



Universiteit
Leiden
The Netherlands

Development of a vernix caseosa substitute : a novel strategy to improve skin barrier function and repair

Rißmann, R.

Citation

Rißmann, R. (2009, March 17). *Development of a vernix caseosa substitute : a novel strategy to improve skin barrier function and repair*. Retrieved from <https://hdl.handle.net/1887/13664>

Version: Not Applicable (or Unknown)

License: [Leiden University Non-exclusive license](#)

Downloaded from: <https://hdl.handle.net/1887/13664>

Note: To cite this publication please use the final published version (if applicable).

Appendix

Samenvatting

List of abbreviations

List of publications

Curriculum vitae

Acknowledgements

Samenvatting

Achtergrond

De geboorte markeert een mijlpaal in het aanpassingsproces van een fetus. Tijdens de geboorte verandert de omgeving van een vochtige, warme en steriele naar een gasvormige, koudere omgeving vol met xenobiotica. Samen met andere organen van het lichaam, moet de huid zich aanpassen aan deze nieuwe omstandigheden [1]. De huid speelt een sleutelrol in het beschermen van het lichaam: het vormt de grens tussen de vitale organen en de externe omgeving. De buitenste huidlaag, de hoornlaag vormt de belangrijkste barrière voor het binnendringen van stoffen. De hoornlaag bestaat uit verhoornde cellen (corneocyten) ingebed in een lipiden matrix. Tijdens de geboorte wordt de huid bedekt door een extra laag, vernix caseosa (VC). Deze natuurlijke biofilm is een witte, vette, smeerbare crème die tijdens het laatste trimester van de zwangerschap door de humane foetus wordt aangemaakt en zich over de hele huid verspreidt. De structuur van VC lijkt erg veel op de structuur van de hoornlaag en bestaat ook uit corneocyten omgeven door lipidendomeinen.

VC bestaat uit ongeveer 80% water, 10% eiwitten en 10% lipiden [2, 3]. Het water bevindt zich voornamelijk in de corneocyten van deze natuurlijke biofilm. De cellen zijn polygonaal en vlak met een doorsnede van ongeveer 20 tot 40 μm [4]. De lipiden van VC zijn onder te verdelen in verschillende lipidenklassen met variërende polariteit. Zo zijn de meest voorkomende lipidenklassen sterolesters/waxesters (SE/WE), triglyceriden (TG) en dihydroxywaxesters (DIOL) [5]. Daarnaast zijn alle barrièrelipiden, d.w.z. cholesterol (CHOL), vrije vetzuren (FFA) en ceramides (CER) aanwezig in VC, maar in veel lagere hoeveelheden dan in de hoornlaag [2].

Uit de literatuur blijkt dat VC een aantal interessante biologische eigenschappen bezit. VC beschermt de hoornlaag tegen te hoge hydratatie *in utero* vóór de geboorte. Bovendien fungeert VC als glijmiddel tijdens de geboorte en beschermt het de hoornlaag tegen uitdroging na de geboorte [6, 7]. Genoemde eigenschappen maken VC interessant voor therapeutische toepassingen. Zo zouden b.v. prematuren, die door een te vroege geboorte nog geen volledige hoornlaag ontwikkeld hebben en dus beschermd moeten worden tegen uitdroging, gebaat kunnen zijn bij een extra beschermende laag. Omdat de structuur van VC veel lijkt op die van de hoornlaag, zou VC een uitstekende kandidaat hiervoor kunnen zijn. Tevens heeft men verondersteld dat VC de vorming van de barrièrefunctie stimuleert wat ook van voordeel voor de onderontwikkelde huid van prematuren zou kunnen zijn [7]. Tenslotte kan VC ook van toepassing zijn voor patiënten met een zieke huid. Zieke huid is meestal

gekenmerkt door een barrière deficiëntie [8]. Echter de klinische toepassing van VC is beperkt door de gelimiteerde beschikbaarheid en door het risico op overdracht van ziektes.

Doel van het onderzoek beschreven in dit proefschrift

Het doel van het onderzoek beschreven in dit proefschrift is het ontwikkelen van synthetisch VC biofilms, welke de unieke eigenschappen, samenstelling en structuur van VC zo veel mogelijk nabootsen.

Om dit te bereiken worden de volgende onderzoeksstappen uitgevoerd

- I) De gedetailleerde karakterisering van VC, gericht op de lipidensamenstelling, ultrastructuur en fysisch-chemische eigenschappen. Deze informatie is cruciaal voor het ontwikkelen van de synthetische biofilms.
- II) De selectie van de juiste bron voor de apolaire lipiden. Na menging van deze apolaire lipiden met barrièrelipiden en TG moet de samenstelling van de biofilm zoveel mogelijk de samenstelling van VC lipiden nabootsen. Vervolgens worden deze mengsels fysisch-chemisch gekarakteriseerd. Hieruit wordt het mengsel geselecteerd, dat in samenstelling en lipidenorganisatie de natuurlijke VC lipiden het dichtst benadert.
- III) De ontwikkeling van kunstmatige corneocyten, die de natuurlijke cellen nabootsen. Dit onderzoek werd uitgevoerd door M.H.M. Oudshoorn (Universiteit Utrecht) en staat beschreven in haar proefschrift met als titel "Composite of microgels and lipids as biofilm to restore skin barrier function" [9].
- IV) De bereiding van de synthetische biofilms. De synthetische corneocyten en lipiden mengsels worden met elkaar gemengd in verschillende verhoudingen. De eigenschappen van de ontstane synthetische biofilms worden vervolgens vergeleken met die van natuurlijke VC. Dit betreft homogeniteit, stabiliteit, smeereigenschappen, (ultra-) structuur en dehydratatiesnelheid van VC.
- V) Het onderzoek naar het effect van de synthetische biofilm op het herstel van de barrière functie. Uit dit onderzoek wordt tenslotte de meest belovende biofilm geselecteerd.

Het onderzoek, dat beschreven wordt in onderdeel IV en V werd uitgevoerd in samenwerking met M.H.M. Oudshoorn [9].

In **Hoofdstuk 1** is een uitgebreide inleiding over het onderwerp van dit proefschrift gegeven. Verder is het proefschrift uit 3 experimentele hoofdstukken opgebouwd.

Deel I – Gedetailleerde karakterisering van vernix caseosa

In **Hoofdstuk 2**, is een gedetailleerde analyse van de lipiden in VC uitgevoerd. Dit betreft zowel de analyse van de verschillende lipidenklassen alsook de ketenlengtes van de vetzuurstaarten. Er werd een breed spectrum van lipiden met verschillende polariteit geïdentificeerd. De lipidenklassen SE/WE en TG met een alkyl-staartlengte tot 32 koolstof atomen komen het meeste voor in VC. De barrièrelipiden (CHOL, FFA, CER) zijn slechts in kleine hoeveelheden aanwezig in VC. De samenstelling van de CER in VC lijkt erg veel op de CER samenstelling in de hoorlaag. Echter, de FFA in VC bevatten in vergelijking met FFA in de hoorlaag meer vertakte, korte en onverzadigde staarten. Tevens bleek dat in VC nog een andere groep lipiden aanwezig is, namelijk lipiden die covalent aan de buitenkant van de corneocyten gebonden zijn. De samenstelling van deze gebonden lipiden (d.w.z. vetzuren, ω -hydroxyzuren and ω -hydroxy-CER) lijkt ook erg veel op de samenstelling van de gebonden lipiden in de hoorlaag. Met behulp van elektronenmicroscopische technieken en röntgendiffractie werd de structuur van VC onderzocht. Het bleek dat water zich voornamelijk in de corneocyten bevindt samen met een netwerk van keratinefilamenten. De lipiden tussen de corneocyten zijn minder regelmatig georganiseerd dan in de hoorlaag. In het onderzoek beschreven in **Hoofdstuk 3** werden de fysisch-chemische eigenschappen van VC onderzocht niet alleen bij kamertemperatuur, maar ook bij 37°C (de temperatuur van babyhuid). Uit waterafgifte en wateropname metingen bleek dat zowel bij kamertemperatuur als bij 37°C het dehydratie-rehydratie proces irreversibel te zijn. Tevens bleek dat de opname- en afgiftesnelheid van water in VC sterk temperatuursafhankelijk is. De dehydratie van VC gaat bij 37°C 3.7 keer sneller dan bij kamertemperatuur. Er werd onderzocht of dit veroorzaakt zou kunnen zijn door een verandering in de lipidenorganisatie. Met behulp van thermische analyse werden twee overlappende lipidenovergangen gemeten rond 20°C en rond 26°C. Bovendien bleek uit röntgendiffractiemetingen dat de lipiden meer geordend zijn bij kamertemperatuur dan bij 37°C. Tevens bleek de temperatuursafhankelijkheid van de lipidenorganisatie reversibel te zijn. Deze resultaten illustreren dat de dat VC zich aanpast aan de sterke wisselingen van omstandigheden (temperatuur, luchtvochtigheid) tijdens de bevalling: een lagere omgevingstemperatuur resulteert in een minder snelle dehydratie van VC mogelijk veroorzaakt door een verandering in de lipidenorganisatie.

Zoals beschreven voor de hoornlaag zijn CHOL, FFA en CER - de zogenoemde barrièrelipiden - ook aanwezig in de VC-lipiden. De barrièrelipiden vormen in de hoornlaag een zeer geordende structuur, namelijk twee lamellaire fasen met repeterende afstanden van 6 en 13 nm. Vooral de 13 nm structuur is heel karakteristiek voor de hoornlaag en wordt ook wel de lange periodiciteitsfase (LPP) genoemd. Om te onderzoeken of deze fase ook in VC-lipiden gevormd kan worden, zijn monsters met verschillende methodes bereid (**Hoofdstuk 4**). Een VC-lipiden-oplossing, opgebracht op een drager met behulp van of sprayen of smeren na vriesdrogen, vormden een structuur met een repeterende afstand van 4.7 nm. Indien de VC-lipidenoplossing met behulp van stikstof werd gedroogd en opgesmeerd op een drager, was de LPP met een repeterende afstand van 13 nm wel aanwezig. In deze studies werd voor het eerst aangetoond dat de LPP ook bij lichaamstemperatuur (37°C) kan worden gevormd.

Deel II - Nabootsen van vernix caseosa (lipiden)

VC bestaat uit hydrofiele corneocyten die zijn ingebed in een lipidenmatrix. De corneocyten zijn verantwoordelijk voor de waterbindende eigenschappen van VC en uit het onderzoek beschreven in het proefschrift van M.H.M. Oudshoorn blijkt dat hydrogeldeeltjes de rol van de corneocyten uitstekend kunnen nabootsen. Echter, ook de lipidenmatrix moet nagenoeg dezelfde eigenschappen hebben als de lipiden in VC. Om dit te kunnen bereiken moest eerst een geschikte bron voor de lipiden gevonden worden (**Hoofdstuk 5**). Qua samenstelling bleek dat anhydrous lanoline (schapen wolvet) de meest optimale bron was voor de apolaire lipiden in VC (d.w.z. SE, WE en DIOL). Bovendien bevatten de lipiden in lanoline grotendeels vertakte vetzuurstaarten, zoals is waargenomen in VC (Hoofdstuk 2). Drie verschillende lipidenfracties werden geïsoleerd uit lanoline. Ieder van deze fracties werd gemengd met TG, squaleen (SQ) en de barrièrelipiden. De lipidenmengsels werden met behulp van thermische analyse, röntgendiffractie en infrarood-spectroscopie gekarakteriseerd. Het lipidenmengsel, dat de fysisch-chemische eigenschappen van VC-lipiden het dichtst benaderde, werd geselecteerd voor verder onderzoek (Hoofdstuk 6). De meest optimale lipidenmengsels bevatten onverzadigde TG, SQ, CHOL, FFA en CER, DIOL, SE en WE. Uit het onderzoek van M.H.M. Oudshoorn bleek dat hydrogelen, gemaakt van het gecrosslinkt polymeer hyperbranched polyglycerol methacrylaat, de eigenschappen van de corneocyten het dichtst benaderden. In **Hoofdstuk 6** is beschreven hoe deze hydrogel deeltjes met de lipiden gemengd werden. Diverse formuleringen met verschillende verhoudingen deeltjes/lipiden (d.w.z. 2:1, 5:1) werden bereid. De deeltjes hadden variërende watergehaltes (d.w.z. 50% of 80%) en soms was ook een

additionele lipidencoating aangebracht. Na het mengen met een micromenger waren de formuleringen homogeen en minstens een maand stabiel bij 4°C. Het mengsel met een verhouding van 5:1 (deeltjes/lipiden) toonde een grote overeenkomst met natuurlijke VC wat betreft de structuur en de deeltjesverdeling. Verder konden de smerbaarheid, thermische eigenschappen en dehydratatiesnelheid van de biofilms veranderd worden door de samenstelling te veranderen. De meest optimale biofilm benaderde de eigenschappen van VC zeer dicht.

Deel III – In vivo studies om de biologische effecten van (natuurlijke) biofilms te onderzoeken

Nadat biofilms ontwikkeld waren, die de eigenschappen van natuurlijk VC goed nabootsten, werden de verschillende synthetische biofilms *in vivo* getest. Hierbij werd gefocuseerd op de herstelsnelheid van de barrièrefunctie. Echter een geschikt diermodel was niet voorhanden en moest daarom ontwikkeld worden. In **Hoofdstukken 7 en 8** zijn verschillende muis-modellen geëvalueerd om een betrouwbaar diermodel voor het herstel van beschadigde huid te ontwikkelen. Verschillende niveaus van barrièrebeschadiging met behulp van herhaald “tape-strippen” van haarloze muizen en het herstel van de barrière staan beschreven in **Hoofdstuk 7**. Een matig beschadigde huidbarrière herstelde zich binnen 72 uur terwijl bij ernstig beschadigde huidbarrière het herstel pas na 200 uur volledig was. Opbrengen van VC op het laatste model (d.w.z. ernstig beschadigde huid) versnelde aanzienlijk het herstelproces en al na 100 uren werd een volledig herstel van de huidbarrière waargenomen. Hieruit blijkt dat natuurlijk VC het herstelproces bevordert, zoals reeds werd gesuggereerd in de literatuur, maar nooit was aangetoond. In **Hoofdstuk 8** werd een ander model onderzocht, namelijk een verlaging van de huidbarrière door middel van acetonextractie. De huid herstelde binnen 72 uur na acetonbeschadiging. Uit histologisch onderzoek bleek dat tijdens het gebruik van acetonextractie niet alleen lipiden geëxtraheerd werd, maar ook zoals bij tape-strippen corneocyten mechanisch verwijderd worden. Vooral apolaire lipiden werden geëxtraheerd met aceton, maar de verhouding van de barrièrelipiden CER, CHOL and FFA veranderde niet. Bovendien kon geen verandering in de lipidenorganisatie vastgesteld worden. Deze resultaten zijn niet in overeenstemming met literatuurgegevens. In de literatuur wordt een significante lipidenextractie gerapporteerd en geen verwijdering van corneocyten. Uit het snellere herstel van de met aceton beschadigde huid blijkt, dat dit muismodel minder geschikt is om het effect van biofilms op barrièreherstel te onderzoeken.

In het vervolgonderzoek werd de tape-strip methode gebruikt om de synthetische biofilms te evalueren (**Hoofdstuk 9**). Diverse formuleringen, zoals beschreven in Hoofdstuk 6, werden opgebracht op gestripte huid met een sterk verminderde huidbarrière. Het effect van deze biofilms op het barrièreherstel werd onderzocht. Alle formuleringen bevorderden het herstel van de barrièrefunctie van de huid. Het sterkste effect werd waargenomen voor biofilms bestaande uit ongecoate hydrogeldeeltjes met 50% watergehalte en een deeltjes/lipiden-verhouding van 2:1. Deze resultaten wijzen op het belang van een optimale lipiden samenstelling en de optimale verhouding deeltjes/lipiden. Voor een effectieve werking van de biofilm werd duidelijk, dat de aanwezigheid van barrièrelipiden van groot belang is. De resultaten laten bovendien zien dat in dit diermodel de lipiden belangrijker zijn voor het versnelde herstel van de huid dan de waterhoudende corneocyten. Het barrièreherstel na behandeling met de meest optimale biofilm was vergelijkbaar met het barrièreherstel na behandeling met VC.

Conclusie

Dit proefschrift beschrijft het succesvol ontwikkelen en bereiden van nieuwe, synthetische biofilms, die de natuurlijke VC in structuur, samenstelling en eigenschappen nabootsen. De resultaten van de *in vivo* studies tonen een duidelijk positief, biologisch effect aan. De toekomst zal uitwijzen of het effect van deze biofilms ook in de kliniek zijn meerwaarde zal bewijzen.

Referenties

- [1] Mauro T, Behne M. Acid Mantle. In: *Neonatal Skin: Structure and Function* (SB Hoath, HI Maibach and EK Boisits, eds), Marcel Dekker, New York 2003:pp. 47-58.
- [2] Hoeger PH, Schreiner V, Klaassen IA, Enzmann CC, Friedrichs K, Bleck O. Epidermal barrier lipids in human vernix caseosa: corresponding ceramide pattern in vernix and fetal skin. *Br J Dermatol* 2002 Feb;146(2):194-201.
- [3] Pickens WL, Warner RR, Boissy YL, Boissy RE, Hoath SB. Characterization of vernix caseosa: water content, morphology, and elemental analysis. *J Invest Dermatol* 2000 Nov;115(5):875-81.
- [4] Agorastos T, Hollweg G, Grussendorf EI, Papaloucas A. Features of vernix caseosa cells. *Am J Perinatol* 1988 Jul;5(3):253-9.
- [5] Kaerkaeinen J, Nikkari T, Ruponen S, Haahti E. Lipids Of Vernix Caseosa. *J Invest Dermatol* 1965 May;44:333-8.
- [6] Visscher MO, Narendran V, Pickens WL, LaRuffa AA, Meinzen-Derr J, Allen K, Hoath SB. Vernix caseosa in neonatal adaptation. *J Perinatol* 2005 Jul;25(7):440-6.
- [7] Hoath SB, Pickens WL, Visscher MO. The biology of vernix caseosa. *Int J Cosmet Sci* 2006 Oct;28(5):319-33.
- [8] Haubrich KA. Role of Vernix caseosa in the neonate: potential application in the adult population. *AACN Clin Issues* 2003 Nov;14(4):457-64.
- [9] Oudshoorn MHM. Composite of microgels and lipids as biofilm to restore skin barrier function. *Dissertation*, University of Utrecht, The Netherlands 2008.

List of abbreviations

AUC	area under the curve
CER	ceramides (for nomenclature of CER see introduction)
CHOL	cholesterol
CLSM	confocal laser scanning microscopy
Cryo-SEM	cryo-scanning electron microscopy
DIOL	dihydroxy wax ester
DOPC	dioleoyl phosphatidylcholine
DOTAP	dioleoyl trimethylammoniumpropane
DSC	differential scanning calorimetry
Euc	eucerin cum aqua
FAME	fatty acid methyl ester
FFA	free fatty acids
FFEM	freeze-fracture electron microscopy
FITC	fluorescein isothiocyanate
FTIR	Fourier transform infrared spectroscopy
G'	storage modulus
G''	loss modulus
GC	gas chromatography
HPTLC	high-performance thin-layer chromatography
HyPG	hyperbranched polyglycerol
HyPG-MA	methacrylated hyperbranched polyglycerol
i.p.	intraperitoneal
LanSE, X, DI	isolated fractions from lanolin (wool wax)
LPP	long periodicity phase
RT	room temperature
SAXD	small-angle X-ray diffraction
SC	stratum corneum
SD	standard deviation

Appendix

SE	sterol esters
SQ	squalene
SSLM	semi-synthetic lipid mixtures
TEWL	transepidermal water loss
TG	triglycerides
TGA	thermogravimetric analysis
Vas	Vaseline
VC	vernix caseosa

List of publications

Papers

Rissmann R, Groenink HWW, Weerheim AM, Hoath SB, Ponec M, Bouwstra JA. New insights into ultrastructure, lipid composition and organization of vernix caseosa. *Journal of Investigative Dermatology* 2006; 126:1823-1833.

Oudshoorn MHM, **Rissmann R**, Bouwstra JA, Hennink WE. Synthesis and characterization of hyperbranched polyglycerol hydrogels. *Biomaterials* 2006; 27(32):5471-5479

Oudshoorn MHM, **Rissmann R**, Bouwstra JA, Hennink WE. Synthesis of methacrylated hyaluronic acid with tailored degree of substitution. *Polymer* 2007; 48:1915-1920

Oudshoorn MHM, Penterman R, **Rissmann R**, Bouwstra JA, Broer DJ, Hennink WE. Preparation and characterization of structured hydrogel microparticles based on crosslinked hyperbranched polyglycerol. *Langmuir* 2007; 23:11819-11825

Rissmann R, Groenink HWW, Gooris GS, Oudshoorn MHM, Hennink WE, Ponec M and Bouwstra JA. Temperature-induced changes in structural and physicochemical properties of vernix caseosa. *Journal of Investigative Dermatology* 2008; 128(2):292-299

Rissmann R, Oudshoorn MHM, Kocks E, Hennink WE, Ponec M, Bouwstra JA. Lanolin-derived lipid mixtures mimic closely the lipid composition and organization of vernix caseosa lipids. *Biochimica et Biophysica Acta – Biomembranes* 2008; 1778(10):2350-2360

Rissmann R*, Oudshoorn MHM*, van der Coelen D, Hennink WE, Ponec M, Bouwstra JA. Development of a murine model to evaluate the effect of vernix caseosa on skin barrier recovery. *Experimental Dermatology* 2009 Feb;18(2):178-84.

Rissmann R, Gooris GS, Ponec M, Bouwstra JA. Long periodicity phase in extracted lipids of vernix caseosa obtained with equilibration at physiological temperature. *Chemistry and Physics of Lipids*; in press

Rissmann R*, Oudshoorn MHM*, Zwier R, Ponec M, Bouwstra JA, Hennink WE. Mimicking vernix caseosa - preparation and characterization of synthetic biofilms. *International Journal of Pharmaceutics*; in press

Rissmann R*, Oudshoorn MHM*, van der Coelen D, Hennink WE, Ponec M, Bouwstra JA. Effect of synthetic vernix biofilms on barrier recovery of damaged mouse skin. *Experimental Dermatology*; in press

Rissmann R, Oudshoorn MHM, Ponec M, Hennink WE, Bouwstra JA. Skin barrier disruption by acetone – observations in a hairless mouse skin model. Submitted as short communication

* contributed equally as first author

Curriculum Vitae

Robert Rissmann was born on September 11, 1977 in Berlin, Germany. In 1997 he completed his high-school diploma with specialization in chemistry and mathematics at the Böhling Gymnasium, Berlin, Germany. After 1 year of alternative civilian service, he started in 1998 his pharmacy education at the Free University Berlin, Germany. During his studies he conducted several internships, among others at the research and development departments of Merck KGaA (Darmstadt, Germany, 2000) and SciCan Health (Toronto Canada, 2001). During his pre-registration year he joined the group of Prof. P. Maincent in the department of pharmaceutics of the University Henri Poincaré (Nancy, France) for 6 months. There he worked on micro- and nanoencapsulation to develop dosage forms with sustained release. He obtained the licensure as pharmacist in May 2004 and worked then as a pharmacist at the Stierbrunnen-Apotheke (Berlin, Germany). In July 2004 he started his PhD project in the Division of Drug Delivery Technology at the Leiden/Amsterdam Center for Drug Research (LACDR), Leiden University, Leiden, The Netherlands. Under the supervision of Prof. Dr. J.A. Bouwstra, Dr. M. Ponc and Prof. Dr. W.E. Hennink, he worked on the project: "Novel strategies to improve skin barrier function and repair". Since July 2008 he works as a lecturer at the Division of Analytical Biosciences at the LACDR.

Acknowledgements

Designing and making synthetic vernix was only possible because of direct and indirect help of so many of you. I deeply appreciate the effort and contribution of all of you, without your support and help this thesis could not have been realized.

It takes (at least) two to make synthetic vernix, in that case I worked on the project together with my fellow PhD-student from Utrecht University. Marion, you designed and produced the artificial corneocytes in your so typical, well-organized and neat way. We performed a lot of experiments together (I only mention tape stripping) and of course it was you who finished first with an excellent thesis. I am very happy that our collaboration turned out to be so efficient and productive.

I would also like to acknowledge the STW user's committee: Paul Boontje (STW), Johann Wiechers (JW Solutions), Kees Korevaar (Cosmoferm), Chris Dederen (Croda), Dick Broer (Philips) and Sicco Scherjon (Leiden University Medical Center, LUMC). You attended the progress meetings every six months and gave very valuable comments and criticisms. Sicco, you provided us regularly with vernix samples and often gave me the chance to present the progress of my work at the Department of Obstetrics at the LUMC. Without your cooperation, I could not have conducted the presented research. The enthusiastic discussions with you have always been very inspiring for me. Carin Kleijburg en Godelieve de Groot from the LUMC are acknowledged for making the logistics of vernix supply possible.

For DSC and rheology measurements, I went regularly to Utrecht to the Department of Pharmaceutics. I appreciated especially the help of Natasha, Niels, Marcel, Birgit and Maryam who made it an enjoyable time in the Wentgebouw. I acknowledge Herre and in particular Mies for their collaboration and assistance to set-up the experiments. Holger (and Eefje), you provided food, fun and shelter for the measuring nights and corrected the Dutch summary, thanks a lot. To discover science at its best and most intense, we went with a small group to Grenoble to perform X-ray diffraction measurements. I would like to express my gratitude towards Wim and Kristina for their help and input and of course to Gert, Daniel, Joop and Georgia for true gezelligheid during the long working hours. Gert, what would I have done without your ever-persisting (mental) help and support? The nice moments in the Gorlaeus, the fun during the beam-time and in the North Sea were very special for me. At the LUMC Department of Dermatology, Arij and Abdoel helped me unconditionally. Arij, your expertise in lipids is incredible and was of invaluable importance for me.

What's all the work without the logistics? I am very grateful for the help and support of Connie; you are really pulling the strings backstage in a fantastic manner. From the scratch on, I also had excellent support of a technician who handled (too) difficult experiments. Wouter, besides our friendship, you also took beautiful vernix EM pictures. Later on, Dennis joined the group and elegantly, sliced, stained and analyzed countless biopsies.

I was also very glad to have such good students. Varsha, Elise, Lies and Dana, you had a significant contribution to my project. Regardless how difficult a new method was to develop, how often you had to re-pack the column for the lipid isolation, you all worked very hard and of course I am very happy and proud that (some of) you pursue the academic career. Teaching the undergraduate students was also a nice but time-consuming task. Fortunately, at the LCP there were Trudy, Arjan and Paul who had enormous impact on the success and the efficiency of the practical courses. All technical problems were solved by the hands-on guys from the fine mechanical department: Raphaël, Henk & Co fixed and designed kindly everything in a fantastic manner. In the final year, we still needed to (quickly) set-up an *in vivo* model to prove the biological efficacy of (synthetic) vernix. Johan, Fred and Ine, you helped and supported wherever you could and made the experimental marathons feasible and enjoyable.

After coming to Leiden, I underestimated the difficulties of being a foreigner with different social, cultural and language background. Fortunately, the colleagues of the Division Drug Delivery and Technology (DDT) soon became friends and everything got much easier and enjoyable for me. With two friends I developed very strong bonds, Ding and Oliver. Sitting in the same (PhD) boat, we learned, discussed and laughed together during the last four, very exceptional years. You always lent me a hand for just any given problem, be it a broken bike, computer issues or translating a summary into Dutch. Looking back, it all seems to have passed so quickly. However, I am really glad that we share so many precious moments and that you also support me today as my paranimfen. Of course, I also appreciated the pleasant (working) atmosphere at DDT which would not have been possible without the nice (ex-) colleagues. Everybody from DDT made the work so enjoyable and special. Maytal, Marc, Miranda & Miranda, Kharis, Julia, Diogenes, Tomo, Sun, Bram, Suus, Tue, Christophe, Vasco, Andrea, Ferry, Elly, Myrra, Aat, Stephan, Mojgan, Nazmoen, Romano and Dirk-Jan, I am very grateful for your help and collegiality. I shall not forget to mention the pleasant moments I had with the (Erasmus) students, among those Christian, Hugo, Francisco, Tsambika and Veerle.

For a steady work flow, also a permanent social activity program was needed. Due to the international dinner club hosted by Ouarda and Rianne, I was quickly introduced to the international kitchen and community of Leiden. Joyful evenings were spent with Thierry, Jordi, Kjeld, Eugenio, Karthik, Massimo, Simon, Stephan, Matteo, Kristo, Martha and Merche and others. Kiri and Yapei, you made the last year(s) very pleasant. Fortunately, there were Hana, Christian and Otto who inspired, danced, baby-sitted and gave welcomed distraction to my PhD life.

My colleagues at the Division of Analytical Biosciences (ABS) kindly shared the last month of writing with me. I would like to express my gratitude to all but in particular towards Thomas who gave me the freedom and opportunity to complete the thesis while I was also teaching and researching at ABS. The research was set-up by Isabel, Judith, Louise and Rob with whom we had appealing work meetings. The established method is the basis for an ongoing project and I am looking forward to the collaboration on lipid analysis with Jeroen, Rob and Joke.

Ein besonderer Dank geht natürlich auch in die Heimat. Liebe Berliner, die Ablenkung von der Käseschmierforschung war bitter nötig. Die Zentrale hat alles gegeben, um daran mitzuwirken. Olivier, Solveig, Anke und Basti, danke für Eure Herzlichkeit, das „zu Hause“ und alle schönen Momente. Hagen, das Cover ist wirklich schick geworden, jetzt darfst du auchmal nach Leiden kommen. Ohne einen starken Rückhalt in der Familie (und die Wende) wäre das alles hier nicht möglich gewesen. Ein großes Dankeschön gilt daher natürlich auch den Wandlitzern und vor allem meinen lieben Eltern. Danke für Eure vorbehaltlose und tatkräftige Unterstützung!

Dear Sylvia, we started our joint adventure instinctively and without any hesitation nor doubt. Everything goes so smooth - *incroyable!* Just before finalizing the thesis you gave birth to our wonderful son Tristan (see photo in the introduction for his excellent vernix yield). You made me a proud and happy father and I am enjoying the new challenges with our little family so much. *Merci beaucoup* for all your confidence, help and support!

Ik heb geschreven.

Robert