

**Die Veränderung der Lipidzusammensetzung in humanem
Stratum corneum nach Induktion eines
Hardening-Phänomens**

Dissertation
zur Erlangung des akademischen Grades
doctor medicinae dentariae (Dr. med. dent.)

vorgelegt dem Rat der Medizinischen Fakultät der
Friedrich-Schiller-Universität Jena

von Christiane Paschold
geboren am 04.05.1979 in Rudolstadt

01.10.2005

Erster Gutachter:

Prof. Elsner, Jena

Zweiter Gutachter:

Prof. Schiele, Jena

Dritter Gutachter:

Prof. John, Osnabrück

Tag der öffentlichen Verteidigung:

06.11.2006

0. Abkürzungsverzeichnis

AMD HPTLC	automated multiple development high performance thin layer liquid chromatography (Hochleistungsdünnschichtchromatographie mit automatisierter Mehrfachentwicklung)
Cer	Ceramid
ESCD	European Society of Contact Dermatitis
fFS	freie Fettsäure
icd	irritant contact dermatitis (irritative Kontaktdermatitis)
KE	Kontaktekzem
nied	no irritant contact dermatitis (keine irritative Kontaktdermatitis)
SC	Stratum corneum
SLS	sodium lauryl sulphate (Natriumlaurylsulfat)
TEWL	transepidermal water loss (transepidermaler Wasserverlust)
VS	visueller Score

Inhaltsverzeichnis

0. Abkürzungsverzeichnis	3
Inhaltsverzeichnis	4
1. Zusammenfassung	6
2. Einleitung	8
2.1. Der Aufbau der menschlichen Haut	8
2.2. Die epidermalen Lipide	9
2.3. Die epidermale Kinetik	14
2.4. Der Aufbau der Permeabilitätsbarriere	15
2.5. Bedeutung der Ceramide für die Barrierefunktion	17
2.6. Das irritative Kontaktekzem	19
2.7. Das Hardening-Phänomen	20
2.8 Zielstellung	23
3. Material und Methoden	25
3.1. Probanden	25
3.2. Chemikalien und Materialien	26
3.2.1. Induktion des irritativen Kontaktekzems	26
3.2.2. Extraktion der SC-Lipide	26
3.2.2. Chemikalien für die AMD HPTLC	26
3.3. Geräte	27
3.3.1. Geräte für hautphysiologische Messungen	27
3.3.2. Geräte zur Lipidanalyse	27
3.4. Methoden	27
3.4.1. Studienablauf	27
3.4.2. Induktion des irritativen Kontaktekzems	28
3.4.3. Reprovokation	30
3.4.4. Lipidgewinnung	30
3.4.5. Klinische Beurteilung und Messungen	31
3.4.6. Analyse der SC –Lipide	33
3.4.7. Software und statistische Methoden	35

4. Ergebnisse	37
4.1 Phase I: Induktion des irritativen Kontaktekzems	37
4.2. Phase II: Reprovokation	41
5. Diskussion	49
5.1. Irritationsphase	49
5. 1.1. TEWL, Chromametrie und VS lassen eine Adaptation der behandelten Hautfelder erkennen	49
5.1.3. Lipidextraktion	50
5.2. Reprovokation	52
5.2.1. Beurteilung irritierter und nicht irritierter Testfelder vor und nach Reprovokation	52
5.2.2. Lipidanalyse an den Tagen 44, 65 und 86	54
5.3. Beeinträchtigung der Ergebnisse und Fehlerquellen	55
5.4. Schlussfolgerung	57
6. Literatur	59
7. Anhang	69
Rohwerte der hautphysiologischen Messungen	69
Lipidanalyse	75
Ehrenwörtliche Erklärung	82
Lebenslauf	83
Danksagung	84

1. Zusammenfassung

Die äußerste Schicht der menschlichen Epidermis ist das Stratum corneum (SC), das durch seinen speziellen Aufbau die Permeabilitätsbarriere des menschlichen Organismus repräsentiert und diesen vor transepidermale Wasserverlust und der Penetration externer Noxen schützt. Die Zellen des SC, die Korneozyten, befinden sich eingebettet in einer einzigartig strukturierten multilamellären Lipidmatrix, hauptsächlich bestehend aus Ceramiden, Cholesterol und freien Fettsäuren (fFS). Den SC-Lipiden, im Besondern den Ceramiden, die eine sehr heterogene Gruppe aus mindestens neun differenzierbaren Klassen repräsentieren, wird die wesentliche Bedeutung für die Funktion der lebenswichtigen Barriere zugeschrieben. Hautkrankheiten, die durch kumulative Einwirkung externer Noxen hervorgerufen werden und mit beeinträchtigter Funktion der Permeabilitätsbarriere assoziiert sind, stellen sehr häufige Krankheitsbilder dar. Große Bedeutung hat hier das irritative Kontaktekzem, dessen Entstehung kausal oft eng mit der beruflichen Tätigkeit der Patienten verbunden ist. Dennoch wird bei einem Großteil von Individuen nach Entwicklung eines Kontaktekzems auf dem Boden einer chemischen Irritation nach Abheilung des Ekzems eine Hyporeaktivität der betroffenen Hautstellen gegenüber den Irritantien beobachtet. Diese Adaptation der Haut wird als Hardening-Phänomen bezeichnet und ist experimentell induzierbar. Als Entstehungstheorie wird die Komposition der SC-Lipide diskutiert. In dieser Arbeit wurde die Zusammensetzung der SC-Lipide vor und nach Induktion eines Hardening Phänomens untersucht. An 23 hautgesunden Probanden wurde in der ersten Studienphase okklusiv mit 0,4%-iger SLS-Lösung über drei Wochen an den Wochentagen ein irritatives Kontaktekzem auf einem Ober- und beiden Unterarmen provoziert und der Effekt mittels visuellem Score (VS), Messung des transepidermalen Wasserverlustes (TEWL) und Chromametrie bewertet. Drei, sechs und neun Wochen (d43, d64 und d85) nach Ende der Irritationsphase wurde je ein irritiertes Testfeld des Oberarmes sowie ein nicht behandeltes Feld des Oberarms der Gegenseite mit 1%-iger SLS-Lösung behandelt. Anhand der Deltawerte des TEWL (vor und nach Reprovokation) beider Seiten erfolgte die Einteilung des Kollektivs in „Hardening“- oder „kein-Hardening-Probanden“. Zur Beurteilung der SC-Lipide wurde an jedem Probanden zu Beginn der Studie eine Lipidextraktion auf unbehandelter Haut des Unterarms mittels Diethylether und Aceton

(1:1) vorgenommen. Hiermit wurden die Anteile der zum Zeitpunkt der Studie möglich separierbaren Ceramide 1-7, Cholesterol und fFS an den SC-Lipiden vor der Irritation bestimmt. Im Verlauf der Studie wurden drei weitere Extraktionen auf den behandelten Unterarmtestfeldern durchgeführt. Jede Auswaschung erfolgte auf dem betreffenden Feld zweimal unmittelbar hintereinander, um mit der ersten Auswaschung die Sebumlipide von der Hautoberfläche zu entfernen. Der Lipidgehalt beider Extrakte wurde analysiert. Während der ersten zwei Wochen der Irritationsphase stiegen die Werte des TEWL, VS sowie der Chromametrie kontinuierlich an, in der dritten Woche gab es einen tendenziellen Rückgang aller Werte, was als Zeichen der Adaptation der Haut an die Irritation gewertet wurde. Nach Reprovokation zeigten an Tag 44 von 22 Probanden 16 ein Hardening Phänomen, an Tag 65 waren es 14 und an Tag 86 konnten 15 Probanden der Hardening-Gruppe zugeordnet werden. Acht Probanden zeigten zu jeder Reprovokation ein Hardening, nur ein Proband zu keinem Zeitpunkt. In der Gruppe der Hardening Probanden gab es an Tag 44 einen signifikanten Anstieg von Cer1 ($p < 0.001$), Cer2 ($p < 0.05$) und Cer4 ($p < 0.01$). Cer5 und Cer6 waren an d44 ($p < 0.05$) und 65 ($p < 0.01$) erhöht, sowie auch Cer7 ($p < 0.01$) an d44 und 65. Cholesterol war zu allen Zeitpunkten erhöht d44 und 86 ($p < 0.001$) und d65 ($p < 0.01$). In der Fraktion der fFS gab es keine signifikanten Veränderungen. Der Proband ohne Hardening zeigte an d44, 65 und 86 im Vergleich zu Tag 1 verminderte Werte für Cer1. Ein statistisch aussagekräftiger Vergleich der Hardening-Gruppe mit dem Probanden ohne Hardening war jedoch nicht möglich. Die Beobachtung, dass zu unterschiedlichen Zeitpunkten der Reprovokation eine verschiedene Zahl von Probanden ein Hardening Phänomen aufwies, kann damit erklärt werden, dass der Zeitpunkt des Einsetzens eines Hardening-Effektes sowie seine Dauer interindividuell verschieden sind. Nur zwei Probanden zeigten nur an d44 und d86 ein Hardening, was möglicherweise auf Fehler in der Durchführung der Irritation oder Messung zurückzuführen ist. Es konnte gezeigt werden, dass es zu Beginn der Phase II in der Hardening-Gruppe einen Anstieg aller Ceramidfraktionen gab und während der gesamten Phase II das Cholesterol erhöht war. Dies unterstreicht die bedeutende Rolle der Ceramide, vor allem des Cer1, und des Cholesterols an der Aufrechterhaltung der Barrierefunktion. Damit ein Vergleich von Hardening-Probanden und den Individuen, die kein Hardening entwickeln, angestellt werden kann, ist jedoch eine größere Gruppe letzterer nötig.

2. Einleitung

2.1. Der Aufbau der menschlichen Haut

Die menschliche Haut umfasst von innen nach außen die drei Schichten Subcutis, Dermis und Epidermis, die im Folgenden kurz beschrieben werden.

Die *Subcutis* besteht aus läppchenartig aufgebautem Fettgewebe. Sie dient der Wärmeisolation des Körpers und schützt tiefer gelegene Strukturen vor dumpfen mechanischen Traumen. Je nach Bedarf kann durch den Fettmetabolismus des Organismus aus dieser Schicht Energie zur Verfügung gestellt oder in Form von neuem Fettgewebe in ihr gespeichert werden

Die *Dermis* wird gebildet von Fibrozyten, die in ein Netz aus Kollagenfasern und elastischen Fasern eingebettet sind. Sie führt die Gefäße und Nerven zur Versorgung der Haut, enthält die Hautanhangsgebilde sowie die Sinnesrezeptoren und gewährleistet ebenfalls Schutz vor mechanischen Krafteinwirkungen. Durch die in ihr enthaltenen Gefäße und Schweißdrüsen wird die Thermoregulation sichergestellt, ihre Sinnesrezeptoren und freien Nervenendigungen machen die Haut zum Kontaktorgan zur Umwelt.

Die *Epidermis* folgt, zapfenartig mit der Dermis verbunden und durch die von Fibrozyten gebildete Basalmembran von ihr abgegrenzt, als äußerste, gefäßlose Schicht. Sie ist ein mehrschichtiges, verhornendes Plattenepithel, das zu etwa 90 Prozent aus Keratinozyten besteht. Weiterhin finden sich hier Melanozyten, durch deren Pigmentbildung der Schutz vor UV- Licht gewährleistet wird sowie Langerhanszellen, die zum immunologischen Schutz beitragen. Die vertikale Ausdehnung der Epidermis schwankt zwischen 30 µm und 4 mm, je nach Hautregion und abhängig von sich verändernden Umweltbedingungen. Histologisch lässt sich sie in vier funktionelle Zellschichten aufteilen: der Basalmembran direkt aufliegend findet man die zylindrischen Zellen, des *Stratum basale*. Darauf folgt nach außen das 2 – 5 Zellen breite *Stratum spinosum*, darüber das 1 – 3 Lagen breite *Stratum granulosum*. Die abschließende Schicht ist das *Stratum corneum* (SC). Als Kontaktfläche zur Umwelt ist

es permanent verschiedenen Reizen mechanischer, chemischer, physikalischer oder thermischer Natur ausgesetzt, denen es nur durch seinen spezifischen Aufbau Widerstand zu leisten vermag. Mechanisch stark beanspruchte Regionen wie die Haut der Hohlhand und der Fußsohle sind stärker verhornt, die Dicke kann bis zu 1,2 mm betragen. Das Stratum corneum verhindert das Eindringen von Mikroorganismen und ist die Schicht der menschlichen Haut, die die wesentlichste Funktion der Haut übernimmt - die Barrierefunktion. Durch seinen speziellen Aufbau verhindert es den Stoffaustausch zwischen Organismus und Umwelt und schützt ihn so vor Exsiccation. Es ermöglicht allerdings einen minimalen Flüssigkeits- und Stoffaustausch, die Perspiratio insensibilis (Fritsch 1990).

2.2. Die epidermalen Lipide

Die am stärksten vertretenen Lipide auf der Hautoberfläche sind die aus den Talgdrüsen stammenden Sebumlipide - unpolare Lipide, die nicht am Aufbau der SC- Barrierschicht beteiligt sind: Squalen, geringe Mengen an Cholesterol, Wachsester, Triglyceride und Fettsäuren (Downing et al. 1991). Die für die Hautbarriere relevanten Lipide befinden sich im SC und stammen aus den lebenden Schichten der Epidermis. Während sich hier reichlich polare Lipide wie Phospholipide und Glykolipide (Glycosylceramide und Acylglycosylceramide) befinden, kommen im SC hauptsächlich Ceramide, Cholesterol und freie Fettsäuren vor (Wertz 1992). Die Lipidextraktion von humanem SC mit Chloroform und Methanol ergibt einen Lipidanteil von 14,7% Trockengewicht (Wertz und Downing 1987). Kovalent gebundene Lipide machen zwischen 1,4 und 2,4% des Trockengewichts des SC aus (Wertz et al. 1989, Swartzendruber et al. 1987, Chang et al. 1993). Angaben in der Literatur zur Verteilung der Lipidfraktionen im SC schwanken relativ stark, die größte Fraktion an extrahierbaren Lipiden im SC sind die Ceramide mit 40-60 % des Gesamtgewichts der Lipide, gefolgt von Cholesterol (25-30%) und freien Fettsäuren (10-25%) (Abraham et al. 1987, Wertz et al. 1987b, Norlen et al. 1999, Wertz 2000). Die Relationen der einzelnen Lipidspezies variieren außerdem innerhalb des SC. Die höchste Konzentration an freien Fettsäuren findet sich in den äußeren Schichten, die

Konzentration an Cholesterol und Ceramiden ist hier am geringsten (Weerheim und Ponc 2001).

2.2.1. Ceramide

Sie gehören zu den Sphingolipiden und stellen eine strukturell sehr heterogene Gruppe dar. Gemeinsam ist ihnen der Aufbau aus einer langkettigen hydroxylierten Aminbasis, einem Sphingoid (Abb. 2.1), die über eine Amidverbindung mit einer langkettigen Fettsäure verbunden ist. Die Ceramide sind die Hauptkomponente der SC-Lipide (Hamanaka et al. 1999). Strukturelle Unterschiede existieren sowohl hinsichtlich ihres Fettsäure- als auch ihres Sphingoidtyps in Variation der Kettenlänge, Typ und Ausmaß der Hydroxilierung und Sättigung (Coderch et al. 2003). Als Basen kommen hauptsächlich Sphingosin und in kleineren Mengen Sphinganin (Dihydrosphingosin), Phytosphingosin und 6-Hydroxysphingosin vor.

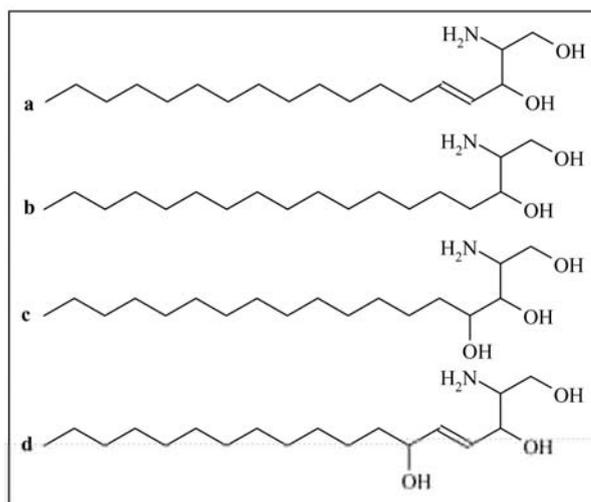


Abb.2.1: Sphingoidbasen der SC-Ceramide:
a: Sphingosin,
b: Spinganin,
c: Phytosphingosin,
d: 6-Hydroxysphingosin

Die Fettsäurereste sind entweder hydroxyliert oder liegen als Nonhydroxyfettsäuren vor. Bei den hydroxylierten Fettsäuren unterscheidet man wiederum α - und ω -Hydroxyfettsäuren. Es gibt mindestens 9 verschiedene frei extrahierbare Ceramide im SC. Zum Zeitpunkt des Entstehens dieser Arbeit konnte man chromatographisch sieben Ceramide unterscheiden (Robson et al. 1994, Hamanaka et al. 1999). Diese wurden

anhand ihrer Mobilität in der Reihenfolge steigender Polarität mit arabischen Zahlen gekennzeichnet (Cer1-Cer7). Allerdings konnten schon wenig später aus einigen Ceramidfraktionen weitere Ceramide (Cer8 und Cer9) separiert werden, die sich chromatographisch zwischen den bereits genannten Ceramiden 1-7 ansiedeln. Die Zahlenklassifikation ist aus diesem Aspekt wenig aussagekräftig, da der Zusammenhang der Nummerierung mit dem chromatographischen Laufverhalten nicht mehr gegeben ist. Eine besser geeignete, sich auf die chemische Struktur der Ceramide beziehende Klassifikation führten Motta et al. (1993) ein. Ein kombinatorisches Buchstabensystem gibt Aufschluss über den Aufbau des Ceramids. Der letzte Buchstabe bezeichnet immer die Sphingoidbasis: „S“ steht für Sphingosin, „P“ für Phytosphingosin und „H“ für 6-Hydroxysphingosin. Die Fettsäuren werden nach der Hydroxilierung mit O (ω -Hydroxyfettsäure), A (α -Hydroxyfettsäure) oder N (Nonhydroxyfettsäure) bezeichnet. Ist die Fettsäure an ihrer ω -Hydroxyfettsäure mit einer weiteren Fettsäure verestert, steht hierfür ein E. Die kovalent gebundenen Ceramide werden als CerA und CerB bezeichnet. Im Folgenden soll kurz auf den Aufbau der einzelnen Ceramide eingegangen werden, die Abbildungen 2.2 2.3a,b und 2.4 zeigen zur Verdeutlichung die Strukturformeln.

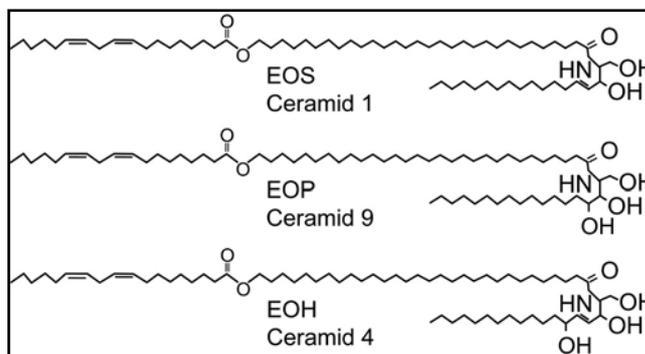


Abb. 2.2: Acylceramide

Ceramid 1 (EOS) ist das am wenigsten polare Ceramid. Als Acylceramid stellt es hinsichtlich seiner Struktur eine Besonderheit dar: seine mit dem Sphingosin amidierter ω -Hydroxyfettsäure ist an der ω -Hydroxidgruppe mit einer weiteren Fettsäure verestert. Bei dieser handelt es sich fast ausschließlich um Linolsäure. *Ceramid 2* (NS) besteht aus einer Sphingosin- oder Sphinganinebasis, (C16-20), die mit einer Nonhydroxyfettsäure (C24, 26, 28) amidiert ist. *Ceramid 3* (NP) enthält wie Cer 2 eine Nonhydroxyfettsäure, unterscheidet sich allerdings in seiner Sphingoidbasis von ihm, die hier Phytosphingosin (C16-C24) ist (Wertz et al 1985, Ponc et al 2003). *Ceramid 4*

(EOH) besteht aus einer Sphingosinbasis (C18-C20) in Amidierung mit einer ω -Hydroxyfettsäure, die über die Hydroxidgruppe mit einer weiteren Fettsäure verestert ist

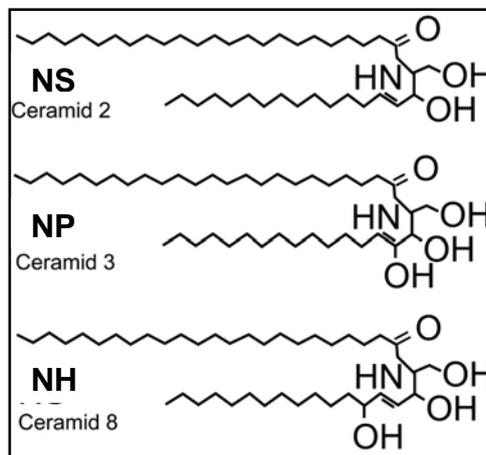


Abb. 2.3a: SC-Ceramide mit nicht hydroxilierten Fettsäureresten (Cer2, 3, 8)

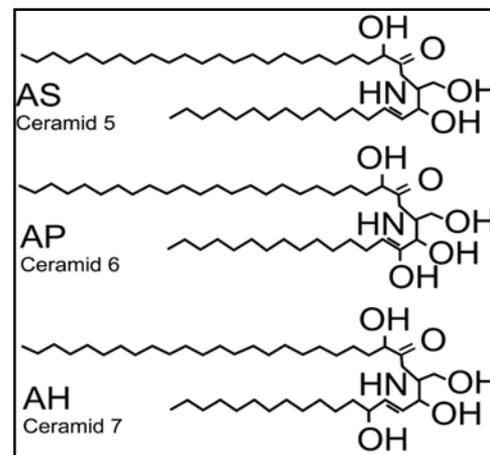


Abb. 2.3b: SC-Ceramide mit α -Hydroxyfettsäureresten (Cer 5, 6, 7)

(Robson et al. 1994). *Ceramide 5* (AS) besitzt eine Sphingosinbasis mit vorwiegenden Kettenlängen von C17 und C18. Die am häufigsten enthaltene Fettsäure ist Palmitylsäure (C16). Die Bande von *Ceramide 6* (AP) konnte nochmals in zwei Fraktionen separiert werden. Es wird zwischen Cer6a und 6b unterschieden, wobei Cer6b, eine Phytosphingosinbasis mit einer α -Hydroxyfettsäure, 90% dieser Fraktion ausmacht (Wertz und Downing 1983). Für Cer 6a sind die Beschreibungen nicht eindeutig, es wird eine Struktur vorgeschlagen, in der an C4 des Phytosphingosins eine weitere 2-Hydroxyfettsäure gebunden ist (Long et al. 1985). *Ceramide 7* (AH), das Ceramid mit der stärksten Polarität, besteht aus einer 6-Hydroxysphingosinbasis, amidiert mit einer α -Hydroxyfettsäure (Robson et al. 1994). *Ceramide 8* (NH) wurde in der Bande von Cer 5 nach Acetylierung und erneuter TLC gefunden. Es wird aus einer 6-Hydroxysphingosinbasis und einer Nonhydroxyfettsäure gebildet (Stewart und Downing 1999). *Ceramide 9* (EOP) ist neben Cer 1 und Cer 4 ein weiteres Acylceramid, dessen Basis 6-Hydroxysphingosin ist und dessen chromatographische Mobilität zwischen Cer 2 und Cer 3 liegt (Ponec et al. 2003). Die kovalent gebundenen Ceramide des „Lipid-Envelope“ der Korneozyten haben eine ω -Hydroxyfettsäure und eine Sphingosin- oder 6-Hydroxysphingosinbasis (Abb. 2.4).

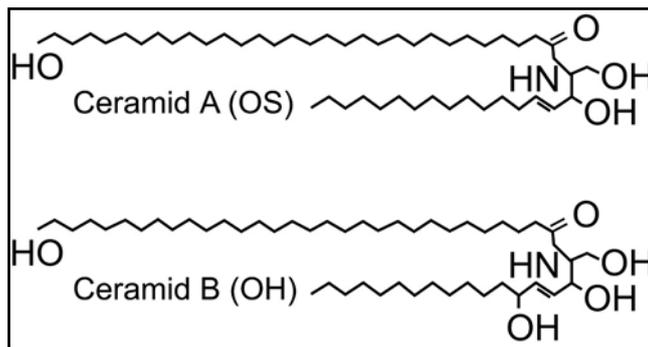


Abb. 2.4: kovalent gebundene Ceramide

2.2.2. Cholesterol

Cholesterol scheint eine Rolle in der Regulation der Mobilität der Kohlenwasserstoffketten der SC-Lipide zu spielen. In steigenden Konzentrationen führt es zu einer Verflüssigung der kristallinen Phasen, was zu einer erhöhten Permeabilität der Barrierschicht führt (Mizushima et al. 1996). Cholesterolsulfat ist zwar nur in kleinen Mengen vorhanden, spielt jedoch eine Rolle in der Regulation der SC-Desquamation (Long et al. 1985). Es hat seine höchste Konzentration in den tieferen Schichten des SC, in den oberflächlichen Schichten nimmt sie abrupt ab (Cox und Squier 1986). Durch Ausbildung von Cholesterolsulfat -Calcium - Brücken soll die interzelluläre Kohäsion verstärkt und durch die Hydrolyse von Cholesterolsulfat dementsprechend die Abschilferung von Korneozyten ermöglicht werden (Epstein et al. 1981a, Long et al. 1985). Bei der X-chromosomalen Ichthyosis, einem Krankheitsbild mit starken Verhornungsstörungen, wird Cholesterolsulfat aufgrund eines Mangels an Cholesterol-Sulfatase vermindert abgebaut (Webster et al. 1978).

2.2.3. Freie Fettsäuren

Alle freien Fettsäuren (fFS) im SC gehören der gesättigten, langkettigen geraden Spezies an. Die Kettenlängen variieren von 16 bis 30 C-Atomen, die am häufigsten vorkommenden sind C22 und C24 (Wertz et al. 1987). Die fFS entstehen laut Mao-Quiong et al (1995) durch enzymatische Umwandlung von Phospholipiden, die bei der

Exozytose der lamellären Granula frei werden und sind für die Integrität der Permeabilitätsbarriere unabdingbar. Die fFS sind an der Entstehung des leicht sauren pH-Wertes des SC beteiligt (Fluhr et al. 2004), der ebenso Einfluss auf die Funktionstüchtigkeit der Permeabilitätsbarriere hat: die zur extrazellulären Produktion der SC-Ceramide benötigten Enzyme haben ihr pH-Optimum im sauren Bereich (Holleran et al. 1992). Bei Patienten mit lamellärer Ichthyose liegt ein Mangel an freien Fettsäuren vor, das SC weist hier Veränderungen in der Ausprägung der interzellulären Lipidlamellen auf (Lavrijssen et al. 1995, Elias et al. 2002).

2.3. Die epidermale Kinetik

Da die Penetration aller Substanzen einschließlich Wasser durch das Stratum corneum hauptsächlich durch den Interzellularraum erfolgt (Boddé et al. 1989), stellen seine interzellulären Lipide die Voraussetzung für die Funktionsfähigkeit der Permeabilitätsbarriere dar. Das SC ist in seinem Aufbau das Ergebnis zellulärer Differenzierungsvorgänge von 28 Tagen Dauer, die in den lebenden Schichten der Epidermis ablaufen und im Stratum basale beginnen. In diesem befinden sich, abgegrenzt zur Dermis durch eine Basalmembran, in 3-5 Lagen die unregelmäßig angeordneten, proliferationsfähigen Stammzellen der Epidermis. Diese durchwandern nach Verlust ihrer Teilungsfähigkeit die höher gelegenen Zellschichten als Keratinozyten und durchlaufen für die Entstehung der Permeabilitätsbarriere wichtige Differenzierungsvorgänge, deren Hauptaspekt hier die Akkumulation von Lipiden in 0,1 – 0,5 µm messenden Organellen ist (Downing et al. 1991). Je weiter die Keratinozyten in der Epidermis nach außen wandern, desto höher ist der Gehalt des Zytoplasmas an diesen „lamelläre Granula“ oder „Odland-Bodies“ genannten Organellen, daher auch der Name Stratum granulosum für die äußerste lebende Schicht. Die sich hier befindenden, Granulozyten genannten, Epidermiszellen enthalten in den Odland-Bodies die Vorstufen der SC Lipide in Form aufeinander gestapelter, abgeflachter Lipidvesikel (Landmann 1988): Glycosylceramide, Sphingomyelin, freie Sterole, und Phospholipide. Außer den Lipiden sind hydrolytische Enzyme für die extrazelluläre Umwandlung der polaren Lipide in die eher hydrophoben SC Lipide gespeichert: saure Phosphatase,

Sphingomyelinase und Glycosidasen (Wertz et al 1984). Zum Teil spielen die Enzyme auch eine Rolle bei der späteren Desquamation der äußersten Schichten des SC (Freinkel und Traczyk 1985; Grayson et al. 1985). Der Inhalt der Odland-Bodies wird an der Grenze des Stratum granulosum zum Stratum corneum durch Exozytose freigesetzt und bildet dort interzelluläre multilamelläre Lipidschichten. Eine Schädigung der Permeabilitätsbarriere wird mit gesteigerter Sekretion aus den Organellen beantwortet (Menon et al. 1992).

2.4. Der Aufbau der Permeabilitätsbarriere

Die Funktion des SC als Permeabilitätsbarriere beruht auf seiner einzigartigen Lipidzusammensetzung und – organisation im Interzellularraum (Wertz 2000). Die Zellen des Stratum corneum, die Korneozyten, sind abgestorbene kernlose, plättchenförmige, hexagonale Zellen. Sie liegen in bis zu 20 Schichten aufeinander und sind durch Desmosomen miteinander verbunden. Durch proteolytischen Abbau der Desmosomen in den äußersten Zellschichten des SC wird der Mechanismus der Abschuppung gefördert (Egelrud 2000). In vertikalen, miteinander verzahnten Säulen angeordnet, befinden sich die Korneozyten eingebettet in eine Matrix aus Lipiden. Aufgrund dieser Struktur wurde in den 1970er Jahren der Ausdruck „bricks-and-mortar model“ geprägt, der die Zellen mit Ziegelsteinen und die Lipide mit dem sie verbindenden Mörtel vergleicht (Elias 1983).

Durch die Gefrierbruch-Replika-Technik und Elektronenmikroskopie (Breathnach 1975) sowie später mit der transmissionselektronenmikroskopischen Untersuchung nach RuO₄- Fixierung wurden in den Interzellularräumen lamelläre Strukturen sichtbar, die nahezu parallel zur Oberfläche der Korneozyten verlaufen (Madison et al. 1987, Swartzendruber et al. 1989). Diese interzellulären Lipide lassen sich mit Chloroform/Methanol aus dem Gewebe auswaschen, wonach transmissionselektronenmikroskopische Untersuchungen des Gewebes noch ein transluzentes Band um die Korneozyten erkennen lassen, was nach alkalischer Hydrolyse und Lipidextraktion verschwindet. Dies weist darauf hin, dass die so erhaltenen Lipide kovalent an die Korneozyten gebunden sind (Swartzendruber et al.

1987, Wertz und Downing 1987, Chang et al. 1993). Analysen dieser Lipide ergaben, dass es sich hier vornehmlich um ω -Hydroxyceramide handelt, deren OH-Gruppen ihrer Sphingosinbasen eine Esterbindung mit den Proteinen der Korneozytenhülle eingehen (Wertz et al. 1989, Ponec et al. 2000). Unterschiedliche Verfahren wurden angewandt, um die Lipidorganisation des SC zu untersuchen. Die Ergebnisse dienten als Basis für die Entwicklung verschiedener Modelle, die Aufschluss über den Aufbau des SC auf molekularer Ebene geben sollen. Ein Parameter die Lamellenstrukturen zu charakterisieren, ist ihre Periodizität. Die Transmissionselektronenmikroskopie nach RuO₄-Fixierung zeigt breitere elektronendurchlässige Schichten von 5 nm, die eine dünnere elektronendichte Schicht von 3 nm einschließen. Diese „breit-schmal-breit-Sequenz“ ergibt eine Periodizität von 13nm. Da die Ausdehnung einer solchen trilamellären Einheit wenig mehr als doppelt so breit ist wie die einer Lipiddoppelmembran, wird angenommen, dass jede dieser Einheiten aus zwei gegenüberliegenden Lipid-Doppelmembranen besteht. Mehrere Lipid-Bilayer – meist bis zu drei - kommen übereinander gestapelt vor (Hou 1991). Die am häufigsten zu beobachtenden Strukturen sind 6- und 9-Band-Muster. Die 13 nm Periodizität ließ sich auch mittels Engwinkel-Röntgenbeugung bestätigen, wobei eine zweite, kürzere Periode von 6nm (short-periodicity-phase) gefunden wurde (Bouwstra et al. 2001). Funktionell wird dem Ceramid 1 aufgrund seiner besonderen Struktur eine bedeutende Rolle in der Formation dieser interzellulären Lipidlamellen im SC zugeschrieben: es soll verantwortlich für die Ausbildung der „long-periodicity-phase“ sein (Bouwstra et al. 1998, Schreiner et al. 2000). Die Lamellenstruktur der Lipide lässt sich mit extrahierten SC-Lipiden in vitro reproduzieren (Kuempel et al. 1998). Die 13 nm - Periodizität findet sich wie im SC auch in vitro wieder (Bouwstra et al. 1996). Untersuchungen an isolierten SC-Lipiden in vitro ohne Cer1 zeigten veränderte Lamellenstrukturen: die 13 nm – Phasen fehlten hier nahezu völlig (Bouwstra et al. 1998). Aufgrund ihrer Molekülstruktur können Lipide in verschiedenen Zuständen vorliegen. Die laterale Anordnung der Lipide innerhalb der Lamellenstrukturen kann mittels Weitwinkel-Röntgenbeugung definiert werden (Bouwstra et al. 1994). Forslind (1994) schlug das „Domain mosaic model“ des Stratum corneum vor, in dem flüssigkristalline Domänen und Gelphasen nebeneinander existieren. Norlen (2001a,b) postuliert ein komplett anderes Modell, das „membrane folding model“ und das „single gel phase model“, die die interzellulären Lipide im unteren Teil des SC als eine

kohärente lamelläre Gelphase beschreiben. Erst im oberen Teil des SC kommt es zu einer Phasentrennung und kristallinen Segregationen. Bouwstra et al. (2001) beschreiben die Anordnung der Lipidschichten mit dem „sandwich model“: die breiten Schichten innerhalb der 13 nm Periodizitäten sind in einem kristallinen Zustand und schließen eine flüssige Schicht (schmal) ein, in der sich hauptsächlich ungesättigte Linolsäure und Cholesterol befinden. Diese fluide Phase ermöglicht einen Stofftransport durch das SC und Kommunikation zwischen den Desmosomen. Bei physiologischen Hauttemperaturen sollen die meisten Lipidketten in einer festkristallinen oder Gelphase vorliegen, die weniger laterale Diffusion zulassen und weniger permeabel sind, als die flüssigkristallinen Membranen bei höheren Temperaturen (Coderch et al. 2003).

2.5. Bedeutung der Ceramide für die Barrierefunktion

Cer1 ist das am häufigsten untersuchte SC-Ceramid, Dermatologische Krankheitsbilder, die mit dem Fehlen oder fehlerhafter Produktion von Cer1 einhergehen, haben ein vermindertes Wasserretentionsvermögen, damit ein Austrocknen und erhöhte Empfindlichkeit der Haut zur Folge. Bei vielen Hautkrankheiten, die mit einer beeinträchtigten Barrierefunktion einhergehen, liegt eine Veränderung des Lipidgehaltes mit zum Teil strukturellen Alterationen des SC vor. Das SC von Patienten mit atopischer Dermatitis weist in ekzematösen sowie intakten Hautarealen signifikant niedrigere Mengen an Ceramiden auf als jenes einer gesunden Kontrollgruppe. Dabei waren Cer1 und Cer3 die Ceramide, die höchstsignifikant verringert waren (Imokawa et al. 1991, di Nardo et al. 1998). Zusätzlich wurden strukturelle Veränderungen des Cer1 gefunden. Die Linolsäure an der ω -Hydroxyfettsäure ist hier größtenteils durch Ölsäure ersetzt (Yamamoto et al. 1991). Dies ist auch der Fall bei der essentiellen Fettsäuredefizienz, bei der mangels Linolsäure Ölsäure verestert wird und klinisch erhebliche Beeinträchtigungen der Barriere in Erscheinung treten (Melton et al. 1987). Strukturveränderungen ergeben sich hierbei aber nur lokal: Abnormitäten der interzellulären Lipidstrukturen mit mangelnder oder exzessiver Ausbildung der Lipidlamellen treten nur vereinzelt auf (Hou et al. 1991). Im Kontrast dazu stehen die Beobachtungen bei Psoriatikern, bei denen es schwere

Störungen in den lamellären Lipidstrukturen mit verminderter Barrierefunktion gibt (Fartasch 1997a). Die kovalent gebundenen Ceramide sollen ebenso eine wichtige Rolle bei der Ausbildung der interzellulären Lamellenstrukturen der SC-Lipide und somit bei der Aufrechterhaltung der Funktion der Permeabilitätsbarriere spielen (Meguro et al. 2000). Ihre Bedeutung wird in einer Untersuchung von Macheleidt et al. (2002) deutlich. Der Anteil der proteingebundenen ω -Hydroxyceramide an der Gesamtmenge der kovalent gebundenen Lipide war auf erscheinungsfreier Haut von Atopikern nur halb so hoch wie bei hautgesunden Probanden. Erkrankte Hautbezirke enthielten einen noch geringeren Anteil dieser Ceramid-Spezies. Auch die laterale Anordnung der Lipide, das heißt, das Vorliegen der Lipide in der Gel- oder kristallinen Phase, beeinflusst die Barrierefunktion. Verglichen mit gesunder Haut liegen die Lipide bei Patienten mit atopischer Dermatitis oder lamellärer Ichthyose viel häufiger in der Gelphase vor (Pilgram et al. 2001).

2.6. Das irritative Kontaktekzem

Das irritative Kontaktekzem als pathophysiologische Antwort der äußeren menschlichen Haut auf eine Zerstörung der Barrierschicht durch exogene Noxen ist ein sehr häufiges dermatologisches Krankheitsbild. Die Zahl der toxischen Kontaktsbstanzien ist groß. Sie umfasst die meisten Alkalien, Säuren, anorganischen und organischen Öle, oxidierenden und reduzierenden Agenzien (Fritsch 1990). Die ursächliche Exposition erfolgt häufig im Rahmen des Berufsalltags. Nettis et al. (2002) fanden dies bei 44,6% einer untersuchten Patientengruppe mit irritativem Kontaktekzem. Zusammen mit dem allergischen Kontaktekzem macht es den größten Teil aller Berufskrankheiten aus. Die Inzidenz beläuft sich auf 0,5-1,9 Fälle pro 1000 Vollbeschäftigte und Jahr (Diepgen und Coenraads 1999). Betroffen sind vornehmlich die exponierten Stellen an Händen und Unterarmen, durch volatile Irritantien in Sprays oder die Anwendung von Kosmetika auch das Gesicht (Streit und Braathen 2001). Klinisches Kennzeichen ist ein Erythem, das auf die mit dem Irritans in Kontakt stehenden Hautareale begrenzt ist, einhergehend mit Rhagadenbildung und Juckreiz (Voigtländer 1998). Das irritative Kontaktekzem stellt neben dem medizinischen ein nicht zu vernachlässigendes sozioökonomisches Problem dar, denn die meisten dieser Ekzeme lassen sich nur therapieren, indem der Kontakt mit dem auslösenden Agens vermieden wird, was starke Einschränkungen im Beruf zur Folge hat oder mit einer Weiterführung der beruflichen Tätigkeit nicht zu vereinbaren ist (Widmer et al. 1994). Eine große Gefahr stellt die Entwicklung eines allergischen Kontaktekzems auf der Basis einer bestehenden irritativen Kontaktdermatitis dar, denn die in ihrer Funktion beeinträchtigte Barriere der Haut erleichtert durch Exsikkation die Permeation von Haptenen und Vollantigenbildung (Jung 2005). Die wiederholte Exposition der Haut zu unterschwelligem Reizeinwirkungen primär irritierender Substanzen führt durch Summation zu einer nichtinfektiösen Entzündung. Diese ist hauptsächlich in der Epidermis lokalisiert und auf die direkte Wirkung des Irritans auf die Haut zurückzuführen. Zahlreiche Versuche zur Untersuchung der Pathogenese mittels strukturell verschiedenen Irritantien sind in der Literatur beschrieben (Lammintausta 1987 und 1988, Willis et al. 1989, Widmer et al. 1994, Wigger-Alberti et al. 2000). Dermatohistologisch ist im akuten Stadium eine Spongiose zu erkennen, subakut eine

vermehrte Akanthose und Parakeratose. Chronische Ekzeme zeigen eine Hyperkeratose. Ein dermales Lymphozyteninfiltrat und Gefäßerweiterung ist in allen Stadien zu beobachten (Streit und Braathen 2001).

Versuche mit der Induktion eines irritativen Kontaktekzems zeigten irritantienabhängig unterschiedliche Zellveränderungen, was auf verschiedene Mechanismen der Interaktion von Chemikalien und Hautstrukturen hinweist (Willis et al. 1989, Lee und Maibach 1995). Ein wichtiger Parameter solch ekzematös veränderter Hautareale ist der objektiv messbare transepidermale Wasserverlust (TEWL), der Ausdruck einer gestörten Barrierefunktion der Haut ist. Trockene Haut ist empfindlicher gegenüber Irritantienexposition (Tupker et al. 1990). Auch eine jahreszeitliche Abhängigkeit der Ausprägung von Hautreaktionen ist beschrieben. Im Winter reagiert die Haut stärker auf die Einwirkung chemischer Irritantien, was mit einem verminderten Hydratationsgrad begründet wird (Agnier und Serup 1989). Zusammenfassend kann davon ausgegangen werden, dass eine Reihe von Hautkrankheiten mit einer Beeinträchtigung der Barrierefunktion und erhöhter Empfindlichkeit gegenüber chemischen Noxen einhergeht. Ein signifikanter Zusammenhang zwischen atopisch veränderter Haut und der Entwicklung eines irritativen Kontaktekzems ist nachgewiesen worden (Nettis et al. 2002).

2.7. Das Hardening-Phänomen

Im Zusammenhang mit dem irritativen Kontaktekzem als Berufsdermatose wurde oft beobachtet, dass es neben Personen mit irritativem Kontaktekzem Individuen gibt, die entweder gar keine Entzündungszeichen zeigen oder solche, bei denen sich nach einer gewissen Expositionszeit und abgelaufener Entzündung trotz fortbestehenden Kontakts zum Irritans eine Spontanheilung mit nachfolgender besonderer Unempfindlichkeit der Haut einstellt. Die Haut scheint sich bei diesen Personen an die Noxe „gewöhnt“ zu haben. Für diese Beobachtung wurde bereits 1926 von Jadassohn der Ausdruck Hardening geprägt (Kawai et al. 1991, Wulforth 1996a). Der Begriff „Hardening“ ist ein rein deskriptiver, für den klinisch zu beobachtenden, jedoch nicht geklärten Adaptationsvorgang der Haut an Irritantien. Er wird allerdings auch im Zusammenhang

mit Kontaktallergien, Toleranzinduktion und Hyposensibilisierung genannt (Epstein et al. 1981b, Möller 1990). Die vorliegende Arbeit soll sich mit dem unspezifischen Hardening, das durch irritative Noxen induziert wird, beschäftigen. Die Literatur weist eine Reihe Synonyme auf, wie „Akkommodation“ (McOsker und Beck 1967), „lokale Hyporeaktivität“ (Andersen et al. 1987), „chemische Schwielen“ oder „Adaptationsphänomen“ (Klaschka 1985). So zahlreich wie die Bezeichnungen des Gewöhnungsphänomens sind auch die Theorien zur seiner Entstehung. So wird von Schaaf und Gross (1953, 1959) eine von der chemischen Konstitution des Irritans abhängige Akanthose der irritierten Stellen in Erwägung gezogen (Wulfhorst 1996a), immunologische Aspekte, Enzyminduktion mit Detoxikation des Irritans, eine gesteigerte Permeabilität des Interzellularraums, verminderte Permeabilität des Intrazellularraumes und somit ein schnellerer Abtransport über Blut- und Lymphbahnen (McOsker und Beck 1967). Die älteste, sich mit dem „Phänomen“ beschäftigende Quelle, stammt aus dem Ende des vorletzten Jahrhunderts, als Kreibich 1890 die „lokale Unterempfindlichkeit“ erkrankter Hautbezirke (Vitiligo) gegenüber erscheinungsfreier Haut beobachtete. Samuel führte 1892 Versuche mit Krotonöl an Kaninchenohren durch, bei denen er herausfand, dass ein Ohr nach einer abgeheilten Krotonölentzündung und erneuter Exposition mit Krotonöl eine schwächere Reaktion zeigt, als ein nicht behandeltes Ohr (Wulfhorst 1996a). Gezielte experimentelle Untersuchungen zur Induktion eines Hardening Phänomens sind in der Literatur selten zu finden – einige seien an dieser Stelle aufgeführt. Schaaf und Gross untersuchten die akanthotische Hornschichtverdickung der Haut als Reaktion auf äußerlich applizierte Noxen. Sie fanden Unterschiede der Stärke der Akanthose in Abhängigkeit vom applizierten Irritans (Wulfhorst 1996a). McOsker und Beck (1967) führten ein Experiment an Meerschweinchenhaut durch, in welchem die Haut durch die wiederholte Behandlung mit verschiedenen oberflächenaktiven Substanzen an selbige akkommodiert werden sollte. Der eingetretene Hardening – Effekt war lokalisiert und nicht streng spezifisch. Nach Behandlung mit einem Tensid lösten andere Tenside keine entzündlichen Reaktionen mehr aus, wobei chemisch nicht verwandte Substanzen eine gesteigerte Reaktivität hervorriefen. Mit der Entwicklung nichtinvasiver hautphysiologischer Messverfahren wurden sehr gut geeignete Methoden gefunden und angewandt, um Hautreaktionen in Studien zur gezielten Induktion kutaner Entzündungsabläufe objektiv zu beurteilen (Willis 1987b, Lammintausta et al. 1988,

Tupker et al. 1989, Agner 1991, Wigger-Alberti et al. 2000). Durch repetitive irritative Modelle wird die Einwirkung chemischer Irritantien auf die Haut im (Berufs-)Alltag gut imitiert. Natriumlaurylsulfat (SLS) – behandelte Haut zeigt bei wiederholter Irritation binnen einer Woche eine verstärkte Reaktivität (Freeman und Maibach 1988), während bei repetitiver offener SLS–Applikation an einem Probandenkollektiv auf den behandelten Hautarealen innerhalb von drei Wochen eine abgeschwächte Reaktion beobachtet werden konnte (Tupker et al. 1989).

In einer weiteren Untersuchung zur Hautreaktion nach experimentell induzierter kumulativer irritativer Kontaktdermatitis konnte ein Hardening der Haut noch 6 und 9 Wochen nach Induktion eines irritativen Kontaktekzems nachgewiesen werden (Widmer et al. 1994). Die Fähigkeit der Haut zur Adaptation an Irritantien scheint unter anderem altersabhängig zu sein. Die Haut älterer Menschen zeigte im Experiment eine verspätete und verminderte entzündliche Reaktion, sowie eine verlängerte Phase der Heilung, als die jüngerer Menschen (Schwindt et al. 1998). Auch eine Abnahme der Empfindlichkeit der Haut gegenüber Irritantien nach UV-A und UV-B Bestrahlung ist beschrieben. Im Versuch zeigten UV-A- und UV-B– behandelte Hautareale eine Zunahme aller SC-Lipide, die UV-B-bestrahlten Areale zusätzlich eine Verbreiterung des Stratum corneum (Lehmann et al 1991).

Im Rahmen der Erforschung der Barriereigenschaften wird auf die Bedeutung der SC-Lipide, vor allem aber der Ceramide, ihrer Komposition und Organisation für den Aufbau einer funktionsfähigen Permeabilitätsbarriere fokussiert (Grubauer et al. 1989, Imokawa et al. 1989). Einen ersten direkten Nachweis der Bedeutung der ω -Hydroxyceramide für eine funktionsfähige Barrierschicht erbrachten Behne et al. (2000), indem sie deren Produktion im SC haarloser Mäuse hemmten und die Auswirkungen auf die Barriereigenschaften beurteilten. Andersherum führt die Applikation von SC-Ceramiden zu beschleunigter Verbesserung des Wasserretentionsvermögens einer zerstörten Permeabilitätsbarriere (Imokawa et al. 1986, Zettersten et al. 1997, Coderch et al. 2002). De Paepe et al. (2002) zeigten, dass extern applizierte Ceramide in Kombination mit anderen SC Lipiden eine noch schnellere Regeneration der Barrierschicht brachten. Die gezielte Untersuchung der SC-Lipide nach Induktion eines Hardening der Haut wurde bisher noch nicht durchgeführt.

2.8 Zielstellung

Noch immer ist die Entstehung des häufig auf empirischer Basis beschriebenen Hardening-Phänomens, mit dem eine besondere Unempfindlichkeit der Haut gegenüber Irritantien bezeichnet wird, ungeklärt. Historische Untersuchungen zu Gewöhnungseffekten der Haut existierten zwar schon Ende des vorletzten Jahrhunderts, der heutige Wissensstand über die Genese eines Hardening der Haut zeichnet sich allerdings nicht durch ein gewachsenes Verständnis dieses Vorgangs aus. Es wurde gezeigt, dass eine verminderte Reaktivität der Haut durch Irritantien induziert werden kann (Lammintausta et al. 1987, Tupker et al. 1989, Widmer et al. 1994). Um die Funktionsweise und die Eigenschaften der Permeabilitätsbarriere zu verstehen ist es nötig, die klinisch zu beobachtenden und messbaren Parameter wie TEWL und Hautrötung in Korrelation zu strukturellen Gegebenheiten auf molekularer Ebene zu betrachten. In dieser Arbeit soll auf die Rolle der SC-Lipide bei der Entstehung des Adaptationsvorganges der Haut an Irritantien fokussiert werden, um der Aufklärung dieses Phänomens ein Stück näher zu kommen. Die vorliegende Arbeit ist die Fortsetzung einer von Widmer et al. (1994) durchgeführten Studie zur Untersuchung der Reaktivität der Haut nach Induktion eines irritativen Kontaktekzems. Sie zeigten, dass es bis zu neun Wochen nach Irritation eine signifikante Hyporeaktivität der Testfelder gab, auf denen ein Kontaktekzem provoziert wurde. Als möglichen Grund diskutierten sie die Veränderungen in der Lipid-Komposition des SC auf den irritierten Testfeldern. Die Absicht der vorliegenden Arbeit lag darin, die Ergebnisse der Studie von Widmer et al. zu verfolgen und zu untersuchen, ob ein Zusammenhang zwischen der Lipid-Zusammensetzung des SC und der Fähigkeit zur Entwicklung eines Hardening der Haut besteht. Das Ziel sollte die Beantwortung folgender Fragen sein: (1.): Gibt es Unterschiede in der Basis-Lipidkomposition bei Probanden, die ein Hardening entwickeln und Individuen, die kein Hardening entwickeln? (2.): Wie verändert sich die Lipid-Komposition des SC nach der Einwirkung von Irritantien auf die Haut und Entstehung eines irritativen Kontaktekzems? Neue Erkenntnisse über Faktoren der individuell verschiedenen Hautempfindlichkeit bzw. – unempfindlichkeit könnten in der Prävention nützlich sein, indem Voraussagen zur Wahrscheinlichkeit der Entwicklung eines Kontaktekzems getroffen werden könnten. Für die Therapie wäre

eine Substitution nicht ausreichend vorhandener Ceramide durch externe Applikation denkbar.

3. Material und Methoden

3.1. Probanden

Es wurde eine klinische randomisierte prospektive Longitudinalstudie an 23 hautgesunden Probanden (11 weiblich, 12 männlich) zwischen 18 und 44 Jahren durchgeführt. Das Durchschnittsalter betrug $26,7 \pm 6,9$ Jahre (Mittelwert \pm SD). Die Projektskizze wurde vor Beginn der Studie durch die Ethikkommission der Friedrich-Schiller-Universität (FSU) Jena geprüft und bewilligt. Die Teilnahme erfolgte freiwillig und bedurfte einer schriftlichen Einverständniserklärung der Probanden nach ausführlicher schriftlicher und mündlicher Aufklärung durch die durchführenden Mitarbeiter. Während der zweiten Studienphase kam es zum Ausfall eines Probanden aus beruflichen Gründen, so dass für diesen Zeitraum nur die Daten von 22 Probanden verwendet werden konnten. Folgende Kriterien lagen den Untersuchungen zugrunde:

Einschlusskriterien

1. freiwillige Teilnahme
2. Alter: 18 – 50 Jahre
3. Geschlecht: männlich oder weiblich
4. keine schweren internistischen Erkrankungen
5. keine schweren dermatologischen Erkrankungen

Ausschlusskriterien

1. schwere internistische Allgemeinerkrankungen
2. dermatologische Erkrankung
3. Immunsuppressive Therapie (Corticosteroide)
4. dermatologische Lokalthherapie
5. lichtempfindliche, sehr helle Haut (Hauttyp I)
6. Exposition zu Irritantien an den Unter- und Oberarmen ein halbes Jahr vor und während der Studie
7. Schwangerschaft, Stillzeit und unsichere Antikonzeption

Abbruchkriterien

1. Überempfindlichkeit gegen das Irritans
2. mangelnde Kooperationsbereitschaft

3.2. Chemikalien und Materialien

3.2.1. Induktion des irritativen Kontaktekzems

SLS ($C_{12}H_{25}O_4S \cdot Na$, Gehalt $\geq 99\%$, Bezug: Serva Feinbiochemie, Heidelberg); destilliertes Wasser; Finnchambers Extra Large und Filterpapierscheiben, Durchmesser 18 mm (beides Epitest Ltd Oy, Tuusula, Finnland); Pflaster

3.2.2. Extraktion der SC-Lipide

Aceton (Gehalt $\geq 99,5\%$, Bezug: Roth, Karlsruhe), Diethylether (Gehalt $\geq 99\%$, Bezug: Roth, Karlsruhe), Glaszylinder, Innendurchmesser: 18 mm; Bördelflaschen à 10 ml; Eppendorfpipetten.

3.2.2. Chemikalien für die AMD HPTLC

Cholesterol, Cholesterol-3-sulfat, Cholesteryloleat, Triolein, Squalen, Palmitolsäure und Ceramide AS von Sigma-Aldrich (Taufkirchen); Ceramid NP (3) und Ceramid AP von Cosmoferm, jetzt Goldschmidt (Essen), Ceramid NS von Sederma (Le Perray en Yvelines, Frankreich)

Lösungsmittel für die TLC waren von analytischem Reinheitsgrad und wurden von Merck (Darmstadt), Baker (Deventer, Niederlande) und Roth (Karlsruhe) bezogen.

Silica TLC Platten (Kieselgel 60 F₂₄₅, 20 × 10 cm) waren von Merck.

3.3. Geräte

3.3.1. Geräte für hautphysiologische Messungen

Zur Bestimmung des transepidermalen Wasserverlustes wurde das Tewameter TM 210[®] (Courage&Khazaka, Köln) und zur apparativen Beurteilung der Hautrötung das Chromameter CR – 300[®] (Minolta GmbH, Ahrensburg) verwendet.

3.3.2. Geräte zur Lipidanalyse

Für die Applikation der Proben wurde der Automatic TLC Sampler 4 von und zur Entwicklung der Kieselgelplatten das AMD-2 Gerät (beides Camag, Muttenz, Schweiz) eingesetzt. Das Scannen erfolgte mit dem TLC-Scanner selbiger Firma.

3.4. Methoden

3.4.1. Studienablauf

Die Durchführung der Untersuchungen erfolgte im Hautphysiologischen Labor der Hautklinik der Friedrich-Schiller-Universität Jena. Die Studie gliederte sich in zwei Abschnitte. In einer dreiwöchigen Irritationsphase (Phase I) wurde ein irritatives Kontaktekzem induziert. Es folgte eine neunwöchige Reprovokationsphase (Phase II), während der im Abstand von 21 Tagen unbehandelte Hautfelder und Felder, auf denen ein Kontaktekzem hervorgerufen wurde, irritiert und die Reaktionen beider mittels nichtinvasiver hautphysiologischer Messmethoden verglichen wurden. Zu Beginn der Studie und jeweils zum Zeitpunkt der Reprovokationen wurden SC – Lipide mittels Extraktion gewonnen. Die 23 rekrutierten Probanden wurden zunächst in fünf Gruppen A bis E eingeteilt, da keine zeitgleiche Behandlung aller Teilnehmer möglich war. Die Gruppen A, C und D bestanden aus jeweils fünf, die Gruppen B und E aus vier Probanden. Durch die Staffelung belief sich die Gesamtdauer der Studie auf 25 Versuchswochen, beginnend am 03.12.2001, letzter Versuchstag war der 21.05.2002.

3.4.2. Induktion des irritativen Kontaktekzems

Die Irritation der Haut während der ersten drei Versuchswochen wurde mit einer wässrigen SLS-Lösung unter Berücksichtigung der von der Standardization Group of the European Group of Contact Dermatitis (Tupker et al. 1997) entwickelten Richtlinien „Guidelines on SLS – exposure tests“ durchgeführt. Für die Induktion des kumulativen irritativen Kontaktekzems wurden bei jedem Probanden sieben Testfelder (f1 – f7) mit

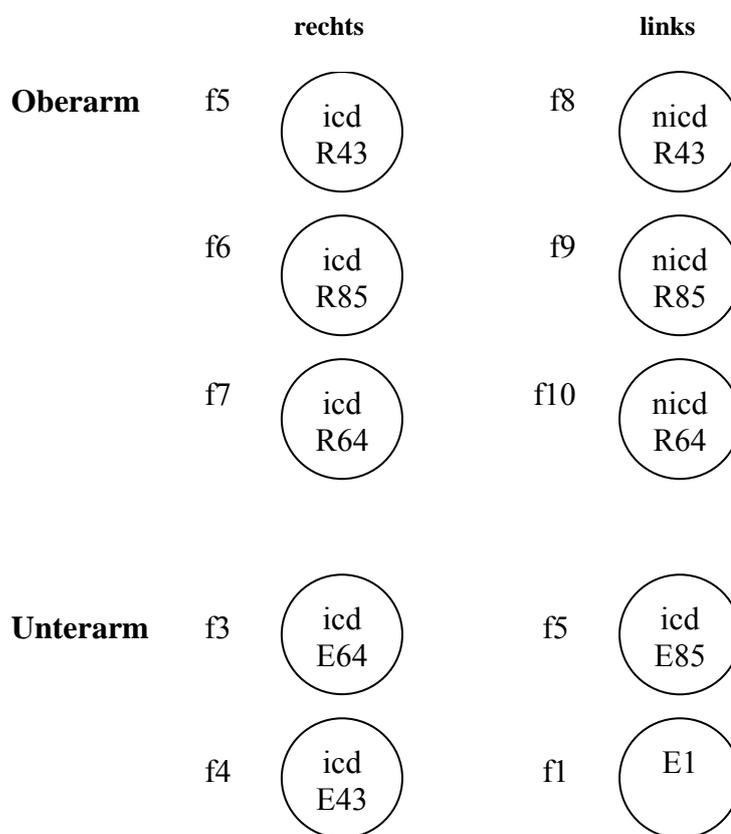


Abb.3.1: Schema der Testfelderverteilung. icd = Induktion eines Kontaktekzems in Phase I, nicd = keine Induktion eines irritativen Kontaktekzems, R43, 64, 86 = Reprovokation an den Tagen 43, 64 und 85) und Lipidextraktion (E) an den Tagen der Reprovokation. Die jeweiligen Zeitpunkte wurden durch Randomisierung festgelegt.

einem Durchmesser von 18 mm auf der Haut des mittleren Abschnittes der ventralen Seite eines Oberarms und beider Unterarme markiert. Je zwei Felder auf jedem Unterarm (f1 – f4) und drei Felder auf dem Oberarm einer Seite (f5 – f7). Von den vier Unterarmfeldern wurden nur f2 – f4 zur Induktion des Kontaktekzems benötigt, f1

diente an Tag 1 zur Bestimmung der Basis-Lipidwerte. Die Felder befanden sich in einem Abstand von 3 cm zueinander und waren 5 cm von der fossa cubitalis entfernt. Die Irritation erfolgte über eine Dauer von drei Wochen jeweils an den Wochentagen zur gleichen Tageszeit (\pm eine Stunde) mit 230 μ l einer 0,4%-igen SLS – Lösung. Das Irritans wurde auf Filterpapierscheibchen pipettiert, okklusiv mittels Finn Chambers und Pflastern auf der Haut appliziert und nach einer Stunde entfernt. SLS wird in hautphysiologischen Studien als Standardirritans eingesetzt, da es alle Forderungen, die an ein experimentell genutztes Irritans zur Anwendung auf der äußeren Haut als Voraussetzung gefordert werden, erfüllt (Wahlberg und Maibach 1980). Es besitzt keine systemische Toxizität, ist nicht karzinogen, wirkt nicht sensibilisierend und ist chemisch genau definiert. Als primäres Irritans schädigt es die Haut durch direkte zytotoxische Wirkung, führt zum Verlust des Wasserretentionsvermögens der Haut und zur Ausbildung eines Erythems (Lee und Maibach 1995, Fartasch 1997b). Obwohl SLS in wässriger Lösung fettlösende Eigenschaften hat, werden dadurch nur sehr kleine Mengen an Cholesterolestern und freien Fettsäuren aus dem SC gelöst (Froebe et al. 1990).

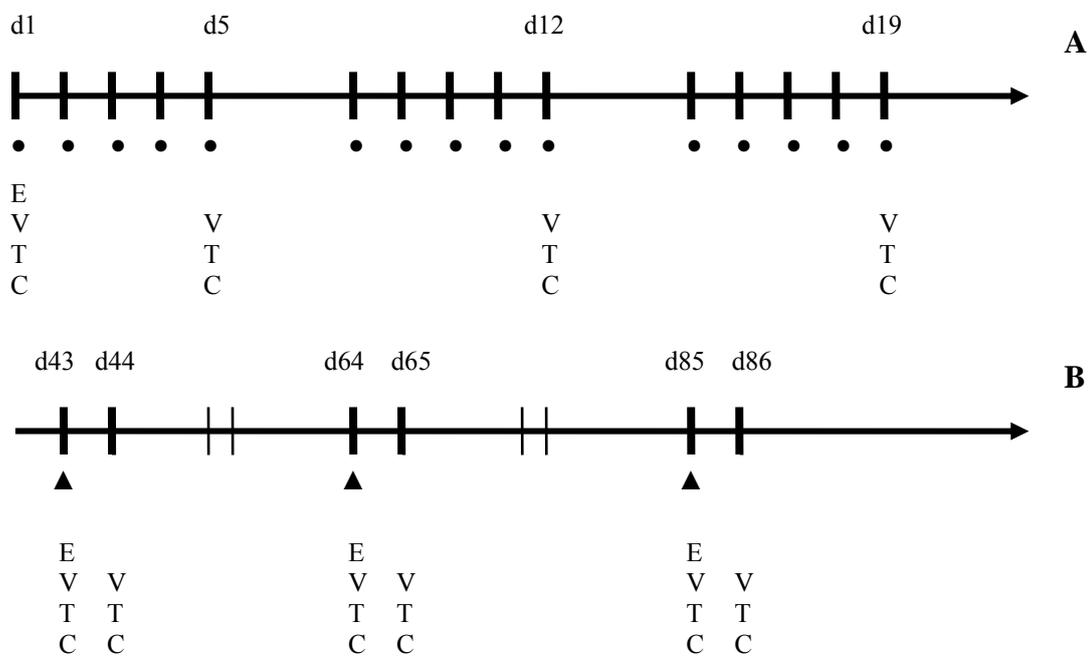


Abb. 3.2 **A:** Phase I – Induktion des irritativen Kontaktdermatitis. • = 0,4% SLS für eine Stunde;
B: Phase II – Reprovokation. ▲ = 1% SLS für 24 Stunden;
E = Lipidextraktion; V = visueller Score; T = TEWL; C = Chromametrie

3.4.3. Reprovokation

Um Reaktionsunterschiede auf externe Irritantien an vorirritierter und unbehandelter Haut zu ermitteln, wurde die Haut der Oberarme erneut mit SLS – Lösung behandelt. Auf dem bisher nicht behandelten Oberarm wurden hierfür auf gleicher Höhe der bereits behandelten Felder drei neue Felder (f8 – f10) angelegt. In 21-tägigen Abständen – an den Tagen 43, 64 und 85 - wurde je eines der Felder f5- f7 und das sich in gleicher Höhe befindende Feld der Gegenseite einer 24-stündigen okklusiven Irritation mit 230µl 1%-iger SLS – Lösung in Finn Chambers unterzogen. Der Zeitpunkt der Irritation wurde für jedes Feld vor Versuchsbeginn durch Randomisierung festgelegt.

3.4.4. Lipidgewinnung

Die SC - Lipide wurden durch Extraktion mit Diethylether und Aceton im Verhältnis 1:1 auf den Testfeldern der Unterarme gewonnen. Im Verlauf der Studie erfolgte die Lipidgewinnung zu vier Zeitpunkten.

Die Proben zur Ermittlung der Basis-Lipidwerte des Probandenkollektivs wurden an Tag 1 gewonnen, alle weiteren Proben in Phase II, jeweils an den Tagen der Reprovokation (Tag 43, 64 und 85). Zur Extraktion wurden speziell angefertigte Glaszylinder mit einem Innendurchmesser von 18 mm auf die Haut aufgesetzt, in die 6 ml des Lösungsmittelgemisches pipettiert wurden. Pro Feld wurde dieser Schritt zweimal durchgeführt, um mit einer ersten Auswaschung die Sebumlipide von der Hautoberfläche zu entfernen. Das Lösungsmittel wurde nach 30 Sekunden auf der Haut abpipettiert und in luftdicht abgeschlossenen Glasbehältern gefüllt als „Probe I“ mit Probandennummer und Datum versehen.

Für die unmittelbar folgende zweite Auswaschung wurden in den sich noch auf der Haut befindlichen Glaszylinder wiederum 6 ml des Lösungsmittelgemisches pipettiert, 20 Minuten abgedeckt auf der Haut belassen und alle fünf Minuten mit einer Pipette vermischt. In dieser Probe sollten nun hauptsächlich SC-Lipide enthalten sein: Ceramide, freie Fettsäuren und Cholesterol. Nach Abpipettieren wurde mit der so

erhaltenen „Probe II“ analog Probe I verfahren. Alle Proben wurden bis zur Analyse bei -80°C aufbewahrt.

3.4.5. Klinische Beurteilung und Messungen

Grundsätzlich ging allen Beurteilungen und Messungen an den Probanden eine 15-minütige Ruhephase voraus, während der sich die Probanden an die standardisierten Laborbedingungen mit einer relativen Luftfeuchtigkeit zwischen 20 - 40% und einer Raumtemperatur von $20-22^{\circ}\text{C}$ akklimatisierten sollten.

Während Phase I fanden die Messungen immer zur gleichen Tageszeit ($\pm 1\text{h}$) vor der Irritation statt. Der visuelle Score wurde an jedem Versuchstag vor Aufbringen des Irritans bestimmt, TEWL und Hautrötung wurden in Phase I an den Tagen 1, 5, 12 und 19 gemessen. In Phase II wurden alle Messungen vor der 24-stündigen Irritation an den Tagen 43, 64 und 85 und 1 h nach Entfernen der Finn Chambers an den Tagen 44, 65 und 86 durchgeführt.

3.4.5.1. Visueller Score

Zur visuellen Beurteilung der Hautrötung wurde der Erythemscore nach Willis angewandt (Willis et al. 1987a, b), der die Intensität in einer Skala von 0 bis 5 differenziert (Tab. 3.1).

0	keine Reaktion
1	leichte, diffuse Rötung
2	gleichmäßig schwache Rötung
3	mäßige Rötung
4	starke Rötung mit Ödem
5	feurig rot, Rhagaden und Ödem

Tab.3.1: Erythemscore nach Willis

3.4.5.2. Transepidermaler Wasserverlust (TEWL)

Der TEWL stellt einen der wichtigsten Parameter zur Beurteilung der Funktionalität der epidermalen Permeabilitätsbarriere dar (Wigger-Alberti und Elsner 1997). Zur Messung des TEWL wurde das Tewameter TM 210[®] eingesetzt.

Das Prinzip der Messung beruht auf der Bestimmung des Wasserdampfgradienten über der Haut (Nilsson 1977). Das Gerät besteht aus einer Basis und einer an beiden Enden offenen zylinderförmigen Sonde, in deren Inneren sich in unterschiedlicher Höhe zwei Sensorpaare für Temperatur und relative Feuchtigkeit befinden. In der Zone der konstanten Diffusion von 10 mm über der Haut wird der auftretende Gradient durch die zwei in der Sonde befindlichen Sensorpaare indirekt gemessen und mit einem Mikroprozessor ausgewertet. Die Ergebnisse werden in $\text{g/m}^2/\text{h}$ angegeben.

Die Messergebnisse sind ganz entscheidend von der Homogenität der Diffusionszone über der Haut abhängig, die durch äußere Einflüsse wie Luftfeuchtigkeit und Umgebungstemperatur beeinflusst wird (Fartasch et al. 1993). Standardisierte Laborbedingungen mit einer Temperatur von 20 – 22°C und einer relativen Luftfeuchtigkeit von 40 – 50% sind daher für reproduzierbare Ergebnisse obligat (Mathias et al. 1981). Die Messungen wurden anhand der Empfehlungen der EEMCO Gruppe (European Expert Group on Efficacy Measurement of Cosmetics and Other Topical Products) von Rogiers (2001) und der Standardisation Group der ESCD (Pinnagoda et al. 1990) durchgeführt. Da die Messempfindlichkeit der Sonde sehr hoch ist, wurde während der Messungen darauf geachtet, dass weder größere Bewegungen der Raumluft z.B. durch Türöffnen, noch die Atemluft der beteiligten Personen die Messung als störende Faktoren beeinflussen konnten. Zur Adaptation des Gerätes an die Raumbedingungen wurde es 15 Minuten vor Beginn der Messungen angeschaltet. Die Sonde wurde auf das zu untersuchende Testfeld auf Ober- oder Unterarm der Probanden so aufgelegt, dass der untere Rand auf der Haut dicht abschloss und so an dieser Stelle kein Wasserdampf entwich oder Luftbewegungen von außen die Messungen stören konnten. Der TEWL wurde zwei Mal pro Testfeld gemessen. Die erhaltenen Werte wurden nach Abschluss jeder Messung auf den an das Gerät angeschlossenen Computer übertragen.

3.4.5.3. Chromametrie

Dieses mit dem Chromameter CR 300[®] durchgeführte Messverfahren bietet eine vom menschlichen Auge unabhängige, objektive und gut reproduzierbare Möglichkeit der Beurteilung der Intensität der Hautrötung nach Induktion irritativer Reaktionen. Das Gerät besteht aus einer portablen Messsonde und einer Basiseinheit. Es simuliert den Sehvorgang des menschlichen Auges: weißes diffuses Licht der Wellenlängen 400 – 700 nm, von einer in der Messsonde befindlichen Xenonlampe ausgesandt, gelangt durch einen Schacht auf die Hautoberfläche, von welcher es in einem Winkel von 90° zur Hautoberfläche reflektiert wird (Elsner, 1994). Das reflektierte Licht trifft auf drei hocheinsensitive Photodioden, die die Lichtsignale in elektrische Signale transformieren. Die Messsonde misst ein Hautareal von 8 mm Durchmesser.

Das Chromameter bietet verschiedene Auswertungssysteme, von denen in der hier beschriebenen Studie das L*a*b* – System zum Einsatz kam. Dieses repräsentiert drei zueinander vertikale Achsen: L* für Helligkeit, mit Werten von 0 (schwarz) bis 100 (weiß); a* für die Rot-Grün-Achse mit Werten von -a*(grün) und +a* (rot) und b* für die Gelb-Blau-Achse mit Werten von -b* (blau) und +b* (gelb) (Elsner, 1994; Pierard, 1998). Für die Beurteilung des Erythems wurde in dieser Studie der a*-Wert verwendet und für jedes Messfeld je Messung dreimal ermittelt. Die Werte wurden vom Gerät direkt auf den Computer übertragen.

3.4.6. Analyse der SC-Lipide

Die Analyse der in der Studie gewonnenen Proben wurde am Institut für Pharmazie und Biopharmazie der Universität Halle/Saale durchgeführt. Die Trennung der SC-Lipide erfolgte durch Hochleistungsdünnschichtchromatographie mit automatischer Mehrfachentwicklung (AMD HPTLC). Dieses Verfahren ermöglichte in einem Durchgang die Trennung und Darstellung aller zum Zeitpunkt der Studie bekannten sieben SC-Ceramide nebst freien Fettsäuren und Cholesterol (Farwanah et al. 2002). Die aus dem SC der Unterarmtestfeldern gewonnenen Lipidextrakte wurden bei 50°C unter einem Argonstrom getrocknet und in 500 µl Chloroform/ Methanol im Verhältnis

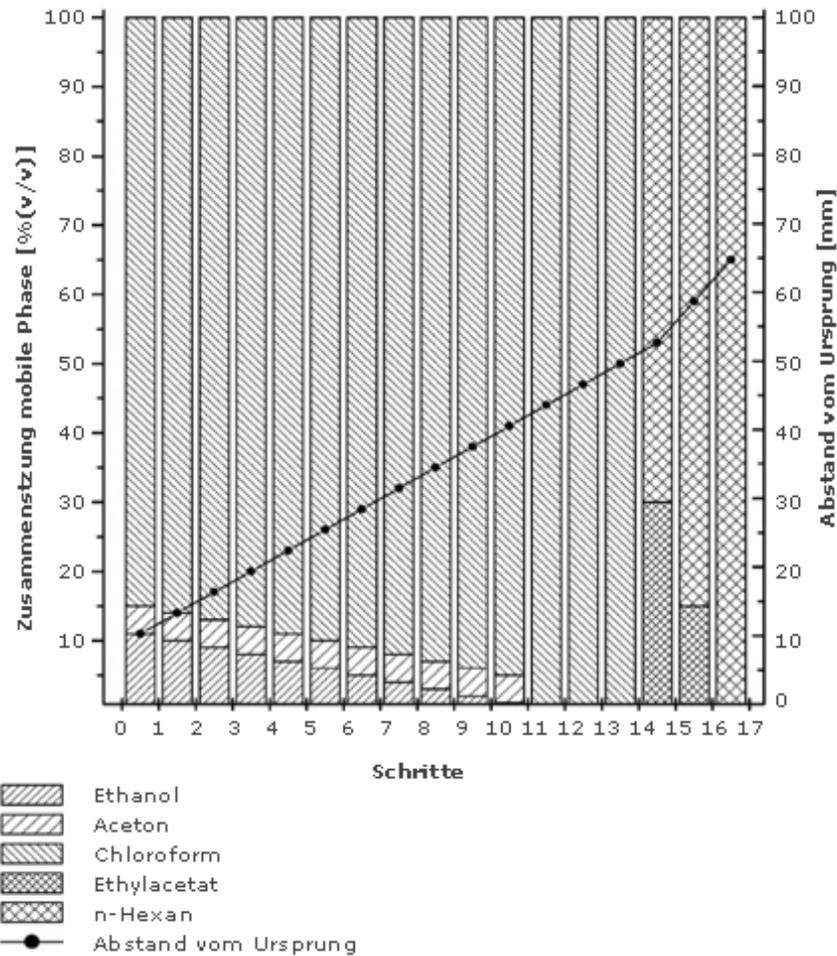


Abb. 3.3: Das AMD-Elutionssystem

1:1 gelöst. Von jeder Probe wurden 50 μl mit einer Geschwindigkeit von 100 $\mu\text{l}/\text{min}$ mit dem TLC Sampler 4 auf die HPTLC-Platten appliziert. Die chromatographische Auftrennung der Lipide erfolgte mit dem AMD-2 Gerät in 17 Entwicklungsstufen mit sinkender Elutionsstärke. Das Gerät erzeugt einen Polaritäts-Stufengradienten, hier beginnend mit dem polarsten Fließmittel. Nach jedem Einzellauf wurde das Fließmittel automatisch aus der Entwicklungskammer entfernt, die Platten unter Vakuum getrocknet und in einer Essigsäureatmosphäre konditioniert, um die Banden zu fokussieren. Für die ersten elf Läufe bestand die mobile Phase aus unterschiedlichen Anteilen von Chloroform, Ethanol und Aceton, worauf drei isokratische Entwicklungsschritte mit Chloroform folgten. Diese Läufe dienten der Trennung von Cholesterolsulfat, der verschiedenen Ceramide und Cholesterol. Zur Separation von Cholesterol, Fettsäuren, Triacylglycerol, Cholesterolester und Squalen waren zwei

Schritte mit n-Hexan und Ethylacetat und ein isokratischer Schritt mit Hexan nötig (Abb. 3.3). Im Anschluss an die Auftrennung wurden die Platten zur Visualisierung der Banden für 20s in eine wässrigen Lösung aus 10% CuSO₄ (w/v), 8% H₃PO₄ (v/v) und 5% Methanol getaucht und 30 min bei 150° in einem Ofen getrocknet. Zur Massenbestimmung durch Densitometrie wurden die Platten mit dem TLC Scanner 3 mit einer Wellenlänge von 456 nm gescannt. Die Auswertung der Daten erfolgte mit der winCATS Software. Alle quantitativen Ergebnisse für die Ceramide wurden mit Hilfe des Referenzlipids Cer3 ermittelt, das in verschiedenen Konzentrationen aufgetragen wurde.

3.4.7. Software und statistische Methoden

Graphiken und Tabellen wurden in Excel 2002 erstellt, für die statistische Datenanalyse kam das Programm SPSS 12.0 für Windows zur Anwendung. Für den Vergleich der TEWL - und Chromametrierwerte sowie für die Werte des visuellen Score über die Zeit wurden für Phase I alle erhaltenen Mittelwerte des Probandenkollektivs (n = 23) getrennt nach Ober- und Unterarm betrachtet. Um signifikante Unterschiede zwischen den Messwerten an verschiedenen Zeitpunkten zu ermitteln, wurde ein nicht nichtparametrischer Test für verbundene Stichproben gewählt. Aufgrund des kleinen Umfanges der Stichproben der Wilcoxon-Test mit α - Adjustierung nach Holm angewendet.

Für Phase I bedeutet dies den Vergleich der jeweiligen Mittelwerte der Messergebnisse aus visuellem Score, Colorimetrie und TEWL von Tag 1 mit Tag 5, Tag 5 mit Tag 12 und Tag 12 mit Tag 19. Für die Lipidanalyse wurden die Werte aus den an Tag 1 gewonnenen Proben als Basiswerte der Probanden definiert und mit den Werten der an den Tagen der Reprovokation (Tage 44, 65 und 86) gewonnenen Proben verglichen. Für den Vergleich der absoluten Mengen wurden die Mittelwerte herangezogen, für die relativen Mengen die Medianwerte. Da für jeden Parameter Unterschiede zu drei Zeitpunkten ermittelt werden, müssen drei Einzeltests gerechnet werden.

Die für jeden Zeitpunkt errechneten p-Werte (Irrtumswahrscheinlichkeit) werden der Größe nach sortiert, beginnend mit dem kleinsten Wert $p_{(1)}$ werden die zugehörigen

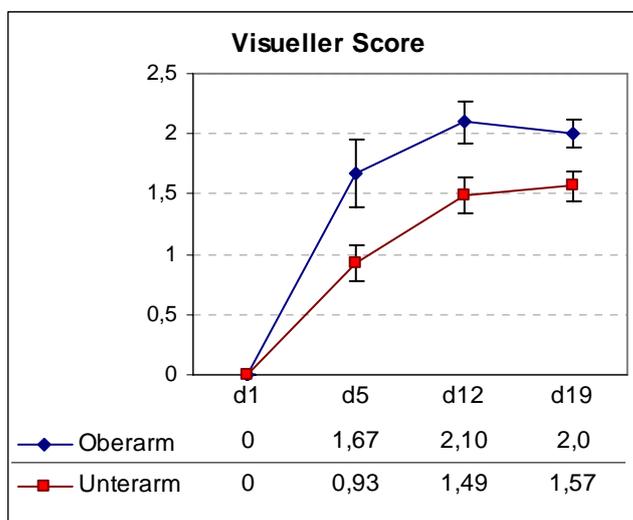
Nullhypothesen ($\alpha = 0.05$) geprüft. Dafür wird $p_{(1)}$ mit $\alpha/3$ verglichen ($H_{0,1}$), $p_{(2)}$ mit $\alpha/2$ ($H_{0,2}$) und $p_{(3)}$ mit α ($H_{0,3}$). Wird $H_{0,1}$ nicht abgelehnt, können auch alle übrigen Nullhypothesen nicht abgelehnt werden und der Test ist beendet.

4. Ergebnisse

4.1 Phase I: Induktion des irritativen Kontaktekzems

4.1.1. Visueller Score

Vor Beginn der Irritation an Tag 1 fand sich bei jedem Probanden der Ausgangswert null. Aus allen Werten des Probandenkollektivs wurden für jeden Versuchstag getrennt für Ober- und Unterarm die Mittelwerte für den visuellen Score bestimmt. Bis zum Versuchstag 12 am Ende der zweiten Woche stiegen die Werte für Ober- und Unterarm kontinuierlich und signifikant an ($p < 0.001$). An Tag 19, am Ende der dritten Versuchswoche, stagnierten die Werte, auf Ober- sowie Unterarmfeldern war kein weiterer Anstieg zu verzeichnen (Abb.4.4a,b). Die Werte der Oberarme waren jeweils



höher als die der Unterarme (Abb.4.1).

Abb. 4.1: Mittelwerte aus visuellem Score aller Ober- und Unterarmfelder (je $n=69$) während der Irritationsphase.

4.1.2. TEWL

Die Basiswerte, gemessen an Tag 1 vor der ersten Irritation, betragen im Mittel $13,54 \text{ g/m}^2/\text{h}$ für die Oberarmfelder und $12,77 \text{ g/m}^2/\text{h}$ für die Felder der Unterarme. Wie schon am visuellen Score beobachtet, waren die Werte der Oberarmfelder höher als auf

denen der Unterarme. Bis zum Ende der zweiten Woche konnte ein signifikanter Anstieg des TEWL auf den Unterarmfeldern beobachtet werden ($p < 0.001$), siehe

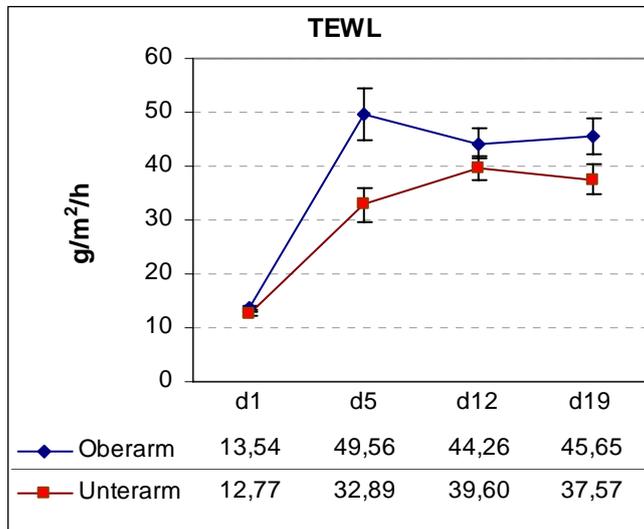


Abb. 4.2: Mittelwerte des TEWL der Irritationsphase aller Felder der Ober- und Unterarme (je $n=69$).

Abb.4.4a,b. Am Ende der zweiten Woche erreichten die Werte ihr Maximum, um während der dritten Woche eine Tendenz nach unten zu entwickeln, die allerdings keine Signifikanz zeigte. Für die Oberarmfelder war das Maximum am Ende der ersten Woche an Tag 5 erreicht, danach stiegen die Werte nicht weiter an (Abb. 4.2).

4.1.3. Chromametrie

Wie bei den vorausgehend beschriebenen Parametern waren auch die mittels Chromametrie bestimmten Werte auf den Oberarmen höher als auf den Unterarmen (Abb. 4.3). Die irritierten Hautareale zeigten im Vergleich zum jeweils

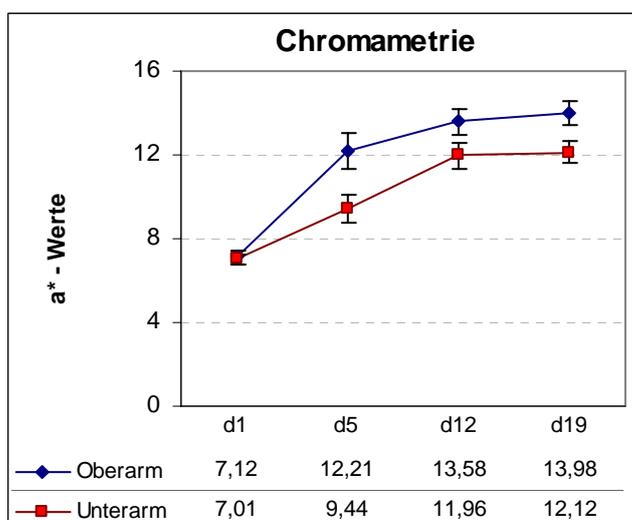


Abb. 4.3: Mittelwerte der Chromametrie der Irritationsphase der Ober- und Unterarmfelder (je $n=69$).

vorausgegangenen Messtag einen kontinuierlichen Anstieg von Tag 1 zu Tag 5 und Tag 5 zu Tag 12 (je $p < 0.001$). Basiswerte waren im Mittel 7,01 für den Unterarm und 7,12 für den Oberarm. Der Vergleich von Tag 19 mit Tag 12 ergab keine weitere Zunahme der Werte (Abb. 4.4a,b)

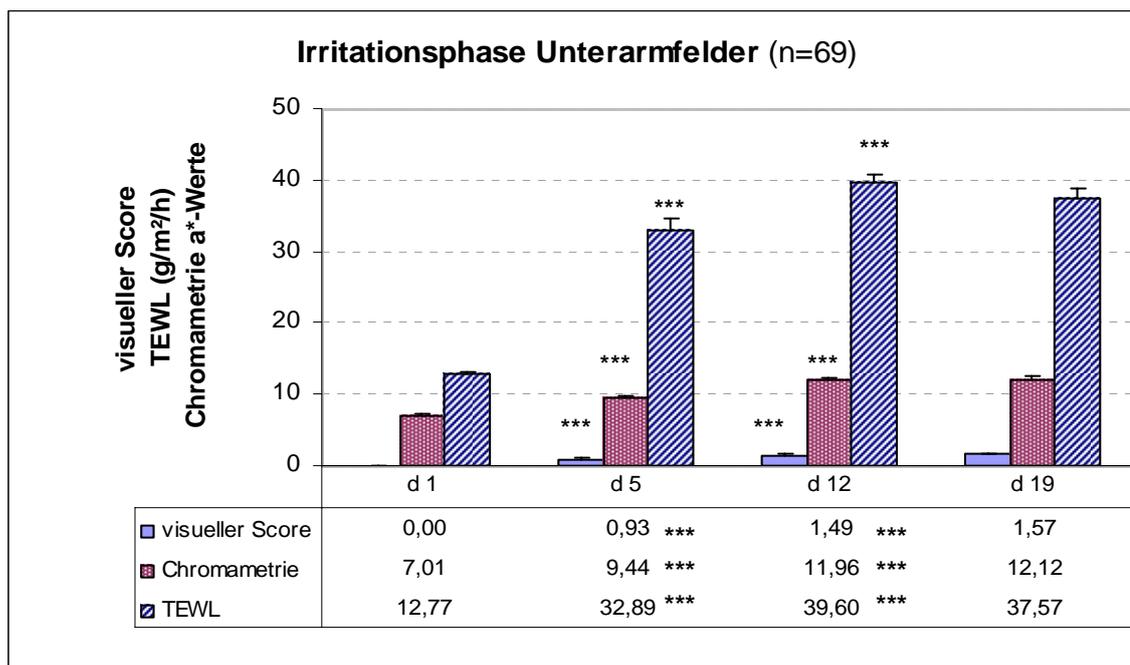


Abb. 4.4a: Mittelwerte für visuellen Score, Chromametrie und TEWL der an den Tagen 1, 5, 12 und 19 ermittelten Werte der Unterarmfelder (n=69). Vergleich der Werte von d1 mit d5, d5 mit d12 und d12 mit d19 (***=p<0.001)

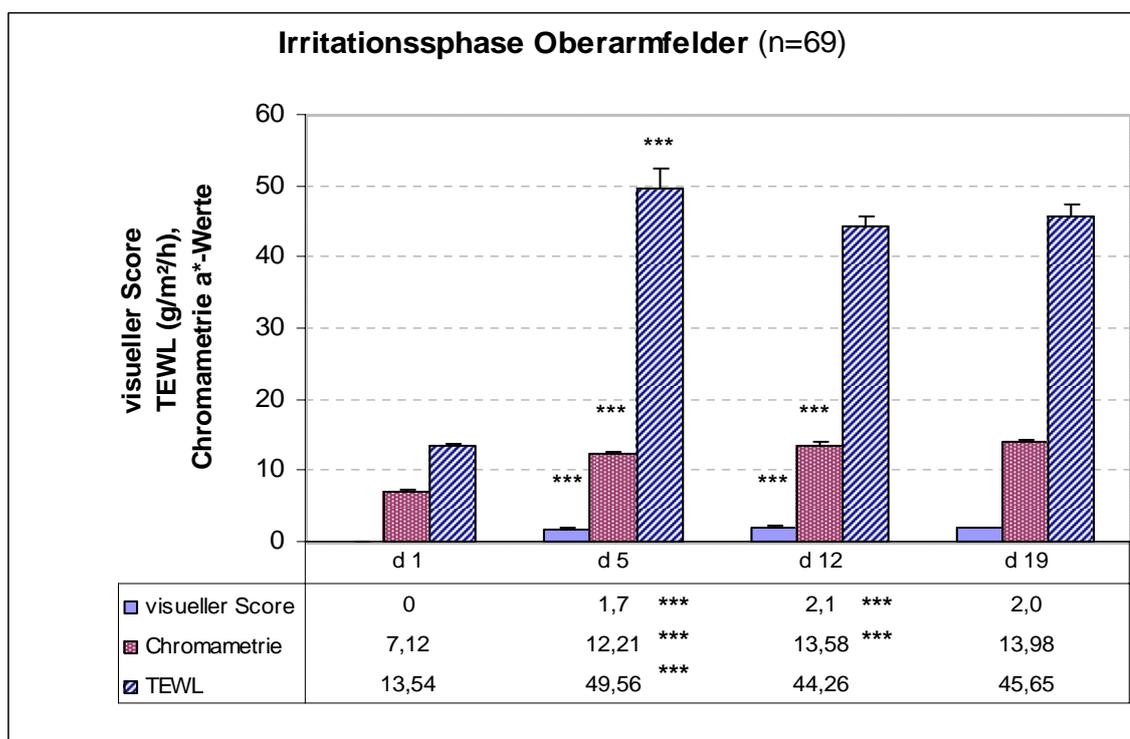


Abb. 4.4b: Mittelwerte für visuellen Score, Chromametrie und TEWL der an den Tagen 1, 5, 12 und 19 ermittelten Werte der Oberarmfelder (n=69). Vergleich der Werte von d1 mit d5, d5 mit d12 und d12 mit d19 (***=p<0.001).

4.1.4. Lipidextraktion

Die extrahierten Lipidmengen wurden als absolute Werte in Mikrogramm und als relative Mengen angegeben. Die Gesamtmenge der analysierten Lipide je Probe stellten die Fraktionen der Cer 1-7, freien Fettsäuren und Cholesterol dar. Die auf einem unbehandelten Hautareal von 18 mm Durchmesser durchgeführte Lipidextraktion ergab als Basiswerte der Lipide für das Probandenkollektiv von 22 Probanden die in Tabelle 4.3 dargestellte Lipidzusammensetzung.

	Probe I		Probe II	
	%	µg	%	µg
C 1	2,749	2,315	4,027	1,875
C 2	3,417	3,681	4,773	1,959
C 3	2,776	1,163	4,685	2,156
C 4	1,264	0,563	2,335	1,003
C 5	3,988	1,576	7,247	2,925
C 6	1,334	0,671	1,779	0,937
C 7	3,667	1,746	5,175	2,349
C total	21,223	11,715	29,610	13,204
Cholesterol	17,229	7,631	22,548	9,763
fFS	54,853	39,873	45,363	22,601

Tab. 4.3: Basiswerte der SC-Lipide an Tag 1 (n=22). C=Ceramid, fFS=freie Fettsäuren

4.2. Phase II: Reprovokation

4.2.1. visueller Score

Vor der Reprovokation an den Tagen 43, 64 und 85 zeigte sich kein Unterschied zwischen den Werten der vorirritierten Felder und nicht irritierten Felder. Bei vereinzelt Probanden gab es eine Hyperpigmentation auf den Testfeldern.

Nach der 24-stündigen Reprovokation beziehungsweise Provokation mit 1% SLS wurden je Proband die Deltawerte für jede Seite –irritiert und nicht irritiert- beurteilt. Auf den vorirritierten Feldern ergaben sich für die Tage 44 und 65 signifikant höhere Werte als auf den zuvor nicht behandelten Feldern (Abb. 4.5)

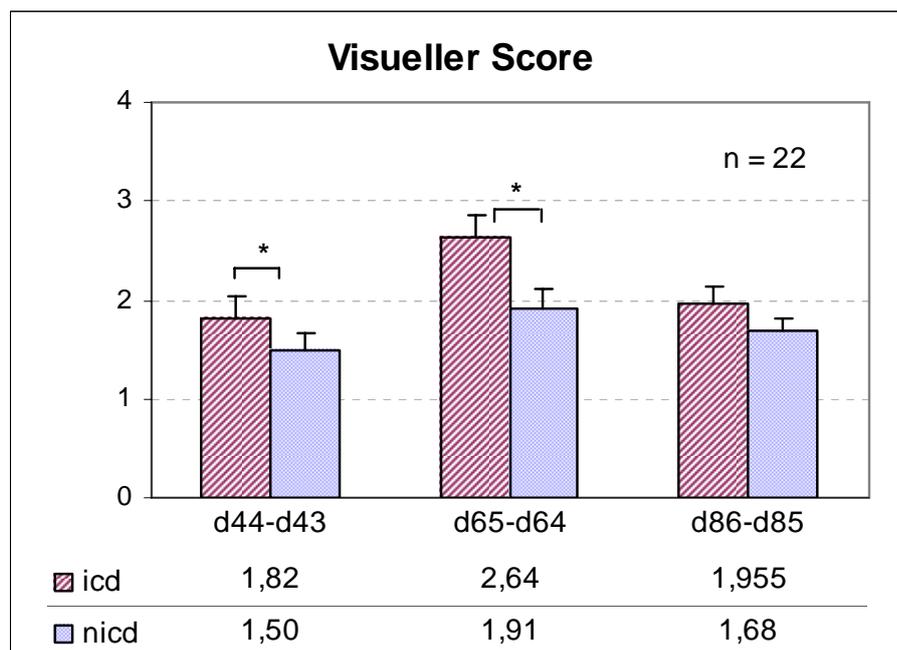


Abb. 4.5: Vergleich der Mittelwerte der Deltawerte (aus Mittelwerten des visuellen Score vor und nach 24h SLS-Applikation) auf vorirritierten (icd) und nicht vorirritierten (nicd) Oberarmfeldern (je n=22). *=p<0.05.

4.2.2. TEWL

Die Messungen an den Tagen 43, 64 und 85 vor der Reprovokation ergaben keine signifikanten Unterschiede der Mittelwerte des TEWL bereits irritierter und nicht irritierter Oberarmfelder. Der TEWL auf den in Phase I behandelten Feldern hatte wieder Normalwerte erreicht (Abb.4.6).

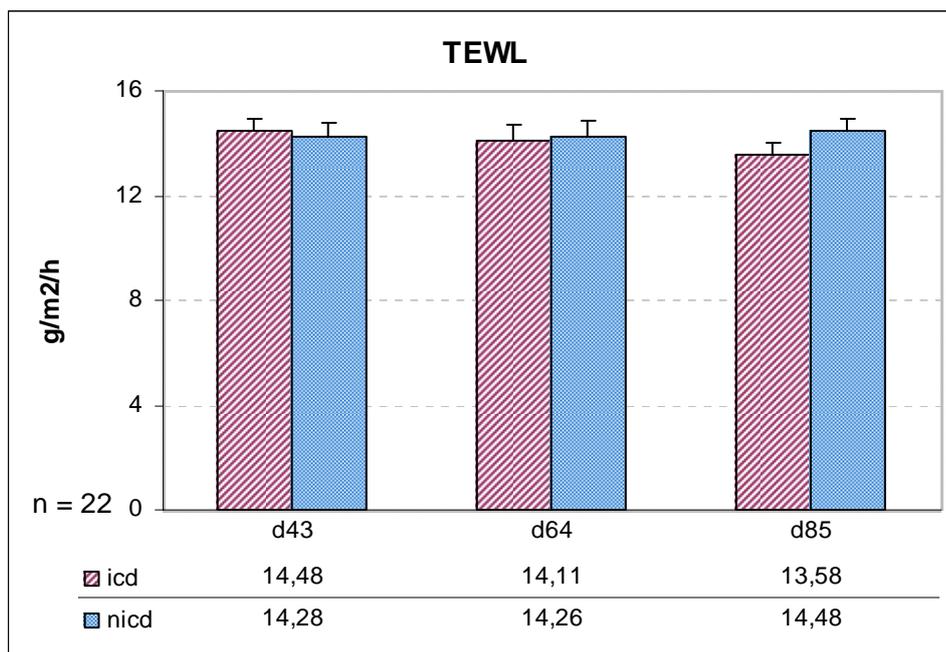


Abb. 4.6: Vergleich der Mittelwerte des TEWL der Oberarmfelder vor Reprovokation (icd – vorirritierte Felder, nicd - nicht vorirritierte Felder, je n=22)

Der nach Provokation gemessene TEWL-Anstieg war an Tag 65 auf den in Phase I nicht irritierten Feldern höher als auf den irritierten Feldern ($p < 0,01$). Anhand der Differenz des TEWL-Anstiegs der irritierten und nicht irritierten Oberarmfelder jedes einzelnen Probanden erfolgte dessen Zuordnung in die Gruppe „Hardening“ oder „Kein Hardening“. Für beide Oberarme (icd = vorirritiert, nicd = nicht vorirritiert) wurde der TEWL-Wert vor der Reprovokation als Basiswert bestimmt und von dem nach der Reprovokation ermittelten Wert abgezogen, um den Deltawert zu erhalten. Diese sind in Abbildung 4.7 dargestellt. $\Delta icd < \Delta nicd$ galt als Kriterium, den Probanden der „Hardening“ – Gruppe zuzuordnen, wenn $\Delta icd \geq \Delta nicd$, erfolgte die Zuordnung zur

„kein-Hardening“ – Gruppe. An Tag 65 gab es einen signifikanten Unterschied in der Reaktion der vorirritierten und nicht vorirritierten Felder ($p < 0.01$).

Nach der ersten Reprovokation an Tag 44 zeigten aus dem Kollektiv von 22 Probanden 16 ein Hardening Phänomen, an Tag 65 waren es 14 und an Tag 86 wiesen 15 Probanden auf den vorbehandelten Feldern einen niedrigeren TEWL-Anstieg als auf den nicht behandelten Feldern auf. Nur ein Proband zeigte nach dieser Definition zu keinem der drei Zeitpunkte ein Hardening, während bei 8 Probanden nach jeder Reprovokation ein Hardening beobachtet werden konnte.

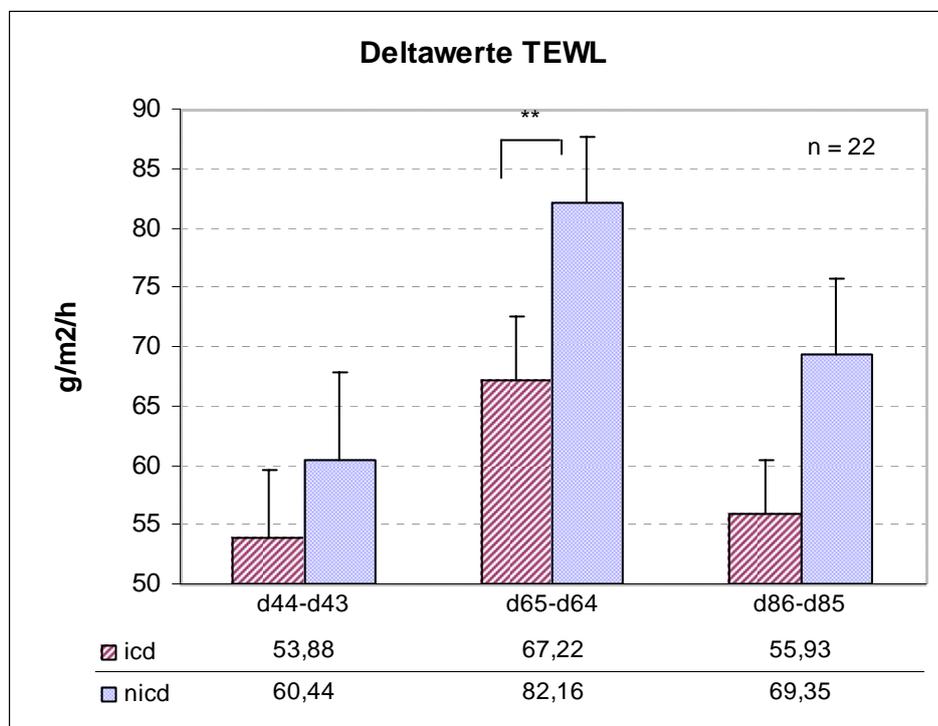


Abb.4.7: Vergleich der Mittelwerte der Deltawerte (aus Werten vor und nach 24h SLS-Applikation an Tag 43 und 44, 64 und 65, 85 und 86) auf vorirritierten (icd) und nicht vorirritierten (nicd) Oberarmfeldern (je $n=22$)** $p < 0.01$

4.2.3. Chromametrie

An den Tagen 43, 64 und 85 vor der Reprovokation gab es keinen Unterschied zwischen den Chromametrierwerten der mit SLS behandelten und nicht behandelten Oberarmfelder. Nach jeder Reprovokation waren die a^* -Werte auf den vorbehandelten Testfeldern höher als auf den nicht vorbehandelten, was sich auch im Vergleich der Deltawerte zeigte. Wie unter 4.2.2. beschrieben wurde aus den Werten der beiden aufeinander folgenden Versuchstage für jeden Probanden der Deltawert der vorbehandelten und nicht vorbehandelten Seite berechnet. Der Mittelwert der Deltawerte wurden miteinander verglichen (Abb. 4.8). Die in Phase I irritierten Felder zeigen an den Tagen 44 und 65 signifikant ($p < 0.05$) höhere Deltawerte, als die nicht irritierten Felder.

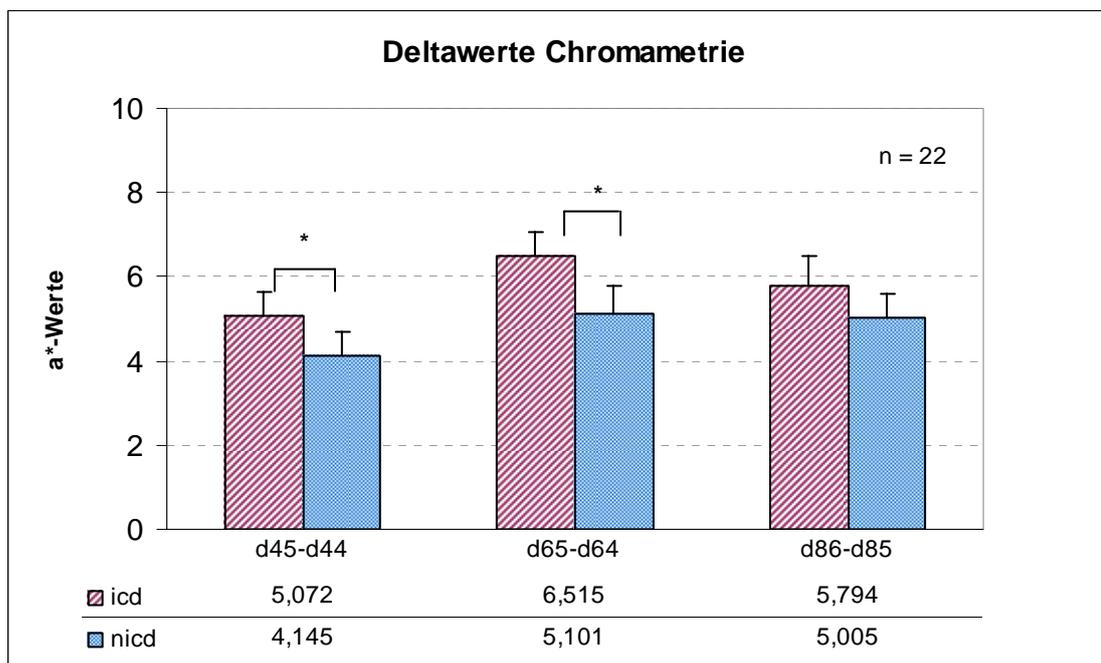


Abb. 4.8: Vergleich der Mittelwerte der Deltawerte (aus Werten vor und nach 24h SLS-Applikation) vorirritierter (icd) und nicht irritierter Oberarmfelder (nicd) (je $n = 22$). $*=p < 0.05$

4.2.4. Lipidextraktion

Aus den Basiswerten und den zu den Zeitpunkten der Provokation gewonnenen SC-Lipide wurden zur Erfassung von Veränderungen der Lipidzusammensetzung die Deltawerte errechnet. Für jede Probe wurden die Anteile der Lipidfraktionen als absolute Mengen in Mikrogramm sowie als relative Mengen angegeben.

Lipide aus Probe I Tage 44, 65 und 86

Die Deltawerte der absoluten und relativen Lipidmengen aus Probe I sind in Tabelle 4.4a dargestellt. Die *relative Menge* an freien Fettsäuren war an Tag 86 signifikant niedriger im Vergleich zum Basiswert ($p < 0.01$). Der prozentuale Anteil von Cholesterol an der Gesamtlipidmenge zeigte einen signifikanten Anstieg an den Tagen 65 und 86 ($p < 0,01$ und $p < 0,001$).

Die *absoluten Mengen* in μg ließen eine Abnahme von Cer 3, ($p < 0.05$) an Tag 86, Cer 5 ($p < 0.05$) an Tag 44 und Cer 6 ($p < 0.01$) an Tag 86 erkennen. Cholesterol war verglichen mit dem Basiswert an den Tagen 44 und 86 höher ($p < 0.01$) als an Tag 1.

Lipide Probe I	%			μg		
	d 44	d 65	d 85	d 44	d 65	d 86
C1	0,938	-0,054	-0,033	4,722	0,004	-0,009
C2	1,525	0,583	0,069	-0,670	-2,124	-1,991
C3	-0,385	-0,531	-0,734	0,654	-0,207	-0,441 *
C4	0,367	-0,017	-0,069	0,371	0,010	-0,037
C5	-0,664	-0,070	-0,949	0,859 *	0,182	-0,175
C6	-0,296	0,009	-0,579	0,224	-0,077	-0,317 **
C7	-0,003	-0,581	-0,234	0,804	-0,076	-0,268
C total	0,712	-2,884	-4,146	6,964	-2,288	-3,238
Chol	4,956	12,943 **	11,024 ***	16,939 **	5,045	4,746 **
fFS	-6,478	-8,434	-8,434 **	-10,281	-14,199	-18,790

Tab. 4.4a: Median [%] und Mittelwerte [μg] der Deltawerte (aus Basiswerten von Tag 1 und dem jeweiligen Reprovokationstag 44, 65 bzw. 85) der Lipide in Probe I der Hardening-Probanden ($n=21$). C = Ceramid, Chol = Cholesterol, fFS = freie Fettsäuren.
* = $p < 0.05$; ** = $p < 0.01$; *** = $p < 0.001$

Die Deltawerte aus der Lipidanalyse des Probanden ohne Hardening sind aus Gründen der Vollständigkeit auch dargestellt (Tab. 4.4b). Hier zeigte sich an den Tagen 44 und 65 einen Verlust der *relativen Mengen* von Cer 1 und der Gesamtmenge der Ceramide. Cer 5, 6, Fettsäuren und Cholesterol nahmen zu allen drei Zeitpunkten zu, der Anteil an Cer 2 dagegen ab.

Die *absoluten Werte in Mikrogramm* für Cer1, 2, 7, die Gesamtmenge der Ceramide und der freien Fettsäuren nahmen zu allen drei Zeitpunkten ab. Cholesterol nahm an den Tagen 44 und 65 zu, an Tag 86 nahmen alle Werte außer für Cer 3 ab. Die starke Abnahme der Menge der gesamten Ceramidfraktion ist vor allem dem dramatischen Sinken der Werte von Cer 1 zu zollen.

Lipide Probe I	%			µg		
	d 44	d 65	d 86	d 44	d 65	d 86
C1	-26,834	-29,563	7,021	-17,909	-19,443	-2,299
C2	-4,960	-6,885	-0,569	-3,677	-4,927	-1,768
C3	2,294	-0,737	1,451	0,982	-0,670	0,440
C4	0,880	4,389	-0,491	0,252	0,810	-0,481
C5	2,160	1,558	0,269	0,758	-0,381	-0,312
C6	0,349	0,124	0,233	0,058	-0,261	-0,046
C7	-3,363	1,361	-3,431	-2,625	-1,890	-2,787
C total	-29,474	-29,754	4,484	-22,159	-26,763	-7,252
Chol	24,413	26,004	1,808	10,639	3,321	-1,421
fFS	5,061	3,750	3,750	-2,669	-11,955	-9,713

Tab. 4.4b: Median [%] und Mittelwerte [µg] der Deltawerte (aus Basiswerten von Tag 1 und dem jeweiligen Reprovokationstag 44, 65 bzw. 85) der Lipide in Probe I des Probanden ohne Hardening (n=1). C = Ceramid, Chol = Cholesterol, fFs = freie Fettsäuren

Lipide aus Probe II Tag 44, 65 und 85

Bei den 21 Hardening Probanden stieg die Gesamtlipidmenge im Vergleich zu den Basiswerten bis zum Tag 44 an ($p < 0,01$). An Tag 44 zeigte sich ein signifikanter Anstieg von Cer1 ($p < 0,001$). Die relative Menge an Cholesterol war an Tag 86 signifikant erhöht ($p < 0,01$). Die Menge an freien Fettsäuren war an den Tagen 44, 65 ($p < 0,05$) und an Tag 86 ($p < 0,01$) im Vergleich zu Tag 1 niedriger.

Die Analyse der absoluten *Lipidmengen in Mikrogramm* ergab für alle Ceramidfraktionen, (wenn für einige auch nur tendenziell) und Cholesterol einen Anstieg der Werte zu jedem der drei Zeitpunkte. An Tag 44 zeigten außer Cer 3, das zu keinem Zeitpunkt eine Veränderung der Werte beobachten ließ, alle Ceramide einen signifikanten Anstieg: Cer 1 ($p < 0,001$), Cer 7 ($p < 0,01$), Cer 2, 4, 5, 6 ($p < 0,05$) und Cer 4 ($p < 0,01$), Cer 5 und Cer 6 ($p < 0,05$). An Tag 65 zeigten Cer 5, 6 und 7 noch eine Zunahme der Werte ($p < 0,01$), an Tag 85 ergaben die Messungen keine weitere Veränderung in den Ceramidfraktionen. Cholesterol zeigte zu jedem Zeitpunkt einen signifikanten Anstieg der Werte: an den Tagen 44 und 85 ($p < 0,001$), an Tag 65 ($p < 0,05$). In der Fettsäurefraktion ergaben sich keine signifikanten Unterschiede im Vergleich der drei Zeitpunkte zu Tag 1.

Lipide Probe II	%			µg		
	d 44	d 65	d 86	d 44	d 65	d 86
C1	2,384 ***	0,964	0,175	1,874 ***	0,523	0,450
C2	0,745	1,168	0,806	1,395 *	0,767	0,766
C3	-0,915	-0,015	1,065	0,660	0,397	0,164
C4	0,426	0,365	-0,043	0,838 *	0,319	0,168
C5	-0,666	0,444	0,694	1,525 *	1,107 **	0,713
C6	-0,505	0,328	0,373	0,603 *	0,43 **	0,140
C7	0,248	1,666	1,094	1,521 **	1,149 **	0,612
C total	4,274	3,748	8,489	8,416 **	4,692	3,013
Chol	4,983	5,194	10,218 **	7,271 ***	3,647 *	6,333 ***
fFS	-4,717 *	-10,673 *	-9,026 **	7,863	-2,247	-3,478

Tab. 4.5a: Median [%] und Mittelwerte [µg] der Deltawerte (aus Basiswerten von Tag 1 und dem jeweiligen Reprovokationstag 44, 65 bzw. 85) der Lipide in Probe II der Hardening-Probanden (n=21). C = Ceramid, Chol = Cholesterol, fFA = freie Fettsäuren.
*= $p < 0,05$, **= $p < 0,01$, ***= $p < 0,001$

Die Werte der relativen Lipidmengen des Probanden ohne Hardening lassen für die Mengen an Cer6, 7 und Cholesterol zu allen drei Zeitpunkten eine Zunahme erkennen. Cer 1 und die freien Fettsäuren zeigen zu jedem Zeitpunkt eine Abnahme. Alle anderen Parameter zeigen bis auf Cer2, 3, 4 und die Gesamtceramide, die an Tag 44 abnehmen, ebenfalls Zunahmen der Werte.

Lipide Probe II	%			µg		
	d 44	d 65	d 86	d 44	d 65	d 86
C1	-0,812	-4,759	-0,170	1,554	-2,654	-1,323
C2	0,384	-3,185	2,095	2,000	-1,900	-0,372
C3	1,350	-1,228	1,442	2,133	-0,964	-0,184
C4	1,385	-0,617	0,196	1,957	-0,671	-0,424
C5	2,645	1,209	3,954	3,670	-0,575	0,257
C6	0,780	0,791	1,096	0,939	0,037	0,138
C7	2,650	2,856	3,444	3,301	0,108	0,325
C total	8,382	-4,932	12,056	15,555	-6,620	-1,583
Chol	3,218	10,898	10,661	10,515	-1,695	-1,494
fFS	-11,600	-5,966	-22,717	7,233	-11,639	-16,101

Tab. 4.5b: Median [%] und Mittelwerte [µg] der Deltawerte (aus Basiswerten von Tag 1 und dem jeweiligen Reprovokationstag 44, 65 bzw. 85) der Lipide in Probe II des Probanden ohne Hardening. (n=1). C = Ceramid, Chol = Cholesterol, fFs = freie Fettsäuren.

5. Diskussion

5.1. Irritationsphase

Das Studienkonzept basiert auf einer Studie von Widmer et al. (1994) zur Untersuchung der Reaktion der Haut nach Induktion eines kumulativen irritativen Kontaktekzems. Die Autoren beobachteten bei einem Teil der Probanden eine eingetretene Hyporeaktivität behandelter Hautareale nach erneuter Irritation und diskutierten eine auf diesen eingetretene Veränderung der Komposition der SC-Ceramide. Um diese Theorie zu untersuchen, wurde die vorliegende Arbeit durchgeführt.

5.1.1. TEWL, Chromametrie und VS lassen eine Adaptation der behandelten Hautfelder erkennen

Die von Widmer et al. (1994) beschriebenen Ergebnisse während der Irritationsphase, mit einem kontinuierlichen Anstieg der TEWL-Werte in den ersten zwei Versuchswochen, konnten in dieser Studie reproduziert werden. Der TEWL reflektiert die Integrität der Permeabilitätsbarriere sehr gut: chemisch oder physikalisch beschädigte Haut, bei der die Wasserverdunstung aus dem SC zunimmt, zeigt höhere Werte als intakte Haut (Lee et al. 1997, de Paepe et al. 2000). Dabei steht das Ausmaß der Veränderungen des TEWL in Relation mit dem Grad der Barrierschäden. So wird im SLS-Modell ein dosisabhängiger Anstieg des TEWL sehr gut wiedergegeben (Agner und Serup 1990). Die steigenden TEWL-Werte können als Zeichen der zunehmenden Schädigung der Permeabilitätsbarriere interpretiert werden. SLS führt zu fokalen Ödemen innerhalb der kernhaltigen Schichten der Epidermis, die interzelluläre lamelläre Anordnung der aus den Odland-Bodies extrudierten Lipide im unteren SC ist gestört. Die äußeren Schichten des SC hingegen zeigen reguläre lamelläre Strukturen der interzellulären SC-Lipide (Fartasch et al. 1998). Die von Widmer und Elsner beschriebene Stagnation und der tendenzielle Rückgang der Werte (nicht signifikant),

zum Ende der dritten Woche waren auch in dieser Studie zu beobachten. Die Autoren führten diesen Verlauf der Werte auf hyperkeratotische Veränderungen des SC zurück. Die Abnahme der TEWL-Werte verhält sich proportional zur Verdickung des SC, wie van der Valk und Maibach (1990) berichteten und sinkt bei zunehmender Regeneration des SC (Welzel et al. 1996, Tanaka et al. 1997).

Die Werte aus der Chromametrie und VS auf Ober- und Unterarm zeigten ebenfalls nur bis zum Ende der zweiten Versuchswoche einen signifikanten Anstieg. Bis zum Ende der dritten Woche gab es keinen weiteren signifikanten Anstieg, was als Rückgang der Entzündung der behandelten Testfelder aufgrund der eingetretenen Adaptation gewertet werden kann.

Alle drei Messverfahren zeigten im Verlauf der Irritationsphase auf dem Oberarm höhere Werte als auf dem Unterarm, woraus geschlossen werden kann, dass Haut unterschiedlicher Körperregionen unterschiedlich starke Reaktionen auf Irritation zeigt. Diese Beobachtung deckt sich mit den Ergebnissen einer Studie von van der Valk und Maibach (1989), die eine Zunahme des Irritationspotentials der Haut vom Handgelenk zum Ellenbogen beschreiben.

5.1.3. Lipidextraktion

Die Auswaschung der Lipide aus dem SC mittels Diethylether und Aceton, angelehnt an die von Imokawa et al. (1989) verwendete Methode, erfolgte in zwei Schritten. Mit einer ersten Applikation des Lösungsmittels (Probe I) sollten Lipide der Talgdrüsen, deren Analyse nicht vorgesehen war, entfernt werden. Die zweite Auswaschung (Probe II) sollte somit möglichst wenig mit diesen Lipiden verunreinigt sein und hauptsächlich die zu untersuchenden SC-Lipide enthalten.

Der Vergleich der Basiswerte der Lipide beider Proben zeigt höhere absolute (in Mikrogramm) und relative Mengen (an der Gesamtmenge der extrahierten Lipide) an Ceramiden und Cholesterol in der zweiten Auswaschung. Die Fettsäuren waren in Probe I in absoluter und relativer Menge stärker vertreten als in Probe II. Insgesamt gab es einen sehr hohen Anteil an freien Fettsäuren im Verhältnis zur Gesamtlipidmenge, im Mittel zwischen 54% und 45% (Probe I und Probe II). In der Literatur wird ein Anteil

von circa 25% am Gesamtgewicht der SC-Lipide beschrieben. Die Werte der Ceramide hingegen fielen im Vergleich zur Literatur zu gering aus, während sich die Mengen an Cholesterol mit Angaben in der Literatur vergleichen lassen. Die untypische Verteilung mit dem hohen Anteil an freien Fettsäuren könnte in dem Verfahren der Extraktion *in vivo* begründet sein, mit dem eventuell hauptsächlich Lipide der äußeren SC-Schichten ausgewaschen werden, was durch die Angaben von Weerheim et al. (2001) gestützt wird. Sie untersuchten die Verteilung von SC-Lipiden in verschiedenen Schichten des SC. Freie Fettsäuren hatten ihre höchste Konzentration in den äußeren Zellschichten, wo Cholesterol und Ceramide mengenmäßig am geringsten vertreten waren. Die Mengenangaben in der Literatur stammen meist aus Experimenten, in denen menschliches Stratum corneum durch Biopsien (Lampe et al. 1983, Wertz und Downing 1983) beziehungsweise nach Tape-stripping (Norlen et al. 1999) gewonnen wurde, wodurch auch die Lipide tieferer Schichten des SC extrahiert werden konnten. Bei der Extraktion direkt vom Testfeld am Probanden scheint es hingegen, als würden die in den basalen Lagen des SC befindlichen Lipide nicht oder nur zum Teil ausgewaschen werden. Um diese Behauptung zu bestätigen, wären allerdings vergleichende Untersuchungen der SC-Lipide der Testfelder an Biopaten oder durch Tape-stripping gewonnene Proben nötig.

In Studien, die sich mit dem Lipidgehalt des SC im Zusammenhang mit der Funktionalität der Permeabilitätsbarriere auseinandersetzen, wird besonders häufig die Bedeutung des Gehalts des SC an Cer1 hervorgehoben. Di Nardo et al. (1996) untersuchten den Zusammenhang zwischen Ceramidgehalt des SC und Reaktionsstärke nach SLS-Irritation und fanden eine negative lineare Korrelation zwischen dem Basis Cer1-Gehalt und TEWL-Anstieg nach 24-stündiger Behandlung mit 3%iger SLS-Lösung. Aufgrund der oben bereits erwähnten Verteilung von Hardening-Probanden gegenüber den Probanden ohne Hardening von 21:1 lassen sich die Basiswerte aus der Lipidanalyse beider Gruppen nicht vergleichen. Vielmehr muss sich hier auf die Beobachtung der Entwicklung der Werte der Hardening-Gruppe während der neunwöchigen Reprovokationsphase beschränkt werden. Zwar konnte beim Probanden ohne Hardening eine Abnahme von Cer 1 zu allen drei Zeitpunkten festgestellt werden, die Betrachtung des Individuums ohne Hardening allein ist jedoch nicht geeignet, um einen statistisch aussagekräftigen Zusammenhang zwischen Lipidkomposition des SC und der Entwicklung eines Hardening zu untersuchen. Der interindividuelle Unterschied

der relativen Lipidmengen kann laut Norlen et al (1999) über 100% betragen. Auch in dieser Studie sind schon bei den Basis-Lipidwerten erhebliche Unterschiede zwischen gleichen Lipidfraktionen der einzelnen Probanden zu verzeichnen.

5.2. Reprovokation

5.2.1. Beurteilung irritierter und nicht irritierter Testfelder vor und nach Reprovokation

In der Reprovokationsphase wurden jeweils die Testfelder des rechten und linken Oberarmes, die sich auf gleicher Höhe befanden, miteinander verglichen, um so intraindividuelle lokalisationsabhängige Reaktionsunterschiede auszuschließen. Drei, sechs und neun Wochen nach Induktion des KE konnten keine Unterschiede des Basis-TEWL, der Chromametrie oder des visuellen Score zwischen irritierten und nicht irritierten Oberarmfeldern ausgemacht werden. Die Felder wurden, jeweils ein Feld pro Seite, mit 1%iger SLS-Lösung für 24 Stunden behandelt. Nach Reprovokation zeigten die Ergebnisse der nichtinvasiven Messungen Unterschiede in der Reaktion irritierter und nicht irritierter Felder auf die erneute beziehungsweise erstmalige Irritation.

Anhand der Differenz der Deltawerte des TEWL der linken und rechten Seite wurden die Probanden als Hardening- oder kein-Hardening-Träger eingestuft. Ein kleinerer Deltawert auf der vorbehandelten Seite wurde als stattgefundene Anpassungsreaktion der Haut auf SLS und somit als Hardening gewertet. Andersherum bedeutete ein größerer Deltawert oder kein Unterschied auf der vorbehandelten Seite eine ausgebliebene Adaptation. An den Tagen 44 zeigten 16, an Tag 65 nur 14 und an Tag 86 wiederum 15 Probanden ein Hardening. Ein signifikant niedrigerer TEWL-Wert der vorirritierten Felder des gesamten Probandenkollektivs wurde nur an Tag 65 ($p < 0.01$) gefunden. Dies lässt sich mit relativ großen interindividuellen Schwankungen der Werte nach Reprovokation erklären. Aus der Gruppe der Hardening Probanden zeigten 8 Probanden nach dieser Definition zu jedem der drei Reprovokationszeitpunkte das Phänomen. Sechs Probanden zeigten nur zu einem Zeitpunkt (Tag 44, 65 oder 86) eine

verminderte Reaktion der vorbehandelten Felder, bei fünf Probanden war dies bei zwei aufeinander folgenden Zeitpunkten der Fall. Diese Beobachtungen sprechen dafür, dass der Zeitpunkt des Einsetzens des Hardening-Effektes sowie sein Andauern interindividuell verschieden sind, was auch von Wulfhorst (1996a) diskutiert wurde. Bei zwei Probanden gab es nur zum ersten und dritten Zeitpunkt ein Hardening der Haut. Ein solcher diskontinuierlicher Verlauf scheint nicht logisch. Vielmehr ist es wahrscheinlich, dass dieses Ergebnis auf Messfehlern resultiert, beziehungsweise die Irritation nicht korrekt ablief. Nur ein Proband ließ während der gesamten Reprovokationsphase kein Hardening erkennen, was aufgrund der geringen Probandenzahl und der Tatsache, dass die Studie an hautgesunden Personen durchgeführt wurde, nicht verwunderlich ist. Eine Adaptation der Haut an ein Irritans mit nachfolgender Unempfindlichkeit scheint häufiger zu sein als eine gesteigerte Empfindlichkeit. Voraussetzung dafür ist, dass keine dermatologische Grunderkrankung besteht, denn Atopiker scheinen seltener ein Hardening zu entwickeln als Hautgesunde (Wulfhorst 1996b). Borelli und Manok (1961, 1965), die eine Untersuchung an Berufsanfängern im Friseurgewerbe durchführten, kamen zu dem Ergebnis, dass 90% der Untersuchten ein Hardening zeigten, während nur 10% ein klassisches „Friseurekzem“ entwickelten.

Hinsichtlich des Basis-TEWL kann gesagt werden, dass bei Hautgesunden dieser Wert nicht geeignet scheint, Rückschlüsse auf die Reaktionsstärke der Haut vorzunehmen, denn obwohl sich auf der linken und rechten Seite vor der Reprovokation keine Unterschiede ermitteln ließen, traten diese nach Irritation beider Seiten zu Tage. Interessanterweise waren zu allen Zeitpunkten nach Reprovokation die mittels Chromameter gemessenen a^* -Werte auf den irritierten Feldern höher als auf den nicht irritierten Feldern, signifikant an den Tagen 44 und 65. Dies spiegelten auch die Werte des visuellen Scores wider. McOsker und Beck (1967) diskutierten als Entstehungstheorie für ein Hardening eine erhöhte Permeabilität des Interzellularraums und dadurch erleichtertem Abtransport des Irritans über Blut und Lymphe. Die bei jeder Entzündung der Epidermis stattfindende vaskuläre Reaktion im Stratum papillare der Dermis ist auf den vorbehandelten Feldern durch diesen Mechanismus offensichtlich verstärkt.

5.2.2. Lipidanalyse an den Tagen 44, 65 und 86

Durch Errechnen der Deltawerte für die einzelnen Lipidfraktionen aus den Werten der Lipidmengen an den Tagen der Reprovokation im Vergleich zu den Basiswerten an Tag 1 sollten Veränderungen der mengenmäßigen Zusammensetzung der SC-Lipide innerhalb der Hardening-Gruppe aufgedeckt werden. Eine Zerstörung der Hautbarriere bewirkt eine gesteigerte die Produktion von SC-Lipiden. Nach Manipulation der Permeabilitätsbarriere, zu Beispiel durch Behandlung mit chemischen Irritantien, werden Reparaturmechanismen in Gang gesetzt, die mit einer gesteigerten Synthese von SC-Lipiden einhergehen. Die Sekretionsrate der Odland-Bodies wird gesteigert (Menon 1992). Als Signal gebender Mechanismus wird der Verlust des epidermalen Calcium-Gradienten diskutiert, der aus der Barrierschädigung resultiert. Wird der Calcium – Gradient aufrecht erhalten, werden die Reparaturmechanismen gehemmt (Lee et al. 1992, Mao-Qiang et al. 1997). Cholesterol scheint „das Lipid der ersten Stunde“ zu sein, direkt nach einer akuten Irritation, innerhalb der ersten vier Stunden, konnte dessen erhöhte Produktion anhand der gesteigerten HMG-CoA-Reduktase, dem limitierenden Enzym der Cholesterolsynthese, nachgewiesen werden. Auch eine vermehrte Synthese von freien Fettsäuren im SC wurde registriert (Menon et al. 1985, Grubauer et al. 1987, Proksch 1990). Auch Feingold et al. (1990) unterstreichen die Bedeutung der Cholesterolsynthese für die frühe Regeneration der Barriere. Erst nachdem durch die Produktion von Fettsäuren und Cholesterol eine Stabilisierung eingetreten war, was sich durch Glättung der gemessenen TEWL-Werte auf den betroffenen Stellen feststellen ließ, kam es zu einer vermehrten Synthese von Sphingolipiden (Elias und Feingold 1992), mit einem Höhepunkt erst circa fünf bis sieben Stunden nach Irritation. Grubauer et al. (1987) berichten, dass eine komplette Wiederherstellung der Permeabilitätsbarriere nach etwa 30 bis 36 Stunden eintritt. Andererseits wurde gezeigt, dass die Reaktion der Haut auf Irritation noch nach bis zu neun Wochen nachdem ein irritatives Geschehen stattgefunden hat, verändert ist (Widmer et al. 1994). Dies unterstützen die Ergebnisse der Lipidanalyse dieser Studie, die noch drei sechs und neun Wochen nach der Induktion eines irritativen KE Veränderungen der SC-Lipide erkennen lassen. Am stärksten ist die Veränderung, vor allem der Ceramide, zum Zeitpunkt drei Wochen nach der Induktion des KE zu erkennen. Sechs von sieben Fraktionen zeigen im Vergleich zu den Basiswerten erhöhte

Werte, was auf eine anhaltende verstärkte Produktion von Ceramiden schließen lässt. Sechs Wochen nach Abschluss der Irritationsphase zeigen diese Zunahme im Vergleich zu Tag 1 nur noch drei Fraktionen: Cer 5, 6 und 7. Dies zeigt, dass alle anderen Ceramidfraktionen sich wieder dem Ausgangswert genähert haben, also auch keine vermehrte Produktion mehr stattfand. Lediglich Cer3 zeigte zu keinem Zeitpunkt eine Veränderung, möglicherweise ist es am wenigsten ausschlaggebend für eine Anpassung der Hautbarriere. Nach neun Wochen ist in den Fraktionen der Sphingolipide keine Veränderung mehr zu verzeichnen, was dafür spricht, dass alle Reparatur- und Anpassungsmechanismen auf Ceramidebene abgeschlossen sind. Auffällig ist, dass Cholesterol auch noch neun Wochen nach Abschluss der Irritationsphase erhöhte Werte zeigt. Es scheint also noch eine gesteigerte Produktion dieses Lipids stattzufinden. Womöglich ist – betrachtet man die sofortige Steigerung der Cholesterolsynthese nach Zerstörung der Permeabilitätsbarriere – dieser Mechanismus empfindlicher und länger anhaltend, als eine Steigerung der Ceramidsynthese. Die freien Fettsäuren sind die einzige Gruppe der SC-Lipide, die während der gesamten Reprovokationsphase im Vergleich zu Tag 1 verringerte relative Werte zeigten. Ein Zusammenhang zwischen erhöhter Cholesterol- und Ceramidproduktion und verminderter Fettsäureproduktion wäre denkbar. Fettsäuren und Cholesterol werden de novo im SC in der späten Phase der epidermalen Differenzierung aus Phospholipiden aus den Odland-Bodies synthetisiert (Freinkel und Fiedler-Weiss 1974, Hedberg et al. 1988a,b, Mao-Qiang et al. 1995). Wenn man annimmt, dass es nach abgelaufener Irritation keinen größeren Pool an Phospholipiden gibt, wäre es möglich, dass die Synthese der freien Fettsäuren zugunsten der Cholesterolproduktion gedrosselt wird. Dies könnte durch eine Untersuchung der Enzymaktivität überprüft werden.

5.3. Beeinträchtigung der Ergebnisse und Fehlerquellen

Im Folgenden sollen kurz mögliche Fehlerquellen bei der Durchführung der Studie diskutiert werden. Die Messergebnisse werden schon mit dem Aufbringen des Irritans auf die Haut beeinflusst: wichtig für reproduzierbare Ergebnisse ist ein konstantes Volumen der applizierten irritativen Lösung (Fischer und Maibach 1984). Zu große

Mengen an Flüssigkeit auf den Filterpapierscheibchen entweichen an den Rändern der Finn Chambers, führen zu einer verminderten Haftung der Pflaster und starker Verdunstung. Obwohl die relative Konzentration des Agens dadurch steigt, resultiert daraus eine verminderte Entzündungsantwort der Haut (Dahl & Roering 1984). Die Hautreaktion ist stärker bei größerer applizierter Menge eines Irritans im Vergleich zu Feldern auf die kleinere Mengen mit gleicher Konzentration aufgebracht werden (Frosch und Kligman 1979). Auch der Zeitpunkt der Messung, vor allem beim TEWL, beeinflusst die Messergebnisse erheblich. Er wurde so gewählt, dass das Intervall zwischen Abnahme des Pads und Messung der erhöhten Verdunstung vom Testfeld direkt nach der Irritation Rechnung trug. In der Literatur herrscht bezüglich des Zeitpunktes für den Messbeginn Uneinigkeit, in den meisten Publikationen wird ein Intervall von 30 Minuten nach Entfernung des Irritans vorgeschlagen, so auch von Freeman und Maibach (1988). Nach der Aussage von Agner und Serup (1993) ist der Zeitpunkt der Messung prinzipiell egal, solange er genau protokolliert wird. Sie schlugen allerdings den Zeitraum von 60 bis 180 Minuten nach Abnahme des Pads vor, da sich in dieser Zeit die TEWL Werte am stabilsten halten und die initial möglichen großen Schwankungen vermieden werden, die 30 bis 60 Minuten nach Abnahme des Pads auftreten können. In dieser Zeit findet ein dramatischer Abfall der zunächst stark erhöhten Werte statt.

Neben allen möglichen Fehlern, die während der Messungen von Chromametrie, TEWL oder der Bestimmung des visuellen Score Einfluss auf die Ergebnisse nehmen können, gibt es weiterhin in der Konzeption der Studie begründete Faktoren, die einen Einfluss auf die hier vorgelegten Ergebnisse genommen haben könnten. Ein Aspekt, der nicht außer Acht gelassen werden sollte, da er eine unterschiedliche Reaktionsbereitschaft in den fünf Probandengruppen unterstützen kann, ist der relativ lange Zeitraum von sechs Monaten, während dem die Studie durchgeführt wurde. Die teilnehmenden Probanden waren hierdurch nicht den gleichen klimatischen Bedingungen ausgesetzt. Es ist nicht auszuschließen, dass Hautreaktionen auf Irritantien im Winter und Sommer unterschiedlich stark ausfallen. Auch wenn es keinen signifikanten Unterschied des Basis TEWL im Winter und Sommer gab, registrierten Agner und Serup (1989) eine stärkere Reaktion der Haut auf SLS im Winter, verglichen mit der Reaktion im Sommer. Diese Beobachtung führten sie auf einen geringeren Wassergehalt des SC im Winter zurück. Die Probanden wurden angehalten, keine Sonnenbäder zu nehmen,

dennoch ist die Haut, vor allem der Unterarme, im Sommer einer höheren UV-Bestrahlung ausgesetzt. Larmi et al. (1989) stellten in einer Studie eine verminderte Reaktion gebräunter Haut auf SLS fest. Im Zusammenhang mit einer UV – bedingten Reaktionsabnahme der Haut nach UV-B Behandlung berichteten Lehmann et al. (1991) von einer parallelen Zunahme von SC-Breite und Lipidmenge. Auch die Lipidzusammensetzung des SC unterliegt nach Rogers et al. (1996) jahreszeitlichen Schwankungen. Aus diesem Grund wäre es interessant gewesen, zu jedem Zeitpunkt der Lipidextraktion der behandelten Felder die Lipide eines unbehandelten Vergleichsfeldes zu analysieren. Allerdings ist das in der Körperregion, in der die Testfelder angelegt wurden, schwer zu realisieren.

5.4. Schlussfolgerung

Zusammenfassend kann gesagt werden, dass sich sowohl ein irritatives Kontaktekzem als auch ein Hardening der Haut durch die Behandlung mit SLS-Lösung im Experiment induzieren lässt. Die Dauer des eintretenden Hardening ist interindividuell verschieden. Ebenso der Zeitpunkt seines Einsetzens. Während sich bei manchen Probanden ein hyposensitiver Effekt schon drei Wochen nach kumulativer Irritation erkennen lässt, zeigt sich dieser bei anderen Individuen erst nach sechs oder gar 9 Wochen. Zur Beantwortung der Frage (1), ob eine Abhängigkeit der Basis-Lipidkomposition und der Ausprägung eines Hardening besteht, konnte diese Studie aufgrund mangelnder Probandenzahlen in der „kein Hardening-Gruppe“ keine Aussage getroffen werden. Es wurden keine statistisch auswertbaren Beobachtungen hinsichtlich dieser Frage angestellt, da nur ein Proband kein Hardening entwickelte. Ein Vergleich eines Individuums mit einer Gruppe (21 Probanden mit Hardening) ist statistisch nicht sinnvoll. Es wäre eine größere Anzahl von Probanden ohne Hardening nötig, um die Bedeutung dieses Faktors beurteilen zu können. Zu Frage (2.) – wie verändert sich die Lipidzusammensetzung des SC nach Induktion eines Hardening - kann anhand der Beobachtung der Entwicklung der Lipidwerte der Hardening-Gruppe beantwortet werden. Es kann gesagt werden, dass (1.) alle SC-Ceramide und Cholesterol drei Wochen nach Induktion eines Hardening-Effektes im Vergleich zu den Basiswerten

erhöht sind. (2.) über die Zeit normalisieren sich die Werte der Ceramide wieder, während (3.) Cholesterol auch noch neun Wochen nach Induktion des Hardening erhöht ist. (4.) Die Fraktion der freien Fettsäuren ist über die gesamte Zeit im Vergleich zu den Basiswerten vermindert. Die Zunahme der Lipidmengen in der Ceramid- und Cholesterol-Fraktion lässt die Vermutung anstellen, dass eine vermehrte Anreicherung dieser Lipide ein relevanter Faktor für die Entstehung einer gesteigerten Unempfindlichkeit der Haut ist. Auch der signifikante Anstieg von Cer 1, dessen herausragende Bedeutung für die Funktion der Permeabilitätsbarriere der menschlichen Haut von vielen Autoren diskutiert wurde, unterstreicht diesen Aspekt: wir konnten zeigen, dass Cer 1 das Ceramid ist, welches bei den Probanden mit Hardening-Phänomen mit der höchsten Signifikanz gesteigert ist. Da sich die Werte der Ceramide relativ schnell wieder dem Basiswert nähern, Cholesterol aber erhöht bleibt, während sich an der Haut eine verminderte Empfindlichkeit beobachten lässt, scheint diese Lipidfraktion eine nicht unmaßgebliche Rolle in der Aufrechterhaltung der Barrierefunktion und der Ausprägung des Hardening-Effektes zu spielen. Interessant wäre allerdings ein direkter Vergleich von Hardening- und nicht-Hardening-Probanden, der in einer mit größerem Umfang angelegten Studie angestellt werden könnte.

6. Literatur

- Abraham W, Wertz PW, Landmann L, Downing DT. 1987. Stratum corneum lipid liposomes: calcium-induced transformation into lamellar sheets. *J Invest Dermatol*, 88:212-214.
- Agner T. 1991. Basal transepidermal water loss, skin thickness, skin blood flow and skin colour in relation to sodium-lauryl-sulphate-induced irritation in normal skin. *Contact Dermatitis*, 25:108-114.
- Agner T, Serup J. 1989. Seasonal variation of skin resistance to irritants. *Br J Dermatol*, 121:323-328.
- Agner T, Serup J. 1990. Sodium lauryl sulphate for irritant patch testing-a dose-response study using bioengineering methods for determination of skin irritation. *J Invest Dermatol*, 95:543-547.
- Agner T, Serup J. 1993. Time course of occlusive effects on skin evaluated by measurement of transepidermal water loss. *Contact Dermatitis*, 28:6-9.
- Andersen KE, Benezra C, Burrow D, Camarsa J. 1987. Contact dermatitis. A review. *Contact Dermatitis*, 16:55-78.
- Behne M, Uchida Y, Seki T, de Montellano PO, Elias PM, Holleran WM. 2000. Omega-hydroxyceramides are required for corneocyte lipid envelope (CLE) formation and normal epidermal permeability barrier function. *J Invest Dermatol*, 114:185-192.
- Boddé HE, Kruithof MAM, Brussee J, Koerten HK. 1989. Visualisation of normal and enhanced HgCl₂ transport through human skin in vitro. *Int J Pharm*, 253:13-24.
- Borelli S, Manok M. 1961. Ergebnisse von Untersuchungen bei Berufsanfängern im Friseurgewerbe. *Berufsdermatosen*, 9:271-276.
- Borelli S, Moormann J, Düngemann H, Manok M. 1965. Ergebnisse einer vierjährigen Untersuchungsreihe bei Berufsanfängern des Friseurgewerbes. *Berufsdermatosen*, 13:216-239.
- Bouwstra J, Gooris G, van der Spek JA, Lavrijsen S, Bras W. 1994. The Lipid and Protein Structure of Mouse Stratum corneum: A Wide and Small Angle Diffraction Study. *Biochim Biophys Acta*, 1212:183-192.

- Bouwstra J, Gooris G, K. C, Weerheim A, Bras W, Ponc M. 1996. Phase behavior of isolated skin lipids. *J Lipid Res*, 37:999-1009.
- Bouwstra J, Gooris G, Dubbelaar FER, Weerheim A, Ijzerman AP, Ponc M. 1998. Role of ceramide 1 in the molecular organisation of the Stratum corneum lipids. *J Lipid Res*, 39:186-196.
- Breathnach AS. 1975. Aspects of epidermal ultrastructure. *J Invest Dermatol*, 65:2-15.
- Chang F, Swartzendruber DC, Wertz PW, Squier CA. 1993. Covalently bound lipids in keratinizing epithelia. *Biochim Biophys Acta*, 1150:98-102.
- Chopart M, Castiel-Higounenc I, Arbey E, Gyeu C, Gaetani Q, Schmidt R. 2002. The normal Stratum corneum: A new ceramide profile. *Perspectives in Percutaneous Penetration*
- Coderch L, Lopez O, de la Maza A, Parra J. 2003. Ceramides and skin function. *J Clin Dermatol*, 2 (4):107-129.
- Coderch L, De Pera M, Fonollosa J, De LA Maza A, Parra JL. 2002. Efficacy of Stratum corneum lipid supplementation on human skin. *Contact Dermatitis*, 47:139-146.
- Cox P, Squier CA. 1986. Variations in lipids in different layers of the porcine epidermis. *J Invest Dermatol*, 87:741-744.
- Dahl MV, Roering MJ. 1984. Sodium lauryl sulfate irritant patch tests. III. Evaporation of aqueous vehicle influences inflammatory response. *J Am Acad Dermatol*, 11:477-479.
- de Paepe K, Derde MP, Roseeuw D, Rogiers V. 2000. Claim substantiation and efficiency of hydrating body lotions and protective creams. *Contact Dermatitis*, 42:227-234.
- de Paepe K, Roseeuw D, Rogiers V. 2002. Repair of acetone- and sodium lauryl sulphate-damaged human skin barrier function using topically applied emulsions containing barrier lipids. *JEADV*, 16:587-594.
- di Nardo A, Wertz PW, Giannetti A, Seidenari S. 1998. Ceramide and cholesterol composition of the skin of patients with atopic dermatitis. *Acta Derm Venereol*, 79:27-30.
- di Nardo A, Sugino K, Wertz P, Ademola J, Maibach HI. 1996. Sodium lauryl sulfate (SLS) induced irritant contact dermatitis: a correlation study between ceramides and in vivo parameters of irritation. *Contact Dermatitis*, 35 (2):86-91.

- Diepgen TL, Coenraads PJ. 1999. The epidemiology of occupational contact dermatitis. *Int Arch Occup Environ Health*, 72:496-506.
- Downing DT, Stewart ME, Wertz PW, Strauss JS. 1993. Lipids of the Epidermis and Sebaceous Glands. In: Freedberg IM, Eisen AZ, Austen KF, Goldsmith LA, Katz SI, Fitzpatrick TB, Hrsg. *Fitzpatrick's Dermatology in General Medicine*. 5te Aufl. New York: McGraw-Hill,
- Egelrud T. 2000. Desquamation in the Stratum corneum. *Acta Derm Venereol*, (Supp 208):44-45.
- Elias PM. 1983. Epidermal lipids, barrier function and desquamation. *J Invest Dermatol*, 80(suppl):44-49.
- Elias PM, Feingold KR. 1992. Lipids and the epidermal water barrier: metabolism, regulation and pathophysiology. *Semin Dermatol*, 2:176-182.
- Elsner P. 1994. Chromametrie. Hardware, measuring principles and standardization of measurements. In: Berardesca E, Elsner P, Maibach HI, Hrsg. *Handbook of skin bioengineering Cutaneous blood flow and erythema*. Aufl. Boca Raton - New York - London - Tokyo: CRC Press,
- Epstein EH, Williams ML, Elias PM. 1981a. Steroid sulfatase, X-linked ichthyosis, and Stratum corneum cell cohesion. *Arch Dermatol Res*, 117:761-763.
- Epstein WL, Byers VS, Baer H. 1981b. Induction of persistent tolerance to urushiol in humans. *J All Clin Immunol*, 68:20-25.
- Fartasch M. 1997a. Epidermal barrier in disorders of the skin. *Micros Res Tech*, 38:361-372.
- Fartasch M. 1997b. Ultrastructure of the epidermal barrier after irritation. *Micros Res Tech*, 37:193-199.
- Fartasch M, Hüner A, Tepe A, Funke A, Diepgen TL. 1993. Hautphysiologische Untersuchungsmethoden in der Berufsdermatologie. *Allergologie*, 16:25-34.
- Farwanah H, Neubert R, Zellmer S, Raith K. 2002. An improved procedure for the separation of major Stratum corneum lipids by means of automated multiple development thin-layer chromatography. *J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci*, 780:443-450.
- Feingold KR, Man MQ, Menon GK, Cho SS, Brown BE, Elias PM. 1990. Cholesterol synthesis is required for cutaneous barrier function in mice. *J Clin Invest*, 86:1738-1745.

- Fischer T, Maibach HI. 1984. Finn chamber patch test technique. *Contact Dermatitis*, 11:137-140.
- Forslind B. 1994. A domain mosaic model of the skin barrier. *Acta Derm Venerol*, 74:1-6.
- Freeman S, Maibach HI. 1988. Study of irritant contact dermatitis produced by repeat patch test with sodium lauryl sulfate and assessed by visual methods, transepidermal water loss and laser Doppler velocimetry. *Am Acad Dermatol*, 19:496-502.
- Freinkel RK, Fiedler-Weiss V. 1974. Esterification of sterols during differentiation and cornification of developing rat epidermis. *J Invest Dermatol*, 62:458-462.
- Freinkel RK, Traczyk TN. 1985. Lipid composition and acid hydrolase content of lamellar granules of fetal rat epidermis. *J Invest Dermatol*, 85:295-298.
- Fritsch P. 1990. *Dermatologie*. 3te Aufl. Heidelberg, Berlin: Springer-Verlag.
- Froebe CL, Simion FA, Rhein LD, Cagan RH, Kligman A. 1990. Stratum corneum lipid removal by surfactants: relation to in vivo irritation. *Dermatologica*, 181:277-283.
- Frosch PJ, Kligman A. 1979. The soap chamber test. A new method for assessing the irritancy of soaps. *J Am Acad Dermatol*, 1:35-41.
- Grayson S, Johnson-Winegar AG, Wintroub BU, Isseroff RR, Epstein EHJ, Elias PM. 1985. Lamellar body - enriched fractions from neonatal mice: Preparative techniques and partial characterization. *J Invest Dermatol*, 85:289-294.
- Grubauer G, Feingold KR, Elias PM. 1987. Relationship of epidermal lipogenesis to cutaneous barrier function. *J Lipid Res*, 28:746-752.
- Grubauer G, Feingold KR, R.M. H, Elias PM. 1989. Lipid content and lipid type as determinants of the epidermal permeability barrier. *J Lipid Res*, 30:89-96.
- Hamanaka S, Hara M, Nishio H, Otsuka F, Akemi S, Uchida Y. 1999. Human epidermal glycolylceramides are major precursors of Stratum corneum ceramides.
- Hedberg CL, Wertz PW, Downing DT. 1988. The nonpolar lipids of pig epidermis. *J Invest Dermatol*, 90:225-229.
- Hedberg CL, Wertz PW, Downing DT. 1988b. The time course of lipid biosynthesis in pig epidermis. *J Invest Dermatol*, 91:169-179.

- Holleran WM, Feingold KR, Mao-Quiang M, Gao WN, Lee JM, Elias PM. 1991. Regulation of epidermal sphingolipid synthesis by permeability barrier function. *J Lipid Res*, 32:1151-1158.
- Hou SY. 1991. Membrane structures in normal and essential fatty acid - deficient Stratum corneum: Characterization by ruthenium tetroxid staining and x-ray diffraction. *J Invest Dermatol*, 96:215.
- Imokawa G, Akasaki S, Hattori M, Yoshizuka N. 1986. Selective recovery of deranged water-holding properties by Stratum corneum lipids. *J Invest Dermatol*, 87:758-761.
- Imokawa G, Akasaki S, Minematsu Y, Kawai M. 1989. Importance of intercellular lipids in water-retention properties of the Stratum corneum: induction and recovery study of surfactant dry skin. *Arch Dermatol Res*, 281:45-51.
- Imokawa G, Abe A, Jin K, Higaki Y, Kawashima M, Hidano A. 1991. Decreased level of ceramides in Stratum corneum of atopic dermatitis: an etiologic factor in atopic dry skin? *J Invest Dermatol*, 96:523-526.
- Jung EG. 1995. *Dermatologie*. 3te Aufl. Stuttgart: Hippokrates-Verlag.
- Kawai K, Nakagawa M, Liew FM, Yasuno H. 1991. Hyposensitisation to urushiol in Japanese craftsmen: results of patch tests on students learning the art of lacquerware. *Contact Dermatitis*, 25:290-295.
- Klaschka F. 1985. Äußere Schutzmechanismen der Haut. In: Hornstein OP, Nürnberg E, Hrsg. *Externe Therapie der Hautkrankheiten*. Aufl. Stuttgart: Thieme, 29-34.
- Kuempel D, Swartzendruber DC, Squier CA, Wertz PW. 1998. In vitro reconstitution of Stratum corneum lipid lamellae. *Biochim Biophys Acta*, 1372:135-140.
- Lammintausta K, Maibach HI, Wilson D. 1987. Human cutaneous irritation: induced hyporeactivity. *Contact Dermatitis*, 17:193-198.
- Lammintausta K, Maibach HI, Wilson D. 1988. Susceptibility to cumulative and acute irritant dermatitis. *Contact Dermatitis*, 19:84-90.
- Lampe MA, Burlingame LA, Whitney J, Williams ML, Brown BE, Roitman E, Elias PM. 1983. Human Stratum corneum lipids: characterization and regional variations. *J Lipid Res*, 24:120-129.
- Landmann L. 1988. The epidermal permeability barrier. *Anat Embryol*, 178:1-13.

- Larmi E, Lathi A, Hannuksela M. 1989. Effect of ultraviolet B on nonimmunologic contact reaction induced by dimethyl sulfoxide, phenol and sodium lauryl sulphate. *Photodermatology*, 6:258-262.
- Lavrijsen APM, Bouwstra J, Gooris G, Boddé HE, Ponc M. 1995. Reduced barrier function parallels abnormal Stratum corneum lipid organisation in patients with lamellar ichthyosis. *J Invest Dermatol*, 105:619-624.
- Lee CH, Maibach HI. 1995. The sodium lauryl sulfate model: an overview. *Contact Dermatitis*, 33:1-7.
- Lee JY, Effendy I, Maibach HI. 1997. Acute irritant contact dermatitis: recovery time in man. *Contact Dermatitis*, 36:285-290.
- Lee SH, Elias PM, Proksch E, Menon GK, Mao-Quiang M, Feingold KR. 1992. Calcium and potassium are important regulators of barrier homeostasis in murine epidermis. *J Invest Dermatol*, 89:530-538.
- Lehmann P, Holzle E, Melnik B, Plewig G. 1991. Effects of ultraviolet A and B on the skin barrier: a functional, electron microscopic and lipid biochemical study. *Photodermatol Photoimmunol Photomed*, 8:129-134.
- Long SA, Wertz PW, Strauss JS, Downing DT. 1985. Human Stratum corneum polar lipids and desquamation. *Arch Dermatol Res*, 277:284-287.
- Macheleidt O, Kaiser HW, Sandhoff K. 2002. Deficiency of epidermal protein-bound omega-hydroxyceramides in atopic dermatitis. *J Invest Dermatol*, 119:166-173.
- Madison KC, Swartzendruber DC, Wertz PW, Downing DT. 1987. Presence of intact intercellular lamellae in the upper layers of the Stratum corneum. *J Invest Dermatol*, 88:714-718.
- Mao-Quiang M, Feingold KR, Jain M, Elias PM. 1995. Extracellular processing of phospholipids is required for permeability barrier homeostasis. *J Lipid Res*, 36:1925-1935.
- Mao-Quiang M, Mauro T, Bench G, Warren R, Elias PM, Feingold KR. 1997. Calcium and potassium inhibit barrier recovery after disruption, independent of the type of insult in hairless mice. *Exp Dermatol*, 6:36-40.
- Mathias CGT, Wilson DM, Maibach HI. 1981. Transepidermal water loss as a function of skin surface temperature. *J Invest Dermatol*, 77:219-220.
- McOsker DE, W BL. 1967. Characteristics of accommodated (hardened) skin. *J Invest Dermatol*, 48:372-383.

- Meguro S, Arai Y, Masukawa Y, Uie K. 2000. Relationship between covalently bound ceramides and transepidermal water loss. *Arch Dermatol Res*, 292:463-468.
- Melton J, al e. 1987. Effects of essential fatty acid deficiency on epidermal O-acylsphingolipids and transepidermal water loss in young pigs. *Biochim Biophys Acta*, 921:191.
- Menon GK. 1992. Lamellar body secretory response to barrier disruption. *J Invest Dermatol*, 98:279.
- Menon GK, Feingold KR, Moser AH, Brown BE, Elias PM. 1985. De novo sterologenesi in the skin. II. Regulation by cutaneous barrier requirements. *J Lipid Res*, 26:418-427.
- Mizushima H, Fukasawa J, Suzuki T. 1996. Phase behavior of artificial Stratum corneum lipids containing a synthetic pseudo-ceramide: a study of the function of cholesterol. *J Lipid Res*, 37:361-367.
- Möller H. 1990. Nickel dermatitis: problems solved and unsolved. *Contact Dermatitis*, 23:217-220.
- Motta S, Monti M, Sesana S, Caputo R, Carelli S, Ghidoni R. 1993. Ceramide composition of the psoriatic scale. *Biochim Biophys Acta*, 1182:147-151.
- Nettis E, Colanardi MC, Soccio AL, Ferrannini A, Tursi A. 2002. Occupational irritant and allergic contact dermatitis among healthcare workers. *Contact Dermatitis*, 46 (2):101-107.
- Nilsson GE. 1977. Measurement of water exchange through skin. *Med Biol Eng Comput*, 15:209-218.
- Norlen L. 2001. Skin barrier structure and function: the single gel phase model. *J Invest Dermatol*, 117:830-836.
- Norlen L. 2001. Skin barrier formation: the membrane folding model. *J Invest Dermatol*, 117:823-829.
- Norlen L, Nicander I, Rozell BL, Ollmar S, Forslind B. 1999. Inter- and Intra-Individual Differences in Human Stratum corneum Lipid Content Related to Physical Parameters of Skin Barrier Function In Vivo. *J Invest Dermatol*, 112:72-77.
- Pierard GE. 1998. EEMCO guidance for the assessment of skin colour. *J Acad Dermatol Venereol*, 10:1 -11.
- Pilgram G, Vissers DC, van der Meulen H, Pavel S, Lavrijsen SP, Bouwstra JA,

- Koerten H. 2001. Aberrant Lipid Organisation in Stratum Corneum of Patients with Atopic Dermatitis and Lamellar Ichthyosis. *J Invest Dermatol*, 117:710-717.
- Pinnagoda J, Tupker RA, Agner T, Serup J. 1990. Guidelines for transepidermal water loss (TEWL) measurement. A report from the Standardization Group of the European Society of Contact Dermatitis. *Contact Dermatitis*, 22 (3):164-178.
- Ponec M, Boelsma E, Weerheim A. 2000. Covalently bound lipids in reconstructed human epithelia. *Acta Derm Venereol*, 80:89-93.
- Proksch E. 1990. Die Epidermis als metabolisch aktives Gewebe: Regelung der Lipidsynthese durch die Barrierefunktion. *Z Hautkr*, 65:296-300.
- Robson KJ, Stewart ME, Michelsen S, Lazo ND, Downing DT. 1994. 6-Hydroxy-4-sphingenine in human epidermal ceramides. *J Lipid Res*, 35:2060-2068.
- Rogers J, Harding C, Mayo A, Banks J, Rawlings A. 1996. Stratum corneum lipids: The effect of ageing and the seasons. *Arch Dermatol Res*, 288:765-770.
- Rogiers V. 2001. EEMCO guidance for the assessment of transepidermal water loss in cosmetic sciences. *Skin Pharmacol Appl Skin Physiol*, 14:117-128.
- Schreiner V, Gooris G, Pfeiffer S, Lanzendörfer G, Wenck H, Diembeck W, Proksch E, Bouwstra J. 2000. Barrier characteristics of different human skin types investigated with X-ray diffraction, lipid analysis and electron microscopy imaging. *J Invest Dermatol*, 114:654-660.
- Schwindt DA, Wilhelm KP, Miller DL, Maibach HI. 1998. Cumulative irritation in older and younger skin: a comparison. *Acta Derm Venereol*, 78:279-283.
- Stewart ME, Downing DT. 1999. A new 6-hydroxy-4-sphingenine-containing ceramide in human skin. *J Lipid Res*, 40:1434-1439.
- Streit M, Braathen LR. 2001. Contact Dermatitis: clinics and pathology. *Acta Odontol Scand*, 59:309-314.
- Swartzendruber DC, Wertz PW, Madison KC, Downing DT. 1987. Evidence that the corneocyte has a chemically bound lipid envelope. *J Invest Dermatol*, 88:709-713.
- Swartzendruber DC, Wertz PW, Kitko KC, Madison KC, Downing DT. 1989. Molecular models of intercellular lipid lamellae in mammalian Stratum corneum. *J Invest Dermatol*, 92:251-257.

- Tanaka M, Zhen YX, Tagami H. 1997. Normal recovery of the Stratum corneum barrier function following damage induced by tape stripping in patients with atopic dermatitis. *Br J Dermatol*, 136:332-336.
- Tupker RA, Pinnagoda J, Coenraads PJ, Nater JP. 1989. The influence of repeated exposure to surfactants on the human skin as determined by transepidermal water loss and visual scoring. *Contact Dermatitis*, 20:108-114.
- Tupker RA, Pinnagoda J, Coenraads PJ, Nater JP. 1990. Susceptibility to irritants: role of barrier function, skin dryness and history of atopic dermatitis. *Br J Dermatol*, 123:199-205.
- van der Valk PG, Maibach HI. 1989. Potential for irritation increases from the wrist to the cubital fossa. *Br J Dermatol*, 121:709-712.
- van der Valk PG, Maibach HI. 1990. A functional study of the skin barrier to evaporative water loss by means of repeated cellophane-tape stripping. *Clin Exp Derm*, 15:180-182.
- Voigtländer V. 1998. Toxische Kontaktekzeme. In: Hrsg. *Dermatologie*. 4te Aufl. Stuttgart: Hippokrates, 493.
- Wahlberg JE, Maibach HI. 1980. Nonanionic acid irritation - A positive control at routine patch testing? *Contact Dermatitis*, 6:128-130.
- Webster D, France JT, Shapiro LJ, Weiss R. 1978. It is concluded that steroid-sulphatase deficiency is the bio-chemical basis of at least some cases of X-linked ichthyosis. *Lancet*, 14:70-72.
- Weerheim AM, Ponc M. 2001. Determination of Stratum corneum lipid profile by tape stripping in combination with high-performance thin-layer chromatography. *Arch Dermatol Res*, 293:191-199.
- Welzel J, Wilhelm KP, Wolff HH. 1996. Skin permeability barrier and occlusion: no delay of repair in irritated human skin. *Contact Dermatitis*, 35:163-168.
- Wertz PW. 1992. Epidermal Lipids. *Semin Dermatol*, 11:106-113.
- Wertz PW. 2000. Lipids and the barrier function of the skin. *Acta Derm Venereol, Supp* 208:7-11.
- Wertz PW, Downing DT. 1983. Ceramides of pig epidermis: structure determination. *J Lipid Res*, 24:759-765.
- Wertz PW, Downing DT. 1987. Covalently bound omega-hydroxyacylsphingosine in the Stratum corneum. *Biochim Biophys Acta*, 917:108-111.

- Wertz PW, Madison KC, Downing DT. 1989. Covalently bound lipids of human Stratum corneum. *J Invest Dermatol*, 92:109-111.
- Wertz PW, Downing DT, Freinkel RK, Traczyk TN. 1984. Sphingolipids of the Stratum corneum and lamellar granules of fetal rat epidermis. *J Invest Dermatol*, 83 (3):193-195.
- Wertz PW, Swartzendruber DC, Madison KC, Downing DT. 1987. Composition and morphology of epidermal cyst lipids. *J Invest Dermatol*, 89:419-425.
- Wigger-Alberti W, Krebs A, Elsner P. 2000. Experimental irritant contact dermatitis due to cumulative epicutaneous exposure to sodium lauryl sulphate and toluene: single and concurrent application. *Br J Dermatol*, 143(3):551-6.
- Widmer J, Elsner P, Burg G. 1994. Skin irritant reactivity following experimental cumulative irritant contact dermatitis. *Contact Dermatitis*, 30 (1):35-39.
- Wigger-Alberti W, Elsner P. 1997. Evaporimetrie. In: Korting HC, Sterry W, Hrsg. *Diagnostische Verfahren in der Dermatologie*. Aufl. Berlin - Wien: Blackwell, 65 - 69.
- Willis C, Stephens C, Wilkinson J. 1987a. Experimentally induced contact dermatitis. Determination of optimum irritant concentrations. *Contact Dermatitis*, 18:20-24.
- Willis C, Stephens C, Wilkinson J. 1987b. Assessment of erythema in irritant contact dermatitis. *Contact Dermatitis*, 18
- Willis CM, Stephens CJ, Wilkinson JD. 1989. Epidermal damage induced by irritants in a man: a light and electron microscopy study. *J Invest Dermatol*, 93:695-699.
- Wulfhorst B. 1996a. Hardening-Effekt. Teil II. Experimentelle Induktion durch Irritantien. *Allergologie*, 12:541-549.
- Wulfhorst B. 1996b. Hardening-Effekt. Teil I. Überblick und Stand der Forschung. *Allergologie*, 11:500-508.
- Yamamoto A, Serizawa S, Ito M, Sato Y. 1991. Stratum corneum abnormalities in atopic dermatitis. *Arch Dermatol Res*, 283:219-223.
- Zettersten EM, Ghadially R, Feingold KR, Crumrine D, Elias PM. 1997. Optimal ratios of topical Stratum corneum lipids improve barrier recovery of chronologically aged skin. *J Am Acad Dermatol*, 37:403-408.

7. Anhang

Rohwerte der hautphysiologischen Messungen

Irritationsphase - Oberarmfelder

Chromametrie				TEWL				VS			
d1	d5	d12	d19	d1	d5	d12	d19	d1	d5	d12	19
10,510	17,013	23,303	15,710	13,90	54,55	80,30	33,65	0	1	3	2
7,797	11,350	13,580	14,420	17,45	39,60	38,50	51,70	0	1	2	2
5,257	7,637	13,113	8,943	12,85	33,90	50,80	23,35	0	1	3	2
6,247	17,493	11,973	17,367	10,75	95,45	39,20	68,55	0	5	2	3
6,110	15,640	14,890	14,577	12,65	68,35	55,15	68,25	0	3	2	2
7,967	15,030	16,630	16,210	11,60	43,30	42,60	32,65	0	1	2	1
7,977	19,853	16,173	21,220	14,35	72,90	38,45	69,55	0	5	3	3
8,750	14,173	18,630	13,190	13,65	38,60	44,95	35,45	0	1	3	1
5,547	4,573	6,867	12,987	11,55	15,90	30,10	74,65	0	0	1	2
8,393	10,163	9,557	11,070	12,95	36,00	33,75	38,25	0	1	1	2
7,450	18,103	17,033	15,777	19,40	86,40	37,85	46,00	0	3	2	2
5,763	16,093	14,377	15,313	12,30	80,45	44,65	38,70	0	3	2	2
6,330	11,333	13,300	12,787	13,40	60,20	50,55	46,25	0	2	2	2
4,100	6,163	6,287	10,927	9,95	29,30	18,50	52,00	0	1	1	1
7,553	11,327	13,980	14,770	11,70	27,85	43,85	33,90	0	1	2	2
5,947	5,690	9,300	17,003	12,80	23,25	44,50	71,30	0	0	1	2
5,397	13,477	13,613	10,130	15,35	84,90	52,65	39,90	0	2	2	2
8,440	9,507	13,187	12,147	12,25	20,95	54,20	37,55	0	0	2	2
7,540	12,283	12,970	12,980	12,60	35,10	36,20	42,35	0	2	2	2
8,260	10,903	13,080	10,933	15,80	38,05	38,05	38,30	0	1	1	2
6,870	12,347	13,473	14,597	13,40	57,05	48,25	33,05	0	3	3	3
8,850	9,330	13,943	17,400	15,45	42,70	56,00	73,30	0	1	2	1
9,090	14,647	17,960	17,933	18,45	51,05	51,15	36,90	0	2	3	3
10,057	13,963	22,710	13,533	15,95	38,80	71,95	33,15	0	1	3	2
6,543	12,890	15,367	15,870	14,60	37,35	38,15	49,35	0	1	2	2
4,783	7,653	13,657	11,810	13,15	35,95	73,70	27,10	0	1	3	2
6,360	19,047	10,847	20,507	12,90	89,10	37,40	64,05	0	5	2	2
6,800	14,147	14,727	14,063	12,15	58,70	50,15	63,20	0	3	3	2
8,820	14,540	16,277	14,483	15,15	55,30	34,55	34,40	0	2	3	2
7,667	21,687	15,293	21,070	13,50	76,15	38,05	67,05	0	5	3	3
8,167	12,330	19,317	14,460	12,75	39,50	54,65	38,10	0	1	3	1
5,500	4,893	6,530	14,040	11,40	15,00	21,85	82,85	0	0	1	2
8,270	11,113	12,397	15,103	14,45	45,35	35,90	37,75	0	1	2	2
8,610	12,590	12,493	16,083	16,00	61,25	34,80	43,50	0	2	2	2
5,977	7,217	7,973	13,390	10,75	23,85	24,00	52,70	0	1	1	2
6,520	10,977	12,057	13,250	12,60	37,10	38,65	49,50	0	2	2	2
3,920	8,873	8,197	11,507	9,90	41,20	26,10	40,20	0	1	1	1
6,567	10,580	13,217	13,597	10,80	31,75	38,30	33,25	0	1	2	2
6,370	13,783	15,673	19,263	12,45	36,85	39,90	56,05	0	2	2	2

Irritationsphase - Oberarmfelder

Chromametrie				TEWL				VS			
d1	d5	d12	d19	d1	d5	d12	d19	d1	d5	d12	19
5,903	14,577	11,997	9,380	20,30	97,75	49,60	51,15	0	2	2	2
8,350	9,297	15,370	10,883	12,20	20,40	67,90	33,15	0	0	2	2
8,443	10,810	11,757	12,650	11,85	29,60	38,85	45,80	0	1	2	2
8,207	18,913	15,017	16,503	15,35	105,90	39,75	57,95	0	2	1	3
6,980	11,413	14,747	14,170	15,05	41,05	51,00	34,75	0	1	1	3
7,513	10,210	12,503	13,830	13,70	46,40	49,80	47,95	0	1	2	1
8,260	11,987	15,550	14,037	16,20	49,15	44,60	29,20	0	2	3	3
9,480	17,913	17,420	14,967	13,35	71,15	38,30	30,45	0	2	2	2
6,450	12,320	12,337	11,967	17,45	59,00	44,05	52,45	0	1	2	2
4,557	7,377	12,433	8,133	12,45	39,25	46,20	18,95	0	1	3	2
5,543	18,860	15,917	14,863	11,75	109,40	50,15	51,00	0	5	3	2
6,687	13,747	14,023	14,380	13,45	66,70	60,05	68,70	0	3	3	2
7,030	14,120	13,413	14,720	11,15	36,45	32,10	34,35	0	1	2	1
7,347	22,673	15,270	21,070	13,40	77,05	39,90	75,25	0	5	4	3
8,653	10,473	15,660	13,063	12,60	37,60	46,25	32,90	0	1	2	1
5,270	5,023	7,187	13,503	13,30	16,25	28,80	88,65	0	0	1	2
9,010	9,617	9,713	9,963	11,25	27,35	29,10	31,05	0	1	1	2
7,147	14,350	14,463	12,630	17,60	79,15	38,95	34,70	0	2	2	2
6,063	8,997	10,690	13,200	11,40	38,60	33,55	41,35	0	1	1	2
6,377	12,363	15,253	14,240	12,55	56,75	58,10	48,40	0	2	3	2
4,157	10,440	8,730	11,367	9,80	56,10	25,35	37,60	0	2	2	2
5,853	10,000	10,630	12,060	10,65	28,60	33,90	32,65	0	1	2	1
6,437	8,137	13,767	15,660	12,70	31,25	43,85	50,30	0	0	1	2
5,910	14,410	12,363	9,627	14,75	85,15	42,10	34,95	0	2	2	2
9,233	9,460	15,800	13,000	12,35	23,50	75,90	35,50	0	0	3	2
8,613	8,800	11,727	11,263	15,00	37,30	44,05	44,80	0	1	2	2
7,120	9,913	12,413	8,340	14,40	36,30	33,50	29,75	0	1	1	2
7,093	16,487	19,017	14,413	16,40	65,40	64,35	35,65	0	3	3	3
7,453	10,703	11,820	14,023	14,25	53,00	45,50	42,80	0	1	2	1
8,807	8,653	16,247	16,240	14,70	39,30	69,90	39,95	0	1	3	3

Irritationsphase - Unterarmfelder

Chromametrie				TEWL				VS			
d1	d5	d12	d19	d1	d5	d12	d19	d1	d5	d12	d19
11,007	14,163	21,307	13,560	12,40	33,65	60,75	29,10	0	1	2	1
7,590	7,793	10,790	16,523	12,60	19,35	34,45	40,95	0	0	1	3
4,590	6,413	10,460	7,390	12,00	38,75	33,30	24,30	0	1	2	2
5,357	14,013	14,143	11,980	13,25	53,15	38,80	28,75	0	2	2	2
6,080	10,557	12,600	10,767	12,75	41,55	47,75	43,80	0	1	2	1
10,553	9,783	12,550	14,343	13,10	26,10	33,90	37,20	0	1	1	1
7,593	13,567	14,737	20,040	14,40	50,60	43,90	68,70	0	2	2	2
7,907	10,897	15,260	15,177	14,50	26,75	36,95	41,00	0	0	2	1
5,400	5,680	7,117	9,920	11,85	16,15	28,05	58,00	0	0	1	2
7,193	8,107	8,010	10,173	8,35	19,75	27,95	27,65	0	0	1	1
9,253	12,817	17,217	13,007	15,65	61,50	40,35	32,80	0	2	2	2
4,797	5,730	7,573	9,387	11,90	18,05	28,80	32,65	0	1	1	1
6,130	8,547	9,843	10,087	10,75	20,10	40,45	36,60	0	1	1	1
4,757	8,703	9,293	11,230	9,70	48,95	38,10	39,40	0	2	2	2
7,753	8,420	9,607	11,107	10,90	32,00	26,70	34,20	0	1	1	1
7,230	6,437	8,830	15,117	13,90	21,80	32,80	43,45	0	1	1	2
5,863	8,203	14,703	10,140	13,55	38,00	59,65	23,80	0	1	2	2
7,733	7,203	11,923	8,830	12,25	18,50	51,30	35,90	0	0	1	1
8,933	10,507	11,043	11,120	12,30	33,60	32,80	35,60	0	1	1	2
7,907	8,493	8,030	8,447	15,85	30,50	24,40	28,40	0	1	1	1
6,580	9,537	16,723	13,320	12,75	33,15	51,30	20,50	0	1	2	2
7,273	8,463	10,157	10,887	14,35	27,65	44,00	33,85	0	0	1	2
8,840	10,857	9,730	11,013	13,85	21,55	21,10	23,20	0	1	1	2
10,937	11,750	17,027	14,397	13,20	33,70	58,35	38,05	0	1	2	1
6,473	9,553	11,567	13,730	14,75	35,95	39,75	33,20	0	1	2	2
4,330	6,093	9,960	8,587	10,50	26,55	35,95	23,70	0	1	2	2
6,800	14,000	13,267	9,690	14,65	55,80	42,60	38,30	0	2	2	1
6,850	11,027	15,600	15,790	12,15	45,05	50,95	59,60	0	1	2	2
7,477	10,063	12,377	12,510	13,75	27,70	32,40	32,30	0	1	1	1
8,170	15,590	16,350	18,433	13,35	43,15	50,85	54,65	0	2	2	2
8,530	10,747	13,393	14,037	13,90	24,25	35,60	39,50	0	0	1	1
5,337	5,730	6,533	10,710	11,10	14,95	23,80	63,95	0	0	0	2
9,173	8,703	9,637	10,433	12,05	18,15	30,55	30,50	0	0	1	1
7,540	15,833	13,743	14,917	17,80	90,45	41,40	38,90	0	2	2	2
5,580	7,247	16,433	13,577	11,20	26,75	55,15	32,00	0	1	3	1
6,400	8,100	9,267	10,567	10,45	22,10	37,35	32,20	0	1	1	1
4,500	9,113	8,527	11,497	10,70	50,60	45,00	46,50	0	1	1	1
6,863	7,183	12,730	12,643	11,85	22,75	44,00	31,60	0	1	2	1
5,897	6,457	7,543	13,280	11,05	17,10	29,20	46,05	0	1	1	2
5,653	7,673	16,127	8,680	14,65	34,05	60,10	25,75	0	1	3	2

Irritationsphase - Unterarmfelder

Chromametrie				TEWL				VS			
d1	d5	d12	d19	d1	d5	d12	d19	d1	d5	d12	d19
7,753	8,433	12,080	9,370	11,45	23,45	46,40	30,30	0	0	1	1
8,050	8,323	10,147	10,973	13,50	22,55	29,50	40,15	0	1	1	2
6,320	8,707	10,403	9,563	15,25	33,40	34,65	28,45	0	1	1	1
5,497	6,897	14,033	10,983	11,60	24,05	23,95	23,50	0	1	2	2
7,517	9,790	8,557	13,063	13,05	27,10	34,60	43,55	0	0	1	2
6,727	9,467	9,820	9,930	14,60	25,90	28,60	27,30	0	1	1	2
9,540	12,433	15,310	16,280	12,75	29,15	50,65	33,45	0	1	2	1
7,343	7,910	7,723	15,330	14,25	26,30	36,60	45,20	0	0	1	3
4,237	7,163	12,007	8,320	11,85	32,50	46,40	23,95	0	1	2	2
6,223	13,633	15,077	11,097	14,10	59,30	45,15	37,60	0	2	2	1
8,057	11,367	16,223	17,417	12,05	43,10	50,25	69,70	0	1	2	1
7,933	9,987	12,063	13,530	13,05	34,80	28,10	37,85	0	1	1	1
7,907	15,057	16,090	16,430	13,65	39,60	43,65	48,00	0	2	2	2
7,607	9,473	12,300	12,053	15,00	24,80	33,45	36,50	0	0	1	1
4,460	4,327	5,947	11,840	9,95	14,00	21,55	77,80	0	0	0	2
8,057	7,067	8,203	9,270	9,70	18,75	25,65	26,65	0	0	1	1
6,883	16,057	15,243	15,450	16,45	85,60	43,80	43,40	0	2	2	2
5,140	6,680	16,433	13,510	10,50	27,95	51,20	31,95	0	1	3	1
6,653	7,337	9,303	11,583	11,05	25,05	38,55	45,50	0	1	1	1
5,250	9,123	9,587	10,600	8,85	38,05	36,60	39,00	0	2	2	2
7,353	8,220	10,473	11,683	10,70	25,60	41,55	32,35	0	1	1	1
7,713	15,127	12,240	14,477	13,15	44,45	38,95	46,00	0	2	2	2
5,800	7,520	16,750	10,553	13,05	36,20	71,70	29,40	0	1	2	2
7,547	8,093	12,303	8,990	11,25	19,60	48,25	31,80	0	0	1	1
6,927	8,313	10,767	9,827	13,90	32,65	37,40	43,10	0	1	1	2
7,617	9,440	9,933	9,733	15,65	38,80	30,30	40,40	0	1	1	1
6,073	7,810	14,277	11,860	12,25	42,65	51,55	27,70	0	1	3	2
7,397	7,380	8,907	11,093	13,20	28,20	33,60	32,30	0	0	1	2
7,513	10,203	11,573	14,697	15,50	25,80	39,05	32,85	0	1	1	2

Reprovokationsphase

Chromametrie											
icd		nicd		icd		nicd		icd		nicd	
d43	d44	d43	d44	d64	d65	d64	d65	d85	d86	d85	d86
11,09	19,22	8,74	15,48	9,78	18,81	8,32	16,58	9,98	17,63	9,08	15,25
9,20	16,21	6,56	13,63	7,34	12,84	7,23	13,12	6,56	17,24	6,23	15,51
6,14	10,92	4,99	7,29	7,10	9,34	5,67		7,16	14,64	6,60	9,56
9,40	9,84	6,61	7,77	7,14	16,86	5,33	12,15	7,87	14,70	5,58	12,09
7,26	9,46	7,25	8,85	7,74	13,54	6,46	9,48	6,98	9,77	7,69	10,86
9,39	10,40	9,33	9,59	7,75	11,61	7,78	10,64	6,61	9,38	8,62	7,73
9,80	11,00	9,61	10,41	8,68	21,07	8,56	14,35	7,99	17,35	8,00	16,97
10,34	17,92	9,47	12,61	9,60	17,38	8,90	15,50	7,33	17,00	7,37	15,64
5,62	11,15	5,35	9,27	4,97	7,95	4,95	8,74	4,88	8,80	5,15	9,17
7,85	15,15	5,22	13,51	6,54	15,71	5,89	12,69	6,54	10,70	6,55	12,01
8,16	18,13	6,97	15,88	7,32	13,76	6,92	14,55	6,63	13,81	6,70	15,60
6,22	15,80	5,90	11,50	8,02	12,61	7,41	12,37	5,89	9,97	5,50	10,51
6,86	9,24	6,40	10,04	7,10	14,64	6,50	10,40	7,94	10,56	6,15	10,00
3,95	9,12	3,61	8,02	4,71	10,52	4,51	11,19	4,51	13,49	4,12	8,36
8,65	11,59	7,87	9,50	8,51	13,41	7,50	13,72	6,17	6,81	5,66	8,09
7,20	12,05	5,07	6,65	7,69	16,68	7,73	15,47	6,88	15,81	7,10	10,58
5,62	11,45	5,48	9,97	5,92	14,57	4,90	10,77	6,22	14,58	5,11	11,65
8,99	12,02	8,18	10,49	7,88	10,99	9,34	10,53	10,11	11,07	9,18	11,28
8,33	12,10	6,74	11,12	6,92	10,17	7,18	9,91	7,11	9,51	6,99	8,97
8,20	12,80	8,77	12,20	7,52	14,44	6,28	14,72	6,76	8,71	7,32	10,41
9,66	15,36	7,37	15,90	7,81		6,90	16,39				
9,22	17,45	8,24	16,12	8,85	16,53	10,64	17,10	7,23	13,60	6,57	14,74
11,45	17,48	9,76	17,41	9,82	16,81	8,07	14,29	7,21	16,89	7,33	13,75

TEWL

icd		nicd		icd		nicd		icd		nicd	
d43	d44	d43	d44	d64	d65	d64	d65	d85	d86	d85	d86
14,40	91,45	17,80	104,60	16,50	102,75	16,65	95,70	13,50	62,00	16,30	81,60
20,25	98,00	14,95	94,50	16,55	61,95	15,75	59,55	18,90	74,40	16,40	69,15
12,50	37,15	10,15	30,30	14,65	44,15	14,90		13,85	30,30	12,20	21,30
13,55	16,75	15,45	19,85	13,70	90,20	13,10	109,75	15,80	73,60	16,10	101,55
15,40	21,85	15,00	26,05	11,85	83,30	11,10	106,70	11,60	62,55	13,60	101,85
13,10	15,50	13,70	17,75	10,65	27,55	10,95	44,25	11,30	28,25	14,95	34,05
13,60	19,30	14,20	18,00	11,45	78,70	10,90	98,10	12,60	95,55	14,50	111,15
16,05	33,00	15,80	23,30	11,95	92,60	15,25	115,70	14,30	67,00	14,50	98,80
12,75	51,55	10,95	37,10	11,10	36,20	11,85	48,30	12,20	52,20	12,75	43,90
11,50	57,10	13,45	85,80	13,95	76,95	15,70	98,25	10,90	26,55	16,20	75,40
15,90	70,90	16,00	88,15	20,15	101,60	21,80	82,95	13,50	79,00	20,70	120,05
14,50	86,65	14,50	95,40	14,10	65,60	14,85	109,25	13,40	42,65	12,55	105,15
13,55	31,45	13,55	53,25	11,75	33,35	12,40	106,15	12,45	33,20	12,30	80,10
13,15	61,30	14,50	71,60	11,40	59,80	12,70	92,60	11,90	74,90	12,40	94,55
13,90	42,30	12,50	31,40	12,20	49,80	11,80	80,90	12,50	29,25	12,50	50,20
17,20	66,50	13,50	27,20	14,15	68,60	13,00	75,25	13,75	61,15	11,85	31,05
14,25	89,65	12,15	95,90	20,15	116,90	17,25	86,95	14,35	74,45	13,20	65,75
12,75	34,25	13,05	33,95	13,55	40,55	11,30	30,45	13,15	33,15	13,25	36,05
14,70	50,95	13,75	92,25	14,80	37,85	15,30	40,15	14,45	38,60	13,85	35,20
12,60	78,35	14,45	77,65	15,80	66,70	15,00	70,05	12,75	49,20	13,60	40,95
16,10	79,25	13,60	97,35	14,35	89,05	14,40	49,30				
17,20	88,40	13,95	120,65	15,30	75,60	17,40	102,90	12,95	91,20	16,50	65,85
15,70	42,95	20,80	85,10	14,75	68,15	14,70	71,45	18,70	51,35	18,30	62,15

VS	icd	nicd									
d43	d44	d43	d44	d64	d65	d64	d65	d85	d86	d85	d86
1	3	0	3	0	3	0	2	0	3	0	2
0	3	0	2	0	3	0	2	0	3	0	3
0	2	0	1	0	2	0	0	0	2	0	1
0	0	0	0	0	4	0	2	0	3	0	2
0	1	0	1	0	4	0	4	0	1	0	1
0	0	0	0	0	1	0	1	0	1	0	1
0	1	0	1	0	4	0	4	0	2	0	2
0	1	0	1	0	4	1	4	0	3	0	2
0	1	0	1	0	1	0	1	0	2	0	2
0	1	0	2	0	3	0	2	0	1	0	1
0	3	0	3	0	1	0	2	0	2	0	3
0	4	0	2	0	2	0	2	0	2	0	2
0	1	0	1	0	3	0		0	2	0	2
0	2	0	2	0	2	0	2	0	3	0	2
0	2	0	1	0	3	0	2	0	1	0	1
0	2	0	1	0	3	0	2	0	1	0	1
0	3	0	2	0	3	0	2	0	3	0	2
0	2	0	1	0	3	0	2	0	1	0	1
0	3	0	2	0	1	0	1	0	1	0	1
0	2	0	2	0	2	0	2	0	1	0	1
0	3	0	2	0		0					
0	2	0	2	0	3	0	2	0	3	0	2
0	2	0	2	0	3	0	2	0	2	0	2

Lipidanalyse

Probe 1 [µg]
d 1

Ceramid 7	Ceramid 6	Ceramid 5	Ceramid 4	Ceramid 3	Ceramid 2	Ceramid 1	Cer total	Cholesterol	fFS	Lipide total
1,05829474	0,53137233	1,30170047	0,19775744	1,09266473	0,81009762	1,13427008	6,12615741	8,03470756	24,0756078	38,2364728
0,65281326	0,15097378	0,45300765	0,08691572	0,28636409	0,11397558	0,08998764	1,83403772	2,44371058	5,04680993	9,32455823
4,20260651	0,54523697	1,54289033	0,89146439	0,8302986	5,30818209	19,6526471	32,973326	7,98991186	23,9570586	64,9202966
1,31528227	0,60043463	1,16606023	0,42121384	0,6652622	0,84107429	0,43226754	5,441595	2,58368012	10,0420567	18,0673318
1,35036444	0,276659	1,53861127	0,37993675	1,17825341	0,46807884	0,48868168	5,68058539	9,32547877	11,5022929	26,508357
0,21569261	0,68490541	1,00948122	0,32054767	0,12893969	0,56976182	0,72015934	3,64948775	5,62953149	10,7645331	20,0435524
2,12805292	1,56044558	0,41201141	0,58078392	1,22848207	0,55277541	0,10346844	6,56601975	4,57232037	20,1048807	31,2432208
0,39363103	1,34437126	1,55225225	0,43687672	1,04620223	1,27129611	0,92960637	6,97423597	5,14871637	10,7407767	22,863729
2,48315483	0,84662017	3,39675859	0,60727608	2,20140033	2,72523568	1,37530883	13,6357545	6,9296033	19,5537512	40,119109
1,7928916	0,60049762	1,27929455	0,30233049	0,8568651	1,00322949	1,24043019	7,07533906	18,7174976	21,1798578	46,9726945
1,50289989	0,29978384	1,40445072	1,13824696	0,48784731	1,18832521	0,31163709	6,33319101	4,66020557	14,3358742	25,3292708
1,33655841	0,82958847	1,51679369	0,46830722	1,16763346	1,00882785	0,87609454	7,20380364	5,72795719	11,7861848	24,7179456
1,62272604	0,8924135	1,83980877	0,45704849	1,63427632	1,20905153	1,150152	8,80547666	5,23285094	7,58922067	21,6275483
1,52722377	0,22904172	0,2358812	0,98482145	0,68503472	0,98482145	1,77391103	6,42073534	5,66510769	73,2124609	85,2983039
0,77700584	0,34330349	0,61875045	0,21289102	0,24645892	0,3094944	0,3094944	2,70717418	4,25798729	21,2884262	14,2819819
0,57710393	0,14665146	0,57646432	0,14171357	0,21351184	0,50249509	0,48851677	2,64645698	3,06482152	75,1282594	80,8395379
1,67503753	0,72312521	2,42360787	0,95976821	2,2664484	0,3218506	3,40773443	11,7775723	15,6473817	206,416829	233,841783
2,83230343	1,87959918	2,51567206	0,91995734	2,87572495	52,7176243	4,60346235	67,5643436	12,5498304	36,2932634	116,407437
1,55464161	0,65355005	1,74450531	0,62069789	1,87561843	2,62517395	1,87880288	10,9529901	11,3024982	43,5108905	65,7663787
1,86686731	0,36007218	2,06800279	0,30084332	1,65795366	3,22979232	4,85298004	14,3365116	5,42766966	33,3019856	53,0661668
1,42719933	0,52349094	1,67810906	0,46930809	1,11042427	2,48621574	1,78255951	9,47730695	6,65442015	25,0093811	41,1411082
6,13024891	0,73325471	4,39386903	1,48293564	2,6350665	0,84220783	3,33834122	19,5559238	16,3244762	186,346855	222,227255

Probe1[µg]
d 43

Ceramid 7	Ceramid 6	Ceramid 5	Ceramid 4	Ceramid 3	Ceramid 2	Ceramid 1	Cer total	Cholesterol	fFS	Lipide total
4,00886631	0,8702548	4,02630787	1,23959157	3,26323628	1,79387964	2,03791029	17,2400468	5,95043518	16,5870571	39,7775391
1,56198341	0,48199248	1,36216555	0,39585888	1,73604571	3,86157844	12,6448891	22,0445135	8,67971157	50,8249404	81,5491656
1,57810042	0,60300349	2,301207	1,14325002	1,81269713	1,63167531	1,74398254	10,8139159	18,6286471	21,2884262	50,7309892
2,32393925	1,2522655	2,48749864	0,73374233	1,53096259	1,98392861	1,66816689	11,9805038	7,79684066	34,2154381	53,9927826
3,61952631	0,73641344	1,9854453	0,41339601	1,08046583	1,73230507	1,73230507	11,299857	3,44753448	47,5217792	62,2691707
0,8973851	1,50129047	1,97786413	0,91301982	3,12022131	4,1018959	6,34452791	18,8562046	21,4921494	53,5577081	93,9060621
3,14138302	0,67848529	2,93578405	0,51984341	2,29497479	2,79050566	1,69686762	14,0578438	9,34291087	41,2995549	64,7003096
6,91137738	1,57309001	5,13630156	2,76266932	4,61758581	14,462454	70,6037727	106,067251	12,069073	43,5819379	161,718262
1,21218768	0,26929978	1,2755438	0,50679722	1,18416087	0,3516423	1,0176765	5,81730814	30,5940614	7,19844674	43,6018163
0,9799238	0,21986309	1,37277973	0,52441386	1,3635115	1,34144553	0,39920802	6,20114552	10,1733671	6,0145218	22,3890344
0,78730754	0,44701701	0,63015026	0,08806349	1,05695837	2,0659816	2,83486787	6,05096269	219,80394	7,44814427	233,303047
1,37862817	0,47522806	1,4416548	0,77149339	0,51562165	0,73725083	0,95522241	6,27509932	11,1483965	12,2107854	29,6342813
2,87970258	1,0711057	3,47263947	1,77263689	1,57504535	2,26092806	2,24379051	15,2758486	12,3142318	16,15472	43,7448004
1,65470682	0,54998011	2,16792169	1,02667519	1,45403024	2,3524106	2,3399988	11,5457234	20,0401771	27,4823368	59,0682368
0,69192058	0,30445415	0,66342576	0,24775863	0,52052521	1,1891516	1,33977048	4,9570064	9,05443023	23,9732685	37,9847051
1,05331805	0,39415688	1,25848553	0,61646454	0,86214056	2,25887058	2,4888835	8,93231964	13,9807218	28,7098791	51,6229206
4,17679712	2,23231829	4,1666636	0,85432031	2,05489011	3,47333264	2,70416679	19,6624889	31,6051799	42,5047208	93,7273896
3,6727789	1,32801276	2,80521685	1,08453173	1,67826091	5,52674625	2,96122394	19,0567713	22,9919221	32,4473116	74,4960051
1,82311599	0,55861603	1,36742638	0,39709479	0,83459982	2,09269798	1,56065181	8,6342028	10,5927925	28,6134172	47,8404126
0,8197672	0,22611245	0,75400139	0,2177302	0,23210324	0,90040251	1,03253337	4,18265036	6,96348407	12,1739092	23,3200436
1,11111765	0,88458049	2,53467802	1,36796264	2,13841598	3,70470691	1,16739616	12,9088579	16,3778088	50,0793515	79,3660181
4,53766464	2,50499592	5,16646076	2,37492223	3,30536782	2,82571977	2,12825108	22,8433822	15,7895927	43,912035	82,5450099

Probe 1[µg]
d 64

Ceramid 7	Ceramid 6	Ceramid 5	Ceramid 4	Ceramid 3	Ceramid 2	Ceramid 1	Cer total	Cholesterol	fFS	Lipide total
0,91348856	0,36757558	1,43047832	0,41087289	1,07287684	1,4846473	1,24579116	6,92573065	12,0698544	22,7818528	41,7774379
0,97282663	0,36189357	1,35624678	0,51630555	1,25557098	1,92738909	2,80169793	9,19193053	6,53922501	20,2996938	36,0308493
2,31295176	0,28453315	1,16151344	1,70122639	0,15994819	0,3811524	0,20930437	6,21062971	11,3107188	12,0019897	29,5233382
1,588365	0,82595725	1,53603863	0,57359723	0,80681665	0,61475597	0,66725449	6,61278521	7,05200404	11,1198294	24,7846186
1,55694612	0,51798477	1,43270037	0,41706943	0,76578889	1,44974769	1,80721001	7,9474473	9,37111812	25,5353606	42,8539261
1,23336938	0,41500361	1,65893509	0,53672882	0,93921198	1,51963282	1,37577761	7,67865931	12,7427515	23,9430962	44,364507
0,90326312	0,31999254	0,84872057	0,15396559	0,72675378	1,26880857	2,5821293	6,80363347	9,83864146	15,65269	32,2949649
2,99580364	0,98500601	2,55944346	0,75237513	1,12858708	2,11230345	0,96426645	11,4978392	12,0144548	12,5397241	36,0520181
3,41594246	1,45635707	4,63004465	1,75639988	1,07484729	0,96701402	0,97636195	14,2769673	46,2301184	7,88603443	68,3931202
3,43530367	1,39522612	3,26720543	1,16785813	1,57099696	2,25673772	1,05201432	14,1453424	11,2712619	15,2560684	40,6726726
1,2260955	0,99239975	1,64114594	0,23015856	0,57017308	0,32087774	0,33369757	5,31454813	9,53361366	13,1994784	28,0476402
1,31794233	0,7877989	0,73968947	0,24417913	0,34011143	0,32023702	0,62756535	4,37752322	8,7222668	4,4349315	17,5347212
1,98439726	0,70025995	1,81187149	0,58710814	0,93367323	1,06812832	0,9036989	8,06580533	13,1893777	11,1690959	32,4242789
1,54702421	0,35656455	2,4387736	1,08664538	2,02530477	3,66822373	3,19965605	14,3221923	25,6323741	24,1664521	64,1210184
1,72069583	0,78850614	1,78737648	0,70119769	1,34115371	2,88820629	1,99293017	11,2200663	9,30060799	97,7442126	118,264887
1,0199246	0,37611288	1,36757555	0,42330371	0,92310442	2,00567644	1,79900005	7,91469765	10,5197945	44,4294252	62,8639173
1,40537839	0,49201593	1,4903875	0,3024842	0,99913139	1,30457202	0,78451837	6,77848781	7,1751292	15,820828	29,774445
0,62433369	0,18395681	0,85615038	0,26725973	0,32176037	1,29520243	0,5963753	4,1450387	6,44842777	10,0424403	20,6359068
2,04397267	0,5042021	2,58424857	0,91758898	1,51269486	2,20893929	1,94106335	11,7589279	21,7431556	66,5617904	100,063874
1,69218539	0,32883946	1,84405784	0,65639899	0,87809997	2,28319185	0,60235865	8,28513214	7,48527968	18,0943588	33,8647706
0,18562429	0,03910373	0,30138688	0,12214492	0,15453863	0,48976809	0,28742755	1,57999408	8,11901925	17,1654331	26,8644465
0,73439108	0,40126007	0,96437831	0,21565337	0,50186838	0,78995511	0,50647012	4,11397644	7,86538673	76,2329702	88,2123334

Probe 1 [µg]
d 85

Ceramid 7	Ceramid 6	Ceramid 5	Ceramid 4	Ceramid 3	Ceramid 2	Ceramid 1	Cer total	Cholesterol	fFS	Lipide total
1,22016841	0,34273381	1,45240802	0,37989486	0,68315645	0,63358823	0,94386514	5,65581492	9,73120809	16,7857201	32,1727431
0,88428424	0,29042217	0,63587324	0,33000278	0,84354406	2,4191229	2,31109049	7,71433987	5,02471058	15,1714182	27,9104686
1,41588837	0,49947252	1,23092422	0,4106949	1,27042838	3,53983836	17,3540566	25,7213033	6,56848592	14,2440087	46,533798
0,09541246	0,02037259	0,14524993	0,09016147	0,11716157	0,14253673	0,20401533	0,81491008	14,6579143	17,5907577	33,0635821
2,00136238	0,37290979	2,62184178	0,86946947	1,46345512	1,86209124	0,80258908	9,99371886	12,1940511	12,5290473	34,7168173
1,38651108	0,44704887	1,58808096	0,73888223	0,71341606	0,62307551	0,37135864	5,86837336	4,73687039	11,6449233	22,250167
0,17873814	0,03868075	0,25682797	0,12869904	0,19538945	0,32251562	0,30342457	1,42427553	16,1728419	24,9269493	42,5240667
0,34779443	0,06904939	0,39622669	0,14639259	0,16254957	0,30983197	0,2511844	1,68302904	24,246295	19,7661012	45,6954253
0,88924678	0,28442641	1,25471006	0,32307754	0,17254807	2,5441035	0,57278243	6,0408948	7,68906528	18,8711052	32,6010653
0,8409585	0,24929876	0,79012778	0,19181902	0,2363935	1,62479517	1,16007923	5,09347196	25,6907866	16,0916897	46,8759483
0,8922026	0,1505638	1,01398152	0,25766402	0,23715187	1,39744823	0,96516039	4,91417242	11,0753163	16,992143	32,9816317
0,86058557	0,09496741	0,62973158	0,21690828	0,16248846	0,54855361	0,622077	3,13558192	8,69951628	12,7733291	24,6084273
0,73949549	0,28645767	1,10639844	0,34074806	0,80638138	0,86085557	1,22476416	5,36510076	12,2102367	7,41971233	24,9950498
2,39252993	0,35503884	0,90702369	0,75565636	0,54163972	0,86369183	0,93837175	6,75395211	12,5116335	8,30178701	27,5673727
1,63238504	0,49610383	0,62694756	0,54647904	0,55339562	0,40006025	0,37139136	4,6267627	9,00316238	13,6956809	27,3265059
1,83501567	0,42689534	2,11336893	1,41401326	1,44717959	3,48082236	2,06405878	12,7813539	13,0714804	69,51429981	95,3658325
2,13900454	0,36948344	2,90610755	2,03103114	1,05042502	3,30226667	4,13630809	15,9346265	8,28560885	27,1257259	51,3459612
2,04758556	1,15765765	2,40076131	0,41987342	1,20546155	3,67422605	2,50676392	13,4123295	8,04946566	15,4532644	36,9150595
1,07226695	0,43905929	1,51502337	0,44021837	1,29208281	2,62546742	1,78607327	9,17019147	16,5443979	24,63102	50,3456094
0,75710036	0,22131186	0,98791111	0,28584115	0,77077334	2,84189954	1,67023185	7,53506921	8,91312902	27,5608052	44,0090034
1,7075784	0,5593483	1,14605649	0,29759122	0,56057866	1,40372412	1,24110677	6,91598395	6,71183851	22,9840767	43,5278831
3,83680716	1,06642086	4,05625096	0,5255607	1,83261473	3,57741354	3,47589766	18,3709656	23,0767536	71,8886747	131,707359

Probe 1 [%]
d1

Ceramid 7	Ceramid 6	Ceramid 5	Ceramid 4	Ceramid 3	Ceramid 2	Ceramid 1	Cer total	Cholesterol	fFS
2,76776245	1,38970018	3,40434243	0,51719583	2,85765044	2,11865155	2,96646106	16,0217639	21,0132028	62,9650333
7,00101004	1,61909852	4,85822107	0,9321162	3,0710741	1,22231615	0,96506058	19,6688967	26,2072531	54,1238502
6,47348632	0,83985595	2,37659162	1,37316747	1,27895072	8,17646001	30,2719615	50,7904735	12,3072633	36,9022631
7,27989214	3,32331656	6,45397027	2,33135608	3,68212754	4,65522138	2,39253666	30,1184206	14,300286	55,5811934
5,09410839	1,04366708	5,80424985	1,43327159	4,44483758	1,76577838	1,84350044	21,4294133	35,1793918	43,3911299
1,07611968	3,41708593	5,03643865	1,59925581	0,64329758	2,84261894	3,59297255	18,2077891	28,0864958	53,7057151
6,81124693	4,99450933	1,3187226	1,85891179	3,93199562	1,76926513	0,33117084	21,0158222	14,6345999	64,3495778
1,72163969	5,87992998	6,78914734	1,91078509	4,57581626	5,56031831	4,06585631	30,503493	22,5191454	46,9773617
6,18945657	2,11026664	8,46668501	1,51368286	5,48716156	6,79286193	3,42806425	33,9881788	17,2725753	48,7392459
3,81645469	1,27839722	2,72348556	0,6436303	1,82417703	2,13577165	2,64074737	15,0626638	39,8476132	45,089723
5,93345106	1,18354706	5,5447736	4,49380073	1,92602193	4,69150974	1,23034372	25,0034478	18,3984987	56,5980534
5,40723907	3,35621932	6,13640678	1,89460412	4,7238289	4,081358	3,54436633	29,1440225	23,1732737	47,6827038
7,50305132	4,12628139	8,50678381	2,11327	7,55645669	5,59033098	5,3179953	40,7141695	24,1953035	35,090527
1,79045033	0,2685185	0,2765368	1,15456159	0,80310474	1,15456159	2,07965568	7,52738923	6,64152442	85,8310864
5,44046232	2,40394885	4,33238507	1,49062685	1,72566331	1,39505822	2,16702699	18,9551716	29,8137003	51,2311822
0,71388821	0,18141057	0,713097	0,1753023	0,26411808	0,6215957	0,60430426	3,27371612	3,79124078	92,9350431
0,71631233	0,30923696	1,03643063	0,41043487	0,96922302	0,13763605	1,45728209	5,03655595	6,69143962	88,2720044
2,43309491	1,61467276	2,16109221	0,79029086	1,80033595	45,2871616	3,95461188	58,0412602	10,7809524	31,1777874
2,36388508	0,99374492	2,65257924	0,94379211	2,85194117	3,99166564	2,85678324	16,6543914	17,1858302	66,1597784
3,51799917	0,67853437	3,89702689	0,56692114	3,12431396	6,08634939	9,14514902	27,0162939	10,228117	62,755589
3,46903473	1,27242791	4,07891069	1,14072789	2,69906261	6,04314236	4,3327941	23,0361003	16,1746254	60,7892743
2,75854954	0,32995715	1,97719629	0,66730593	1,18575307	0,37898494	1,50221953	8,79996644	7,34584795	83,8541856

Probe 1 [%]
d 43

Ceramid 7	Ceramid 6	Ceramid 5	Ceramid 4	Ceramid 3	Ceramid 2	Ceramid 1	Cer total	Cholesterol	fFS
10,078216	2,18780452	10,1220638	3,11631036	8,20371586	4,50978036	5,1232689	43,3411598	14,9592843	41,6995559
1,91538859	0,59104527	1,67036112	0,48542358	2,12883321	4,73527646	15,5058473	27,0321755	10,643532	62,3242925
3,11072274	1,18862947	4,53609723	2,25355357	3,57315549	3,21632859	3,43770654	21,3161936	36,7204492	41,9633572
4,30416649	2,31932018	4,60709472	1,35896372	2,38549489	3,67443298	3,08961088	22,1890839	14,4405239	63,3703923
5,81271	1,18262928	3,18848842	0,66388553	1,73515372	2,78196265	2,78196265	18,1467922	5,53650295	76,3167048
0,95561998	1,59871518	2,1062156	0,97226931	3,32270488	4,36808424	6,75624956	20,0798587	22,8868605	57,0332808
4,85528283	1,04865849	4,5375116	0,80346356	3,54708471	4,3129711	2,62265765	21,7276299	14,4402877	63,8320823
4,27371486	0,92773492	3,17608012	1,70832242	2,85532738	8,94299372	43,6585034	65,5876768	7,46302418	26,949299
2,77962116	0,61752101	2,92490065	1,16211731	2,71535394	0,80633748	2,33359501	13,3394466	70,1540708	16,5064826
4,3768024	0,98201237	6,13148251	2,34227991	6,0900862	5,99152917	1,78305154	27,6972441	45,4390614	26,8636944
0,33746132	0,19160359	0,27009946	0,0377464	0,45304096	0,08855356	1,21510109	2,59360637	94,2139174	3,19247621
4,65213972	1,60364295	4,86482119	2,60338149	1,73994991	2,48783097	3,22336959	21,1751358	37,6199322	41,204932
6,58295971	2,44853261	7,93840512	4,05222306	3,60053157	5,16844983	5,12927362	34,9203755	28,1501611	36,9294634
2,80134791	0,93109282	3,67019875	1,73811722	2,46161105	3,98253059	3,96151795	19,5464163	33,9271632	46,5264205
1,82157681	0,80151774	1,74656026	0,65225892	1,37035475	3,13060637	3,52713145	13,0500063	23,8370423	63,1129514
2,04040771	0,76353077	2,43784256	1,19416827	1,6700732	4,37571249	4,82127604	17,303011	27,0823921	55,6145968
4,45418651	2,38057097	4,44337999	0,91105742	2,19135944	3,70400356	2,88375587	20,9683138	33,7041426	45,3275436
4,93016893	1,78266306	3,76559367	1,45582536	2,25282001	7,41884916	3,97501038	25,5809306	30,8632954	43,555774
3,81082832	1,16766559	2,85830809	0,83004047	1,74454979	4,37433097	3,26220391	18,0479271	22,1419339	59,810139
3,51529018	0,96960559	3,23327608	0,93366119	0,99529506	3,86106703	4,42766483	17,9358599	29,8605105	52,306295
1,39999167	1,11455824	3,19365653	1,72361253	2,69437227	4,6678755	1,47090177	16,2649685	20,635795	63,0992365
5,49720043	3,03470303	6,25896194	2,87712392	4,0043218	3,42324724	2,57829163	27,67385	19,1284643	53,1976858

Probe 1 [%]
d 64

Ceramid 7	Ceramid 6	Ceramid 5	Ceramid 4	Ceramid 3	Ceramid 2	Ceramid 1	Cer total	Cholesterol	fFS
2,18655956	0,87984232	3,42404511	0,98348035	2,56807715	3,55370597	2,9819712	16,5776817	28,890844	54,5314743
2,69998252	1,00439923	3,76412659	1,43295414	3,48471101	5,34927466	7,77583093	25,5112791	18,1489616	56,3397593
7,83431653	0,96375672	3,93422125	5,76231043	0,54176864	1,29102067	0,70894547	21,0363397	38,3111107	40,6525496
6,40867233	3,33253968	6,19754798	2,31432744	3,25531193	2,48039308	2,69221207	26,6810045	28,4531473	44,8658482
3,63314699	1,20872185	3,34321848	0,97323506	1,78697487	3,38299854	4,2171399	18,5454357	21,8675836	59,5869807
2,78008134	0,93544059	3,73932948	1,20981582	2,11703464	3,42533463	3,1010772	17,3081137	28,7228515	53,9690348
2,79691624	0,99084343	2,62802755	0,47674796	2,25036251	3,92881234	7,99545474	21,0671648	30,4649393	48,4678959
8,30966976	2,73232974	7,09930705	2,08691545	3,1304408	5,85904358	2,67465319	31,8923596	33,3253321	34,7823083
4,99457028	2,12939119	6,76975204	2,56809439	1,57157223	1,4139054	1,42757335	20,8748589	67,5946913	11,5304499
8,44622063	3,43037728	8,03292535	2,87135823	3,86253682	5,5485356	2,58653847	34,7784924	27,7121251	37,5093826
4,37147471	3,53826468	5,85127993	0,82059866	2,03287364	1,1440454	1,18975274	18,9482898	33,9907871	47,0609231
7,51618639	4,49279172	4,21842731	1,39254639	1,9396455	1,82630233	3,57898675	24,9648864	49,7428315	25,2922821
6,12009681	2,15966867	5,58800857	1,8107053	2,87954972	3,29422383	3,02356729	24,8758202	40,6774741	34,4467057
2,41266319	0,55608061	3,80339187	1,69467891	3,15856612	5,72078208	4,99002688	22,3361897	39,9749952	37,6888151
1,45495072	0,66672887	1,51133318	0,59290438	1,13402528	2,4421503	1,68514106	9,4872338	7,86421754	82,6485487
1,62243247	0,59829691	2,17545392	0,67336514	1,46841695	3,19050503	2,8617371	12,5902075	16,7342331	70,6755593
4,72008258	1,65247726	5,0055929	1,01591884	3,35566756	4,38151583	2,63487153	22,7661265	24,0982803	53,1355932
3,02547253	0,8914404	4,14883818	1,29511985	1,55922575	6,27645026	2,88998832	20,0865353	31,2485796	48,6648851
2,04266794	0,55006886	2,58259896	0,91700326	1,51172926	2,20752925	1,93982431	11,7514218	21,7292762	66,5193019
4,99689015	0,97103701	5,44535753	1,9382945	2,59296004	6,74208568	1,77871764	24,4653426	22,1034412	53,4312162
0,69096635	0,1455594	1,12188011	0,45467126	0,57525336	1,8231088	1,06991801	5,88135729	30,2221721	63,8964706
0,83252653	0,45487979	1,09324657	0,24447077	0,56893221	0,8955155	0,57414887	4,66372023	8,9164252	86,4198546

Probe 1 [%]
d 85

Ceramid 7	Ceramid 6	Ceramid 5	Ceramid 4	Ceramid 3	Ceramid 2	Ceramid 1	Cer total	Cholesterol	fFS
3,79255325	1,06529247	4,51440531	1,18079723	2,12340132	1,96933231	2,93374157	17,5795235	30,2467466	52,1737299
3,16828876	1,04054923	2,27826071	1,182362	3,02232139	8,66743919	8,28037151	27,6395928	18,0029603	54,3574469
3,04270967	1,0733543	2,6452262	0,88257336	2,73011968	7,60702655	37,2934455	55,2744553	14,1155165	30,6100283
0,28857267	0,0616164	0,43930487	0,27269118	0,35435231	0,43109889	0,61703939	2,46467572	44,3325053	53,202819
5,76482102	1,0741474	7,55207991	2,50446192	4,21540693	5,36365767	2,31181641	28,7863913	35,1243347	36,089274
6,2314637	2,00919332	7,13738895	3,3207941	3,20634025	2,80031833	1,66901509	26,3745137	21,2891453	52,336341
0,42032232	0,09096202	0,60395909	0,30264988	0,45947969	0,7584308	0,7135361	3,3493399	38,0322089	58,6184512
0,76111434	0,15110788	0,86710362	0,32036596	0,35572396	0,67803716	0,54969267	3,68314559	53,060617	43,2561927
2,72766174	0,87244514	3,84867811	0,99100301	0,52927126	7,80374347	1,7569439	18,5297466	23,5853191	57,8849343
1,7940085	0,53182659	1,68557183	0,40920564	0,50429593	3,46615958	2,47478562	10,8658537	54,8059027	34,3282436
2,70514997	0,45650803	3,07438252	0,78123491	0,71904225	4,23705	2,92635732	14,899725	53,5802557	51,5200194
3,49821451	0,38591416	2,55900784	0,88143904	0,66029601	2,22912909	2,5279023	12,7419029	35,3517768	51,9063202
2,95856778	1,14605761	4,42647023	1,36326218	3,22616431	3,44410425	4,90002688	21,4646532	48,8506196	29,6847272
8,67884639	1,28789508	3,29020723	2,74112579	1,96478541	3,13302192	3,40392159	24,4998034	45,3856582	30,1145384
5,97382926	1,81552728	2,29435921	1,99987895	2,02519065	1,46404898	1,3591331	16,9319674	32,9477136	50,120319
1,92418566	0,44763971	2,2160651	1,48272523	1,51750323	3,64996799	2,16435879	13,4024457	13,7066705	72,8908838
4,16586718	0,71959591	5,65985617	3,95558111	2,04577925	6,43140491	8,05576134	31,0338459	16,1368269	52,8293273
5,54674864	3,13600376	6,50347404	1,13740415	3,26550078	9,95319011	6,7906268	36,3329483	21,8053709	41,8616808
2,12981224	0,87209052	3,00924627	0,87439277	2,56642599	5,21488855	3,54762468	18,214481	32,8616499	48,9238691
1,72033061	0,50287861	2,24479319	0,64950606	1,75139921	6,45754123	3,7952049	17,1216538	20,2529672	62,625379
4,66399842	1,52777735	3,13028418	0,81282649	1,53113788	3,8340653	3,38989999	18,8899896	18,3323965	62,7761339
3,38532666	0,94093417	3,57894832	0,4637175	1,61696933	3,15645612	3,0668857	16,2092378	20,3612915	63,4294706

Probe 2 [µg]
d1

Ceramid 7	Ceramid 6	Ceramid 5	Ceramid 4	Ceramid 3	Ceramid 2	Ceramid 1	Cer total	Cholesterol	fFS	Lipide total
2,34809148	1,14134591	3,62857481	0,9838149	3,53255286	2,43009829	2,03250485	16,0969831	13,7602449	27,6649967	57,5222247
1,39608006	0,74843437	1,7310625	0,53751098	1,29945264	0,25455401	0,37915113	6,34624569	6,10170546	11,3501064	23,7980576
1,65333638	0,44051653	2,18881427	1,19764406	1,49001967	2,42649483	3,18003097	12,5768567	11,357122	23,9210885	47,8550672
0,69924501	0,45348676	1,58506244	0,53042259	1,33433174	1,74851621	0,97026991	7,32133466	3,61310404	10,5371541	21,4715928
2,36308923	0,47644124	2,62083811	0,88548584	1,35911497	1,21821352	1,1555186	10,0787015	7,57076034	13,3541267	31,0035885
1,18964791	0,26354804	1,55133482	0,50417472	0,68424196	0,52229444	0,50288229	5,2181242	7,03826163	10,0179056	22,2742915
4,4955825	1,16309678	3,04391577	0,72385667	2,06353553	1,96745172	1,03448511	14,4919241	5,81255009	13,62163	33,9261042
1,99299333	0,86217784	2,44076808	0,8372418	2,08607439	1,27129611	1,14138976	10,6319413	4,57786362	11,5955061	26,8053111
2,97276435	1,29873155	3,93239151	0,92901579	2,95355865	2,57696416	1,71874845	16,3821744	8,29587346	12,8887402	37,5667881
3,73114932	1,21892912	3,42333351	1,30749393	2,31320914	1,48570871	1,50354863	14,6233724	10,3462045	23,7334022	48,702979
2,47321231	1,05759519	3,50487837	0,94384351	2,66697804	2,00190085	1,43772298	14,356132	6,91826862	17,9411267	39,2155274
2,60185668	2,10854354	3,37976579	1,84064769	2,95721474	1,8776148	2,97734123	17,7429845	10,3060258	9,78642683	37,8354371
2,59296106	1,36237866	3,50964028	1,30516206	2,75491159	1,83813111	2,20657869	15,5697635	6,9239344	6,9239344	37,44827
1,85295733	0,62131794	2,95200156	1,02720266	2,49210962	0,18375034	1,66810352	10,797443	13,9097724	12,2786555	36,9858709
1,02189713	0,56815239	0,95247047	0,32076296	0,60527996	0,16209545	0,48343771	4,11409608	5,70025811	29,3440068	39,158361
0,26203122	0,07340861	0,31951038	0,11459129	0,12876122	0,04521549	0,08507294	1,02859115	1,41081585	3,69118515	6,13059214
3,35023144	1,19696377	5,19488255	1,59843222	4,24063922	4,06874105	3,60652548	23,2564157	19,2644558	52,4815708	95,0024423
3,05886978	1,45940638	3,13842013	1,59458176	2,13173342	5,23815832	3,7780889	20,3992587	33,4232492	33,4455367	87,2680446
4,8928143	1,57612415	5,00908511	1,67892508	4,06874105	3,6958167	3,46940265	23,7873762	10,7004251	94,8717684	129,35957
3,83036921	0,97617628	4,63243071	1,68670555	2,32243283	3,56796648	3,85810572	20,8741868	1,00168489	38,2476442	60,1235159
1,46328009	0,52349094	2,3171941	0,49095007	1,40372786	1,88223383	1,56109463	9,64197152	8,88946207	13,5586335	32,090067
2,12637465	1,03369422	3,28808679	1,0208291	2,54279095	2,6428595	2,50247591	15,1571111	17,8601643	22,0089245	55,0262

Probe 2 [µg]
d 43

Ceramid 7	Ceramid 6	Ceramid 5	Ceramid 4	Ceramid 3	Ceramid 2	Ceramid 1	Cer total	Cholesterol	fFS	Lipide total
1,14157467	0,2337801	1,0176765	0,13805104	1,19326074	0,70307826	2,10598468	6,53340598	8,34309887	13,2700866	28,1465914
3,55508452	1,41551243	4,80966221	2,02470737	3,70384746	4,7789604	4,44554607	24,7333205	15,3394972	36,6507783	76,723596
4,95447684	1,37984711	5,85867871	3,15497061	3,62264305	4,42672792	4,73411303	28,1314573	21,8719308	31,153731	81,157119
1,76712617	0,64469104	1,78644097	0,67450324	1,02042792	1,77232266	2,11980798	9,78531998	15,3867038	21,8398401	47,0118639
7,7052867	2,67635521	8,3857455	2,32707543	3,44645644	5,44398596	4,56735993	34,5522652	24,3354885	131,754175	190,641929
1,74710778	0,37089665	1,50635015	0,75847882	1,90988776	1,72121738	2,94659427	10,9605327	21,3197438	22,4214601	54,7017365
4,45610712	1,38848436	4,51735374	1,74414549	2,73409093	3,09572599	3,36051007	21,2964177	21,0860356	25,7452002	68,1276535
2,5178063	0,84117513	2,4795376	1,12626135	1,55708959	2,20314273	3,46914142	14,1941541	9,1876421	8,74924882	32,131045
0,81218356	0,18327279	0,95187674	0,22365656	0,79738461	0,30431797	1,44867884	4,72137108	7,75421703	5,24336962	17,7189577
2,24506572	0,6394009	3,32856286	1,45227345	2,52899457	1,24592648	2,03337334	13,4735613	13,7008743	5,64898242	32,8234181
1,17157505	0,4398948	1,08946908	0,38954673	1,20587462	0,19335222	0,97102198	5,46073447	13,5495774	61,88083	80,8911418
3,1339891	1,59015636	3,58906857	2,20886695	1,76000647	2,07138931	3,6382582	17,991755	12,6322735	12,7907574	43,4147858
5,1652366	1,76864724	5,89805658	2,83343991	2,91252209	3,83421649	4,57291879	26,9850377	19,5891405	17,6934369	64,2676151
3,85235161	1,39679515	5,80720496	2,76818507	4,26642798	4,22309145	5,60510608	27,9191623	19,5273202	25,8213464	73,2678289
3,29915261	1,65998803	3,19564004	1,43514536	2,03618589	3,8705064	3,42835956	18,9249779	14,7987256	42,0106514	75,7343549
4,4158565	1,48990954	5,82415124	2,39246981	3,06404979	4,08147703	4,29046559	25,6623795	15,9338347	34,4322485	76,0284626
6,47583897	2,88592609	6,98136556	2,75712302	5,868484	6,7088945	5,55202571	37,2296579	22,2643337	37,1615832	96,6555747
6,92946024	3,31842076	7,29122927	3,90910701	4,28081458	6,83422292	6,44480953	39,0080643	22,7111302	26,973179	88,6923735
6,90401585	2,98082838	6,00026916	1,46771575	2,41661908	3,31397325	3,23116886	26,3145903	17,8186304	19,6516747	63,7848955
3,78595953	1,61266699	4,96153458	1,60532122	1,68027315	3,65840053	4,66470674	21,9688627	24,0177702	24,4088926	70,3955255
2,11340708	1,45733264	3,72724119	1,5412397	2,94073582	2,81099435	2,22313033	16,8140811	13,9616692	18,2159434	48,9916936
8,77344586	3,84913539	11,0332866	4,67235221	8,37638648	7,11573755	6,29989318	50,1202373	22,8555859	46,0652045	119,041028

Probe 2 [µg]
d 64

Ceramid 7	Ceramid 6	Ceramid 5	Ceramid 4	Ceramid 3	Ceramid 2	Ceramid 1	Cer total	Cholesterol	fFS	Lipide total
2,73990741	1,06998884	3,98832374	0,84370359	2,77317809	2,57065814	2,02094654	16,0067064	13,8222397	17,8376874	47,6666334
1,76802163	0,77665584	2,47502749	0,96452917	1,88156314	1,85723804	2,52854038	12,2515757	11,287655	26,4764447	50,0156754
1,76097265	0,47758644	1,61346014	0,52622028	0,52622028	0,52622028	0,52622028	5,95690038	9,6625103	12,2824466	27,9018573
3,62558724	1,5943574	2,99250557	1,09166334	2,13251048	1,38980225	1,61985322	14,4462795	8,5177171	14,6822731	37,6462697
4,23407503	1,6191027	5,85298023	1,58312371	3,62043009	4,53381673	3,18667291	24,6302014	12,3915251	30,911551	67,9322775
2,50190235	0,78345838	3,09176488	1,04186205	1,46978592	1,87886832	2,71803812	13,48568	18,9673284	46,352906	78,8059144
4,10465042	2,12278053	4,35890578	2,15485079	4,76739499	6,05153551	3,64247193	27,20259	16,4021934	33,4047822	77,0095655
6,44430685	2,41838946	6,49257672	2,24336985	3,85423777	4,48739791	3,22681389	29,1670925	21,5344568	17,5991855	68,2307347
4,92284313	2,10925954	5,73451589	1,70460946	2,86605785	2,83685601	1,75079299	21,9249349	15,8965573	9,166531	46,9880232
4,46733585	1,83439464	4,99637463	1,70880257	3,11823043	5,2799776	2,02425033	20,7293661	12,197234	13,2093369	46,135937
2,32190119	1,43022794	2,44203496	0,75219693	1,43022794	1,18070636	1,11522043	10,6725157	6,95948489	9,50763176	27,1396324
2,26902679	1,56268251	2,97356497	1,19559611	1,77253043	1,76902243	2,06991509	13,6123383	11,9919123	7,3647716	32,9690122
2,38149566	0,98036989	3,21740238	1,13477067	1,85201244	1,66691997	1,68575382	12,9187248	9,70999023	12,9481043	35,5768193
2,49116484	0,63150436	4,02461606	1,82518233	3,21122016	3,18914982	3,81885242	19,19169	12,4966661	16,0792005	47,7675565
3,51136761	1,5747296	3,72117826	1,27622101	2,3664941	3,18914982	2,91403594	18,5531763	15,1403493	27,4123201	61,1058457
3,44197736	1,08943126	4,62104269	1,63699443	3,0302238	3,80579835	3,67254067	21,2980086	19,6840952	40,1323679	81,1144717
4,80308285	1,90166944	5,70112114	1,25710572	3,4340809	2,73640186	2,33715111	22,170613	12,0236434	14,8290482	49,0233046
2,35412793	1,13954605	2,67760978	0,9977386	1,4039198	1,94027974	2,01565022	12,5288721	10,9308541	8,2499286	31,7096548
5,24813911	1,73806539	6,00581549	1,69274912	3,38347399	3,12833715	2,35247497	23,5490552	12,8473513	27,1636305	63,560037
6,80921259	2,16985154	6,50831379	1,65161237	2,78115747	2,81932218	1,92172649	24,6611997	10,4961959	13,5258883	48,6823839
0,39122376	0,10365048	0,53004879	0,21524238	0,33010585	0,43059396	0,43059396	2,48988706	13,1953473	15,2296367	30,914871
3,32159434	0,5678462	3,00291485	0,58176704	2,78962541	2,68933928	2,00941067	14,9624978	13,5144643	24,097695	52,5746571

Probe 2 [µg]
d 85

Ceramid 7	Ceramid 6	Ceramid 5	Ceramid 4	Ceramid 3	Ceramid 2	Ceramid 1	Cer total	Cholesterol	fFS	Lipide total
2,71728679	0,9078263	4,7327223	1,34023034	3,28181136	2,18027536	2,16799881	17,3281513	15,6347608	15,1173009	48,080213
1,99075668	1,1345191	2,56609702	0,9673607	2,86206039	3,1310997	3,0096353	15,6615289	10,1136822	18,0754502	43,8506613
1,97836104	0,57832478	2,44542149	0,77374765	1,30633239	2,05487416	1,85696916	10,9940307	9,86288356	7,81999642	28,6769107
0,37388375	0,11018993	0,45308622	0,26131661	0,33317309	0,39931822	0,38519477	2,31616258	15,2163958	27,7488976	45,281456
6,91730816	1,12849196	8,79213475	2,47086614	4,27701456	3,7197985	2,98841888	30,294033	13,4596616	15,3308444	59,0845389
3,82658636	1,08922439	4,68128804	1,90131356	2,25646159	1,72082098	2,04942578	17,5251207	13,6907491	16,2555374	47,4714073
0,38225538	0,08207865	0,45975727	0,19380901	0,29629484	0,35452884	0,37740763	2,14613161	8,39697683	25,0296121	35,5272206
0,6371977	0,1770175	0,82491185	0,37359016	0,63780349	1,27018604	0,8714768	4,79218353	13,0111411	17,4243037	35,2276283
2,85987667	0,74651941	2,69413764	0,59011753	1,21455471	1,5363682	1,03432055	10,6758947	12,3894553	12,6100073	35,6753572
1,76212266	0,39700337	2,41983007	0,76775962	1,1249918	1,57963704	1,48930365	9,54064821	19,5660288	16,5409992	45,6476762
1,91016973	0,49117786	2,42618956	0,96260119	0,96260119	0,96260119	2,41559359	10,1309343	14,2773257	16,3168868	40,7251469
1,9416929	0,95050429	1,47150963	0,58942366	0,91912625	2,060946	2,66969449	10,6028972	37,0276154	11,3558414	58,9863541
3,33354288	1,39070593	4,12261331	1,0249803	2,51349095	3,16623812	2,61688518	18,1684567	14,6758407	12,7482087	45,5925061
5,52578204	2,33444073	6,65391803	1,74657195	3,13419788	4,42212775	1,83650303	25,6535414	30,3159325	12,1086976	68,0781715
2,0710622	1,09989472	1,4091943	0,59566984	2,0197828	1,18615692	0,89848766	9,28024845	18,1382063	17,661951	45,0804058
5,09130049	1,59081652	6,04731437	1,94059235	3,94640066	5,96453546	5,13846938	29,7194292	28,877382	44,335575	94,8437424
3,05845152	1,1692693	4,74127276	1,47489606	3,77014206	4,1403227	3,44680903	21,8011634	17,0144069	16,976111	55,7916814
3,94883027	1,62108966	3,22754212	1,36238657	1,53317714	2,14108955	2,65903121	15,4931465	8,34315773	10,9484425	34,7847468
2,68440118	1,44467355	4,82651888	1,52510405	4,4784989	4,42285874	3,33686768	23,719274	15,8179454	20,9292512	60,4664705
4,62684961	1,73474826	6,18714323	2,23776975	4,25692648	6,94683687	4,46483206	30,4551063	15,2132664	40,3047054	85,9730781
2,93776855	1,26709257	3,15471489	0,93077301	1,87546682	2,26047557	1,57972376	14,0060152	9,01590099	11,4552084	48,4831397
4,28154542	2,26117687	5,22713404	1,12545801	3,69911725	3,20723221	2,07937254	21,8810363	14,3162697	20,9861127	79,0644551

Probe 2 [%]
d1

Ceramid 7	Ceramid 6	Ceramid 5	Ceramid 4	Ceramid 3	Ceramid 2	Ceramid 1	Cer total	Cholesterol	fFS
4,08205957	1,98418249	6,30812669	1,71032137	6,14119652	4,224625	3,53342531	27,983937	23,9216147	48,0944484
5,86636138	3,1449389	7,27396552	2,25863382	5,4603307	1,06964198	1,59320199	26,6670743	25,6395105	47,6934152
3,45488257	0,92052222	4,57384014	2,50264836	3,11360897	5,07050761	6,64512904	26,2811389	23,7323291	49,986532
3,25660521	2,11203128	7,38213717	2,47034579	6,21440501	8,14339312	4,5188539	34,0977715	16,8273684	49,0748601
7,62198618	1,53672933	8,45333792	2,8560753	4,38373437	3,9292662	3,72704793	32,5081772	24,4189808	43,0728419
5,34090126	1,18319384	6,96468765	2,26348266	3,07189103	2,34483079	2,25768032	23,4266675	31,5981393	44,9751932
13,25111015	3,42832401	8,97219366	2,13362745	6,08244175	5,7992268	3,04923047	42,7161456	17,1329725	40,1508819
7,43506885	3,21644407	9,10553911	3,1234176	7,78231742	4,74270232	4,25807316	39,6635625	17,0781962	43,2582412
7,91327792	3,45712693	10,4677341	2,47297105	7,86215377	6,8596872	4,57518072	43,6081317	22,082999	34,3088692
6,92185445	2,50278144	7,02900228	2,68462824	4,74962556	3,05054997	3,08717999	30,0256219	21,2434735	48,7309045
6,99522175	2,69687865	8,93747605	2,40681071	6,80082157	5,10486784	3,66620844	36,608285	17,6416564	45,7500585
6,87677181	5,57293294	8,93280493	4,86487756	7,81599199	4,96258255	7,8691868	46,8951486	27,2390823	25,8657692
7,76929214	4,08209671	10,5159391	3,91065856	8,25454468	5,07759431	6,61157422	46,6516997	20,7461924	32,6021078
5,00990591	1,67987916	7,98143044	2,77728397	6,73800443	0,49681226	4,51011017	29,1934263	37,6083409	33,1982327
2,60965246	1,45090953	2,43235531	0,81914298	1,54572342	0,41394851	1,23457086	10,5063031	14,5569374	74,9367595
4,27415843	1,19741463	5,21173775	1,86917159	2,10030634	0,73753866	1,38767908	16,7780065	23,0127174	60,2092761
3,52646875	1,25992947	5,46815685	1,68251698	4,46371601	4,28277522	3,79624502	24,4798083	20,2778532	55,2423385
3,50514303	1,6723262	3,59629936	1,82722298	2,44274227	6,00237847	4,32929249	23,3754048	38,299528	38,3250671
3,31578208	1,21840553	3,87221844	1,29787466	3,14529575	2,85701067	2,68198376	18,3885709	8,27184657	73,3398525
6,3708337	1,62361809	7,70485665	2,80540072	3,86276949	5,93439427	6,41696624	34,7188391	1,66604511	63,6151158
4,55991597	1,6313177	7,22090764	1,52991288	4,37433756	5,8654718	4,86472846	30,046592	27,7016002	42,2518078
3,86429492	1,87854917	5,97549312	1,85516918	4,62105497	4,80291117	4,54778979	27,5452623	32,4575645	39,9971732

Probe 2 [%]
d 43

Ceramid 7	Ceramid 6	Ceramid 5	Ceramid 4	Ceramid 3	Ceramid 2	Ceramid 1	Cer total	Cholesterol	fFS
4,05581851	0,83058049	3,61562963	0,49047159	4,23945026	2,49791616	7,48220149	23,2120681	29,6415959	47,146336
4,63362604	1,84495059	6,26881749	2,63896308	4,82752067	6,22880137	5,7942358	32,236915	19,9931938	47,7698912
6,10479635	1,70021697	7,21893381	3,88748474	4,46374032	5,45451585	5,83326896	34,662957	26,9501074	38,3869356
3,75889409	1,37133691	3,79997903	1,43475111	2,17057533	3,76994764	4,50909155	20,8145757	32,729406	46,4560184
4,04175868	1,40386494	4,39868897	1,22065248	1,8078166	2,85560789	2,39577933	18,1241689	12,7650243	69,1108068
3,19387992	0,67803423	2,75375198	1,38657174	3,49145727	3,1465498	5,38665581	20,0369008	38,9745283	40,885709
6,5408199	2,03806279	6,6307197	2,56011384	4,01318816	4,54400795	4,93266669	31,259579	30,9507733	37,7896476
7,8360548	2,61795136	7,71695285	3,50521233	4,84605959	6,85674159	10,7968521	44,1758247	28,5942835	27,2298919
4,5836983	1,03433168	5,3720809	1,26224446	4,50017782	1,71747104	8,17586938	26,6458736	43,7622638	29,5918626
6,83982914	1,94800218	10,1408173	4,42450402	7,7048483	3,79584624	6,19477635	41,0486235	41,7411566	17,2102199
1,44833541	0,54381084	1,3468336	0,48156908	1,49073754	0,23902768	1,20040583	6,75071998	16,7503846	76,4988954
7,21871372	3,66270691	8,26692682	5,08786788	4,05393333	4,77116095	8,38022837	41,441538	29,0967081	29,4617539
8,03707528	2,75200384	9,17733849	4,40881446	4,53186583	5,96601644	7,11543252	41,9885469	30,480578	27,5308751
5,25790332	1,90642356	7,92599569	3,77817264	5,82305774	5,76390964	7,65015991	38,1056225	26,6519706	35,2424069
4,3562167	2,19185604	4,21953821	1,89497272	2,68858947	5,11063494	4,52682216	24,9886302	19,5403072	55,4710626
5,8081623	1,95967337	7,66048798	3,14680809	4,16692801	5,36835402	5,64323603	33,7536478	20,9577231	45,2886291
6,69991253	2,98578338	7,2229311	2,85252354	6,0715422	6,94103214	5,74413398	38,5178589	23,0347124	38,4474287
7,81291555	3,74149504	8,22080747	4,40748945	4,82658701	7,70553617	7,26647543	43,9813061	25,6066325	30,4120613
10,823904	4,67325118	9,40703769	2,30103968	3,78870117	5,19554548	5,0657273	41,2552065	27,9355015	30,809292
5,37812524	2,29086576	7,04808231	2,28043077	2,38690334	5,19692197	6,62642506	31,2077544	34,1183193	34,6739262
4,31380695	2,97465251	7,60790436	3,14592043	6,00251921	5,7376958	4,5377699	34,3202691	28,4980333	37,1816976
7,37010259	3,23345276	9,26847393	3,92499318	7,03655424	5,9775505	5,29220329	42,1033305	19,1997552	38,6969143

Probe 2 [%]
d 64

Ceramid 7	Ceramid 6	Ceramid 5	Ceramid 4	Ceramid 3	Ceramid 2	Ceramid 1	Cer total	Cholesterol	fFS
5,74806152	2,2447334	8,36711858	1,77000877	5,81786018	5,39299286	4,23975093	33,5805262	28,9977259	37,4217479
3,53493503	1,55282486	4,94850358	1,92845376	3,76194689	3,71331192	5,05549583	24,4954719	22,5682346	52,9362935
6,31130981	1,71166542	5,78262632	1,88596866	1,88596866	1,88596866	1,88596866	21,3494762	34,6303481	44,0201757
9,63066798	4,23510062	7,94900954	2,89979154	5,6645997	3,69173961	4,30282532	38,3737343	22,6256603	39,0006054
6,23269654	2,38337197	8,61577778	2,33040973	5,32939117	6,67392608	4,69088645	36,2564597	18,2407291	45,5028112
3,17476469	0,99416191	3,92326503	1,32206073	1,86507058	2,38417172	3,44902808	17,1125227	24,0684073	58,81907
5,33005269	2,75651539	5,66021345	2,79815991	6,19065302	7,85816082	4,72989544	35,3236507	21,298904	43,3774453
9,4448739	3,54442829	9,51561896	3,28791689	5,64882935	6,57679846	4,72926739	42,7477332	31,5612266	25,6910402
10,4768041	4,48893015	12,2042076	3,62775309	6,09954974	6,03740235	3,72604096	46,6606879	33,8310834	19,5082286
9,68298498	3,97606456	10,8296806	3,70384277	6,75878854	5,5921214	4,38757823	44,9310611	26,437599	28,6313399
8,55538924	5,26988693	8,99803992	2,77158114	5,26988693	4,35048765	4,10919504	39,3244668	25,6432541	35,0322791
6,88229933	4,73985095	9,0192695	3,62642271	5,37635122	5,36571094	6,27836361	41,2882683	36,3732722	22,3384593
6,69395328	2,75564232	9,04353576	3,18963497	5,20567177	4,68541034	4,73834889	36,3121973	27,2930251	36,3947776
5,21518164	1,32203614	8,42541749	3,82096649	6,72259665	6,67639305	7,99465726	40,172487	26,1614095	33,6613418
5,74636938	2,57705229	6,08972548	2,08854161	3,87277857	5,21905848	4,76883333	30,3623591	24,772519	44,860389
4,24335792	1,34307878	5,69693989	2,0181287	3,73573758	4,69188577	4,52760228	26,2567309	24,2670571	49,476212
9,79755015	3,87911312	11,6294101	2,56430228	7,00499677	5,58183885	4,76742874	45,22464	24,5263828	30,2489771
7,42400993	3,59368797	8,44414672	3,14648205	4,42742063	6,11889265	6,35658203	39,511222	34,4716906	26,0170874
8,25697932	2,73452546	9,44904341	2,66322865	5,32327253	4,92186175	3,70118565	37,0500968	20,2129386	42,7369646
13,9867637	4,45707719	13,3686828	3,39256565	5,71275651	5,79115037	3,94740521	50,6564015	21,560164	27,7834345
1,26548727	0,33527708	1,71454311	0,6962422	1,06778983	1,58184052	1,39283081	8,05401082	42,6828476	49,2631416
6,31786211	1,0800759	5,71171553	1,10655413	5,30602683	5,11527688	3,82201384	28,4595252	25,7052828	45,835192

Probe 2 [%]
d85

Ceramid 7	Ceramid 6	Ceramid 5	Ceramid 4	Ceramid 3	Ceramid 2	Ceramid 1	Cer total	Cholesterol	fFS
5,65156979	1,8881495	9,8433888	2,78748836	6,82570054	4,53466245	4,50912896	36,0400884	32,5180773	31,4418343
4,53985554	2,58723372	5,8519004	2,20603445	6,52683518	7,14037053	6,86337495	35,7156048	23,0639217	41,2204735
6,89879417	2,01669137	8,52749279	2,69815554	4,55534561	7,16560505	6,47548538	38,3375699	34,3931174	27,2693127
0,82568843	0,24334449	1,00059993	0,57709409	0,73578263	0,88185817	0,85066782	5,11503557	33,6040339	61,2809306
11,7074759	1,90996153	14,8806014	4,1819166	7,238805	6,29572231	5,05786951	51,2723523	22,7803446	25,9473031
8,06082352	2,29448515	9,86127926	4,00517632	4,75330672	3,62496307	4,31717933	36,9172134	28,8399901	34,2427966
1,07457448	0,23073481	1,29244339	0,54482482	0,83292712	0,99663121	1,06094676	6,03308259	23,6051016	70,3618158
1,80880101	0,50249623	2,34166162	1,06050328	1,81052066	3,605653	2,47384465	13,6034804	36,9344793	49,4620402
8,01639251	2,09253519	7,55181686	1,65413207	3,40446405	4,30652506	2,89925771	29,9251235	34,7283285	35,346548
3,86026806	0,86971212	5,30110243	1,68192486	2,46451055	3,46049825	3,26260563	20,9006219	42,8631431	36,236235
4,69039373	1,20608002	5,95747283	2,3636531	2,3636531	2,3636531	5,93145458	24,8763604	35,0577636	40,065876
3,29176626	1,61139691	2,49466111	0,99925427	1,55820149	3,49393691	4,52595272	17,9751697	62,7731888	19,2516415
7,31160265	3,05029499	9,04230467	2,24813327	5,51294755	6,94464594	5,73972656	39,8496556	32,1891511	27,9611932
8,11681912	3,42905909	9,77393765	2,56553887	4,60382206	6,49566176	2,6976386	37,6824771	44,5310616	17,7864612
4,59415165	2,43985098	3,12595744	1,32134977	4,48040068	2,63120286	1,99307802	20,5859914	40,2352329	39,1787757
5,3680932	1,67730256	6,37608156	2,04609424	4,16094996	6,2888023	5,41782647	31,3351503	21,9189349	46,7459148
5,48191316	2,09577713	8,49817149	2,643577	6,7575344	7,42103949	6,17799813	39,0760108	30,4963151	30,4276741
8,47736592	4,66034631	9,27861324	3,91662064	4,40761335	6,15525409	7,64424483	44,5400584	23,9851041	31,4748375
6,09329625	2,38921429	7,98214091	2,52223097	7,40716277	7,31456409	5,51854218	39,2271514	26,1598622	34,6129863
5,38174242	2,01778079	7,19660546	2,60287267	4,95146455	8,08024678	5,19329092	35,4240036	17,6953841	46,8806123
8,52092101	3,67516892	9,15016819	2,69968283	5,43974256	6,55645038	4,58194753	40,6240814	26,1503855	33,2255331
7,48738973	3,95425268	9,14099603	1,96815447	6,4688634	5,60867517	3,63632077	38,2646523	25,0357009	36,6996468

Publikation

Heinemann C, Paschold C, Fluhr J, Wigger-Alberti W, Schliemann-Willers S, Farwanah H, Raith K, Neubert R, Elsner P. 2005. Investigative Report: Induction of a Hardening Phenomenon by repeated Application of SLS: Analysis of Lipid Changes in the Stratum Corneum. *Acta Derm Venereol*, 85:1-6.

Ehrenwörtliche Erklärung

Hiermit erkläre ich, dass

- mir die Promotionsordnung der Medizinischen Fakultät der Friedrich-Schiller-Universität bekannt ist,
- ich die Arbeit selbst angefertigt habe und alle von mir benutzten Hilfsmittel, persönlichen Mitteilungen und Quellen in meiner Arbeit angegeben sind,
- mich folgende Personen bei der Auswahl des Materials und der Herstellung des Manuskriptes unterstützt haben: Dr.Christian Heinemann, PD Dr. Joachim Fluhr
- die Hilfe eines Promotionsberaters nicht in Anspruch genommen wurde,
- Dritte weder unmittelbar noch mittelbar geldwerte Leistungen von mir für Arbeiten erhalten haben, die im Zusammenhang mit dem Inhalt der vorgelegten Dissertation stehen,
- und ich die gleiche, eine in wesentlichen Teilen ähnliche oder eine andere Abhandlung nicht bei einer anderen Hochschule als Dissertation eingereicht habe.

Bremen, 01.10.2005

Christiane Paschold, Verfasserin

Danksagung

Vielen Dank an dieser Stelle an alle Personen, die das Entstehen dieser Arbeit unterstützt haben.

Ganz herzlichen Dank möchte ich meinen Eltern für ihre immer vorhandene Unterstützung in jeglicher Hinsicht danken.

Ich bedanke mich bei meinem Doktorvater Herrn Prof. Dr. Elsner für die Bereitstellung des Themas, die Korrektur und die Gutachterausswahl.

Der Firma SEBAPHARMA in Boppard danke ich für die Bereitstellung der finanziellen Mittel in Form des Forschungspreises, der von Dr. Wigger-Alberti beantragt und für seine Arbeit verliehen wurde.

Mein ganz besonderer Dank gilt Herrn Dr. Heinemann für die exzellente Betreuung und seine wertvollen Ratschläge zur Durchführung der Studie und der Arbeit. Seine ständige Diskussionsbereitschaft und freundliche Unterstützung waren eine große Hilfe.

Vielen Dank Herrn Dr. Vollandt für die Hilfe bei statistischen Fragen.

Herrn Dr. Jörg Tittelbach gilt der Dank für die Einrichtung und Betreuung der PC-Anlage im hautphysiologischen Labor und die Hilfsbereitschaft bei computertechnischen Problemen.

Für die anfängliche Betreuung der Studie danke ich Frau Dr. Schliemann-Willers.

Mein Dank geht auch an das Labor der Hautklinik, der Chefin Frau Dr. Hipler und ihren Mitarbeiterinnen - für die Bereitstellung von Geräten und Chemikalien.

Für die freundliche Zusammenarbeit und die Analyse der Lipidproben danke ich Herrn Prof. Dr. Dr. Neubert, Herrn Dr. Raith, und Herrn Dr. Hany Farwanah im Institut für pharmazeutische Technologie und Biopharmazie der Martin-Luther-Universität in Halle.

Ich danke Herrn PD Dr. Joachim Fluhr für seine Bereiterklärung als Korrektor, seine konstruktive Kritik und Ratschläge.

Herzlichen Dank an alle Probanden, die sich für die Teilnahme an der Studie bereiterklärt und tapfer durchgehalten haben.