

## 5. Zusammenfassung

Ziel der vorliegenden Arbeit war die Untersuchung der Verteilung humaner Bakterien im Stratum corneum der menschlichen Haut, speziell die Untersuchung follikotroper Bakterien und die Erfassung ihres prozentualen Anteils an der Menge aller gefundenen Hautkeime.

Zahlreiche Untersuchungen konnten an Hautschnitten belegen, dass der Großteil der residenten Hautbakterien in den Haarfollikeln und in den assoziierten Talgdrüsen liegt. [3, 4, 5, 32, 38] So wird vermutet, dass die Bakterien der residenten Hautflora ihren Ursprung in Haarfollikeln oder Talgdrüsen haben. [6, 7, 38]

Durch die Kombination verschiedener Methoden ist ein neues nicht invasives Verfahren entwickelt worden, welches die Erfassung follikelbezogener Bakterienkolonien ermöglicht. Somit kann erstmals Auskunft über den prozentualen Anteil der follikotropen Bakterien gegeben werden.

Ein wesentlicher Bestandteil der neu entwickelten Methode stellt das Abrissverfahren dar. Dieses wird seit Jahren erfolgreich angewandt, um Penetrationsprozesse [69, 75, 106, 107] und die Bioverfügbarkeit [108, 109] verschiedener topisch applizierter Substanzen zu untersuchen, daneben können mit der Abrissmethode auch Hautirritationen durch topisch applizierte Substanzen eingeschätzt werden. [110]

Mit der *tesa*®-Film-Abrissmethode ist es möglich, Bakterien aus verschiedenen Hornzellschichten zu isolieren.

Röckl und Müller (1959) [37] befassten sich mit der quantitativen Verteilung und Tiefenreichweite der Hautbakterien in der Hornschicht. Sie kombinierten die *tesa*®-Film-Abrissmethode mit der kulturellen Bestimmung der an den einzelnen Filmabrissen haftenden Hautkeime. In den Versuchen der vorliegenden Arbeit wurde diese Abrissmethode angewandt. Die mit den Hautbakterien beimpften Agarplatten wurden inkubiert und die an der Nähragaroberfläche sichtbaren Bakterienkolonien ausgezählt. Das Innovative an dieser Methode im Gegensatz zu dem von Röckl und Müller entwickelten Verfahren ist, dass nachgewiesen wird, aus welcher Hornzellschicht die einzelnen Hautbakterien stammen. Dazu wurden die am Filmabriss haftenden Corneozyten bei 430 nm spektroskopisch vermessen. Mit den ermittelten Extinktionswerten konnten die Anzahl der Hornzellschichten bestimmt und die Hautbakterien den Schichten zugeordnet werden.

Das Abrissverfahren alleine lässt keine Aussage über follikelbezogene Keime zu. Für die Untersuchung follikotroper Bakterien war es notwendig, die Follikelpositionen am zu untersuchenden

Hautareal eindeutig zu bestimmen. Hierfür stellt die Anwendung und Modifikation des an der Charité entwickelten Prinzips der Follikelkarte einen weiteren wesentlichen Bestandteil des neu entwickelten Verfahrens dar. In der Follikelkarte wird die Position des Haarfollikels im zu untersuchenden Hautareal markiert.

Von den auf dem Nährmedium gewachsenen Bakterienkolonien wurden digitale Fotoaufnahmen gemacht und diese mit den erstellten Follikelkarten kombiniert. Dieses Verfahren ermöglichte solche Bakterienkolonien auszuwählen, die in unmittelbarer Nähe eines Follikels lokalisiert waren. Somit wurden follikotrope Hautbakterien erfassbar. Diese Bakterienkolonien wurden sowohl quantitativ als auch qualitativ näher untersucht.

Für die Gewinnung von Keimen aus tieferen Hautschichten wurde nach Anwendung der *tesa*®-Film-Abrissmethode die Cyanacrylat-Abrisstechnik angewandt. Mit diesem Verfahren konnten Hautbakterien direkt aus den Talgdrüsengängen und Follikeln isoliert werden. Die Abrisstechnik ermöglicht es, alle Bakterienkolonien zu erfassen, die durch die toxische Wirkung des Cyanacrylats nicht beeinträchtigt wurden. Bakterienkolonien, die örtlichen Bezug zum Haarfollikel zeigten, wurden mittels qualitativer Verfahren genauer untersucht.

Aus der Kombination der Verfahren ergaben sich folgende Ergebnisse:

1. Mit der *tesa*®-Film-Abrissmethode wurden quantitativ Verteilung und Tiefenreichweite der Hautbakterien im Stratum corneum untersucht.  
Aus den Ergebnissen wurde deutlich, dass der Keimgehalt von der Hautoberfläche zur Tiefe innerhalb des Stratum corneum deutlich abnimmt. Ca. 85% der erfassten Hautkeime konnten aus den oberen Hornzellschichten (Zelllage 2-6) isoliert werden. In tieferen Schichten konnten nur noch wenige Bakterien nachgewiesen werden.
2. Grundlage für die Untersuchung follikelbezogener Bakterien ist das Erstellen von Follikelkarten. Dabei wurden zwei verschiedene Methoden angewandt. Zum einen wurde die *tesa*®-Film-Abrissmethode mit der Osmiumtetroxid-Färbung kombiniert, wodurch die Follikelpositionen auf den Abrissen sichtbar wurden. Als zweite Methode diente die Cyanacrylat-Abrisstechnik. Nach Anwendung beider Methoden geht aus den gewonnenen Daten hervor, dass das Cyanacrylat-Abrissverfahren zur Follikelerfassung geeigneter ist als die Kombination aus der *tesa*®-Film-Abrissmethode und der Osmiumtetroxid-Färbung.

3. Die Untersuchung follikotroper Bakterienkolonien erfolgte grundsätzlich auf zwei verschiedenen Wegen: Einerseits wurde die *tesa*®-Film-Abrissmethode angewandt. Mit dieser sind die Bakterien aus der entsprechenden Hornzellschicht isoliert worden. In Verbindung mit der erstellten Follikelkarte wurden dann nur die follikelbezogenen Bakterienkolonien ausgewählt.  
Andererseits wurde mit der Cyanacrylat-Abrissmethode nach Durchführung von 15 *tesa*®-Filmabrissen der Inhalt der Haarfollikel direkt mit der vorhandenen Follikelflora herausgelöst und auf ein Nährmedium überführt.  
Im Vergleich der beiden Methoden konnte belegt werden, dass zur Untersuchung der follikelbezogenen Bakterien die *tesa*®-Film-Abrissmethode in Kombination mit der entsprechenden Follikelkarte effektiver ist als die Anwendung der Cyanacrylat-Abrisstechnik.
4. Mit der Erfassung der follikelbezogenen Bakterienkolonien ließ sich der prozentuale Anteil der follikotropen Bakterienkolonien an der Gesamtheit aller gewonnenen Bakterienkolonien ermitteln. Die Ergebnisse zeigten, dass etwa 25% der Bakterienkulturen follikelbezogen sind, während der Anteil der Follikelöffnungen/cm<sup>2</sup> an der Hautoberfläche des Unterarms durchschnittlich 0,09% beträgt.
5. Die quantitative und qualitative Untersuchung der follikelbezogenen Bakterienkolonien pro Proband ergab, dass diese in ihrer Zusammensetzung und in ihrem prozentualen Anteil stark variieren. Des Weiteren sind Schwankungen bezüglich der Menge der zu den verschiedenen Bakteriengruppen gehörenden follikotropen Bakterienkolonien zu verzeichnen.
6. Nach Erhalt der follikotropen Bakterienkolonien wurden diese qualitativ untersucht. Die Differenzierungsvorgänge ergaben, dass es sich bei dem Hauptteil der follikelbezogenen Bakterienkulturen um Gram-positive, Katalase-positive Kokken handelt. Dieses Ergebnis lässt zu, dass diese Bakterienkolonien in die Familie der *Micrococcaceae* einzuordnen sind.
7. Die mittels der Cyanacrylat-Abrissmethode erhaltenen follikelbezogenen Bakterienkolonien wurden ebenso weiteren qualitativen Differenzierungsvorgängen unterzogen. Die biochemischen Differenzierungsmethoden ergaben ein Gram-positives und ein Katalase-

positives Verhalten. Die mikroskopische Untersuchung konnte die follikelbezogenen Bakterienkolonien in die Gruppe der Kokken einordnen. Somit können auch diese Bakterienkolonien der Familie der *Micrococcaceae* zugerechnet werden.

Die Ergebnisse aus der Untersuchung belegen die besondere Funktion des Haarfollikels für die residente Hautflora: Obwohl der Anteil der Follikelöffnungen/cm<sup>2</sup> an der Hautoberfläche der Innenseite des Unterarms lediglich etwa 0,09% beträgt, ist anzunehmen, dass doch ca. 25% der Hautflora in den Haarfollikeln ein geschütztes Reservoir bilden, das der Haut auch nach einer Desinfektion oder Verletzung die Erneuerung ihrer Bakterienflora ermöglicht. Dies wird zudem daraus deutlich, dass mit intensiven mechanischen und chemischen Desinfektionsmaßnahmen nur eine relativ kurz anhaltende Keimfreiheit der Hautoberfläche erzielt werden kann. Es wurde geschätzt, dass Desinfektionsmaßnahmen der Haut ca. 20% der residenten Bakterienflora zurücklassen. [38] Wenn das Reservoir der Hautbakterien Haarfollikel oder Talgdrüsen darstellen, so müssen antiseptische Substanzen erst diese dermalen Strukturen erreichen und sebumhaltige Areale penetrieren, um eine antibakterielle Wirkung zu erzielen. [6, 38] Auch topisch applizierte Antibiotika beeinflussen das wahrscheinlich unterhalb der Hautoberfläche liegende Reservoir der residenten Flora nicht, sie führen nur zu einer vorübergehenden Beseitigung der Bakterien der Hautoberfläche und der Hornschicht. [7, 111] Demnach bieten die Tiefe des Haarfollikels und die Lipide in den Follikelöffnungen Schutz gegen antiseptische Substanzen [38] und gegen weitere äußere Umwelteinflüsse. Diese Tatsachen müssen bei der Entwicklung von Antiseptika berücksichtigt werden.

Mit der vorliegenden Arbeit wurde eine nicht invasive Methode entwickelt, die nahe legt, dass ein relativ hoher Prozentsatz der residenten Bakterienflora aus den Haarfollikeln stammt. Das Verfahren erzielt einen hohen Wirkungsgrad, der jedoch in weiteren Studien an größeren Probandenzahlen zu belegen ist.