

## 2. Literaturübersicht

### 2.1 Das Integumentum commune

#### 2.1.1 Die Funktion der Haut

Die Haut als zweitgrößtes Organ des Körpers erfüllt eine Vielzahl von Aufgaben. Als äußere Grenzfläche des Körpers bildet sie ein Schutzorgan gegenüber verschiedensten Umwelteinflüssen. Diese Schutzfunktion ist sehr komplex: die Haut bildet eine Barriere gegen das Eindringen von fremden Stoffen und schützt den Organismus gleichzeitig vor Austrocknung. Durch ihren strukturellen und funktionellen Aufbau ist sie außerdem in der Lage, den Wärmehaushalt des Körpers zu regulieren. Mit verantwortlich dafür ist das Unterhautfettgewebe, welches parallel dazu auch ein mechanisches Schutzpolster darstellt. Die Melaninpigmentierung verhindert Schädigungen durch UV-Licht. Alle jene Funktionen der Haut ermöglichen dem Organismus eine an das terrestrische Leben gut angepasste Existenz, relativ unabhängig von klimatischen Faktoren. Das Zusammenspiel der Hornschichtanatomie und des sauren Hautoberflächenmilieus bietet einen optimalen Schutz gegenüber Mikroorganismen. Auch das Vorhandensein immunologisch aktiver Zellen und Antikörper verhindert das Eindringen von Keimen. Die durch dermale Wärme-, Schmerz- und Tastrezeptoren vermittelten Sinnesreize erfüllen gleichzeitig auch eine Schutzfunktion: der Organismus wird alarmiert und kann entsprechend reagieren. Die Haut ist somit der äußerste Grenzposten des Körpers [Liebich 1999, Fritsch 1998, Stevens und Lowe 1992, Junqueira und Carneiro 1996]. Schließlich erfüllen die tierartlich und regional unterschiedlichsten Modifikationen der Haut ihre individuelle Aufgabe und sind Ausdruck der evolutionären Anpassung der einzelnen Spezies.

### 2.1.2 Der Aufbau der Haut

Trotz der morphologischen Vielfalt bei Mensch und Tieren folgt der Aufbau der Haut einem einheitlichen Grundprinzip. Demnach besteht die äußere Haut aus drei Schichten: der Oberhaut (Epidermis), der Lederhaut (Dermis, Korium) und der Unterhaut (Hypodermis, Subkutis).

#### 2.1.2.1 Epidermis

Die Epidermis der Säugetiere besteht aus mehrschichtigem Plattenepithel, das zu 90% aus verhornenden Zellen, den Keratinozyten, aufgebaut ist. Daneben existieren im Basalbereich drei weitere Zellarten: Melanozyten, Langerhans-Zellen und Merkel-Zellen. Die Epidermis ist der ständigen Erneuerung unterworfen. Die verschiedenen Schichten der Epidermis übernehmen im Prozess der Keratinisierung, der Verhornung und der Abschilferung (Desquamation) jeweils wichtige Funktionen. In einem dreiwöchigen Differenzierungsprozess wandern die Keratinozyten zur Hautoberfläche und liegen dort als abgestorbene Hornschuppen vor, die schließlich abgestoßen werden. Von basal nach apikal lassen sich je nach Körperregion vier, bzw. fünf, epidermale Schichten unterscheiden: 1. Stratum basale, 2. Stratum spinosum, 3. Stratum granulosum, 4. Stratum lucidum und 5. Stratum corneum.

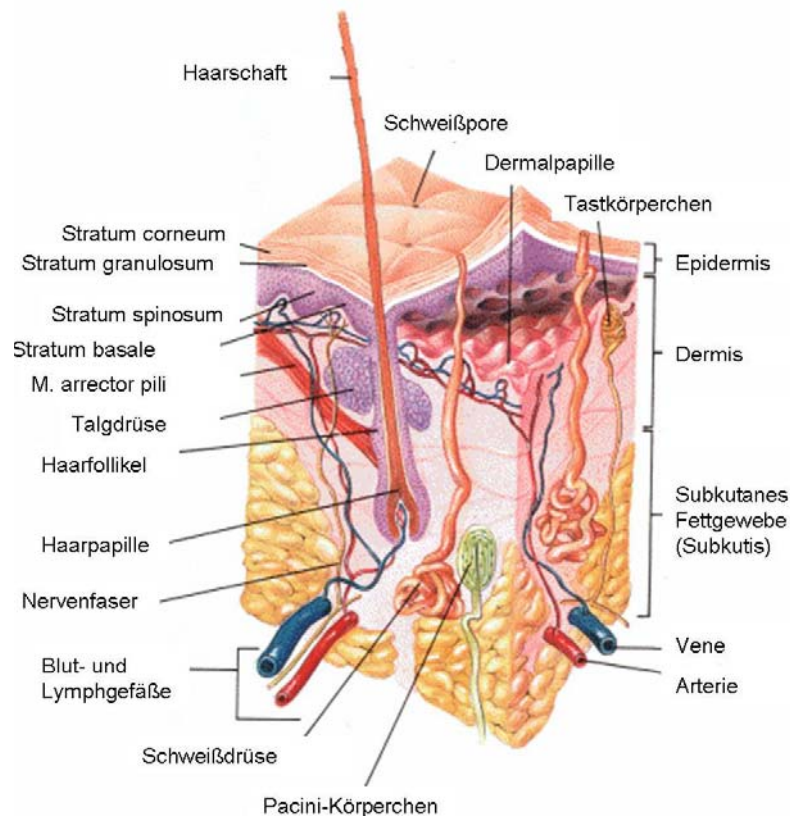
Zuunterst befindet sich das der Basalmembran aufliegende, einlagige **Stratum basale**. (Basalzellschicht) Diese iso- bis hochprismatische Zellschicht steht im Dienste der zyklischen Erneuerung der Keratinozyten.

Im 2 – 5 lagigen **Stratum spinosum** (Stachelzellschicht) erfolgt die Keratinisierung der Epithelzellen, die mit der Bildung von schwefelreichen Zytokeratinen, Keratinfilament-assoziierten Proteinen (Filagrinen) und „membrane coated granules“ (MCGs) einhergeht. Zahlreiche Zytoplasmaausläufer an der Zelloberfläche verleihen den Keratinozyten ihr stacheliges Aussehen. Über Desmosomen an der Spitze dieser Ausläufer sind die Zellen untereinander fest verknüpft.

Charakteristisch für das **Stratum granulosum** (Körnerschicht), das je nach Spezies und Körperregion 1 – 5 Schichten umfasst, sind die stark basophilen Keratohyalin granula. Keratohyalin ist eine Mischung verschiedener Proteine, die in der Stachelzellschicht synthetisiert werden. Die stark abgeflachten Zellen des Stratum granulosum enthalten außerdem zahlreiche verdichtete Tonofibrillen, sowie membranumschlossene lamelläre Granula. Diese „Lamellar granules“ (LGs), oder auch Odland bodies, sind nur elektronenmikroskopisch sichtbar und enthalten Phospholipide, Cholesterol und Glycosylceramide [Freinkel and Traczyk 1985], die als Vorstufen für die interzellulären Lipide des Stratum corneums dienen [Landmann 1988].

Ein **Stratum lucidum** findet sich gewöhnlich nur in Regionen mit dicker Epidermis. Beim Menschen ist diese Schicht an den Handinnenflächen und den Fußsohlen besonders ausgeprägt. Die Zellen sind homogen eosinophil, sie enthalten dicht gepackte Filamente und lysosomal degradierte Zellorganellen. Mit histochemischen Verfahren konnte diese Zone auch bei Maus, Ratte, Meerschweinchen und Hund an verschiedenen Körperstellen nachgewiesen werden [Zirra 1976].

Am Übergang der Körnerschicht zum Stratum lucidum, bzw. zum **Stratum corneum**, findet der Prozess der Verhornung statt. Dabei werden die Zytokeratinfilamente untereinander, und mit den Filagrinen, zu einer festen Masse verbacken. Gleichzeitig erfolgt die Synthese von Involucrin und anderen Proteinen. Diese lagern sich an die innere Seite der Zellmembran und bilden die sogenannte „cornified envelope“. Gleichzeitig kommt es zur Degeneration der Zellorganellen und Fragmentierung des Zellkerns. Die Korneozyten sind in eine Matrix aus Lipiden eingebettet, welche dem exozytierten und reorganisierten Inhalt der Lamellar granules entspricht. Dieser dichte Hornzellerverband bildet das Stratum corneum, das als wichtigste Schutzschicht der Haut die Funktion als epidermale Grenzbarriere übernimmt [Kolb 1991, Junqueira und Carneiro 1996, Fritsch 1998, Liebich 1999]. Der detaillierte Aufbau der Haut ist in Abbildung 1 (S.6) dargestellt.



**Abb. 1:** Schematischer Aufbau der Haut

### 2.1.2.2 *Dermis*

Die Dermis ist die bindegewebige Unterlage der Epidermis. Die unterschiedliche Anordnung des kollagen-elastischen Grundgerüsts lässt zwei Schichten der Lederhaut erkennen: das Stratum papillare sowie das Stratum reticulare. Ersteres ist durch die Ausbildung fingerförmiger Papillarkörper fest mit der Epidermis verzahnt. Ein dichtes Maschennetz aus Kollagenfasern des Typs III wird von elastischen Fasern durchzogen und ist fest mit den Basalzellen der Epidermis verbunden. Das lockere Bindegewebe ist durchsetzt mit Kapillarschlingen und feinen vegetativen Nerven; häufig sind basophile Rundzellinfiltrate zu finden. Das Stratum papillare erfüllt somit sowohl mechanische, als auch nutritive, immunologische und sensorisch-sensible Aufgaben. Das Stratum reticulare ist eine faserreiche und zellarme Bindegewebsschicht. Der scherengitterartige Verlauf der Typ I - Kollagenfasern ermöglicht, zusammen mit elastischen Faserbündeln, die Plastizität und Verformbarkeit der Haut.

### **2.1.2.3 Subcutis**

Die Unterhaut besteht aus lockerem, unregelmäßig angeordnetem Bindegewebe, das die Haut verschieblich mit Faszien oder Muskulatur verbindet. Je nach Spezies, Geschlecht und Körperregion dienen unterschiedlich ausgeprägte Fetteinlagerungen als Energiereserven, Kälteschutz und mechanische Pufferzone.

### **2.1.3 Das Stratum corneum**

Die Hauptaufgabe der Haut, den Körper vor chemischen und physikalischen Umwelteinflüssen, als auch vor Austrocknung zu schützen, wird durch das Stratum corneum wahrgenommen. Zusätzlich fungiert es als Reservoir für topisch applizierte Moleküle [Rougier *et al.*, 1985]. Sein spezieller struktureller und funktioneller Aufbau trägt dieser Aufgabe Rechnung.

#### **2.1.3.1 Histologische Struktur**

Die Struktur des Stratum corneum kann, wenn auch stark vereinfacht, als Modell einer Mauer dargestellt werden. Dabei stellen die in den Mörtel eingebetteten Steine der Mauer die Korneozyten dar, die von einer Matrix aus interzellulären Lipiden umgeben sind. Die Korneozyten sind fünf- oder sechseckige, kernlose Zellen, die einen Durchmesser von etwa 40 µm und eine Dicke von 0.75 µm besitzen [Marks und Barton, 1983]. Beim Menschen variiert die Größe der Korneozyten mit der anatomischen Lokalisation [Marks und Barton, 1983], Alter [Grove *et al.*, 1981] und den Bedingungen, die die epidermale Proliferation erhöhen [Corcuff und Leveque, 1988]. Die dachziegelartige Überlappung benachbarter Korneozyten trägt, neben der interzellulären Verbindung durch Korneodesmosomen, zur Kohäsion des Hornzellverbandes bei. Das Stratum corneum ist keine statisch gleichbleibende Struktur. Es unterliegt vielmehr einer kontinuierlichen Synthese durch die darunter liegende Epidermis einerseits und der ständigen Desquamation auf der Hautoberfläche andererseits. Demnach wird das Stratum corneum, das je nach Körperregion, Tierart und mechanischer Belastung etwa 15 Zellschichten umfasst, in zwei Schichten unterteilt.

Das obere Stratum disjunctum enthält ungefähr 3 – 5 Zellschichten und unterliegt der Desquamation, wobei täglich etwa eine Lage abgestoßen wird. Die untere Hornzellschicht, das Stratum compactum, ist dicker und dichter gepackt [Hou *et al.*, 1991, Fartasch 1995]. Sie enthält im Vergleich zum Stratum disjunctum eine höhere Dichte an Korneodesmosomen [Mils *et al.*, 1992]. Der Wassergehalt sinkt innerhalb der Hornschicht von 30% im Stratum compactum auf die Hälfte im Stratum disjunctum [Warner *et al.*, 1988, von Zgliniki *et al.*, 1983], was mit einem unterschiedlichen Aminosäure- und Lipidgehalt der Zellen korreliert [Scott *et al.*, 1982 und 1986, Horii *et al.*, 1989, Mils *et al.*, 1992]. Die Gesamtdicke des Stratum corneum variiert von Tier zu Tier sehr stark. Je stärker die Behaarung ausgeprägt ist, umso dünner ist die Hornzellschicht [Rivière *et al.*, 2001]. Die absoluten Dickenangaben unterscheiden sich auch mit der verwendeten Methode. Monteiro-Rivière *et al.* (1990) untersuchten die Dicke des Stratum corneum in Gefrierschnitten. Danach besitzt das Schwein ein etwa 20 µm dickes SC. Beim Hund sind es 11,5 µm, bei der Katze 9,5 µm, beim Kaninchen 8,5 µm, bei der Ratte 13 µm und bei der Maus nur 6 µm. Meerschweinchen weisen mit 18,5 µm ein relativ dickes SC auf [Sato *et al.*, 1991]. Panchagnula *et al.* (1997) untersuchten die Dicke der Hornzellschicht am Affen und ermittelten in Gefrierschnitten Werte von 10 µm.

### **2.1.3.2 Lipide des Stratum corneum**

Die Lipide des Stratum corneum umfassen ungefähr 15% seines Trockengewichts [Elias und Leventhal, 1979]. Diese 15 Prozent sind hauptverantwortlich für die Funktion der Hornschicht als Schutzbarriere. Zurückzuführen ist dies auf die ausgeklügelte Zusammensetzung aus verschiedenen Lipidkomponenten, die als mehrfach geschichtete Lamellen zwischen den Korneozyten präsent sind [Madison 2003, Downing 1992, Breathnach *et al.*, 1973, Elias *et al.*, 1977]. Mit herkömmlicher Elektronenmikroskopie unsichtbar, erlaubt die Fixierung mit Rutheniumtetroxid die Betrachtung der Lamellen in den extrazellulären Spalten des Stratum corneum [Madison *et al.*, 1987]. Abb. 2 (S.10) zeigt die schematische und die elektronenmikroskopische Darstellung eines Lamellar granule. Die Lipidkomposition des Stratum corneum ist im Vergleich zur Lipidzusammensetzung verschiedener Membranen einzigartig.

Sie besteht aus einer annähernd equimolaren Mixtur aus Ceramiden (45 – 50%), Cholesterol (25%), freien Fettsäuren (10-15%) und etwa 5% unterschiedlichen anderen Lipiden, von denen das Cholesterolsulfat die größte Rolle spielt [Review Madison 2003]. Die langkettigen, unverzweigten gesättigten Fettsäuren der Ceramide erlauben ein dichtes laterales Aneinanderlagern und somit die Formation von geordneten Gelphasen – Membrandomänen. Diese sind starrer und weniger permeabel als die typischen flüssig-kristallinen, Phospholipid - dominanten biologischen Membranen [Madison 2003]. Cholesterol bietet diesem System wahrscheinlich die nötige Fluidität und Plastizität [Review Madison 2003, Yeagle *et al.* 1985]. Landmann (1988) entwickelte die Bilayertheorie, die die Koexistenz zweier Doppelmembranen beschreibt. Zahlreiche Studien [Forslind 1994, Bouwstra *et al.*, 2000, Norlén 2001a, b] lassen die Koexistenz von kristallinen und flüssig-kristallinen Domänen in den Membranen des Stratum corneum vermuten. Freie Fettsäuren und Cholesterylsulfat spielen vermutlich in der Formation und Aufrechterhaltung der relativ unpolaren Lipide, wie Ceramide und Cholesterol, eine entscheidende Rolle. So können beispielsweise bei Fehlen dieser Bestandteile keine Liposomen aus den unpolaren Lipiddoppelschichten gebildet werden [Wertz *et al.*, 1986]. Die Zusammensetzung dieser Lipidkomponenten, die eine Kettenschmelztemperatur von 60°C besitzen, sorgt dafür, dass das Gelphasen-Gleichgewicht unter allen denkbaren äußeren Umständen erhalten bleibt und somit den Schutz gegen erhöhte Wasserpermeabilität aufrecht erhält [Downing, 1992]. Die Konstanz der Lipidzusammensetzung im Stratum corneum wird unter anderem durch den strengen Ausschluss von exogenen Fetten gewährleistet. Mit Ausnahme des Ceramidbestandteils Lineolat, welches über den Weg der Nahrung aufgenommen werden muss, sind die Lipide des Stratum corneum endogenen Ursprungs [Wertz und Downing, 1990, Hedberg *et al.*, 1988].

### **2.1.3.3 Lipogenese**

Die Lipidlamellen des Stratum corneum leiten sich aus den scheibenartigen Lipidmembranen ab, die aus den Lamellar Granules (LG) in die interzellulären Spalten exozytiert werden. Lamellar Granules sind kleine, elektronenmikroskopisch sichtbare Organellen, die im Golgi-Apparat der Zellen des oberen Stratum spinosum, sowie im Stratum granulosum gebildet werden [Fartasch 1995, Landmann 1986, Swartzendruber *et al.*, 1995, Fartasch *et al.*, 1993].

Sie enthalten einen oder mehrere Stapel aus Lipidmembranen, die hauptsächlich aus Phospholipiden, Cholesterol und Glycosylceramiden bestehen [Grayson *et al.*, 1985, Freinkel and Traczyk, 1985, Wertz *et al.*, 1984] und als biologische Vorstufen für die interzellulären Lipide des Stratum corneum gelten [Landmann 1988]. Zusätzlich sind eine Reihe von katabolischen Enzymen enthalten: Hydrolasen, Sphingomyelinase und Phospholipase A<sub>2</sub> [Schäfer und Redelmaier 1996]. Zum Zeitpunkt der späten epidermalen Differenzierung, am Übergang von Granulosazelle zum Korneozyt, verschmelzen die LGs mit der Zellmembran und entlassen ihren Inhalt in die Interzellulärspalten. Die zusammen mit den Lipiden exozytierten Enzyme beginnen im Stratum compactum mit dem Ab- und Umbau der Komponenten. Somit ist die Zusammensetzung der Lipide im Stratum corneum eine andere als jene in den LGs. Phospholipide werden abgebaut und Glucosylceramide deglycosyliert [Reviews: Goodridge 1991, Cook 1991, Futerman 1994, Block 1991].



**Abb. 2:** *rechts:* Schematische Darstellung eines Lamellar granule nach Landmann (1986) *links:* Lamellar Granule aus dem Stratum spinosum (aus Liebich, Funktionelle Histologie der Haussäugetiere, © Schattauer 1998, Seite: 307)

Wie wichtig der strukturelle Umbau der Lipide aus den LGs ist, zeigt sich in Krankheiten, die auf einem genetischen Defekt eines der Enzyme beruhen und sich in gestörten Barriereigenschaften der Haut manifestieren. Ein bekanntes Beispiel ist die Gaucher's disease, bei der es zu einer stark verminderten Aktivität der  $\beta$ -Glucocerebrosidase kommen kann. Die fehlende Deglycosylierung resultiert in einem Mangel an Ceramiden und in damit verbundenen starken Funktionsbeeinträchtigungen der Haut.



In der Folge sterben die Kinder bereits in der frühen Neonatalperiode [Holleran *et al.* 1994, Sidransky *et al.* 1992]. Patienten mit X-chromosomaler Ichthyose, auch als Fischschuppenkrankheit bekannt, leiden unter einem Mangel eines Enzyms, welches die Hydrolyse von Cholesterolsulfat katalysiert [Shapiro und Weiss 1978, Elias *et al.*, 1984]. Die Akkumulation von Cholesterolsulfat behindert die Desquamation der Korneozyten; die Haut wird hyperkeratotisch und erscheint charakteristisch trocken, schuppig und schwierig verdickt [Küster *et al.* 2004]. Zusätzlich zur Bedeutung für die Barrierefunktion haben die enzymatischen Umbauprozesse der Stratum corneum Lipide noch einen weiteren biologischen Sinn: der Abbau der Phospholipide und Glucosylceramide verhindert ein Schwellen der Lipiddoppelschicht in Wasser – ein biologischer Vorteil, der ein Leben auch unter feuchten Bedingungen zulässt. Schließlich erhöht die Eliminierung der Nährstoffe Phosphor und Zucker die Resistenz gegen bakterielle Besiedlung der Hautoberfläche [Downing 1992].

### **2.1.4 Der Haarfollikelapparat**

Die genaue Kenntnis der Follikelstruktur sowie auch der physiologischen Unterschiede zwischen den einzelnen Spezies und innerhalb der verschiedenen Körperregionen ist erforderlich, um die Rolle der Haarfollikel bei der Penetration von Substanzen durch die Haut verstehen und untersuchen zu können.

#### **2.1.4.1 Struktur des Haarfollikels**

Haare sind ein Charakteristikum der Säugetiere. Sie bedecken, in speziesunterschiedlicher Dichte, den größten Teil der Körperoberfläche und werden in kleinen, sack-ähnlichen Organen, den Haarfollikeln, gebildet. Diese entwickeln sich aus zapfenförmigen Ausbuchtungen der Epidermis. Am proximalen Ende verdickt sich der Haarzapfen zum epithelialen Haarbulbus und wird von der bindegewebigen Haarpapille eingestülpt. Während sich die zentralen Zellen des Bulbus zum Haar differenzieren, bilden sich aus den peripheren Teilen die epithelialen Wurzelscheiden, die das Haar manschettenartig umgeben. Dabei werden eine innere und eine äußere Wurzelscheide unterschieden.

Letztere stellt die Fortsetzung der Epidermis in die Tiefe dar und entspricht weitestgehend ihrem Wandaufbau. Eine deutlich entwickelte Basalmembran (Glashaut) trennt die epithelialen Teile des Haarorgans von den dermalen Schichten. Diese bindegewebige Wurzelscheide wird auch als Haarbalg bezeichnet und beherbergt feine Nervenfasern und zahlreiche Kapillarschlingen. Letztere sind in der Haarpapille besonders dicht ausgebildet und dienen der Versorgung der stoffwechselaktiven germinativen Zellen und damit der Neubildung und dem Wachstum des Haares. An der bindegewebigen Wurzelscheide ansetzend, richten die Mm. arrectores bei ihrer Kontraktion das Haar auf und komprimieren die zwischen Haarmuskeln und Wurzelscheide befindlichen Talgdrüsen. Der Teil des Follikelapparates, der sich von der Hautoberfläche bis zur Talgdrüsenmündung erstreckt, wird als Haartrichter, oder Infundibulum, bezeichnet. Das Epithel weist im oberen Fünftel des Infundibulum ein epidermales Verhornungsmuster auf und kann demnach in Stratum basale, Stratum spinosum, Stratum granulosum und Stratum corneum gegliedert werden. Dieser Teil des Haartrichters wird als Akroinfundibulum bezeichnet. Das proximale Vierfünftel des Infundibulums besitzt ebenfalls ein epidermales Verhornungsmuster; das Epithel besteht jedoch vorwiegend aus kleinen, brüchig erscheinenden Hornzellen. Dieser Teil des Follikels wird als Infracroinfundibulum bezeichnet und stellt eine inkomplette Barriere gegenüber der Penetration und Permeation von Stoffen dar. Unterhalb der Talgdrüsenmündung ist das Epithel der äußeren Wurzelscheide nur noch einschichtig und besteht aus Zellen, die denen des Stratum basale entsprechen. Die innere Wurzelscheide liegt der Oberfläche des Haares unmittelbar an. Sie besteht aus drei Schichten, von denen die innere als Scheidenkutikula bezeichnet wird und durch ihre dachziegelartig angeordneten Zellen eng mit der Haarkutikula verzahnt ist. Der Scheidenkutikula folgen nach außen ein bis drei Schichten kernhaltiger Zellen (Huxley-Schicht), die eosinophile Trichohyalin granula enthalten. Daran schließt sich die einschichtige, kernlose Henle-Schicht an. Die innere Wurzelscheide ist nur bis zur Einmündung der Talgdrüsen nachweisbar, oberhalb werden ihre verhornenden Zellen durch Desquamation in den Haartrichter abgegeben [Junqueira und Carneiro 1996, Liebich 1999, Stevens und Lowe, 1992, Braun-Falko *et al.* 1996]. Der Haarschaft ist aus drei unterschiedlichen Zelltypen aufgebaut, wobei die Struktur der einzelnen Schichten streng tierartspezifisch ist und daher für forensische Zwecke herangezogen werden kann. Die äußere, einlagige Haarkutikula besteht aus dachziegelartig zur Haarspitze gerichteten Deckzellen, durch die das Haar fest im Follikel verankert wird.

Die Haarrinde bildet den größten Teil des Haarschaftes und besteht aus langen, keratinisierten Zellen, die sich als längsgerichtete Fasern organisieren. Die Kortikalzellen enthalten Melaningranula, die in den Melanozyten der Bulbusregion synthetisiert werden und dem Haar seine Farbe verleihen. Die Zellen des Haarmarks unterliegen der ständigen Teilung. Sie sind stark vakuolisiert und nur geringgradig verhornt. Den Wollhaaren der Tiere fehlt ein Haarmark gänzlich [Kolb 1991, Harkey 1993, Liebich 1999].

### **2.1.4.2 Die Talgdrüsen (*Glandulae sebaceae*)**

Talgdrüsen sind exoepitheliale, exokrine, alveoläre und holokrin sezernierende Drüsen. Sie sind in den meisten Körperregionen mit den Haarfollikeln anatomisch und funktionell zu pilosebaceous Einheiten assoziiert. Sie kommen jedoch auch separat vor, wie z.B. die Meibomschen Drüsen am Augenlid oder die Ceruminaldrüsen am äußeren Gehörgang [Liebich 1999]. Die Anzahl, Größe und Aktivität der Talgdrüsen wird durch Androgene stimuliert und unterhalten. Sexuell unreife oder kastrierte Tiere produzieren weniger Sebum [Steward und Downing, 1999]. Die Sekretion schwankt beim Menschen in Abhängigkeit des Alters und der Körperregion [Ebling 1974, Pochi und Strauss 1974, Blume *et al.*, 1991, Saint-Leger 1994]. Die Talgdrüsen sind über einen kurzen Ausführungsgang, der unterhalb des Infundibulums mündet, mit den Haarfollikeln verbunden. Das Sekret der Talgdrüsen wird an der Basis der alveolären Drüsenläppchen gebildet und setzt sich beim Menschen aus einem Gemisch aus Glyceriden und freien Fettsäuren (57%), Squalen (12%), Wachs- und Sterolestern (29%) und freien Sterolen (1,5%) zusammen [Sperling 1991]. Tiere besitzen kein Squalen und keine Triglyceride. Im Gegensatz zum Menschen finden sich bei Säugetieren viele Diester und nur wenige Monoester. Eine Ausnahme bildet das Schwein, dessen Talglipidzusammensetzung sehr der des Menschen ähnelt [Nicolaidis *et al.*, 1968]. Das fettige Sebum wird zunächst in das Infundibulum des Follikels sezerniert, so dass der Haarschaft bereits umhüllt wird, bevor er die Hautoberfläche erreicht. Über die Follikelöffnung gelangt das Sekret an die Hautoberfläche und überzieht die Epidermis mit einem dünnen Fettfilm [Liebig 1999]. Die Sebumlipide besitzen nur einen geringen Effekt auf die physischen Eigenschaften der epidermalen Barriere, da sie aufgrund ihrer geringen Polarität in der Regel nicht in die Lipiddoppelschicht integriert werden [Downing, 1992].

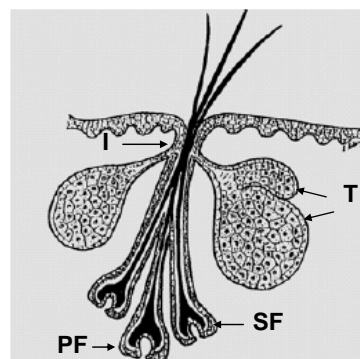
### 2.1.4.3 *Morphologische Besonderheiten*

Die Dichte, Anordnung und Art der Haarfollikel variiert innerhalb der einzelnen Tierarten zum Teil erheblich. Die Kenntnis über das Behaarungsmuster, sowie die Besonderheiten der Follikelanatomie der verschiedenen Spezies, ist eine Grundvoraussetzung für eine vergleichende Untersuchung des follikulären Potentials.

Bei den Haustieren bilden die Haare eine fast vollständig geschlossene, mehr oder weniger dichte Decke, das Fell oder Haarkleid. Sie fehlen lediglich an Nasenspiegel, After, Schamlippen sowie an den Zehenendorganen. Das Meerschweinchen besitzt zusätzlich hinter den Ohren eine genetisch bedingt haarfreie Stelle. Die Haardichte im Rückenbereich liegt beim Hund bei 1000 - 9000 [Habermehl 1996], bei der Maus bei etwa 50 000, bei der Ratte bei 86 000 und beim Kaninchen ungefähr zwischen 64 000 und 170 000 Haaren je cm<sup>2</sup> [Militzer 1982]. Für das Schweineohr werden Werte zwischen 19 und 36 Borsten je cm<sup>2</sup> angegeben [Meyer *et al.*, 2001]. Die großen innerartlichen Schwankungen spiegeln auffällige Rassenunterschiede wider.

Generell werden im Fell des Tieres fünf Haararten unterschieden: Deckhaare, Wollhaare, Langhaare, Borstenhaare und Tasthaare. Deckhaare sind die für das Fell charakteristischen Haare, die auch dessen Farbe bestimmen. Dabei werden die langen, steifen Leithaare, oder auch guard hairs oder monotrichs, von den kürzeren Grannenhaaren (awns) unterschieden. Bei Maus und Ratte werden letztere noch einmal in längere Ahlenhaare (awls) und kürzere, feine Knickhaare (auchenes) unterteilt. Bei den Wollhaaren handelt es sich um meist feine Haare mit starker Wellung; sie werden daher bei Nagetieren auch als Zick-Zack-Haare (zig-zag-hairs) bezeichnet [Ryder 1973]. Ihre Dichte variiert jahreszeitlich: im Winterpelz sind die Wollhaare sehr viel zahlreicher. Langhaar findet sich vor allem bei Equiden als Mähne und Schweifhaar. Borstenhaare bilden die charakteristische Körperbehaarung des Schweins. Sie sind auffällig steif und an der Spitze gespalten. Sie kommen aber auch bei anderen Tieren zur Ausprägung, wie z.B. die Haare an der Innenfläche der Ohrmuscheln oder die Augenwimpern. Tasthaare stecken mit ihrer Wurzel in einem Blutsinus, der zahlreiche Tastkörperchen enthält. Sie fungieren somit als Reizempfänger und sind für die Orientierung wichtig [Habermehl 1996, Militzer 1982].

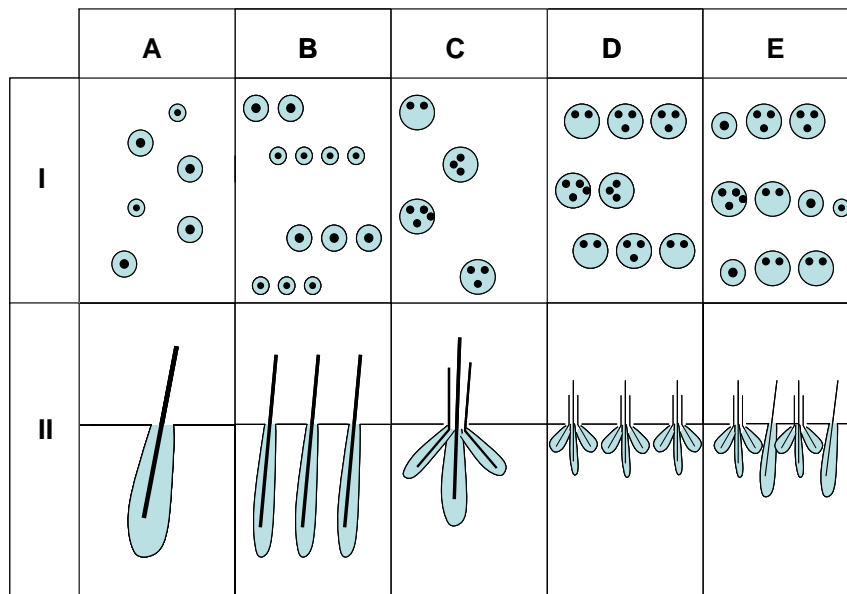
Eine große strukturelle, vermutlich auch eine funktionelle Ähnlichkeit mit Tasthaaren im Kopfbereich besitzen die so genannten tylotrichen Haare, die bei Maus, Ratte, Meerschweinchen, Kaninchen [Straile 1960], Hund [Habermehl 1996] und Mensch [Straile 1960] nachgewiesen wurden. Diese Haare werden beim Tier vor allem im Rückenbereich ausgebildet und münden in speziellen Haarfollikeln, die Blutsinusräume und reichlich Nervengewebe enthalten. Dieses, um die Follikelöffnung gelegene stark innervierte Gebiet der Epidermis wird auch als Haarscheibe bezeichnet [Pinkus, 1905] und fungiert vermutlich als besonders empfindlicher Reizempfänger. Unabhängig vom Haartyp und Haarwachstumszyklus lässt sich eine charakteristische Haaranordnung an der Haut von Mensch und Säugetier nachweisen. Einzelne stehende Haarfollikel sind in der Regel Primärfollikel, die embryonal in ungefähr gleichem Abstand zueinander angelegt werden und erst durch das unterschiedlich starke Wachstum einzelner Körperpartien ungleichmäßig auseinander rücken. Sie entsprechen den Follikeln der Deckhaare und werden dementsprechend in zentrale (Mittelhaarfollikel, Leithaar) und laterale (Seitenhaarfollikel, Grannenhaar) Primärfollikel unterschieden [Habermehl 1996]. In den Zwischenräumen entwickeln sich später neue Haaranlagen, die als Sekundär- oder Beihaarfollikel bezeichnet werden [Militzer 1982] und den Wollhaaren entsprechen. Bei den meisten Tieren stehen sie mit den Primärfollikeln in Kontakt und treten in unterschiedlicher Anzahl mit ihnen zusammen durch eine gemeinsame Öffnung an die Oberfläche. Diese Formation wird auch als Haarbündel (Abb. 3) bezeichnet [Oberste-Lehn und Nobis, 1963, Ryder 1973].



**Abb. 3:** Schema eines Haarbündels. Eine unterschiedliche Anzahl an Primär- und Sekundärhaaren, deren Follikel mit jeweils eigenen Talgdrüsen assoziiert sind, treten durch ein gemeinsames Infundibulum nach außen. PF, Primärfollikel; SF, Sekundärfollikel; T, Talgdrüse; I, Infundibulum

Abb. 4 (S.17) gibt die möglichen Lagebeziehungen der Haarfollikel zueinander wieder. Von den Haarfollikeltypen der Schweinehaut unterliegen nur die Primärhaarfollikel einem regelmäßigen Anordnungsmuster. Sie bilden Dreiergruppen, bei denen jeweils ein zentraler mit zwei lateralen Primärfollikeln ein gleichschenkliges Dreieck bildet. Die Sekundärhaarfollikel liegen dazwischen unregelmäßig verstreut [Meyer 1986]. Auch beim Meerschweinchen kommen nur Einzelfollikel vor; sie sind meist in Gruppen angeordnet [Militzer 1982].

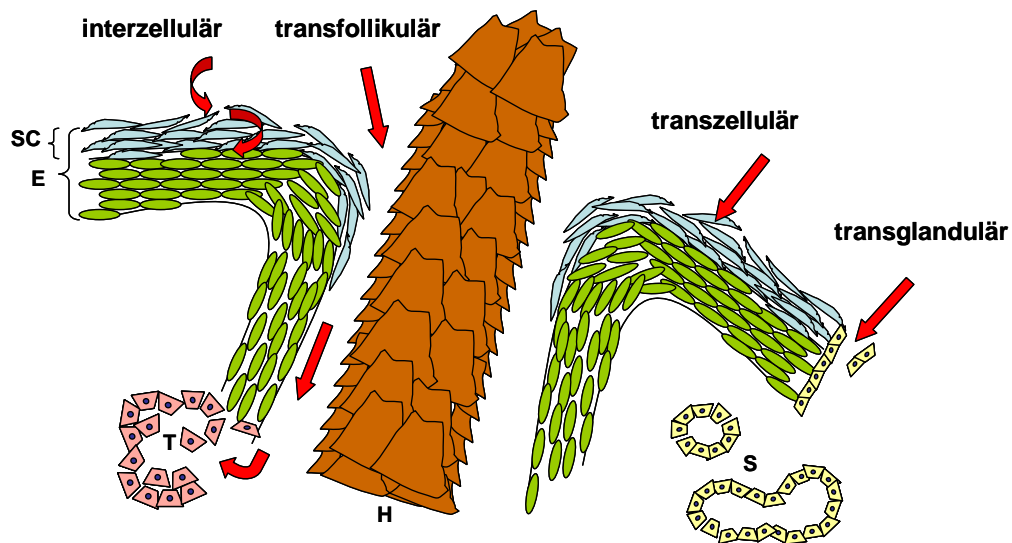
Bei den meisten Felltieren sind gruppierte Haarbündel und gemischte Haargruppen die vorherrschende Form der Follikelanordnung. Der Hund besitzt rasseabhängig 100 – 600 Haarbündel je cm<sup>2</sup>. Ein einzelnes Haarbündel besteht dabei aus einem zentralen großen Primärfollikel, der von mehreren lateralen und sekundären Follikeln flankiert wird und somit insgesamt aus bis zu 15 Einzelhaaren besteht [Meyer 1978]. Beim Kaninchen wird jeweils ein einzelnes Leithaar von drei oder mehreren Haarbündeln kranzförmig umgeben, die 6, 8 oder 12 dünne Beihaare enthalten [Salaman 1922, Hieronymi 1958]. Bei Ratten und Mäusen werden sowohl einfache, als auch gebündelte Haarfollikel nachgewiesen. Während in der Embryonalzeit Einzelfollikel vorherrschen [Militzer 1982], bilden sich bei Neonaten Gruppen aus 2 – 12 Einzelfollikeln [Hussein 1971]. Eine Haargruppe besteht in der Regel aus einem Deckhaar (Leit-, Ahlen- oder Knickhaar), das im Halbkreis auf seiner Rückseite von mehreren Woll- bzw. Zick-Zackhaaren umgeben wird [Priestley 1967]. Diese stehen ab dem 4. Lebenstag jedoch so dicht, dass Einzelgruppen nicht mehr zu unterscheiden sind [Gibbs 1941, Slee 1962]. Die Haarbündel bestehen entweder aus einem zentralen Primärhaar und mehreren Sekundärhaaren, oder nur aus Sekundär- oder Beihaarfollikeln. Bei den vergleichenden Untersuchungen muss berücksichtigt werden, dass das Haargruppenmuster beim Menschen und beim Labortier einer ausgeprägten Altersabhängigkeit unterliegt [Ryder 1973].



**Abb. 4:** Haaranordnungsmuster der Haare im Quer- (I) und im Längsschnitt (II) nach Oberste-Lehn und Nobis (1963) A: Einzelfollikel, zufällig verteilt; B: gruppierte Einzelfollikel; C: einzeln stehende Haarbündel; D: gruppierte Haarbündel; E: gemischte Haargruppen

## 2.2 Penetrationswege durch die Haut

Abb. 5 (S.18) beschreibt die Wege, die eine Substanz auf ihrem Weg durch die Haut nehmen kann: zwischen den Zellen hindurch (interzellulär) und über die Hautanhänge (transappendageal), zu denen die Haarfollikel und die assoziierten Talgdrüsen, sowie die Schweißdrüsen, gehören [Illel 1997]. Theoretisch existiert ein weiterer, dritter Weg durch die Zellen des Stratum corneum hindurch (transzellulär). Während dieser transzelluläre Weg bei der Penetration von Substanzen bisher praktisch keine Rolle zu spielen scheint, sind die Routen entlang des Lipidpfades im Stratum corneum [Potts und Francoeur 1991] und durch die Haarfollikel entscheidend [Otberg *et al.*, 2004, Lademann *et al.*, 2001 und 2004, Lauer *et al.*, 1995]. Die Bedeutung, die die einzelnen Routen bei der perkutanen Absorption von Stoffen besitzen, hängt einerseits von ihrem Flächenanteil und der Länge des Penetrationsweges ab. Andererseits spielen Diffusivität und Löslichkeit der Komponenten eine entscheidende Rolle [Schaefer und Redelmaier 1996].



**Abb. 5:** Penetrationswege in die Haut; SC, Stratum corneum; E, Epidemis; H, Haarschaft; T, Talgdrüse; S, Schweißdrüse

### 2.2.1 Der interzelluläre Weg durch das Stratum corneum

Als einzige kontinuierliche Domäne im Stratum corneum kommt den interzellulären Lipiden eine Schlüsselrolle in dessen Funktion als Hauptbarriere der Haut zu [Landmann 1988, Wertz 1986]. Nachdem Studien [Bronaugh *et al.*, 1982] zeigten, dass zwischen der Hautdicke und der perkutanen Absorption verschiedener Spezies keine Korrelation besteht, entwickelten Elias *et al.* (1981) die Theorie, dass der Lipidgehalt der Haut die Hauptbarriere gegen perkutane Absorption darstellt. Die Autoren postulierten weiter, dass Variationen bei der Penetration durch die Haut verschiedener Spezies auf Unterschiede im Lipidgehalt zurückzuführen sind. Diese Relevanz wird durch die Tatsache unterstützt, dass bei der Permeation von Stoffen durch das Stratum corneum ein enger Zusammenhang zwischen der Polarität (Hydrophobizität) und den Permeabilitätskoeffizienten der Komponenten besteht [Flynn 1990]. Daraus lässt sich ableiten, dass die hydrophoben interzellulären Lipide ein permeationslimitierendes Element darstellen [Tayar *et al.*, 1991].



So resultieren sowohl die experimentelle Extraktion der Lipide [Grubauer *et al.*, 1989, Abrams *et al.*, 1993, Imokawa *et al.*, 1986, Hadgraft *et al.*, 1992, Landmann 1988, Menczel 1999, Alvarez-Roman *et al.*, 2003], als auch genetisch bedingte Änderungen in der Zusammensetzung [Schaefer und Redelmaier 1996] in einem stark erhöhten transepidermalen Wasserverlust sowie in veränderten Penetrationsraten. Die Lipidmatrix folgt einem gewundenen Pfad zwischen den Korneozyten hindurch. Diese strukturelle Besonderheit ist mitverantwortlich für die Barriereigenschaften des Stratum corneum [Potts und Francoeur, 1991]. Die Frage, welche Eigenschaften der interzellulären Lipidmatrix die Diffusivität von Verbindungen durch das Stratum corneum bestimmen, ist noch nicht endgültig geklärt. Grundsätzlich kann die Diffusion senkrecht (translamellar) oder parallel (lateral-lamellar) zu den Lipidlamellen erfolgen. Seelig und Seelig (1980) vermuteten einen Zusammenhang zwischen der Anzahl der trans-gauche Isomerisierungen (Parameter der Membranordnung) und der translamellaren Diffusion. Die Bedeutung der Membranordnung der Stratum corneum Lipide für die Barrierefunktion wird durch die Anwesenheit von kristallinen Domänen verdeutlicht, die als die höchst organisierten Lipidstrukturen in biologischen Systemen gelten. Die laterale Diffusion entlang der gewundenen Lipidlamellen ist ebenfalls ein wichtiger Schlüssel in der Membranbarriere. Sie wird durch die Membranfluidität, bzw. Membranviskosität beeinflusst. Die Formation von kontinuierlichen festen starren Domänen im Stratum corneum ist ein zusätzlich bestimmender Faktor, da deren Anwesenheit mit  $10^6$ mal geringeren Diffusionskoeffizienten, verglichen mit Zellmembranen, assoziiert ist. Es ist wahrscheinlich, dass die Bewegungseigenschaften der interzellulären Lipide von den drei Lipidhauptklassen abhängen, denn relativ kleine Änderungen in deren Zusammensetzung haben eine große Auswirkung auf das Phasenverhalten [Schaefer und Redelmaier 1996].

### **2.2.2 Die Rolle der Haarfollikel bei der Penetration**

Die Tatsache, dass Haarfollikel einen entscheidenden Beitrag zur Penetration von topisch applizierten Stoffen durch die Haut leisten, blieb lange Zeit unerkannt. Bei ihren Untersuchungen an der Haut des Menschen vermuteten Feldmann und Maibach (1967) sowie Maibach *et al.* (1971) aufgrund von regionalen Unterschieden bei der Absorption von  $^{14}\text{C}$  Cortisol und verschiedenen Pestiziden, dass die Haarfollikel bei der perkutanen Penetration eine Rolle spielen.

Tur *et al.* (1991) zeigten, dass beim Menschen ein Zusammenhang zwischen der Absorption von Methylnicotinat und der Haarfollikeldichte verschiedener Körperareale existiert. Scheuplein (1967) entwickelte ein mathematisches Modell, nachdem Shunt – Diffusion kurz nach der Applikation einer Substanz potentiell größer ist, als die Diffusion durch die Stratum corneum Lipidmatrix. Weiterhin ist der Weg durch Shuntrouten vor allem für sehr langsam diffundierende Chemikalien von Bedeutung. Essa *et al.* (2002) entwickelten eine Stratum corneum - Epidermis Sandwichmethode mit der sie bewiesen, dass Shunts in der Haut des Menschen einen wesentlichen Beitrag zum iontophoretischen Transport von Liposomen leisten. In zahlreichen Studien an Tieren [Illel *et al.*, 1991, Hueber *et al.*, 1992, Kao *et al.*, 1988] wurden die Penetrationsraten normaler und follikelfreier Haut verglichen, um die Rolle der Haarfollikel bei der Absorption verschiedener Substanzen zu untersuchen. Neugeborene Ratten besitzen noch keine Haarfollikel, ihre Entwicklung beginnt erst 5 Tage nach der Geburt. Der Vergleich der Penetration von Hydrocortison durch die Haut neugeborener und 5 Tage alter Ratten beweist, dass die follikelfreie Haut sehr viel weniger permeabel ist, als jene, bei der die Haarfollikel eine potentielle Shuntroute darstellen [Behl *et al.*, 1984]. Illel und Schäfer (1988) untersuchten die *in vivo* Absorption von <sup>3</sup>H-Hydrocortison bei intakter Haut von Nacktratten und im induzierten follikelfreiem Rattenmodell nach Behl *et al.* (1981). Es zeigte sich, dass die Diffusionsraten der intakten Haut um bis zu 50fach größer waren als im follikelfreiem Modell. Auch Penetrationsuntersuchungen anderer topisch applizierter Stoffe [Hueber *et al.*, 1992 und 1994, Illel 1991] offenbarten höhere Konzentrationen und Absorptionsraten wenn die Möglichkeit der Shunt - Diffusion nicht gegeben war. Mit Hilfe der Fluoreszenzmikroskopie wurden nach Applikation von Benzopyren auf die Haut von Nacktmäusen und normal behaarten Mäusen fluoreszierende Areale in den Follikelkanälen der behaarten Tiere nachgewiesen [Kao *et al.*, 1988]. Am Meerschweinchen wurde mit dieser Methode Vitamin A *in vivo* in Haarfollikeln und Schweißdrüsen detektiert [Montagna 1954]. In jüngster Zeit gelang der Nachweis von topisch applizierten Mikropartikeln und Liposomen [Lademann *et al.*, 1999, Jung *et al.*, 2006]. Ebenso sind Pollenallergene in der Lage, die Haarfollikel zu penetrieren [Wilken Diss. 2005]. Aus der Beobachtung, dass bestimmte, topisch applizierte Substanzen in den Follikeln nachweisbar sind und andere nicht, wurde abgeleitet, dass die physikalischen und chemischen Eigenschaften des Stoffes selbst für den Transport mitbestimmend sind [Review Lauer *et al.*, 1995]. So hängt die Permeation in den Haarfollikel von der Größe, der Ladung und der Formulierung der Substanz ab [Lieb *et al.*, 1994].

Schäfer *et al.* (1990) zeigten, dass lipophile Mikropartikel mit einem Durchmesser von 7 µm und kleiner tief in den Follikelkanal penetrieren. Die lang verbreitete Ansicht, dass die Haarfollikel des Menschen nur 0,1% der Hautoberfläche ausmachen, wurde durch Vermessungen der Vellushaarfollikel widerlegt. Otberg *et al.* (2004) bewiesen, dass das follikuläre Reservoir an einigen Körperstellen mit dem des Stratum corneum vergleichbar ist. Unterschiede in der Kapazität der Follikel bestehen nicht nur innerhalb der verschiedenen Körperareale des Menschen; auch innerhalb einzelner ethnischer Gruppen gibt es Variationen [Mangelsdorf *et al.*, 2006]. Weiterhin muss der Einfluss der Hautanhänge auch in Zusammenhang mit seinen Sekreten (Sebum, Schweiß) betrachtet werden. Diese können den Wasser- und Lipidgehalt des Stratum corneum verändern und somit die Absorption von Molekülen modifizieren [Scheuplein 1967, Ebling *et al.*, 1991]. Daneben existiert ein deutlicher Zusammenhang zwischen dem Haarwachstumsstatus und der transfollikulären Penetration. Follikel, bei denen weder Sebumproduktion noch Haarwachstum nachgewiesen werden kann, werden daher als „inaktive“ Follikel bezeichnet [Lademann *et al.*, 2001]. Mit Laserspektroskopischen Untersuchungen konnte gezeigt werden, dass die Öffnungen von „inaktiven“ Haarfollikeln durch Keratinozytenpfropfen verschlossen und somit für die Penetration blockiert sind [Otberg *et al.*, 2004]. Die Behandlung der Haut mit der CSSB – Technik entfernt die Verschlüsse und maximiert die follikuläre Absorption [Otberg *et al.*, 2004, Schäfer und Lademann 2001, Toll *et al.*, 2004]. Lademann *et al.* (2006) bewiesen kürzlich in einem Vergleich der Speicherkapazität von Nanopartikeln im Stratum corneum und Haarfollikeln, dass in letzteren eine bis zu 10fach längere Speicherung erfolgt. Damit wird ersichtlich, dass das Potential der Haarfollikel nicht unterschätzt werden darf. Inzwischen spekulieren einige Autoren, dass die Penetration bestimmter Substanzen via Hautanhänge bei Tieren mit hoher Haarfollikel- und Talgdrüsendichte, wie Schaf oder Rind, bedeutender ist als der interzelluläre Weg [Magnusson *et al.*, 2001].

### **2.2.2.1 Vermessung der Haarfollikel mit Hilfe der CSSB**

Die Cyanoacrylate Skin Surface Biopsy (CSSB) ist eine Methode die die Vermessung der Infundibula der Vellushaarfollikel in verschiedenen Körperregionen ermöglicht [Otberg *et al.*, 2004, Pagnoni *et al.* 1994]. Durch auf die Haut aufgetragenes Cyanacrylat werden nicht nur die anhaftenden oberen Schichten des Stratum corneum und das Haar entfernt.

Der Kleber gelangt auch durch die Follikelöffnung in das Infundibulum und füllt es aus. Somit entsteht eine Follikelteilbiopsie. Cyanacrylat findet als kommerziell erhältlicher Einkomponentenkleber, sowie auch als Wundkleber in der Chirurgie weltweit Verwendung. Cyanacrylat polymerisiert unter leichtem Druck innerhalb weniger Sekunden. Die Technik der Hautoberflächenbiopsie wurde erstmals durch Marks und Dawber (1971) beschrieben. Dabei konnten die anhaftenden oberflächlichen Hornzellen, einschließlich dort residierender Mikroflora, unter dem Mikroskop untersucht werden. Dass mit dieser Methode auch Vellushaare samt Teilen des Haarfollikels extrahiert werden können, bestätigten Holmes *et al.* (1972) und nutzten dieses Verfahren, um Follikelinhalte zu sammeln und zu analysieren. In weiteren Untersuchungen wurde die Hautoberflächenbiopsie verwendet, um Änderungen in der mikrobiellen Besiedlung [Mills und Kligman 1983] und der Zusammensetzung der Sebumlipide [Downing 1968, Greene *et al.*, 1970] bei Aknepatienten zu eruieren.