zeigt, daß die Hydrolyserate mit der Substratkonzentration ansteigt und ein Plateauwert erreicht. Eine Analyse der Meßwerte nach Michaelis-Menten ist aber nicht möglich, da die Substratmoleküle stark hydrophob sind und in den eingesetzten Konzentrationen in wäßriger Lösung als Aggregate vorliegen. Das zeigt folgende Abschätzung: die CMC von DMPC beträgt $4,6 \cdot 10^{-10} \text{ M}$ ⁽¹⁷⁰⁾. Das 1-

Palmitoyl-2-hexanoyl-*sn*-glycero-3-phosphocholin, das dem NBD-C₆-PC ohne Fluorophor entspricht, weist eine CMC von $2,2 \cdot 10^{-7}$ M auf ⁽¹¹⁹⁾. Da NBD lipophil ist, ist die CMC vermutlich ähnlich der des DMPC, also im Bereich von $1 \cdot 10^{-10}$ M (77,2 pg/ml).

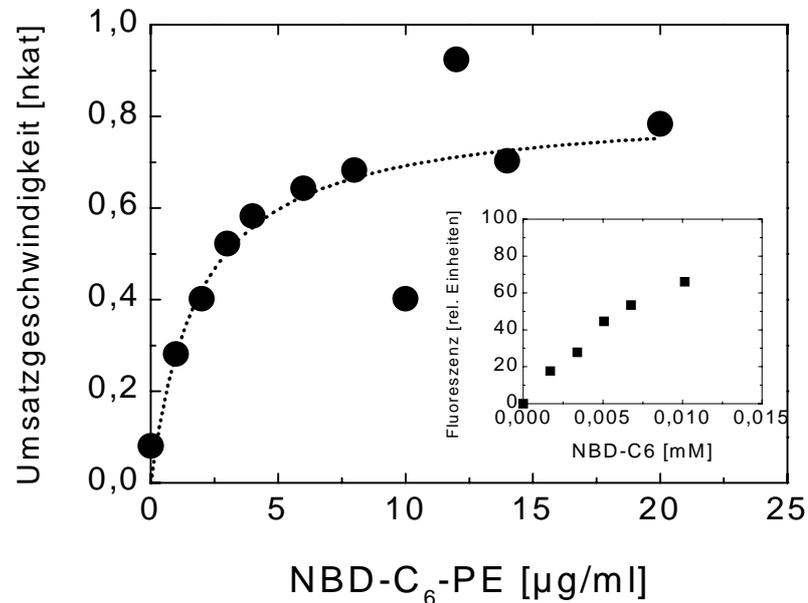


Abbildung 33:

Einfluß der NBD-C₆-PE Konzentration auf die Umsatzgeschwindigkeit. Mit steigender Konzentration nimmt die Umsatzgeschwindigkeit zu und erreicht dann einen konstanten Wert. Jeder Punkt repräsentiert den Mittelwert aus 3 Einzelmessungen bei 35 °C. Die Proteinkonzentration des SC-Extraktes betrug 0,25 mg/ml. **Einsatz:** Zwischen 0 und 5 nmol besteht eine lineare Korrelation zwischen der Fluoreszenzintensität und der Konzentration des Hydrolyseproduktes NBD-C₆. Experimentelle Bedingungen in Kapitel 4.

Der Einsatz verschiedener Substrate erlaubt aber die Bestimmung der apparenten Michaelis-Menten Konstante ($K_{m(app)}$) und der unter diesen experimentellen Bedingungen vorhandenen Umsatzgeschwindigkeit ($V_{max(app)}$). Dazu wurden ein Phosphatidylethanolamin-, ein Phosphatidsäure-, ein Phosphatidylcholin-, ein Phosphatidylglycerol- und ein Phosphatidylserin-Derivat verwendet, die alle in der *sn*-2 Position mit NBD markiert waren. Tabelle 6 zeigt, daß das Phosphatidylethanolamin (NBD-C₆-PE) und das -cholin (NBD-C₆-PC) mit einer apparenten Geschwindigkeit von 0,8 nkat umgesetzt werden. Die ($K_{m(app)}$) ist sehr niedrig und beträgt $3,3 \mu\text{M}$ bzw. $2,7 \mu\text{M}$. Das Phosphatidylglycerolderivat wird schlechter umgesetzt ($K_{m(app)} = 2,3 \mu\text{M}$). Das NBD-C₆-PA und das NBD-C₆-PS werden nicht umgesetzt.

5.6. Die Phospholipase A₂-Aktivität des nativen *Stratum corneums*

Tabelle 6:

Apparente enzymkinetische Parameter der Phospholipase A₂ Aktivität des humanen *Stratum corneums*. Experimentelle Bedingungen in Kapitel 4 und Abb. 33.

Lipid	V _{max(app)} (nkat)	K _{m(app)} (μM)	χ ²
NBD-C ₆ -PE	0,82 ± 0,1	3,31 ± 1,69	0,015
NBD-C ₆ -PA	nicht meßbar	nicht meßbar	
NBD-C ₆ -PC	0,87 ± 0,13	2,75 ± 1,78	0,02
NBD-C ₆ -PG	2,33 ± 0,33	18,0 ± 4,93	0,009
NBD-C ₆ -PS	nicht meßbar	nicht meßbar	

Diese Befunde decken sich mit den Untersuchungen an Liposomen (Abb. 30). Werden die Substrate in liposomaler Form angeboten, so ist PC und PG ein Substrat der PL A₂ des humanen epidermalen *Stratum corneums*, während PS keiner Hydrolyse unterliegt.

Aus unseren enzymatischen Untersuchungen muß geschlossen werden, daß topisch applizierte Lipide, die in das *Stratum corneums* eindringen, einer bedingten Hydrolyse unterliegen. Insbesondere fluides Diacylphosphatidylcholin, das gut in das SC penetriert und dort Störungen verursacht, unterliegt einer Hydrolyse. Durch die Hydrolyse entstehen freie Fettsäuren. Diese entfalten detergenzartige Wirkung und können die Barriereeigenschaft des *Stratum corneums* zusätzlich stören. Die Folge ist eine erleichterte Penetration weiterer Lipide und koapplizierter Substanzen. Daß topisch applizierte freie Fettsäuren Störungen im *Stratum corneum* auslösen und eine erleichterte Penetration von Wirkstoffen bewirken, zeigten Tanojo und Mitarbeiter^(180,181).

Dafür, daß topisch applizierte Lipide einer Hydrolyse im *Stratum corneum* unterliegen und die freigesetzten Fettsäuren die Struktur der Barriere stören, gibt es bisher nur indirekte Befunde. Bouwstra und Mitarbeiter^(28,79) berichteten, daß die topische Applikation von Liposomen aus Soja-Lipiden (Nat 106) mit einem hohen Gehalt an Diacylphosphatidylcholin (85 % PC, 10 % PE, 5 % PA), das einer enzymatischen Hydrolyse unterliegen kann, die Bildung von Vakuolen im *Stratum corneum* zur Folge hat. Topische Applikation von Lipidmischungen mit einem geringeren Gehalt an Diacylphosphatidylcholin (Nat 50: 28 % PC, 2 % PE, 11 % PI und PA, 32 % N-acyl-PE, 12 % Stearin, 32 % Öle) führte zu keiner Vakuolenbildung und zu geringeren Störungen im *Stratum corneum*.

5.6.1. Zusammenfassung

Im epidermalen *Stratum corneum* kommt eine Phospholipase A₂-Aktivität vor. Das Temperaturoptimum liegt zwischen 30 und 35 °C. Substrate sind fluide Lipide mit einer PC-, PE- oder PG-Kopfgruppe, die in liposomaler oder mizellarer Form vorliegen können. Durch die PL A₂-Aktivität kommt es zu einer Zunahme freier Fettsäuren in den untersuchten Vesikelsuspensionen.

Phosphatidylserin, Phosphatidsäure und Lipide unterhalb der Kettenschmelztemperatur werden nicht hydrolysiert.

Die Enzymaktivität wird durch Ca²⁺-Ionen erhöht und durch EDTA und Cu²⁺-Ionen gehemmt.

5.7. Schlußfolgerung und Ausblick

Ziel der Arbeit ist es, einen Beitrag zum Verständnis der komplexen Vorgänge zu leisten, die zwischen topisch applizierten Lipiden und dem *Stratum corneum* stattfinden. Da liposomale Lipide in Abhängigkeit von ihrer Zusammensetzung unterschiedlich mit den Lipiden des *Stratum corneums* wechselwirken, ergeben sich verschiedene potentielle Einsatzmöglichkeiten. Durch Verwendung verschiedener liposomaler Suspensionen läßt sich die Barrierefunktion des SC unterstützen oder umgehen. Topisch applizierte liposomale Träger können dazu auf 3 verschiedene Funktionen optimiert sein: auf die Unterstützung der epidermalen Barriere, auf die Penetration durch die epidermale Barriere oder Penetration in das *Stratum corneum*.

5.7.1. Unterstützung der epidermalen Barriere

Topisch applizierte Träger können darauf optimiert werden, auf der obersten Schicht des *Stratum corneums* zu verbleiben und somit eine zusätzliche **Schutzschicht** zu bilden. Insbesondere in Kombination mit Sonnenschutzfaktoren können dadurch tiefere *Stratum corneum* und Epidermisschichten vor den Folgen einer intensiven UV-Strahlung (z. B. Oxidation der Lipide, Kapitel 3.5) geschützt werden. Als lipophiles Antioxidanz bietet sich z. B. das α -Tocopherol an. Dabei ist zu berücksichtigen, daß α -Tocopherol in hohen Konzentrationen die UV-vermittelte Oxidation fördert⁽¹⁹⁰⁾. Es ist nicht sinnvoll Substanzen einzusetzen, die die Bildung von Singulett-Sauerstoff reduzieren, da dieser bei der strahlungsinduzierten Lipidperoxidation keine Rolle spielt.

Topische applizierte liposomale Träger, die auf der Oberfläche eine Schutzschicht bilden sollen, müssen relativ groß sein (> 200 nm) und eine geringe Membranflexibilität besitzen, um nicht in Spalten, Poren oder Defekte des *Stratum corneums*^(121,163) einzudringen. Es sollten gesättigte Lipide eingesetzt werden, die selbst nur einer geringen UV-vermittelten Oxidation unterliegen. Wenn die Träger aus Lipiden bestehen, die eine starke Fusionsfähigkeit mit den Lipiden des *Stratum corneums* aufweisen, wie z. B. PS oder PE/CHEMS-Gemische (Abb. 15), ist ein Verbleib auf der Oberfläche des *Stratum corneums* gesichert. Es ist zu vermuten, daß auch kationische Lipide auf der *Stratum corneum* Oberfläche verbleiben, da sie mit

den im *Stratum corneum* vorhandenen anionischen Lipiden (Cholesterolsulfat, freie Fettsäuren) eine starke Wechselwirkung aufweisen sollten.

5.7.2. Penetration durch die epidermalen Barriere

Topisch applizierte Liposomen können auch auf eine möglichst schnelle und vollständige Penetration durch das *Stratum corneum* in die lebenden Schichten der Epidermis optimiert werden. Dadurch ist es möglich, therapeutische Wirkstoffe in den Organismus zu transportieren. Die Träger sollten entweder möglichst klein sein (20 -30 nm) oder eine sehr flexible Membran besitzen. Entscheidend ist, daß sie keine, oder nur eine geringe Wechselwirkung mit den Lipiden des *Stratum corneums* aufweisen. Für die Entwicklung solcher Träger eignet sich das Diacylphosphatidylcholin, das keine Wechselwirkung mit den SCV aufweist (Abb. 15). Um eine mögliche Wechselwirkung der Träger mit dem *Stratum corneum* zu charakterisieren, ist der Einsatz von *Stratum corneum* Vesikeln sinnvoll.

Eine hohe Penetration weisen z. B. die lipidbeschichteten Öltröpfchen ⁽⁹⁾ und die von Cevc und Mitarbeitern ⁽³⁵⁾ entwickelten Lipid/Tensid-Vesikel auf. Während erstere für den Transport lipophiler Substanzen geeignet sind, erlauben die letzteren sowohl den Transport von hydrophilen ^(37,39,141) als auch lipophilen ^(34,142) Substanzen durch das SC. Alle liposomalen bzw. lipidhaltigen Träger und die koapplizierten Wirkstoffe unterliegen während der Penetration einer enzymatischen Hydrolyse (Kapitel 5.6). Die im *Stratum corneum* vorhanden Lipasen können die Zusammensetzung der penetrierenden Liposomen verändern und die ebenfalls vorhandenen Proteinasen ^(49,51,64,93,108,175,199) können koapplizierte oder verkapselte Wirkstoffe (Peptide) abbauen. Das Ausmaß der Hydrolyse wird wesentlich von der Penetrationsgeschwindigkeit der Träger durch das *Stratum corneum* bestimmt. Zusätzlich können die Trägerlipide einer Oxidation unterliegen. Die Oxidationsprodukte (z. B. MDA, Hydroxynonenal) wirken zytotoxisch ⁽⁷³⁾.

Um die Penetration lipidhaltiger Träger (Liposomen) durch das *Stratum corneum* zu verbessern, muß geklärt werden, welchen Einfluß die Hydrolasen auf den Wirkstofftransport und die Wirkstoffzusammensetzung haben. Es muß geklärt werden, ob sich der Wirkstofftransport deutlich erhöht, wenn Lipide eingesetzt werden, die nicht hydrolysiert werden können oder die Hydrolasen des *Stratum corneums* gehemmt werden. Auch die koapplizierten Wirkstoffe unterliegen einer

Veränderung ^(4,151). Der Einsatz von Hemmstoffen könnte einen ungestörten Transport durch das *Stratum corneum* fördern.

5.7.3. Penetration in das *Stratum corneum*

Topisch applizierte Träger können auch auf eine Penetration in das *Stratum corneum* und den Verbleib in diesem optimiert werden. Dazu eignen sich Lipidgemische, die mit den *Stratum corneum* Lipiden in Anwesenheit von Kalzium fusionieren (z. B. Vesikel aus Diacylphosphatidylcholin und CHEMS, Kapitel 5.2.4). Da die Kalziumkonzentration an der Grenze zwischen dem *Stratum granulosum* und dem *Stratum corneum* stark ansteigt, aggregieren und fusionieren solche Vesikel dort. Diese Lipidgemische penetrieren nicht in tiefere Hautschichten ⁽⁹⁰⁾.

In weiteren Studien sollte geklärt werden, ob sich mit solchen Trägern Enzyme im *Stratum corneum* aktivieren oder inaktivieren lassen. Dadurch läßt sich die Abschilferung der Hornschuppen (Desquamation) beeinflussen und bietet somit eine neuartige Möglichkeit, dermale Verhornungsstörungen zu behandeln. Studien von Zettersten und Mitarbeiter ⁽²¹⁴⁾ zeigten, daß dieser Ansatz möglich ist. Die topische Applikation von Cholesterolsulfat stört die normale Desquamation. Es kommt zu einer Verdickung der Hornschicht, da Cholesterolsulfat die Proteinase hemmt, die die Desquamation steuern ⁽¹⁶¹⁾. Würde man im Gegensatz dazu Substanzen applizieren, die die Proteinase aktivieren, käme es zu einer beschleunigten Desquamation. Dieser Ansatz könnte bei der Behandlung der X-chromosomalen rezessiven Ichthyose (RXLI) hilfreich sein.

6. Verzeichnis der Abkürzungen

AMD	automatische Mehrfachentwicklung (automated multiple development)
CHEMS	Cholesterolemhemisuccinat
CMC	kritische mizellare Konzentration (critical micellar concentration)
<i>c</i> -UCA	<i>cis</i> -Urokaninsäure
DMPC	Dimyristoylphosphatidylcholin
DPPC	Dipalmitoylphosphatidylcholin
DPPE	Dipalmitoylphosphatidylethanolamin
DSPC	Distearoylphosphatidylcholin
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
EGF	epidermaler Wachstumsfaktor (epidermal growth factor)
FT-IR	Fouriertransformierte Infrarotspektroskopie
HMG-CoA	β -Hydroxy-methyl-glutaryl-CoA
HPLC	Hochleistungsflüssigkeits-Chromatographie (high-performance liquid-chromatography)
HPTLC	Hochleistungs-Dünnschichtchromatographie (high-performance thin-layer chromatography)
hSCL	humane <i>Stratum corneum</i> Lipide
LH	ungesättigte Lipide
$L\sigma$	Alkylradikal
LOO σ	Peroxyradikal
LOOH	Lipidhydroperoxyd
LDL	Low density lipoprotein
MDA	Malondialdehyd
NBD-C ₆ -PC	2-(6-(7-Nitrobenz-2-oxa-1,3-diazol-4-yl)aminohexanoyl-1-hexadecanoyl- <i>sn</i> -glycero-3-phosphocholin
NMR	Kernresonanzspektroskopie (nuclear magnetic resonance)
O ₂ ⁻	Superoxidanion
PA	Diacylphosphatidsäure
PBS	physiologische Kochsalzlösung, (phosphate buffered saline)
PC	Diacylphosphatidylcholin
PE	Diacylphosphatidylethanolamin
PG	Diacylphosphatidylglycerol
PL A ₁	Phospholipase A ₁
PL A ₂	Phospholipase A ₂
PS	Diacylphosphatidylserin
ReHE	rekonstituierte humane Epidermis
R ₁₈	Octadecylrhodamin B chlorid
Rho-PE	1,2-Dipalmitoyl- <i>sn</i> -glycero-3-phosphoethanolamin-N-Rhodamin
SC	<i>Stratum corneum</i>
SCV	humane <i>Stratum corneum</i> Vesikel
SDS	Natriumdodecylsulfat
SPT	Serin-Palmitoyl-Transferase
TBARS	thiobarbituresäure-reaktive Substanzen
TEWL	transepidermaler Wasserverlust (transepidermal water loss)
<i>t</i> -UCA	<i>trans</i> -Urokaninsäure

7. Verzeichnis der Abbildungen und Tabellen

ABBILDUNG 1:	8
ABBILDUNG 2:	10
ABBILDUNG 3:	14
ABBILDUNG 4:	21
ABBILDUNG 5:	24
ABBILDUNG 6:	25
ABBILDUNG 7:	37
ABBILDUNG 8:	41
ABBILDUNG 9:	42
ABBILDUNG 10:	43
ABBILDUNG 11:	44
ABBILDUNG 12:	46
ABBILDUNG 13:	47
ABBILDUNG 14:	49
ABBILDUNG 15:	50
ABBILDUNG 16:	52
ABBILDUNG 17:	53
ABBILDUNG 18:	54
ABBILDUNG 19:	55
ABBILDUNG 20:	56
ABBILDUNG 21:	58
ABBILDUNG 22:	59
ABBILDUNG 23:	60
ABBILDUNG 24:	61
ABBILDUNG 25:	62
ABBILDUNG 26:	66
ABBILDUNG 27:	67
ABBILDUNG 28:	68
ABBILDUNG 29:	70
ABBILDUNG 30:	72
ABBILDUNG 31:	72
ABBILDUNG 32:	73
ABBILDUNG 33:	75
TABELLE 1:	13
TABELLE 2:	29
TABELLE 3:	38
TABELLE 4:	69
TABELLE 5:	74
TABELLE 6:	76

8. Literatur

1. Abraham, W. and Downing, D.T. Lamellar structures formed by stratum corneum lipids in vitro: a deuterium nuclear magnetic resonance (NMR) study. *Pharm.Res.* 9:1415-1421, 1992.
2. Abraham, W., Wertz, P.W. and Downing, D.T. Effect of epidermal acylglucosylceramides and acylceramides on the morphology of liposomes prepared from stratum corneum lipids. *Biochim.Biophys.Acta* 939:408-1988.
3. Abraham, W., Wertz, P.W., Landmann, L. and Downing, D.T. Stratum corneum lipid liposomes: calcium induced transformation into lamellar sheets. *J.Invest.Dermatol.* 88:212-214, 1987.
4. Ahmed, S., Imai, T. and Otagiri, M. Stereoselective hydrolysis and penetration of propranolol prodrugs: In vitro evaluation using hairless mouse skin. *J.Pharm.Sci.* 84:877-883, 1995.
5. Arthur, G. and Choy, P.C. Phospholipases. In: *A studies of enzymes*, edited by Kuby, S.A. CRC Press, 1991, p. 540-562.
6. Artmann, C., Röding, J., Ghyczy, M. and Pratzel, H.G. Liposomes from soya phospholipids as percutaneous drug carriers. *Arzneimittel-Forschung* 40:1363-1371, 1990.
7. Barry, B.W. and Williams, A.C. Terpenes as skin penetration enhancers. 95-111, 1993.
8. Bartnik, F.G., Pittermann, W.F., Mendorf, N., Tillman, U. and Künstler, K. Skin organ culture for the study of skin irritancy. *Toxic.in Vitro* 4:293-301, 1990.
9. Baschong, W., Hüglin, D. and Röding, J. D-panthenol loaded NanotopesTM providing enhanced anti-inflammatory efficacy - A study on human volunteers. *SÖWF-Journal* 125:18-20, 1999.
10. Bayerl, C., Taake, S., Moll, J. and Jung, E.G. Characterization of sunburn cells after exposure to ultraviolet light. *Photodermatol.Photoimmunol.Photomed.* 11:149-154, 1995.
11. Beissert, S. and Granstein, R.D. UV-induced cutaneous photobiology. *Critical Reviews in Biochemistry and Molecular Biology* 31:381-404, 1995.
12. Bentz, J. and Ellens, H. Membrane fusion: kinetics and mechanisms. *Colloids and Surfaces* 30:65-112, 1988.
13. Bernerd, F. and Asselineau, D. Successive alteration and recovery of epidermal differentiation and morphogenesis after specific UVB-damages in skin reconstructed in vitro. *Developmental Biology* 183:123-138, 1997.
14. Biard, D.S.F., Saintiguy, Y., Maratrat, M., et al. Differential expression of the HS Kin17 protein during differentiation of in vitro reconstructed human skin. *Arch.Dermatol.Res.* 289:448-456, 1997.
15. Blume, A., Jansen, M., Ghyczy, M. and Gareiss, J. Interaction of phospholipid liposomes with lipid model mixtures for stratum corneum lipids. *Int.J.Pharm.* 99:219-228, 1993.
16. Bonté, F., Pinguet, P., Chevalier, J.M. and Meybeck, A. Analysis of all stratum corneum lipids by automated multiple development high-performance thin-layer chromatography. *J.Chromatogr.B* 664:311-316, 1995.
17. Bonté, F., Saunois, A., Pinguet, P. and Meybeck, A. Existence of a lipid gradient in the upper stratum corneum and its possible biological significance. *Arch.Dermatol.Res.* 289:78-82, 1997.
18. Bose, B. and Chatterjee, S.N. Correlation between UVA-induced changes in microviscosity, permeability and malondialdehyde formation in liposomal membrane. *Photochem.Photobiol.* 28:149-153, 1995.
19. Bouwstra, J.A. The skin barrier, a well-organized membrane. *Colloids and Surfaces* 123:403-413, 1997.
20. Bouwstra, J.A., Cheng, K., Gooris, G.S., Weerheim, A. and Ponc, M. The role of ceramides 1 and 2 in the stratum corneum lipid organization. *Biochim.Biophys.Acta* 1300:177-186, 1996.

21. Bouwstra, J.A., de Vries, M.A., Gooris, G.S., Bras, W., Brussee, J. and Ponec, M. Thermodynamic and structural aspects of the skin barrier. *J.Contr.Rel.* 15:209-220, 1991.
22. Bouwstra, J.A., Gooris, G.S., Cheng, K., Weerheim, A., Bras, W. and Ponec, M. Phase behaviour of isolated skin lipids. *J.Lipid Res.* 37:999-1011, 1996.
23. Bouwstra, J.A., Gooris, G.S., Dubbelaar, F.E., Weerheim, A.M., Ijzerman, A.P. and Ponec, M. Role of ceramide 1 in the molecular organization of the stratum corneum lipids. *J.Lipid Res.* 39:186-196, 1998.
24. Bouwstra, J.A., Gooris, G.S., Salomons-de Vries, M.A., Spek, J.A. and Bras, W. Structure of human stratum-corneum as a function of temperature and hydration - A wide-angle X-ray diffraction study. *Int.J.Pharm.* 84:205-216, 1992.
25. Bouwstra, J.A., Gooris, G.S., van der Speck, J.A. and Bras, W. Strukturele investigations of human stratum corneum by small-angle X-ray scattering. *J.Invest.Dermatol.* 97:1005-1012, 1991.
26. Bouwstra, J.A., Gooris, G.S., Weerheim, A., Kempenaar, J. and Ponec, M. Characterization of stratum corneum structure in reconstructed epidermis by X-ray diffraction. *J.Lipid Res.* 36:496-504, 1995.
27. Bouwstra, J.A., Gooris, G.S. and White, S.H. X-ray analysis of the stratum corneum and its lipids. In: *Mechanisms of transdermal drug delivery*, edited by Potts, R.O. and Guy, R.H. New York: Marcel Dekker, 1997, p. 41-84.
28. Bouwstra, J.A., Hofland, H.E.J., Spies, F., Gooris, G.S. and Junginger, H.E. Changes in the structure of the human stratum corneum induced by liposomes. In: *Liposome Dermatics*, edited by Braun-Falco, O., Korting, H.C. and Maibach, H.I. Berlin: Springer Verlag, 1992, p. 121-136.
29. Bouwstra, J.A., Meuwissen, M., van Hal, D., Hofland, H.E.J. and Junginger, H.E. Transport of model drugs through skin applied in vesicles. *J.Liposome Res.* 6:192-193, 1996.
30. Bowser, P.A. and Gray, G. Sphingomyelinase in pig and human epidermis. *J.Invest.Dermatol.* 70:331-335, 1978.
31. Bruels, W.A.G., Slaper, H., van der Leun, J.C. and Berrens, L. Transmission of human epidermis and stratum corneum as a function of thickness in the ultraviolet and visible wavelengths. *Photochem.Photobiol.* 40:485-494, 1984.
32. Brysk, M., Bell, T., Brysk, H., Selvanayagam, P. and Rajaraman, S. Enzymatic activity of desquamin. *Exp.Cell Res.* 214:22-26, 1994.
33. Cevc, G. Dermal insulin. In: *Frontiers in insulin pharmacology*, edited by Berger, M. and Gries, F.A. Stuttgart: Thieme Verlag, 1993, p. 161-169.
34. Cevc, G. Transfersomes, liposomes and other lipid suspensions on the skin: permeation enhancement, vesicle penetration, and transdermal drug delivery. *Crit.Rev.Ther.Drug Carrier Syst.* 13:257-388, 1996.
35. Cevc, G. and Blume, G. Lipid vesicles penetrate into intact skin owing to the transdermal osmotic gradients and hydration force. *Biochim.Biophys.Acta* 1104:226-232, 1992.
36. Cevc, G., Blume, G., Schätzlein, A., Gebauer, D. and Paul, A. The skin: a pathway for systemic treatment with patches and lipid-based agent carriers. *Advanced Drug Delivery Reviews* 18:349-378, 1996.
37. Cevc, G., Gebauer, D., Stieber, J., Schätzlein, A. and Blume, G. Ultraflexible vesicles, Transfersomes, have on extremely low pore penetration resistance and transport therapeutic amounts of insulin across the intact mammalian skin. *Biochim.Biophys.Acta* 1368:201-215, 1998.
38. Cevc, G. and Marsh, D. *Phospholipid bilayers. Physical principles and models*, New York: Wiley & Sons, 1987.
39. Cevc, G., Schätzlein, A. and Blume, G. Transdermal drug carriers: basic properties, optimization and transfer efficiency in the case of epicutaneously applied peptides. *J.Contr.Rel.* 36:3-16, 1995.

40. Chang, F., Swartzendruber, D.C., Wertz, P.W. and Squier, C.A. Covalently bound lipids in keratinizing epithelia. *Biochim.Biophys.Acta* 1150:98-102, 1993.
41. Chen, Y.L. and Wiedmann, T.S. Human stratum corneum lipids have a distorted orthorhombic packing at the surface of cohesive failure. *J.Invest.Dermatol.* 107:15-19, 1996.
42. Cornwell, P.A., Barry, B.W., Stoddart, C.P. and Bouwstra, J.A. Wide-angle x-ray diffraction of human stratum corneum: Effects of hydration and terpene enhancer treatment. *J.Pharm.Pharmacol.* 46:938-950, 1994.
43. Corsini, E., Sangha, N. and Feldman, S.R. Epidermal stratification reduces the effects of UVB (but not UVA) on keratinocyte cytokine production and cytotoxicity. *Photodermatol.Photoimmunol.Photomed.* 13:147-152, 1997.
44. Craven, B.M. Pseudosymmetry in cholesterol monohydrate. *Acta Crystallographica* B35:1123-1128, 1979.
45. de Leo, V.A., Horlick, H., Hanson, D., Eisinger, M. and Harber, L.C. Ultraviolet radiation induces changes in membrane metabolism of human keratinocytes in culture. *J.Invest.Dermatol.* 83:323-326, 1984.
46. Denda, M., Koyama, J., Hori, J., et al. Age- and sex-dependent change in stratum corneum sphingolipids. *Arch.Dermatol.Res.* 285:415-417, 1993.
47. Doucet, O., Robert, C. and Zastrow, L. Use of serum-free reconstituted epidermis as a skin pharmacological model. *Toxic.in Vitro* 10:305-313, 1996.
48. Downing, D.T., Abraham, W., Wegner, B.K., Willman, K.W. and Marshall, J.L. Partition of sodium dodecyl sulfate into stratum corneum lipid liposomes. *Arch.Dermatol.Res.* 285:151-157, 1993.
49. Egelrud, T. Purification and preliminary characterization of stratum corneum chymotryptic enzyme: a proteinase that may be involved in desquamation. *J.Invest.Dermatol.* 101:200-204, 1993.
50. Egelrud, T. and Lundstrom, A. Intercellular lamellar lipids in plantar stratum corneum. *Acta derm.-venereol.* 71:369-372, 1991.
51. Egelrud, T. and Lundstrom, A. A chymotrypsin-like proteinase that may be involved in desquamation in plantar stratum corneum. *Arch.Dermatol.Res.* 283:108-112, 1991.
52. Elias, P.M. Epidermal lipids, barrier function, and desquamation. *J.Invest.Dermatol.* 80:44s-49s, 1983.
53. Elias, P.M., Cullander, C., Mauro, T., et al. The secretory granular cell: the outermost granular cell as a specialized secretory cell. *J.Invest.Dermatol.* 3:87-100, 1998.
54. Elias, P.M. and Menon, G.K. Structural and lipid biochemical correlates of the epidermal permeability barrier. In: *Advances in Lipid Research*, edited by Elias, P.M. San Diego: Academic Press Inc. 1991, p. 1-26.
55. Elias, P.M., Menon, G.K., Grayson, S. and Brown, B.E. Membrane structural alterations in murine stratum corneum: relationship to the localization of polar lipids and phospholipases. *J.Invest.Dermatol.* 91:3-10, 1988.
56. Elias, P.M., Nau, P., Hanley, K., et al. Formation of the epidermal calcium gradient coincides with key milestones of barrier ontogenesis in the rodent. *J.Invest.Dermatol.* 110:399-404, 1998.
57. Epstein, E.H., Bonifas, J.M., Barber, T.C. and Haynes, M. Cholesterol sulfotransferase of newborn mouse epidermis. *J.Invest.Dermatol.* 83:332-335, 1984.
58. Farrell, A., Uchida, Y., Nagiec, M.M., et al. UVB irradiation up-regulates serine palmitoyltransferase in cultured human keratinocytes. *J.Lipid Res.* 39:2031-2038, 1998.
59. Fartasch, M. and Ponec, M. Improved barrier structure formation in air-exposed human keratinocyte culture systems. *J.Invest.Dermatol.* 102:366-374, 1994.
60. Feingold, K.R. The regulation and role of epidermal lipid synthesis. *Adv.Lipid Res.* 24:56-82, 1991.

61. Feingold, K.R., Brown, B.E., Lear, S.R., Moser, A.H. and Elias, P.M. Effect of essential fatty acid deficiency on cutaneous sterol synthesis. *J.Invest.Dermatol.* 87:588-591, 1986.
62. Feingold, K.R., Mao-Qiang, M., Proksch, E., Menon, G.K., Brown, B.E. and Elias, P.M. The lovastatin-treated rodent: a new model of barrier disruption and epidermal hyperplasia. *J.Invest.Dermatol.* 96:201-209, 1991.
63. Fenske, D.B., Thewald, J.L., Bloom, M. and Kitson, N. Models of stratum corneum intercellular membranes: 2H NMR of macroscopically oriented multilayers. *Biophys.J.* 67:1562-1573, 1994.
64. Freinkel, R.K. and Traczyk, T.N. Lipid composition and acid hydrolase content of lamellar granules of fetal rat epidermis. *J.Invest.Dermatol.* 85:295-298, 1985.
65. Fritsch, P. *Dermatologie*, Berlin, Heidelberg, New York:Springer-Verlag, 1990.
66. Ganesan, M.G., Weiner, N.D., Flynn, G.L. and Ho, N.F.H. Influence of liposomal drug entrapment on percutaneous absorption. *Int.J.Pharm.* 20:139-154, 1984.
67. Gibbs, S., Boelsma, E., Kempenaar, J. and Ponc, M. Temperature-sensitive regulation of epidermal morphogenesis and the expression of cornified envelope precursors by EGF and TGF alpha. *Cell Tissue Res.* 292:107-114, 1998.
68. Gildenast, T. and Lasch, J. Isolation of ceramide fractions from human stratum corneum lipid extracts by high-performance liquid chromatography. *Biochim.Biophys.Acta* 1346:69-74, 1997.
69. Girotti, A.W. Photodynamic lipid peroxidation in biological systems. *Photochem.Photobiol.* 51:497-509, 1990.
70. Golden, G.M., Guzek, D.B., Kennedy, A.H., McKie, J.E. and Potts, R.O. Stratum corneum lipid phase transition and water barrier properties. *Biochemistry* 26:2382-2388, 1987.
71. Grayson, S., Johnson-Winegar, A.G., Wintroub, B.U., Isserhoff, R.R., Epstein, E.H. and Elias, P.M. Lamellar body-enriched fractions from neonatal mice: preparative techniques and partial characterization. *J.Invest.Dermatol.* 85:289-294, 1985.
72. Grubauer, G., Feingold, K.R. and Elias, P.M. Relationship of epidermal lipogenesis to cutaneous barrier function. *J.Lipid Res.* 28:746-752, 1987.
73. Halliwell, B. and Gutteridge, J.M.C. *Free radicals in biology and medicine*, Oxford:Clarendon Press, 1992.
74. Haratake, A., Uchida, Y., Mimura, K., Elias, P.M. and Holleran, W.M. Intrinsically aged epidermis displays diminished UVB-induced alterations in barrier function associated with decreased proliferation. *J.Invest.Dermatol.* 108:319-323, 1997.
75. Harrison, J.E., Groundwater, P.W., Brain, K.R. and Hadgraft, J. Azone induced fluidity in human stratum corneum. A fourier transform infrared spectroscopy investigation using the perdeuterated analogue. *J.Contr.Rel.* 41:283-290, 1996.
76. Hatfield, R.M. and Fung, L.W.M. Molecular properties of a stratum corneum model lipid system: Large unilamellar vesicles. *Biophys.J.* 68:196-207, 1995.
77. Hesse, M., Meier, H. and Zeeh, B. *Spektroskopische Methoden in der organischen Chemie*, Stuttgart:Thieme Verlag, 1995. Ed.5th
78. Hoekstra, D., de Boer, T., Klappe, K. and Wilschut, J. Fluorescence method for measuring the kinetics of fusion between biological membranes. *Biochemistry* 23:5675-5681, 1984.
79. Hofland, H.E.J., Bouwstra, J.A., Bodde, H.E., Spies, F. and Junginger, H.E. Interactions between liposomes and human stratum corneum in vitro: Freeze fracture electron microscopical visualization and small angle X-ray scattering studies. *Br.J.Dermatol.* 132:853-856, 1995.
80. Holleran, W.M., Feingold, K.R., Mao-Qiang, M., Gao, W.N., Lee, J.M. and Elias, P.M. Regulation of epidermal sphingolipid synthesis by permeability barrier function. *J.Lipid Res.* 32:1151-1158, 1991.

81. Holleran, W.M., Tagaki, Y., Menon, G.K., Legler, G., Feingold, K.R. and Elias, P.M. Processing of epidermal glucosylceramides is required for optimal mammalian cutaneous permeability barrier function. *J.Clin.Invest.* 91:1656-1664, 1993.
82. Holleran, W.M., Uchida, Y., Halkier Sorensen, L., et al. Structural and biochemical basis for the UVB-induced alterations in epidermal barrier function. *Photodermatol.Photoimmunol.Photomed.* 13:117-128, 1997.
83. Iizawa, O., Kato, T., Tagami, H., Akamatsu, H. and Niwa, Y. Long-term follow-up study of changes in lipid peroxide levels and the activity of superoxide dismutase, catalase and glutathione peroxidase in mouse skin after acute and chronic UV irradiation. *Arch.Dermatol.Res.* 286:47-52, 1994.
84. Jakobsson-Borin, A., Aberg, F. and Dallner, G. Lipid peroxidation of microsomal and mitochondrial membranes extracted with n-pentane and reconstituted with ubiquinol, dolichol and cholesterol. *Biochim.Biophys.Acta* 1213:159-166, 1994.
85. Janero, D.R. Malondialdehyde and thiobarbituric acid-reactivity as diagnostic indices of lipid peroxidation and peroxidative tissue injury. *Free Rad.Biol.Med.* 9:515-540, 1990.
86. Jin, K., Higaki, Y., Takagi, Y., et al. Analysis of a beta-glucocerebrosidase and ceramidase activities in atopic and aged dry skin. *Acta derm.-venereol.* 74:337-340, 1994.
87. Jones, P.H. Isolation and characterization of human epidermal stem cells. *Clinical Science* 91:141-146, 1996.
88. Kawakubo, Y., Iizuka, M., Matsuo, I. and Ohkido, M. Ultraviolet irradiation enhances arylamine N-acetyltransferase activity in human keratinocytes. *Arch.Dermatol.Res.* 287:341-343, 1995.
89. Kennedy, A.H., Golden, G.M., Guy, R.H., Francoeur, M.L., Mak, V.H.W. and Gay, C.L. Stratum corneum lipids of human epidermal keratinocyte airliquid cultures: implications for barrier function. *Pharm.Res.* 13:1162-1167, 1996.
90. Kirjavainen, M., Urtti, A., Jääskeläinen, I., et al. Interaction of liposomes with human skin in vitro - the influence of lipid composition and structure. *Biochim.Biophys.Acta* 1304:179-189, 1996.
91. Krill, S.L., Knutson, K. and Higuchi, W.I. The stratum corneum lipid thermotropic phase behaviour. *Biochim.Biophys.Acta* 1112:281-286, 1992.
92. Kuempel, D., Swartzendruber, D.C., Squier, C.A. and Wertz, P.W. In vitro reconstitution of stratum corneum lipid lamellae. *Biochim.Biophys.Acta* 1372:135-140, 1998.
93. Kylmäniemi, M., Autio, P. and Oikarinen, A. Influence of aging, localization, glucocorticoids and isotretinoin on matrix metalloproteases 2 (MMP-2) and 9 (MMP-9) in suction blister fluids. *Arch.Dermatol.Res.* 287:434-438, 1995.
94. Lampe, M.A., Burlingame, A.L., Whitney, J., et al. Human stratum corneum lipids: characterization and regional variations. *J.Lipid Res.* 24:120-130, 1983.
95. Lampe, M.A., Williams, M.L. and Elias, P.M. Human epidermal lipids: characterization and modulations during differentiation. *J.Lipid Res.* 24:131-140, 1983.
96. Landmann, L. The epidermal permeability barrier. *Anat.Embryol.* 178:1-13, 1988.
97. Lasch, J. and Bouwstra, J.A. Interactions of external lipids (lipid vesicles) with the skin. *J.Liposome Res.* 5:543-569, 1995.
98. Lasch, J., Schmitt, U., Sternberg, B. and Schubert, R. Human stratum corneum lipid-based liposomes (hSCLLs). *J.Liposome Res.* 4:93-106, 1994.
99. Lasch, J., Schönfelder, U., Walke, M., Zellmer, S. and Beckert, D. Oxidative damage of human skin lipids: dependence of lipid peroxidation on sterol concentration. *Biochim.Biophys.Acta* 1349:171-181, 1997.
100. Lasch, J. and Wohlrab, W. Liposome-bound cortisol: a new approach to cutaneous therapy. *Biomed.Biochim.Acta* 45:1295-1299, 1986.

101. Lasch, J., Zellmer, S., Pfeil, W. and Schubert, R. Interaction of liposomes with the human skin lipid barrier: hSCLLs as model systems - DSC of intact stratum corneum and in situ CLSM of human skin. *J.Liposome Res.* 5:99-108, 1995.
102. Lasch, J., Zellmer, S. and Reissig, D. Do externally applied amphiphilic lipids act as penetration enhancers through the lipid barrier of human skin. *Proceed.Int'l.Symp.Control.Rel.Bioact.Mater.* 26:214, 1999.
103. Lavker, R.M., Gerberick, G.F., Veres, D., Irwin, C.J. and Kaidbey, K.H. Cumulative effects from repeated exposures to suberythemal doses of UVB and UVA in human skin. *J.Am.Acad.Dermatol.* 32:53-62, 1995.
104. Lavrijsen, A.P.M., Bouwstra, J.A., Gooris, G.S., Weerheim, A., Bodde, H.E. and Ponc, M. Reduced skin barrier function parallels abnormal stratum corneum lipid organization in patients with lamellar ichthyosis. *J.Invest.Dermatol.* 105:619-624, 1995.
105. Lavrijsen, A.P.M., Higounenc, J.M., Weerheim, A., et al. Validation of an in vivo extraction method for human stratum corneum ceramides. *Arch.Dermatol.Res.* 495-503, 1994.
106. Lazo, N.D., Meine, J.G. and Downing, D.T. Lipids are covalently attached to rigid corneocyte protein envelopes existing predominantly as β -sheets: A solid-state nuclear magnetic resonance study. *J.Invest.Dermatol.* 105:296-300, 1995.
107. Li, L., Tucker, R.W., Hennings, H. and Yuspa, S.H. Chelation of intracellular Ca^{2+} inhibits murine keratinocyte differentiation in vitro. *J.Cellular Physiol.* 163:105-114, 1995.
108. Li-Stiles, B., Lo, H.H. and Fischer, S.M. Identification and characterization of several forms of phospholipase A_2 in mouse epidermal keratinocytes. *J.Lipid Res.* 39:569-582, 1998.
109. Liu, M., Dhanwada, K.R., Birt, D.F., Hecht, S. and Pelling, J.C. Increase in p53 protein half-life in mouse keratinocytes following UV-B irradiation. *Carcinogenesis* 15:1089-1092, 1994.
110. Long, S.A., Wertz, P.W., Strauss, J.S. and Downing, D.T. Human stratum corneum polar lipids and desquamation. *Arch.Dermatol.Res.* 277:284-287, 1985.
111. Lundstrom, A. and Egelrud, T. Cell shedding from human plantar skin in vitro: evidence that two different types of protein structures are degraded by a chymotrypsin-like enzyme. *Arch.Dermatol.Res.* 282:234-237, 1990.
112. Mak, V.H.W., Cumpstone, M.B., Kennedy, A.H., Harmon, C.S., Guy, R.H. and Potts, R.O. Barrier function of human keratinocyte cultures grown at the air-liquid interface. *J.Invest.Dermatol.* 96:323-327, 1991.
113. Mao-Qiang, M., Elias, P.M. and Feingold, K.R. Fatty acids are required for epidermal permeability barrier function. *J.Clin.Invest.* 92:791-798, 1993.
114. Mao-Qiang, M., Jain, M., Feingold, K.R. and Elias, P.M. Secretory phospholipase A_2 activity is required for permeability barrier homeostasis. *J.Invest.Dermatol.* 106:57-63, 1996.
115. Mattai, J., Froebe, C.L., Rhein, L.D., et al. Prevention of model stratum-corneum lipid phase transitions invitro by cosmetic additives - differential scanning calorimetry, optical microscopy, and water evaporation studies. *J.Soc.Cosmet.Chem.* 44:89-100, 1993.
116. Mauro, T., Grayson, S., Gao, W.N., et al. Barrier recovery is impeded at neutral pH, independent of ionic effects: implications for extracellular lipid processing. *Arch.Dermatol.Res.* 290:215-222, 1998.
117. McAuliffe, D.J. and Blank, I.H. Effects of UVA (320-400 nm) on the barrier characteristics of the skin. *J.Invest.Dermatol.* 96:758-762, 1991.
118. McCord, M., Chabot-Fletcher, M., Breton, J. and Marshall, L.A. Human keratinocytes possess an *sn*-2 acylhydrolase that is biochemically similar to the U937-derived 85-kDa phospholipase A_2 . *J.Invest.Dermatol.* 102:980-986, 1994.
119. McIntosh, T.J. and Magid, A.D. Phospholipid hydration. In: *Phospholipid handbook*, edited by Cevc, G. New York: Marcel Dekker, 1993, p. 553-578.
120. Melnik, B.C. *Biochemie und Pathobiochemie des epidermalen Lipidstoffwechsels*, Stuttgart:Georg Thieme Verlag, 1990. pp. 1-298.

121. Menon, G.K. and Elias, P.M. Morphologic basis for a pore-pathway in mammalian stratum corneum. *Skin Pharmacol.* 10:235-246, 1997.
122. Menon, G.K., Elias, P.M. and Feingold, K.R. Integrity of the permeability barrier is crucial for maintenance of the epidermal calcium gradient. *Br.J.Dermatol.* 130:139-147, 1994.
123. Menon, G.K. and Ghadially, R. Morphology of lipid alterations in the epidermis: a review. *Microscopy Research and Technique* 37:180-192, 1997.
124. Menon, G.K., Grayson, S. and Elias, P.M. Ionic calcium reservoirs in mammalian epidermis: ultrastructural localization by ion-capture cytochemistry. *J.Invest.Dermatol.* 84:508-512, 1985.
125. Menon, G.K., Grayson, S. and Elias, P.M. Cytochemical and biochemical localization of lipase and sphingomyelinase activity in mammalian epidermis. *J.Invest.Dermatol.* 86:591-597, 1986.
126. Mezei, M. and Gualsekham, V. Liposomes- a selective drug delivery system for the topical route of administration. *Life Sci.* 26:1473-1474, 1980.
127. Michel, M., L'Heureux, N., Auger, F.A. and Germain, L. From newborn to adult: phenotypic and functional properties of skin equivalent and human skin as a function of donor age. *J.Cellular Physiol.* 171:179-189, 1997.
128. Moloney, S.J. Effect of exogenous lipids on in vitro transepidermal water loss and percutaneous absorption. *Arch.Dermatol.Res.* 280:67-70, 1988.
129. Moore, D.J., Rerel, M.E. and Mendelsohn, R. Lipid domains and orthorhombic phases in model stratum corneum: evidence from fourier transform infrared spectroscopy studies. *Biochem.Biophys.Res.Comm.* 231:797-801, 1997.
130. Naik, A. and Guy, R.H. Infrared spectroscopic and differential scanning calorimetric investigations of the stratum corneum barrier formation. In: *Mechanisms of transdermal drug delivery*, edited by Potts, R.O. and Guy, R.H. New York: Marcel Dekker, 1997, p. 87-162.
131. New, R.R.C. Preparation of liposomes. In: *Liposomes, a practical approach*, edited by New, R.R.C. Oxford: IRL Press, 1990, p. 33-104.
132. Nieminen, E., Leikola, E., Koljonen, M., Kiistala, U. and Mustakallio, K.K. Quantitative analysis of epidermal lipids by thin-layer chromatography with special reference to seasonal and age variation. *Acta derm.-venereol.* 47:327-338, 1967.
133. Niki, E. and Nakano, M. Estrogens as antioxidants. *Meth.Enzymol.* 186:330-333, 1990.
134. Olivarius, F.d., Wulf, H.C., Crosby, J. and Norval, M. Seasonal variation in urocanic acid isomers in human skin. *Photochem.Photobiol.* 66:119-123, 1997.
135. Olivarius, F.d., Wulf, H.C., Therkildsen, P., Poulsen, T., Crosby, J. and Norval, M. Urocanic acid isomers: relation to body site, pigmentation, stratum corneum thickness and photosensitivity. *Arch.Dermatol.Res.* 289:501-505, 1997.
136. Ongpipattankul, B., Burnette, R.R., Potts, R.O. and Francoeur, M.L. Evidence that oleic acid exists in a separate phase within stratum corneum lipids. *Pharm.Res.* 8:350-354, 1991.
137. Ongpipattankul, B., Francoeur, M.L. and Potts, R.O. Polymorphism in stratum corneum lipids. *Biochim.Biophys.Acta* 1190:115-122, 1994.
138. Öhman, H. and Vahlquist, A. In vitro studies concerning a pH gradient in human stratum corneum and upper epidermis. *Acta derm.-venereol.* 74:375-379, 1994.
139. Parasassi, T., Giusti, A.M., Raimondi, M., Ravagnan, G., Saporita, O. and Gratton, E. Cholesterol protects the phospholipid bilayer from oxidative damage. *Free Rad.Biol.Med.* 19:511-516, 1995.
140. Parrish, J.A., Jaenicke, K.F. and Anderson, R.R. Erythema and melanogenesis action spectra of normal human skin. *Photochem.Photobiol.* 36:187-191, 1982.
141. Paul, A. and Cevc, G. Noninvasive administration of protein antigens: transdermal immunisation with bovine serum albumin in transfersomes. *Vaccine Res.* 4:145-164, 1995.

142. Planas, M.E., Gonzalez, P., Rodriguez, L., Sanchez, S. and Cevc, G. Noninvasive percutaneous induction of topical analgesia by a new type of drug carrier, and prolongation of local pain insensitivity by anesthetic liposomes. *Anesth.Analg.* 75:615-621, 1992.
143. Plewig, G., Jansen, T. and Schürer, N.Y. Das Stratum corneum. *Hautarzt* 48:510-521, 1997.
144. Ponec, M. Reconstruction of human epidermis on de-epidermized dermis: expression of differentiation-specific protein markers and lipid composition. *Toxic.in Vitro* 5:597-606, 1991.
145. Ponec, M. In vitro cultured human skin cells as alternatives to animals for skin irritancy screening. *Int.J.Cosm.Sci.* 14:245-264, 1992.
146. Ponec, M., Gibbs, S., Weerheim, A., Kempenaar, J., Mulder, A. and Mommaas, A.M. Epidermal growth factor and temperature regulate keratinocyte differentiation. *Arch.Dermatol.Res.* 289:317-326, 1997.
147. Ponec, M. and Weerheim, A. Retinoids and lipid changes in keratinozytes. *Meth.Enzymol.* 190:30-41, 1990.
148. Ponec, M., Weerheim, A., Kempenaar, J., Mommaas, A.M. and Nugteren, D.H. Lipid composition of cultured human keratinozytes in relation to their differentiation. *J.Lipid Res.* 29:949-961, 1988.
149. Ponec, M., Weerheim, A., Kempenaar, J., et al. The formation of competent barrier lipids in reconstructed human epidermis requires the presence of vitamine C. *J.Invest.Dermatol.* 109:348-355, 1997.
150. Potts, R.O. Physical characterization of the stratum corneum: the relationship of mechanical and barrier properties to lipid and protein structure. In: *Transdermal drug delivery*, edited by Hadgraft, J. and Guy, R.H. New York: Marcel Dekker, 1989, p. 23-58.
151. Potts, R.O., McNeill, S.C., Desbonnet, C.R. and Wakshull, E. Transdermal drug transport and metabolism. II. The role of competing kinetic events. *Pharm.Res.* 6:119-124, 1989.
152. Proksch, E., Holleran, W.M., Menon, G.K., Elias, P.M. and Feingold, K.R. Barrier function regulates epidermal lipid and DNA synthesis. *Br.J.Dermatol.* 128:473-482, 1993.
153. Punnonen, K., Jansen, C.T., Puntala, A. and Ahotupa, M. Effects of in vitro UVA irradiation and PUVA treatment on membrane fatty acids and activities of antioxidant enzymes in human keratinocytes. *J.Invest.Dermatol.* 96:255-259, 1991.
154. Punnonen, K., Puntala, A., Jansen, C.T. and Ahotupa, M. UVB irradiation induces lipid peroxidation and reduces antioxidant enzyme activities in human keratinocytes in vitro. *Acta derm.-venereol.* 71:239-273, 1991.
155. Raith, K., Zellmer, S., Lasch, J. and Neubert, R. Profiling of human stratum corneum ceramides by liquid chromatography-electrospray mass spectrometry. *Am.J.Mass Spectr.* 1999.
156. Rheinwald, J.G. Methods for clonal growth and serial cultivation of normal human epidermal keratinocytes and mesothelial cells. In: *Cell growth and division. A practical approach*, edited by Baserga, R. Oxford University Press: IRL Press, 1988, p. 81-94.
157. Riederer, M. Die Kutikula als Barriere zwischen terrestrischen Pflanzen und der Atmosphäre. *Naturwissenschaften* 78:201-208, 1991.
158. Robson, K.J., Steward, M.E., Michelsen, S., Lazo, N.D. and Downing, D.T. 6-Hydroxy-4-sphingenine in human epidermal ceramides. *J.Lipid Res.* 35:2060-2068, 1994.
159. Rogers, J., Harding, C., Mayo, A., Banks, J. and Rawlings, A. Stratum corneum lipids: the effect of ageing and the seasons. *Arch.Dermatol.Res.* 288:765-770, 1996.
160. Rosdy, M., Pisani, A. and Ortonne, J. Production of basement membrane components by a reconstructed epidermis cultured in the absence of serum and dermal factors. *Br.J.Dermatol.* 129:227-234, 1993.
161. Sato, J., Denda, M., Nakanishi, J., Nomura, J. and Koyama, J. Cholesterol sulfate inhibits proteases that are involved in desquamation of stratum corneum. *J.Invest.Dermatol.* 111:189-193, 1998.

162. Schaller, M., Steinle, R. and Korting, H.C. Light and electron microscopic findings in human epidermis reconstructed in vitro upon topical application of liposomal tretinoin. *Acta dermat.-venereol.* 77:122-126, 1977.
163. Schätzlein, A. and Cevc, G. Non-uniform cellular packing of the stratum corneum and permeability barrier function of intact skin: a high-resolution confocal laser scanning microscopy study using highly deformable vesicles (Transfersomes). *Br.J.Dermatol.* 138:583-592, 1998.
164. Schönfelder, U. Der Einfluss von Cholesterol auf die UV-induzierte Peroxidation der Lipide des menschlichen Stratum corneums. Dissertation, *Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg*. 1999.
165. Schönfelder, U., Zellmer, S. and Lasch, J. Lipid peroxidation in human stratum corneum lipid liposomes induced by artificially generated UV radiation and natural sunlight. Dependence on lipid composition. *J.Liposome Res.* 9:115-128, 1999.
166. Schreier, H. and Bouwstra, J.A. Liposomes and niosomes as topical carriers: dermal and transdermal drug delivery. *J.Contr.Rel.* 30:1-15, 1994.
167. Schubert, R., Joos, M., Deicher, M., Magerle, R. and Lasch, J. Destabilization of egg lecithin liposomes on the skin after topical application measured by perturbed gamma-gamma angular correlation spectroscopy (PAC) with ¹¹¹In. *Biochim.Biophys.Acta* 1150:162-164, 1993.
168. Serizawa, S., Osawa, K., Tagshi, K., et al. Relationship between cholesterol sulfate and intercellular cohesion of the stratum corneum: Demonstration using a push-pull meter and an improved high performance thin-layer chromatographic separation system of all major stratum corneum lipids. *J.Invest.Dermatol.* 99:232-236, 1992.
169. Simonetti, O., Hoogstraate, A.J., Bialik, W., et al. Visualization of diffusion pathways across the stratum corneum of native and in-vitro-reconstructed epidermis by confocal laser scanning microscopy. *Arch.Dermatol.Res.* 287:465-473, 1995.
170. Smith and Tanford. *J.Mol.Biol.* 67:75-82, 1972.
171. Smith, L.L. Another cholesterol hypothesis: cholesterol as antioxidant. *Free Rad.Biol.Med.* 11:47-61, 1991.
172. Steinert, P.M. and Marekov, L.N. The proteins elafin, filaggrin, keratin intermediate filaments, loricin, and small proline-rich proteins 1 and 2 are isodipeptide cross-linked components of the human epidermal cornified cell envelope. *J.Biol.Chem.* 270:17702-17711, 1995.
173. Steward, M.E. and Downing, D.T. Free sphingosines of human skin include 6-hydroxysphingosine and unusually long-chain dihydrosphingosines. *J.Invest.Dermatol.* 105:613-618, 1995.
174. Sugioka, K., Shimosegawa, Y. and Nakumo, M. Estrogens as natural antioxidants of membrane phospholipid peroxidation. *FEBS Lett* 210:37-39, 1987.
175. Suzuki, Y., Nomura, J., Koyama, J. and Horii, I. The role of proteases in stratum corneum: involvement in stratum corneum desquamation. *Arch.Dermatol.Res.* 286:249-253, 1994.
176. Swartzendruber, D.C., Wertz, P.W., Kitko, D.J., Madison, K.C. and Downing, D.T. Molecular models of the intercellular lipid lamellae in mammalian stratum corneum. *J.Invest.Dermatol.* 92:251-257, 1989.
177. Swartzendruber, D.C., Wertz, P.W., Madison, K.C. and Downing, D.T. Evidence that the corneocyte has a chemically bound lipid envelope. *J.Invest.Dermatol.* 88:709-713, 1987.
178. Szebeni, J. and Toth, K. Lipid peroxidation in hemoglobin-containing liposomes: Effects of membrane phospholipid composition and cholesterol content. *Biochim.Biophys.Acta* 857:139-145, 1986.
179. Tanojo, H., Bos-van Geest, A.B., Bouwstra, J.A., Junginger, H.E. and Bodde, H.E. In vitro human barrier perturbation by oleic acid: Thermal analysis and freeze fracture electron microscopy studies. *Thermochimica Acta* 293:77-85, 1997.

180. Tanojo, H., Bouwstra, J.A., Junginger, H.E. and Bodde, H.E. In vitro human skin barrier modulation by fatty acids: skin permeation and thermal analysis studies. *Pharm.Res.* 14:42-471997.
181. Tanojo, H., Junginger, H.E. and Bodde, H.E. In vivo human skin permeability enhancement by oleic acid: transepidermal water loss and fourier-transform infrared spectroscopy studies. *J.Contr.Rel.* 47:31-39, 1997.
182. Tennenbaum, T., Adam, L.L., Belanger, J., de Luca, L.M. and Juspa, S.H. Selective changes in laminin adhesion and alpha 6 beta 4 integrin regulation are associated with the initial steps in keratinocyte maturation. *Cell Growth Differ.* 7:615-628, 1996.
183. Thiele, B., Ghyczy, M., Lunow, C., Teichert, H.M. and Wolff, H.H. Influence of phospholipid liposomes (PLL) on UVB-induced erythema formation. *Arch.Dermatol.Res.* 285:428-431, 1993.
184. Thiele, J.J., Traber, M.G. and Packer, L. Depletion of human stratum corneum vitamin E: an early and sensitive in vivo marker of UV induced photo-oxidation. *J.Invest.Dermatol.* 110:756-761, 1998.
185. Thiele, J.J., Traber, M.G., Re, R., et al. Macromolecular carbonyls in human stratum corneum: a biomarker for environmental oxidant exposure? *FEBS Lett* 422:403-406, 1998.
186. Thiele, J.J., Traber, M.G., Tsang, K., Cross, C.E. and Packer, L. In vivo exposure to ozone depletes vitamins C and E and induces lipid peroxidation in epidermal layers of murine skin. *Free Rad.Biol.Med.* 23:385-391, 1997.
187. van Duijn, G., Verkleij, A.J. and de Kruijff, B. Influence of phospholipid peroxidation on the phase behaviour of phosphatidylcholine and phosphatidylethanolamine in aqueous dispersions. *Biochemistry* 23:4969-4977, 1984.
188. Van Duzee, B.F. Thermal analysis of human stratum corneum. *J.Invest.Dermatol.* 65:404-408, 1975.
189. Vicanova, J., Mommaas, A.M., Mulder, A., Koerten, H.K. and Ponc, M. Impaired desquamation in the in vitro reconstructed human epidermis. *Cell and Tissue Research* 286:115-122, 1996.
190. Walke, M., Beckert, D. and Lasch, J. Interaction of UV light-induced α -tocopherol radicals with lipids detected by an electron spin resonance prooxidation effect. *Photochem.Photobiol.* 68:502-510, 1998.
191. Warner, R.R., Bush, R.D. and Ruebusch, N.A. Corneocytes undergo systematic changes in element concentrations across the human inner stratum corneum. *J.Invest.Dermatol.* 104:530-536, 1995.
192. Watt, F.M. Epidermal stem cells: markers, patterning and the control of stem cell fate. *Philosophical Transactions of the Royal Society London* 353:831-837, 1998.
193. Wefers, H., Melnik, B.C., Flür, M., Bluhm, C., Lehmann, P. and Plewig, G. Influence of UV irradiation on the composition of human stratum corneum lipids. *J.Invest.Dermatol.* 96:959-962, 1991.
194. Wertz, P.W. and Downing, D.T. Hydroxyacid derivatives in human epidermis. *Lipids* 23:415-418, 1988.
195. Wertz, P.W., Miethke, M.C., Long, S.A., Strauss, J.S. and Downing, D.T. The composition of the ceramides from human stratum corneum and from comedones. *J.Invest.Dermatol.* 84:410-412, 1985.
196. Williams, M.L. Lipids in normal and pathological desquamation. 211-262, 1991.
197. Williams, M.L., Menon, G.K. and Hanley, K.P. HMG-CoA reductase inhibitors perturb fatty acid metabolism and induce peroxomes in keratinocytes. *J.Lipid Res.* 33:193-208, 1992.
198. Wood, E.J. and Harris, J.R. Reconstructed human skin: transplant, graft or biological dressing? *Essays in Biochemistry* 29:65-85, 1995.
199. Xie, M. and Low, M.G. Identification and characterization of an ecto(lyso)phosphatidic acid phosphatase in PAM212 keratinocytes. *Arch.Biochem.Biophys.* 312:254-2591994.

200. Yokomizo, Y. Effects of phospholipids on the percutaneous penetration of drugs through the dorsal skin of the guinea pig in vitro. 3. The effects of phospholipids on several drugs having different polarities. *J.Contr.Rel.* 42:217-228, 1996.
201. Yokomizo, Y. and Sagitami, H. Effects of phospholipids on the in vitro percutaneous penetration of prednisolone and analysis of mechanism by using attenuated total reflectance - fourier transform infrared spectroscopy. *J.Pharm.Sci.* 85:1220-1226, 1996.
202. Yosipovitch, G., Xiong, G.L., Haus, E., Sackett-Lundeen, L., Ashkenazi, I. and Maibach, H.I. Time-dependent variations of the skin barrier function in humans: transepidermal water loss, stratum corneum hydration, skin surface pH, and skin temperature. *J.Invest.Dermatol.* 110:20-23, 1998.
203. Zellmer, S. and Cevc, G. Thermolabile liposomes with a high fusion efficacy at 42°C can be made of dipalmitoylphosphatidylcholine/fatty alcohol mixtures in a molar ratio of 1/2. *J.Liposome Res.* 4:1091-1113, 1994.
204. Zellmer, S. and Dammer, H.U. Fluoreszenzspektroskopie in der Lipidmembranforschung. *CLB* 47:13-16, 1996.
205. Zellmer, S., Kaltenborn, G., Rothe, U., Lehnich, H., Lasch, J. and Pauer, H.-D. Quantification of lipids, liposomes, amino acids and proteins by thermal ultra-micro digestion and an ultra-micro coulometric assay, based on the reaction of hypobromite with ammonia. *Anal.Biochem.* 273:163-167, 1999.
206. Zellmer, S., Koelsch, R. and Lasch, J. Extracellular lipases of the plantar human stratum corneum. *Europ.J.Cell Biol.* 72 (S43), 57, 1997.
207. Zellmer, S. and Lasch, J. Analyse eines komplexen Lipidgemisches mit AMD/HPTLC. In: *InCom*, edited by Günther, W., Hempel, V. and Wulff, G. Düsseldorf: InCom-Bureau, 1994, p. 28
208. Zellmer, S. and Lasch, J. Degradation of liposomal lipids by human stratum corneum derived phospholipases. *Biol.Chem.* 377:S192, 1996.
209. Zellmer, S. and Lasch, J. Individual variation of human plantar stratum corneum lipids, determined by automated multiple development of high-performance thin-layer chromatography plates. *J.Chromatogr.B* 691:321-329, 1997.
210. Zellmer, S., Pfeil, W. and Lasch, J. Interaction of phosphatidylcholine liposomes with the human stratum corneum. *Biochim.Biophys.Acta* 1237:176-182, 1995.
211. Zellmer, S., Reissig, D. and Lasch, J. Liposome-skin surface interaction: aggregation, penetration and degradation. *Biol.Chem.* 378 (S129), 1997.
212. Zellmer, S., Reissig, D. and Lasch, J. Reconstructed human skin as model for liposome-skin interaction. *J.Contr.Rel.* 55:271-279, 1998.
213. Zellmer, S., Zimmermann, I., Selle, C., Sternberg, B., Pohle, W. and Lasch, J. Physicochemical characterisation of human stratum corneum lipid liposomes. *Chem.Phys.Lipids* 94:97-108, 1998.
214. Zettersten, E., Man, M.Q., Sato, J., et al. Recessive x-linked ichthyosis: role of cholesterol-sulfate accumulation in the barrier abnormality. *J.Invest.Dermatol.* 111:784-790, 1998.

9. Anhang

- Anhang 1: Zellmer, S. und Lasch, J. Individual variation of human plantar stratum corneum lipids, determined by automated multiple development of high-performance thin-layer chromatography plates. *J.Chromatogr.B* 691:321-329, 1997.
- Anhang 2: Raith, K., Zellmer, S., Lasch, J., und Neubert, R. Profiling of human stratum corneum ceramides by liquid chromatography-electrospray mass spectrometry. *Am.J.Mass Spectr.* (eingereicht), 1999.
- Anhang 3: Zellmer, S., Kaltenborn, G., Rothe, U., Lehnich, H., Lasch, J., and Pauer, H.-D. Quantification of lipids, liposomes, amino acids and proteins by thermal ultra-micro digestion and an ultra-micro coulometric assay, based on the reaction of hypobromite with ammonia. *Anal.Biochem.* 273:163-167, 1999.
- Anhang 4: Zellmer, S., Zimmermann, I., Selle, C., Sternberg, B., Pohle, W., und Lasch, J. Physicochemical characterisation of human stratum corneum lipid liposomes. *Chem.Phys.Lipids* 94(1):97-108, 1998.
- Anhang 5: Lasch, J., Zellmer, S., Pfeil, W., und Schubert, R. Interaction of liposomes with the human skin lipid barrier: hSCLLs as model systems - DSC of intact stratum corneum and in situ CLSM of human skin. *J.Liposome Res.* 5:99-108, 1995.
- Anhang 6: Lasch, J., Schönfelder, U., Walke, M., Zellmer, S., und Beckert, D. Oxidative damage of human skin lipids: dependence of lipid peroxidation on sterol concentration. *Biochim.Biophys.Acta* 1349:171-181, 1997.
- Anhang 7: Schönfelder, U., Zellmer, S., und Lasch, J. Lipid peroxidation in human stratum corneum lipid liposomes induced by artificially generated UV radiation and natural sunlight. Dependence on lipid composition. *J.Liposome Res.* 9(1):115-128, 1999.
- Anhang 8: Zellmer, S., Reissig, D., und Lasch, J. Reconstructed human skin as model for liposome-skin interaction. *J.Contr.Rel.* 55:271-279, 1998.
- Anhang 9: Zellmer, S., Pfeil, W., und Lasch, J. Interaction of phosphatidylcholine liposomes with the human stratum corneum. *Biochim.Biophys.Acta* 1237:176-182, 1995.

Danksagung

Mein Dank gilt all denen, die das Entstehen der Arbeit möglich gemacht haben und mich durch die Höhen und Tiefen des wissenschaftlichen Arbeitens begleiteten.

Das sind Prof. Jürgen Lasch (Institut für Physiologische Chemie der Universität Halle), der die Arbeitsmöglichkeiten schuf, die Freiheit des experimentellen Arbeitens ermöglichte und ein kritischer Diskussionspartner war, sowie Prof. Renate Ulbrich-Hofmann, die den Fortgang dieser Arbeit konstruktiv begleitete.

Mein Dank gilt dem wissenschaftlichen und technischen Personal des Institutes für Physiologische Chemie, ohne die diese Arbeit nicht entstanden wäre. Dazu gehören insbesondere Helga Haberland und Sabine Sommer, die mit großer experimenteller Sorgfalt und Einsatz arbeiteten und ein verbindendes Element in Zeiten wechselnder Laborbesetzung waren.

Frau Dr. Ute Schönfelder danke ich für die gute und produktive Zusammenarbeit auf dem Gebiet der Lipidperoxidation und Herrn Prof. E. Schönbohm (Philipps-Universität Marburg) für die zur Verfügung gestellte Bestrahlungsanlage.

Herrn Dr. Förster und Frau Dr. I. Zimmermann (Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg) danke ich für die Zusammenarbeit auf dem Gebiet der Röntgenstreuung von Lipiden, Herrn Dr. W. Pohle und Herrn Dr. C. Selle (Universität Jena) für die infrarot-spektroskopischen Untersuchungen und Herrn Prof. W. Pfeil (z. Zt. Universität Potsdam) für die kalorimetrischen Messungen.

Prof. D. Reißig (Universität Leipzig) danke ich für den Zugang zu dem 3-dimensionalen Modell der rekonstituierten humanen Epidermis und Frau Wieczorek für die damit verbundenen experimentellen Arbeiten.

Die Einbindung dieser Arbeit in die Thematik des Sonderforschungsbereich 197 war für mich ein großer Gewinn und hat Kontakte und Kooperationen mit anderen Arbeitsgruppen erleichtert.

Diese Arbeit entstand an Abenden und Wochenenden. Es war eine Zeit, in der die Familie ohne mich auskommen mußte. Meiner Frau Iris möchte ich für die Unterstützung, das Verständnis und den Freiraum danken, der diese Arbeit ermöglichte.

Hiermit erkläre ich, daß ich die vorliegende Habilitationsschrift selbständig und ausschließlich mit den angegebenen Quellen bzw. Hilfsmitteln und der zitierten Literatur verfaßt habe. Sämtliche Textstellen, die wörtlich oder inhaltlich aus veröffentlichten oder unveröffentlichten Schriften entnommen wurden, und alle Angaben die auf mündlichen Auskünften beruhen, sind als solche kenntlich gemacht.

Halle, den

Dr. rer. nat. Sebastian Zellmer

LEBENS LAUF

NAME: Dr. rer. nat. Sebastian Zellmer
GEBURTSDATUM: 29.05.1962 in Bad-Nauheim (Hessen)
WOHNORT: Wilhelm-Busch-Str. 14, 06118 Halle

WISSENSCHAFTLICHE AUSBILDUNG:

Universität:

1981-1984 Diplom-Biologie an der Philipps-Universität Marburg
1984-1985 University of Utah, Salt Lake City, U.S.A.
(Schwerpunkte: Biochemie, Photobiologie, Physiologie)
1985-1987 Philipps-Universität Marburg
17.12.1987 Dipl.-Prüfung (Botanik, Mikrobiologie, Biochemie, Physik)
Titel der Diplomarbeit: "Die Bedeutung von Frost-Dunkelperioden auf die Ergrünung von Triticum-Primärblätter im anschließenden Weißlicht"
1988-1992 Klinikum r. d. Isar der Technische Universität München
01.12.1992 Graduierung zum Dr. rer. nat.
Titel der Doktorarbeit: "Liposomen zur Penetration biologischer Barrieren. Die Entwicklung thermolabiler fusionsfähiger Liposomen für die Tumorthherapie und von Transfersomen für den Einsatz an Pflanzen"