

## 2. Material und Methoden

### 2.1. Vorversuche

#### 2.1.1. Hautparameter und deren Auswirkung auf das Wachstum der Bakterienkolonien

Die menschliche Haut ist von einer Bakterienflora besiedelt. Sie wird als Normalflora bezeichnet und setzt sich aus zufällig anwesenden (transiente Flora) und dauerbesiedelnden Keimen (residente Flora) zusammen. Der Mensch bietet den Bakterien besonders konstante Umweltbedingungen, z.B. gleich bleibende Temperatur. Daher ist er für das Bakterienwachstum als geeigneter Organismus anzusehen. [35]

In Abhängigkeit von der Hautregion sind bezüglich der Dichte und Zusammensetzung der Mikroflora erhebliche Unterschiede zu verzeichnen. Auf gesunder Hautoberfläche kommen etwa zwischen  $10^2$  und  $10^6$  Keime/cm<sup>2</sup> vor. [32] Die unterschiedliche Zusammensetzung der Hautflora in verschiedenen Körperregionen beruht hauptsächlich auf dem unterschiedlichen Angebot an Nährstoffen, weiterhin spielen eine unterschiedlich starke Talgproduktion und der unterschiedlichem Feuchtigkeitsgehalt eine Rolle. [40, 52]

Das Gelingen der Hauptuntersuchung wurde durch Vorversuche sichergestellt. Dabei wurden physiologische Hautparameter bestimmt, um deren Einfluss auf das Bakterienwachstum zu überprüfen. Folgende Parameter wurden an der Haut des rechten Unterarms der Probanden nicht-invasiv gemessen:

1. transepidermaler Wasserverlust
2. pH-Wert der Haut
3. Sebumgehalt der Haut
4. Feuchtigkeit der Corneozyten

Für die Messung der physiologischen Hautparameter wurden sieben männliche Probanden im Alter zwischen 25 und 30 Jahren ausgewählt. Alle Probanden waren kaukasischer Abstammung und befanden sich im guten Gesundheitszustand. Es konnten keine bekannten Krankheiten, weder Hautkrankheiten noch hormonelle Dysregulationen oder Adipositas eruiert werden. Der Bodymassindex (BMI) lag zwischen 19 und 24. Der rechte Arm der Probanden wurde vor Versuchsbeginn 24 Stunden lang mit keiner Seifenlösung oder anderen kosmetischen Produkten behandelt. Die Vorgehensweise soll einer möglichen Einflussnahme dieser Substanzen auf das Stratum corneum vorbeugen. Nach Ankunft des Probanden folgte ein Akklimatisierungszeitraum

von ca. 15 Minuten, in dem er sich an die Raumbedingungen des Untersuchungsortes anpassen konnte. Anschließend wurden die Messungen unter standardisierten Bedingungen durchgeführt.

### 2.1.1.1. Der transepidermale Wasserverlust (TEWL)

Das bakterielle Wachstum ist an ein gewisses Maß an Feuchtigkeit gebunden. Die menschliche Haut mit ihrem geringen Feuchtigkeitsgehalt stellt einen eher limitierenden Faktor für das Bakterienwachstum dar. Eine relativ gute Vermehrung der Bakterien zeigt sich auf den bedeckten Oberflächen der Haut, z.B. intertriginöse Bereiche: Perinealregion, Zehenzwischenraum. Des Weiteren ist die Achsel- und Nasenhöhle als geeigneter, feuchtwarmer Ort für das Bakterienwachstum anzusehen. [32, 35] Das Keimgleichgewicht der residenten Flora kann leicht gestört werden, indem die Lebensbedingungen der Keime verändert werden. So kann erhöhte Feuchtigkeit in Form von verstärktem Schwitzen das Wachstum der Bakterienkolonien fördern. [32] Untersuchungen, bei denen die Haut partiell mit Kunststoff-Folie abgedeckt wurde, zeigten, dass sich unter dem geschaffenen feuchtwarmen Klima die Bakteriendichte stark veränderte. Bei der Bestimmung dieser vor dem Versuch und nach drei Tagen war eine Zunahme der Keimzahlen von Staphylokokken und Korynebakterien um bis zu fünf Zehnerpotenzen zu verzeichnen. [40, 53]

An der Hautoberfläche und in den Atemwegen werden dem menschlichen Organismus durch Wasserverdunstung große Wärmemengen entzogen. Das Wasser gelangt dabei an die Oberfläche der Haut- bzw. Schleimhaut und wird dort durch Verdunstung an die Umgebung abgegeben (Perspiratio insensibilis). Somit verliert der Körper täglich ca. 1 Liter Wasser ohne Schweißsekretion. Dies entspricht einer Wärmeabgabe von 580 kcal. [54] Beim Erwachsenen werden maximal  $6 \text{ mg/cm}^2/\text{h}$  bei  $33^\circ\text{C}$  Wasserdampf durch Diffusion durch die Haut abgegeben. [27] Die Wärmeabgabe durch Verdunstung je Flächeneinheit  $\dot{q}_v$  ist abhängig vom jeweiligen Wasserdampfdruck der Haut ( $P_H$ ) und der Luft ( $P_L$ ). Als Verdunstungszahl wird der Proportionalitätsfaktor  $\alpha_v$  angegeben.

Es gilt :

$$\dot{q}_v = \alpha_v (P_H - P_L)$$

Der Wassergehalt und die Temperatur der Luft bzw. der Haut bestimmen den Wasserdampfdruck. [54]

Steigt die Außentemperatur an, so kommt die Schweißsekretion als zweiter Faktor der Wärmeabgabe hinzu (Perspiratio sensibilis). Sie dient der Regulation der Körpertemperatur. Liegt die Umgebungstemperatur bei über 30°C, setzt die aktive Schweißsekretion aus ekkrinen Schweißdrüsen bei ruhenden, unbedeckten Menschen ein. Sie wird vegetativ vom Sympathikus gesteuert, als verantwortlicher Transmitter gilt hauptsächlich Acetylcholin. [54] Bei Erhöhung der Kerntemperatur oder durch Übertragung von afferenten Signalen aus überwärmter Haut werden diese einlaufenden Impulse im hinteren Hypothalamus als Struktur der thermischen Informationsverarbeitung verarbeitet, integriert und in verschiedene Steuersignale umgesetzt, z.B. in Form von Acetylcholinfreisetzung für die Schweißdrüsensekretion als vegetative Steuerung. [32, 54] Folglich setzt sich der transepidermale Wasserverlust (TEWL) aus verdunstetem Wasserdampf zusammen, der durch das Stratum corneum diffundiert, und Wasserdampf, der infolge von Schweißsekretion über die Haut verloren geht.

Das Stratum corneum der Epidermis schützt den Organismus vor unkontrolliertem Wasserverlust. Es stellt eine Barriere gegen die epidermale Permeation von Wassermolekülen dar. Die Corneozyten sind in multilamellare Lipidschichten eingebettet. Diese Lipidschichten bestehen aus Ceramiden, Cholesterol und freien Fettsäuren, ferner aus Cholesterolestern, Triglyceriden, Glycosphingolipiden und Cholesterolsulfat. [13, 55, 56, 57] Die Zusammensetzung der Lipide und ihre spezifische strukturelle Organisation haben großen Einfluss auf die Wirksamkeit des Stratum corneum als epidermale Barriere. [13, 16, 58, 59] Werden Veränderungen des TEWL festgestellt, so können diese als Hinweis auf eine Ineffektivität der epidermalen Barriere gewertet werden. [60]

Für die Durchführung der TEWL-Messungen müssen standardisierte Messbedingungen eingehalten werden, da viele Faktoren seitens des Probanden, der Umgebung und des Geräts die Messung beeinflussen. [61, 62] Ziel der Bestimmung des transepidermalen Wasserverlustes ist es, nur den durch das Stratum corneum diffundierenden Wasserdampf zu erfassen, um so Aussagen über die Funktionalität der Hornschicht als Barriere treffen zu können. Die aktive Schweißsekretion soll weitgehend ausgeschaltet sein. Zu diesem Zweck soll der Proband vor Messbeginn 15-30 Minuten ausruhen und sich emotional nicht erregen. Ferner wird im Untersuchungsraum eine Temperatur von 20-22°C und eine relative Luftfeuchte von 40-60% als Anwendungsrichtlinie empfohlen. [60]

Für die Messung wurde das TEWAMETER TM 210® (COURAGE + KHAZAKA electronic GmbH, Köln/D) genutzt. Bevor mit der Messung begonnen werden kann, muss das TEWAMETER 15 Minuten angeschaltet sein, erst dann ist das Gerät betriebsbereit. Zu Beginn wird die Messbereitschaft mittels einer Leerlaufmessung überprüft. TEWL-Werte von  $0 \pm 0,5$  g/hm<sup>2</sup> erfordern keinen Nullabgleich, mit der Messung kann begonnen werden. Die Sonde wird auf das zu untersuchende Hautareal ohne zusätzlichen Druck aufgesetzt, wichtig ist dabei das Halten der Sonde parallel zur horizontalen Messfläche unter konstant geringem Auflagedruck. [60] Ein stabiler Messwert mit einer Standardabweichung von maximal  $\pm 0,5$  g/hm<sup>2</sup> ist nach ca. 30-45 Sekunden erreicht. Das Gerät reagiert dann mit einem Tonsignal und die Messung wird abgebrochen. Zu jedem gemessenen TEWL-Wert und seiner Standardabweichung kann gleichzeitig die Hautfeuchtigkeit und Hauttemperatur abgelesen werden.

Die physikalische Grundlage der TEWL-Messung beruht auf dem von Adolf Fick 1885 beschriebenen Diffusionsgesetz [54]:

$$\dot{m} = -D \cdot A \cdot \frac{\Delta C}{\Delta x}$$

- $\dot{m}$  = Diffusionsstrom
- D = Diffusionskoeffizient
- A = Austauschfläche
- $\Delta C$  = Konzentrationsdifferenz
- $\Delta x$  = Diffusionsweg

Dieses Gesetz hat nur Gültigkeit in einer homogenen Diffusionszone. Trotz der heterogenen Struktur kann das Stratum corneum in Hinblick auf den TEWL als homogene Membran angesehen werden. [19] Der Wasserverlust über das Stratum corneum verhält sich umgekehrt proportional zur Schichtdicke.

Das durch das Stratum corneum diffundierte Wasser tritt durch einen Sondenkopf aus. In diesem befinden sich 2 Sensoren. Der entstandene Dichtegradient wird über diese Sensoren indirekt gemessen und mittels eines Mikroprozessors ausgewertet. [62] Gleichzeitig wird über Hygro- und Thermosensoren die Hautfeuchtigkeit und -temperatur bestimmt.

### 2.1.1.2. pH-Wert der Haut

Der pH-Wert beträgt auf der Haut je nach Alter und Lokalisation 5,4-5,9. Aufgrund dieser schwach sauren Reaktion der Hautoberfläche wird die Haut auch als Säureschutzmantel bezeichnet. Hier gedeihen nur relativ säureresistente Keime. Eine Alkalisierung des pH-Wertes der Haut

würde zu Entzündungen durch andere Bakterien oder Hefen führen. [35] Viele Untersuchungen an der Haut konnten nachweisen, dass ein ausgeprägter pH-Gradient über dem Stratum corneum besteht. In der Umgebung der lebenden Epidermis beträgt der pH-Wert 7,4 und nimmt 2-3 pH-Einheiten bis zur Hautoberfläche ab. [63] Viele Studien zur pH-Messung der Haut beruhen auf der Abrissmethode mittels eines adhäsiven Films. Locher (1961) [64] beschrieb eine Methode, bei der mittels durchschnittlich 14,5 *tesa*®-Filmabrissen die Hornschicht bei gesunden Probanden bis zum Stratum lucidum entfernt wurde. Nach jedem zweiten Filmabriss wurde der pH-Wert gemessen. Der mittlere pH-Wert auf der Hautoberfläche betrug 5,8. Am Stratum lucidum wurde ein mittlerer pH-Höchstwert von 6,4 gemessen. In einer anderen Untersuchung konnten Öhman und Vahlquist (1994) [65] zeigen, dass unter Verwendung der Filmabrissmethode am Unterarm mittels 100 bis 120 Filmabrissen der pH-Wert bei Frauen von  $5,3 \pm 0,5$  auf  $6,8 \pm 0,5$  und bei Männern von  $4,5 \pm 0,2$  auf  $6,9 \pm 0,4$  anstieg. In vitro Untersuchungen zeigten, dass die Anordnung der lamellenartigen Strukturen in der Lipidmischung des Stratum corneum an einen sauren pH-Wert gebunden ist. Des Weiteren spielt die partielle Ladung von freien Fettsäuren bei einem pH-Wert von 4,5-6 eine große Rolle. In diesem Zustand ist es ihnen möglich, die Form von lamellenartigen flüssigen Kristallen einzunehmen. [63] Die strukturelle, spezifische Organisation der Lipide der Hornschicht und ihre Zusammensetzung sind notwendig, um eine intakte Barrierefunktion aufzubauen. [58, 59] Steigt der pH-Wert der Haut, so ist der Zusammenhalt der Strukturen des Stratum corneum nicht mehr gewährleistet und die Integrität geht verloren. Folglich kann die Barrierefunktion der Haut nicht im gleichen Maß aufrechterhalten werden, die Haut ist empfänglicher für das Eindringen von Keimen. [20, 21, 22] Frühere Untersuchungen stellten einen Zusammenhang zwischen veränderten pH-Werten und bestimmten Hauterkrankungen fest. So zeigte Locher (1961) [64], dass der pH-Wert von Patienten mit atopischer Dermatitis um annähernd 0,5 Einheiten höher lag als bei gesunden Menschen. Auch bei anderen Erkrankungen der Haut wie Ichthyosis oder Kontaktdermatitis konnte durch Studien gezeigt werden, dass der pH-Wert einen großen Stellenwert hinsichtlich der Pathogenese, Prävention und Therapie einnimmt. [63]

Wasserlösliche Substanzen aus dem Stratum corneum sowie Zerfallsprodukte aus der Schweißsekretion, Talgproduktion und Bakterienflora bestimmen den pH-Wert auf der Haut.

Die pH-Wertmessung auf der Hautoberfläche erfolgt potentiometrisch. Es wird eine Flachelektrode in Form einer Einstabmesskette verwendet, die sowohl die aktive als auch die Referenzelektrode in einer Einheit enthält (siehe Abb. 2.1). Eine durch Berührung mit Wasser an der Glasmembran entstandene Gelschicht der aktiven Elektrode kann je nach pH-Wert der außen

befindlichen Lösung Wasserstoffionen abgeben oder aufnehmen. Zwischen der inneren Schicht, die Kontakt zu einer definierten Pufferlösung hat, und der äußeren Schicht der Glasmembran baut sich eine Potentialdifferenz auf. Diese kann im Vergleich zum konstanten Potential der Referenzelektrode über ein angeschlossenes pH-Meter in pH-Werte umgerechnet werden. [60]

Für die Messung wurde das SKIN-PH-METER PH 900 PC® (COURAGE + KHAZAKA, electronic GmbH, Köln/D) verwendet. Vor Beginn der pH-Messung muss das pH-Meter unter Nutzung eine Standardpufferlösung kalibriert werden. Anschließend wird der Elektrodenkopf mit destilliertem Wasser gespült. Dies dient der Benetzung der Elektrodenoberfläche mit Wasser, um eine Gelschicht an der Glasmembran zu erzeugen. Erst dann kann der Elektrodenkopf auf die zu messende Hautstelle aufgesetzt werden. Die Temperatur wird gleichzeitig festgehalten, denn die gemessenen pH-Werte sind von ihr abhängig [60].

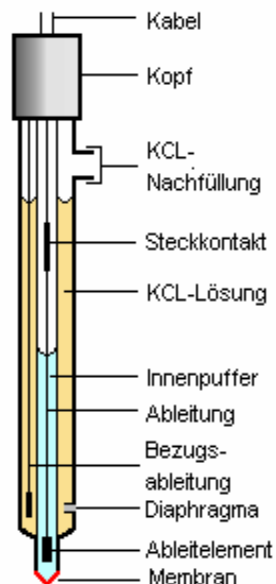


Abb. 2.1: Einstabmesskette [70]

### 2.1.1.3. Sebumgehalt der Haut

Eine Erhöhung des Lipidangebotes führt zu einer gesteigerten Keimproliferation, z.B. bei der im Rahmen der Pubertät angekurbelten Talgproduktion oder bei allgemein vermehrter Talgproduktion (Seborrhoe).

Die Messung des Fettgehalts der Haut erlaubt eine einfache Einteilung in trockene, fettige, normale und Mischhaut. Dieser Einteilung wird große Bedeutung bei der Anwendung von Haut-

pflegemitteln beigemessen. Zusätzlich können über die Messung des Hautfettgehalts Aussagen bezüglich der Effektivität von Therapien mit speziellen Präparaten gegen Acne vulgaris getroffen werden. [60]

Der Fettgehalt der Hautoberfläche setzt sich größtenteils aus dem Talgdrüsensekret zusammen, ferner tragen Lipide des Stratum corneum und dissoziative Produkte der Schweißdrüsensekretion, z.B. flüchtige Fettsäuren und Cholesterin, zum Oberflächenfettfilm der Haut bei. Die Talgdrüsensekretion aus apokrinen Drüsen wird endokrinologisch gesteuert und ist abhängig von Sexualhormonen. Sie kommt erst in der Pubertät zum Tragen und geht mit zunehmendem Alter zurück. [11]

Eine Möglichkeit zur Messung des Hautfettgehalts besteht darin einen adhäsiven Film auf die Haut aufzutragen. Dieser wird dann an den Stellen transparent, wo ein Kontakt zwischen Fettpartikeln und Film stattfindet.

Zur Messung des Hautfettgehalts wurde das SEBUMETER SM 810 PC® (COURAGE + KHAZAKA, electronic GmbH, Köln/D) verwendet. Dieses verfährt zur Messung des Hautfettgehalts nach oben genanntem Prinzip. Das Sebumeter weist einen mattierten Kunststofffilm auf, dieser wird für 30 Sekunden auf das zu messende Hautareal aufgebracht. Nach Fettpartikelkontakt wird dieser Film transparent. Die Transparenz kann mittels einer Messzelle gemessen werden. Die erfassten Werte verhalten sich innerhalb eines Messbereichs von 50-300  $\mu\text{m}/\text{cm}^2$  proportional zur Fettmenge.

Bevor mit der Messung begonnen werden kann, muss die Transparenz des Films auf den Wert 0 kalibriert werden. [60]

### **2.1.1.4. Feuchtigkeit der Corneozyten**

Die Messung der Feuchtigkeit der Hornschicht kann zur Beschreibung des Zustandes trockener Haut eingesetzt werden. Des Weiteren können Auswirkungen von bestimmten Feuchtigkeitsprodukten oder austrocknenden Substanzen auf der Haut beurteilt werden. Die Bakterienkolonien der residenten Hautflora sind auf der Hautoberfläche und zwischen den Schichten des Stratum corneum lokalisiert [4, 37]. Da die Hornschicht als heterogene lipophile Schicht angesehen wird, ist das Wachstum der Bakterienkolonien innerhalb des Stratum corneum eher auf lipophile Bakterienarten beschränkt. Der Hydratisierungszustand der Hornschicht beeinflusst die Lebensbedingungen und damit das Wachstum der lipophilen Bakterienkolonien.

Die Permeabilität der Haut, die Hautspannung sowie die Barrierefunktion der Haut (vgl. 2.1.1.1) werden durch den Wassergehalt des Stratum corneum bestimmt.

Die Wasserbindungskapazität des Stratum corneum sowie der transepidermale Wasserverlust sind wesentliche Faktoren, die den Wassergehalt der Hornschicht beeinflussen und ihn im Gleichgewicht halten. Hinzu kommen noch äußere Faktoren, die am Gleichgewicht des Wassergehalts der Hornschicht beteiligt sind, z.B. Temperatur und Luftfeuchte. Der Wassergehalt des Stratum corneum kann Werte zwischen 10-60% aufweisen. Die große Schwankungsbreite kommt weiterhin durch zusätzliche Einflussfaktoren wie Alter, Geschlecht und Lokalisation zustande.

Das Prinzip der Messung beruht darauf, dass das Stratum corneum in Verbindung mit Wasser eine Erhöhung in der elektrischen Leitfähigkeit und der Dielektrizitätskonstante erfährt. Bei Erhöhung der Dielektrizitätskonstante steigen die Leitfähigkeit und die Kapazität an. Die Impedanz verhält sich dabei umgekehrt proportional zu beiden. Wasser zeigt eine hohe Dielektrizitätskonstante. Je nach Hydratisierungszustand des Stratum corneum steigt die Dielektrizitätskonstante, in Abhängigkeit von ihr steigt die Kapazität und Leitfähigkeit, diese Steigung bzw. Änderung ist annähernd proportional zum Wassergehalt der Hornschicht. [60]

Zur Messung der Hydratisierung des Stratum corneum wurde das CORNEOMETER CM 820® (COURAGE + KHAZAKA, electronic GmbH, Köln/D) verwendet. Dieses Gerät bestimmt den Wassergehalt der Hornschicht über die Kapazitätsmessung. Im Messkopf befinden sich als Kondensator wirkende Metallplatten. Bei Verbindung zur Hautoberfläche reagiert der Kondensator mit unterschiedlicher Änderung der Kapazität in Abhängigkeit vom Wassergehalt. Diese Kapazitätsänderung kann in dimensionslosen Werten angegeben werden. Da diese Messmethode sehr anfällig ist und oftmals Schwankungen bei den Messwerten zu verzeichnen sind, müssen die Messungen unter standardisierten Bedingungen durchgeführt werden. [60]

### **2.1.1.5. Bakterienwachstum in Abhängigkeit der ermittelten Hautparameter**

Nach Bestimmung der physiologischen Hautparameter soll das Bakterienwachstum in Abhängigkeit der ermittelten Werte überprüft werden. Dazu werden die Hautbakterien von der Hautoberfläche auf einen adhäsiven Film mittels der *tesa*®-Film-Abrissmethode (vgl. 2.2.) übertragen. Der Ort der Filmstreifenplatzierung wird so gewählt, dass die Haut in diesem Bereich nicht durch die Gerätschaften der Hautparameterbestimmung kontaminiert wurde. Vor dem Auftragen des Filmstreifens auf die Hautoberfläche wird dieser auf eine definierte Länge von 3 cm zuge-



schnitten, um die Ergebnisse des Bakterienwachstums der sieben verschiedenen Probanden im Anschluss vergleichen zu können. Der erhaltene *tesa*®-Filmabriss wird auf eine Standard X Agarplatte für die Anzucht der Bakterien übertragen (vgl. 2.3.). Die Position des Streifens auf dem Nährmedium wird in ganzer Länge auf der Unterseite der Platte farblich markiert. Dieses Vorgehen stellt sicher, dass nur die Bakterienkolonien untersucht werden, die vom Filmabriss auf das Kulturmedium übertragen wurden. Nach Inkubation der Agarplatten unter aeroben Bedingungen werden diese auf ihr Bakterienwachstum überprüft. Die Bakterienkolonien werden im markierten Areal ausgezählt, nach Farbe, Aussehen und Oberflächenbeschaffenheit charakterisiert und anhand dieser morphologischen Kriterien und der Farbe in Gruppen eingeteilt.

### 2.1.2. Einfluss der Temperatur auf das Wachstum der Bakterienkolonien

Die Temperatur des Menschen liegt zwischen 32°C, auf der Hautoberfläche, und 37°C als Körperkerntemperatur. Auf der Haut gedeihen demzufolge eher Bakterien, deren Temperaturoptimum unter 37°C liegt. [35] Steigende Temperatur und vermehrte Feuchtigkeit bewirken zum einen eine Zunahme der Dichte der Bakterienkolonien und zum anderen eine Änderung des relativen Verhältnisses der Mikroorganismen. Beide sich verändernde Parameter sind erforderlich, um eine signifikante Veränderung der normalen Mikroflora zu bewirken. [33]

In einem weiteren Vorversuch sollte gezeigt werden, wie sich die Temperatur auf das Wachstum der Bakterien auswirkt. Für diese Untersuchung stellten sich sechs Probanden zur Verfügung, die nach oben genannten Kriterien ausgewählt wurden (vgl. 2.1.1.). Vor Untersuchungsbeginn wurde die Hauttemperatur an der Innenseite des rechten Unterarms mittels des TEWAMETER TM 210® (COURAGE + KHAZAKA electronic GmbH, Köln) gemessen. Untersuchungsgrundlage stellt ein *tesa*®-Filmabriss mit einer Länge von 3 cm dar, der mittels der Abrissmethode (vgl. 2.2) von dem zuvor markiertem Untersuchungsareal des rechten Unterarms entnommen wird. Dieser wird anschließend auf eine Standard X Agarplatte zur Übertragung der Bakterien vom Filmabriss auf das Kulturmedium aufgebracht. Nun wird die Lage des Filmstreifens auf dem Nähragar an der Unterseite der Agarplatte markiert. Nach einer Minute wird der Filmabriss vom Kulturmedium entfernt und dann entsorgt. Die beimpfte Agarplatte wird für die Anzucht der Bakterienkolonien für 48 h bei 30°C unter aeroben Bedingungen inkubiert (vgl. 2.3). Nach Durchführung des ersten Filmabrisses wurde der mit dem *tesa*®-Film behandelte Hautbereich der Innenseite des rechten Unterarms für 30 Minuten mit Infrarotlicht bestrahlt. Der Hautabstand zur Infrarotlampe (Infrared RI 1521, 150W, PHILIPS, Germany) betrug dabei einen Meter. Nach

dieser Zeit wurde die Hauttemperatur des bestrahlten Hautbereichs mittels des TEWAMETER TM 210® gemessen. Die Durchführung der Messung dauerte 120 Sekunden. Anschließend wurde wiederholt die Abrissmethode für einen erneuten *tesa*®-Filmabriss an einer mit Infrarotlicht bestrahlten, jedoch unberührten Stelle des Unterarms angewandt. Dabei betrug die Zeit zwischen dem Abbruch der Infrarotbestrahlung und der Anwendung der Abrissmethode drei Minuten. Im Anschluss wurden die Bakterien vom adhäsiven Filmstreifen auf das Nährmedium übertragen und die beimpfte Agarplatte bei 30°C für 48 h unter aeroben Bedingungen inkubiert. Nach dieser Zeit wurde das Kulturmedium auf das Bakterienwachstum überprüft.

### **2.1.3. Überprüfung einer möglichen desinfizierenden Wirkung des *tesa*®-Filmstreifens auf das Wachstum der Bakterienkolonien**

Die auf der Haut vorhandenen Bakterienkolonien werden mittels eines adhäsiven Filmstreifens auf ein Nährmedium übertragen. Überprüft werden soll, ob der *tesa*®-Film beim Haften auf der Hautoberfläche selber einen wachstumshemmenden Einfluss auf die Bakterien ausübt. Zu diesem Zweck wurden sechs männliche Probanden nach zuvor genannten Kriterien ausgewählt (vgl. 2.1.1.). Ein *tesa*®-Filmstreifen mit einer Länge von 3 cm wird auf das unbehandelte, zuvor markierte Hautareal aufgetragen (vgl. 2.2). Er verbleibt eine Minute auf der Haut. Anschließend wird er auf das Kulturmedium, Standard X Agarplatte, übertragen. Die Agarplatte wird nach Beimpfung für 48 h bei 30°C unter aeroben Bedingungen inkubiert. Im Anschluss an den ersten Filmabriss wird erneut ein 3 cm langer *tesa*®-Filmstreifen auf ein noch unbehandeltes Untersuchungsareal in unmittelbarer Nähe der zuvor behandelten Hautstelle aufgebracht. Dieser verbleibt 20 Minuten auf der Haut. Im Anschluss wird eine zweite Standard X Agarplatte mit den Bakterien dieses Filmabrisses beimpft und danach für 48 h bei 30°C unter aeroben Bedingungen inkubiert.

### **2.1.4. Anwendung von Waschmittel auf der Haut und deren Einfluss auf das Wachstum der Bakterien**

Die Hautreinigung spielt als äußerer Einflussfaktor auf den pH-Wert der Haut eine wichtige Rolle. Ein Anstieg des pH-Wertes der Haut bewirkt eine Veränderung in der Kohäsion und Integrität des Stratum corneum, was wiederum mit einer verminderten Barrierefunktion der Haut und damit einem leichteren Eindringen von Mikroorganismen einhergeht. [20, 21, 22] In einigen Stu-

dien wurde die Auswirkung auf den pH-Wert bei Anwendung von Seifenlösungen auf der Haut untersucht. Wird die Haut allein mit Wasser gereinigt, so ist ein vorübergehender Anstieg des pH-Werts zu verzeichnen. Erfolgt die Reinigung der Hände mit herkömmlicher Seife, so steigt der an den Handflächen gemessene pH-Wert um durchschnittlich drei Einheiten. Dabei stellte sich heraus, dass sich der pH-Wert der Hände nach 90 Minuten noch nicht komplett normalisiert hatte. Nach Reinigung der Haut mit Natrium Lauryl Sulfat stieg der pH-Wert der Haut signifikant an. Dieser Anstieg ging jedoch einher mit einer beeinträchtigten Barrierefunktion der Haut, die über den Anstieg des transepidermalen Wasserverlustes gemessen wurde. Durch wiederholte Reizung der Haut mittels Natrium Lauryl Sulfat ergab sich ein Gewöhnungseffekt mit der Tendenz zur Wiederherstellung der physiologischen Hautparameter. Synthetische Stoffe mit saurem pH-Wert werden heutzutage aufgrund ihrer bakterienregulierenden Wirkung und ihrer guten Verträglichkeit bevorzugt bei Patienten mit Seborrhoe oder atopischen Hautkrankheiten eingesetzt. [63] Korting et al. (1987) [67] zeigten, dass sich bei abwechselnder Anwendung einer alkalischen Seifenlösung und eines sauer eingestellten Syndetpräparats der gemessene Hautoberflächen-pH-Wert unterschied und dass die Dichte der Propionibakterien unterschiedlich ausfiel. Keines dieser beiden Produkte bewirkte eine Änderung in der Anzahl der Koagulase-negativen Staphylokokken, hingegen stieg die Zahl der Propionibakterien bei Anwendung einer alkalischen Seifenlösung deutlich an. Bei Gebrauch des sauer eingestellten Syndetpräparats sank die Anzahl der Propionibakterien. [33]

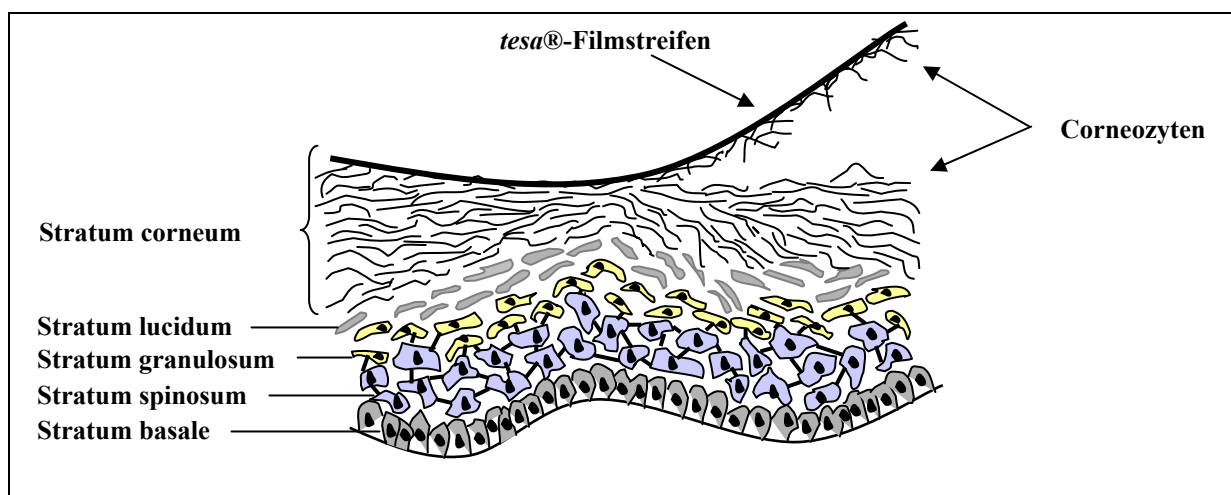
Für die Beurteilung des Bakterienwachstums auf der Haut nach Anwendung von Seifenlösungen wurden Versuche durchgeführt, an denen drei Probanden teilnahmen. Die Auswahl der Probanden richtete sich nach den oben genannten Kriterien (vergleiche 2.1.1.). In diesem Fall wurden die Probanden angehalten, ihren rechten Unterarm gegen 7.00 Uhr morgens des Untersuchungstages mit einer herkömmlichen Seifenlösung zu waschen. Der linke Unterarm hingegen sollte unbehandelt belassen werden. Gegen 8.30 Uhr des gleichen Tages wurde mit dem Versuch begonnen. Ein *tesa*®-Filmstreifen, Länge 3 cm, wurde auf das gewaschene zuvor markierte Hautareal des rechten Unterarms aufgetragen (vgl. 2.2). Der adhäsive Streifen verblieb eine Minute auf der Haut, wurde dann ruckartig entfernt und auf eine Standard X Agarplatte übertragen. Auf der Unterseite der Platte wurde die Position des Filmstreifens farblich markiert. Nachdem der Filmstreifen eine Minute auf dem Kulturmedium auflag, konnte er entsorgt werden. Die Agarplatte wurde nach Beimpfung für 48 h bei 30°C unter aeroben Bedingungen inkubiert. Das gleiche Verfahren wurde auf der Haut des linken, unbehandelten Unterarms angewandt. Nach Inkubation der Agarplatten wurde das Wachstum der Bakterienkolonien auf dem Kulturmedium an markierter Position ausgewertet.

## 2.2. Tesa®-Film-Abrissmethode

Für die Untersuchung humaner Bakterien im Stratum corneum der menschlichen Haut wurde eine Methode angewandt, die es ermöglicht Corneozyten schichtweise, das heißt von der Oberfläche bis in die Tiefe der Hornschicht, von der Haut zu entfernen und im Anschluss daran auf das Bakterienwachstum zu überprüfen. Dieses sukzessive Entfernen des Stratum corneum unter Verwendung eines adhäsiven Filmstreifens wird als Abrissmethode bezeichnet. Dieses Verfahren ist zur Untersuchung des Stratum corneum und der Dermatopharmakokinetik topisch applizierbarer Stoffe anerkannt. [68, 69, 70, 71]

Wolf (1939) [72] entwickelte als erster eine Methode zur Untersuchung des Oberflächenreliefs der Haut unter Verwendung eines transparenten Klebestreifens, mit dem er die oberflächliche Hornschicht entfernte. Pinkus (1951) [70] entwickelte diese Abrissmethode zur Untersuchung der gesamten Epidermis weiter. Die schichtweise Abtragung des Stratum corneum mittels Klebestreifen in Kombination mit der kulturellen Bestimmung der Zahl der auf den einzelnen Filmabrissen vorhandenen Keimen wurde erstmalig von Leone (1957) [73] angewandt. Röckl und Müller (1959) [37] veränderten die Methode dahingehend, dass sie den mit Hornzellen beschichteten Filmstreifen direkt auf Nähragar aufbrachten. Leone hingegen löste vor Bebrütung die keimtragenden Hornschuppen mittels Benzin vom Filmstreifen ab. Auch Keddie et al. (1961) [74] beschrieben eine Methode, bei der sie Vinyl-Klebestreifen einsetzten, um die Mikroflora der Haut zu untersuchen.

In der folgenden Abbildung 2.2 ist die Abrissmethode schematisch dargestellt.

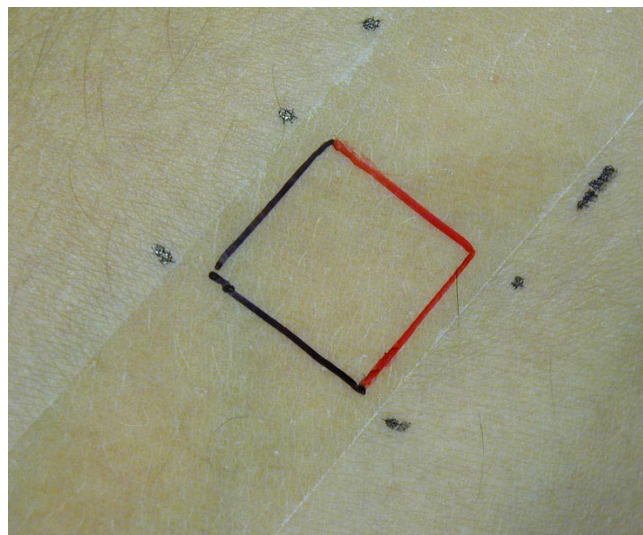


**Abb. 2.2:** Schematische Darstellung der *tesa*®-Film-Abrissmethode gezeigt an einem Ausschnitt der Epidermis mit ihren einzelnen Schichten

Sie zeigt, wie die Corneozyten des Stratum corneum der Epidermis durch wiederholtes Aufbringen eines adhäsiven Films (tesa®-Filmstreifen) Schicht für Schicht auf diesen übertragen werden.

Für die Abrissmethode wurde *tesa*®-Film Nr. 5529 der Firma Beiersdorf, Hamburg verwendet. Als zu untersuchendes Testareal wurde die Innenseite des rechten männlichen Unterarms gewählt, die dort angesiedelte Bakterienflora soll gewonnen werden. Die Innenseite des Unterarms bietet für die Untersuchung gute Zugangsmöglichkeiten. Dieser Hautbereich ist ein häufig ausgewähltes Untersuchungsareal, die Vergleichbarkeit zu anderen Studien kann somit erleichtert werden.

Zunächst wird mittels Pinzetten unter Verwendung von Latexhandschuhen ein 8 cm langer *tesa*®-Filmstreifen (Breite 1,9 cm) auf das festgelegte Hautareal aufgebracht. Anschließend erfolgt das Aufbringen einer Zwischenlage aus Papier. Mit einer Kunststoffrolle wird dreimal mit konstantem Druck auf dem Papier über den Filmstreifen gerollt, um ein gleichmäßiges Anhaften des Films auf der Haut zu gewährleisten. Wie auf der folgenden Abbildung 2.3 sichtbar, wird mit Folienmarker das zu untersuchende Testareal, 1,5 x 1,5 cm<sup>2</sup>, mittels einer Schablone markiert. Die rot gekennzeichnete Ecke zeigt nach distal-ulnar, die schwarze Ecke nach proximal-radial.



**Abb. 2.3:** Haut der Innenseite des rechten Unterarmes mit *tesa*®-Film und darauf markiertem Testareal

Im Anschluss an die Markierung wird der Filmstreifen mittels Pinzetten in einem Zug ruckartig [68, 75] von der Haut entfernt und auf eine entsprechende Haltevorrichtung aufgebracht.

Die Darstellung in Abbildung 2.4. zeigt das Hautareal nach Durchführung von 15 aufeinander folgenden *tesa*®-Filmabrissen.



**Abb. 2.4:** Hautareal nach 15 *tesa*®-Filmabrissen

### 2.3. Anzucht der Bakterien

Für die Züchtung der Mikroorganismen wurden Standard X Agarplatten verwendet. Agarplatten sind feste Kulturmedien und ermöglichen die Anzucht von Bakterienkolonien außerhalb ihres natürlichen Standortes. Als gelierende Substanz wurde Agar-Agar verwendet, ein Polysaccharid aus getrockneten Fäden roter Meeresalgen. Es verleiht dem Kulturmedium Festigkeit. Agar löst sich nach Quellung unter Erwärmung in Wasser, bei Temperaturen unter 45°C wird eine agarhaltige Lösung fest. [76, 77] Bei Zugabe von 0,5-1,5% pulverisierten Agars verfestigt sich das Nährmedium. [76] Nur auf festen Kulturmedien können die Koloniemorphologie und Reinheit einer Bakterienkultur überprüft werden. Agar-Agar besitzt spezielle Eigenschaften, welche seine weite Verbreitung als gelierende Substanz erklärt: Es ist nahezu inert gegen mikrobielle Aktivität und weist niedrige Toxizität, hohe Schmelz- und Erstarrungspunkte und Klarheit auf. Agarplatten enthalten ca. 2% Agar und werden in einer Schichtdicke von 3-3,5 mm in Petrischalen gegossen. [35]

Für die Versuche wurden Standard X Agarplatten verwendet, deren pH-Wert auf 7,0 eingestellt worden war. Folgende Bestandteile werden zur Herstellung von Standard X Agarplatten (1000 ml Medium) verwendet:

- |                             |         |                      |
|-----------------------------|---------|----------------------|
| • Lösungsmittel:            | 1000 ml | destilliertes Wasser |
| • Nährstoff:                | 10 g    | Hefeextrakt          |
| • Energiequellen:           | 1 g     | Glucose              |
| • Metalle und Mineralsalze: | 6 g     | NaCl                 |
| • Gelierende Substanz:      | 20 g    | Agar-Agar            |

Die Standard X Agarplatten wurden für diese Arbeit im Institut der Biotechnologie, Fachbereich Mikrobiologie und Genetik der TU Berlin hergestellt.

Der 8 cm lange Filmabriss auf der Haltevorrichtung wird mittels einer Rasierklinge in der Mitte geteilt. Der Abschnitt des Filmabrisses mit dem markierten Testareal wird für die Bakterienanzucht verwendet. Der andere Abschnitt wird für die spektroskopische Messung herangezogen.

Für die Anzucht der Hautbakterien wird der 4 cm lange Filmabriss mit dem markiertem Testareal mittels Pinzetten von der Haltevorrichtung entfernt und auf eine Standard X Agarplatte aufgebracht. Nur für das Aufbringen und Herunternehmen des Filmstreifens wird der Deckel der Agarplatte geöffnet, um eine Kontamination mit Keimen aus der Luft zu verhindern. Während des Aufliegens des Filmabrisses auf dem Nährmedium wird die Position des Streifens auf der Unterseite der Platte markiert. Das farblich markierte Testareal auf dem Filmabriss wird, wie unter 2.2. beschrieben, analog auf der Unterseite der Agarplatte übertragen. Das Markieren soll sicherstellen, dass im Anschluss nur die gewachsenen Bakterienkolonien auf dem Kulturmedium untersucht werden, welche vom Testareal des Filmabrisses auf die Agarplatte übertragen wurden. Die Verweildauer des Filmstreifens auf dem Nährmedium beträgt eine Minute. Dieser Zeitraum rechtfertigt sich zunächst durch Vorversuche, die zeigten, dass 20 Sekunden Kontakt zwischen *tesa*®-Filmabriss und Nährmedium ausreichen, um Bakterien des Filmabrisses auf das Kulturmedium zu übertragen. Diese Versuche wurden im Vergleich mit 60, 90 und 120 Sekunden Verweildauer durchgeführt. Aus den Ergebnissen wurde deutlich, dass jede Zeit von 20 Sekunden bis zwei Minuten geeignet scheint und die Bakterienanzucht durch die unterschiedlich gewählten Zeiten nicht beeinflusst wird. Insofern spielen für die Festlegung der Verweildauer vor allem verfahrenstechnische Gründe eine Rolle: Es muss genügend Zeit verbleiben um die Agarplatten angemessen zu markieren.

Nachdem der Streifen mit dem Nährmedium eine Minute in Kontakt war, wird er mittels Pinzetten entfernt und kann im Anschluss daran entsorgt werden. Die mit den Hautbakterien beimpften Agarplatten werden bei 30°C für 48 h im Institut der Biotechnologie, Fachbereich Mikrobiologie und Genetik der TU Berlin unter aeroben Bedingungen inkubiert.

Im Anschluss an die Inkubation der Platten werden die auf dem Nährmedium gewachsenen Bakterienkolonien im zu untersuchenden Testareal nach Quantität und Aussehen beurteilt.

#### **2.4. *tesa*®-Film-Abrissmethode in Kombination mit der Osmiumtetroxid-Färbung**

Osmiumtetroxid ( $\text{OsO}_4$ ) ist eine farblose, kristalline Substanz. Sie wird in der präparativen organischen Chemie als Oxidationsmittel eingesetzt. [78] Gewöhnlich wird  $\text{OsO}_4$  zur Fixierung von Fetten verwendet. In der Elektronenmikroskopie findet es Einsatz als Kontrastierungsmittel von Strukturen. [79]

$\text{OsO}_4$  bildet durch Anlagerung an Kohlenstoffdoppelbindungen schwarze Reaktionsprodukte. Lademann et al. (1999) [27] zeigten, dass sich die Follikelöffnungen auf einem mit Osmiumtetroxid gefärbten Filmabriss als schwarze Punkte darstellen. Im Follikelkanal befindet sich Talg, welcher von der assoziierten Talgdrüse des Follikels gebildet wird. Zum größten Teil besteht Talg aus Lipiden mit ungesättigten Fettsäuren. Durch Anlagerung von  $\text{OsO}_4$  an diese Kohlenstoffdoppelbindungen ist es möglich, die Follikelöffnungen auf dem *tesa*®-Filmabriss als deutlich schwarze Punkte sichtbar zu machen.

Röckl und Müller (1959) [37] wendeten die von Herrmann et al. (1953) [80] angegebene Osmiumtetraoxydreaktion direkt auf der Epidermisoberfläche an, um die Follikelöffnungen darzustellen.

Ein *tesa*®-Filmstreifen in der Länge von 8 cm wird auf das festgelegte Hautareal aufgebracht, die gleichmäßige Verteilung des Films wird mittels einer Kunststoffrolle erreicht. Mit dieser wird drei Mal auf dem Streifen auf und ab gerollt, dabei befindet sich zwischen Rolle und Filmstreifen eine Lage Papier. Das Testareal wird farblich markiert. Der Filmstreifen verbleibt 20 Minuten auf der Haut. Damit soll gewährleistet werden, dass die für den Follikel typischen Strukturen hinreichend aus dem Follikelkanal in die Filmschicht des *tesa*®-Filmstreifens diffundieren. Im Anschluss an die 20 Minuten Verweildauer auf der Haut wird der Filmstreifen ruckartig mittels Pinzetten entfernt und auf eine für die Osmiumtetroxid-Färbung geeignete Haltevorrichtung aufgebracht. Unter Abzug wird die Färbung des Filmabrisses mit 200 µl einer 0,1%igen



Osmiumtetroxidlösung ( $\text{OsO}_4$ ) vorgenommen. [72] Nach der Trocknung des Filmstreifens wird dieser mit destilliertem Wasser gespült. Die Arbeiten mit Osmiumtetroxid wurden immer unter Abzug durchgeführt, da Osmiumdämpfe als kanzerogen gelten.

## **2.5. Cyanacrylat zur Herstellung von Hautoberflächenbiopsien und zur Keimgewinnung**

### **2.5.1. Anwendungsgebiete und Stoffeigenschaften von Cyanacrylat**

Cyanacrylat wird weltweit als Einkomponentenkleber verwendet. Unter Druck und Spuren von Wasser polymerisiert Cyanacrylat sehr leicht. [81] Von Goldschmidt und Kligmann (1967) [82] wurde eine Methode beschrieben, bei der unter Verwendung eines Objektträgers und Klebstoff Oberflächenabdrücke erstellt werden. Marks und Dawber (1972) [83] benutzten zur Herstellung von Hautoberflächenbiopsien Cyanacrylat. Diese wurden unter anderem zum Zweck der Untersuchung des oberflächlichen Stratum corneum bei gesunden Menschen und Psoriasispatienten herangezogen. Holmes et al. (1972) [84] sowie Mills und Kligman (1983) [85] untersuchten Velushaarfollikel unter Benutzung von Cyanacrylat.

Cyanacrylat dient nicht nur dem Oberflächenabguss, sondern auch zur Untersuchung der oberflächlichen Schichten des Stratum corneum, da sie bei der Anwendung von Cyanacrylat entfernt werden. Goldschmidt und Kligmann (1967) [82] gelang es mit oben genanntem Verfahren in der entfernten Zellschicht des Stratum corneum Bakterien und Hefepilze zu identifizieren. Marks und Dawber (1972) [83] verwendeten ihre Hautoberflächenbiopsie-Methode zur Erfassung von infektionsauslösenden Mikroorganismen und zur Bestimmung ihrer Quantität in der gewonnenen Hornzellschicht. Für die Darstellung von Haarfollikeln eignet sich Cyanacrylat, da der Klebstoff das Infundibulum füllt, darin aushärtet und das Haar mit entfernt. Das Ergebnis ist eine Follikelteilbiopsie.

Holland et al. (1974) [51] nutzten Cyanacrylat zur Gewinnung von Mikroorganismen aus tieferen Hautschichten, vor allem aus den Haarfollikeln. Dabei wird der Klebstoff mit einem Stempel auf die Haut gedrückt und nach 20 Sekunden ruckartig entfernt. Diese Methode ermöglicht den Abriss von Hornschichtlamellen sowie das Herauslösen der Follikelinhaltsstoffe. [43] Da Cyanacrylat bakterizide Eigenschaften aufweist, gehen oberflächliche Keime teilweise zugrunde. [40] Nach Hartmann et al. (1986) [44] ist die Cyanacrylat-Abrissmethode nach Holland zur Gewinnung der Hautflora im Infrainfundibulum-Bereich der Talgdrüsen geeignet.

### 2.5.2. Herstellung des Cyanacrylat-Abrisses

Auf das 1,5 x 1,5 cm<sup>2</sup> große Testareal der Haut wird ein Tropfen Cyanacrylat (UHU® Sekundenkleber, UHU GmbH, Brühl) gegeben. Sofort im Anschluss wird ein 3 cm langer *tesa*®-Filmstreifen auf die mit Cyanacrylat behandelte Hautstelle aufgebracht und mit einer Kunststoffrolle gleichmäßig angedrückt, zwischen Rolle und Filmstreifen befindet sich dabei eine Lage Papier. Das Testareal wird auf dem *tesa*®-Filmstreifen farblich markiert (vgl. 2.2.). Nach fünf Minuten ist der Klebstoff vollständig polymerisiert und der Filmstreifen wird ruckartig mittels Pinzetten von der Haut abgerissen. Die so erhaltene Oberflächenbiopsie wird einerseits für die Lokalisation der Haarfollikel herangezogen, andererseits für die Bakterienanzucht verwendet.

### 2.5.3. Bakterienanzucht unter Verwendung des Cyanacrylat-Abrisses

Der mittels Cyanacrylat erhaltene Oberflächenabguss stellt die Haarfollikel dar (vgl. 2.5.1.). Bakterien, die sich im Haarfollikel – im Infundibulum – befinden, werden mit dem Cyanacrylat-Abriss entfernt und sollen im Anschluss angezüchtet werden (vgl. 2.2.). Dazu wird der Cyanacrylat-Abriss auf eine Standard X Agarplatte aufgebracht. Er verbleibt eine Minute auf dem Nährmedium. Währenddessen wird das auf dem Cyanacrylat-Abriss farblich markierte Testareal auf die Unterseite der Agarplatte übertragen. Anschließend wird der Abriss für die Lokalisation der Haarfollikel herangezogen.

## 2.6. Ermittlung des Hornschichtprofils

Mit jedem Filmabriss von dem gleichen markierten Hautareal werden Corneozyten von der Oberfläche bis in die Tiefe des Stratum corneum von der menschlichen Haut entfernt. Die einzelnen Filmabrissse und damit auch die dazugehörigen Bakterien sollen zur Tiefe innerhalb der Hornschicht zugeordnet werden.

Weigmann et al. (1999) [75] entwickelten eine Methode, die es ermöglicht, die genaue anatomische Lokalisation eines individuellen Filmabrisses in Hinblick auf die Tiefe des Stratum corneum zu bestimmen. Unter Anwendung der *tesa*®-Film-Abrissmethode in Kombination mit der UV/VIS-Spektroskopie kann das individuelle Hornschichtprofil bestimmt werden.

Weigmann et al. [75] zeigten, dass die Menge der auf dem Filmabriss fixierten Corneozyten mit der im UV/VIS-Spektrum gemessenen Extinktion direkt korreliert. In unabhängigen Untersuchungen konnte der lineare Zusammenhang zwischen der durch Wägung bestimmten Corneozytenmenge auf dem Filmabriss und der UV/VIS-spektroskopischen Messwerte der Corneozytenmenge bestätigt werden. [75, 86] Hornschichtprofile lassen sich für Penetrationsstudien nutzen, dazu wird parallel die Konzentration einer topisch applizierten Substanz auf den Filmstreifen spektroskopisch bestimmt und der jeweiligen Schicht des Stratum corneum zugeordnet.

Das Photometer misst die Lichtintensität, die Schwächung der Lichtstrahlen einer bestimmten Wellenlänge nach Durchtritt durch den sich im Messbereich befindlichen *tesa*®-Filmabriss. Die Extinktionswerte ergeben sich durch Streuung, Reflexion und Absorption des Lichts durch die auf dem Filmstreifen fixierten Corneozyten. Der Durchlässigkeitsgrad des Filmstreifens, Transmission (**T**), ergibt sich aus dem Verhältnis von geschwächter Lichtintensität (**I**) zu eingestrahelter Lichtintensität (**I<sub>0</sub>**):

$$\mathbf{T = I / I_0}$$

Die Durchlässigkeit des Filmstreifens steht in Wechselbeziehung zur Konzentration des Absorbers. Hier gilt das Lambert-Beersche Gesetz [87] :

$$\mathbf{\ln T = \ln I / I_0 = E = \varepsilon \cdot c \cdot d}$$

**E** = Extinktion

**ε** = Extinktionskoeffizient

**c** = Konzentration des Absorbers

**d** = Weglänge des Lichtstrahls durch  
das absorbierende System

Die Extinktion verhält sich direkt proportional zur Konzentration der absorbierenden Substanz. Die am *tesa*®-Filmstreifen anhaftenden Corneozyten werden mittels eines Zweistrahl-spektrophotometers (Lambda 20; Perkin Elmer, Überlingen, Germany) bei 430 nm gegen einen Leerstreifen vermessen. Die Extinktion des Leerstreifens wird von den Extinktionswerten jedes

einzelnen Filmabrisses subtrahiert. Dieses Vorgehen stellt sicher, dass die spektroskopischen Messwerte wirklich nur durch die Corneozyten zustande kommen.

Anhand der spektroskopischen Messung der auf dem einzelnen Filmabriss fixierten Corneozyten lässt sich die Corneozytenmenge auf dem jeweiligen Abriss quantitativ erfassen. Zum einen ist es nun möglich ein Hornschichtprofil zu erstellen, zum anderen kann die Position eines Filmabrisses innerhalb des Hornschichtprofils und damit auch die Bakterienlokalisation exakt bestimmt werden.

Jacobi et al. (2005) [88] untersuchten das Stratum corneum an Schweineohren. Sie zählten die Hornschicht-Zelllagen vor und nach Anwendung der *tesa*®-Film-Abrissmethode unter Nutzung histologischer Techniken. Die Pseudo-Absorption der am Filmabriss haftenden Corneozyten wurde bei 430 nm bestimmt und die erhobenen Daten mit der Anzahl der Zellschichten verglichen. Dabei spiegeln die spektroskopisch ermittelten Pseudo-Absorptionswerte der Corneozyten die Menge der entfernten Zellen wider. Zwischen den spektroskopisch ermittelten Daten und der Anzahl der entfernten Zelllagen besteht ein linearer Zusammenhang. So entspricht ein Extinktionswert von 0,25 einer Schicht von Corneozyten. Untersuchungen, in denen Corneozyten der menschlichen Haut vom Unterarm mit den Corneozyten vom Schwein verglichen wurden, machten deutlich, dass die Corneozyten ähnliche spektroskopische Eigenschaften aufweisen. So lässt sich vermuten, dass die gleiche Beziehung auch für das menschliche Stratum corneum am Unterarm gilt.

Das Fazit dieser Untersuchung bedeutet für die vorliegende Arbeit, dass die Hautbakterien exakt den Hornzellschichten zugeordnet werden können.

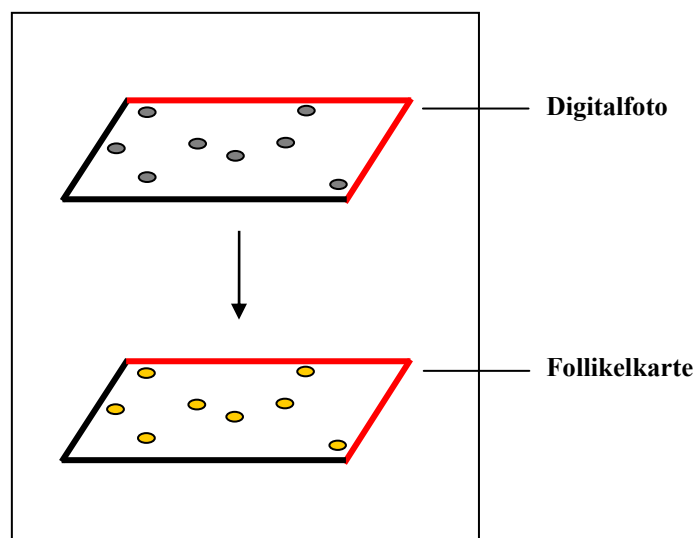
## 2.7. Erstellen von Follikelkarten

### 2.7.1. Follikelkarte mittels Osmiumtetroxid

Mittels Osmiumtetroxid-Färbung können Follikelöffnungen auf den Filmabrissen sichtbar gemacht werden. Der mit Osmiumtetroxid gefärbte Filmabriss wird fotografiert.

Diese Aufnahmen wurden mit einer Digitalkamera (Olympus Camedia C-2000 Zoom) unter Verwendung eines Makroaufsatzes (Macro conversion lens,  $f = 40 \text{ cm}$ ) durchgeführt. Für jede Bildaufnahme wurde ein vorher festgelegter Abstand zwischen Objektiv und zu fotografierendem Objekt eingehalten. Alle Fotografien wurden mit Stativ durchgeführt. Diese Maßnahmen stellen sicher, dass für jedes angefertigte Foto die gleichen standardisierten Bedingungen hinsichtlich Bildschärfe und Vergrößerung gewährleistet sind.

Der mit  $\text{OsO}_4$  gefärbte Filmabriss wurde fotografiert und das entsprechende Bild mittels eines Software-Programms (Olympus Camedia Master 1.1., ©1998-1999 Image Software, OLYMPUS OPTICAL CO., LTD.) auf einen Rechner geladen und mit einem Bildbearbeitungsprogramm (Adobe® Photoshop® 6.0) bearbeitet. Für das Erstellen der Follikelkarte wurde Microsoft® PowerPoint® aus dem Officepaket 2000 verwendet. Mit diesem Programm ist es möglich in mehreren Ebenen zu arbeiten. Der fotografierte Filmabriss mit dem zu untersuchenden Testareal ( $1,5 \times 1,5 \text{ cm}^2$ ) kann in einer neuen Ebene in eine Folie der Fotografie umgewandelt werden. In dieser Ebene werden die Follikelöffnungen, die auf der Fotografie als schwarz-graue Punkte zu sehen sind, als gelbe Punkte gekennzeichnet. Die Begrenzung des Testareals auf der Folie erfolgt farblich in gleicher Weise, wie die Fotografie es vorgibt. Die folgende Abbildung 2.4 zeigt vereinfacht das Erstellen einer Follikelkarte.



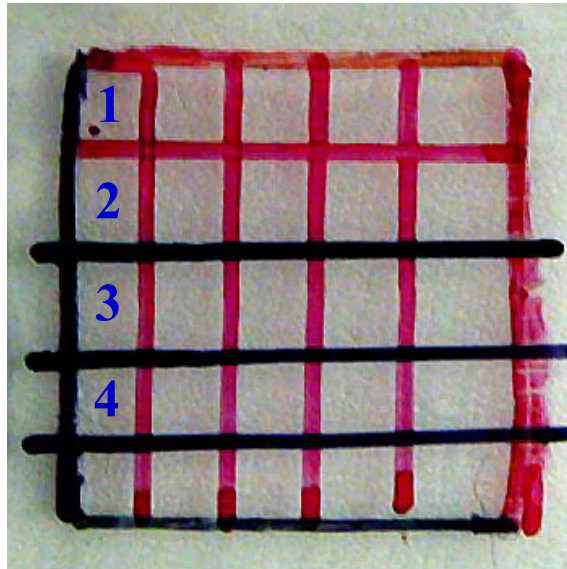
**Abb. 2.4:** Follikelkarten-Schema mittels Osmiumtetroxid-Färbung

### 2.7.2. Follikelkarte mittels Cyanacrylat

Die mit Cyanacrylat entstandene Oberflächenbiopsie wird für die Bestimmung der Follikelposition genutzt und kann somit für das Erstellen der Follikelkarte verwendet werden.

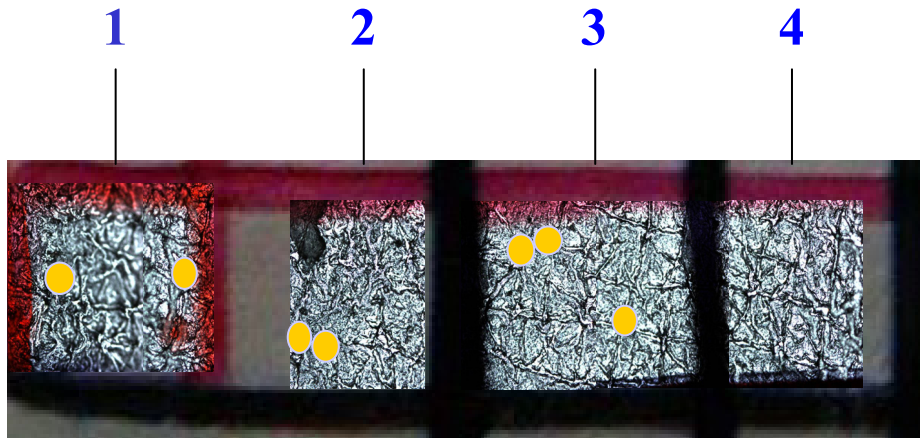
Der Filmstreifen wird von dem mit Cyanacrylat behandelten Hautabschnitt entfernt, anschließend auf der Rückseite mit einem Raster aus Gitternetzlinien markiert. Durch die lichtmikroskopische Untersuchung der einzelnen so entstandenen Abschnitte auf dem Filmabriss lassen sich die Follikel lokalisieren.

Im Vorfeld wurde der mit Gitternetzlinien versehene Cyanacrylat-Filmabriss mit der Digitalkamera fotografiert und mittels Adobe® Photoshop® und Microsoft® PowerPoint® überarbeitet. Die Abbildung 2.5 zeigt das überarbeitete Digitalfoto.



**Abb. 2.5:** Cyanacrylat-Filmabriss mit Gitternetzlinien, vier Abschnitte nummeriert

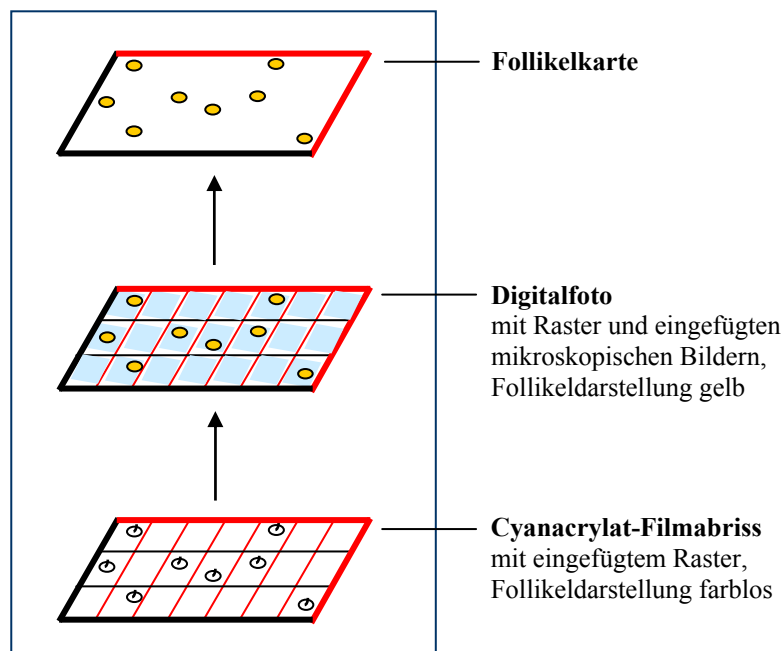
Jeder durch das Gitternetz entstandene Abschnitt des Cyanacrylat-Filmabrisses,  $3 \times 3 \text{ mm}^2$ , wird lichtmikroskopisch (Olympus®BX60M System-Mikroskop) bei 100facher Vergrößerung auf Follikel untersucht. Das Gitternetz ist durch das durchsichtige Cyanacrylat erkennbar. Abschnitte mit mikroskopisch sichtbaren Follikeln werden digital mit analySIS® (Soft Imaging System GmbH SIS, Münster) fotografiert. Beim Mikroskopieren wurde systematisch vorgegangen. Jedes einzelne mikroskopische Bild wurde zusammen mit dem jeweiligen Abschnitt des Rasters nummeriert, um später das richtige Einfügen der Abschnitte in das Gitternetz zu gewährleisten. Jeder dieser einzelnen mikroskopischen Abschnitte wird, so wie es das Gitternetz vorgibt, in das zuvor bearbeitete Cyanacrylat-Filmabriss-Digitalfoto überführt. Die roten bzw. schwarzen Linien helfen beim korrekten Einfügen der mikroskopischen Bilder. Mittels Microsoft® PowerPoint® wird über dem Digitalfoto mit den eingefügten mikroskopischen Abschnitten eine neue Folie erstellt. Überall dort, wo auf den mikroskopischen Abbildungen Follikel zu sehen sind, werden diese in der neuen Ebene in gleicher Position als gelbe Punkte auf der Folie markiert. Die folgende Abbildung 2.6 soll dies verdeutlichen.



**Abb. 2.6:** Raster mit eingefügten mikroskopischen Abschnitten und gelb markierten Follikeln

In einigen Abschnitten des Cyanacrylat-Filmabrisses konnten keine Follikel gefunden werden, so dass diese Bereiche nicht fotografiert wurden. Dies zeigt sich anhand von Lücken zwischen den mikroskopischen Bildern.

Auf der neuen Folie mit den gelb markierten Follikeln wird der Rahmen des Testareals entsprechend dem Rahmen des Cyanacrylat-Filmstreifens übernommen. Die noch vorhandenen mikroskopischen Abschnitte sowie das Gitternetz werden entfernt. Die schematische Darstellung in Abbildung 2.7 zeigt vereinfacht das Erstellen einer Follikelkarte mittels Cyanacrylat.



**Abb. 2.7:** Follikelkarten-Schema mittels Cyanacrylat

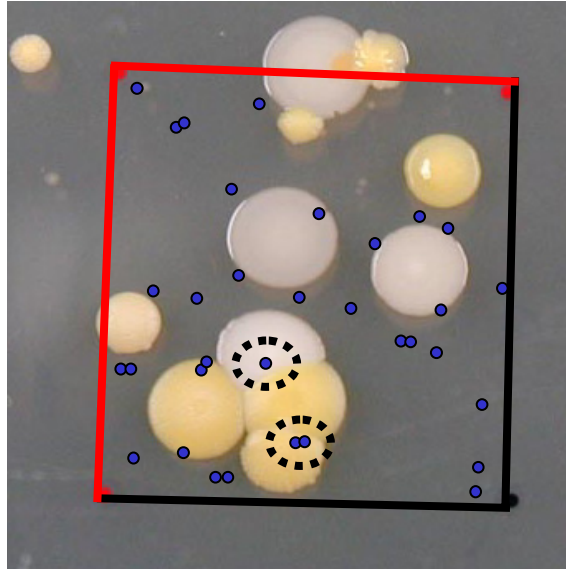
## 2.8. Zählung und Charakterisierung der gewachsenen Bakterienkolonien

Im Institut der Biotechnologie, Fachbereich Mikrobiologie und Genetik der TU Berlin wurden die beimpften Agarplatten des jeweiligen Probanden im Brutraum bei 30°C für 48 h unter aeroben Bedingungen inkubiert (vgl.2.3.). Nach Ablauf dieser Zeit wurden die auf dem Nähragar angezüchteten Bakterienkolonien auf ihr Wachstum hin überprüft. Es wurde nur das auf der Unterseite des Kulturmediums markierte Testareal untersucht. Alle Bakterienkolonien auf dem Kulturmedium wurden auf dem 1,5 x 1,5 cm<sup>2</sup> großen Areal ausgezählt und nach Koloniemorphologie und -farben klassifiziert. Anschließend erfolgte die Auswahl der follikelbezogenen Bakterienkolonien (vgl. 2.11.).

## 2.9. Anzucht follikotroper Bakterienkolonien zur Herstellung von Reinkulturen

Die gewachsenen Bakterienkolonien auf der Oberfläche des Nähragars sollen den Follikelpositionen auf den Filmabrissen zugeordnet werden. Mit der Digitalkamera (Olympus Camedia C-2000 Zoom) unter Verwendung eines Makroaufsatzes (Macro conversion lens, f = 40 cm) werden die Bakterienkolonien auf der Agarplatte fotografiert. Bei diesen Aufnahmen wurde ein vorher festgelegter Abstand zwischen Objektiv und zu fotografierendem Objekt eingehalten. Alle Bildaufnahmen wurden mit Stativ durchgeführt. Diese Maßnahmen gewährleisten die gleichen standardisierten Bedingungen für jedes angefertigte Foto. Die entsprechenden Bilder werden mittels eines Software-Programms (Olympus Camedia Master 1.1., ©1998-1999 Image Software, OLYMPUS OPTICAL CO., LTD.) auf einen Rechner geladen. Im Anschluss werden die Digitalaufnahmen mittels Adobe® Photoshop® 6.0 und Microsoft® PowerPoint® in der Weise bearbeitet, dass nur das zu untersuchende Testareal mit den gewachsenen Bakterienkolonien (1,5 x 1,5 cm<sup>2</sup>) als Abbildung vorliegt. Mittels Microsoft® PowerPoint® wird auf dieses Digitalfoto in einer zweiten Ebene die von dem jeweiligen Probanden erstellte Follikelkarte aufgelegt. Anhand des mit farbigen Punkten markierten Testareals sowie der farblich unterschiedlich gekennzeichneten Seiten der Follikelkarte wird das korrekte Einfügen der Follikelkarte in das Digitalfoto garantiert. Die nachfolgende Abbildung 2.8 zeigt gewachsene Bakterienkolonien im Testareal mit aufgelegter Follikelkarte.





**Abb. 2.8:** Nähragaroberfläche mit Bakterienkolonien in Kombination mit der Follikelkarte, eingekreist die Follikel der ausgewählten Bakterienkolonie

Anhand dieser mit der Follikelkarte kombinierten Abbildung ist es möglich genau solche Bakterienkolonien auszuwählen, die örtlich Bezug zum Haarfollikel zeigen. Für die Herstellung von Reinkulturen wurden Bakterienkolonien ausgewählt, bei denen die Follikel in ihrem Mittelpunkt lokalisiert oder maximal 1,5 mm vom Mittelpunkt entfernt waren. Abbildung 2.8 verdeutlicht das Vorgehen beim Auswählen der Bakterienkolonien zur Herstellung von Reinkulturen. Anhand dieser Abbildung wurden die gelbe und die weiße Bakterienkolonie mit den darauf kenntlich gemachten schwarz eingekreisten Follikeln ausgesucht.

Die gewählten Bakterienkolonien werden mittels des fraktionierten Ausstrichs auf das Kulturmedium aufgetragen. Diese Arbeitstechnik dient der Isolierung von einzelnen Spezies aus einer Mischkultur. Einzelkolonien werden als Ergebnis angestrebt, denn nur diese enthalten ausschließlich eine Art: Die Reinkultur. Erst nach Erhalten der Reinkultur ist es möglich, weitere Untersuchungsgänge anzuschließen – z.B. die biochemische Differenzierung, - Identifizierung. [89]

Nach Beimpfung der Agarplatten mit den ausgewählten Bakterienkolonien werden diese bei 30°C für 48 h unter aeroben Bedingungen inkubiert.

## **2.10. Reinkultur und biochemische Differenzierung follikotroper Bakterienkolonien**

### **2.10.1 Katalase-Test**

Nach Erhalt der follikotropen Bakterien-Reinkultur erfolgte die Vordifferenzierung durch makroskopische Morphologiebetrachtung, diese beinhaltete Größe, Form und Oberflächenbeschaffenheit. Ferner wurden die follikotropen Bakterienkolonien nach Farben klassifiziert.

Die Reinkultur, auch genannt Isolat, ist Voraussetzung für die weitere Charakterisierung. Eine Methode der biochemischen Differenzierung ist der Katalase-Test.

Eine Kolonie der Reinkultur wird mittels einer sterilen Impföse auf einen Objektträger verteilt. Auf diese Kolonie wird ein Tropfen einer 3%igen  $H_2O_2$ -Lösung gegeben. Verfügt diese Bakterienkolonie über das Enzym Katalase, dann wird die Wasserstoffperoxid-Lösung gespalten und es steigen Gasblasen auf. Diese Gasbläschen beruhen auf  $O_2$ -Bildung und sind mit bloßem Auge sichtbar. Die getestete Bakterienkolonie wird als Katalase-positiv bezeichnet und es handelt sich um Staphylokokken.

Bei fehlender Reaktion wird die zu untersuchende Bakterienkolonie als Katalase-negativ bezeichnet – es handelt sich um Streptokokken. [89]

### **2.10.2. Untersuchung auf Gramverhalten**

Als eine weitere Charakterisierung wird das Färbeverhalten der Bakterienzelle untersucht. Dabei nimmt die Gram-Färbung als komplexe Färbung einen großen Stellenwert in der Medizinischen Mikrobiologie ein. Für die Identifizierung von Bakterien ist sie richtungweisend. In der Diagnostik können mit dieser Färbetechnik eine vorläufige Erregerdiagnose gestellt und außerdem Aussagen bezüglich der Materialqualität getroffen werden.

Die Zellhülle der Bakterien enthält als wesentlichen Bestandteil ein netzwerkartig angelegtes und als Sack ausgebildetes Riesenmolekül. Dieses wird entweder als Peptidoglykanschicht oder als Murein bezeichnet. Das Prinzip der Gramfärbung, entwickelt nach Hans Chr. Gram, dänischer Arzt (1853-1938), beruht darauf, dass die Peptidoglykanschicht je nach Dicke den Farbstoff Gentiana-Violett oder Kristallviolett mit unterschiedlicher Affinität bindet. [35]

Bakterien mit dicker Mureinschicht binden die eingebeizte Gentianoviolettlösung und halten sie fest. Die Bakterien erscheinen blau-violett = Gram-positiv.

Bakterien mit dünner Peptidoglykanschicht verlieren bei Entfärbung mit Aceton-Alkohol die Kristallviolettlösung und erscheinen nach Gegenfärbung mit Safarinlösung rot = Gram-negativ. [89] Die Einteilung in Gram-positiv und Gram-negativ erwies sich als sehr nützlich. Gram-positive und Gram-negative Bakterien unterscheiden sich nicht nur in ihrem Färbeverhalten, sondern zeigen auch Unterschiede in ihrer Pathogenität und in ihrer Antibiotikaempfindlichkeit. [35]

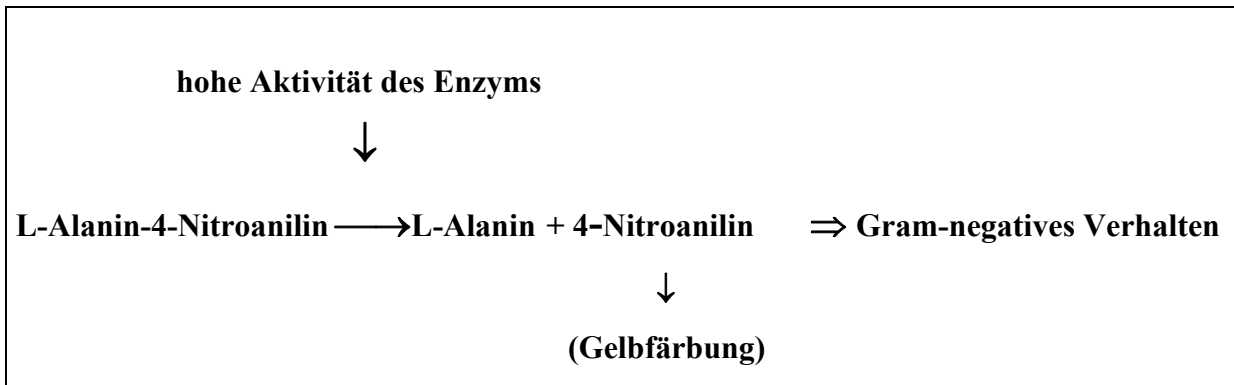
Ein anderes Verfahren zur Untersuchung auf Gramverhalten stellt der Bactident Aminopeptidase Diagnostica Merck 1.13301.0001-Test dar. Mittels Teststreifen wird das Vorhandensein eines bestimmten Enzyms, der L-Alaninaminopeptidase, in der Bakterienzellwand nachgewiesen. Hohe Aktivität des Enzyms in der Bakterienzellwand kennzeichnet Gram-negatives Verhalten der Bakterien. Keine oder geringe Aktivität sprechen für Gram-positives Verhalten. L-Alaninaminopeptidase spaltet die Aminosäure Alanin von verschiedenen Peptiden ab.

In der Reaktionszone des Teststreifens befindet sich L-Alanin-4-Nitroanilin. Von der zu untersuchenden Bakterienreinkultur wird mittels einer sterilen Impföse ein kleiner Teil abgenommen und mit 0,2 µl physiologischer Kochsalzlösung in einem Reagenzglas versetzt. In diese Bakterienlösung wird der Teststreifen getaucht. Er verbleibt im Reagenzglas und wird zusammen mit der Bakteriensuspension 30 Minuten bei 37°C inkubiert.

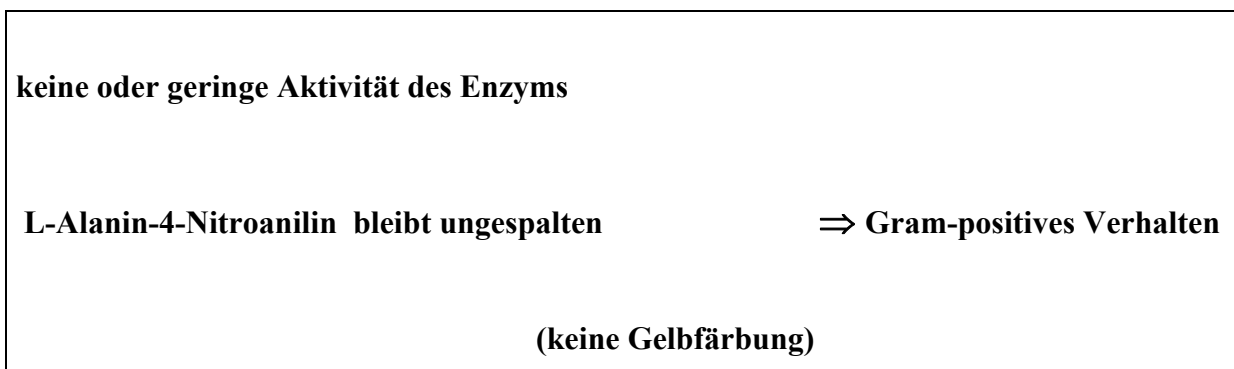
Anschließend wird das Reagenzglas auf Gelbfärbung überprüft und mit der Farbskala auf der Teststreifen-Verpackung der Fa Merck verglichen bzw. mit der Positivprobe. Ist die Aminopeptidase aus der Bakterienlösung vorhanden oder weist sie hohe Aktivität aus, so spaltet sie die in der Reaktionszone des Teststreifens befindliche Substanz L-Alanin-4-Nitroanilin in L-Alanin und 4-Nitroanilin. Die Gelbfärbung der Lösung im Reagenzglas wird durch den Farbstoff 4-Nitroanilin bewirkt. Die Bakterien zeigen Gram-negatives Verhalten.

Färbt sich die Lösung im Reagenzglas nicht, so wird von einem Gram-positiven Verhalten der Bakterien ausgegangen.

Das nachfolgende Schema (Abbildung 2.9, 2.10) zeigt vereinfacht das Prinzip des Teststreifen-Verfahrens.



**Abb. 2.9:** Prinzip des Bactident Aminopeptidase Diagnostica Merck 1.13301.0001-Verfahrens; Gram-negatives Isolat



**Abb. 2.10:** Prinzip des Bactident Aminopeptidase Diagnostica Merck 1.13301.0001-Verfahrens; Gram-positives Isolat

### 2.10.3. Differenzierung mittels Methylenblau-Färbung

Die Methylenblau-Färbung dient der schnellen orientierenden mikroskopischen Untersuchung. Mit alkalischer wässriger Methylenblau-Lösung lassen sich Mikroorganismen und Zellen leicht anfärben. Mit diesem einfachen Färbeverfahren können Aussagen bezüglich Größe und Form der Mikroorganismen getroffen werden. Genus und Spezies können mit dieser Färbetechnik nicht ermittelt werden. [35]

Auf einen Objektträger, der zuvor auf der oberen Seite markiert wurde, wird ein Tropfen einer physiologischen Kochsalzlösung gegeben. Mit einer sterilen Impföse wird eine kleine Menge der Bakterienreinkultur neben den Tropfen physiologischer Lösung flächig aufgetragen und anschließend mit der Flüssigkeit vermischt. Das Material wird als dünner Ausstrich an der Luft getrocknet und anschließend hitzefixiert. Dazu wird der Objektträger mit dem getrockneten Material mittels einer speziellen Haltevorrichtung dreimal langsam durch den Flammenkegel eines Bunsenbrenners gezogen. Das hitzefixierte Präparat wird in ein mit Methylenblau-Lösung nach

LÖFFLER gefülltes Gefäß getaucht und verbleibt in diesem ca. eine Minute. Im Anschluss wird das Präparat mit Leitungswasser gespült und danach luftgetrocknet. Mit der Ölimmersions-Mikroskopie (Olympus® BX60M System-Mikroskop) kann das fertige Präparat bei 1000facher Vergrößerung nach Größe und Form der Bakterien beurteilt werden. Anschließend erfolgt die Digitalfotografie der mikroskopischen Bilder mit analySIS® (Soft Imaging System GmbH SIS. Münster).

#### **2.10.4. Identifizierung der Isolate**

Die biochemische Speziesdifferenzierung wurde mit dem kommerziell erhältlichen Identifizierungssystem API STAPH (bio-Merieux) durchgeführt. Dieses ermöglicht die Identifizierung von Bakterien der Gattung Staphylokokken und Mikrokokken. API STAPH besteht aus Teststreifen, die dehydrierte Testsubstrate in eigenen Mikroröhren enthalten. Zu jeder Röhre wird ein bestimmtes API STAPH Medium hinzugefügt, welches mit der zu identifizierenden Bakterienkolonie beimpft wurde. Der Teststreifen wird anschließend für 18-24 h bei 35-37°C inkubiert. Nach dieser Zeit kann der Teststreifen ausgewertet werden. Der Packung des Identifizierungssystem API STAPH ist ein Farbtabelle beigelegt, diese erleichtert die Identifizierung der zu untersuchenden Bakterienkolonie. Die erfolgte Identifizierung basiert auf der Klassifikation nach Kloos und Schleifer. [90]

### **2.11. Voruntersuchung zu Filmabrissen**

#### **2.11.1. Eignung des Filmabrisses für die Osmiumtetroxid-Färbung nach Übertragen der Bakterien auf die Agarplatte**

Das Protokoll 1 für die Hauptuntersuchung ist auf der Grundlage von im Vorfeld durchgeführten *tesa*®-Filmabriss-Untersuchungen erstellt worden.

An einer Testperson wurde überprüft, ob der *tesa*®-Filmabriss mit den anhaftenden Corneozyten nach dem Aufbringen auf die Agarplatte noch für die Osmiumtetroxid-Färbung verwendet werden kann. Zu diesem Zweck wird im ersten Teil des Versuchs ein 3 cm langer *tesa*®-Filmstreifen auf die Innenseite des rechten Unterarms der Testperson geklebt (vgl. 2.1.). Der Filmstreifen verbleibt 20 Minuten auf der Haut. Der mit Osmiumtetroxid zu färbende Abschnitt des *tesa*®-Filmstreifens, 1,5 x 1,5 cm<sup>2</sup>, wird mittels einer Schablone farblich markiert.

Nach 20 Minuten wird der Filmabriss mittels Pinzetten ruckartig von der Haut entfernt und auf einen für die Osmiumtetroxid-Färbung geeigneten Metallring geklebt. Die Färbung des Filmabrisses wird mit 200 µl einer 0,1%igen Osmiumtetroxidlösung ( $\text{OsO}_4$ ) vorgenommen. Im Anschluss an die Färbung wird der Filmabriss 3 h unter Abzug getrocknet und danach mit destilliertem Wasser gespült.

Im zweiten Teil des Versuches wird erneut ein 3 cm langer *tesa*®-Filmstreifen auf die Innenseite des linken Unterarms der Testperson geklebt. Nach 20 Minuten wird der *tesa*®-Filmstreifen aber nicht gleich mit Osmiumtetroxid gefärbt, sondern erst auf die Agarplatte aufgebracht, wieder heruntergenommen und im Anschluss daran mit Osmiumtetroxid gefärbt.

### **2.11.2. Eignung des Filmabrisses für die UV/VIS-Spektroskopische Messung nach Übertragung der Bakterien auf den Nähragar**

Überprüft wurde, ob die Extinktionswerte der *tesa*®-Filmabrissse vor dem Auftragen auf die Agarplatte und im Vergleich dazu nach dem Auftragen auf das Nährmedium verschieden ausfallen. Zu diesem Zweck wurden von einem Probanden zehn *tesa*®-Filmabrissse mittels der *tesa*®-Film-Abrissmethode von einem Bereich der Hautinnenseite des rechten Unterarms erhalten und die auf dem Filmabriss haftende Menge der Corneozyten bei 430 nm spektroskopisch bestimmt. Anschließend wurden die gemessenen Abrisse auf den Nähragar übertragen, nach 30 Sekunden entfernt und erneut bei 430 nm spektroskopisch vermessen.

## **2.12. Studiendesign für bakterielle Untersuchungen**

### **2.12.1. Vorstellung des Probandenkollektivs für die Hauptuntersuchung**

Das Probandenkollektiv setzte sich aus neun freiwilligen männlichen Probanden kaukasischer Abstammung im Alter zwischen 25 und 35 Jahren zusammen. Alle Probanden befanden sich im guten Gesundheitszustand, keiner litt an einer Hauterkrankung, an hormonellen Dysregulationen oder Adipositas. Der Bodymassindex lag im Normalbereich.

Untersuchungen zeigten, dass Männer eine größere Anzahl von Haut-Mikroorganismen beherbergen als Frauen. Des Weiteren weist das männliche Geschlecht eine größere Artenvielfalt bezüglich der Mikroorganismen auf. [91] Aus diesen Gründen wurden männliche Probanden in das Versuchskollektiv aufgenommen.

Am Versuchstag wurde der rechte Arm der Probanden im Rahmen der morgendlichen Dusche mittels einer herkömmlichen Seifenlösung individuell gereinigt, andere kosmetischen Produkte kamen nicht zum Einsatz. Diese Vorgehensweise soll sich an den Gepflogenheiten des Alltags orientieren. Nach Ankunft des Probanden folgte ein Akklimatisierungszeitraum von ca. 15 Minuten, in dem er sich an die Raumbedingungen des Untersuchungsortes anpassen konnte. Jeder Proband wurde über die Fragestellung und Zielsetzung des Versuchsprotokolls sowie über mögliche, unerwünschte Hautreaktionen ausführlich unterrichtet. Jeder Proband unterzeichnete vor Beginn der Studie eine Einverständniserklärung.

### **2.12.2. Versuchsdurchführung**

Ein Großteil der Versuche wurde zwischen Juli und November 2003 im Bereich für Experimentelle und Angewandte Physiologie der Haut an der Hautklinik der Charité - Universitätsmedizin Berlin und im Institut der Biotechnologie, Fachbereich Mikrobiologie und Genetik der Technischen Universität Berlin durchgeführt. Weitere Versuche schlossen sich im Frühjahr 2004 an. Für die Versuchsdurchführung wurden zwei Protokolle verwendet. Das Studienprotokoll für die Versuchsdurchführung am Probanden wurde vor Studienbeginn der Ethikkommission vorgelegt und von ihr akzeptiert.

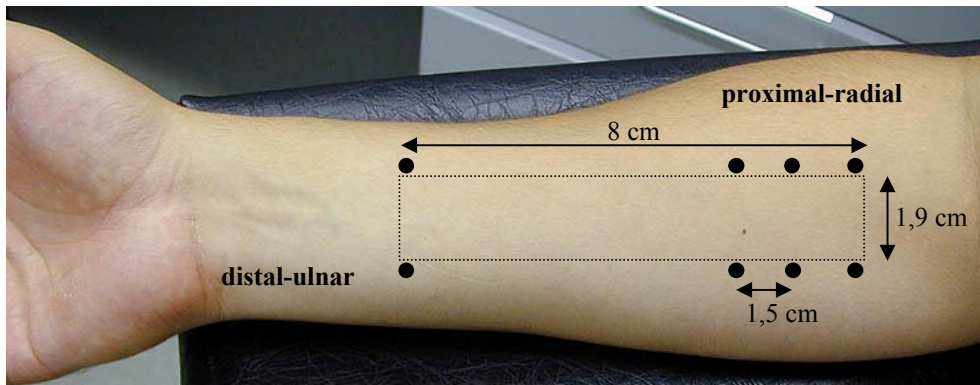
### **2.12.3. Protokolle**

#### **1. Protokoll:**

Die folgenden Untersuchungen wurden im Bereich Hautphysiologie der Hautklinik der Charité - Universitätsmedizin Berlin durchgeführt.

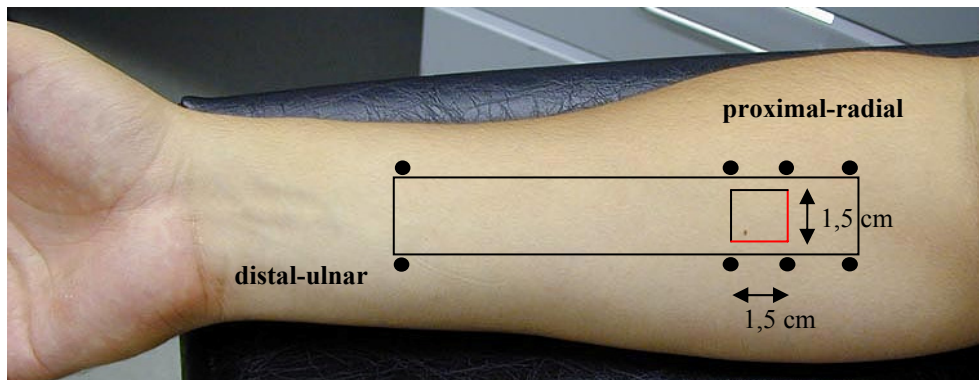
Die Versuche wurden bei jedem Probanden auf der Innenseite des rechten Unterarms vorgenommen. Die Durchführung dauerte pro Proband ca. 4 Stunden. Die Versuche erfolgten immer unter denselben Raumbedingungen.

1. Fotografie des rechten Unterarms
2. Markierung des zu untersuchenden Hautareals, siehe nachfolgende Skizze in Abb. 2.11



**Abb. 2.11:** Innenseite des rechten Unterarms, schwarz gekennzeichnete Umrisspunkte zur Orientierung für das Aufbringen des *tesa*®-Filmstreifens

3. Auftragen des ersten *tesa*®-Filmstreifens, 20 Minuten Verweilzeit auf der Haut
4. Markierung des Testareals auf dem ersten *tesa*®-Filmstreifen (vgl. 2.2.), siehe Skizze in Abb. 2.12



**Abb. 2.12:** Innenseite des rechten Unterarms, Testareal schwarz-rot markiert

5. Fotografie des Hautareals zusammen mit *tesa*®-Filmstreifen
6. Teilung des 1. Filmabrisses:
  - a. Übertragung der Bakterien aus dem Testareal auf Agarplatte (vgl. 2.3.)
  - b. Osmiumtetroxid-Färbung des mit dem Testareal versehenen Filmabriss-Abschnittes (vgl. 2.4.)
  - c. Spektroskopische Messung des unmarkierten Filmabriss-Abschnittes (vgl. 2.6.)



7. Durchführung von 14 Filmabrissen im gleichen zuvor markierten Hautbereich, jeweils Teilung der Filmabrisse:
  - a. Übertragung der Bakterien aus dem Testareal auf Agarplatte
  - b. Spektroskopische Messung der unmarkierten Filmabriss-Abschnitte
8. Herstellung des Cyanacrylat-Abrisses nach dem 15. Filmabriss
9. Übertragung der Bakterien vom Cyanacrylat-Abriss auf Agarplatte

## **2. Protokoll**

Die Durchführung der Versuche fand sowohl in den Laboratorien des Biotechnologischen Instituts, Fachbereich Mikrobiologie und Genetik der TU Berlin, als auch im Bereich Hautphysiologie der Hautklinik der Charité - Universitätsmedizin Berlin statt.

1. Inkubation der beimpften Agarplatten (vgl. Punkt 10, Protokoll 1) für 48 h bei 30°C im Institut der Biotechnologie, FB Mikrobiologie und Genetik der TU Berlin
2. Auszählen der auf dem Nähragar gewachsenen Bakterienkolonien in dem zu untersuchenden Testareal
3. Einteilung der gezählten Bakterienkolonien nach morphologischen Kriterien und Farben
4. Digitalfotografie der im Testareal gewachsenen Bakterienkolonien (vgl. 2.9.)
5. Bearbeitung der Digitalfotos und Kombination dieser mit den erstellten Follikelkarten (vgl. 2.9.)
6. Auswahl der follikelbezogenen Bakterienkolonien und deren Isolierung mittels des fraktionierten Ausstreichens
7. Bebrütung der Verdünnungsreihe auf dem Nähragar bei 30°C für 48 h
8. nochmals Ausstreichen der entstandenen Einzelkolonien auf einer Agarplatte und Inkubation der Platten bei 30°C für 48 h

9. biochemische Differenzierung der follikotropen Bakterien:
  - Katalase-Test
  - Gram-Verhalten
  - Methylenblau-Färbung
10. Ölimmersions-Mikroskopie der angefertigten Präparate
11. Digitalfotografie der Methylenblau-gefärbten Präparate
12. Anzucht der zu identifizierenden Isolate bei 30°C für 48 h
13. Identifizierung der follikotropen Bakterienkolonien mittels Identifizierungssystem  
API STAPH
14. Auswahl der mittels des Cyanacrylat-Abrisses gewonnenen Bakterienkolonien  
und deren Isolierung mittels des fraktionierten Ausstrichs
15. Bebrütung der Verdünnungsreihe auf dem Nähragar bei 30°C für 48 h
16. nochmals Ausstreichen der entstandenen Einzelkolonien auf Standard X Agarplatte  
und Inkubation der Platten bei 30°C für 48 h
17. biochemische Differenzierung der Bakterien des Cyanacrylat-Abrisses:
  - Katalase-Test
  - Gram-Verhalten
  - Methylenblau-Färbung
18. Ölimmersions-Mikroskopie der angefertigten Präparate
19. Digitalfotografie der Methylenblau-gefärbten Präparate