



Universiteit
Leiden
The Netherlands

Stratum corneum hydration : mode of action of moisturizers on a molecular level

Caussin, J.

Citation

Caussin, J. (2009, June 17). *Stratum corneum hydration : mode of action of moisturizers on a molecular level*. Retrieved from <https://hdl.handle.net/1887/14739>

Version: Corrected Publisher's Version

License: [Licence agreement concerning inclusion of doctoral thesis in the Institutional Repository of the University of Leiden](#)

Downloaded from: <https://hdl.handle.net/1887/14739>

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

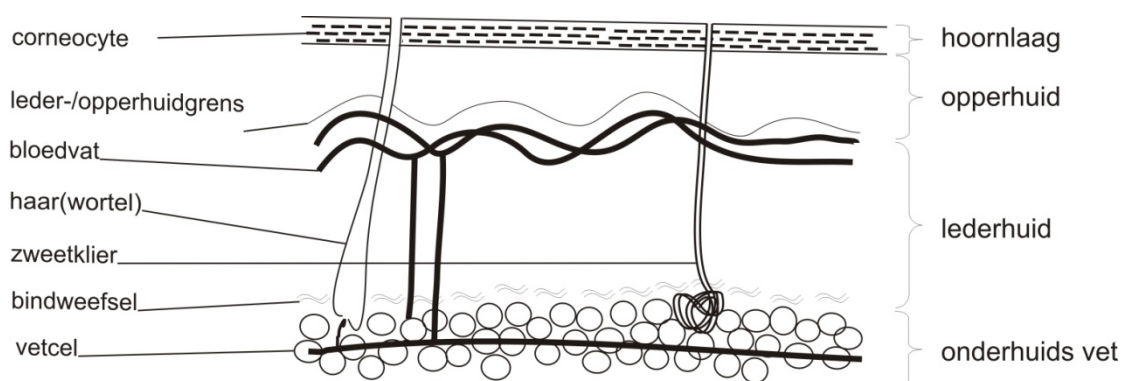
CHAPTER 10

SAMENVATTING

1. INLEIDING

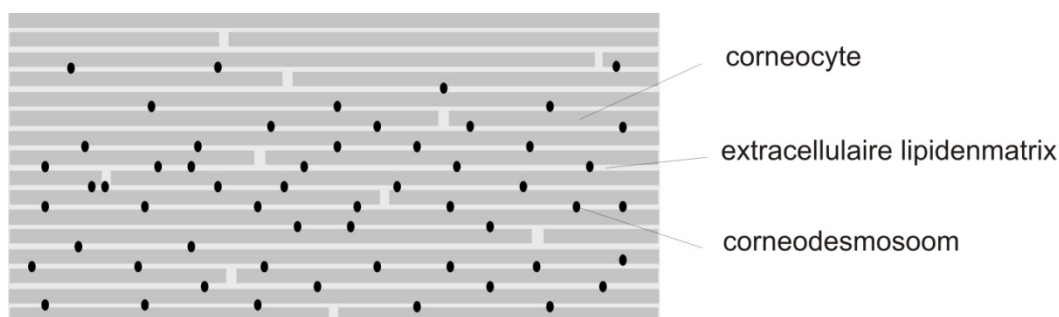
DE HUID: LEDERHUID, OPPERHUID EN HOORNLAAG

De huid (figuur 1) vormt de barrière tussen het lichaam en zijn omgeving. Ze bestaat uit twee delen, de lederhuid (latijn: dermis) en erboven de opperhuid (latijn: epidermis). De lederhuid vormt het dikste gedeelte van de huid en kan tot 3 mm dik zijn. Ze beschermt het lichaam tegen beschadiging door (bijvoorbeeld scherpe) voorwerpen. De opperhuid is veel dunner, slechts iets meer dan één tiende van een millimeter. Toch is het de opperhuid die het lichaam voor biologische (bijvoorbeeld bacteriën) en chemische stoffen beschermt. Bovendien voorkomt het bovenste deel van de opperhuid, de hoornlaag (latijn: stratum corneum), het uitdrogen van het lichaam (Schaefer, 1996). Dit laatste is voor het onderzoek beschreven in dit proefschrift het belangrijkste.



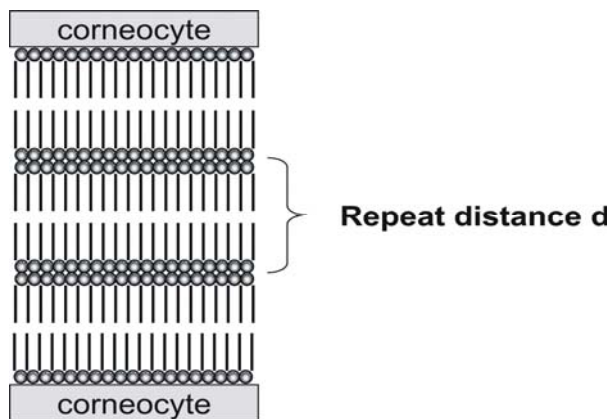
FIGUUR 1. Een schematisch overzicht van de huid. Van onder naar boven zijn er vier lagen te zien. De diepste laag is het onderhuidse vet dat uit vetcellen bestaat. Na een laag bindweefsel begint de lederhuid (*dermis*), die tot 1 mm dik kan zijn. Dit deel van de huid bevat adertjes die de haarwortels en zweetklieren met voedingsstoffen verzorgen. Ze verzorgen ook de cellen in de lederhuid, de fibroblasten en de keratinocyten onderin de opperhuid (*epidermis*) met voeding. De opperhuid heeft een golvende vorm en is 100 tot 150 μ m dik. Tijdens hun reis naar het oppervlak vormen de keratinocyten zich om tot corneocyten, de cellen waaruit de bovenste laag, de hoornlaag (*stratum corneum*) voor het grootste deel bestaat (zie figuur 2).

De hoornlaag (figuur 2) is 10 tot 15 μm (10 tot 15 duizenste mm) dik en bestaat uit platte, dunne cellen die in de opperhuid worden gevormd. Levende opperhuidcellen (keratinocyten) worden vanaf de onderkant van de opperhuid naar boven geduwd, richting het oppervlak van de huid. Tijdens dit transport ondergaan zij veel veranderingen, totdat ze dood, plat en vrijwel helemaal uitgedroogd zijn. Vanaf dat moment vormen ze de hoornlaag en worden ze corneocyten genoemd. Vóór de opperhuidcellen omgevormd worden tot corneocyten produceren ze grote hoeveelheden lipiden (vetten). In de hoornlaag bevinden zich tussen de corneocyten de lipiden. We noemen deze lipiden intercellulaire lipiden. Het zijn juist deze lipiden die ervoor zorgen dat de hoornlaag, en daarmee de huid, bijna geen water doorlaat en het lichaam niet uitdroogt.

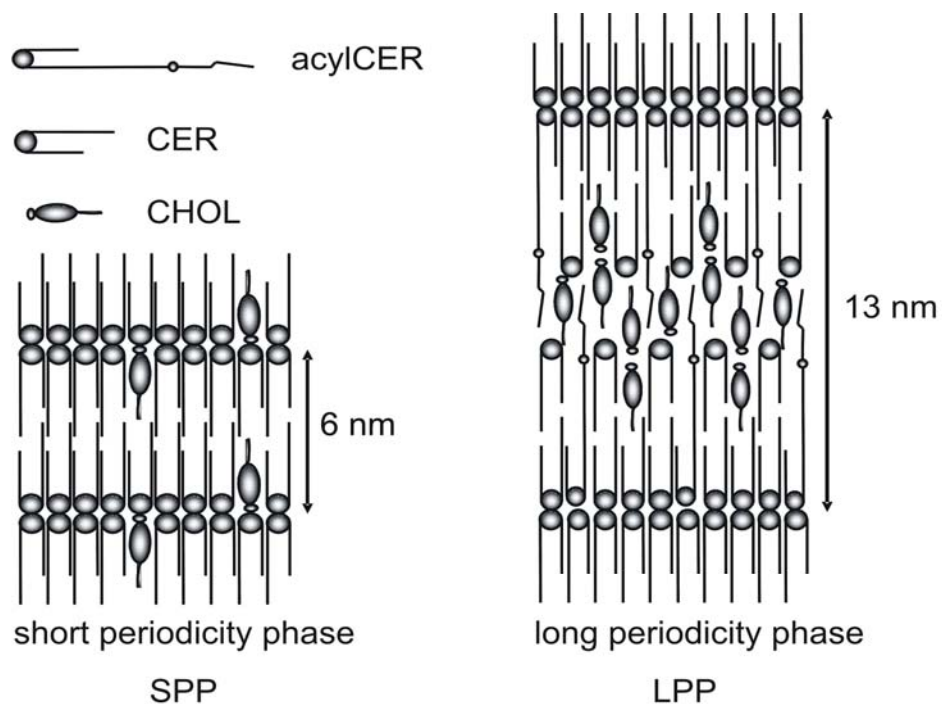


FIGUUR 2. De hoornlaag (*stratum corneum*). De hoornlaag bestaat uit grote, platte cellen die corneocyten worden genoemd. De corneocyten worden omgeven door vetten (lipiden) die ongeveer 10% van het gewicht van de hoornlaag uitmaken. Corneocyten zijn aan elkaar bevestigd met corneodesmosomen. Hoger in de hoornlaag worden deze door enzyme afgebroken, waardoor de huid haar cellen kan verliezen.

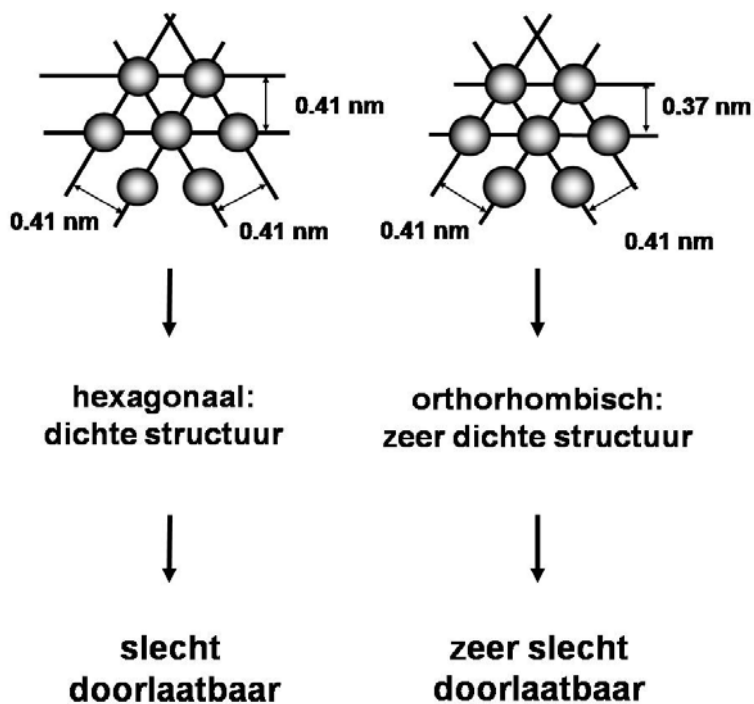
De intercellulaire lipiden zijn om twee redenen bijzonder. Ten eerste bestaan zij uit een mengsel van vrije vetzuren, cholesterol en ceramides. Deze samenstelling is uniek voor de hoornlaag. Ten tweede zijn de lipiden op een bijzonder manier ten opzichte van elkaar gerangschikt. Ze zijn geordend in zogenaamde bi- of trilagen die parallel aan het oppervlak van de huid opeen zijn gestapeld (figuur 3). Van deze lagen, die we de lamellaire structuur noemen, zijn er twee soorten: de SPP, die ongeveer 6 nm (6 miljoenste mm) dik is en de LPP, die ongeveer 12 nm dik is (figuur 4). Binnenin de bilagen zijn de koolstofstaarten van de lipiden op twee manieren ten opzichte van elkaar gerangschikt, namelijk in een hexagonaal en een orthorhombisch rooster. Deze twee vormen de zogenaamde laterale organisatie (figuur 5). Op deze manier geordende lipiden laten slechts zeer weinig water door. Omdat de lipiden in het orthorhombische rooster dichter gerangschikt zijn dan in het hexagonale, laten lipiden in een orthorhombisch rooster nog minder water door dan in het hexagonale rooster.



FIGUUR 3. De lamellaire organisatie van de extracelulaire lipiden in de hoornlaag. Tussen de corneocyten in zijn de lipiden in bi- of trilagen gerangschikt. Deze kunnen zich tot 12 keer bovenelkaar gestapeld zijn. De dikte van één laag wordt met *repeat distance* of *d* aangeduid.



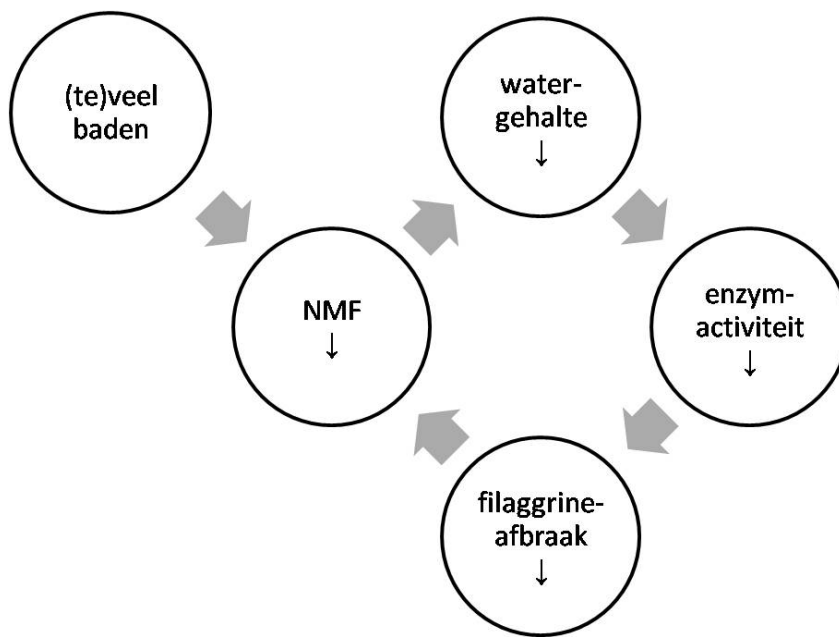
FIGUUR 4. In de hoornlaag zijn twee periodiciteiten gevonden: de korte periodiciteit (short periodicity phase of SPP met een repeat distance van 6 nm en de lange periodiciteit (long periodicity phase of LPP) met een repeat distance van 13 nm. Van deze twee lijkt de tweede essentieel voor de barrier functie van de hoornlaag.



FIGUUR 5. De laterale organisatie van de extracelulaire lipiden in de hoornlaag. De laterale organisatie wordt gevormd door de koolstofketens van de lipiden. Die zijn in deze figuur als stippen aangegeven. Hoe kleiner de afstand tussen de koolstofketens, hoe dichter de structuur is en hoe minder doorlaatbaar voor water. In de hoornlaag van gezonde huid is voornamelijk de zeer dichte orthorhombische organisatie aanwezig.

DROGE HUID

Als men van droge huid spreekt, bedoelt men in feite een droge hoornlaag. In droge huid bevatten de leder- en opperhuid namelijk evenveel water als in normale huid. Alleen de hoornlaag is droger. Droge huid wordt veroorzaakt door een tekort aan een groep stoffen die we de *natural moisturizing factor* (NMF, natuurlijke bevochtigingsfactor) noemen. NMF bestaat uit kleine moleculen zoals aminozuren, die allen water aantrekken, zoals bijvoorbeeld keukenzout dat ook doet. NMF wordt in de corneocyten gemaakt door enzymen die het eiwit *filaggrine* in stukjes knippen. Deze enzymen hebben water nodig om goed te werken. Als de hoornlaag te droog is, werken de enzymen niet. Dat betekent ook dat droge huid niet makkelijk uit zichzelf kan herstellen en er een droge huid cyclus ontstaat (figuur 5).



FIGUUR 6. De droge huid cyclus. NMF uit de hoornlaag kan verloren gaan, bijvoorbeeld door veelvuldig baden of douchen. Hierdoor kan het watergehalte van de hoornlaag zo laag worden dat allerlei enzyme niet langer werken. Eén van die enzyme is het eiwit dat filaggrine omzet in NMF. Dat betekent dus dat het verlies van NMF resulteert in een verlaagde NMF productie.

Droge huid wordt over het algemeen behandeld met moisturizers. Moisturizers zijn stoffen die de hoeveelheid water in de hoornlaag verhogen. Er zijn twee soorten moisturizers, wateroplosbare en vetoplosbare, ook wel hydrofiele en lipofiele moisturizers genoemd. Hydrofiele moisturizers zijn meest kleine stoffen die water aantrekken. Men gaat ervan uit dat deze stoffen werken door de hoornlaag binnen te dringen en daar water vast te houden, zoals ook NMF dat doet. Lipofiele stoffen zijn meestal molekulen met lange koolstofketens. De meeste lipofiele moisturizers vormen een laag op de huid, waardoor er minder water uit de hoornlaag kan ontsnappen. Er zijn echter ook lipofiele moisturizers die op een andere, nog onbekende wijze werken. Mogelijk gaan zij een interactie met de intercellulaire lipiden in de hoornlaag aan, waardoor die (nog!) minder water doorlaten.

Hoewel er al duizenden jaren stoffen op de huid worden gebracht om droge huid te behandelen is de precieze werking van moisturizers niet bekend. In de studies beschreven in dit proefschrift wordt de werking van moisturizers onderzocht. Hiertoe wordt eerst het effect van de moisturizer op de waterverdeling in de hoornlaag zichtbaar gemaakt en onderzocht. Vervolgens wordt bepaald waar de moisturizer zich in de hoornlaag bevindt. Tenslotte wordt het effect van de moisturizer op de rangschikking van de lipiden in de hoornlaag onderzocht.

2. IN DIT PROEFSCHRIFT

In *hoofdstuk 4* van dit proefschrift werden vier lipofiele (Vaseline, ISIS, IPIS en GMIS) en vier hydrofiele (glycerol, glucose, saccharose en HEU) moisturizers op huid *in vitro* (d.w.z. buiten het lichaam) 24 uur lang opgebracht. Daarna werd de huid door een electronenmicroscop bekeken. Hierbij was te zien dat de waterverdeling in de hoornlaag uit drie gedeelten bestaat: een middengedeelte waarin de corneocyten gezwollen zijn doordat ze water op hebben genomen met daarboven en daaronder een droge laag, waarin de corneocyten plat zijn en nagenoeg geen water bevatten. Na opbrengen van lipofiele moisturizers bleek de hoeveelheid water in de hoornlaag te zijn toegenomen. Dit was het best zichtbaar wanneer er Vaseline werd gebruikt. Bij hydrofiele moisturizers bleek het, afhankelijk van de concentratie waarin de moisturizer was opgelost, echter ook mogelijk om de hoornlaag droger dan vóór de behandeling te maken. De middelste laag, waarin de cellen gezwollen zijn, bleek het meest gevoelig voor het gebruik van de moisturizers: hier zwollen de cellen nóg meer. Dit wordt waarschijnlijk veroorzaakt doordat het midden van de hoornlaag ook de plaats is waar zich het meeste NMF bevindt.

De studies in *hoofdstuk 4* zijn bedoeld om de corneocyten in de hoornlaag ná gebruik van moisturizers zichtbaar te maken. Met de gebruikte microscoop kunnen de lipiden in de hoornlaag echter niet zichtbaar gemaakt worden en dus ook niet het effect van de moisturizers op de lipiden. Dit effect kan echter wel met mengsels bestaande uit hoornlaag lipiden bestudeerd worden. Cholesterol en vrije vetzuren zijn te koop. Dat is echter niet zo voor ceramides. Daarom maken we gebruik van ceramides geïsoleerd uit de hoornlaag. Hievoor is veel materiaal nodig. Omdat de hoornlaag van humane huid niet in grote hoeveelheden beschikbaar is, proberen we in *hoofdstuk 5* om ceramides geïsoleerd uit humane huid te vervangen door varkensceramides. Dit omdat hoornlaag van varkenshuid veel makkelijker te verkrijgen is.

Eerste werd met Fourier transform infrarood spectrometrie (FTIR) de hoornlaag van varkens met die van mensen vergeleken. Met FTIR wordt de laterale organisatie (orthorhombisch of hexagonaal) van de lipiden in de hoornlaag onderzocht. Hieruit bleek dat deze lipidenorganisatie erg verschillend is. De lipiden in de humane hoornlaag zijn namelijk zeer dicht, orthorhombisch georganiseerd, terwijl de lipiden in varkenshoornlaag hexagonaal zijn georganiseerd. Vervolgens werden de ceramiden uit beide soorten hoornlaag geïsoleerd, gemengd met cholesterol en vrije vetzuren. Deze mengsels werden ook met FTIR onderzocht.

Deze studies laten zien dat de structuur van de lipiden in humane hoornlaag met beide soorten ceramides nagebootst kan worden. Ook werden er kleine-hoek Röntgendiffractie (SAXD) experimenten uitgevoerd. Met SAXD wordt de lamellaire organisatie (LPP of SPP) van de lipiden bepaald. Ook uit deze studies bleek dat de structuur van de lipiden in de menselijke hoornlaag met varkensceramides nagebootst kan worden.

In hetzelfde hoofdstuk zijn ook studies met glycerol beschreven. Glycerol is één van de meest gebruikte moisturizers. Er wordt echter beweerd dat glycerol de orthorhombische organisatie in de hexagonale omzet. Dit zou de hoornlaag beter doorlaatbaar voor water maken, wat de huid juist droger zou kunnen maken. In onze studies hebben we geïsoleerde stukjes hoornlaag en lipidenmengsels met glycerol behandeld. Hieruit bleek dat glycerol onder normale omstandigheden géén negatief effect op de lamellaire of laterale organisatie heeft. Er zijn dus geen aanwijzingen dat glycerol de lipidenorganisatie doorlaatbaarder maakt.

In *hoofdstuk 5* is dus aangetoond dat varkensceramiden gebruikt kunnen worden om de lipiden in de menselijke hoornlaag na te bootsen. In *hoofdstuk 6* wordt bepaald wat de invloed van de lipofiele moisturizers ISIS, IPIS en GMIS op de lamellaire organisatie van de lipiden in de hoornlaag is. Hiervoor worden wederom SAXD metingen uitgevoerd. Deze keer op zowel geïsoleerde stukjes menselijke hoornlaag enals op lipidenmengsels gemaakt met varkensceramiden.

Voor de SAXD metingen werden stukjes hoornlaag met de lipofiele moisturizers behandeld. Deze behandeling bleek geen effect op de lamellaire structuur van de lipiden in de hoornlaag te hebben. Ook werd 20% moisturizer aan lipidenmengsels van varkensceramiden, vrije vetzuren en cholesterol toegevoegd. Hieruit bleek dat de LPP, die zo belangrijk voor de barrièrefunctie van de hoornlaag is, sterker was in aanwezigheid van de moisturizers. IPIS en GMIS lijken ook de samenstelling van de LPP te veranderen.

Daarnaast wordt in *hoofdstuk 6* gebruik gemaakt van in vivo studies (d.w.z. studies op vrijwilligers). Na behandeling met moisturizers wordt het lipid in de hoornlaag zichtbaar gemaakt. Hiervoor wordt Freeze Fracture elektronenmicroscopie (FFEM) gebruikt. Met deze techniek wordt de hoornlaag in de lengte doormidden gebroken. Op het breukvlak zijn dan de lipidenlagen zichtbaar te maken. De huid van vier vrijwilligers werd drie uur lang met de moisturizers behandeld. Daarna werd een gedeelte van de hoornlaag m.b.v. plakband verwijderd. De hoornlaag werd verwijderd met het plakband, in de lengte gebroken en na een behandeling, om het breukvlak zichtbaar te maken, onder de electronenmicroscopie bekeken. Er waren geen verschillen te zien tussen de lipidendomeinen in onbehandelde huid en huid

behandeld met ISIS of IPIS. Na GMIS behandeling waren kleine ronde structuren zichtbaar. Alledrie de stoffen bevonden zich in aparte domeinen tussen de lipiden en leken niet met de intercellulaire lipiden gemengd te zijn.

Uit beide studies in *hoofdstuk 6* kunnen we de conclusie trekken dat de moisturizers geen negatieve effecten op de lipiden in de hoornlaag hebben. Uit de SAXD experimenten met lipidenmengsels bleek echter dat de moisturizers de lamellaire organisatie van de lipiden een beetje kunnen beïnvloeden. In *hoofdstuk 7* wordt bepaald of dezelfde moisturizers ook de laterale organisatie van de lipiden kunnen veranderen. Hiervoor worden wederom mengsels gemaakt van varkensceramiden, vrije vetzuren, cholesterol en 20% ISIS, IPIS of GMIS. De laterale organisatie wordt vervolgens bij verschillende temperaturen met behulp van FTIR (zie *hoofdstuk 5* en hierboven) bepaald.

De orthorhombische structuur van de controlemengsels was tot ongeveer 30°C duidelijk aanwezig. Maar na toevoeging van 20% ISIS of IPIS aan de mengsels was deze nog bij veel hogere temperaturen aanwezig. Als er echter GMIS werd toegevoegd was er geen verschil met de controle zichtbaar. ISIS en IPIS lijken dus de orthorhombische organisatie bij hogere temperaturen te stabiliseren. Alle drie de moisturizers blijken bovendien in kleine hoeveelheden opgenomen te zijn in de bestaande lipidenstructuren, hoewel het overgrote gedeelte zich in aparte domeinen bevond. Dat laatste blijkt ook uit de FFEM studies, beschreven in *hoofdstuk 6*.

De resultaten van de experimenten in de *hoofdstukken 6 en 7* tonen aan dat de moisturizers ISIS, IPIS en GMIS hetzij de lamellaire, hetzij de laterale organisatie (of in het geval van IPIS allebei) van mengsels van hoornlaag lipiden kunnen veranderen. Dit is een zeer interessante uitkomst. Recentelijk hebben De Jager e.a. (de Jager et al., 2006) laten zien dat de lamellaire structuur LPP essentieel is voor de barrièrefunctie van de hoornlaag. De aanwezigheid van lipofiele moisturizers versterkt de LPP. Daarnaast is al bekend dat de orthorhombische structuur minder doorlaatbaar is voor water dan de hexagonale of vloeibare organisatie (Abrahamsson et al., 1978). ISIS en IPIS stabiliseren de orthorhombische pakking. Beide constatering zouden dus kunnen verklaren waarom de drie onderzochte moisturizers de hoornlaag vochtiger maken: namelijk door de hoornlaag minder doorlaatbaar voor water te maken, waardoor het water minder makkelijk kan ontsnappen.

Echter, om een goede interactie met de lipiden aan te gaan, moeten lipofiele moisturizers in de lipiden in de bovenste lagen van de hoornlaag doordringen. Hydrofiele moisturizers

daarentegen moeten juist in de centrale laag terechtkomen, om daar de rol van de NMF over te nemen.

Om te bepalen of beide soorten moisturizers de juiste plaats van werking bereiken, zijn er penetratiestudies uitgevoerd met vrijwilligers. Deze studies staan in *hoofdstuk 8*. Beide soorten moisturizers worden op de armen van vrijwilligers opgebracht. Na drie uur wordt de hoornlaag met behulp van plakband laagje voor laagje verwijderd. Na elke laag plakband wordt de hoeveelheid moisturizer en water in de hoornlaag bepaald. Dit gebeurt met attenuated total reflectance Fourier transform infrared spectroscopie (ATR-FTIR), een vorm van de eerder gebruikte FTIR.

Uit de resultaten blijkt dat niet alleen de kleine, hydrofiele moisturizers diep in de hoornlaag doordringen, maar dat ook de lipofiele moisturizer zich in grote hoeveelheden in de bovenste lagen van de hoornlaag bevinden. Ook werden kleine hoeveelheden lipofiele moisturizer in de diepere lagen gevonden. Een drie uur durende behandeling met lipofiele moisturizers was echter te kort om van invloed te zijn op de hoeveelheid water in de hoornlaag. Hydrofiele moisturizers houden het water echter meteen vast op de plaats waar ze zich bevinden.

Om goed te kunnen werken moeten hydrofiele moisturizers dus in het midden van de hoornlaag zitten, waar in normale huid ook vooral het NMF gevonden worden. De lipofiele moisturizers moeten echter in de bovenste lagen van de hoornlaag terecht komen. Dan kunnen zij hier met de lipiden een interactie aangaan die ervoor zorgt dat de orthorhombische pakking stabiel wordt. De penetratiestudies tonen aan dat de moisturizers de hoornlaag kunnen binnendringen en suggereert dat na langere behandeling de hoeveelheden groot genoeg zijn om dit effect te veroorzaken.

3. CONCLUSIE EN PERSPECTIEVEN VOOR DE TOEKOMST

Om de vicieuze cirkel van droge huid te doorbreken moet er voldoende water in het centrale deel van de hoornlaag aanwezig zijn. Pas dan kan de hoornlaag weer zelf NMF aanmaken, om zichzelf vochtig te houden. Om te bepalen of moisturizers werkzaam zijn moeten we dus bepalen wat het effect van die moisturizers op het centrale gedeelte van de hoornlaag is

Zoals al vermoed werd, werken kleine, hydrofiele moisturizers door de hoornlaag binnen te dringen en daar water vast te houden, mits ze in de juiste concentratie op de huid worden gebracht. Op die manier zouden zij de hoeveelheid water op een niveau kunnen brengen dat hoog genoeg is om weer NMF te produceren.

De juiste hoeveelheid water kan ook met lipofiele moisturizers bereikt worden, maar hier lijkt de werking iets ingewikkelder. Traditionele, occlusieve moisturizers verhogen de hoeveelheid water in de hoornlaag doordat zij het verdampen van water uit de hoornlaag verhinderen. De moisturizers ISIS, IPIS en GMIS lijken echter volgens een ander mechanisme te werken. In dit proefschrift laten we zien dat zij de hoornlaag binnen dringen en interacties met de hoornlaag lipiden kunnen aangaan. De lipofiele moisturizers verhogen de hoeveelheid gevormde LPP en ISIS en IPIS stabiliseren de orthorhombische pakking. Beide interacties zouden de hoornlaaglipiden nóg minder doorlaatbaar voor water kunnen maken. Mogelijk verklaart dit het effect van niet-occlusieve moisturizers.

In de studies in dit proefschrift hebben we drie onderdelen die een rol spelen bij de bevochtiging van de hoornlaag onderzocht:

- de waterverdeling in de hoornlaag,
- de interactie tussen moisturizers en hoornlaaglipiden,
- de penetratie van moisturizers in de hoornlaag.

Bij de productie van NMF spelen echter enzymen een belangrijke rol. Als een moisturizer effectief is, dan zouden deze enzymen activer moeten worden. In de toekomst zou het erg interessant zijn om het effect van (langdurig gebruik van) moisturizers op de activiteit van enzymen te bestuderen.

In de laatste studies beschreven in dit proefschrift werd de penetratie van moisturizers in de hoornlaag van vrijwilligers onderzocht. In de studies werd de huid echter maar zeer kort met de moisturizers behandeld. Het zou zeer interessant zijn om te bepalen hoe de moisturizers zich in de hoornlaag verdelen wanneer zij een maand of langer dagelijks worden opgebracht.

Tenslotte moet worden opgemerkt dat alle studies in dit proefschrift gebaseerd zijn op gezonde huid. De echte uitdaging ligt echter in het behandelen van droge of zieke huid. Het is echter erg moeilijk om studies met droge of zieke huid uit te voeren, omdat er enerzijds maar weinig huidmonsters van patienten beschikbaar zijn voor onderzoek en anderzijds het uitvoeren van onderzoek met vrijwilligers met een zieke huid niet eenvoudig is. Recent onderzoek heeft echter laten zien dat uit celkweek afkomstige huidmonsters sommige karakteristieken met droge huid delen (Bouwstra et al., 2007). Wellicht kunnen deze daarom als tussenstap gebruikt worden. Bij positieve resultaten zou het toepassen van moisturisers op zieke of droge huid zeer interessant zijn.

Concluderend: wanneer een nieuwe moisturizer of een combinatie van moisturizers wordt ontwikkeld, zouden het volgende onderzocht moeten worden:

- De invloed van de moisturizer op de water verdeling in de hoornlaag,
- de interactie tussen moisturizer en hoornlaaglipiden en
- het effect van de moisturizer op de enzymactiviteit in de hoornlaag.

Wanneer dit alles, in combinatie met penetratiestudies onderzocht wordt, is het mogelijk om de werking van een moisturizer volledig te ontrafelen.

4. REFERENTIES

Abrahamsson, S., Dahlen, B., Löfgren, H., and Pascher, I. (1978): Lateral packing of hydrocarbon chains. *Progress in the Chemistry of Fats and other Lipids* 16, 125-143.

Bouwstra, J., Groenink, H., Kempenaar, J., Romeijn, S., and Ponc, M. (2007): Water Distribution and Natural Moisturizer Factor Content in Human Skin Equivalents Are Regulated by Environmental Relative Humidity. *Journal of Investigative Dermatology* 128.

de Jager, M., Groenink, W., Guivernau, R. B. I., Andersson, E., Angelova, N., Ponc, M., and Bouwstra, J. (2006): A novel in vitro percutaneous penetration model: Evaluation of barrier properties with P-aminobenzoic acid and two of its derivatives. *Pharmaceutical Research* 23(5), 951-960.

Schaefer, H., Redelmeier, TE (1996): "Skin Barrier, Principles of Percutaneous Absorption." Karger