

Aus der Klinik und Poliklinik für Dermatologie und Allergologie
der Ludwig-Maximilians-Universität München
Direktor: Prof. Dr. med. Dr. h.c. G. Plewig

In-vivo-Porphyrinproduktion von *Propionibacterium acnes* unter systemischer Aknetherapie
mit Isotretinoin und Minozyklin

Dissertation
zum Erwerb des Doktorgrades der Medizin
an der Medizinischen Fakultät der
Ludwig-Maximilians-Universität zu München

vorgelegt von
Kathrin Merk
aus Garmisch-Partenkirchen
2004

Mit Genehmigung der Medizinischen Fakultät
der Universität München

Berichterstatter: Prof. Dr. med. Dr. med. h.c. G. Plewig

Mitberichterstatter: Prof. Dr. W. Stolz
Prof. Dr. Dr. K.-S. Boos

Mitbetreuung durch
promovierte Mitarbeiter: PD Dr. med. Martin Schaller
Dr. med. Claudia Borelli

Dekan: Prof. Dr. med. Dr. h.c. K. Peter

Tag der mündlichen Prüfung: 25.11.2004

INHALTSVERZEICHNIS

1. Einleitung
 - 1.1 *Propionibacterium acnes*
 - 1.2 Porphyrine
 - 1.2.1 Nomenklatur
 - 1.2.2 Biosynthese
 - 1.2.3 Fluoreszenzeigenschaften der Porphyrine
 - 1.2.4 Nachweisverfahren
 - 1.2.4.1 Chromatographische Porphyrinauftrennung mittels HPLC
 - 1.3 Porphyrinproduktion von *Propionibacterium acnes*
 - 1.4 Systemische Therapie der Akne
 - 1.4.1 Antibiotika
 - 1.4.2 Isotretinoin
 - 1.4.2.1 Wirkungsweise
 - 1.5 Zielsetzung
2. Material und Methoden
 - 2.1 Materialien
 - 2.1.1 Patientengut
 - 2.1.2 Kulturmedien und Kulturbedingungen
 - 2.1.3 Chromatographische Auftrennung der Porphyrine
 - 2.2 Methoden
 - 2.2.1 Extraktion und Wiegen der Komedonen
 - 2.2.2 Anzuchtung
 - 2.2.3 Porphyrinextraktion
 - 2.2.4 Festphasensäulenkonditionierung
 - 2.2.5 Gradientensysteme
 - 2.2.6 Datenverarbeitung
3. Ergebnisse
 - 3.1 *In-vivo*- Porphyrinproduktion von *Propionibacterium acnes*
 - 3.2 Porphyrinproduktion von *Propionibacterium acnes* nach 7 und 14 tägiger Bebrütung

4. Diskussion
5. Zusammenfassung
6. Anhang
7. Literaturverzeichnis
8. Danksagung
9. Lebenslauf

1. Einleitung

Akne ist eine Erkrankung der Talgdrüsenfollikel und betrifft in mehr oder weniger ausgeprägter Form 80 % der Jugendlichen im Alter von 12 - 25 Jahren ¹⁶⁶ sowie 3 - 8 % der über 25 -Jährigen ¹⁵¹.

In den letzten Jahrzehnten haben sich die therapeutischen Möglichkeiten sehr verbessert, vor allem durch die Einführung der 13-cis-Retinsäure als hochwirksames systemisches Medikament. Besonders schwere Verläufe der Akne, insbesondere die Acne conglobata, lassen sich damit günstig und meist auch nachhaltig beeinflussen.

Trotz der Fülle an Literatur, die zum Thema Akne erhältlich ist, besteht weiterhin großer Bedarf an der Klärung der pathophysiologischen Vorgänge, die zur Entstehung dieser Erkrankung führen. Zum gegenwärtigen Zeitpunkt gelten eine Androgen-induzierte übermäßige Sebumproduktion, abnormale Keratinisierung, die bakterielle Besiedlung durch *Propionibacterium acnes* (*P. acnes*) sowie genetische Faktoren als pathogenetische Ursachen der Akne ¹⁵¹. Bei chronologischer Durchsicht der Literatur zu diesem Thema stößt man auf viele Widersprüche, die vor allem die Rolle von *P. acnes* bei der Entstehung von Akne-effloreszenzen betreffen. Bisher konnte ein eindeutiger kausaler Zusammenhang weder bestätigt noch negiert werden. Zahlreiche Fragen zur Rolle dieser Mikroorganismen bei der Pathogenese der Akne sind noch nicht geklärt. Allein die Tatsache, daß antimikrobielle Substanzen wie zum Beispiel Antibiotika oder Isotretinoin, welche indirekt gegen *P. acnes* wirksam sind, bei der Aknetherapie erfolgreich eingesetzt werden, spricht für die Rolle von *P. acnes* als einen pathogenetischen Faktor in der Entstehung der Akne. Dieses Bakterium besitzt eine für diese Arbeit sehr wichtige und interessante Stoffwechseleigenschaft, nämlich die Produktion von Porphyrinen.

Porphyryne sind Verbindungen, die im Woodlicht eine charakteristische rötliche Fluoreszenz aufweisen. Diese Verbindungen sind endogene Photosensibilisatoren, die die absorbierte Energie an das umgebende Gewebe abgeben und so zur Zerstörung von Zellen führen können. Die Produktion von Porphyrinen durch *P. acnes* wurde 1967 von Cornelius und Ludwig *in vitro* nachgewiesen ²¹ und auch in mehreren nachfolgenden Studien bestätigt ^{104, 107}, nachdem bereits vorher die orangefarbene Fluoreszenz von Follikeln im Bereich des Gesichtes durch Berch und Carrie Porphyrinen zugeschrieben werden konnte ⁶. Hierbei ergaben sich sehr unterschiedliche, zum Teil widersprüchliche Ergebnisse in der Verteilung der gefundenen Porphyrinklassen und Porphyrinisomere. Bei Cornelius und Ludwig ²¹ und Lee et al. ⁹⁵

stellte Koproporphyrin III die größte Fraktion, während Protoporphyrin nur in geringen Mengen und polare Porphyrine wie Uroporphyrin oder Heptaporphyrin nur unter speziellen Wachstumsbedingungen (Zusatz von Aminolävulinsäure) nachweisbar waren. Im Gegensatz dazu maß Romiti et al. ¹⁶² als größte Porphyrinfraktion Protoporphyrin, gefolgt von Koproporphyrin III, vereinzelt waren polare Porphyrine nachweisbar. Zusätzlich identifizierte diese Arbeitsgruppe biochemisch Subtypen von *P. acnes* mittels Bunter Reihe und konnte somit eine spezifische Verteilung der Porphyrinisomere in Abhängigkeit des jeweiligen Subtyps aufzeigen. An dieser Stelle sei noch einmal darauf hingewiesen, daß es sich bei diesen Studien meist um *In-vitro*-Versuche handelte, es wurden also *P. acnes* - Kulturen gezüchtet, die daraufhin auf ihren Porphyringehalt untersucht wurden.

Unser Ziel war hingegen der Nachweis einer *In-vivo* - Porphyrinproduktion von *P. acnes*. Desweiteren wollten wir die Verteilung der Porphyrinklassen und Porphyrinisomere *in vivo* ermitteln und feststellen, inwieweit dies durch die systemisch applizierten Aknetherapeutika Isotretinoin und Antibiotika beeinflussbar ist.

Die Rolle der Porphyrine als Entzündungsmediatoren bei *Acne vulgaris* ist bisher noch wenig untersucht worden. Der erfolgreiche Einsatz neuerer Therapieformen der *Acne vulgaris* wie die Lichttherapie mittels Blaulicht im Absorptionsspektrum der Porphyrine, also bei 400 - 420 nm, deuten jedoch darauf hin, daß Porphyrine eine Rolle bei der Genese entzündlicher Akneeffloreszenzen spielen.

1.1 *Propionibacterium acnes*

Das zu der Familie der *Propionibacteriaceae* gehörende *Propionibacterium acnes* (*P. acnes*) ist ein gram-positives, anaerobes beziehungsweise mikroaerophiles pleomorphes Stäbchen. Diese Bakterien sind etwa 0,5 - 1,0 µm lang und 0,3 - 0,5 µm breit, bilden keine Sporen und sind unbeweglich. Sie sind meist von diphteroider Form und Lagerung, wobei auch fädige Elemente mit teils rudimentär ausgebildeten Verzweigungen beobachtet werden können.

1863 beschrieb Unna erstmalig ein koryneformes Bakterium, welches er in histologischen Präparaten aus Komedonen und Pusteln von Aknepatienten entdeckte und bezeichnete es als Aknebacillus. In den folgenden Jahren wurde dieser Keim mit verschiedenen Krankheiten in Zusammenhang gebracht, unter anderen auch mit der Alopecia areata durch Sabouraud. Diesem gelang 1897 erstmals auch die Anzüchtung des Bakteriums in einer Kultur. Bis zu diesem Zeitpunkt galt es als sicher, daß *P. acnes* die Ursache der Akneeffloreszenzen ist. Langsam erst gelangte man zu der Erkenntnis, daß auch andere Mikroorganismen wie Staphylokokken bei der Bildung von beispielsweise Pusteln eine Rolle spielen.

1923 erfolgte durch Bergey et al. aufgrund der morphologischen Ähnlichkeit des Aknebacillus mit der Gruppe der Korynebakterien eine Umbenennung in *Corynebakterium acnes*. Durch Douglas und Gunter erfolgte 1946 aufgrund der Fähigkeit, Milchsäure zu Propionsäure zu fermentieren, die bis heute gültige Namensgebung als *Propionibacterium acnes*. Desweiteren gelang damals auch der Nachweis, daß *P. acnes* als Teil der Normalflora der Haut auch bei gesunden Menschen zu finden ist ¹⁴¹.

Johnson und Cummins beschrieben drei Spezies, *P. acnes*, *P. avidum* und *P. granulosum*. Später wurden weitere zwei Spezies als zur Standardflora der Haut gehörend beschrieben, *P. innocuum* und *P. propionicum*. In seltenen Fällen läßt sich eine sechste Spezies von der Haut isolieren, *P. lymphophilum*, wobei nicht sicher ist, inwieweit dieses Bakterium zur Normalflora der Haut gehört ²³.

Die Spezies lassen sich aufgrund unterschiedlicher Reaktionen in Sero-, Bio-, und Phagentypen unterscheiden und können wiederum in Untergruppen unterteilt werden. Durch Bakteriophagentypisierung, das Vorhandensein von Galaktose als Zellwandzucker sowie die Durchführung von Agglutinationstests lassen sich zwei Serotypen I und II des *P. acnes* unterscheiden ¹⁶¹.

Die Anzüchtung dieser Bakterien gelingt gut bei 35 - 37 ° C unter anaeroben Bedingungen und einer Inkubation von durchschnittlich 7 Tagen. Auf Agarnährböden sind Propionibakterien als kleine, runde, je nach Spezies dunkelrot über violett bis grau-weiße,

glänzende und kugelig gewölbt Kolonien zu identifizieren. Zudem kann auf bluthaltigen Nährböden eine Beta-Hämolyse zu erkennen sein ²³.

Zur Hautflora gehören im wesentlichen aerobe Kokken der Familie *Micrococcaceae*, meist *Staphylococcus epidermidis*, *P. acnes*, als diphteroides Stäbchen sowie der Pilz *Pityrosporum ovale*. Im Talgdrüsenfollikel, welcher bei der Pathophysiologie der Akne eine wichtige Rolle spielt, nehmen diese einzelnen Komponenten eine typische topographische Verteilung ein (Abb.1). So liegen die lipophilen *Pityrosporum* sehr oberflächlich in der Nähe der Follikelmündungen, die aeroben Mikrokokken sind in der Mitte des Akroinfundibulums angesiedelt, wohingegen sich die anaerob wachsenden Propionibakterien in der Tiefe des Infrainfundibulums befinden ⁷⁴. Die dortigen Wachstumsbedingungen, die niedrige Sauerstoffspannung und ausreichend Nährmaterial in Form des Sebums, genauer der Triglyzeridfraktion des Talgs, sind ein idealer Nährboden für das Wachstum von *P. acnes*.

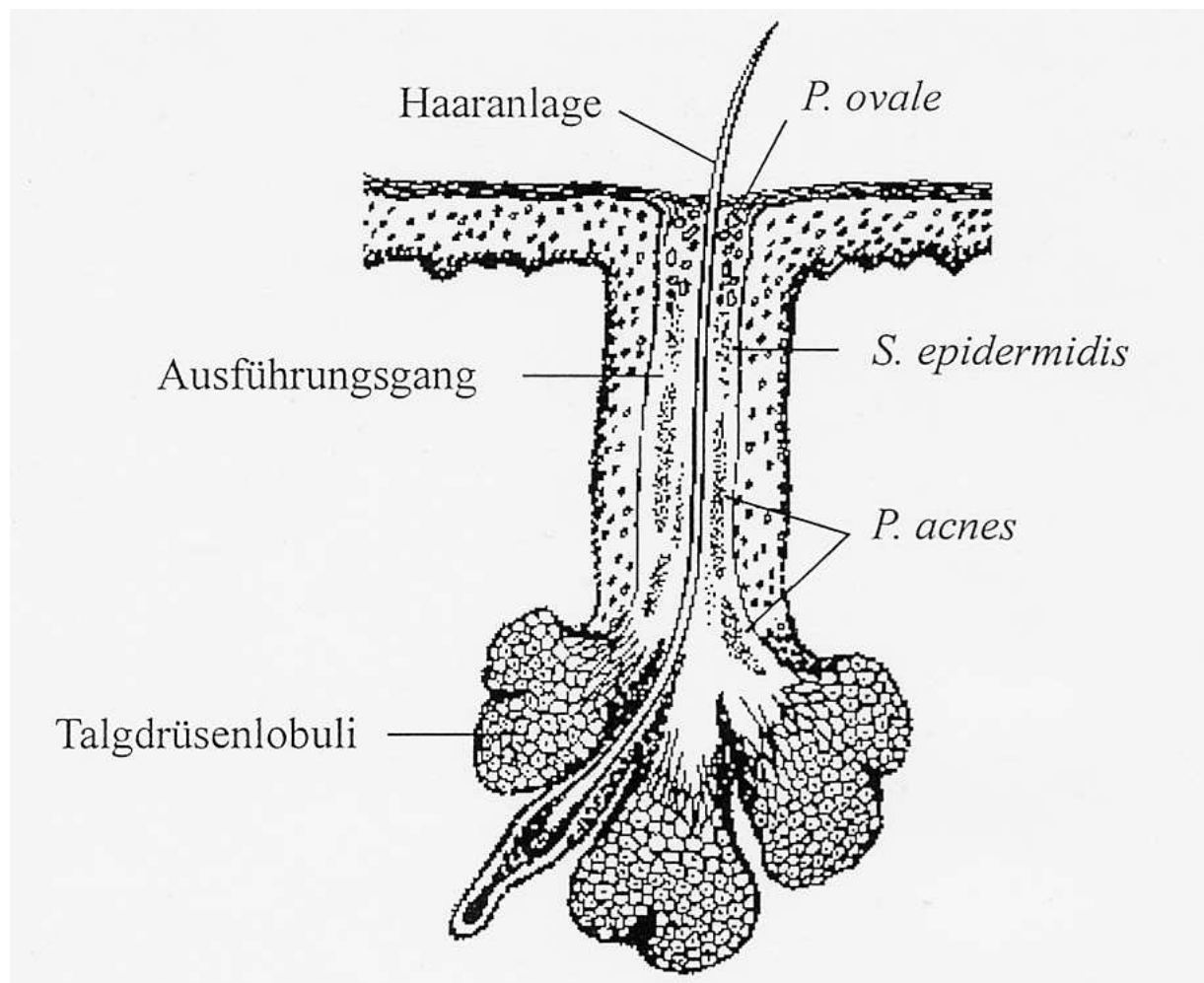


Abbildung 1: Talgdrüsenfollikel mit Topographie der Standortflora (Mit freundlicher Genehmigung aus ¹⁶⁴)

Die Benennung von *P. acnes* erfolgte aufgrund seiner Erstisolierung von der Haut eines Aknepatienten. Die Namensgebung ist insofern irreführend, als dieses Bakterium auch auf der Haut von gesunden Menschen in ebensolcher Anzahl existiert ¹⁵¹.

Im allgemeinen ist *P. acnes* kein pathogenes Bakterium. Sehr selten werden systemische Infektionen bei immunkomprimierten Patienten durch *P. acnes* beschrieben, wie Endokarditis. Aus der Tatsache, daß in vielen bakteriologischen Proben auch *P. acnes* nachgewiesen werden konnte, entsprang die Theorie, daß dieser Keim bei schweren nekrotisierenden Verläufen der Akne eine entscheidende Rolle spielt. Dies läßt sich allerdings allein durch die Zugehörigkeit zur Standortflora der Haut, nicht nur bei Aknepatienten sondern auch bei hautgesunden Menschen, erklären. Die Besiedelung der Haut bei Aknepatienten nimmt einen typischen Verlauf. Nach relativ niedrigen Werten in der Kindheit steigt sie in der Pubertät, mit Zunahme der Sebumproduktion, stark an und bleibt dann ziemlich konstant im weiteren Verlauf. Bei Menschen, die nicht an Akne leiden, ist die Besiedelungsdichte durch *P. acnes* niedriger ²⁵. Da allerdings die meisten Menschen in ihrem Leben eine Akne durchleiden, wenn auch in sehr unterschiedlichem Umfang, und es keine Korrelation der Dichte der Besiedelung durch *P. acnes* mit der Schwere der Akneerkrankung gibt, sind diese Zahlen wenig aussagekräftig.

Die pathogenetische Rolle von *P. acnes* besteht somit weniger in seiner direkten Virulenz. Vielmehr trägt es zur Komedogenese und vor allem zur Ruptur der Komedonen mit konsekutiver entzündlicher Reaktion in der Umgebung bei. Der Bildung eines Komedo geht eine massive Anhäufung von *P. acnes* im Follikelkanal voraus. Das Vorhandensein einer Lipase befähigt *P. acnes* zur hydrolytischen Abspaltung von freien Fettsäuren aus Triglyzeriden ¹⁵⁴. Obwohl die Rolle der freien Fettsäuren bei der Pathogenese der Akne noch mit vielen Unklarheiten behaftet ist, steht dennoch fest, daß diese Substanzen in hohem Umfang komedogen sind. Ebenso ist mittlerweile gesichert, daß *P. acnes* eine entscheidende Rolle bei der Ruptur der Komedonen spielt, unter anderem durch die Bildung von freien Fettsäuren, aber auch durch die Produktion von Enzymen wie Protease, Hyaluronidase, Lezithinase, Neuramidase, Phosphatase, Phospholipase, Proteinase und Ribonuklease, die, wie auch die freien Fettsäuren, das Follikelepithel angreifen und zur Extrusion des Komedoneninhalts in die Umgebung führen können ¹⁵². Außer freien Fettsäuren tragen aber auch andere Substanzen zur entzündlichen Reaktion bei Akne bei. So kann *P. acnes* in monozytären Zellen signifikante Konzentrationen an Interleukin (IL)-1 α , IL-8 und Tumornekrosefaktor- α induzieren ⁹⁸. Weiterhin bedarf die Rolle der von *P. acnes* exprimierten Antigene und die Bildung von dagegen gerichteten Antikörpern noch der

Klärung. Knop und Mitarbeiter konnten in Komedonenextrakten IgG und Albumin messen und durch Immunfluoreszenzmikroskopie in histologischen Präparaten von Komedonen IgG-Antikörper auf stäbchenförmigen Bakterien, die als *P. acnes* oder *P. granulosum* identifiziert wurden, nachweisen⁸⁸. Weder die Antikörpertiter noch die Menge an gemessenen Albumin von Patienten mit verschiedenen Formen der Akne (*Acne comedonica*, *Acne papulopustulosa*, *Acne conglobata*) und von Patienten unter Tetracyklintherapie wiesen Unterschiede auf. Till et al. zeigten, daß die Antikörpertiter nur bei Patienten mit einer höhergradigen Akne erhöht sind, bei gesunden Personen und Patienten mit milder Form der Akne jedoch im selben niedrigen Bereich liegen¹⁸¹.

Immunologische Prozesse finden demnach also auch bei der Akne statt, wie diese allerdings pathogenetisch zu werten sind, ist bisher noch unklar.

1.2 Porphyrine

Porphyrine sind Verbindungen, die ubiquitär im Pflanzen- und Tierreich vorkommen. Sie sind die farbgebenden Bestandteile der Hämoproteine, zu denen unter anderem Hämoglobin, Myoglobin, Cytochrome, Katalase und Peroxidase gehören.

Porphyrine sind zyklische Moleküle, die aus vier Pyrrolringen bestehen. Diese sind über Methinbrücken zu einem Tetrapyrrolosystem verbunden und bilden ein konjugiertes Ringsystem mit 11 Doppelbindungen, welches als Porphin bezeichnet wird (Abb. 2). Durch unterschiedliche Substitution an den acht außenstehenden Kohlenstoffatomen leiten sich die verschiedenen Porphyrine ab⁶³.

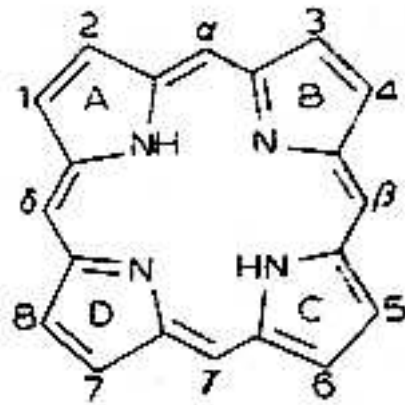


Abbildung 2: Porphin, Grundstruktur der Porphyrine

Die chemische Struktur der Porphyrine wurde erstmals 1912 durch Küster beschrieben. Zu dieser Zeit ging man jedoch noch davon aus, daß eine solche zyklische Struktur instabil wäre und es dauerte noch weitere 17 Jahre, bis 1929 Fischer endgültig mit der vollständigen Synthese von Protohäm der Nachweis der Tetrapyrrolstruktur der Porphyrine gelang¹⁷¹.

Porphyrine sind in der Lage, mit Metallionen stabile Komplexe zu bilden, welche als Metalloporphyrine bezeichnet werden. Während dies im Pflanzenreich meistens Magnesiumionen sind (als Chlorophyll), kommen bei Mensch und Tier hauptsächlich Eisenionen (als Häm) als Bindungspartner vor. Hierbei bindet das Metallion an die inneren Stickstoffatome der vier Pyrrolringe¹³⁹.

1.2.1 Nomenklatur

Die vier Pyrrolringe werden mit A, B, C und D bezeichnet (Abb. 2). Man unterteilt die Porphyrine nach der chemischen Natur ihrer Substituenten in Ätioporphyrine (4 Methyl- und 4 Ethylgruppen als Substituenten), Mesoporphyrine (4 Methyl-, 2 Propionsäure- und 2 Ethylgruppen als Substituenten), Uroporphyrine (4 Propionsäuregruppen und 4 Essigsäuregruppen als Substituenten), Koproporphyrine (4 Methyl- und 4 Propionsäuregruppen als Substituenten) und Protoporphyrine (4 Methyl- 2 Propionsäure- und 2 Vinylgruppen als Substituenten).

Dabei sind die Protoporphyrine am weitesten verbreitet. Von den 15 Isomeren des Protoporphyrin kommt in der Natur nur Protoporphyrin IX vor, unter anderem im Hämoglobin, Myoglobin und in den meisten Cytochromen⁶³.

1.2.2 Biosynthese

Beim Menschen werden die Porphyrine in praktisch allen Zellen in einer Sequenz von acht enzymatischen Schritten aus Glycin und Succinyl-CoA synthetisiert (Abb. 3).

Intramitochondrial reagiert Succinyl-CoA, ein Zwischenprodukt des Zitratzyklus, mit Glycin, einer Aminosäure und bildet unter Abspaltung von CoA α -Amino- β -ketoacid, ein sehr labiles Zwischenprodukt, welches spontan zu δ -Aminolävulinat decarboxyliert. Diese Reaktion wird durch das Enzym δ -Aminolävulinat-synthetase katalysiert und ist der geschwindigkeitsbestimmende Schritt der Porphyrinbiosynthese. Die δ -Aminolävulinat-synthetase unterliegt einer Rückkopplungshemmung durch das Häm, welches das Endprodukt dieser Biosynthesekette darstellt. Desweiteren ist dieses Enzym Pyridoxalphosphat-abhängig, was die Verminderung der Hämbiosynthese unter Vitamin B₆-Mangel erklärt.

Nach Übertritt in das Zytosol kondensieren unter Katalyse der Porphobilinogensynthase zwei Moleküle δ -Aminolävulinat zu Porphobilinogen als Pyrrolvorstufe der Porphyrine.

Vier Porphobilinogenmoleküle kondensieren unter dem Einfluß der Porphobilinogen-Desaminase unter Abspaltung von Ammoniak und Bildung des Zwischenproduktes

Hydroxymethylbilan zum Tetrapyrrol. Durch die katalytische Aktivität der Porphobilinogen-Isomerase entsteht Uroporphyrinogen III sowie in geringen Mengen auch Uroporphyrinogen I.

Unter dem Einfluß der zytosolischen Uroporphyrinogen-Decarboxylase werden alle vier Azetatseitenketten im Uroporphyrinogen III zu Methylgruppen decarboxyliert.

Das daraus entstandene Koproporphyrinogen III tritt ins Mitochondrium über, wo die Propionatseitenketten der Ringe A und B durch die Wirkung der Koproporphyrinogen-Oxidase dehydriert und decarboxyliert werden, es entsteht Protoporphyrinogen IX.

Die Protoporphyrinogenoxidase dehydriert die Methylenbrücken zwischen den Pyrrolringen und bildet dadurch Protoporphyrin IX, welches die unmittelbare Vorstufe des Häm darstellt.

Im Mitochondrium wird nun unter Einfluß der Ferrochelatase zweiwertiges Eisen in das Protoporphyrin IX eingebaut und es entsteht das Endprodukt, Häm ¹³⁹.

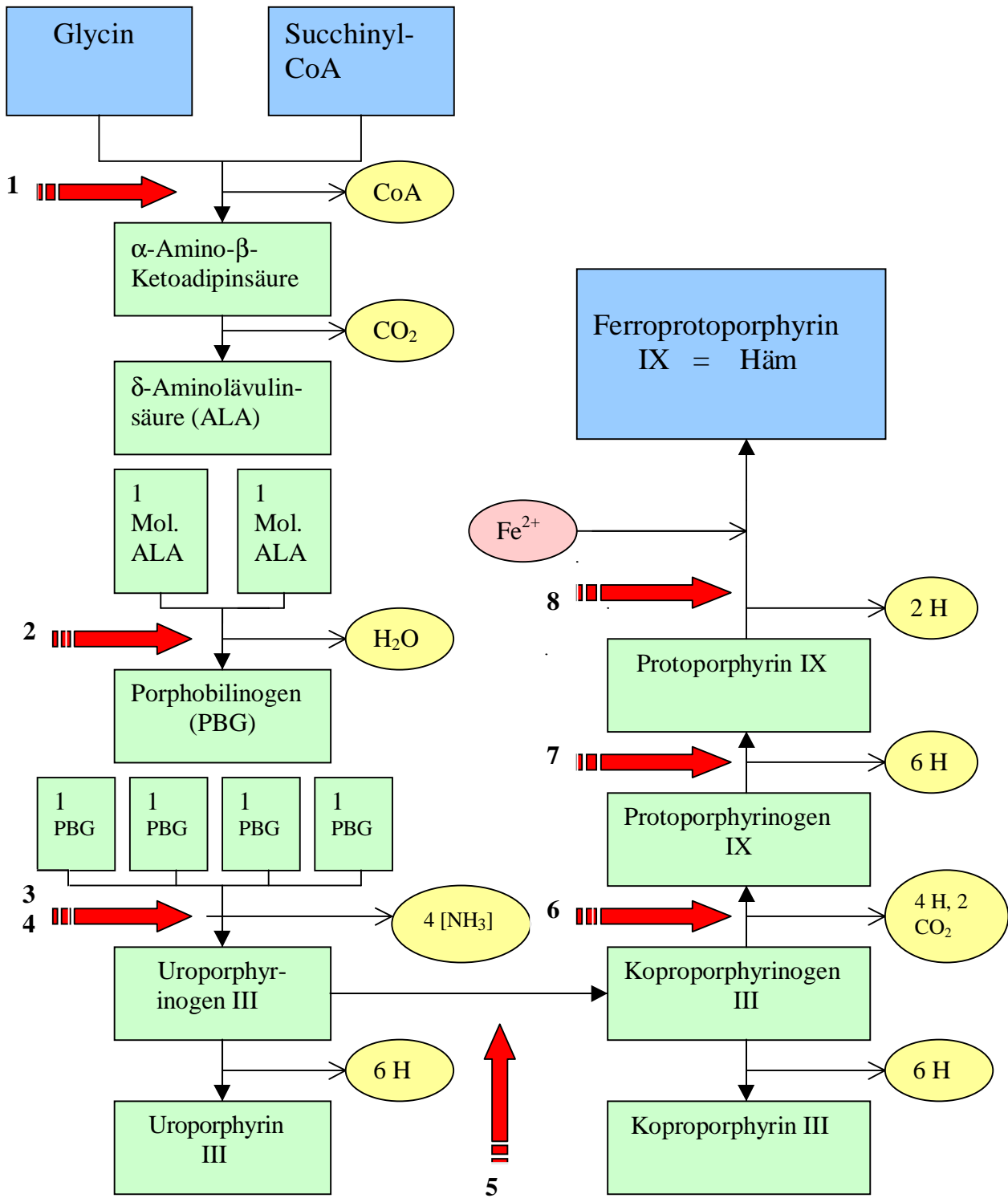


Abb. 3: Porphyrin- und Hämbiosynthese

- Enzyme:
- 1 δ-Aminolävulinsäure-Synthetase
 - 2 δ-Aminolävulinsäure-Dehydratase
 - 3 Porphobilinogen-Desaminase
 - 4 Uroporphyrinogen-Cosynthetase
 - 5 Uroporphyrinogen-Decarboxylase
 - 6 Koproporphyrinogen-Oxidase
 - 7 Protoporphyrinogen-Oxidase
 - 8 Ferrochelatase

1.2.3 Fluoreszenzeigenschaften der Porphyrine

Neben der Fähigkeit, mit Metallionen Komplexe zu bilden, sind im Rahmen dieser Arbeit vor allem die Fluoreszenzeigenschaften der Porphyrine von Interesse. Durch den strukturellen Aufbau der Porphyrine, das konjugierte Ringsystem mit Doppelbindungen, erhalten diese Verbindungen die Fähigkeit, Lichtenergie zu absorbieren. Dabei werden die Elektronen dieses Moleküls durch Absorption von Lichtquanten kurzzeitig auf ein höheres Energieniveau angehoben. Bei der Rückkehr in den Grundzustand wird Wärme frei und es entstehen Sekundärstrahlen, die im Falle der Porphyrine im Bereich des sichtbaren Lichtes liegen, es resultiert eine sicht- und meßbare Fluoreszenz. Charakteristisch sind die Absorptionsspektren der Porphyrine im sichtbaren wie im ultravioletten Bereich, welche je nach chemischer Struktur der Seitenketten variieren. Soret, ein französischer Radiologe, konnte 1883 jedoch eine scharfe Absorptionsbande bei 400 nm für alle Porphyrine nachweisen, welche nach ihm als Soret-Bande benannt ist ¹⁶². Koproporphyrin konnte zudem eine weitere Absorptionsbande bei 625 nm, Protoporphyrin bei 635 nm zugeschrieben werden.

1.2.4 Nachweisverfahren

Die Wasserlöslichkeit der verschiedenen Porphyrine differiert stark, was auch ihre Ausscheidung im Organismus beeinflusst. So werden die polaren Uroporphyrinogene zu einem hohem Prozentsatz im Urin ausgeschieden, wohingegen das apolare Protoporphyrinogen in die Gallenflüssigkeit gelangt und somit in den Faeces erscheint. Koproporphyrinogen als mittelpolares Porphyrin kann sowohl über die Nieren im Urin als auch über die Galle in den Faeces ausgeschieden werden.

Prinzipiell bieten sich zwei Möglichkeiten zur Trennung eines Porphyringemisches in seine Komponenten an. Diese bestehen in der Fraktionierung der Porphyrine als freie Säuren und in der Isolierung als Methylester.

Sowohl Koproporphyrin I und III als auch Protoporphyrin sind in Eisessig-Äthermischungen löslich, aus denen sie mit Salzsäure extrahiert werden können, wohingegen Uroporphyrine in Eisessig-Äthermischungen unlöslich, jedoch in Äthylacetat löslich sind, aus dem sie ebenfalls mit Salzsäure extrahiert werden können ³¹.

Der einfachste Nachweis von Porphyrinen erfolgt mittels Fluoreszenznachweis.

Zur Differenzierung der einzelnen Porphyrinfraktionen wird die Dünnschichtchromatographie oder die Hochdruckflüssigkeitschromatographie (HPLC) eingesetzt. Der Vorteil der HPLC besteht in der Möglichkeit einer Isomerentrennung, beispielsweise in Koproporphyrin I und III, was bei der Dünnschichtchromatographie nicht möglich ist.

1.2.4.1 Chromatographische Porphyrinauftrennung mittels HPLC

Die Chromatographie ist ein Trennverfahren, bei welchem das Probengemisch zwischen zwei Phasen im chromatographischen Bett (Trennsäule oder Ebene) verteilt wird. Eine Hilfsphase ruht (stationäre Phase), die andere Hilfsphase strömt daran im chromatographischen Bett vorbei (mobile Phase). Als stationäre Phase dient ein zur Absorption fähiges oberflächenaktives Material in Form fester Teilchen, behandelte Oberfläche oder flüssigkeitsbelegter Träger. Die mobile Phase besteht entweder aus Gas oder Flüssigkeit.

Voraussetzung für die Flüssigkeitschromatographie ist die Löslichkeit der Probe in einem geeigneten Lösungsmittel. Dies trifft für alle organischen und ionischen anorganischen Substanzen zu.

HPLC ist die Abkürzung für High Performance Liquid Chromatography (= Hochleistungs-Säulen-Flüssig-Chromatographie). Die HPLC ist eine sehr effektive Trenntechnik. Sie liefert eine gute quantitative und qualitative Auftrennung von Stoffgemischen in kurzer Zeit. Dies wird zum einen durch eine stationäre Phase mit sehr kleinen Teilchen, zum anderen durch einen hohen Druck, der beim Durchpressen der mobilen Phase aufgewendet wird, erreicht.

Das zu trennende Gemisch wird mit Hilfe eines geeigneten Lösungsmittels auf die Säule gebracht, die mit der stationären Phase gefüllt ist. Hier findet nun die Trennung statt. An der stationären Phase werden die zu trennenden Komponenten der Probe bei optimalen Bedingungen unterschiedlich lange aufgehalten und verlassen die Säule nach unterschiedlichen Zeiten. Diese einzelnen Probenkomponenten werden vom Detektor registriert, an die Auswerteeinheit weitergegeben und graphisch dargestellt. Die daraus resultierenden Signale bezeichnet man als Peaks, ihre Gesamtheit als Chromatogramm. Aus diesen Peaks lassen sich sowohl qualitative als auch quantitative Informationen über das untersuchte Probengemisch gewinnen. Die Zeit, nach welcher ein Signal auf dem Schreiber erscheint, nennt man Elutionszeit. Sie ist unter standardisierten Bedingungen für jeden Stoff

des Gemisches charakteristisch. Die Fläche jedes Signals ist der Menge des entsprechenden Stoffes proportional ¹²³.

1.3 Porphyrinproduktion von *Propionibacterium acnes*

Sigwald Bommer beschrieb 1926 erstmalig eine ihm damals sehr rätselhafte Erscheinung, eine im Woodlicht orangefarbene Fluoreszenz der Follikelmündung, die vor allem zentrofazial im Bereich der seitlichen Nasenpartien auftritt ¹¹.

Berch und Carrie gelang die Identifizierung der Ursache dieser Fluoreszenz als Porphyrine ⁶, Cornelius und Ludwig konnten 1967 die Quelle dieser Porphyrinproduktion *P. acnes* zuordnen ²¹. Darüberhinaus konnte gezeigt werden, daß die Intensität der Porphyrinfluoreszenz mit der Besiedlungsdichte durch *P. acnes* korreliert ^{108, 111}.

Mittlerweile existieren viele verschiedene Untersuchungen zur Porphyrinproduktion von *P. acnes*, wobei es sich hierbei meist um *In-vitro*- Untersuchungen handelt ^{40, 43}. Dabei stellte sich heraus, daß viele verschiedene Faktoren einen Einfluß auf die *In-vitro*-Porphyrinproduktion von *P. acnes* haben, so zum Beispiel die Dauer der Bebrütung, die Abnahmestellen des Untersuchungsmaterials, die Wahl des Nährmediums, der pH - Wert des Nährbodens und der Zusatz von bestimmten Substanzen ^{41, 80}. Die größte durchschnittliche quantitative Porphyrinmenge wurde bei Wachstum auf festem Nährboden nach 5-tägiger Bebrütung gewonnen, bei Züchtung im flüssigen Medium wurde die beste qualitative Ausbeute einzelner Porphyrinfraktionen erzielt ⁴³. Bei den meisten von ihnen stellte sich Koproporphyrin III als die größte Porphyrinfraktion heraus, gefolgt von Protoporphyrin IX ^{43, 111, 80}.

Vergleichende Untersuchungen an nicht-entzündlicher seborrhoischer Haut und Akneläsionen ergaben bei letzteren zum einen eine höhere Porphyrinproduktion, zum anderen aber auch eine vermehrte Abgabe der Porphyrine in die Umgebung, was eventuell auf eine Stoffwechsel-aktivere Variante von *P. acnes* bei Aknepatienten hinweist ⁴⁰.

Auch die verschiedenen Methoden zur Extraktion der Porphyrine lieferten unterschiedliche Ergebnisse.

1.4 Systemische Aknetherapie

Die Indikationen für eine systemische Aknetherapie sind unter anderem ein nicht zufriedenstellendes Ansprechen auf lokale Therapie, Unverträglichkeiten gegenüber Lokaltherapeutika, schwere Akneformen wie *Acne conglobata* sowie die für die topische Behandlung ungünstige Lokalisation von Akneeffloreszenzen im Nacken oder am Rücken.

Wichtige Medikamente sind dabei Antibiotika, Isotretinoin, Glukokortikoide und Hormone.

1.4.1 Antibiotika

Die Einführung von Breitspektrumantibiotika in die Aknetherapie stellte einen Fortschritt in der Behandlung von entzündlichen Formen der Akne wie *Acne papulopustulosa* dar. Diese Substanzen standen über viele Jahre nur zur systemischen Therapie zur Verfügung. Mittlerweile sind auch eine Vielzahl von topischen Präparaten zur Behandlung entzündlicher Formen der Akne auf dem Markt.

Antibiotika vieler verschiedener Klassen zeigen hohe *In-vitro*-Aktivität gegen *P. acnes*, unter anderem Makrolide, Tetracykline, Sulfonamide, Penicillin und Cephalosporine. Trotzdem sind nur einige von ihnen auch für die Therapie der Akne geeignet, da alle hydrophilen Substanzen nur schwer in Komedonen und Mikrokomedonen mit ihren hohen Lipidkonzentrationen penetrieren können.⁹⁸

Geeignete Antibiotika für die Aknetherapie sind daher vor allem lipophile Substanzen wie Doxycyclin, Minozyklin oder Erythromycin. Vor allem Minozyklin hat hierbei einen großen Stellenwert erreicht, da es im Vergleich zu älteren Tetracyklinen einige Vorteile aufweist. So ist zum Beispiel die Resorptionsrate und damit auch die Bioverfügbarkeit von Minozyklin mit 90 % sehr günstig. Desweiteren erleichtert seine starke Lipophilie die Anreicherung in Talgdrüsen und Komedonen, wodurch vor allem dort ein hoher Wirkspiegel erzielt werden kann^{74, 140}. Bei Minozyklin sind bisher am wenigsten Fälle von resistenten *P. acnes* bekannt¹⁴⁰.

Der Nutzen dieser antimikrobiellen Therapie zeigt sich einerseits in einer Reduktion der Besiedelung durch *P. acnes*, die allerdings nur während der Therapiedauer zu beobachten ist. Etwa zwei Wochen nach Absetzen des Antibiotikums gleicht sich die Bakterienzahl wieder an die Ausgangswerte an, beziehungsweise zeigt einen geringfügigen Anstieg⁹⁸. Tetracykline

wirken bakteriostatisch durch Hemmung der Proteinsynthese von Bakterien, sie reduzieren die Produktion von Lipase durch *P. acnes* und beeinflussen somit die Konzentration von freien Fettsäuren der Haut. Die Hydrolyse von Triglyceriden durch die dabei anfallenden freien Fettsäuren aufgrund der Schädigung des Follikelepithels ist an der Ruptur von Komedonen und konsekutiver entzündlicher Reaktion mitverantwortlich.

Andererseits nehmen Tetrazykline aber auch unabhängig von der direkten antimikrobiellen Wirkung Einfluß auf Entzündungsvorgänge wie sie auch bei der Akne vorliegen. Elewski et al. wiesen eine hemmende Wirkung der Neutrophilen Chemotaxis durch Tetrazykline *in vivo* nach ³⁹. Zudem konnte gezeigt werden, daß Minozyklin Dosis abhängig die T-Zell Proliferation inhibieren kann und somit die Produktion von proinflammatorischen Zytokinen wie Interleukin 2, Interferon γ und Tumornekrosefaktor α reduzieren kann. Aus *In vitro*-Untersuchungen ist bekannt, daß Doxyzyklin und Minozyklin die Expression der Nitroxid-Synthase hemmen können. Nitroxid-Synthase gilt als Schlüsselenzym für die Produktion von Stickoxid, welches eine Rolle als Neurotransmitter, aber auch als Botenstoff im Entzündungsgeschehen spielt ¹⁶⁸.

Ein in zunehmendem Maße auftretendes Problem in der antibiotischen Aknetherapie stellt die Entwicklung von Resistenzen dar. Entgegen der noch vor einigen Jahren verbreiteten Ansicht, daß die Resistenzentwicklung bei der antibiotischen Aknetherapie keine Rolle spielt, wurden bereits 1979 die ersten Berichte von gegenüber Erythromycin oder Clindamycin resistenten *P. acnes* Stämme bekannt. Die Datenlage bezüglich Resistenzentwicklungen bei *P. acnes* ist immer noch sehr unbefriedigend und zum Teil auch widersprüchlich. Neuere Daten sprechen für eine deutliche Zunahme von resistenten *P. acnes* Stämmen. Cooper beschrieb eine Zunahme der Antibiotikaresistenzen von etwa 20% 1978 auf ungefähr 62 % bis 1996. Dabei traten vor allem Resistenzen gegenüber Erythromycin, Klindamycin, Tetrazyklin, Doxyzyklin und Trimethoprim auf, selten dagegen auf Minozyklin ²⁰.

Sicher ist, daß Resistenzen gegenüber Erythromycin und Clindamycin weit häufiger sind als gegenüber Tetrazyklinen ¹⁹. Diese entstehen bei Tetrazyklinen durch ein plasmidkodiertes Transportersystem, welches für einen aktiven Transport von intrazellulären Tetrazyklinmolekülen aus der Zelle hinaus verantwortlich ist ¹²¹.

Durch die vermehrte systemische Anwendung von Isotretinoin und die Kombination von antibiotischen Substanzen mit topischen Benzoylperoxid läßt sich die Resistenzentwicklung verringern.

1.4.2 Isotretinoin

Retinoide stellen eine heterogene Gruppe von sowohl natürlich vorkommenden Vitamin-A-Verbindungen als auch synthetischen Vitamin-A-Derivaten dar. Dabei handelt es sich um lipophile Isoprenoide, bestehend aus einer Polyenkette mit einer zyklischen und einer polaren Endgruppe.

Bei der Suche nach therapeutisch wirksamen und weniger toxischen Vitamin-A-Verbindungen wurden bisher mehr als 2000 verschiedene Retinoide synthetisiert. Davon erlangten vor allem drei praktische Bedeutung durch ihren Einsatz in der systemischen und lokalen Dermatotherapie: Acitretin, Etretinat und Isotretinoin.

Isotretinoin ist ein Stereoisomer der natürlich vorkommenden all-*trans*-Retinsäure (Abb. 4).

164

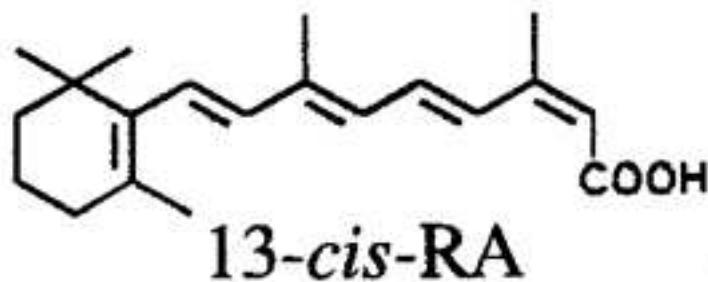


Abbildung 4: Isotretinoin (13-*cis*-Retinsäure)

Isotretinoin (13-*cis*-Retinsäure) wurde 1971 von Bollag et al. bei der Suche nach einem anti-karzinogenen Retinoid mit weniger Nebenwirkungen als Tretinoin entdeckt ¹⁵³. 1979 berichtete Peck et al. von kompletten Remissionen bei Patienten mit schwerer nodulär-zystischer Akne unter oraler Isotretinoin Gabe, die auch Monate nach Absetzen des Medikaments anhielten ¹³⁶. Nachdem diese Beobachtung durch mehrere nachfolgende Studien bestätigt werden konnte, erfolgte 1982 in den USA erstmals die Zulassung von Isotretinoin für schwere Formen der Akne. In Europa wurde die systemische Isotretinointherapie 1985 zugelassen.

1.4.2.1 Wirkungsweise

Retinoide beeinflussen zelluläre Differenzierungsprozesse der Epidermis sowie ihrer Anhangsgebilde. Die Wirkung der Retinoide wird durch zwei Rezeptortypen vermittelt, den RAPs (retinoid acid receptor) und den RXRs (retinoid X receptor), die jeweils durch drei Gene kodiert werden (α -, β - und γ)¹⁵³.

Isotretinoin gilt als das wirksamste Medikament zur Behandlung schwerer und mittelschwerer Formen der Akne. Diesen Stellenwert in der Aknetherapie hat es unter anderem durch die nachhaltige Beeinflussung mehrerer pathogenetischer Faktoren der Akne in Form einer sebosuppressiven, komedolytischen, antiinflammatorischen und indirekt antimikrobiellen Wirkung erhalten.

Die Sebumsuppression ist wahrscheinlich die herausragendste Eigenschaft, da sie unter Isotretinoin weit ausgeprägter ist als beispielsweise unter Östrogenen oder Antiandrogenen. Die Wirkung setzt innerhalb von zwei Wochen ein und ist dosisabhängig. Nach einer therapeutischen Dosierung von 0,1 mg/kg KG resultiert eine 30 % ige, nach 0,5 mg/kg KG eine 40 % ige Sebumsuppression. Mit einer Dosierung von 1,0 mg/kg KG läßt sich nach drei Monaten eine nahezu vollständige Unterdrückung der Sebumproduktion beobachten. Eine klinische Besserung ist dabei schon bei einer 30 % igen Sebumsuppression erkennbar. Dabei finden sich nicht nur qualitative, sondern auch quantitative Veränderungen. Die Zusammensetzung des Sebums zeigt ein Absinken des Wachsesters- und Squalengehaltes sowie eine Erhöhung des Cholesteringehaltes. Dies entspricht einem Muster von Hautlipiden, welches vor Androgenstimulation, also in der Kindheit vorliegt¹⁶⁴.

Histologisch läßt sich eine Reduktion der Sebozytenzahl sowie eine Verkleinerung der Talgdrüsenzini erkennen¹⁵³.

Ebenfalls sehr ausgeprägt ist die komedolytische Wirkung des Isotretinoins. Dabei wird sehr effektiv durch Eliminierung von überschüssigem Hornmaterial die Bildung von Komedonen und Mikrokomedonen verhindert, sowie die Größe der Gesichtsporen vermindert. Histologisch zeigt sich dies in einer Abnahme der Hornzellagen im Talgdrüsenfollikel von normalerweise 30-60 auf 10-15 Zellagen. Die Reduktion des Sebums ist wiederum eine wichtige Voraussetzung für die Reduktion von *P. acnes*, welchem dadurch die nötigen Wachstumsbedingungen entzogen werden. Es resultiert eine verringerte mikrobielle Besiedelung der Talgdrüseninfundibuli.

Sowohl *In-vitro*- als auch *In-vivo*- Studien bestätigen darüberhinaus die antiinflammatorische Wirkung von Isotretinoin im Sinne eines direkten inhibierenden Effektes auf

Entzündungszellen. Dies wird auch in der Behandlung anderer entzündlicher Dermatosen wie Rosazea oder perioraler Dermatitis ausgenutzt, die ebenfalls auf Isotretinoin gut ansprechen. Die antimikrobielle Wirkung ist nicht in einer direkt bakteriziden oder bakteriostatischen Wirkung zu finden, sondern in einem veränderten Mikroklima in den Talgdrüsen sowie auf der Haut, bedingt durch die starke Sebumpsuppression. Der Abfall der Dichte der Besiedelung durch *P. acnes* unter Isotretinointherapie setzt erst nach dem Beginn der Sebumpsuppression ein⁹⁹.

Im Gegensatz dazu kann es zu einer vermehrten Besiedelung der Haut durch Staphylokokken und damit auch zu Follikulitiden oder Furunkeln kommen.

Isotretinoin wird als Monotherapie über mehrere Wochen bis Monate in Dosierungen von 0,2 bis 1,0 mg/kg KG täglich gegeben. Eine niedrigere Dosierung von 0,5 mg/kg KG oder weniger ist dabei zu favorisieren.

1.5 Zielsetzung

Im Rahmen dieser Arbeit wurden 55 Aknepatienten, von denen 16 unbehandelt waren, 16 systemisch mit Isotretinoin, 6 kombiniert systemisch mit Isotretinoin und Lokalthérapeutika und 17 kombiniert systemisch mit Minozyklin und Lokalthérapeutika behandelt wurden, Komedonen entnommen und die darin enthaltenen Porphyrine extrahiert und mittels HPLC-Analyse aufgetrennt. Es konnte der Nachweis von Porphyrinen in Komedonen *in vivo* erbracht und das Verhältnis der einzelnen Porphyrinklassen zueinander *in vivo* bestimmt werden. Durch die selektive Auswahl der Patienten und deren Unterteilung in Behandlungsgruppen ist es möglich, den Einfluß der systemischen Aknetherapeutika Minozyklin und Isotretinoin auf die Porphyrinproduktion und Porphyrinverteilung zu ermitteln.

Dies ist insbesondere deshalb von Interesse, da die Porphyrine am Entzündungsgeschehen im Rahmen der Acne vulgaris eine wichtige Rolle spielen. Neuere Ansätze zur Aknetherapie mit Blaulicht im Bereich von 407 - 420 nm, ein Wellenlängenbereich welcher im Absorptionsspektrum der Porphyrine liegt, nutzen diese Erkenntnis erfolgreich.

2. Material und Methoden

2.1 Materialien

2.1.1 Patientengut

55 Patienten mit Acne papulopustulosa beziehungsweise Acne conglobata, im Alter zwischen 13 und 37 Jahren (Median 20 Jahre) wurden untersucht. Darunter befanden sich 28 Frauen und 27 Männer. Keiner dieser Patienten litt an einer systemischen Erkrankung. Die Patienten wurden mittels eines standardisierten Fragebogens evaluiert (siehe Anhang).

16 Patienten waren zum Zeitpunkt der Probenentnahme unbehandelt, das heißt weder lokale noch systemische Aknetherapeutika waren angewendet worden. 16 Patienten erhielten seit mindestens 2 Monaten Isotretinoin (Dosisintervall 10 - 40 mg pro Tag), 6 Patienten erhielten seit mindestens 2 Monaten eine Kombinationstherapie mit Isotretinoin und lokaler Therapie und 17 Patienten erhielten Minozyklin peroral (Dosisintervall 50 - 100 mg pro Tag) und eine Lokaltherapie. Als Lokaltherapie wurde Benzoylperoxid verwendet.

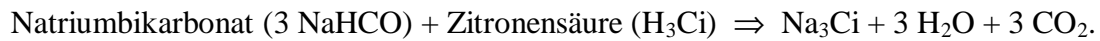
2.1.2 Kulturmedien und Kulturbedingungen

Bei den Versuchen mit *P. acnes* -Kulturen wurde als Nährmedium Hirn-Herz-Infusionsagar (Difco Manual. Dehydrated culture media and reagents for microbiology. Difco Laboratories Detroit, USA) mit folgender Zusammensetzung (g/l) verwendet:

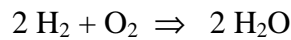
Kalbshirninfusion	200,0
Rinderherzinfusion	250,0
Proteose-Pepton	10,0
Glukose	2,0
Natriumchlorid	5,0
Dinatriumhydrogenphosphat	2,5
Agar	15,0

Der Ausgangs-pH-Wert ist $7,4 \pm 0,2$.

Zur Herstellung von nahezu anaeroben Verhältnissen wurden Gas-Pak-Töpfe (Gas Pak 150 Anaerobiotöpfe der Firma BBL, Heidelberg) mit zugehörigem Entwicklerkit verwendet. Die CO₂ - Gasentwicklung läuft nach folgender Formel ab:



Durch Zusatz von Natriumborhydrid (NaBH₄) entsteht Wasserstoff (H₂). Dieser wiederum reagiert mit Hilfe eines Palladiumkatalysators mit Sauerstoff zu Wasser:



2.1.3 Chromatographische Auftrennung der Porphyrine

Zur Auftrennung und Quantifizierung der Porphyrine wurde ein HPLC-System verwendet. Dieses besteht aus einem Eluentenfördersystem (Pumpe), einem Injektor, einer Säule und einem Detektor sowie einer Auswerteeinheit. Das L-6200 Flüssigkeitschromatographmodell (Merck-Hitachi, Darmstadt) wurde verwendet, das mit einem Modell F-1000 Spektrofluorimeter-Detektor ausgestattet ist. Als Systemkontroller und Datenprozessor diente ein D-2500 Integratormodell.

2.2 Methoden

2.2.1 Extraktion und Wiegen der Komedonen

Nach gründlicher Desinfektion der Haut mit einem farblosem Hautdesinfiziens (Cutasept® F, Bode Chemie Hamburg) wurden mehrere Komedonen im Gesicht oder am Oberkörper mit einer sterilen Nadel punktiert und mittels leichtem seitlichen Druck exprimiert. Zu einer genauen quantitativen Bestimmung wurde eine Analysenwaage (Sarorius AG Göttingen, BA 110 S, Deutschland) benutzt. Die erzielte Menge betrug zwischen 0,5 mg und 17,2 mg (Median 4,6 mg). Für die Anzucht von *P. acnes* auf Kulturen wurden nach ebenfalls gründlicher Desinfektion der Haut mittels einer sterilen Nadel eine Pustel im Bereich des Gesichtes oder des Oberkörpers punktiert.

2.2.2 Anzüchtung

Bei der Anzüchtung von *P. acnes* aus Komedonen wurde das Material in einem Eppendorf-Röhrchen mit isotoner NaCl-Lösung gespült bis alle sichtbaren Verunreinigungen beseitigt waren und anschliessend im Mörser homogenisiert. Aus diesem Gemisch wurde mit einer sterilen Öse etwas Material entnommen und mittels fraktioniertem Ausstrich auf die - mit gegossenem Nährmedium (Hirn-Herz-Infusionsagar) gefüllten - Petri-Schalen überimpft.

Bei der Anzüchtung von *P. acnes* aus Pusteln wurde der Inhalt der Pustel mit einer sterilen Öse aufgenommen und ebenfalls mittels fraktioniertem Ausstrich auf den oben beschriebenen Nährböden aufgebracht. Die Platten wurden für 5 Tage anaerob in Gas Pak 150 Anaerobiertöpfen bei 37 ° C inkubiert.

2.2.3 Porphyrinextraktion

Die Komedonen wurden in einem Eppendorf-Röhrchen zweimal mit jeweils 1 ml isotoner NaCl-Lösung gespült und auf Filterpapier getrocknet. Anschliessend wurden sie mit 2 ml isotoner NaCl-Lösung im Mörser homogenisiert. Aus diesem Gemisch wurde jeweils 1 ml entnommen und in ein Eppendorf-Röhrchen übertragen. Der Mörser wurde mit 1ml isotoner NaCl-Lösung nachgespült, jeweils 0,5 ml wurden auf die beiden Eppendorf-Röhrchen verteilt und für 3 min bei 2500 r.p.m. zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen. In Röhrchen 1 wurde 50 µl Celite[®] (Fluka, Paesel, Frankfurt; in 5%iger Suspension mit isotoner NaCl-Lösung), ein Filterhilfsmittel, bestehend aus Kieselgur verschiedener Korngrößen und 250 µl Äthylazetat : Essigsäure (4 : 1) zugegeben. Diese Mischung wurde für 10 Sekunden auf einem Vortexmixer gemischt und für 90 Sekunden mit 1500 r.p.m. zentrifugiert. Der Überstand wurde mittels Pipette in Röhrchen 2 übertragen, nochmals für 10 Sekunden auf dem Vortexmixer gemischt und für 90 Sekunden mit 1500 r.p.m. zentrifugiert. Der Überstand wurde in ein neues Eppendorf-Röhrchen übertragen. Anschliessend wurden 250 µl 1,4 N HCl zugefügt. Die Lösung wurde für 10 Sekunden auf dem Vortexmixer gemischt und es wurden 300 µl der unteren Phase mittels Pipette in ein neues Eppendorf-Röhrchen überführt und mittels HPLC-Analyse weiter verarbeitet.

2.2.4 Festphasensäulenconditionierung

- 1 ml Festphasen-Extraktions-Säule (100 mg) C-18 e (Separtis GmbH, Grenzach-Wyhlen)
- mit 3×1 ml Azeton/MeOH (1/1, v/v) aktivieren und
- 3×1 ml 1,3 M Phosphorsäure aufbringen

2) Probenvorbereitung

- 2 ng Mesoporphyrin (in 20 μ l 50 mM Methanol. Tetrabutylammoniumphosphat-Lösung
- TBA-PO₄, Fluka, Buchs, CH) als internen Standard zu 300 μ l Piomelli-Porphyrin-Extrakt geben
- 0,75 ml 1,3 M H₃PO₄ zugeben und
- 20 Sekunden vortexen

3) Festphasen-Extraktion

- Probe auf die Festphasen-Extraktions-Säule aufgeben
- mit 5×1 ml Wasser waschen
- 15 Sekunden trockensaugen
- mit 0,8 ml Azeton/MeOH (1/1, v/v)/1% Triethylamin eluieren
- Extrakt am Trockenabdampfgerät unter Stickstoff (N₂) abblasen
- Rückstand in 100 μ l 50 mM Methanol. TBP-PO₄ aufnehmen

4) HPLC-Analyse

Das Injektions-Volumen beträgt 50 μ l. Darin enthalten sind 1,0 ng Mesoporphyrin aus dem Standard.

- Probe auftragen
- HPLC-Anlage starten und das Trennverfahren beginnen
- Qualitative und quantitative Analyse der Ergebnisse des Auswertesystems

2.2.5 Gradientensysteme

Zur vollständigen Auftrennung und Eluierung aller Porphyrine und Isomere mußten zwei Ionenpaar-HPLC-Gradientensysteme verwendet werden. Der Gradient 1 trennt nur Koproporphyrin I/III, jedoch keine polaren Porphyrine (Uro- bis Pentacarboxyporphyrin), wohingegen beim Gradienten 2 alle Isomere I/III getrennt werden, jedoch Protoporphyrin nicht mehr eluiert wird.

2.2.6 Datenverarbeitung

Alle Daten wurden auf einem MEDION-Computer eingegeben und mittels SPSS Statistikprogramm (SPSS- GmbH, München, Version 10.0) ausgewertet.

Der Zusammenhang zwischen Porphyrinkonzentration und jeweiliger Therapie wurde mittels Mann-Whitney-U-Test, einem nicht-parametrischen Test für unverbundene Stichproben überprüft.

3. Ergebnisse

3.1 *In-vivo*- Porphyrinproduktion von *Propionibacterium acnes*

In allen Patientenproben ergab sich Koproporphyrin III als größte Porphyrinfraktion. Als zweitgrößte Porphyrinfraktion mit weitaus niedrigeren Werten erwies sich Koproporphyrin I. Protoporphyrine waren nur in wenigen Fällen in geringen Mengen nachzuweisen, polare Porphyrine wurden *In-vivo*- Messung nicht nachgewiesen. Diese Relation der Porphyrine zueinander war in allen Therapiegruppen stabil.

Die Tabellen 1 - 4 zeigen die Ergebnisse der Messungen in Abhängigkeit der jeweiligen Therapiegruppe sowie die eingesetzte Trockenmenge der Komedonen und die prozentuale Wiederfindungsrate des internen Standards Mesoporphyrin bei der HPLC-Analyse. In den Abbildungen 5 - 7 sind die Meßergebnisse für die jeweiligen Therapiegruppen in Säulendiagrammen dargestellt. Daraus ist ersichtlich, daß die Porphyrinwerte selbst bei unbehandelten Patienten starken interindividuellen Schwankungen unterliegen. Zudem lassen sich bei der Gruppe der systemisch mit Isotretinoin behandelten Patienten deutlich niedrigere Koproporphyrin-III-Werte als bei allen anderen Behandlungsgruppen nachweisen. Koproporphyrin-I war in geringen Mengen bei fast allen Patienten in jeder Behandlungsgruppen nachweisbar. Protoporphyrin dagegen war nur bei ungefähr einem Drittel der Patienten in sehr geringen Mengen, teilweise nur knapp oberhalb der Nachweisgrenze, meßbar.

Abbildung 9 stellt die Mediane der unterschiedlichen Therapiegruppen sowohl für Koproporphyrin I als auch für Koproporphyrin III dar. Die Protoporphyrinwerte fanden in dieser Darstellung keinen Eingang, da die Mediane hierfür unabhängig von der Art der Therapie konstant bei Null lagen.

Aus Abbildung 9 ist ersichtlich, daß im Vergleich zur Kontrollgruppe der unbehandelten Patienten bei den systemisch mit Isotretinoin behandelten Patienten die Koproporphyrin-III-Werte deutlich niedriger liegen, wohingegen die Gruppe der kombiniert systemisch mit Isotretinoin und lokal behandelten, sowie die kombiniert mit Antibiotika und Lokalthherapie behandelten Patienten höhere Werte sowohl von Koproporphyrin III, als auch von Koproporphyrin I aufweisen. Die Mediane der Protoporphyrine waren in allen vier Patientengruppen gleich Null.

Unterstützend führten wir bei neun Patienten mit systemischer Isotretinointherapie Wiederholungsmessungen im Abstand von 1 bis 3 Monaten durch. Tabelle 5 gibt die Koproporphyrin-III-Werte wieder, in Abbildung 11 sind diese graphisch dargestellt. Es zeigt

sich hierbei bei zwei Drittel der Patienten ein deutlicher Rückgang, bei einem Drittel ein leichter bis mäßiger Anstieg der Koproporphyrin-III-Werte.

Wiederholungsmessungen wurden auch für Patienten mit systemischer Antibiotika- und Lokaltherapie durchgeführt (Tabelle 6). Aus der graphischen Aufbereitung der Meßwerte (Abbildung 12) kann man weder bei den Koproporphyrin-III- noch bei den Koproporphyrin-I-Werten einen Rückgang erkennen, trotz klinischer Besserung des Hautbefundes bei diesen Patienten. Allerdings ist hier die Fallzahl mit drei Patienten zu niedrig, um valide Aussagen zu treffen.

3.2 Porphyrinproduktion von *P. acnes* nach 7 und 14 tägiger Bebrütung

Da Romiti in seiner Arbeit über die *In-vitro* Porphyrinproduktion von *P. acnes* im Gegensatz zu unseren Ergebnissen als größte Porphyrinfraktion Protoporphyrin IX herausstellte ¹⁶⁴, führten wir diese Versuche noch einmal durch. Dafür wurden *P. acnes* -Kulturen entweder aus Komedonen oder aus Pusteln angelegt und diese nach 7 und 14 Tagen auf ihren Porphyringehalt nach der modifizierten Piomelli-Methode untersucht. Die Meßergebnisse für das Ausgangsmaterial Komedonen sind in Tabelle 7 aufgeführt, für das Ausgangsmaterial Pusteln in Tabelle 9. Die jeweils größte Porphyrinfraktion pro Messung ist fett gedruckt. In Abbildung 13 sind die Meßwerte für Koproporphyrin III nach 7- und 14- tägiger Bebrütung aufgetragen. Bei sechs Proben läßt sich ein Zuwachs der Koproporphyrin-III-Produktion erkennen, bei 5 Proben nimmt die Koproporphyrin-III-Produktion ab. Abbildung 14 zeigt die Meßwerte von Protoporphyrin ebenfalls nach 7- und 14-tägiger Kultur. Bei zwei Patienten waren weder nach 7 noch nach 14 Tagen Protoporphyrine nachweisbar. Bei weiteren zwei Proben waren Protoporphyrine, in einem Fall sogar in großen Mengen, nach 7 Tagen vorhanden, nach 14 Tagen aber nicht mehr nachweisbar. Bei vier Patienten konnte nach 14 Tagen eine höhere Protoporphyrinmenge als nach 7-tägiger Kultur nachgewiesen werden und bei zwei Patienten zeigte sich eine Reduktion der Protoporphyrinwerte.

Um diese Werte mit den *in vivo* erzielten Werten zu vergleichen, fertigten wir von 11 Patienten Porphyrinbestimmungen sowohl direkt aus dem Komedonenmaterial als auch indirekt nach kultureller Anzüchtung von *P. acnes* an. Die Ergebnisse können aus Tabelle 8 entnommen werden. Wiederum ist die jeweils größte Porphyrinfraktion je Messung fett gedruckt. Da die Einheiten der nativen Meßwerte und der Meßwerte aus Kulturen differieren (ng/mg bei nativer Bestimmung, ng/10⁹ bei der Bestimmung aus Kulturen) ist ein direkter

Vergleich zwar nur eingeschränkt möglich, allerdings sind die absoluten Werte in diesem Zusammenhang auch nicht entscheidend. Wichtig war die Relation der einzelnen Porphyrine zueinander und inwieweit sich diese bei kultureller Anzucht unterscheidet beziehungsweise ändert. Bei diesen Messungen konnten wir zum ersten Mal in vier Proben bei der Porphyrinbestimmung aus Kulturen Uroporphyrin I nachweisen, in einem Fall war dies auch die größte Porphyrinfraktion. In Abbildung 15 sind diese Werte für die native Koproporphyrin-III-Bestimmung und nach 7 tägiger Bebrütung der Kultur graphisch dargestellt. Erkennbar ist, daß die Koproporphyrin-III-Werte nativ bei 8 von 11 Patientenproben höher liegen als nach 7-tägiger Kultur. Auch nach 14-tägiger Bebrütung der Kulturen findet sich diese Relation bestätigt (Abbildung 16). Das gegenteilige Bild spiegelt sich in den vergleichenden Meßwerten von nativer Protoporphyrinbestimmung und Porphyrinextraktion aus Bakterienkulturen. Nach 7-tägiger Kultur lassen sich bei 8 Patientenproben Protoporphyrine nachweisen, bei denen dies nativ nicht gelang. Bei nur einem Patienten konnte *in vivo* Protoporphyrin in geringen Mengen, *in vitro* nicht mehr nachgewiesen werden. Bei zwei Patienten konnten weder *in vivo* noch *in vitro* Protoporphyrine nachgewiesen werden (Abbildung 17). Nach weiteren 7 Tagen konnte in 7 Proben Protoporphyrin nachgewiesen werden. Bei einer nach 7 Tagen Kultur-positiven Probe ließ sich nun kein Protoporphyrin mehr detektieren, bei der einen *in vivo* positiven Probe konnte nun auch *in vitro* Protoporphyrin gemessen werden.

Zusätzlich wurden auch Kulturen aus Pustelmaterial angefertigt und nach 7 und 14 Tagen eine Porphyrinbestimmung durchgeführt. Tabelle 9 gibt über die Meßergebnisse Auskunft. Koproporphyrin III war auch bei diesen Versuchen bis auf eine Ausnahme die größte Porphyrinfraktion, nur einmal stellte diese Koproporphyrin I dar. Bei zwei Patienten konnte Uroporphyrin I nachgewiesen werden. Protoporphyrine waren nicht in größerem Umfang meßbar.

Tabelle 1: Meßwerte für unbehandelte Patienten

Patient	Komedonen Trockengewicht mg	Koproporpyrin I ng/mg	Koproporphyrin III ng/mg	Protoporpyhrin ng/mg	% WF Mesoporphyrin
1	5,6	0,027	0,068	n.n.*	82
2	5,6	0,023	0,304	0,007	95
3	3,4	0,012	0,112	0,024	100
4	4,1	0,003	0,087	n.n.*	96
5	2,1	0,014	0,152	0,014	97
6	1,5	0,02	0,153	0,047	89
7	1,8	0,006	0,083	0,044	92
8	2,1	0,005	0,076	0,005	93
9	3,6	0,011	0,119	n.n.*	100
10	1,2	n.n.*	0,017	n.n.*	90
11	10,1	0,015	0,128	n.n.*	87
12	1,8	0,006	0,05	n.n.*	101
13	4,6	0,007	0,202	n.n.*	103
14	1,6	0,006	0,075	n.n.*	111
15	6,2	0,01	0,152	n.n.*	110
16	2,6	0,012	0,123	n.n.*	127

* : nicht nachweisbar, das heißt der Meßwert lag unter einer Nachweisgrenze von 0,01 ng

Abbildung 5: Porphyrinwerte unbehandelter Patienten

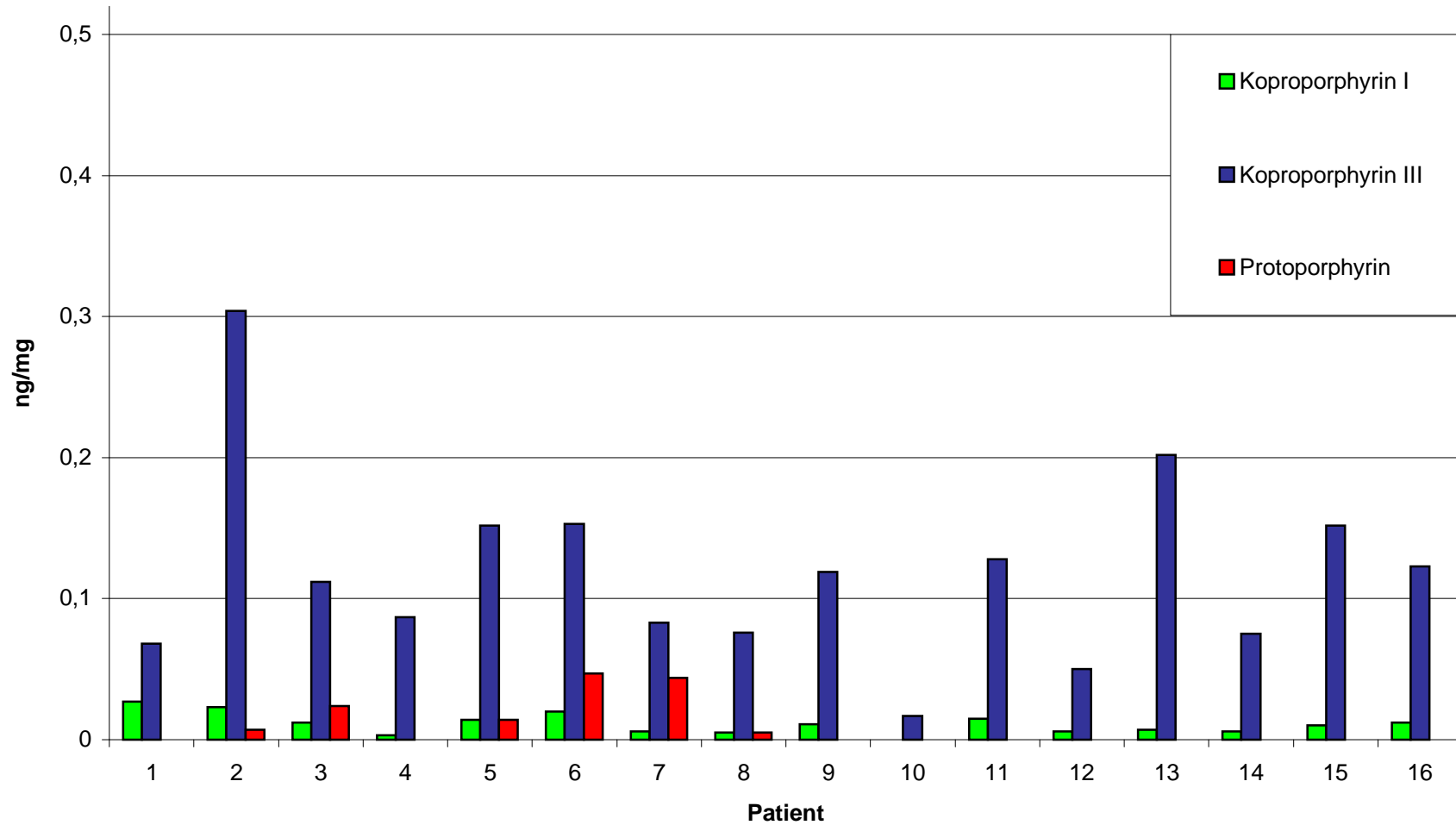


Tabelle 2: Meßwerte Patienten mit systemischer Isotretinointherapie

Patient	Komedonen Trockengewicht mg	Koproporphyrin I ng/mg	Koproporphyrin III ng/mg	Protoporphyrin ng/mg	% WF Mesoporphyrin
1	16,6	0,014	0,264	n.n.*	94
2	5,3	n.n.*	n.n.*	n.n.*	92
3	5,3	0,004	0,072	0,002	86
4	17,2	0,012	0,014	0,006	91
5	10,5	0,022	0,312	0,004	100
6	6,7	0,003	0,002	0,01	96
7	9,6	0,003	0,007	n.n.*	97
8	10,9	0,005	0,041	0,015	98
9	13,4	0,002	0,013	0,002	99
10	4,2	n.n.*	0,012	n.n.*	99
11	5,7	0,007	0,11	n.n.*	98
12	5,2	0,004	0,054	n.n.*	97
13	10,3	0,011	0,1	0,004	99
14	1,3	n.n.*	0,015	n.n.*	97
15	2,7	0,004	0,048	n.n.*	95
16	2,6	0,004	0,058	n.n.*	99

* : nicht nachweisbar, das heißt der Meßwert lag unter einer Nachweisgrenze von 0,01 ng

Abbildung 6: Porphyrinwerte von Patienten mit systemischer Isotretinointherapie

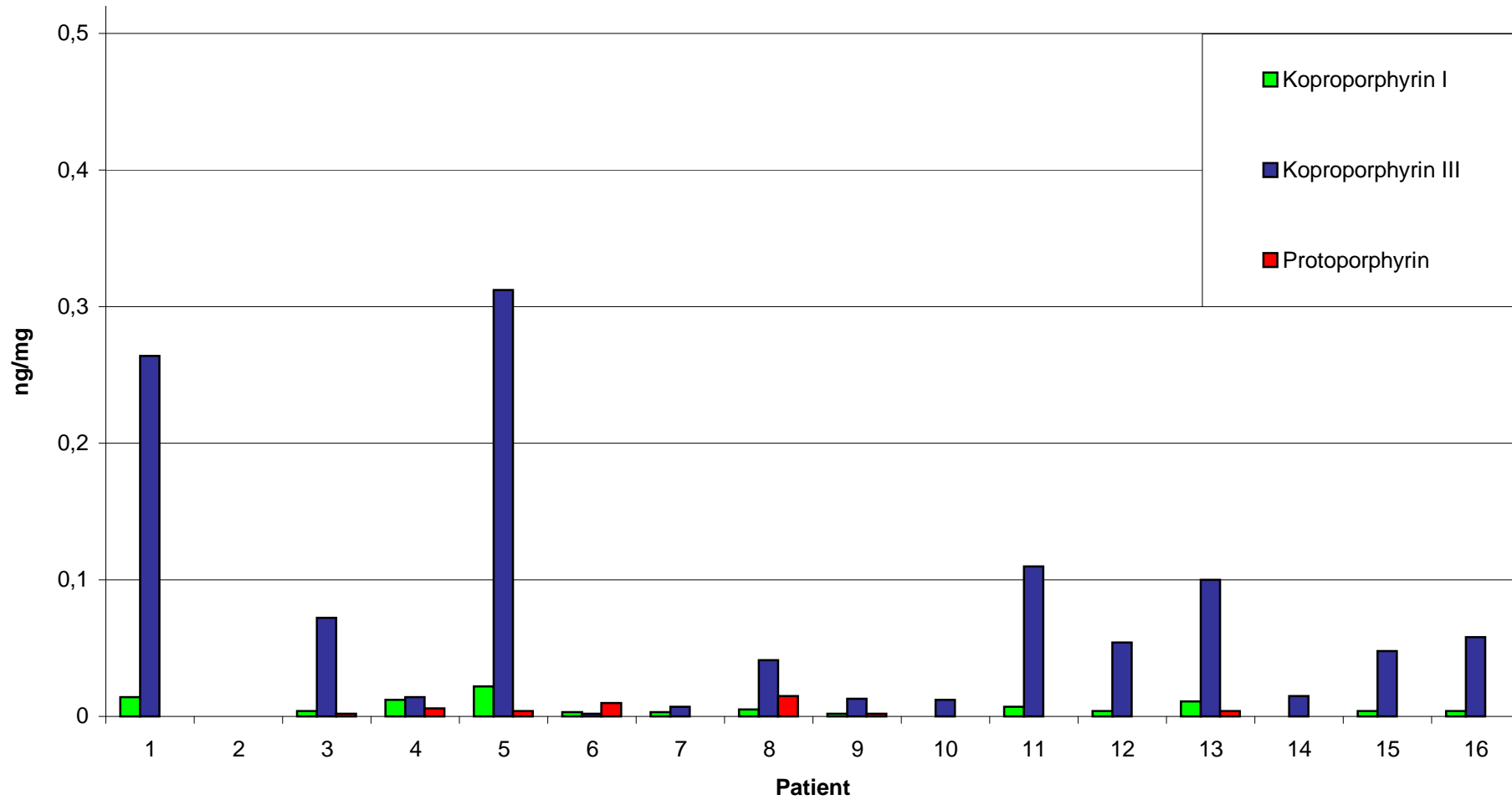


Tabelle 3: Patienten mit kombiniert systemischer Isotretinointherapie und Lokalthherapie

Patient	Komedonen Trockengewicht mg	Koproporphyrin I ng/mg	Koproporphyrin III ng/mg	Protoporphyrin ng/mg	% WF Mesoporphyrin
1	9,0	0,001	0,07	n.n.*	100
2	5,3	0,008	0,119	n.n.*	90
3	10,0	0,002	0,005	0,001	96
4	4,6	0,002	0,067	n.n.*	94
5	5,3	0,017	0,221	n.n.*	96
6	5,3	0,015	0,189	n.n.*	113

* : nicht nachweisbar, das heißt der Meßwert lag unter einer Nachweisgrenze von 0,01 ng

Abbildung 7: Porpyhrinwerte von Patienten mit kombiniert systemischer Isotretinointherapie und lokaler Therapie

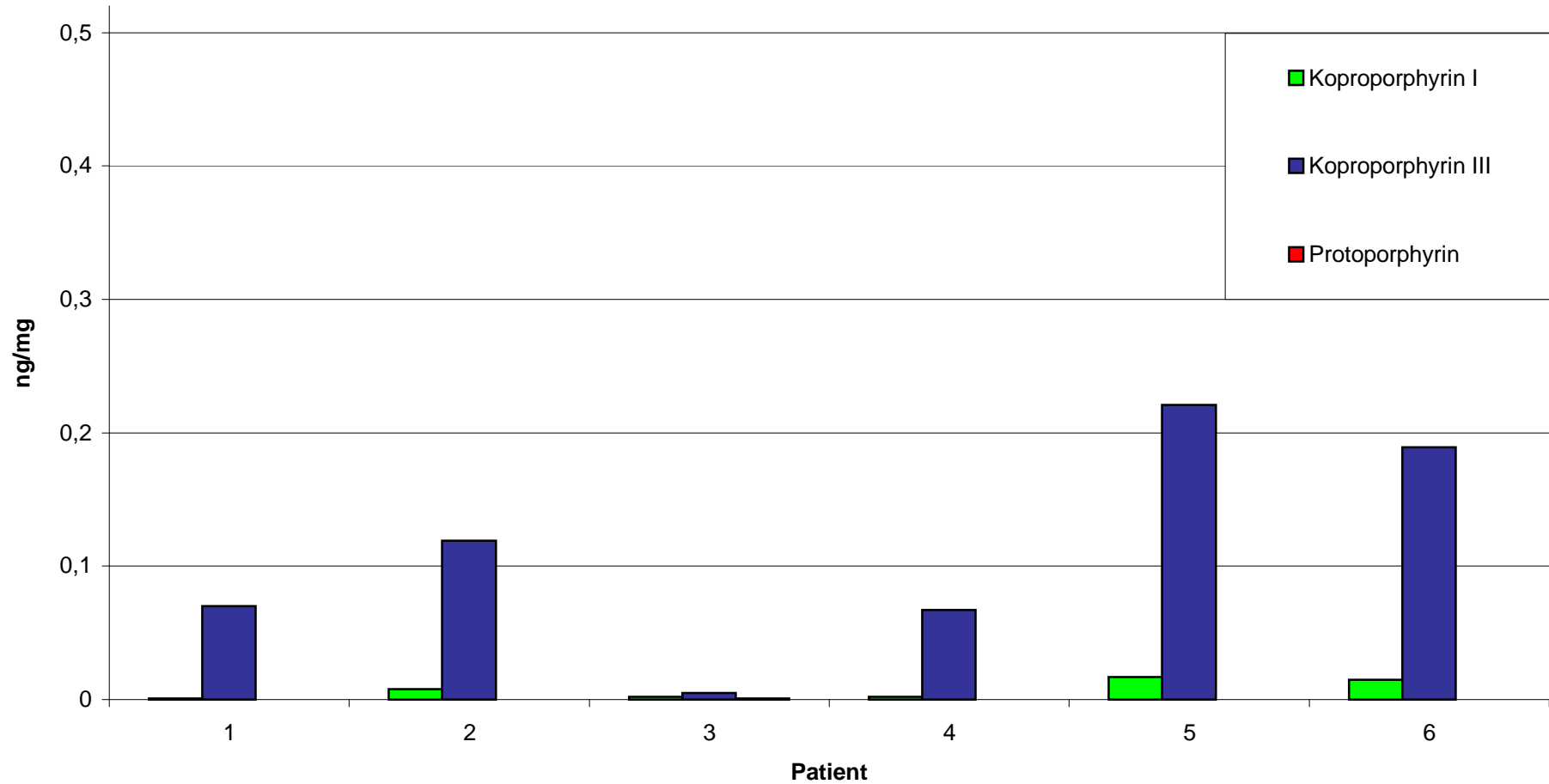


Tabelle 4: Patienten mit kombiniert systemischer Antibiotikatherapie und Lokalthherapie

Patient	Komedonen Trockengewicht mg	Koproporphyrin I ng/mg	Koproporphyrin III ng/mg	Protoporphyrin ng/mg	% WF Mesoporphyrin
1	1,6	0,019	0,186	n.n.*	93
2	3,2	0,003	0,019	n.n.*	74
3	5,5	0,011	0,233	n.n.*	99
4	13,6	0,022	0,419	0,003	100
5	12,6	0,003	0,07	0,002	91
6	3,1	0,02	0,515	0,01	94
7	6,2	0,007	0,095	n.n.*	93
8	3,2	0,018	0,08	n.n.*	84
9	1,4	0,007	0,086	n.n.*	???
10	10,1	0,015	0,128	n.n.*	100
11	2,9	0,004	0,055	n.n.*	93
12	3,8	0,003	0,063	n.n.*	100
13	0,9	0,011	0,256	0,011	96
14	6,9	0,009	0,1	n.n.*	102
15	3,3	0,006	0,035	n.n.*	84
16	5,5	0,007	0,146	n.n.*	81
17	0,5	n.n.*	0,04	n.n.*	97

* : nicht nachweisbar, der Meßwert lag unter einer Nachweisgrenze von 0,01 ng

Abbildung 8: Porphyrinwerte von Patienten mit kombiniert systemischer Antibiotikatherapie und lokaler Therapie

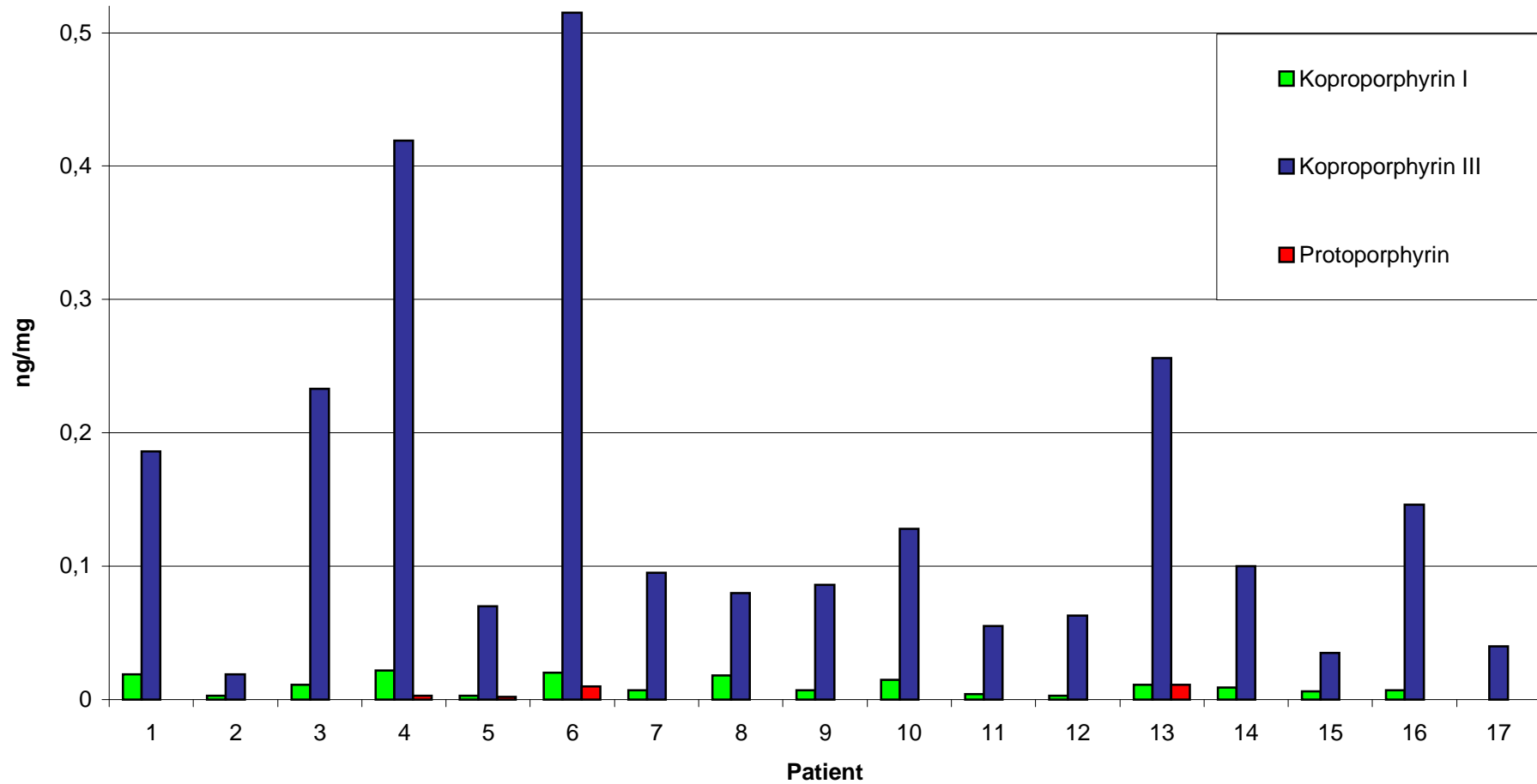


Abbildung 9: Mediane unbehandelter und systemisch behandelter Patienten

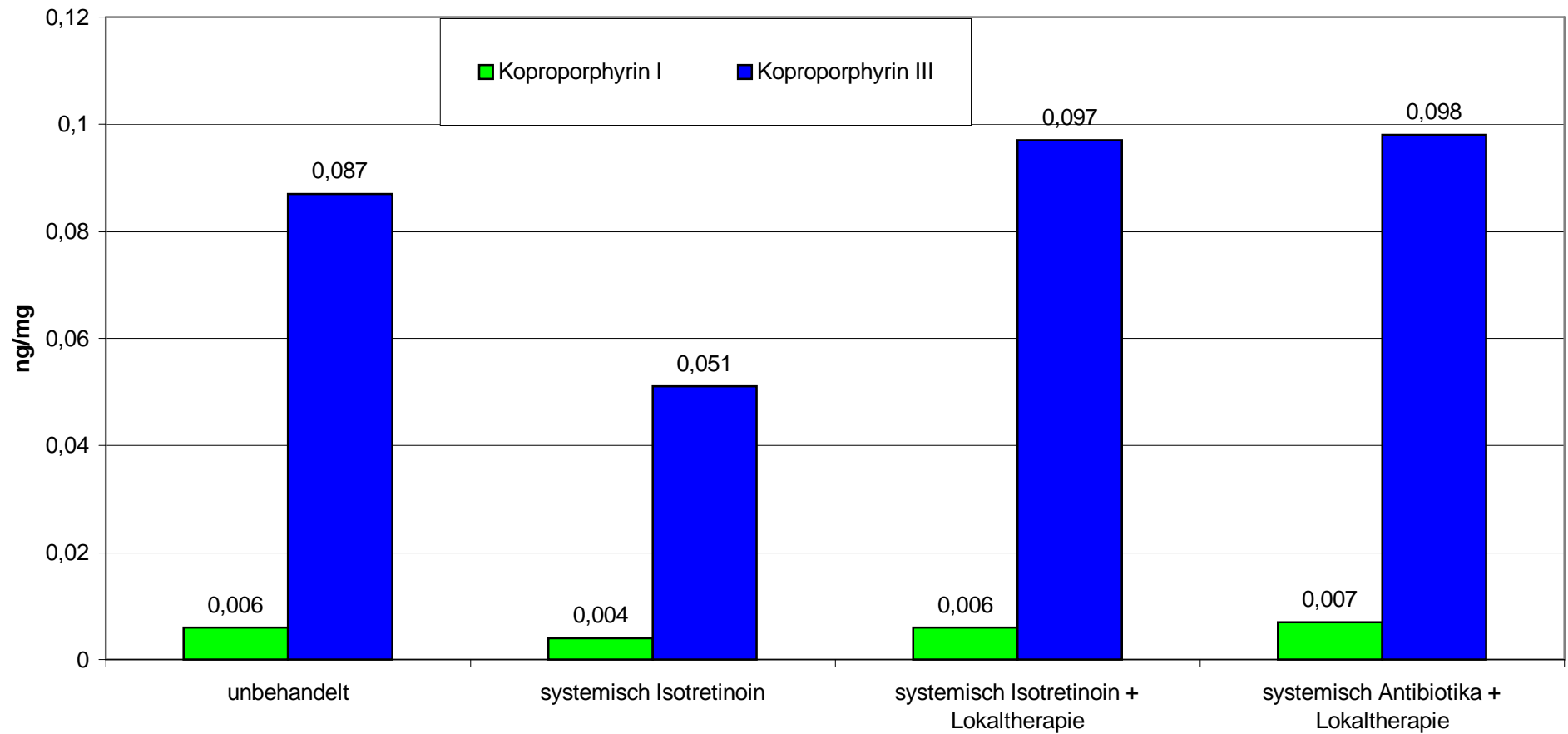


Tabelle 5: Wiederholungsmeßwerte für Patienten mit Isotretinointherapie

Patient	Koproporphyrin III 1. Messung ng/mg	Koproporphyrin III letzte Messung ng/mg
1	0,07	0,074
2	0,352	0,014
3	0,42	0,002
4	0,097	0,007
5	0,082	0,012
6	0,15	0,276
7	0,24	0,054
8	0,155	0,221
9	0,295	0,189

Tabelle 6: Wiederholungsmeßwerte für Patienten mit kombiniert systemischer Antibiotikatherapie und Lokalthherapie

Patient	Koproporphyrin III 1. Messung ng/mg	Koproporphyrin III letzte Messung ng/mg
1	0,019	0,05
2	0,07	0,043
3	0,086	0,138

Abbildung 10: Wiederholungsmessungen bei Isotretinointherapie

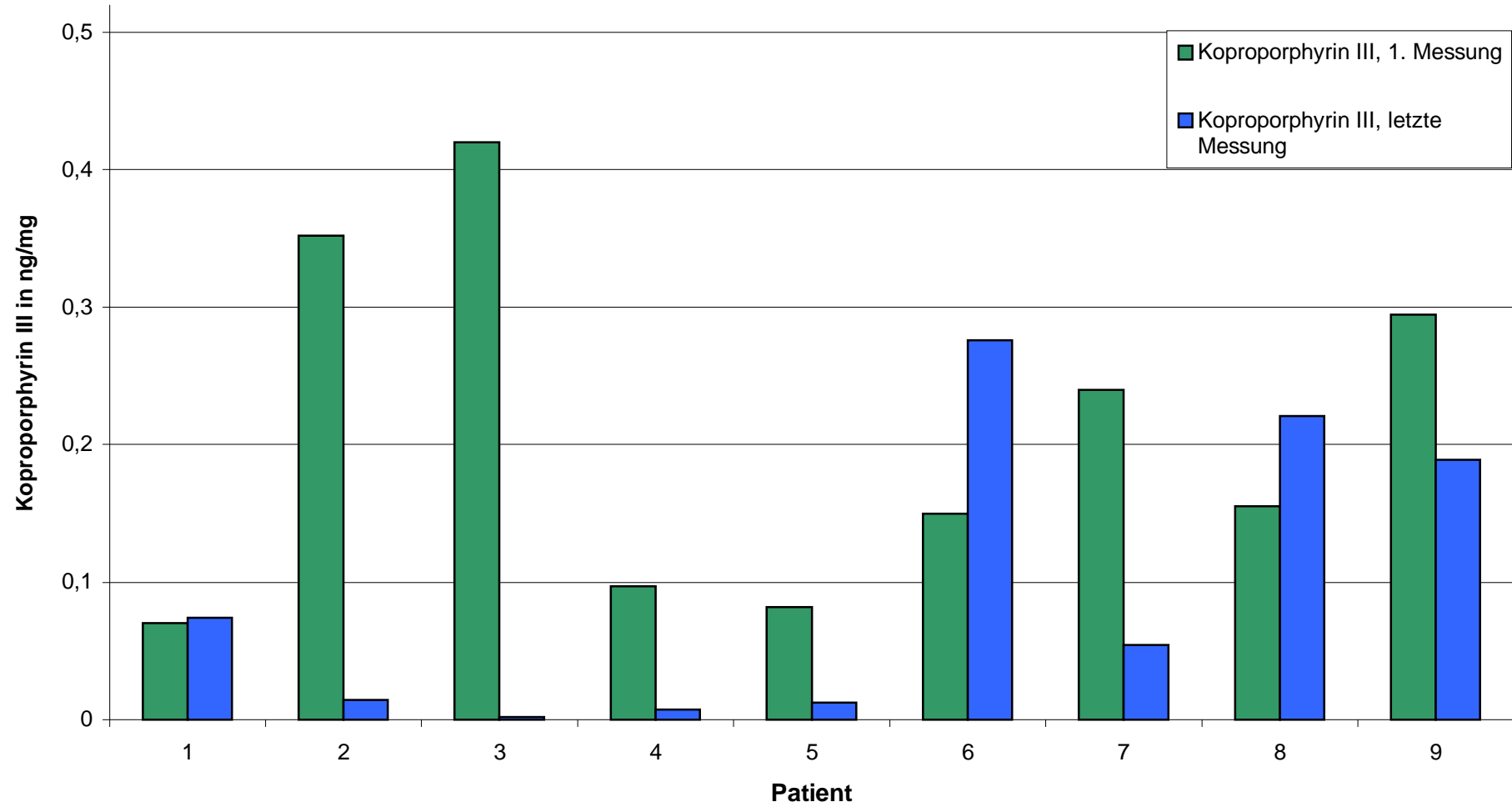


Abbildung 11: Wiederholungsmessungen bei Patienten mit kombiniert systemischer Antibiotikatherapie und Lokaltherapie

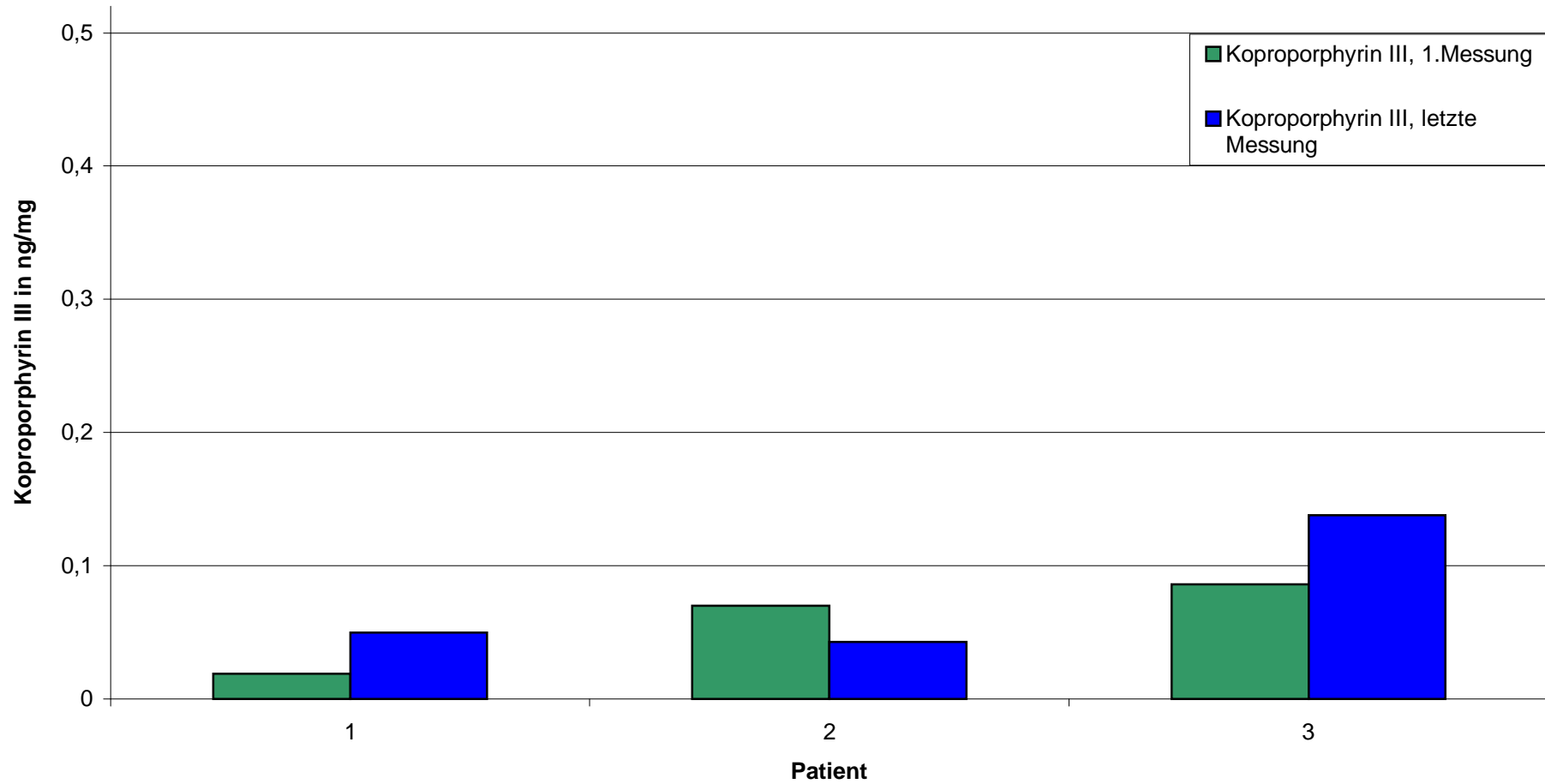


Abbildung 12: Vergleich von *in vitro* gewonnenen Koproporphyrin-III-Werten nach 7 und 14 Tagen

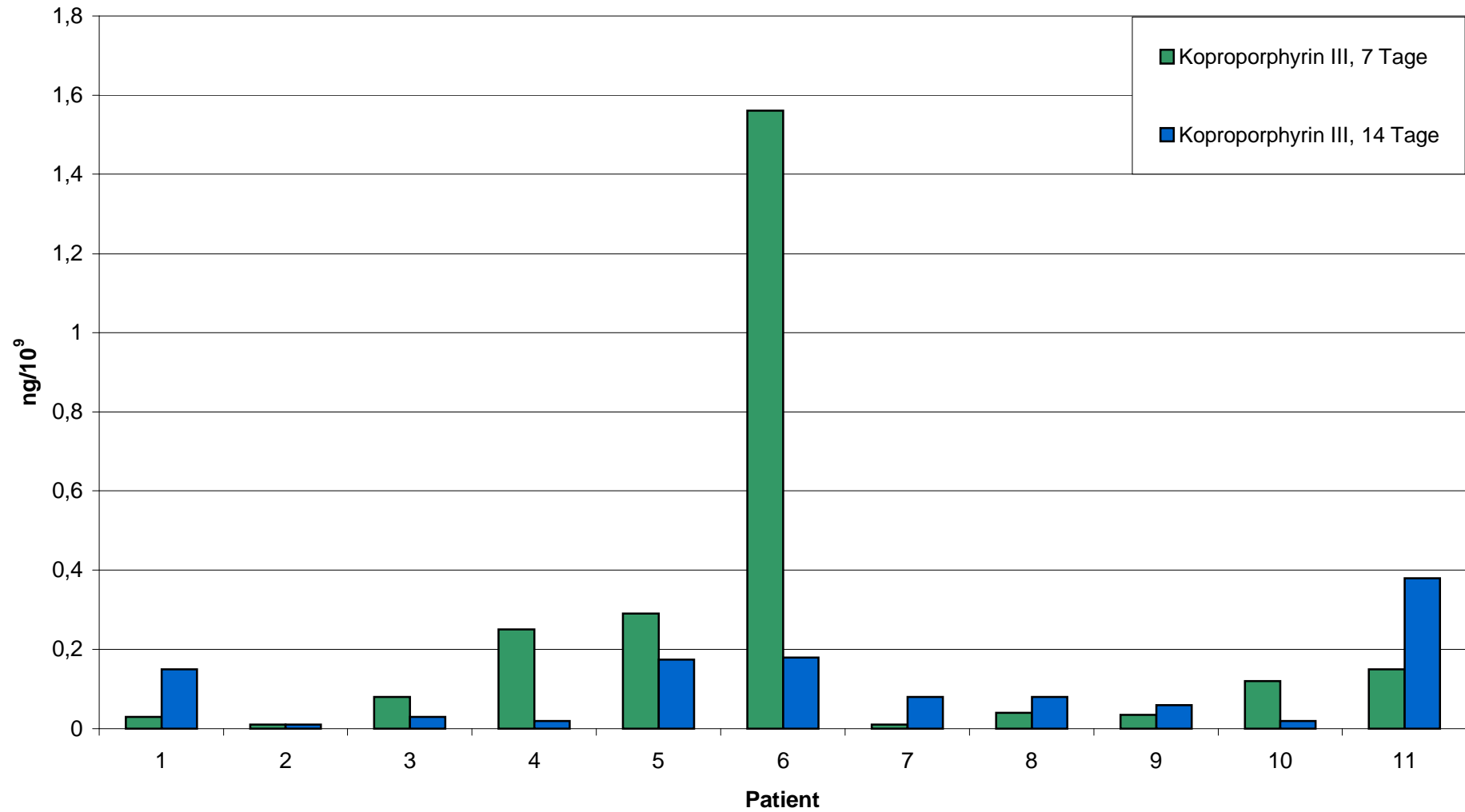


Tabelle 7: Porphyrinbestimmung aus Bakterienkulturen, Material Komedo

Patient	Kultur 7 Tage ng/10 ⁹				Kultur 14 Tage ng/10 ⁹			
	Kopro I	Kopro III	Proto	Uro I	Kopro I	Kopro III	Proto	Uro I
1	n.n.*	0,03	n.n.*	n.n.*	n.n.*	0,15	0,65	n.n.*
2	n.n.*	0,01	0,1	n.n.*	n.n.*	0,01	0,18	n.n.*
3	n.n.*	0,08	0,025	0,655	n.n.*	0,03	0,06	n.n.*
4	n.n.*	0,25	n.n.*	n.n.*	n.n.*	0,02	n.n.*	n.n.*
5	0,025	0,29	1,385	0,12	0,01	0,175	n.n.*	n.n.*
6	0,04	1,56	0,02	0,65	0,03	0,18	0,15	n.n.*
7	n.n.*	0,01	0,06	n.n.*	n.n.*	0,08	0,05	n.n.*
8	0,02	0,04	0,15	n.n.*	n.n.*	0,08	n.n.*	n.n.*
9	n.n.*	0,02	0,02	n.n.*	n.n.*	0,06	0,01	n.n.*
10	n.n.*	0,12	n.n.*	n.n.*	n.n.*	0,02	n.n.*	n.n.*
11	0,04	0,15	0,07	n.n.*	0,05	0,38	0,55	0,08

* : nicht nachweisbar, der Meßwert lag unter einer Nachweisgrenze von 0,01 ng

Kopro I: Koproporphyrin I; Kopro III: Koproporphyrin III; Proto: Protoporphyrin; Uro I: Uroporphyrin I

Abbildung 13: Vergleich von *in vitro* gewonnenen Protoporphyrinwerten nach 7 und 14 Tagen

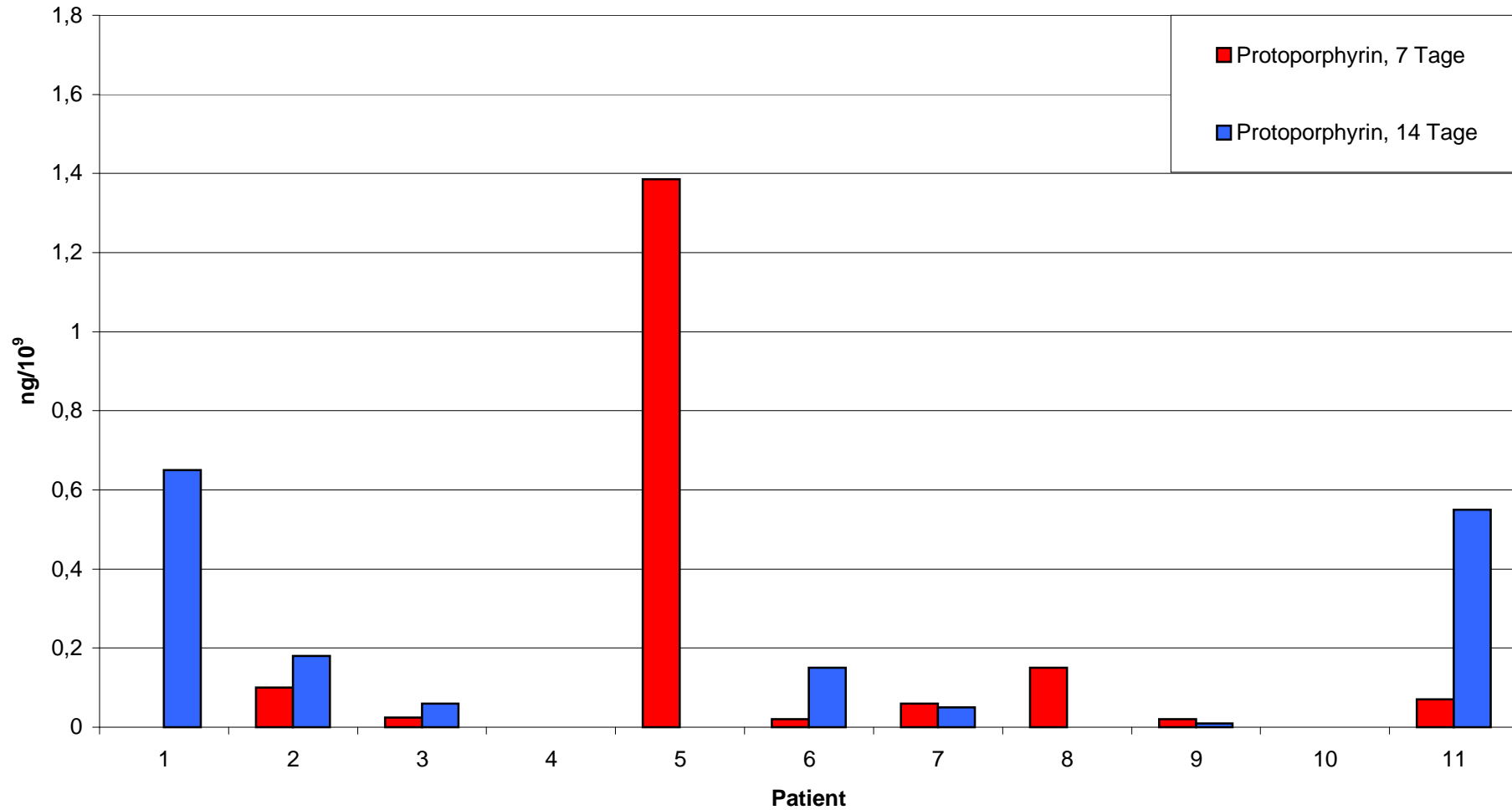


Tabelle 8: *In-vitro*-Porphyrinbestimmung aus Bakterienkulturen (Material Komedo) im Vergleich zur gleichzeitigen *In-vivo*-Nativbestimmung

Patient	nativ ng/mg			Kultur 7 Tage ng/10 ⁹				Kultur 14 Tage ng/10 ⁹			
	Kopro I	Kopro III	Proto	Kopro I	Kopro III	Proto	Uro I	Kopro I	Kopro III	Proto	Uro I
1	0,011	0,1	0,004	n.n.*	0,03	n.n.*	n.n.*	n.n.*	0,15	0,65	n.n.*
2	0,004	0,074	n.n.*	n.n.*	0,01	0,1	n.n.*	n.n.*	0,01	0,18	n.n.*
3	0,009	0,1	n.n.*	n.n.*	0,08	0,025	0,655	n.n.*	0,03	0,06	n.n.*
4	0,013	0,138	n.n.*	n.n.*	0,25	n.n.*	n.n.*	n.n.*	0,02	n.n.*	n.n.*
5	0,004	0,27	n.n.*	0,025	0,29	1,385	0,12	0,01	0,175	n.n.*	n.n.*
6	0,009	0,146	n.n.*	0,04	1,56	0,02	0,65	0,03	0,18	0,15	n.n.*
7	0,013	0,259	n.n.*	n.n.*	0,01	0,06	n.n.*	n.n.*	0,08	0,05	n.n.*
8	0,006	0,111	n.n.*	0,02	0,04	0,15	n.n.*	n.n.*	0,08	n.n.*	n.n.*
9	0,01	0,152	n.n.*	n.n.*	0,02	0,02	n.n.*	n.n.*	0,06	0,01	n.n.*
10	0,01	0,147	n.n.*	n.n.*	0,12	n.n.*	n.n.*	n.n.*	0,02	n.n.*	n.n.*
11	0,071	0,358	n.n.*	0,04	0,15	0,07	n.n.*	0,05	0,38	0,55	0,08

* : nicht nachweisbar, der Meßwert lag unter einer Nachweisgrenze von 0,01 ng

Kopro I: Koproporphyrin I; Kopro III: Koproporphyrin III; Proto: Protoporphyrin; Uro I: Uroporphyrin I

Abbildung 14: Vergleich von *in vivo* und *in vitro* gewonnenen Koproporphyrin-III-Werten nach 7 tager Kultur

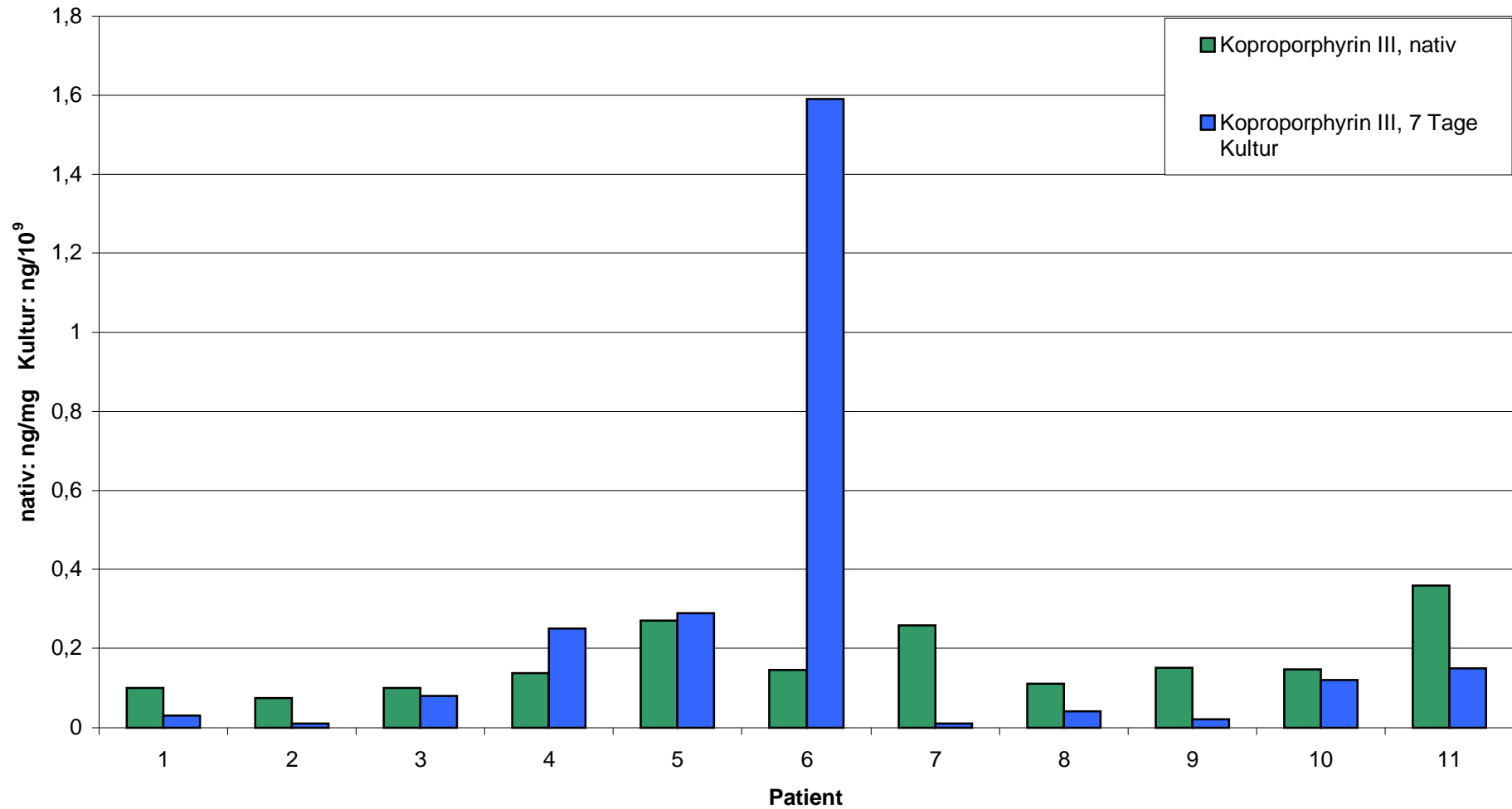


Abbildung 15: Vergleich von *in vivo* und *in vitro* gewonnenen Koproporphyrin-III-Werten bei 14 tägiger Kultur

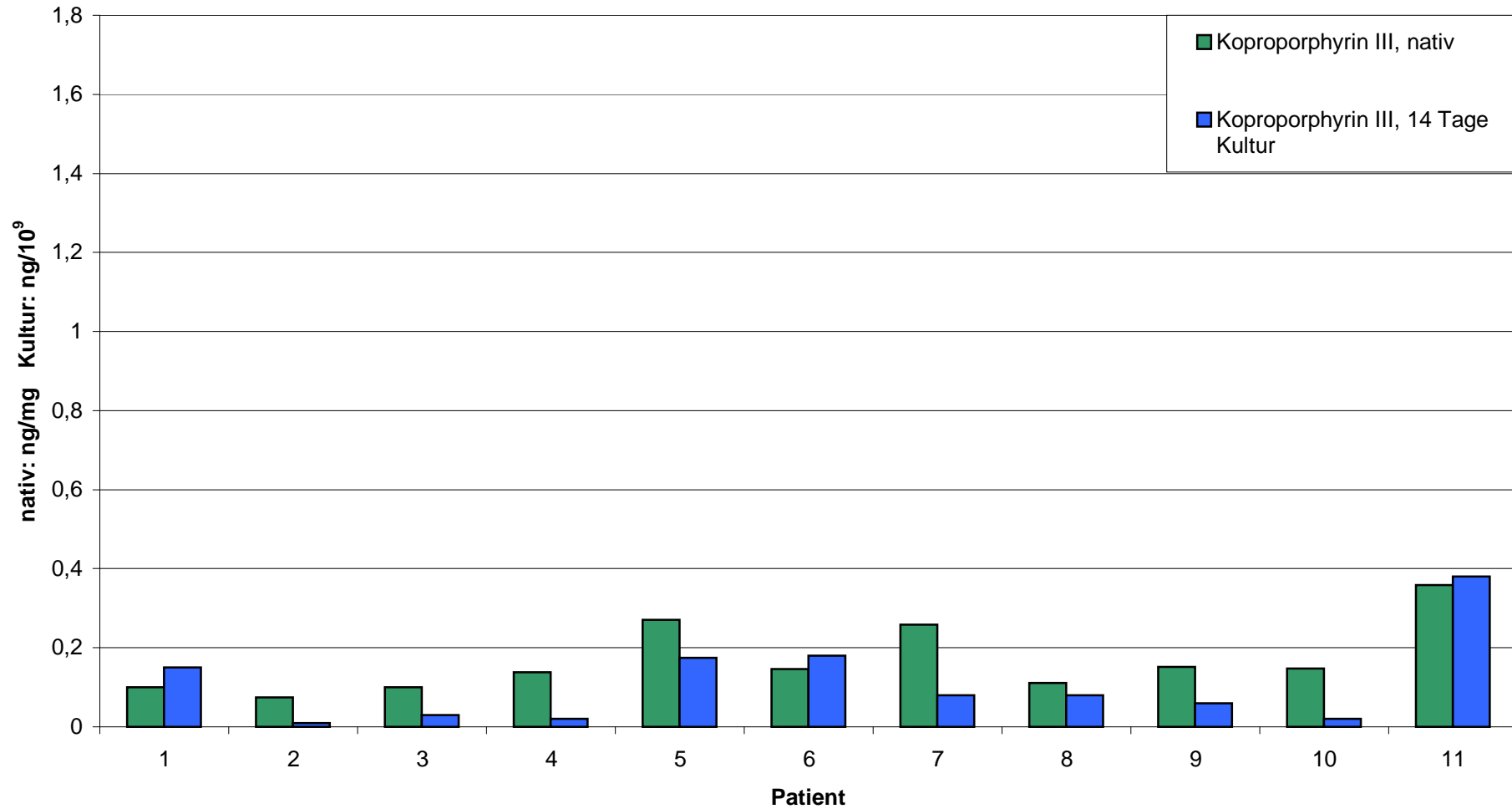


Abbildung 16: Vergleich von *in vivo* und *in vitro* gewonnenen Protoporphyrin-Werten nach 7 tägiger Kultur

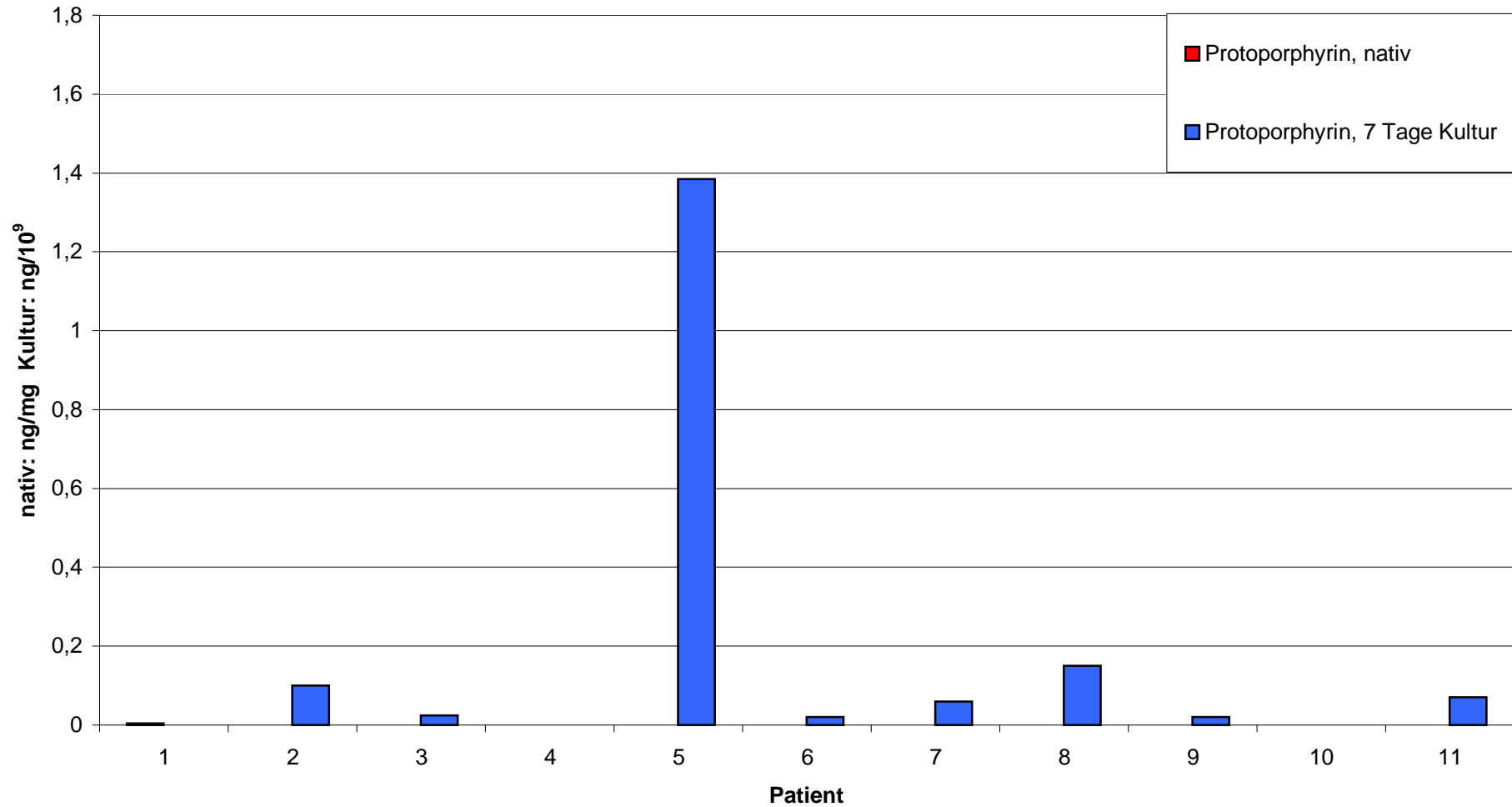


Abbildung 17: Vergleich von *in vivo* und *in vitro* gewonnenen Protoporphyrin-Werten nach 14 tägiger Kultur

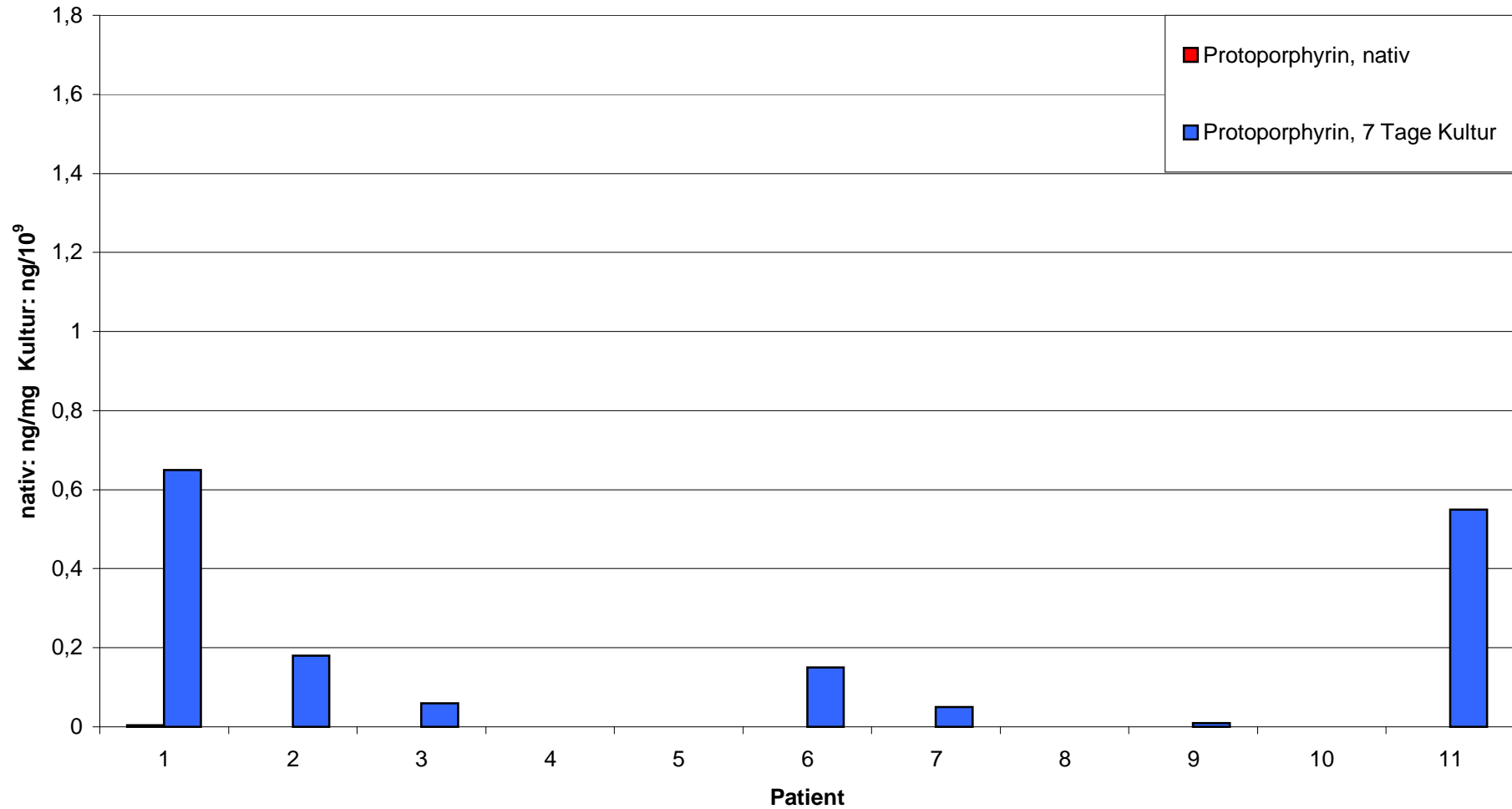


Tabelle 9: Porphyrinbestimmung aus Bakterienkulturen, Material Pustel

Patient	Kultur 7 Tage				Kultur 14 Tage			
	Kopro I	Kopro III	Proto	Uro I	Kopro I	Kopro III	Proto	Uro I
1	0,05	0,34	n.n.*	0,18	0,01	0,12	n.n.*	n.n.*
2	n.n.*	0,18	0,1	n.n.*	0,01	0,12	0,05	n.n.*
3	n.n.*	0,02	n.n.*	n.n.*	n.n.*	0,03	n.n.*	
4	0,08	n.n.*	n.n.*	n.n.*	n.n.*	0,16	n.n.*	0,05

* : nicht nachweisbar, der Meßwert lag unter einer Nachweisgrenze von 0,01 ng

Kopro I: Koproporphyrin I; Kopro III: Koproporphyrin III; Proto: Protoporphyrin; Uro I: Uroporphyrin I

4. Diskussion

Die Rolle von *P. acnes* in der Pathogenese der Akne ist bisher trotz zahlreicher Studien und einer Vielzahl an Literatur noch nicht hinlänglich geklärt. Eine zentrale Frage lautet hierbei, in welcher Form *P. acnes* an den im Rahmen der Akne stattfindenden Entzündungsvorgängen beteiligt ist. Lange Zeit wurde hierfür vor allem die Produktion von Lipase durch *P. acnes* und die damit einhergehende Generierung von freien Fettsäuren aus Triglyzeriden verantwortlich gemacht. Anscheinend spielen aber auch andere Faktoren eine wichtige Rolle, so zum Beispiel eine Komplementaktivierung, vor allem auf dem alternativen Reaktionsweg und damit eine Neutrophilen - Chemotaxis durch *P. acnes*^{188, 189}. Auch eine zelluläre Immunität gegenüber *P. acnes* könnte an Entzündungsreaktionen beteiligt sein¹⁶¹. Abgesehen von diesen immunologischen Faktoren werden immer mehr Stoffwechselprodukte von *P. acnes* wie Porphyrine diskutiert.

Diese farbigen Verbindungen, die für die charakteristische orangefarbene Follikelfluoreszenz im Gesicht verantwortlich zeichnen, werden in den Bakterien intrazellulär gespeichert. *In-vitro*-Untersuchungen an Bakterienkulturen ergaben sowohl quantitativ als auch qualitativ unterschiedliche Werte bezüglich der Porphyrinproduktion und ihrer Abgabe an die Umgebung, auch in Abhängigkeit der einzelnen *P.-acnes*-Stämme und der Kulturbedingungen. Vor allem bei entzündlichen Akneläsionen konnte eine vermehrte Abgabe von Porphyrinen an das umgebende Gewebe nachgewiesen werden⁸⁵. Diese könnten dort eine Entzündungsreaktion auslösen oder mit unterhalten.

Zur Differenzierung der einzelnen Porphyrinklassen werden leistungsfähige Trennverfahren wie die Dünnschichtchromatographie oder die HPLC-Methode verwendet. Der Hauptvorteil der HPLC-Analyse gegenüber planaren chromatographischen Trennverfahren ist die Möglichkeit der Isomerentrennung von Porphyrinen .

Ebenfalls sehr vorteilhaft bei diesem Verfahren ist, daß durch die Säulentchnik die sehr empfindlichen Porphyrine Licht- und Sauerstoff geschützt sind. Somit können ohne Verluste auch geringe Mengen an Porphyrinen analysiert werden.

Die Porphyrinwerte zeigten bei den Patienten quantitativ starke individuelle Schwankungen. Jedoch konnte bei allen Patienten unabhängig von der Art der Therapie Koproporphyrin III als größte Porphyrinfraktion nachgewiesen werden, gefolgt von weit niedrigeren Werten an Koproporphyrin I und Protoporphyrin. Polare Porphyrine wie Uroporphyrin konnten bei den *In-vivo*-Bestimmungen nicht nachgewiesen werden. In früheren *In-vitro*-Untersuchungen stellte meist ebenfalls Koproporphyrin III die größte Porphyrinfraktion, gefolgt von Koproporphyrin I und Protoporphyrin dar^{40, 43, 111, 95, 118}, in wenigen Untersuchungen konnte

Protoporphyrin als die größte Porphyrinfraktion vor Koproporphyrin III ermittelt werden^{84, 162}. Uroporphyrine konnten nur in zwei Untersuchungen nachgewiesen werden^{118, 162}.

Vergleicht man die Mediane von Koproporphyrin III der einzelnen Therapiegruppen, so fällt auf, daß die mit Isotretinoin behandelten Patienten deutlich niedrigere Koproporphyrin-III-Werte aufweisen. Dies erklärt sich aus der Wirkungsweise des Isotretinoins und korreliert auch mit dem klinischen Befund. Durch die starke Sebumsuppression wird *P. acnes* der Nährboden entzogen und es kommt zu einer Reduktion der Bakteriendichte, was wiederum die niedrigen Porphyrinwerte erklärt. Bei der statistischen Analyse mit dem Mann-Whitney-U Test für unverbundene Stichproben waren diese Unterschiede aufgrund der starken Schwankungen der Porphyrinmengen nicht signifikant (Kruskal-Wallis-Test, $p=0,119$). Im Gegensatz dazu konnte bei den Patienten mit einer kombinierten systemischen Isotretinointherapie und Lokalthherapie mit Benzoylperoxid beziehungsweise Benzoylperoxid und einem topischen Retinoid keine Abnahme, sondern eine geringfügige Erhöhung der Koproporphyrin-III-Werte gemessen werden.

Um diese Meßergebnisse erklären zu können, muß das Patientenkollektiv, welches kombinierte systemische und lokale Therapie erhielt, näher beleuchtet werden. Dabei fällt auf, daß diese Patienten im Gegensatz zu den nur mit Isotretinoin behandelten Patienten einen deutlich schlechteren Hautbefund im Sinne einer vermehrten Komedogenese und gesteigerten Entzündungsaktivität und auch ein verzögertes Ansprechen auf Isotretinoin zeigten.

So läßt sich zusammenfassen, daß Patienten, welche gut auf Isotretinoin ansprachen, auch keine zusätzliche Lokalthherapie mehr erhielten, wohingegen Patienten, die nur langsam auf Isotretinoin ansprachen, unterstützend eine Lokalthherapie mit Benzoylperoxid oder topischen Retinoiden durchführten. Insofern korreliert der klinische Befund hier ebenso wie bei den nur systemisch mit Isotretinoin behandelten Patienten mit den gemessenen Porphyrinwerten.

Bei den mit Minozyklin und Lokalthapeutika behandelten Patienten konnte ebenfalls eine Zunahme der Koproporphyrin-III-Werte beobachtet werden. Martin et al. wiesen nach Tetrazyklintherapie einen Rückgang der Besiedlungsdichte durch *P. acnes* sowie einen Rückgang der Follikelfluoreszenz nach¹⁰⁸. Demnach müßten die Porphyrinwerte unter einer ausreichenden antibiotischen Therapie absinken. Da dies nicht der Fall ist, kann mehrere Ursachen haben. Ein wichtiger Faktor ist die Resistenzentwicklung auf oral applizierte Antibiotika, die bei Minozyklin seltener als bei anderen in der Aknetherapie verwendeten Substanzen wie beispielsweise Erythromyzin vorkommt.

Von 17 der mit Minozyklin und Lokalthherapie behandelten Patienten konnte bei 11 Patienten eine klinische Besserung des Hautbefundes festgestellt werden. Bei den restlichen 6 Patienten zeigte sich dagegen keine Änderung des Hautbefundes im Sinne einer geringeren Entzündungsaktivität. Die Tatsache, daß bei 11 Patienten trotz fehlendem Rückgang der Porphyrinwerte eine klinische Besserung unter Minozyklin eingetreten ist, demnach also entweder eine Anhebung der *P. acnes* - Dichte oder eine vermehrte Porphyrinproduktion von *P. acnes* eingetreten ist, spricht dafür, daß der therapeutische Nutzen der Tetracykline nicht in deren antimikrobiellen Eigenschaften zu suchen ist, sondern vielmehr in ihrer antiinflammatorischen Wirkung, beispielsweise durch die Hemmung von Lipasen, liegt.

Bei *In-vitro*-Untersuchungen zeigte sich, daß die nativen, also direkt aus Komedonen extrahierten Koproporphyrin-III-Werte höher liegen als unter Kulturbedingungen gemessen werden konnte. Konträr dazu lagen die *in vivo* gemessenen Protoporphyrinwerte meist im nicht nachweisbaren Bereich. Nach kultureller Bebrütung ließ sich ein Anstieg der Protoporphyrine erkennen. Dieses Phänomen der Umwandlung von Koproporphyrin III unter kulturellen, auch anaeroben Bedingungen, in Protoporphyrin-IX ist in der Literatur bekannt³⁶. Porphyrine sind nicht nur bezüglich der Pathogenese der Akne ein interessantes Gebiet, sondern bieten auch hinsichtlich neuerer Therapiemöglichkeiten weitere Möglichkeiten. Die therapeutische Umsetzung der zytotoxischen Effekte der Porphyrine unter Lichteinstrahlung sind aus der Tumorthherapie mittels photodynamischer Therapie bekannt. Der lichtsensibilisierende Effekt der Porphyrine am Menschen wurde erstmals 1913 durch Meyer-Betz entdeckt, der sich im Eigenexperiment intravenös Hämatoporphyrin zuführte und durch nachfolgende Sonnenbestrahlung schwere Erytheme und Ödeme an lichtexponierten Körperstellen zuzog⁷. Nach Lichtabsorption erfolgt über sauerstoffabhängige Energie-Transferprozesse die Bildung von Singulett-Sauerstoff. Dieses hochreaktive Zwischenprodukt führt zu irreversibler Oxidierung von essentiellen Zellkomponenten und kann so zu Gewebeschädigung und Zelltod führen. Somit wirken Porphyrine als endogene Photosensibilisatoren. Durch UV-Bestrahlung von Aknepatienten wurden keine oder nur sehr schwach ausgeprägte Verbesserungen¹²⁴ beziehungsweise sogar eine Verschlechterung des Hautbefundes, hauptsächlich als Zunahme der Komedogenese¹²⁵, nachgewiesen. Dem gegenüber stehen Untersuchungen von Meffert et al. und Lassus, die eine deutliche Besserung der Akne unter UV-Therapie feststellten^{93, 113, 114}. Das Problem bei dieser Therapie liegt in dem großen Spektrum an Nebenwirkungen wie vorzeitige Hautalterung und Karzinogenese. Die photoinduzierte Inaktivierung von *P. acnes* ohne Zusatz von exogenen Photosensibilisatoren durch Bestrahlung mit Blaulicht konnte durch Kjeldstad und Johnson

sowie durch Meffert demonstriert werden^{83, 112}. König und Mitarbeiter wiesen diesen Effekt auch bei Bestrahlung mit Rotlicht nach⁸⁹. Sigurdsson et al. konnten eine Verringerung der Porphyrinproduktion von *P. acnes* unter sichtbarem Licht im violetten und grünen Bereich nachweisen. Eine klinische Besserung wurde vor allem bei entzündlichen Akneeffloreszenzen festgestellt, weniger bei der Anzahl und Neubildung von Komedonen¹⁷⁰. Meffert et al. konnten unter Verwendung eines Hochdruckstrahlers vom Blaulichttyp eine Verminderung sowohl des Akne- als auch des Seborrhoe-Schweregrades zeigen. Die Koproporphyrin-III-Werte nach Lichttherapie waren vermindert. Zudem konnte ein direkter Zusammenhang zwischen dem Koproporphyrin-III-Gehalt von Komedonen und dem Schweregrad der Akne nachgewiesen werden¹¹⁵.

Diesen und unseren eigenen Ergebnissen zufolge ist eine Lichttherapie der Akne mit sichtbarem Licht, auch in Kombination mit Lokaltherapeutika eine möglicherweise effektive und nebenwirkungsarme Alternative zu einer medikamentösen Aknetherapie.

5. Zusammenfassung

Acne vulgaris ist eine sehr häufige Hauterkrankung, die bevorzugt während der Pubertät auftritt. Die Pathogenese dieser Erkrankung ist multifaktoriell und nicht restlos aufgeklärt.

Ein pathogenetischer Faktor bei der Entstehung der Akne ist *P. acnes*, ein grampositives, anaerobes beziehungsweise mikroaerophiles Bakterium, welches in den tiefen Abschnitten des Talgdrüsenfollikels angesiedelt ist. Bisher sind verschiedene Stoffwechselprodukte dieses Bakteriums nachgewiesen worden, von denen einige an Komedogenese und Entzündungsreaktionen beteiligt sind.

Die orangefarbene Fluoreszenz, die vor allem an Follikelöffnungen im Gesicht zu beobachten ist, konnte auf die Porphyrinproduktion von *P. acnes* zurückgeführt werden. Unter ausreichender Aknetherapie konnte eine Reduktion der Besiedelungsdichte von *P. acnes* sowie ein Rückgang der Fluoreszenz nachgewiesen werden.

Antibiotika werden in der Aknetherapie vor allem bei stark entzündlichen Akneformen eingesetzt. Ihr Effekt ist meist nur von vorübergehender Dauer. Zudem erschweren die immer häufiger auftretenden resistenten *P. acnes*-Stämme die Therapie.

Isotretinoin ist, systemisch appliziert, das wirksamste Aknetherapeutikum. Es verändert durch seinen stark ausgeprägten sebumsuppressiven Effekt das Mikroklima von *P. acnes* und reduziert so die Bakteriendichte.

Zielsetzung dieser Arbeit war die *In-vivo*-Bestimmung von Porphyrinen aus *P. acnes* und der Nachweis von Änderungen der Porphyrinmenge und Porphyrinfraktionen unter Antibiotikatherapie beziehungsweise Isotretinointherapie sowie die Diskussion von möglichen Konsequenzen für weitere Therapieformen der Akne.

Hierbei wurde eine Porphyrinextraktion aus Komedonen und eine Auftrennung dieses Gemisches mittels HPLC-Technik durchgeführt. Es konnte festgestellt werden, daß die größte Porphyrinfraktion immer Koproporphrin III war. Protoporphyrine und Koproporphyrin I waren nur in kleinen Mengen, polare Porphyrine nicht nachweisbar. Bezüglich der unterschiedlichen Therapiegruppen konnte unter Isotretinointherapie im Vergleich zu unbehandelten Patienten ein deutlicher, wenn auch aufgrund der Patientenzahlen nicht signifikanter Rückgang der Porphyrinkonzentration festgestellt werden. Dieses Ergebnis, welches auch klinisch mit dem Hautbefund der Patienten korreliert, wird auf den sebumsuppressiven Effekt von Isotretinoin zurückgeführt. Hingegen konnte unter einer Kombinationstherapie mit systemischem Isotretinoin und einer Lokalthherapie mit Benzoylperoxid beziehungsweise Benzoylperoxid und Retinoiden keine Reduktion der

Porphyrinkonzentration festgestellt werden. Auch dieses Ergebnis korreliert mit dem Hautbefund der Patienten, da bei diesem Kollektiv mit zusätzlicher Lokalthherapie auch der Hautbefund schlechter war. Unter systemischer Antibiotikatherapie konnte keine Reduktion, sondern im Gegenteil ein leichter Anstieg der Porphyrinkonzentration bei gleichbleibendem klinischen Hautbefund festgestellt werden. Dies wird auf das allgemein bekannte Phänomen der Resistenzentwicklung gegen antibiotische Substanzen zurückgeführt, das gerade auch bei den in der Aknetherapie eingesetzten Tetrazyklinen weit verbreitet ist. Zudem konnte in ergänzenden Untersuchungen mit *P. acnes* Kulturen eine vermehrte Verschiebung der Koproporphyrine-III-Werte zu Protoporphyrinen nachgewiesen werden.

Zusammenfassend konnte die *In-vivo*-Porphyrinproduktion von *P. acnes* quantitativ und qualitativ nachgewiesen werden. Eine Reduktion der Porphyrinkonzentration konnte durch therapeutischen Einsatz von systemischen Isotretinoin aufgezeigt werden.

Dies könnte zu neuen Therapieformen der Acne vulgaris führen, die direkt auf die Porphyrinproduktion Porphyrinspeicherung von *P. acnes* einwirken, wie zum Beispiel die Lichttherapie mit Blau- oder Rotlicht (400-420 nm).

6. Anhang

Substanzen und Reagenzien für die HPLC-Gradienten 1 und 2

Porphyrine (Paesel, Frankfurt)
Tetrabutylammoniumhydroxid 40% in H₂O (Fluka, Buchs, CH)
Orthophosphorsäure 85%ig p.a. (Merck, Darmstadt)
Methanol (Merck, Darmstadt)
Azeton (Merck, Darmstadt)
KH₂PO₄ p.a. (Merck, Darmstadt)
KH₂PO₄ p.a. (Merck, Darmstadt)
I₂ p.a. (Merck, Darmstadt)
KI p.a. (Merck, Darmstadt)
Na₂S₂O₃ p.a. (Merck, Darmstadt)

Lösungsmittel für die HPLC-Standards und -Proben

50 mM TBPA (8,27 g Tetrabutylammoniumhydroxid 40% in H₂O +
200 ml Methanol + 600 µl Orthophosphorsäure 85 %ig + 50 ml H₂O, pH 7,3)

Fließmittelsystem für Gradient 1

H₂O (10 mM Phosphat-Puffer): 1,36 g KH₂PO₄ in 1 l H₂O lösen und 1,174 g KH₂PO₄ in 100 ml H₂O lösen; durch Mischen auf pH 5,4 einstellen. Methanol (5 MM TBPA): 3,31g Tetrabutylammoniumhydroxid (40% in H₂O) mit Methanol und 240 µl Orthophosphorsäure (85%ig) auf 1 l auffüllen (pH 7,3)

Standard-Gradient 1

Uro-I, Kopro-I, Kopro-III, Meso- und Protoporphyrin werden mit 10 ml 50 MM TBPA gelöst; der externe Standard enthält je 1 pmol Porphyrin / µl. Davon werden 10 µl für die HPLC-Analyse injiziert.

Fließmittelsystem für Gradient 2

H₂O (40 mM Phosphat-Puffer): 10,88 g KH₂PO₄ in 2 l H₂O lösen und 0,69 g KH₂PO₄ in 100 ml lösen; durch Mischen auf pH 5,4 einstellen
Methanol (12,5 mM TBPA): 16,55 g Tetrabutylammoniumhydroxid (40 % in H₂O) mit Methanol und 1,2 ml Orthophosphorsäure (85 %ig) auf 2 l auffüllen (pH 7,3)

Standard-Gradient 2

Uro-, Hepta-, Hexa-, Penta-, Kopro- (alle Isomer I) und Mesoporphyrin werden mit 10 ml 50 mM TBPA gelöst; der so hergestellte externe Standard enthält je 1 pmol Porphyrin / μl . Davon werden 10 μl für die HPLC-Analyse injiziert.

7. Literaturverzeichnis

1. Akamatsu H, Horio T (1998) The possible role of reactive oxygen species generated by neutrophils in mediating acne inflammation. *Dermatology* 196: 82-85
2. Allaker RP, Greenman J, Osborne RH (1987) The production of inflammatory compounds by *Propionibacterium acnes* and other skin organisms. *Br J Dermatol* 117: 175-183
3. Arakane K, Ryu A, Hayashi C, Masunaga T, Shinmoto K, Mashiko S, Nagano T, Hirobe M (1996) Singlet oxygen generation from coproporphyrin in *Propionibacterium acnes* on irradiation. *Biochem Biophys Res Commun* 223: 578-582
4. Arrese, JE, Goffin V, Avila-Camacho M, Greimers R, Pierard GE (1998) A pilot study on bacterial viability in acne. Assessment using dual flow cytometry on microbials present in follicular casts and comedones. *Int J Dermatol* 37: 461-464
5. Barker DS, Henderson RW, Storey E (1970) The in vivo localization of porphyrins. *Br J Exp Pathol* 51: 628-638
6. Berch H (1928) Studien über Porphyrine. *Deutsch Med Wochenschr* 36: 1492-1494
7. Berns MW, McCullough JL (1986) Porphyrin sensitized phototherapy. *Arch Dermatol* 122: 871-874
8. Bickers DR (1986) Photoradiation diagnosis and therapy: dermatologic and photobiologic aspects. *Invest Radiol* 21: 885-890
9. Bijlmer-Jest JC, Baart de la Faille H, Van Hattum J, Van Weelden H Max JJ, Koningsberger JC (1992) Protoporphyrin photosensitivity cannot be attenuated by oral N-acetylcystein. *Photodermatol Photoimmunol Photomed* 9: 245-249
10. Bissonnette R, Zeng H, McLean DI, Schreiber WE, Roscoe DL, Lui H (1998) Psoriatic plaques exhibit red autofluorescence that is due to protoporphyrin IX. *J Invest Dermatol* 111: 586-591
11. Blaner WS (2001) Cellular metabolism and actions of 13-*cis*-retinoic acid. *J Am Acad Dermatol* 45: 129-135
12. Bommer S (1926) Hautuntersuchungen in gefiltertem Quarzlicht II. *Dermtol Wochenschr* 19: 637-644
13. Bonnett R (1981) Oxygen activation and tetrapyrroles. *Essays Biochem* 17: 1-51
14. Bonnett R, Charalambides AA, Jones K, Magnus IA (1978) The direct determination of porphyrin carboxylic acids. High-pressure liquid chromatography with solvent systems containing phase-transfer agents. *Biochem J* 173: 693-696
15. Bonnett R (1973) Some recent advances in tetrapyrrole chemistry. *Ann NY Acad Sci* 206: 722-735

16. Brazier JS (1990) Analysis of the porphyrin content of fluorescent pus by absorption spectrophotometry and high performance liquid chromatography. *J Med Microbiol* 33: 29-34
17. Carraro C, Pathak MA (1988) Studies on the nature of in vitro and in vivo photosensitization reactions by psoralens and porphyrins. *J Invest Dermatol* 90: 267-275
18. Carrie C (1943) Die Ursache der Porphyrin-Fluoreszenz in der Mundhöhle und auf der Haut. *Dermtol Z* 70: 189-193
19. Chatterjee SR., Srivastava TS, Kamat JP, Devasagayam TPA (1996) Lipid peroxidation induces by a novel porphyrin plus light in isolated mitochondria: Possible implications in photodynamic therapy. *Mol Cell Biochem* 166: 25-33
20. Clewell HJ 3rd, Andersen ME, Wills RJ, Latriano L (1997) A physiologically based pharmacokinetic model for retinoic acid and its metabolites. *J Am Acad Dermatol* 36: 77-85
21. Coates P, Vyakrnam S, Eady EA, Jones CE, Cove JH, Cunliffe WJ (2002) Prevalence of antibiotic-resistant propionibacteria on the skin of acne patients: 10-year surveillance data and snapshot distribution study. *Br J Dermatol* 146: 840-848
22. Cooper AJ (1998) Systemic review of Propionibacterium acnes resistance to systemic antibiotics. *Med J Aust* 169: 259-261
23. Corneluis Ch E, Ludwig GD (1967) Red Fluorescence of comedones: production of porphyrins by Corynebacterium acnes. *J Invest Dermatol* 40: 368- 370
24. Cunliffe WJ (1993) Biochemie des Talgdrüsenfollikels. In: Cunliffe WJ Akne. Hippokrates, Stuttgart, S 163-177
25. Cunliffe WJ (1993) Mikrobiologie der Akne. In: Cunliffe WJ Akne. Hippokrates, Stuttgart, S. 178-210
26. Cunliffe WJ (1993) Das Infundibulum des Talgdrüsenfollikels. In: Cunliffe WJ Akne. Hippokrates, Stuttgart, S 211-231
27. Cunliffe WJ (1993) Entzündungsvorgänge bei der Akne. In: Cunliffe WJ Akne. Hippokrates, Stuttgart, S 232-245
28. Cunliffe WJ, Holland DB, Clark SM, Stables GI (2000) Comedogenesis: some new aetiological, clinical and therapeutic strategies. *Br J Dermatol* 142: 1084-1091
29. Dalle Carbonare M, Pathak MA (1992) Skin photosensitizing agents and the role of reactive oxygen species in photoaging. *J Photochem Photobiol B* 14: 105-124

30. De Young LM, Spires DA, Ballaron SJ, Cummins CS, Young JM, Allison AC (1985) Acne-like chronic inflammatory activity of *Propionibacterium acnes* preparation in an animal model: correlation with ability to stimulate the reticuloendothelial system. *J Invest Dermatol* 85: 255-258
31. De Young LM, Young JM, Ballaron SJ, Spires DA, Puhvel SM (1984) Intradermal injection of *Propionibacterium acnes*: a model of inflammation relevant to acne. *J Invest Dermatol* 83: 394-398
32. Divaris DXG, Kennedy JC, Pottier RH (1990) Phototoxic damage to sebaceous glands and hair follicles of mice after systemic administration of 5-Aminolevulinic acid correlates with localized protoporphyrin IX fluorescence. *Am J Pathol* 136: 891-897
33. Doss M (1969) Trennung, Isolierung und Bestimmung von Proto-Kopro-, Pentacarboxy-, Hexacarboxy- und Uroporphyrin. *Hoppe-Seyler's Z Physiol Chem* 350: 499-502
34. Doss M (1971) Excretion of porphyrins by bacteria. *Experientia* 27: 376- 377
35. Eady EA (1998) Bacterial resistance in acne. *Dermatol* 196: 59-66
36. Eady EA, Cove JH (2000) Is acne an infection of blocked pilosebaceous treatment? *Am J Clin Dermatol* 1: 201-209
37. Eady EA, Ingham E, Walters CE, Cove JH, Cunliffe WJ (1993) Modulation of comedonal levels of interleukin-1 in acne patients treated with tetracyclines. *J Invest Dermatol* 101: 86-91
38. Ehteshamuddin AFM (1968) Anaerobic formation of protoporphyrin IX from coproporphyrinogen III by bacterial preparations. *Biochem J* 107: 446-447
39. Elewski BE, Lamb BA, Sams WM, Gammon WR (1983) In vivo suppression of neutrophil chemotaxis by systemically topically administered tetracycline. *J Am Acad Dermatol* 8: 807-812
40. Epstein JH, Tuffanelli DL, Seibert JS, Epstein WL (1976) Porphyria-like cutaneous changes induced by tetracycline hydrochloride photosensitization. *Arch Dermatol* 112: 661-666
41. Esterly NB, Koransky JS, Furey NL, Trevisan M (1984) Neutrophil chemotaxis in patients with acne receiving oral tetracycline therapy. *Arch Dermatol* 120: 1308-1313
42. Fanta D, Formanek I, Poitschek Ch, Thurner J; (1978) Die Porphyrinproduktion des *Propionibacterium acnes* bei Akne und Seborrhoe. *Arch Dermatol Res* 261: 175-179
43. Fanta D, Formanek, Poitschek, Thurner J (1981) Die Porphyrinproduktion des *Propionibacterium acnes* in Abhängigkeit von externen Einflüssen. *Arch Dermatol Res* 271: 127-133

44. Fluhr JW, Gloor M (1997) The antimicrobial effect of narrow-band UVB (313nm) and UVA 1 (345-440nm) radiation in vitro. *Photodermatol Photoimmunol Photomed* 13: 197- 201
45. Formanek I, Fanta D, Poitschek Ch, Thurner J (1977) Porphyrinproduktion des *Propionibacterium acnes*. *Arch Dermatol Res* 259: 169-176
46. Fritsch C, Goerz G, Ruzicka T (1998) Photodynamic therapy in dermatology. *Arch Dermatol* 134: 207-214
47. Fuhrhop JH, Smith KM (1975) Laboratory methods. In: Smith KM (eds) *Porphyryns and Metalloporphyryns*. Elsevier, Amsterdam, pp 829-839; 851-869
48. Futsaether CM, Kjeldstad B, Johnsson A (1995) Intracellular pH changes induces in *Propionibacterium acnes* by UVA radiation and blue light. *J Photochem Photobiol B* 31: 125-131
49. Futsaether CM, Kjeldstad B, Johnsson A (1993) Measurement of the intracellular pH of *Propionibacterium acnes*: comparison between the fluorescent probe BCECF and ³¹P-NMR spectroscopy. *Can J Microbiol* 39: 180-186
50. Gehse M, Höffler U, Gloor M, Pulverer G (1983) *Propionibacteria* in patients with acne vulgaris and in healthy persons. *Arch Dermatol Res* 275: 100-104
51. George P (1973) Thermodynamic aspects of porphyrin synthesis and biosynthesis. *Ann NY Acad Sci* 206: 84-86
52. Gfesser M; Worret WI (1996) Seasonal variations in the severity of acne vulgaris. *Int J Dermatol* 35: 116-117
53. Gillies R, Zonios G, Anderson RR, Kollias N (2000) Fluorescence excitation spectroscopy provides information about human skin in vivo. *J Invest Dermatol* 115: 704-707
54. Girotti AW (1992) Photosensitized oxidaton of cholesterol in biological systems: reaction pathways, cytotoxic effects and defense mechanisms. *J Photochem Photobiol B: Biol* 13: 105-118
55. Gloor M, Habedank W-D (1976) Zur Pathogenese der Acne vulgaris. *Münch Med Wochenschr* 118: 649-652
56. Gloor M, Lamerz A, Höffler U, Franke M (1980) Über die *Propionibakterien* im Talgdrüseninfundibulum der nicht erkrankten Haut bei Acne vulgaris. *Dermatol Monatsschr* 166: 798-803
57. Van Gog H, Schothorst AA (1973) Determination of very small amounts of protoporphyrin in epidermis, plasma, and blister fluid. *J Invest Dermatol* 61: 42-45
58. Goltz RW; Kjartansson S (1966) Oral tetracycline treatment on bacterial flora in acne vulgaris. *Arch Dermatol* 93: 92-100

59. Gould DJ, Cunliffe WJ, Holland DB (1977) Chemotaxis and acne. *J Invest Dermatol* 68: 251
60. Gould DJ, Ingham E, Gowland G, Cunliffe WJ (1979) Leukocyte chemotaxis in acne vulgaris: the role played by *Propionibacterium acnes* and host factors. *Br J Dermatol* 101: 104-105
61. Gray CH, Lim CK, Nicholson CC (1977) The differentiation of the porphyrias by means of high pressure liquid chromatography. *Clin Chim Acta* 77: 167-178
62. Gribbon EM, Schoesmith JG, Cunliffe WJ, Holland KT (1994) The microaerophily and photosensitivity of *Propionibacterium acnes*. *J Appl Bacteriol* 77: 583-590
63. Hernandez LG, Puhvel M (1978) Analysis of the water soluble extract of comedones. *J Invest Dermatol* 71: 330-333
64. Higaki S, Kitagawa T, Kagoura M, Morohashi M, Yamagishi T (2000) Corelation between *Propionibacterium acnes* biotypes, lipase activity and rash degree in acne patients. *J Dermatol* 27: 519-522
65. Hofman, E (1996) Porphyrine - Struktur , Funktion und Stoffwechsel. In: Hofman, E *Medizinische Biochemie systematisch*. UNI-MED, Lorch, S 449-460
66. Holland DB, Cunliffe WJ (1983) Skin surface and open comedone pH in acne patients. *Acta Dermato Venereol (Stockh)* 63: 155-158
67. Holland KT, Ingham E, Cunliffe WJ (1981) A review: the microbiology of acne. *J Appl Bacteriol* 51: 195
68. Holland KT, Aldana O, Bojar RA, Cunliffe WJ, Eady EA, Holland DB, Ingham E, McGeown C, Till A, Walters C (1998) *Propionibacterium acnes* and acne. *Dermatol* 196: 67-68
69. Hongcharu W, Taylor CR, Chang Y, Aghassi D, Suthamjariya K, Anderson RR (2000) Topical ALA-Photodynamic therapy for the treatment of acne vulgaris. *J Invest Dermatol* 115: 183-192
70. Hopf FR, Whitten DG (1975) Photochemistry of porphyrins and metalloporphyrins. In: Smith KM (eds) *Porphyrins and Metalloporphyrins*. Elsevier Amsterdam, pp 667-700
71. Inuma S, Farshi SS, Ortel B, Hasan T (1994) A mechanistic study of cellular photodestruction with 5-aminolaevulinic acid-induced porphyrin. *Br J Cancer* 70: 21-28
72. Ingham E, Eady EA, Goodwin CE, Cove JH, Cunliffe WJ (1992) Pro-inflammatory levels of interleukin-1 α -like bioactivity are present in the majority of open comedones in acne vulgaris. *J Invest Dermatol* 98: 896-901
73. Jacob K, Demant T (1998) Diagnostik und Klinik der Porphyrien. *Münch Med Wochenschr* 140: 52-57

74. Jacob K, Luppá P (1991) Application of ion pair high performance liquid chromatography to the analysis of porphyrins in clinical samples. *Biomed Chromatogr* 5: 122-127
75. Jacobs NJ, Jacobs JM, Brent P (1970) Formation of protoporphyrin from coproporphyrinogen in extracts of various bacteria. *J Bacteriol* 102: 398-403
76. Jansen T, Plewig G (1997) Advances and perspectives in acne therapy. *Eur J Med Res* 2: 321-234
77. Johnsson A, Kjeldstad B, Melo TB (1987) Fluorescence from pilosebaceous follicles. *Arch Dermatol Res* 279: 190-193
78. Kalka K, Fritsch C, Bolsen K, Verwohlt B, Goerz G (1997) Influence of indoles (melatonin, serotonin and tryptophan) on the porphyrin metabolism in vitro. *Skin Pharmacol* 10: 221-224
79. Keßeler T, Enderer K, Steigleder GK (1985) Die quantitative Analyse der Hautoberflächenlipide mit Hilfe einer Sebumetermethode. *Z Hautkr* 60: 857-865
80. Kiefer CR, McKenney JB, Trainor JF, Lambrecht RW, Bonkovsky HL, Lifshitz LM, Valeri CR, Snyder LM (1998) Porphyrin loading of lipofuscin granules in inflamed striated muscle. *Am J Path* 153: 703-708
81. Kjeldstad B; (1987) Different photoinactivation mechanisms in *Propionibacterium acnes* for near-ultraviolet irradiation. *Photochem Photobiol* 46: 363-366
82. Kjeldstad B (1984) Photoinactivation of *Propionibacterium acnes* by near-ultraviolet light. *Z Naturforsch C* 39: 300-302
83. Kjeldstad B, Heldad M, Nissen H, Bergan AS, Evjen K (1991) Changes in polyphosphate composition and localization in *Propionibacterium acnes* after near-ultraviolet irradiation. *Can J Microbiol* 37: 562-567
84. Kjeldstad B, Johnsson A (1987) A³¹P-NMR study of *Propionibacterium acnes*, including effects caused by near-ultraviolet irradiation. *Biochim Biophys Acta* 927: 184-189
85. Kjeldstad B, Johnsson A (1986) An action spectrum for blue and near ultraviolet inactivation of *Propionibacterium acnes*; with emphasis on a possible porphyrin photosensitization. *Photochem Photobiol* 43: 67-70
86. Kjeldstad B, Johnsson A, Furuheim M, Schie Bergan A, Krane J (1989) Hyperthermia induced polyphosphate changes in *Propionibacterium acnes* as studied by ³¹P NMR. *Z Naturforsch C* 44: 45-48
87. Kjeldstad B, Johnsson A, Sandberg S (1984) Influence of pH on porphyrin production in *Propionibacterium acnes*. *Arch Dermatol Res* 276: 396-400

88. Kjeldstad B, Melo TB, Johnsson A (1991) Near-UV-induced radicals in *Propionibacterium acnes*, studied by electron spin resonance spectrometry at 77 K. *J Photochem Photobiol B* 9: 181-187
89. Kligman AM, Plewig G (1976) Classification of acne. *Cutis* 17: 520- 522
90. Knop J, Ollefs K, Frosch PJ (1983) Anti-*P.acnes* antibody in comedonal extracts. *J Invest Dermatol* 80: 9-12
91. König K, Schneckenburger H, Meyer H, Rück A (1993) Fluoreszenzverhalten und photodynamische Aktivität von *Propionibacterium acnes*. *Akt Dermatol* 19: 199-201
92. Kohn K, Kessel D (1979) On the mode of cytotoxic action of photo-activated porphyrins. *Biochem Pharmacol* 28: 2465-2470
93. Koningsberger JC, van Asbeck BS, van Hattum J, Wiegman LJJM, van Berge Henegouwen GP, Marx JJM (1993) The effect of porphyrins on cellular redox systems: a study on the dark effect of porphyrins on phagocytes. *Eur J Clin Invest* 23: 716-723
94. Lamola AA (1982) Fluorescence studies of protoporphyrin. Transport and clearance. *Acta Dermato Venereol (Stockh) Suppl* 100: 57-66
95. Lassus A, Salo O, Förström L, Lauharanta J, Kanerva L, Juvakoski T (1983) Behandlung der Akne mit selektiver Ultraviolettphototherapie (SUP). *Dermatol Monatsschr* 169: 376-379
96. Lavker RM, Leyden JJ, McGinley KJ (1981) The relationship between bacteria and the abnormal follicular keratinisation in acne vulgaris. *J Invest Dermatol* 77: 325-330
97. Lee WL, Shalita AR, Poh-Fitzpatrick MB (1978) Comparative studies of porphyrin production in *Propionibacterium acnes* and *Propionibacterium granulosum*. *J Bacteriol* 133: 811-815
98. Leeming JP, Holland KT, Cunliffe WJ (1985) The pathological and ecological significance of microorganisms colonizing acne vulgaris comedones. *J Med Microbiol* 20: 11-16
99. Lehmann, HP, Robinson KA, Andrews JS, Holloway V, Goodman SN (2002) Acne therapy: a methodologic review. *J Am Acad Dermatol* 47: 231-240
100. Leyden JJ (2001) Current issues in antimicrobial therapy for the treatment of acne. *J Eur Acad Dermatol Venerol* 15: 51-55
101. Leyden JJ, McGinley KJ, Foglia A (1986) Qualitative and quantitative changes in cutaneous bacteria associated with systemic Isotretinoin therapy for acne conglobata. *J Invest Dermatol* 86: 390-393
102. Leyden JJ, McGinley KJ, Mills OH, Kligman AM (1975) *Propionibacterium* levels in patients with and without acne vulgaris. *J Invest Dermatol* 65: 382-384

103. Leyden JJ, McGinley KJ, Vowels B (1975) Propionibacterium acnes colonization in acne and nonacne. *Dermatology* 196: 55-58
104. Lim HW, Gigli I (1981) Role of complement in porphyrin-induced photosensitivity. *J Invest Dermatol* 76: 4-9
105. Lucchina, LC, Nikiforos K, Gillies R, Phillips SB, Muccini JA, Stiller MJ, Trancik RJ, Drake LA (1996) Fluorescence photography in the evaluation of acne. *J Am Acad Dermatol* 35: 58-63
106. Majeski Ja, Alexander JW (1977) Evaluation of tetracycline in the neutrophil chemotactic response. *J Lab Clin Med* 90: 259-265
107. Malik Z, Hanania J, Nitzan Y (1990) Bactericidal effects of photoactivated porphyrins. An alternative approach to antimicrobial drugs. *J Photochem Photobiol B* 5: 281-293
108. Marks R, Davies MJ (1969) The distribution in the skin of systemically administered tetracycline. *Br J Dermatol* 81: 448-451
109. Marples RR, McGinley KJ (1974) Corynebacterium acnes and other anaerobic diphtheroids from human skin. *J Med Microbiol* 7: 349-357
110. Martin RJ, Kahn G, Gooding JW, Brown G (1973) Cutaneous porphyrin fluorescence as an indicator of antibiotic absorption and effectiveness. *Cutis* 12: 758
111. Massey A, Mowray JF, Noble WC (1978) Complement activation by Corynebacterium acnes. *Br J Dermatol* 98: 583
112. Mauzerall DC (1998) Evolution of porphyrins. *Clin Dermatol* 16: 195-201
113. McGinley KJ, Webster GF, Leyden JJ (1980) Facial follicular porphyrin fluorescence: correlation with age and density of Propionibacterium acnes. *Br J Dermatol* 102: 437-441
114. Meffert H, Gaunitz K, Gutewort T, Amlong UJ (1990) Aknetherapie mit sichtbarem Licht. *Dermatol Monatsschr* 176: 597-603
115. Meffert H, Kölzsch J, Laubstein B, Sönnichsen N (1986) Phototherapie bei Akne vulgaris mit dem Teilkörperbestrahlungsgerät „TuR“ UV 10. *Dermatol Monatsschr* 172: 9-13
116. Meffert H, Laubstein B, Kölzsch J, Sönnichsen N (1986) Phototherapie bei Akne vulgaris mit dem UVA-Bestrahlungsgerät TGB 400. *Dermatol Monatsschr* 172: 105-106
117. Meffert H, Scherf HP, Sönnichsen N (1987) Behandlung von Akne vulgaris mit sichtbarem Licht. *Dermatol Monatsschr* 173: 678-679
118. Melo TB, Reisaeter G, Johnsson A (1985) Photodestruction of Propionibacterium acnes porphyrins. *Z Naturforsch [C]* 40: 125-128

119. Melo TB (1987) Uptake of protoporphyrin and violet light photodestruction of *Propionibacterium acnes*. *Z Naturforsch [C]* 42: 123-128
120. Melo TB, Johnsson M (1982) In vivo porphyrin fluorescence from *Propionibacterium acnes*. A characterization of the fluorescing pigments. *Dermatologica* 164: 167-174
121. Melnig B, Plewig G (1988) Neue lipidbiochemische Aspekte in der Pathogenese der folliculären Verhornungsstörungen bei *Acne vulgaris*. *Z Haut Geschlkrh* 63: 591-596
122. Melnik B, Kinner T, Plewig G 1988 Influence of oral isotretinoin treatment on the composition of comedonal lipids. Implications for comedogenesis in *acne vulgaris*. *Arch Dermatol Res* 280: 97-102
123. Mempel M, Abeck D (2001) Antibiotika. In: Korting HC, Sterry W (Hrsg) *Therapeutische Verfahren in der Dermatologie*. Blackwell, Berlin, S 615-629
124. Merchat M, Bertolini G, Giacomini P, Villanueva A, Jori G (1996) Meso-substituted cationic porphyrins as efficient photosensitizers of gram-positive and gram-negative bacteria. *J Photochem Photobiol B* 32:153-157
125. Meyer, VR (1990) Praxis der Hochleistungsflüssigkeitchromatographie. In: Meyer VR (Hrsg), Salle, Frankfurt, Aarau, S 1-36
126. Mills OH, Kligman AM (1978) Ultraviolet phototherapy and photochemotherapy of *acne vulgaris*. *Arch Dermatol* 114: 221-223
127. Mills OH, Porte M, Kligman AM (1978) Enhancement of comedonic substances by ultraviolet radiation. *Br J Dermatol* 98: 145-150
128. Moan J (1986) Porphyrin photosensitization and phototherapy. *Photochem Photobiol* 43: 681-690
129. Moore WEC, Cato EP (1963) Validity of *Propionibacterium acnes*. *J Bacteriol.* 85: 870-874
130. Mortazawo SA, Oberste-Lehn H (1973) Lichtsensibilisatoren und ihre therapeutischen Fähigkeiten. *Z Haut Geschlkrh* 48: 1-9
131. Mutzhas MF, Hölzle E, Hofmann C, Plewig G (1981) A new apparatus with high radiation energy between 320-460nm: physical description and dermatological applications. *J Invest Dermatol* 76: 42-47
132. Niebauer G (1979) Die Porphyrinproduktion des *Propionibacterium acne*. *Z Haut Geschlkrh* 54: 325
133. Nishijima S, Kurokawa I, Katoh N, Watanabe K (2000) The bacteriology of *acne vulgaris* and antimicrobial susceptibility of *Propionibacterium acnes* and *Staphylococcus epidermidis* isolated from *acne* lesions. *J Dermatol* 27: 318-323

134. Pagnoni A, Kligman AM, Kollias N, Goldberg S, Stoudemayer T (1999) Digital fluorescence photography can assess the suppressive effect of benzoyl peroxide on *Propionibacterium acnes*. *J Am Acad Dermatol* 41: 710-716
135. Papageorgiou P, Katsambas A, Chu A (2000) Phototherapy with blue (415 nm) and red (660 nm) light in the treatment of acne vulgaris. *Br J Dermatol* 142: 973-978
136. Pathak MA, Burnett JW (1963) The porphyrin content of skin. *J Invest Dermatol* 43: 119-120
137. Pathak MA, West JD (1982) Porphyrins: Office procedures and laboratory tests for diagnosis of porphyrin abnormalities. *Acta Dermato Venerol (Stockh) Suppl* 100: 91-105
138. Peck GL, Olsen TG, Yoder FW, Strauss JS, Downing DT, Pandya M, Butkus D, Arnaud-Battandier J (1979) Prolonged remissions of cystic and conglobate acne with 13-*cis*-retinoic acid. *N Engl J Med* 300: 329-333
139. Perisho K, Wertz PW, Madison KC, Stewart ME, Downing DT (1982) Fatty acids of acylceramides from comedones and from the skin surface of acne patients and control subjects. *J Invest Dermatol* 90: 350-353
140. Petkovich PM (2001) Retinoic acid metabolism. *J Am Acad Dermatol* 45: 136- 142
141. Petrides, PE (1997) Häm und Gallenfarbstoffe. In: Löffler G, Petrides PE (Hrsg), *Biochemie und Pathobiochemie*. Springer Berlin, S 601-621
142. Piérard-Franchimont C, Goffin V, Arrese JE, Martalo O, Braham C, Slachmuylders P, Piérard GE (2002) Lymecycline and minocycline in inflammatory acne. *Skin Pharmacol Appl Skin Physiol* 15: 112-119
143. Piomelli S (1973) A micromethod for free erythrocyte porpyrins: the FEP test. *J Lab Clin Med* 81: 932-940
144. Plewig G (1970) Cell morphology in exprimates from nose-follicles and comedones. *Arch Clin Exp Dermatol* 237: 703-716
145. Plewig G (1972) Progress in acne therapy (vitamin A acid). *Arch Dermatol Forsch* 244: 426-428
146. Plewig G (1974) Acne vulgaris: proliferative cells in sebaceous glands. *Br J Dermatol* 90: 623-630
147. Plewig G (1974) Follicular keratinization. *J Invest Dermatol* 62: 308-320
148. Plewig G (1980) Morphologic dynamics of acne vulgaris. *Acta Dermatol Venereol (Stockh) Suppl* 89: 9-16
149. Plewig G, Abrecht G, Henz BM, Meigel W, Schopf E, Stadler R (1997) Systemische Behandlung der Akne mit Isotretinoin: aktueller Stand. *Hautarzt* 48: 881-885

150. Plewig G, Fulton JE, Kligman AM (1971) Cellular dynamics of comedo formation in acne vulgaris. Arch Dermatol Forsch 242: 12-29
151. Plewig G, Gollnick H, Meigel W, Wokalek H (1981) 13-*cis* Retinsäure zur oralen Behandlung der Acne conglobata. Hautarzt 32: 634-646
152. Plewig G, Hennes R, Maas B, Mack-Hennes A (1986) Remissionsverhalten nach niedrigdosierter 13-*cis*-Retinsäuretherapie bei Acne papulo-pustulosa. Z Hautkr 61: 1205-1210
153. Plewig G, Kligman AM (2000) History of acne and rosacea. In: Plewig G, Kligman AM Acne and rosacea. Springer, Berlin, pp 1-11
154. Plewig G, Kligman AM (2000) Etiology, pathophysiology and nosology of acne. Acne and rosacea. Springer, Berlin pp 25-250
155. Plewig G, Kligman AM (2000) Systemic treatment. In: Plewig G, Kligman AM Acne and rosacea. Springer, Berlin pp 634- 696
156. Plewig G, Petrozzi JW, Berendes U (1970) Double-blind study of doxycycline in acne vulgaris. Arch Dermatol 101: 435-438
157. Plewig G, Schill WB, Hofmann C (1979) Oral treatment with tretinoin: andrological, trichological, ophthalmological findings and effects on acne. Arch Dermatol Res 265: 37-47
158. Plewig G, Wagner A (1981) Anti-inflammatory effects of 13-*cis*-retinoic acid. An *in vivo* study. Arch Dermatol Res 270: 89-94
159. Poh-Fitzpatrick MB (1986) Molecular and cellular mechanisms of porphyrin photosensitization. Photodermatol 3:148-157
160. Poh-Fitzpatrick MB, Piomelli S, Young P, Hsu H, Harber LC (1974) Rapid quantitative assay for erythrocyte porphyrins. Arch Dermatol 110: 225-230
161. Puhvel SM, Amirian DA (1979) Bacterial flora of comedones. Br J Dermatol 101: 543-548
162. Puhvel SM, Sakamoto M (1980) Cytotoxin production by comedonal bacteria (Propionibacterium acnes, Propionibacterium granulosum and Staphylococcus epidermidis). J Invest Dermatol 74: 36-39
163. Puhvel SM, Sakamoto M (1978) The chemoattractant properties of comedonal components. J Invest Dermatol 71: 324-329
164. Romiti R (2000) *In-vitro*-Bestimmung der Porphyrinproduktion aus Propionibacterium acnes und ihre Bedeutung zur Pathophysiologie und Therapie der Akne vulgaris. Dissertation, Medizinische Fakultät, Universität München
165. Romiti R, Schaller M, Plewig G (2000) High-performance liquid chromatography analysis of porphyrins in Propionibacterium acnes. Arch Dermatol Res 292: 320-322

166. Rotomskis R, Streckyte G, Bagdonas S (1997) Phototransformations of sensitizers.1. Significance of the nature of the sensitizer in the photobleaching process and photoproduct formation in aqueous solution. *J Photochem Photobiol B* 39: 167-171
167. Ruzicka T, Kalka K (2001) Retinoide. In: Korting HC, Sterry W (Hrsg) *Therapeutische Verfahren in der Dermatologie*. Blackwell, Berlin, S 449-459
168. Sapadin AN, Fleischmajer R () Tetracyclines: non-antibiotic properties and their clinical significance.
169. Schiller F, Amling UJ, Heller J, Gerbeth J, Langguth K, Schulze P (1987) Möglichkeiten einer direkten Ultraviolettphototherapie von Psoriasis und Akne. *Dermatol Monatsschr* 173: 309-315
170. Schothorst AA, De Haas CAC, Suurmond D (1980) Photochemical damage to skin fibroblasts caused by protoporphyrin and violet light. *Arch Dermatol Res* 268: 31-42
171. Schreiber WE, Raisys VA, Labbe RF (1983) Liquid-chromatographic profiles of urinary porphyrins. *Clin Chem* 29: 527-530
172. Shalita AR, Freinkel RK (1984) Acne. *J Am Acad Dermatol* 11: 957-960
173. Sigurdsson V, Knulst AC, van Weelden H (1997) Phototherapy of acne vulgaris with visible light. *Dermatology* 194: 256-260
174. Simon KH (1966) Einfache Porphyrin Nachweise. *Med Monatsschr* 20:324-325
175. Smith KM (1975) General features of the structure and chemistry of porphyrin compounds. In: Smith KM (eds) *Porphyrins and Metalloporphyrins*. Elsevier, Amsterdam, pp 3-28
176. Sobczak E, Kocon J (1983) Morphologie von Bakterien der Gattung *Propionibacterium* im Scanning- und Transmissionselektronenmikroskop. *Zentralbl Mikrobiol* 138: 375-390
177. Spikes JD (1975) Porphyrins and related compounds as photodynamic sensitizers. *Ann N Y Acad. Sci* 244: 496-508
178. Sturkenboom MC, Meier CR, Jick H, Stricker BH (2000) Minocyclin in acne is still an issue. *Arch Dermatol* 136: 1143-1145
179. Suh DH, Kwon TE, Youn JI (2002) Changes of comedonal cytokines and sebum secretion after UV irradiation in acne patients. *Eur J Dermatol* 12: 139-144
180. Tan HH, Goh CL, Yeo MGC, Tan ML (2001) Antibiotic sensitivity of *Propionibacterium acnes* isolates from patients with acne vulgaris in a tertiary dermatological referral centre in Singapore. *Ann Acad Med Singapore* 30: 22-25
181. Tan JKL, Vasey K, Fung KY (2001) Beliefs and perceptions of patients with acne. *J Am Acad Dermatol* 44: 439-445

182. Thunell S (2000) Porphyrins, porphyrin metabolism and porphyrias I. Update. Scand J Clin Lab Invest 60: 509-540
183. Till AE, Goulden V, Cunliffe WJ, Holland KT (2000) The cutaneous microflora of adolescent, persistent and late-onset acne patients does not differ. Br J Dermatol 142: 885-892
184. Tronnier H (1967) Über den heutigen Stand der dermatologischen UV-Therapie aus klinischer Sicht. 21: 19-23
185. Tronnier H, Böttger EM, Hoffmann E (1979) Transcutane PO₂- Messung unter UV-Therapie von Psoriasis und Akne. Z Hautkr 54: 546-550
186. Tsukada M, Schröder M, Roos TC, Chandraratna RAS, Reichert U, Merk HF, Orfanos CE, Zouboulis CC (2000) 13-*cis*-retinoic acid exerts its specific activity on human sebocytes through selective intracellular isomerization to all-*trans*-retinoic acid and binding to retinoid acid receptors. J Invest Dermatol 115: 321-327
187. Tucker SB, Rogers RS 3rd, Winkelmann RK, Privett OS, Jordon RE (1980) Inflammation in acne vulgaris: leucocyte attraction and cytotoxicity by comedonal material. J Invest Dermatol 74: 21-25
188. Venezia FR, DiVincenzo C, Sherman R, Reichman M, Origitano TC, Thomson K, Reichman OH (1985) Bactericidal effects of photoradiation therapy with hematoporphyrin derivative. J Infect Dis 151: 166-169
189. Voss JG (1976) A microbial etiology of acne? Cutis 17: 488-496
190. Webster GF, Leyden JJ, Nilsson UR (1979) Complement activation in acne vulgaris: consumption of complement by comedones. Infect Immun 26: 183-186
191. Webster GF, Leyden JJ, Norman ME, Nilsson UR (1978) Complement activation in acne vulgaris: in vitro studies with *Propionibacterium acnes* and *Propionibacterium granulosum*. Infect Immun 22: 523-529
192. Wertz PW, Miethke MC, Long SA, Strauss JS, Downing DT (1985) The composition of the ceramides from human stratum corneum and from comedones. J Invest Dermatol 84: 410-412
193. Wiegand UW, Chou RC (1998) Pharmacokinetics of oral isotretinoin. J Am Acad Dermatol 39: 8-12
194. Whitten DG (1978) Photochemistry of porphyrins and their metal complexes in solution. Rev Chem Intermediates 2: 107-138
195. Williamson P, Kligman AM (1965) A new method for the quantitative investigation of cutaneous bacteria. J Invest Dermatol 45: 498-503
196. Wolff, HH, Plewig G (1976) Ultrastruktur der Mikroflora in Follikeln und Komedonen. Hautarzt 27: 432-440

197. Zeina B, Greenman J, Purcell WM (2001) Killing of cutaneous microbial species by photodynamic therapy. *Br J Dermatol* 144: 274-278
198. Zouboulis CC (2001) Exploration of retinoid activity and the role of inflammation in acne: issues affecting future directions for acne therapy. *J Eur Acad Dermatol Venerol* 15: 63-67

8. Danksagung

Herrn Prof. Dr. Dr. h.c. G. Plewig möchte ich für die Überlassung des Dissertationsthemas und für die Ermöglichung der notwendigen Untersuchungen im Bakteriologischen Labor der Klinik und Poliklinik für Dermatologie und Allergologie der Ludwig-Maximilians-Universität München recht herzlich danken.

Herrn Privatdozent Dr. med. M. Schaller gilt mein Dank für die stets konstruktive und freundliche Unterstützung.

Frau Dr. med. C. Borelli gilt mein besonderer Dank für die kompetente und zu jeder Zeit hilfsbereite und freundliche Betreuung.

Frau Weißhaar (MTA), Frau Diem (MTA) und Frau Eichmüller (MTA) möchte ich für ihre große Hilfsbereitschaft sowie für die stets freundliche Unterstützung danken.

Für die außerordentlich hilfreiche und stets freundliche Unterstützung bei der HPLC-Analyse danke ich Herrn Prof. Dr. Jacob und Herrn PD Dr. Vogeser sowie Herrn Egeler (MTA) für die sorgfältige Durchführung der Untersuchungen.

Zudem danke ich der Hans-Fischer-Gesellschaft für die Bereitstellung von Mitteln zur Durchführung der notwendigen Laboranalysen.

Nicht zuletzt möchte ich meinen Eltern und meiner Schwester für die uneingeschränkte Unterstützung in jeder Hinsicht danken.

9. Lebenslauf

Name, Vorname	Merk, Kathrin
Adresse	Fliegenstrasse 1, 80337 München
Geburtsdatum	04.12.1973
Geburtsort	Garmisch-Partenkirchen
Nationalität	deutsch
Familienstand	ledig
Schulausbildung	
9/1980 - 7/1984	Grundschule Mittenwald
9/1984 - 7/1993	St. Irmengard-Gymnasium, Garmisch-Partenkirchen Abitur
Universitätsausbildung	
11/1993 - 7/1995	Studium der Informatik, Nebenfach: Theoretische Medizin, Technische Universität München Einführung in Unix, Modula 2, C++
10/1995 - 9/1998	Studium der Humanmedizin, Universität Leipzig; Physikum 9/1997
10/1998 - 3/2001	Studium der Humanmedizin, Ludwig-Maximilian- Universität München; 1. Staatsexamen 3/99 2. 2. Staatsexamen 3/01
23.04.01 - 24.03.02	Praktisches Jahr
19.04.2002	3. Staatsexamen
01.11.02 - 30.04.04	ÄiP an der Klinik und Poliklinik für Dermatologie und Allergologie der Ludwig-Maximilians-Universität München Direktor: Prof. Dr. Dr. h.c. G. Plewig
seit 01.05.04	Assistenzärztin an der Klinik und Poliklinik für Dermatologie und Allergologie der Ludwig- Maximilians-Universität München Direktor: Prof. Dr. Dr. h.c. G. Plewig