

Aus der Klinik und Poliklinik für Dermatologie und Allergologie
Klinikum der Ludwig-Maximilians-Universität München



*Kultivierung der humanen Milbe Demodex spp. und
Untersuchung Seborrhoe-modifizierender Substanzen*

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

vorgelegt von
Luka Michele Ständer

aus
Stuttgart

Jahr
2024

Mit Genehmigung der Medizinischen Fakultät der
Ludwig-Maximilians-Universität zu München

Erstes Gutachten: Prof. Dr. Dr. Markus Reinholz

Zweites Gutachten: Priv. Doz. Dr. Jens Wallmichrath

Drittes Gutachten: Priv. Doz. Dr. Andreas Wieser

weitere Gutachten: Prof. Dr. Dennis Novak

Promovierter Mitbetreuer Dr. Dr. Benjamin Clanner-Engelshofen

Dekan: Prof. Dr. med. Thomas Gudermann

Tag der mündlichen Prüfung: 20.08.2024

Inhaltsverzeichnis

Zusammenfassung	V
Abstract	VII
Abbildungsverzeichnis	VIII
Tabellenverzeichnis	VIII
Abkürzungsverzeichnis	IX
I. Einleitung.....	1
I.1 Rosacea	1
I.1.1 Definition.....	1
I.1.2 Epidemiologie.....	2
I.1.3 Pathogenese.....	2
I.1.4 Klinische Präsentation	5
I.1.5 Diagnostik.....	7
I.1.6 Therapie	7
I.1.7 Prognose.....	12
I.2 Demodex spp.	12
I.2.1 Arten.....	13
I.2.2 Lebenszyklus.....	14
I.2.3 Pathogenität.....	15
II. Fragestellung	17
III. Material und Methoden	18
III.1 Probengewinnung.....	18

III.2 Probenaufbereitung und hOSEC-Modell	19
III.3 Evaluation der Endpunkte	21
III.4 Mikroskopische Evaluation	23
III.5 Statistische Analyse	24
IV. Ergebnisse.....	25
IV.1 Ex-vivo Kultivierung von humanen Demodex-Milben nach 90 Tagen Inkubationszeit.....	25
IV.2 Untersuchung der Milbenpopulationsdichte nach Zugabe sebostatischer bzw seborrhoischer Substanzen	26
V. Diskussion.....	28
Literaturverzeichnis.....	37
Danksagung.....	46
Publikationsliste.....	47

Zusammenfassung

Hintergrund: Als fester und komplexer Bestandteil des menschlichen Mikrobioms kann die Haarbalgmilbe, *Demodex spp.*, neben der kommensalen Koexistenz mit ihrem Wirt, auch eine pathophysiologisch relevante Rolle in der Entstehung von Hauterkrankungen spielen. Sie kann hierbei vor allem zur Entwicklung der chronisch-entzündlichen Hauterkrankung Rosacea beitragen. Trotz ihrer prominenten Rolle ist die Demodex-Milbe bis heute wenig erforscht. Ein Grund hierfür ist unter anderem, dass bisher noch kein funktionierendes ex-vivo-, also wirtsunabhängiges Kultivierungsmodell etabliert werden konnte. Dies könnte ermöglichen, Fragestellungen im Hinblick auf die Physiologie und Therapie der Rosacea dahingehend voranzutreiben.

Fragestellung: Ziel der hier beschriebenen Experimente war es daher, ein ex-vivo-Kultivierungsmodell zu etablieren. Des Weiteren sollte die Wirkung von Substanzen, welche die Talgproduktion beeinflussen, auf die Milbenpopulationsdichte und damit Reproduktion der Milbe und mögliche Therapieansätze untersucht werden.

Material und Methoden: Hierzu wurden Hautproben aus dem Gesichtsbereich im sogenannten "human organotypic skin explant culture" (hOSEC)-Modell kultiviert. In einer weiteren Modellreihe wurden dem Modell zusätzlich die beiden sebostatisch wirkenden Substanzen Retinol und Isotretinoin sowie die beiden seborrhöisch wirkenden Substanzen Testosteron und Trenbolon zugesetzt und untersucht. Die Ergebnisse wurden schlussendlich lichtmikroskopisch evaluiert.

Ergebnisse: So konnten nach 90 Tagen der Inkubation in den Hautproben lebende Milben in allen Lebensstadien nachgewiesen werden. Die Behandlung mit den die Talgproduktion beeinflussenden Substanzen zeigte nach dreißigtägiger Inkubation jeweils eine signifikante Minderung der Milbenpopulationsdichte im Vergleich zur unbehandelten Negativkontrolle.

Diskussion: Mit dem hier beschriebenen hOSEC-Modell konnten zum ersten Mal erfolgreich Demodex-Milben fernab des lebenden Wirts über mehrere Generationen kultiviert werden. Fernerhin könnte die sebostatische Wirkung von Retinoiden einen Hinweis auf den pathogenetischen Mechanismus der klinisch eingesetzten Therapieoption bei Rosacea liefern. Die hier beschriebenen Methoden könnten in Zukunft neue Wege zur Erforschung der Demodex-Milbe und Rosacea eröffnen.

Abstract

Background: As most complex commensal and integral part of the human microbiome, *Demodex* spp. mites can contribute to the pathogenesis of clinically relevant skin conditions such as the chronic inflammatory disease rosacea. Although their pathophysiological role is recognized, few is known about *Demodex* mites. Up until now, no reliable ex-vivo, i.e. host independent culture model does exist.

Objectives: The goal of this study was to establish an ex-vivo cultivation system for *Demodex* mites. Furthermore, an objective was set to investigate the impact of sebogenesis-modifying substances on mite density that is, mite reproduction and possible therapy approaches for future treatment of skin diseases caused by *Demodex* mites. Specifically, the sebostatic acting drugs retinol and isotretinoin, as well as two seborrheic acting drugs testosterone and trenbolone, were used in this case.

Methods: Skin samples of the face region were obtained to be cultivated in a so called human organotypic skin explant culture (hOSEC). In a parallel test series, sebogenesis-modifying drugs were supplemented to the hOSEC model. Mite survival and density was quantified microscopically.

Results: Mites were proved to be alive after 90 days of incubation. All stages of the life cycle of the *Demodex* mites were identified. Treatment with both sebostatic-acting and seborrhea inducing drugs each lead to a significant decrease of mite density in comparison to the negative control.

Conclusion: The cultivation model described below proved to be the first successful one in terms of cultivating *Demodex* spp. over multiple generations without their living host. Additionally, the sebostatic effect of retinoids could be one of its key mechanisms in the treatment of rosacea which shows a high rate of positive outcomes. The outcomes

described below may be expected to boost new research concerning Demodex mites and help to comprehend human's most intricate commensal.

Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: Präparation der Hautproben mittels 6mm Hautstanze in die dafür vorgesehenen Glaszylinder. Quelle: L. M. Ständer.

Abbildung 2: hOSEC-Modell zur ex-vivo Kultivierung der Demodex-Milben und Inkubation. Das Bild zeigt die präparierten Hautproben im Nährmedium in 12-Well-Zellkulturplatten. Quelle: L. M. Ständer.

Abbildung 3: Milbenpopulationsdichte (Milben pro $0,283\text{cm}^2$) in Negativkontrollen und nach Behandlung mit seborrhoeischen beziehungsweise sebostatischen Substanzen.

3A: seborrhoeische Substanzen führten zu einer signifikanten Abnahme der Milbendichte ($p=0,0286$ (Testosteron) beziehungsweise $p=0,0024$ (Trenbolon)). Mittelwertdifferenz zur Kontrolle war 39,6% (Testosteron) respektive 55,7% (Trenbolon).

3B: sebostatische Substanzen führten zu einer signifikanten Abnahme der Milbendichte ($p=0,0378$ (Retinol), $p=0,0049$ (Isotretinoin)). Mittelwertsdifferenz zur Kontrolle war 15,2% (Retinol) respektive 63,4% (Isotretinoin).

Tabellenverzeichnis

Tabelle 1. Verteilung der Lebensstadien der Demodex-Milben in drei Hautproben.

Drei nach dem Zufallsprinzip gewählte Hautproben mit vorbekannter Demodex-Milben-Besiedelung wurden einer enzymatischen Verdauung unterzogen und die verbliebenen Milben in ihren verschiedenen Lebensstadien gezählt. Die Tabelle zeigt die Verteilung der Lebensstadien in den einzelnen Proben und ihrer Gesamtheit in Prozent an.

Abkürzungsverzeichnis

AIDS	“acquired immunodeficiency syndrome”
AWMF	Arbeitsgemeinschaft der Wissenschaftlichen Medizinischen Fachgesellschaften e.V. (eingetragener Verein)
BRNL2	Butyrophilin-like 2 Gen
CD4	“cluster of differentiation 4”
CLSM	“confocal laser scanning microscopy“, Konfokalmikroskopie
cm ²	Quadratcentimeter
CO ₂	Kohlenstoffdioxid
DAC/NRF	Deutscher Arzneimittel-Codex/Neues Rezeptur Formularium
DAPI	4',6-Diamidin-2-Phenylindol
DMEM	“Dulbecco’s Modified Eagle Medium“
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
et al.	et alii
GFP	“green fluorescent protein”
GST	Glutathion S-Transferase
h	Stunde(n)
HE	Hämatoxylin-Eosin
HLA	“human leukocyte antigene”
hOSEC	“human organotypic skin explant culture”
i.e.	id est
IL-17	Interleukin 17
Inc.	“Incorporation”
IPL	“intense pulsed light”

kg	Kilogramm
LMU	Ludwig-Maximilians-Universität
Log-Stufe	Logarithmus-Stufe
mg	Milligramm
ml	Milliliter
mm	Millimeter
NaCl	Natriumchlorid
OCT	optische Kohärenztomografie
PBS	“phosphate buffered saline“
PDT	Photodynamische Therapie
SNPs	“single-nucleotide polymorphisms“
spp.	species pluralis
TACR3	Tachykinin-Rezeptor
Th1 / Th17	T-Helfer-Zellen 1/ 17
TRP	“transient receptor potential ion channels“
USA	Vereinigte Staaten von Amerika
UV-Licht	Ultraviolettstrahlung des Lichts
YAG	Yttrium-Aluminium-Granat
µm	Mikrometer

I. Einleitung

I.1 Rosacea

I.1.1 Definition

Die Rosacea ist eine chronisch-entzündliche, meist schubweise verlaufende, hauptsächlich das Gesicht (Wangen, Stirn, Nase und Kinn) betreffende Hauterkrankung, deren genaue Pathogenese noch ungeklärt ist.¹ Pathogenetisch sind häufig dilatierte Blutgefäße von Bedeutung, welche klinisch neben Flush-Symptomatik auch als Teleangiektasien imponieren. Zusätzlich kommt es zur Ausbildung von Papeln und Pusteln sowie in einigen Fällen zu derber Talgdrüsenhyperplasie mit daraus folgender Entstehung eines Phym, meist an den facialem Akren. Neben kosmetisch störenden Faktoren und einhergehend verminderter Lebensqualität ist eine Affektion der Augen im Sinne einer Ophthalmorosacea eine gefürchtete Komplikation. Die Ophthalmorosacea kann hierbei nicht nur als Komplikation einer Rosacea auftreten, sie ist auch als eigenständige Erkrankung beschrieben.

Obwohl die genaue Pathogenese noch nicht vollends nachvollzogen ist, scheinen neben intrinsischen immunologischen wie neurovaskulären Faktoren auch externe Trigger eine Rolle zu spielen, welche zur Vermeidung von Exazerbationen gemieden werden sollten. Hierunter fallen unter anderem scharfe Speisen, Alkohol, direkte UV-Licht-Exposition, zu kalte oder zu warme Temperaturen und der schnelle Wechsel von Kälte zu Wärme respektive von Wärme zu Kälte. Auch Demodex-Milben zählen zu den bekannten Triggern der Rosacea. Da es neben den beschriebenen Symptomen im Gesicht auch zu extrafazialen Beteiligungen im Sinne eines Red Scalp Syndroms oder beispielsweise eines Red Scrotum Syndroms, aber auch zu einer Ophthalmorosacea und auch zu Migräne kommen kann und die Rosacea mit weiteren

Komorbiditäten wie Adipositas, Helicobacter pylori Infektionen, sogenanntem “small intestine bacterial overgrowth“ (SIBO) und weiteren Erkrankungen assoziiert ist, kann im Gesamtzusammenhang bei Rosacea durchaus von einer systemischen Erkrankung gesprochen werden.^{2,3}

I.1.2 Epidemiologie

Epidemiologische Daten zur Rosacea variieren in verschiedenen Studien deutlich.

Eine retrospektive Studie zu Patientendaten von 1995-2008 im Vereinigten Königreich ergab eine Inzidenz von 165 Fällen/100.000 Einwohnern/Jahr. Zudem scheinen Frauen häufiger als Männer betroffen zu sein und der Erkrankungsgipfel zwischen 40 und 59 Jahren zu liegen.⁴

Dies kann aber auch daran liegen, dass die meisten Studien zur Rosacea in erwachsenen Studiengruppen durchgeführt wurden. Dennoch existiert auch eine pädiatrische, wenn auch noch wenig erforschte, Variante der Rosacea in der Gruppe der unter 20-jährigen.⁵

Weltweit variieren die Angaben zwischen 0,09% und 22,41%. Im Mittel kann die Prävalenz jedoch auf 5,46% der erwachsenen Bevölkerung geschätzt werden. Dies hängt jedoch stark von Diagnosekriterien wie Selbstbewertung durch Patienten mittels Fragebögen oder von Dermatologen diagnostizierter Rosacea oder der Wahl der Datenbasis und auch der untersuchten Population ab.⁶ Dieselbe Metaanalyse ergab Prävalenzen von 5,41% bei weiblichem und 3,90% bei männlichem Geschlecht.

I.1.3 Pathogenese

Die genaue Pathogenese der Rosacea ist noch nicht vollständig geklärt. Dennoch spricht eine Reihe von Daten für eine multifaktorielle Genese, welche sich aus intrinsischen Mechanismen und externen Triggern zusammensetzt.

Die Rosacea weist eine genetische Prädisposition auf, was sich in der Beobachtung widerspiegelt, dass Menschen mit positiver Familienanamnese signifikant häufiger erkranken.⁷ Bisher konnten in einer 2015 publizierten genomweiten Assoziationsstudie unter anderem zwei "single nucleotide polymorphisms" (SNPs) und zusätzlich drei "human leukocyte antigenes" (HLA) Allele (HLA-DRB1, HLA-DQB1, HLA-DQA1) mit Rosacea in Verbindung gebracht werden.⁸ Yazici et al. zeigten eine signifikante Assoziation zwischen den Glutathion-S-Transferasen GSTT1 und GSTM1 null Genotypen und der Rosacea.⁹ Zusätzlich zeigten sich die Kandidatengene "Butyrophilin-like 2" (BRNL2), TACR3 (Tachykinin-Rezeptor) sowie „Human leukocyte antigen“ (HLA)-DRA loci und NOD2/CARD15 signifikant häufiger dysreguliert im Vergleich zu Kontrollpersonen, wobei das TACR3 rs3733631 G Allel vermutlich die initiale Phase der Rosacea triggert.¹⁰

Bei oben genannter genetischer Prädisposition bedarf es häufig zusätzlich eines Triggers zur Auslösung der Erkrankung. In der Literatur werden als die häufigsten Trigger Hitze, UV-Belastung, Verzehr scharfer Speisen, Kälte, Alkohol, verschiedene Externa sowie die Besiedelung durch Mikroorganismen beschrieben.¹¹ Auch ein Nikotinabusus kann zu einer Exazerbation der Erkrankung beitragen¹. Interessanterweise kann eine Besiedelung mit Bakterien und/oder Demodex-Milben ebenfalls einen Triggerfaktor darstellen.¹² Es konnte gezeigt werden, dass die Milben eine entscheidende Rolle bei der Entstehung einer entzündlichen Immunantwort spielen können, als Vektor für Mikroorganismen fungieren aber auch mechanisch zu einem Verschluss der Follikelausführungsgänge führen können.¹³

In den letzten Jahren konnte ebenfalls die Bedeutung des Immunsystems für die Entstehung der Erkrankung demonstriert werden, wobei sowohl die angeborene und die adaptive Immunantwort eine Rolle spielt. Die genauen Mechanismen sind nicht hinreichend geklärt, jedoch geht man von einer Aktivierung von immunologisch aktiven Zellen, wie den

Keratinozyten, Mastzellen, neutrophilen Granulozyten und antigenpräsentierenden Zellen, wie den Makrophagen aus, die dann wiederum in verschiedensten Krankheitsphasen der Rosacea vermehrt lokal präsent sind und proinflammatorische Zytokine und antimikrobielle Peptide sezernieren.^{11,14} Der genaue Zusammenhang zur adaptiven Immunantwort ist nicht präzise geklärt, jedoch sind zahlreiche Beobachtungen hinweisend auf eine Beteiligung von T- und B-Lymphozyten. Spezifischer spielt eine Aktivierung von CD4 positiven T-Zellen sowie eine spezifische Th-1 und Th-17 Immunantwort mit den Effektorzytokinen Interferon gamma und IL-17 eine pathogenetisch wichtige Rolle.¹⁵ Die Arbeitsgruppe um Buhl et al. konnte ferner zeigen, dass Makrophagen und Mastzellen in allen klinischen Subtypen der Rosacea präsent waren, während sich neutrophile Granulozyten insbesondere bei der papulopustulösen Form in großer Zahl manifestierten.¹⁵

Auch spielt neurovaskuläre Dysregulation, vor allem in Zusammenhang mit den rosaceatypischen Symptomen "Flush" und "Skin Sensitivity" eine entscheidende Rolle durch Stimulation nozizeptiver Hautnerven über axonale Reflexe¹⁶. Steinhoff et al. postulieren in diesem Zusammenhang auch die zentrale Rolle der "transient receptor potential ion channels" (TRP) in der Entstehung von Erythemen und damit Neuroinflammation.¹⁴ Damit handelt es sich entgegen vieler Annahmen bei dem rosacea-assoziierten Erythem nicht um eine vaskuläre Dysregulation sondern um eine Form einer Entzündung, welche durch Zytokine angestoßen wird und durch T-Zellen, Makrophagen und Mastzellen mediiert wird.^{11,17} Eine weitere bedeutende Rolle in der Inflammationsgenese nehmen antimikrobielle Peptide, wie zum Beispiel Cathelicidine ein. Yamasaki et al. konnten in einer 2007 publizierten Studie zeigen, dass eine erhöhte Expression dieser Peptide im Zusammenhang mit der Entzündung der Haut bei Rosacea steht.¹⁸ Am Anfang dieser Inflammationskaskade stehen einer Publikation von Yamasaki et al. zufolge Toll-like-Rezeptoren. Diese befinden sich auf der

Oberfläche von Keratinozyten in der Epidermis, können vermutlich von Mikroorganismen auf der Haut wie Bakterien oder den Milben *Demodex* spp. aktiviert werden und in Folge dessen die Überexpression antimikrobieller Peptide und weitere entzündliche Prozesse triggern.¹⁹

I.1.4 Klinische Präsentation

Die Rosacea ist eine chronisch-entzündliche, schubweise verlaufende und hauptsächlich das Gesicht betreffende Hauterkrankung. Prädilektionsstellen stellen hierbei das Kinn, die Nase, Wangen und Stirn dar.²⁰ In selteneren Fällen können auch Dekolletee und der obere Rücken betroffen sein.²⁰ Plewig et al. unterteilen die Rosacea in der siebten Auflage von Braun Falco's *Dermatologie, Venerologie und Allergologie* in drei Stadien mit einigen Sonderformen. Diesen Stadien vorausgehend ist demnach zunächst ein funktionelles Erythem, welches rezidivierend in Form von "Flushs" auftritt, später aber auch persistieren kann.²⁰ Auslöser dieser Symptomatik sind häufig die bereits beschriebenen Triggerfaktoren.

I.1.4.1 Rosacea erythemato-teleangiectatica:

Das Stadium I der Rosacea, Rosacea erythemato-teleangiectatica, äußert sich mit Bestehen persistierender Erytheme, dem Erythema congestivum. Hinzu treten Teleangiektasien und livide Verfärbungen der Haut aufgrund diffuser Dilatation oberflächlicher Hautgefäße.²⁰

I.1.4.2 Rosacea papulopustulosa:

Im zweiten Stadium der Rosacea, der Rosacea papulopustulosa, dominieren Papeln und Pusteln zunächst solitär, später multipel und gruppiert den Hautbefund. Charakteristisch ist, dass sich die Pusteln hierbei meist als steril oder zumindest mit physiologischer bakterieller Hautflora besiedelt erweisen. Es kann ebenfalls eine Überpopulation mit *Demodex*-Milben auftreten. Fernerhin kann es auch zur Ausbildung von diffusen Ödemen kommen. Dieses

Stadium wird häufig als Acne vulgaris verkannt und sollte hiervon klinisch abgegrenzt werden.²⁰

I.1.4.3 Rosacea phymatosa:

In Stadium III der Rosacea werden die oben beschriebenen Effloreszenzen durch Hyperplasien von Talgdrüsen und Bindegewebe, sogenannten Phymen, ergänzt.²⁰ Betrifft dieser bindegewebige Umbau Nase oder Kinn, spricht man in diesem Zusammenhang von einem Rhino- respektive Gnatophym.

Neben dieser klassischen Einteilung findet immer mehr ein Paradigmenwechsel in der Klassifikation der Rosacea hin zu einem phänotyporientierten Ansatz, welcher sich zur Einteilung neben diagnostischen Kriterien auf Major- und Minor- Kriterien stützt.^{21,22} Diese neue Einteilung wird seit 2017 auch vom ROSacea COnsensus Panel und seit 2022 auch von der deutschen S2k-Leitlinie Rosacea¹¹ empfohlen, mit der Überzeugung, der tatsächlichen Klinik so besser gerecht werden zu können.²² Zu den diagnostischen Kriterien gehören zum einen das persistente Erythem, welches sich variabel in Ausbreitung und Intensität zeigt und durch Trigger ausgelöst beziehungsweise verstärkt werden kann und zum anderen phymatöse Veränderungen der betroffenen Gesichtshaut, entstehend durch fibrotische Veränderungen oder Talgdrüsenhyperplasie.²² Die drei Major-Kriterien umfassen das transiente Erythem beziehungsweise "Flushing", Papeln und Pusteln sowie Teleangiektasien.²² Zu den vier Minor-Kriterien gehören Brennen der Haut, Stechen der Haut, Trockenheitsgefühl der Haut und das Ödem.²² Das Zusammenspiel dieser verschiedenen Kriterien in Kombination mit den diagnostischen Merkmalen erlauben so eine flexible und auf den Patienten „maßgeschneiderte“ Diagnose mit gleichzeitiger Beurteilung von Ausmaß und Grad der Symptomatik.

I.1.5 Diagnostik

Die Diagnose ist vor allem auf Grund der klinischen Präsentation zu stellen.²⁰ Eine histopathologische Untersuchung dient hier eher dem Ausschluss anderer Hauterkrankungen, insbesondere malignen¹¹ und wird daher nicht regelhaft durchgeführt.

Zur Quantifizierung der im Zusammenhang mit Rosacea relevanten Besiedelung der Haut mit Demodex-Milben kann ein Hornschichtabriss durchgeführt werden.²⁰ Hierbei wird ein Tropfen flüssiger, schnell trocknender Kleber (Sekundenkleber auf Methacrylatbasis) auf einen Objektträger aufgetragen. Dieser wird dann auf das zu analysierende Hautgesichtsareal geklebt und nach etwa 60 Sekunden wieder abgerissen. Mikroskopisch ließen sich nun bei bestehender Demodexbesiedelung die Milben auf dem Objektträger nachweisen. Dies ist jedoch auch kein Standarddiagnostikum, da es etwas invasiver als andere Methoden ist.

Differentialdiagnostisch sind Acne vulgaris, das seborrhoische Ekzem und die periorale Dermatitis von der Rosacea abzugrenzen.²³

I.1.6 Therapie

Zur Therapie der Rosacea stehen wahlweise topische, systemische, alternative Verfahren oder die Kombination dieser Möglichkeiten miteinander neben Basismaßnahmen samt gründlicher Gesichtspflege zur Verfügung. Die Maßnahmen dienen allerdings stets dem symptomatischen Management der Erkrankung, um Leidensdruck zu vermindern und Lebensqualität zu verbessern. Eine kausale Therapie der Rosacea existiert aktuell noch nicht.²⁴

Allgemeine Maßnahmen

Jeglicher pharmakologischen Therapie steht zunächst als erster Ansatz die Meidung von Triggerfaktoren voran. Diese können von Mensch zu Mensch unterschiedlich sein. Zu nennen sind hier vor allem Konsum von Alkohol oder scharfen Speisen, UV-Licht-Exposition, extreme

Kälte, Wärme und Stress.²⁵ Der potenziell negative Einfluss der Sonne ließe sich hier zum Beispiel durch das Tragen von Kopfbedeckungen, Sonnenbrillen sowie dem Auftragen von suffizientem Lichtschutz mit hohem UV-Index minimieren. Auch sollten zu heiße sowie zu scharfe Speisen und Getränke aus dem Speiseplan gestrichen werden.

Topische Therapie

Die alleinige topische Therapie richtet sich vornehmlich an leichte und mittelschwere Formen der Rosacea erythematoso beziehungsweise Rosacea papulopustulosa. Die neue phänotypische Einordnung der Erkrankung ermöglicht zudem eine variablere und auf den Patienten individuell abgestimmte Therapie.¹¹ Hierzu stehen verschiedene Topika aus verschiedenen Wirkstoffklassen zur Wahl. In Deutschland zugelassene Pharmaka sind aktuell Ivermectin, Metronidazol, Azelainsäure und Brimonidin.²⁶ Hiervon ist Metronidazol das derzeit in der Bundesrepublik am häufigsten verschriebene Medikament. Dabei ist die genaue Wirkung bei der topischen Therapie noch nicht abschließend nachvollzogen. Eine Kombination aus antiinflammatorischer, antimikrobieller, antiparasitärer, immunsupprimierender und antioxidativer Wirkung wird jedoch angenommen.¹¹ Als ebenso wirksam zeigte sich in vergleichenden Studien von 0,75% Metronidazol-Creme mit Azelainsäure, ebenfalls als Creme.^{27,28} Die Dicarbonsäure Azelainsäure hemmt Cathelicidin und Kallikrein und wirkt so antiinflammatorisch und positiv auf die Keratinisierung.²⁶ Desweiteren empfehlen Reinholz und Clanner-Engelshofen et al. in der aktuellen Leitlinie „Rosazea“ die topische Anwendung des antiparasitär und möglicherweise auch antientzündlich wirkenden Ivermectins. Dadurch kann zum einen der Inflammation begegnet werden, zum anderen kann die bei Rosacea häufige Überpopulation mit Demodex-Milben substanziell vermindert werden, was ebenfalls positive Wirkung auf die Rosacea gezeigt hat,

da die Bedeutung der Demodex-Milbe in der Entstehung der Rosacea bereits gezeigt werden konnte.²⁹ Schließlich empfiehlt die S2k-Leitlinie noch die lokale Anwendung des hochselektiven alpha2-adrenergen Rezeptoragonisten Brimonidin. Durch seine gefäßverengende Wirkung ist der Einsatz von Brimonidin besonders beim Subtyp I der Rosacea, der Rosacea erythematosa, empfohlen. Die Wirksamkeit setze hier bereits 20-30 Minuten nach Applikation ein und halte etwa acht bis zehn Stunden an.¹¹

Systemische Therapie

Zeigt die topische Therapie nicht die gewünschte Wirkung oder sieht man sich mit schweren Formen der Rosacea konfrontiert, wird die Einleitung einer systemischen Therapie empfohlen.¹¹ Der hierfür bisher einzige in Deutschland zugelassene Wirkstoff ist das Tetracyclin Doxycyclin in nicht antibiotisch-wirkender, antientzündlicher Dosierung (40mg/Tag, teilretardiert).²⁶ Als Wirkmechanismus des Doxycyclins bei der Rosacea konnten Kanada et al. eine Inhibition von Cathelicidin und damit eine Reduktion der Entzündung auf der Haut nachweisen.³⁰ Als ebenfalls wirksam hat sich die systemische Anwendung von niedrigdosierten Vitamin-A-Säure-Derivaten, den Retinoiden, gezeigt.³¹⁻³³ Eine Metaanalyse von van Zuuren et al. hat die Evidenz der Therapie mit Retinoiden als hoch eingestuft.¹ Reinholz et al. empfehlen hier bei Erwägung einer Retinoidtherapie eine Dosis von 0,1-0,3mg/kg Körpergewicht.¹¹ Unbedingt zu beachten ist die Teratogenität³⁴ von Vitamin-A-Säure-Derivaten und die damit zwingend erforderliche sichere Kontrazeption bei Frauen im gebärfähigen Alter.

Kombinierte Therapie

Die S2k Leitlinie „Rosazea“ der AWMF (Arbeitsgemeinschaft der Wissenschaftlichen Medizinischen Fachgesellschaften e.V.) stellt die Indikation zur kombinierten systemischen

und topischen Therapie der Rosacea vor allem bei komplizierteren Verläufen. Hierfür wird vornehmlich eine Kombination von niedrigdosiertem Doxycyclin mit topischem Ivermectin empfohlen. Weitere mögliche, ebenfalls empfohlene Kombinationen sind niedrig dosiertes Doxycyclin mit topischem Metronidazol sowie niedrig dosiertes Doxycyclin mit topischer Azelainsäure.¹¹ In einer 2007 von Fowler publizierten, randomisierten, doppelt verblindeten und placebokontrollierten Studie über 16 Wochen konnte er die Überlegenheit von einer Kombinationstherapie von 40mg Doxycyclin und topischem 1% Metronidazol Gel gegenüber der eines Placebos mit topischem 1% Metronidazol Gel aufzeigen. Hierbei wurden Patienten mit milder bis mittelschwerer Rosacea behandelt.³⁵ In einer weiteren Studie evaluierten Del Rosso et al. die Wirksamkeit, Sicherheit und auch die Überlegenheit einer kombinierten Therapie von 40mg Doxycyclin mit entweder 15% Azelainsäure Gel oder 1% Metronidazol Gel. Neben guter Ansprechraten und guter Tolerabilität in beiden Gruppen konnte zusätzlich ein früheres Ansprechen der Patienten auf die Therapie mit Doxycyclin und Azelainsäure bei 207 untersuchten Männern und Frauen mit milder bis moderater Rosacea beobachtet werden.³⁶ Auch die Wirksamkeit von Ivermectin topisch in Kombination mit niedrig dosiertem, wirkstofffreisetzungsmodifiziertem 40mg Doxycyclin (30mg sofortige Freisetzung mit 10mg retardierter Freisetzung) wurde eingehend untersucht. Schaller et al. zeigten in einer 2020 publizierten, randomisierten, placebokontrollierten Phase 3b/4 Studie, dass die Kombination von Doxycyclin mit topischem Ivermectin das Ansprechen, die Geschwindigkeit des Ansprechens und Patientenzufriedenheit bei Fällen mit schwerer Rosacea signifikant steigern kann.³⁷

Alternative Verfahren

Neben der Basismaßnahmen sowie topischer, systemischer und kombinierter Therapie kann auch die Indikation zu alternativen Therapien gestellt werden. Hier stehen aktuell die photodynamische Therapie (PDT), diverse Laserverfahren und zur kosmetischen Korrektur von Phymen chirurgische Methoden zur Auswahl. Die PDT wird aktuell von der AWMF-Leitlinie noch nicht empfohlen. Es konnten jedoch bereits in einigen Studien positive Ergebnisse vorgelegt werden.³⁸⁻⁴⁰ All diesen Studien ist jedoch ein relativ kleines Patientenkollektiv gemein, sodass hier trotz vielversprechender Ergebnisse noch Forschungsbedarf besteht. Besser erforscht als die PDT sind hingegen Lasertherapien und Therapien mit intensiver gepulster Lichtquelle (IPL), sowohl zur Behandlung von Erythemen als auch ablativ zur Behandlung von Phymen. So empfiehlt Dahan in einer Publikation von 2011 die Anwendung diverser Laserverfahren, insbesondere bei Rosacea erythematoso. Insbesondere Teleangiektasien ließen sich demzufolge mittels IPL deutlich reduzieren. Diffuse Erytheme seien allerdings sehr schwer zu therapieren und bedürfen multipler Laser oder IPL Behandlungen.⁴¹ Neuhaus et al. verglichen in einer Fallserie von 29 Patienten die Effektivität eines „nonpurpuragenic pulsed dye laser“ (PDL) mit der IPL. Beide Methoden erwiesen sich als gleichermaßen effektiv und sicher.⁴² So stimmen auch Reinholz und Clanner-Engelshofen et al. zu, dass eine Laser- oder IPL Therapie „Patienten mit Rosacea-bedingten Teleangiektasien und Erythemen als ergänzende Therapieoption oder Therapiealternative angeboten werden“ kann, „insbesondere für Patienten mit therapieresistentem Befund“.¹¹ Fernerhin kommen Laser-Verfahren nicht nur zur Behandlung von Erythemen und Teleangiektasien infrage; CO₂-Laser und Erbium-YAG-Laser sind zur Ablation von Phymen geeignet und stellen in Kombination mit einem Vasokonstriktor und einer lokalen Anästhesie

eine sehr gute Wahl der Behandlung dar, bei geringen Blutungskomplikationen und kosmetisch ansprechenden Ergebnissen.^{43,44} Dabei können sie einzeln oder auch kombiniert zum Einsatz kommen.

Zur Ablation von Phymen stellen chirurgische Verfahren eine Alternative zum Laser dar. Sadick et al. sehen in der chirurgischen Intervention die Therapie der Wahl zur Beseitigung kosmetischer Störungen, aber auch eventueller Probleme beim Atmen oder Essen, die ein Phym herbeiführen kann. Standardtherapie ist hierbei das Dermashaving mittels Skalpell oder Rasierklinge. Alternative Verfahren sind Dermabrasion, Kryochirurgie, Elektrochirurgie und, wie bereits beschrieben, die Laserchirurgie.⁴⁵

I.1.7 Prognose

Bei der Rosacea handelt es sich um eine meist harmlose chronische Erkrankung welche nicht heilbar, unter adäquater Therapie jedoch sehr gut behandelbar ist. So ist unter suffizienter Therapie eine deutliche Verbesserung des Hautbefundes sowie der damit einhergehenden psychosozialen Belastung zu erwarten.^{46,47} Besonders aus psychosozialer Sicht ist eine adäquate Therapie notwendig, da Rosaceapatienten in Abhängigkeit des Schweregrades eine erhöhte Anfälligkeit für Angststörungen und Depression aufweisen.⁴⁸⁻⁵¹

I.2 *Demodex spp.*

Da die Rosazea auch eine deutliche pathogenetische Assoziation mit der Demodex-Milbe aufweist, wird im Nachfolgenden näher darauf eingegangen.

I.2.1 Arten

Die Milbe *Demodex* spp. oder Haarbalgmilbe ist seit Millionen von Jahren Teil des Mikrobioms von Säugetieren. Dabei sind die jeweiligen Arten der *Demodex*-Milbe hoch wirtsspezifisch. Obwohl das Immunsystem des Wirts grundsätzlich in der Lage ist, Chitin von Milben über "Toll-like receptor-2" an Keratinozyten zu erkennen, scheint es in den allermeisten Fällen die *Demodex*-Milben als Kommensale und Teil des Mikrobioms zu akzeptieren.⁵² Humane *Demodex*-Milben unterteilen sich in zwei Subtypen, *Demodex brevis* und *Demodex folliculorum*, welche in den Haarfollikeln und den Talgdrüsen der menschlichen Haut leben. Beiden ist ihr anatomischer Aufbau gemein. Sie gliedern sich in Gnathosoma, Podosoma und ein Opisthosoma. Gnathosoma und Podosoma sind dabei von einem Chitinpanzer umgeben. Der vorderste Teil, das Gnathosoma, stellt den „Kopfteil“ der *Demodex*-Milbe dar und dient der Nahrungsaufnahme und Sinneswahrnehmung. Das Mittelstück, Podosoma, trägt bei der adulten Milbe jeweils vier mehrgliedrige Beinpaare. Ebenfalls sitzen hier die jeweiligen Geschlechtsorgane. Der hinterste und größte Teil, das Opisthosoma, ist Heimat für den Verdauungstrakt und den zentralen Teil des Nervensystems, dem Synganglion. Mikroskopisch lassen sich *Demodex folliculorum* und *Demodex brevis* durch ihre unterschiedliche Länge unterscheiden. *Demodex folliculorum* ist mit etwa 420µm fast doppelt so lang wie *Demodex brevis* (etwa 250µm). Auch haben *Demodex brevis* einen spitzer zulaufendes Opisthosoma.⁵³

Aufgrund der biologischen Komplexität und Entwicklung stellen die *Demodex*-Milben, verglichen mit beispielsweise Acnebakterien (z.B. *Propionibacterium acnes*) oder anderen Bakterien und Pilzen der physiologischen Hautflora (z.B. *Staphylococcus epidermidis*, *Malassezia furfur*), den komplexesten Teil des menschlichen Mikrobioms dar. Zum ersten Mal

beschrieben wurde sie im Jahr 1841, damals zunächst als Wurm. Ein Jahr später klassifizierte Carl Gustav Theodor Simon sie korrekterweise als Milben, wodurch sie taxonomisch zu den Arthropoden zählen.⁵⁴ Im Vergleich zu anderen Milbenarten, wie zum Beispiel der humanen Krätzmilbe (*Sarcoptes scabiei* var. *hominis*), zeigen Demodex-Milben eine verminderte Aktivität, sodass sie selten klinisch überschießende und massive immunologische Reaktionen bewirken.⁵⁵ Dennoch zeigt sich eine Assoziation zwischen der Besiedelung von Demodex mit klinisch relevanten Hautbefunden. Eine Überbesiedelung kann durch Immunsuppression bedingt sein.⁵⁴ So illustrieren zahlreiche Fallstudien eine erhöhte Besiedelung von Demodex bei Individuen mit einer Immunsuppression durch Defizienz der Immunzellen durch eine Leukämie.^{56–58} Ein weiterer Fall zeigt ebenfalls eine Überbesiedelung mit Demodex bei einem 35-jährigem Patienten mit AIDS (“acquired immunodeficiency syndrome“), welche hier auch zum Bild einer Rosacea-ähnlichen Demodikose mit Papeln, Pusteln im Gesicht und Pruritus führte.⁵⁹ Ebenfalls sind Fälle einer iatrogenen Induktion einer rosacea-ähnlichen Demodikose mit gleichzeitiger Demodexüberpopulation bei Behandlung mit Medikamenten der Wirkstoffklasse der Calcineurininhibitoren.^{60,61}

I.2.2 Lebenszyklus

Stanley Hirst unterteilte die verschiedenen Lebensabschnitte bereits 1919 in Ovum, Larve, Protonympe, Deutonympe und adulte Milbe.⁶² Eine für dieses Demodex-Kultivationsprojekt wegweisende Arbeit lieferte Spickett im Jahre 1961, indem er das erste Mal den Lebenszyklus und damit auch die ungefähre Lebenserwartung der Demodex-Milben spezifizierte. Er führte nach Extraktion der Milben aus der Haut verschiedene Experimente an den Milben in allen Stadien ihres Lebenszyklus durch (Phototaxie, Stereotaxie, Dehydrierung, Wärmetoleranz, Fressverhalten). So konnte er auch die Lebenszeit der Milben in ihrem

jeweiligen Stadium sowie die gesamte Lebenserwartung der Demodexmilben abschätzen. Diese beträgt für die jeweiligen Stadien: Ovum 60h, Larve 36h, Protonymphe 72h, Deutonymphe 60h und adulte Milbe 120h. So lässt sich seinen Forschungsergebnissen zufolge ein Gesamtüberleben der Demodex-Milben von 14,5 Tagen oder 348 Stunden berechnen.⁶³ Es ist allerdings zu beachten, dass Spickett zu diesem Zeitpunkt während der Beschreibung des Lebenszyklus der Milben zunächst nur von einer Spezies ausging, also nicht zwischen *Demodex folliculorum* und *Demodex brevis* unterscheiden konnte. Die Differenzierung der beiden Arten erfolgte durch Desch und Nutting in einer Publikation von 1972.⁵³

I.2.3 Pathogenität

Obwohl die Demodex-Milben in den allermeisten Fällen vom humanen Immunsystem toleriert werden, kann es in besonderen Fällen zu durch von Demodex ausgelösten oder zumindest potenzierten Hauterkrankungen kommen. Diese lassen sich nach Chen und Plewig in primäre und sekundäre Demodikosen einteilen.^{54,64} Primäre Demodikosen definieren sich als Hauterkrankungen, welche erstens in Abwesenheit anderer die Klinik erklärenden entzündlichen Hauterkrankungen (beispielsweise Rosacea, periorale Dermatitis oder Acne) auftreten, zweitens mit einer überproportionalen Besiedelung mit Demodex von mehr als fünf Milben pro Quadratzentimeter assoziiert sind und sich drittens mit systemischen oder topischen Akariziden (milbenvernichtende Mittel) behandeln lassen.^{65,66} Differenzialdiagnostisch typisch für primäre Demodikosen ist ein recht spätes Auftreten dieser Hauterkrankungen (meist nach dem 40. Lebensjahr), das Auftreten der Läsionen an Stellen, welche typischerweise von Demodex besiedelt werden, also periorbital, periaurikulär und perioral und schließlich die im Vergleich zur Acne oder Rosacea asymmetrische Verteilung der follikelgebundenen, wenig juckenden und häufiger asymptomatischen Effloreszenzen. So

fehlen meist auch rosacea-typische Begleiterscheinungen wie Teleangiektasien, "Flushing" oder das persistierende Erythem.⁵⁴ Zu den primären Demodikosen gehören die Pityriasis folliculorum⁶⁷, die periorbitale/periorale/periaurikuläre dermatitis-ähnliche Demodikose beziehungsweise die Rosacea-ähnliche Demodikose^{59,61} und die Gesichtsabszess-ähnlichen Konglomerate⁶⁸ beziehungsweise der Demodex-Abszess.⁶⁹ Die Pityriasis folliculorum präsentiert sich mit weißlichen, trockenen, meist isoliert, aber gruppiert und auch mit simultanen Pusteln auftretenden Haarfollikeln der Gesichtshaut. Diese können auch von einer allgemeinen "Flush"-Neigung des Gesichts begleitet sein.⁷⁰ Die Rosacea-ähnliche Demodikose äußert sich wie der Name bereits suggeriert in papulopustulösen Hautveränderungen im Gesicht, allerdings ohne zugrundeliegender Rosacea. Auch fehlen Teleangiektasien und die Verteilung ist nicht symmetrisch. Weitere Differenzierung ermöglicht die Einteilung nach Lokalisation: periorbital, periaurikulär und perioral.⁵⁴ Wird dieses Hautbild noch um Abszesse oder Granulome ergänzt, entspricht es dem von Gesichtsabszess-ähnlichen Konglomeraten beziehungsweise von Demodex-Abszessen.⁵⁴

Von einer sekundären Demodikose wird gesprochen, wenn den durch Milbenüberpopulation hervorgerufenen Effloreszenzen eine andere Erkrankung zugrunde liegt. Als Beispiele für mit einer sekundären Demodikose vergesellschafteten Erkrankungen lassen sich Tumore (melanozytäre Naevi, Mycosis fungoides, Basalzellkarzinom), chronisches Nierenversagen, entzündliche Dermatosen (Acne, Rosacea, seborrhoisches Ekzem, periorale Dermatitis, Steroiddermatitis), AIDS und iatrogene Einflussnahme durch beispielsweise Photo- oder Chemotherapie anführen. Fernerhin treten sekundäre Demodikosen früher auf, zeigen ein diffuseres Bild und gehen mit einer fulminanteren Entzündungsreaktion einher.⁵⁴

Zur Therapie der Demodikosen gibt es aktuell nur wenig Studien, daher auch nur wenig Evidenz. Chen und Plewig führen hier als Mittel der Wahl das Akarizid Ivermectin an. Weitere

akarizide Therapieoptionen wären Benzylbenzoat, Crothamiton, Malathion, Lindan und Permethrin. Analog zur Rosaceatherapie können auch topische sowie subantibiotisch dosierte orale Antibiotika zum Einsatz kommen. Der genaue Wirkungsmechanismus ist hier allerdings auch noch ungeklärt. Im Raum stehen die antiinflammatorische Wirkung, ein antibiotischer und ein ebenfalls akarizider Effekt. Es gilt zu beachten, dass sich die antibiotische Therapie bei primären Demodikosen als sine effectu zeigen kann. Wirkstoffe der Wahl sind hier wie bei der Rosacea Doxycyclin, Metronidazol, Minozyclin, Azelainsäure und Makrolidantibiotika.⁵⁴

II. Fragestellung

Um das Management von primären und sekundären Demodikosen zu verbessern und um weitere Studien zur Physiologie und Anatomie der Demodex-Milben zu ermöglichen, war es Ziel dieser Arbeit, ein erstes Modell der Demodex-Milben-Kultivierung ex-vivo zu untersuchen. Basierend auf einem bereits mehrfach in der Literatur beschriebenen "human organotypic skin explant culture" (hOSEC)-System sollte in einem ersten Versuchsansatz das wirtsunabhängige Demodex-Überleben untersucht werden.⁷¹ Ein weiteres Ziel der Arbeit war

es, anhand verschiedener Substanzen zu untersuchen, ob sich der Lebenszyklus der Demodex-Milbe durch die veränderte Talgzusammensetzung aufgrund der zugegebenen Substanzen auf der Haut ex-vivo verändert.

III. Material und Methoden

Sämtliche verwendeten Substanzen zur Testung und Prüfung der Fragestellung wurden vom Hersteller Sigma Aldrich (Steinheim, Deutschland) bezogen. Ausnahmen werden gesondert gekennzeichnet.

III.1 Probengewinnung

Die zum Einsatz gekommenen Hautproben wurden als „Verwurfhaut“ aus der operativen Abteilung der Klinik und Poliklinik für Dermatologie und Allergologie der LMU München akquiriert. Die Hautproben wurden lediglich dem Gesicht entnommen. Völlige irreversible Anonymität der Hautproben wurde sichergestellt. Ein Schreiben der Ethikkommission, aus dem hervorgeht, dass dadurch keine Beratungspflicht durch eben diese besteht, liegt vor

(Antragsnummer 18-671 UE). Die Proben wurden nach Entnahme aus der Haut auf in physiologischer Kochsalzlösung (0,9% NaCl) getränkten Tüchern feucht gehalten und noch am selben Tag verarbeitet.

III.2 Probenaufbereitung und hOSEC-Modell

Die Proben wurden initial zur Dekontamination mit 70% Ethanol an der Epidermis gewaschen. Fernerhin wurde überschüssiges subkutanes Fettgewebe mit einem Skalpell entfernt und die Hautproben mit einer Stanze in einheitliche Teile von 6mm Durchmesser gebracht. Im nächsten Schritt wurde die Haut in passgenaue, 6mm durchmessende und 10mm hohe Glaszylinder eingelegt und mit Ethylcyanoacrylat, sogenanntem „Sekundenkleber“, so befestigt, dass die Epidermis mit dem oberen Teil des Glaszylinders abschließt. Die zu diesem Zweck verwandten Glaszylinder wurden zuvor autoklaviert, um Sterilität zu gewährleisten. Des Weiteren wurden an einer Seite vier kleine Kerben in die Zylinder gefräst. Diese Seite stellte den unteren Teil des Modells dar und sollte im weiteren Verlauf den Kontakt vom Nährmedium zur Haut in der Innenseite des Glaszylinders gewährleisten. Die so präparierten hOSEC-Modelle wurden nun in 12-Well-Zellkulturplatten mit Nährmedium bei 37°C mit 5% CO₂ inkubiert. In diesem Zusammenhang galt es zu beachten, dass eventuell verbliebene Luftbläschen im Inneren des Glaszylinders unter der Haut zu entfernen waren, um die Proben in Kontakt mit dem Medium zu halten. Die Inkubation zur Beantwortung der ersten Fragestellung bezüglich der Kultivierung der Demodex-Milben in einem ex-vivo-Modell betrug 90 Tage. Zur Beantwortung der zweiten Fragestellung nach Milbenproliferation nach

verschiedener Substanzzugabe wurden in einem weiteren Versuchsaufbau 18 weitere Hautpräparate für 30 Tage inkubiert.

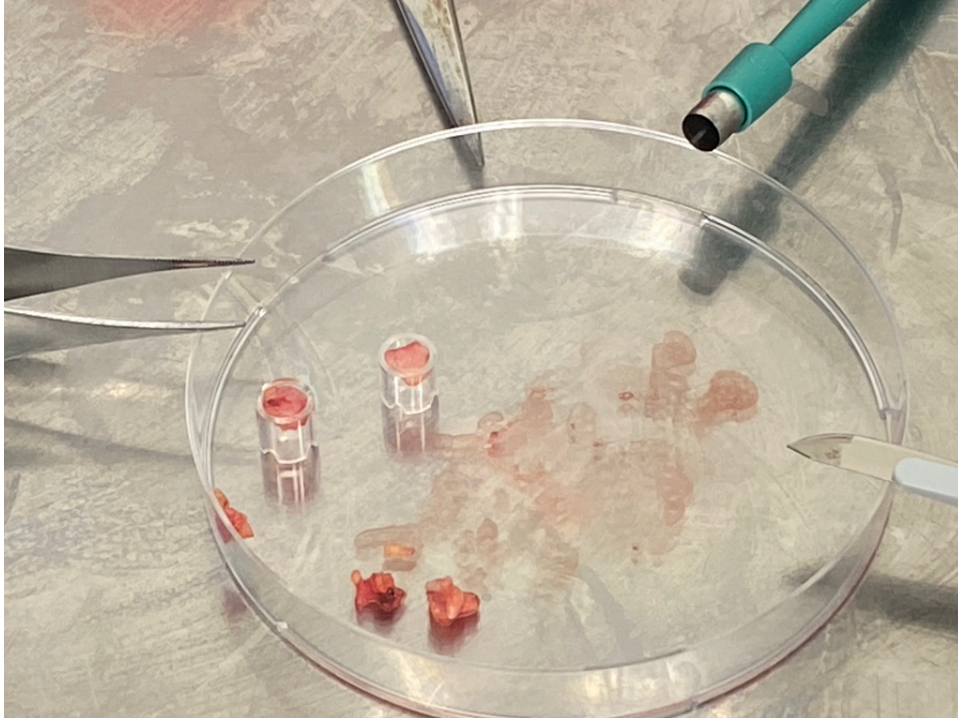


Abbildung 1: Präparation der Hautproben mittels 6mm Hautstanze in die dafür vorgesehenen Glaszylinder.
Quelle: L. M. Ständer.

Die Zusammensetzung des Nährmediums für das hOSEC-Kultur-Modell bestand aus DMEM ("Dulbecco's Modified Eagle Medium") mit 10% Serum neugeborener Kälber, 100 µg/ml Nystatin, 500 µg/ml Aztreonam und 100 µg/ml Clindamycin. Die Antibiotika beziehungsweise das Antimykotikum wurden so gewählt, damit sie der zu erwartenden Hautflora und den endobakteriellen Verhältnissen von *Demodex optimal* begegnen. Dieses Vorgehen wurde bereits in einer früheren Arbeit von Clanner-Engelshofen et al. publiziert.⁷²

Es wurde darauf geachtet, dass das Nährmedium die Füllhöhe von 10mm in den Zellkulturplatten nicht übersteigt, um eine möglichst trockene Epidermis und damit so physiologisch wie möglich Bedingungen für ein ex-vivo-Hautmodell schaffen zu können.

Das Medium samt Zellkulturplatten wurde jeden zweiten Tag gewechselt, um die Hautproben frei von Kontamination zu halten. Im Falle einer bakteriellen Kontamination wurde die Hautprobe nach sorgfältiger Desinfektion mit 70% Ethanol in einen neuen Glaszylinder eingebettet und dann erneut inkubiert, um einer andauernden bakteriellen Überbesiedelung entgegenzuwirken.

III.3 Evaluation der Endpunkte

Nach 90 Tagen der Inkubation wurden im ersten Versuchsansatz die insgesamt 36 Hautkulturpräparate auf Demodex-Milben Besiedelung untersucht. Hierbei wurde zur weiteren Differenzierung auch die Anzahl der im jeweiligen Lebensstadium vorliegenden Milben gezählt.

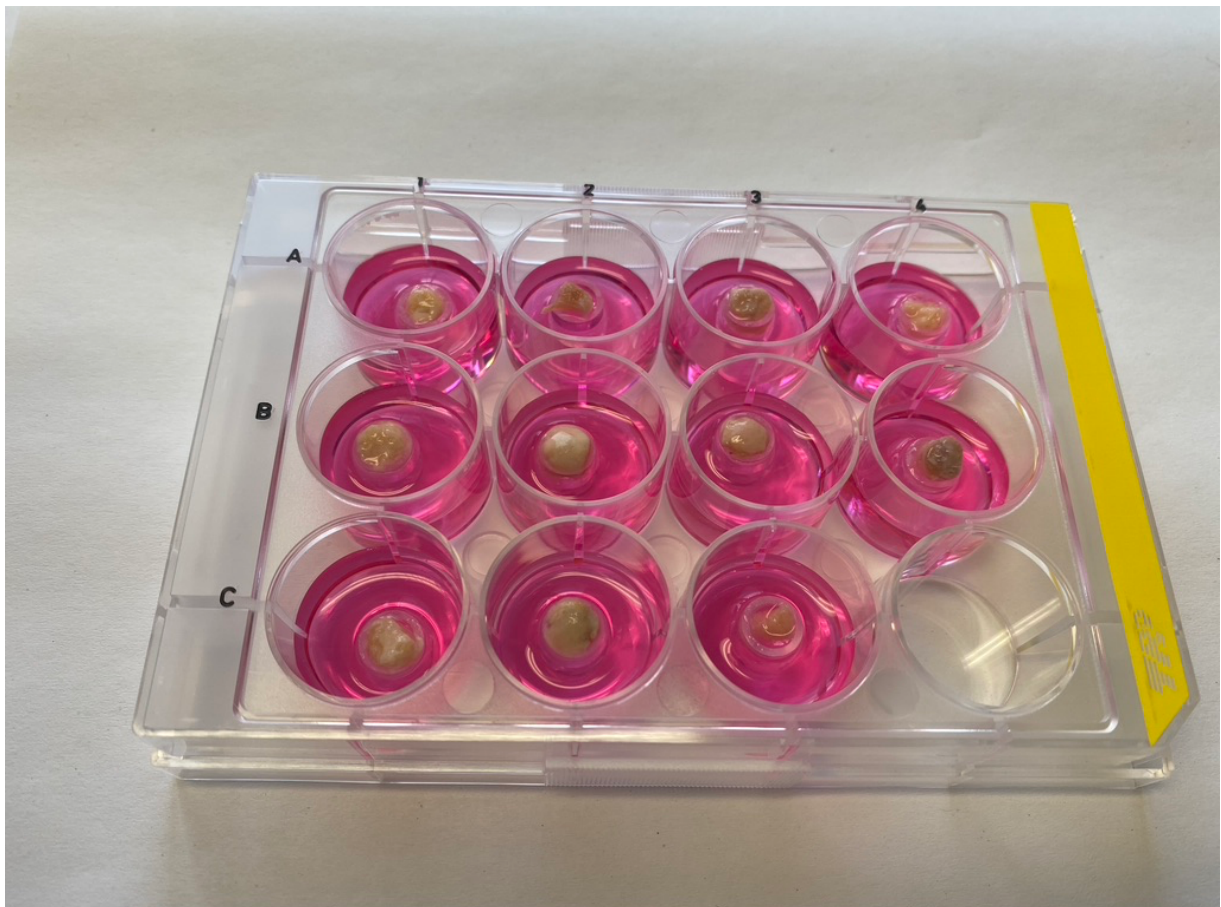


Abbildung 2: hOSEC-Modell zur ex-vivo Kultivierung der Demodex-Milben und Inkubation. Das Bild zeigt die präparierten Hautproben im Nährmedium in 12-Well Zellkulturplatten. Quelle: L. M. Ständer.

In einer zweiten Versuchsanordnung wurde anhand zusätzlicher humaner Hautpräparate aus dem Gesicht von gesunden Spendern die Milbenproliferation ausgedrückt durch die Milbenpopulationsdichte nach Zugabe jeweils zweier seborrhöischer bzw. sebostatischer Substanzen untersucht. Es wurden die Substanzen Testosteron (0,1mg/ml), Trenbolon (0,1 mg/ml), Retinol (0,1 mg/ml) und Isotretinoin (13-cis-Retinsäure 0,1mg/ml) samt einer Negativkontrolle, also einer fehlenden Wirkstoffzugabe, für 30 Tage mit den Hautproben inkubiert. Die Stammlösung bestand aus den bereits genannten Substanzen in 100% Ethanol und wurde den hOSEC-Modellen bei jedem Mediumwechsel jeden zweiten Tag neu hinzugegeben. Den Negativkontrollen wurde dementsprechend nur Ethanol und kein Wirkstoff hinzugegeben. Eine einheitliche Ausgangslage in puncto Milbendichte wurde durch Unterteilung eines Verwurfshautstückchens eines einzigen Spenders in 6mm Stenzen für dieses Experiment geschaffen. Die Experimente wurden in dreifacher Ausführung praktiziert und die daraus entstandenen Daten wurden in Prozent relativ zur Negativkontrolle ausgedrückt. Dies ergab im zweiten Versuchsansatz insgesamt 18 Datenpunkte (siehe Abbildung 3). Somit wurden sechs Verwurfshautproben in jeweils drei Probenbiopsien unterteilt: je zwei Proben mit einer Negativkontrolle für die sebostatische Versuchsreihe und zwei Proben inklusive Negativkontrolle für die seborrhöische Versuchsreihe. Dies gewährleistete eine Vergleichbarkeit der Ergebnisse.

Die Ergebnisse wurden anschließend nach 90 (erster Versuchsansatz) respektive 30 Tagen (zweiter Versuchsansatz) evaluiert, indem sie mikroskopiert wurden. Zusätzlich wurden drei Proben aus dem ersten Versuchsansatz und die Proben aus dem zweiten Versuchsansatz in einem Verdauungsexperiment untersucht. Hierbei wurden die drei Proben zunächst bei 4°C

über Nacht in einer Lösung aus Protease aus Bacillus Polymyxa (Dispase, 5000 caseinolytische Einheiten/ 10ml Arbeitslösung) eingelegt wurden. Der nächste Schritt bestand in der vorsichtigen Ablösung der Epidermis von der Dermis mittels einer Mikropinzette. Die nun abgelöste Epidermis wurde zur weiteren Verarbeitung in einen Nunc™ (Dänemark) Polycarbonat-Zellkultureinsatz mit einer Kulturfläche von 3,14 cm² und einer Porengröße von 8,0 µm gelegt und in kleinere Teile geschnitten. Nun wurde für 30 Minuten bei 37°C zur weiteren Zerteilung eine Trypsin-EDTA-Lösung (0,5 g Trypsin vom Schwein pro Liter Salzlösung nach Hanks) hinzugegeben. Die nun zurückgebliebenen Milben und größeren unverdauten Residuen wurden mit PBS-Lösung ("Phosphate Buffered Saline") gewaschen und bis zur weiteren mikroskopischen Untersuchung in 12-Well-Zellkulturplatten aufbewahrt.

III.4 Mikroskopische Evaluation

Zur mikroskopischen Evaluation der Proben wurde das inverse Lichtmikroskop Axio Observer (Carl Zeiss AG, Oberkochen, Deutschland) mit einer bis zu zweihundertfachen Gesamtvergrößerung und der firmeneigenen ZEN Mikroskopsoftware eingesetzt. Jede Probe wurde unter normalem UV-Licht sowie mit zwei verschiedenen Fluoreszenzfiltern (blau: DAPI (4',6-Diamidin-2-Phenylindol, Filterset 02 oder 49, Zeiss, Deutschland), grün: GFP ("green fluorescent protein", Filterset 38, Zeiss, Deutschland)) untersucht. Dabei erwies sich besonders die Autofluoreszenz der Milben als sehr hilfreich, da sie sich so unter dem unverdauten Debris gut lokalisieren ließen. Als Lebenskriterium einer adulten Milbe wurden Bewegungen der Beinpaare respektive der Kieferklauen über eine Minute festgesetzt. Zeigte die Milbe in dieser Zeit keine Bewegung, galt sie als tot. Da weder Ova noch Nymphen oder Larvae klassischerweise viel Bewegung zeigen, galt einzig ihre typische Morphologie als Identifikationskriterium. Hierbei ist zu beachten, dass sich der Einfachheit und der besseren

Einteilung und Handhabung halber einer vereinfachten Nomenklatur bedient wurde. So war die Anzahl der Beinpaare das Entscheidungskriterium zur Differenzierung zwischen Larven und Nymphen. Daher wurden Milben mit drei Beinpaaren (Larven und Protonymphen) vereinfacht als Larven gewertet und noch nicht adulte Milben mit bereits vier Beinpaaren (Deutonymphen) zu den Nymphen gezählt.

III.5 Statistische Analyse

Schließlich wurden die Ergebnisse zur statistischen Analyse einem Paardifferenztest (auch t-Differenzentest) unterzogen, wobei ein P-Wert ≤ 0.05 als statistisch signifikant angenommen wurde (* $p \leq 0,05$, ** $p \leq 0,01$, *** $p \leq 0,001$). Sämtliche hier aufgeführten Daten bilden die Ergebnisse mindestens dreier voneinander unabhängiger Experimente ab. Die statistische Analyse und graphische Darstellung erfolgte mit dem Programm GraphPad Prism® 5.01 (GraphPad Software Inc., USA).

IV. Ergebnisse

IV.1 Ex-vivo Kultivierung von humanen Demodex-Milben nach 90 Tagen Inkubationszeit

Nach dreimonatiger Inkubation der Demodex-Milben im hOSEC-Modell konnten entsprechend oben genannter Kriterien in 25 von 36 (69,4%) der Hautkulturproben vitale Milben nachgewiesen werden. In 11 der 36 Proben war kein Chitinpanzer (Exoskelett) nachweisbar. So wurde die Überlebensfähigkeit der Demodex-Milben anhand von 36 voneinander unabhängigen Proben untersucht. Die einzelnen Hautproben wurden parallel und eigenständig demselben Experiment unterzogen und lieferten in insgesamt 25 Fällen dasselbe Ergebnis, den Nachweis vitaler Milben. Die Ergebnisse waren somit hier reproduzierbar. Insgesamt wurden drei Hautproben mit vitalen Milben dem Verdauungsexperiment unterzogen und alle vorgefundenen Lebensstadien wurden zur weiteren Differenzierung und zur Detektion der prozentualen Verteilung dieser mikroskopisch ausgewertet und gezählt (Tabelle 1). Insgesamt ließen sich nur zwei Ova finden (3,8%), gefolgt von Larven (7,5%) und Nymphen (13,2%). Mit Abstand am häufigsten wurden adulte Milben nachgewiesen (75,5%).

Tabelle 1				
Lebensstadium	Haut 1	Haut 2	Haut 3	Gesamt
Ovum	1 (6,3%)	1 (5,0%)	0 (0,0%)	2 (3,8%)
Larve	2 (12,5%)	1 (5,0%)	1 (5,9%)	4 (7,5%)
Nymphe	1 (6,3%)	3 (15,0%)	3 (17,7%)	7 (13,2%)
Adulte Milbe	12 (75,0%)	15 (75,0%)	13 (76,5%)	40 (75,5%)
Gesamt	16	20	17	53

Tabelle 1. Verteilung der Lebensstadien der Demodex-Milben in drei Hautproben. Drei nach dem Zufallsprinzip gewählte Hautproben mit vorbekannter Demodex-Milben-Besiedelung wurden einer enzymatischen Verdauung unterzogen und die verbliebenen Milben in ihren verschiedenen Lebensstadien gezählt. Die Tabelle zeigt die Verteilung der Lebensstadien in den einzelnen Proben und ihrer Gesamtheit in Prozent an. Tabelle modifiziert nach Clanner-Engelshofen et al. aus JEADV 36, 2499–2503 (2022).⁷³

IV.2 Untersuchung der Milbenpopulationsdichte nach Zugabe sebostatischer bzw seborrhoischer Substanzen

In Abbildung 3 ist die Wirkung von Seborrhoe-verursachenden beziehungsweise sebostatischen Substanzen auf die Milbenpopulationsdichte (Milben pro 6 mm durchmessende Epidermis (0,283cm²)) in den Hautstückchen im hOSEC-Modell nach einer Inkubationszeit von 30 Tagen, also zwei Lebenszyklen nach Spickett, aufgeführt.

Hier zeigt sich in Abbildung 3A eine signifikante Abnahme der Milbenpopulationsdichte im Vergleich zur substanzfreien Negativkontrolle (p=0,0286 für Testosteron, p=0,0024 für Trenbolon). So betrug die Mittelwertdifferenz zur Kontrolle 39,6% bei Testosteron respektive 55,7% für Trenbolon.

Ebenfalls signifikant negativ auf die Milbenpopulationsdichte im Experiment wirkten sich sebostatische Substanzen nach 30 Tagen, also zwei Generationen Demodex-Milben-Inkubation, aus (p=0,0378 für Retinol, p=0,0049 für Isotretinoin (13-cis-Retinsäure)), aufgeführt in Abbildung 3B. Die Mittelwertdifferenz zur Negativkontrolle war 15,2% bei

Retinol beziehungsweise 63,4% für Isotretinoin. Damit konnte gezeigt werden, dass die Behandlung der Proben mit Isotretinoin im Experiment zur stärksten Abnahme der Milbenpopulationsdichte nach 30 Tagen im Vergleich zu allen anderen die Talgproduktion beeinflussenden Substanzen geführt hat. Den geringsten Effekt im Experiment zeigte Retinol.

Abbildung 3

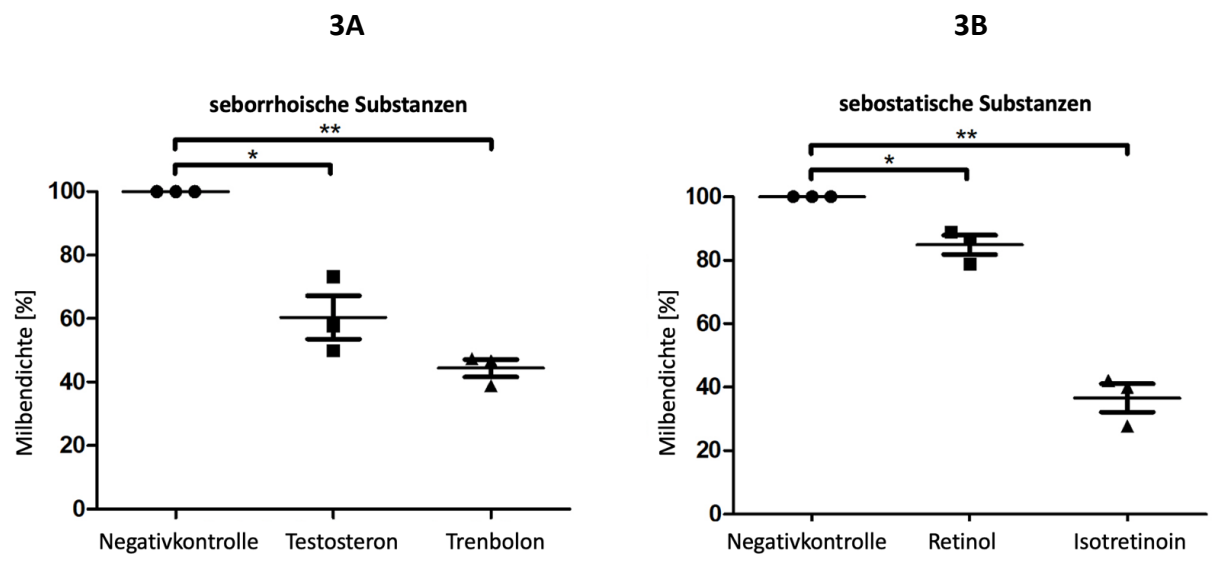


Abbildung 3: Milbenpopulationsdichte (Milben pro 0,283cm²) in Negativkontrollen und nach Behandlung mit seborrhoischen beziehungsweise sebostatischen Substanzen. Abbildung 3 modifiziert nach Clanner-Engelshofen et al. aus JEADV 36, 2499–2503 (2022).⁷³

3A: seborrhoische Substanzen führten zu einer signifikanten Abnahme der Milbendichte ($p=0,0286$ [Testosteron] beziehungsweise $p=0,0024$ [Trenbolon]). Mittelwertdifferenz zur Kontrolle war 39,6% (Testosteron) respektive 55,7% (Trenbolon).

3B: sebostatische Substanzen führten zu einer signifikanten Abnahme der Milbendichte ($p=0,0378$ [Retinol], $p=0,0049$ [Isotretinoin]). Mittelwertsdifferenz zur Kontrolle war 15,2% (Retinol) respektive 63,4% (Isotretinoin).

V. Diskussion

Die vorliegende Arbeit hatte zum Ziel, zwei Fragestellungen zu beantworten. Erstens untersucht sie, ob ein ex-vivo Kultivierungsmodell der humanen Demodex-Milben im hOSEC-Modell realisiert werden kann. Zweitens sollten die Auswirkungen von Seborrhoe-fördernden und sebostatischen Substanzen auf die Milbenproliferation untersucht werden.

Die vorliegende Dissertation konnte zeigen, dass sich nach 90 Tagen Inkubation im hOSEC-Modell in 25 von 36 humanen fazialen Hautpräparaten vitale Demodex-Milben nachweisen lassen konnten. Dies ist ein erster Hinweis auf einen ersten Schritt hin zu einem ex-vivo Demodex-Kultivierungsmodell.

Nach dem nach Spickett ca. 14,5 Tage dauernden Lebenszyklus⁶³ der Milbe sind hier Milben in mindestens der sechsten Generation detektiert worden, welche sich unabhängig von einem lebenden Wirt vermehrt haben. Frade et al. haben in einem Experiment zur Überlebensfähigkeit des hOSEC-Modells menschlicher Haut mindestens 75 Tage lang die Funktionsfähigkeit dieses Modell aufzeigen können. Hierzu bedienten sie sich mikroskopischer Untersuchungen mittels HE (Hämatoxylin-Eosin) Färbung nach 1, 7, 30 und 75 Tagen und immunhistochemischer Färbungen (Ck5/6, Ck10 und Ki-67) am 75. Tag.⁷¹ Es bleibt jedoch auch zu bemerken, dass in 11 der 36 Hautpräparaten keine Milben gefunden

wurden. Dies könnte darauf hindeuten, dass hier die Kultivierung der Demodex-Milbe nicht erfolgreich war, falls entsprechende Milbenbestandteile nachweisbar wären. Die Tatsache, dass jedoch auch keine Milbenexoskelette oder sonstige Überreste toter Demodex-Milben bei diesen Proben detektiert wurden, lässt die Annahme zu, dass bereits zum Zeitpunkt der Inkubation in den entsprechenden Proben keine Milbenbesiedelung stattgefunden hat und deswegen auch nicht detektiert werden konnte. Dies ist auch im Einklang mit der Beobachtung, dass die Demodex-Milbendichte deutlich höher bei Patienten ist, die an einer Rosazea oder Demodikose leiden, im Vergleich zu gesunden Individuen.⁷⁴ Es wäre jedoch auch denkbar, dass Milben oder Milbenbestandteile durch Waschungen mit Ethanol bei Kontamination weggespült wurden und somit das Ergebnis hier verfälscht haben könnten. Weitere Untersuchungen diesbezüglich sind notwendig, um eventuelle Störfaktoren sicher ausschließen zu können. So wären bei künftigen Experimenten unter anderem begleitende, nicht-invasive bildgebende Verfahren sinnvoll, um den Startpunkt sowie den Verlauf der Studien besser beurteilen zu können. Möglich wäre dies beispielsweise mit der konfokalen Lasermikroskopie oder der Optischen Kohärenztomografie (OCT).^{75,76} So könnten die Hautbiopsate zu Beginn, sowie an mehreren Punkten im Verlauf der Kultivierung im hOSEC-Modell evaluiert werden und mögliche Störfaktoren besser eingegrenzt und identifiziert werden.

Auch bleibt zu klären, wie es zu der Demodex-Populationszusammensetzung der verschiedenen Milben-Lebensstadien bei den im Verdauungsexperiment untersuchten Hautproben kam. Hier zeigten sich die adulten Milben in großer Überzahl im Vergleich zu Ova, Larven und Nymphen. Konkret setzte sich die Milbenpopulation jeweils zu etwa 75% aus adulten Milben zusammen. Am wenigsten waren Ova detektiert worden, gefolgt von Larven und Nymphen. Eine nähere Betrachtung der 1961 von Spickett spezifizierten

Lebenserwartung der Demodex-Milben⁶³ ließe die Annahme zu, dass sich eine gesunde Demodex-Milbenpopulation prozentual anders auf die verschiedenen Lebensstadien verteilen würde. Ausgehend von der Annahme, dass sich der Demodex-Milben Lebenszyklus wie folgt zusammensetzt: Ovum 60h, Larve 36h, Protonymphe 72h, Deutonymphe 60h und adulte Milbe 120h, folgt daraus, dass die Demodex-Milben den Großteil ihres Daseins nicht als adulte Milbe verbringen. Dies sollte sich der Annahme folgend auch in der Zusammensetzung der Milbenpopulation dahingehend äußern, dass der Großteil der Milben in den Hautproben nicht adult hätte vorliegen sollen. Die Tatsache, dass in der hier vorliegenden Arbeit in den drei untersuchten Hautproben zu etwa drei Vierteln adulte Milben detektiert wurden, kann verschiedene Gründe haben und zeigt gleichzeitig mögliche Schwächen des hOSEC Modells auf. Zum einen könnte die Milbenpopulation zu diesem Zeitpunkt bereits insoweit eingebrochen sein, als dass es zum Zeitpunkt der Untersuchung zu keiner suffizienten Reproduktion der Milben mehr kam, was nun zu einem Überhang von adulten Milben führen könnte. Dies ließe sich in künftigen Experimenten durch Untersuchungen der Hautproben zu früheren Zeitpunkten näher beleuchten. Eine Möglichkeit zur nicht-invasiven bildgebenden Milbendetektion bestünde beispielsweise in der Zuhilfenahme der konfokalen Laser-Scanning-Mikroskope. Sattler et al. konnten bereits zeigen, dass sich Demodex-Milben mit dieser Methode in-vivo detektieren sowie quantifizieren ließen.⁷⁵ Zum anderen könnte die in diesem Experiment ermittelte Verteilung der Lebensstadien der Demodex-Milbe einer Detektionsproblematik unterliegen. Möglicherweise ließen sich die Ova, Nymphen und Larven nicht zuverlässig mikroskopisch auffinden und konnten daher nicht gezählt werden. Ebenfalls möglich wäre, dass die Milben sich mikroskopisch nicht eindeutig differenzieren ließen und so Nymphen und Larven irrtümlich als adulte Milben gewertet wurden und es dadurch zu dem prozentuellen Überhang

adulter Milben kam. Hier sind ebenfalls weitere Experimente und Untersuchungen notwendig, um möglicherweise neue Methoden zur sicheren Milbendetektion zu finden oder auch aktuelle Methoden zu validieren. Ein weiterer Punkt, welchem die aufgeführte Milbenverteilung zugrunde liegen könnte, ist die Tatsache, dass bei dem Verdauungsexperiment die Epidermis enzymatisch von der Dermis getrennt wurde. Hierbei könnte sich die Epidermis unerwünschterweise auch teils unvollständig von der Dermis gelöst haben und Teile der Follikelstrukturen mitsamt den darin enthaltenen Demodex-Milben, besonders in nicht adulten Lebensstadien, samt Ova in der Dermis verblieben sein. Schließlich wäre auch möglich, dass die Überlebenszeit der adulten Milbe doch länger als die bisher angenommenen 120h andauert. Dies könnte die in Tabelle 1 aufgeführte Verteilung der Lebensstadien der Demodex-Milben rechtfertigen. Auf jeden Fall wären weitere Untersuchungen dahingehend angezeigt. Aufschluss über die Verteilung der Lebensstadien der Demodex-Milben in einer gesunden Population könnte beispielsweise die Untersuchung einer frisch entnommenen, nicht kultivierten Hautprobe geben. Eine vergleichende Untersuchung frischer Hautbiopsien mit den hier untersuchten, über 90 Tage im hOSEC-Modell kultivierten Hautproben könnten Gegenstand künftiger Forschung sein.

Dennoch bleibt festzuhalten, dass in einer Mehrzahl der Fälle vitale Milben nachweisbar waren, was einen ersten Schritt hin zu einem ex-vivo Modell sein kann, was nach ausreichender zusätzlicher Validierung zu neuen experimentellen Fragestellungen und deren Beantwortung führen könnte.

Chen und Plewig führen in ihrer 2014 publizierten Arbeit zu humanen Demodikosen unter anderem an, dass einer der Gründe für die schlechte Evidenzlage zur Therapie ein fehlendes in-vitro- oder ex-vivo-Kultivierungsmodell ist, in welchem mögliche Therapeutika zu Effektivität und minimaler Hemmkonzentration getestet werden können.⁵⁴ Es besteht Grund

zur Hoffnung, dass mit dem hier beschriebenen Modell in Zukunft weitere Untersuchungen möglich werden könnten.

Im zweiten Teil dieser Dissertation sollten verschiedene Seborrhoe-induzierende oder sebostatische Substanzen auf ihren Einfluss auf die Milbenproliferation untersucht werden. Diese Experimente zeigten, dass die Beeinflussung der Talgproduktion sich signifikant auf die Milbenpopulation im hOSEC-Modell auswirkt. Der Grund hierfür könnte sich möglicherweise in der genaueren Betrachtung des Lebenszyklus und der unterschiedlichen Lebensstationen der Demodex-Milben finden. Nach der Kopulation an der Talgfollikelöffnung begeben sich die weiblichen Milben in die Tiefe der Talgdrüse zur Eiablage. Spickett schätzte die Dauer dieses Prozesses auf etwa zwölf Stunden. Etwa 60 Stunden nach Eiablage schlüpfen die Larven. Diese halten sich in der Regel nun für etwa 40 Stunden im Talgausführungsgang auf. Dort entwickeln sie sich auch, nachdem sie sich gehäutet haben, zu Protonymphen. Da ihre Beinpaare noch nicht weit genug entwickelt sind, damit auch wenig Bewegung zeigen, richtet sich die Wanderung der Nymphen nach dem Talgfluss aus den Talgdrüsen gen Hautoberfläche. Die sich aus der Protonymphe entwickelnde Deutonymphe wandert nun für einige Zeit (etwa 12-36 Stunden), vor allem bei Dämmerung und Dunkelheit, über die Hautoberfläche, um sich dann wieder in einen Haarfollikel zu begeben und nach 60 Stunden des Deutonymphen-Daseins nach erneutem Häuten zur adulten Milbe zu werden. Die weiblichen Demodex-Milben verbleiben nun in der Follikelöffnung. Die männlichen wiederum begeben sich auf Wanderschaft aus dem Follikel hinaus und auf die Suche nach einem zu begattenden Weibchen.⁶³

So könnten die Talgproduktion-fördernden Substanzen dazu führen, dass die Milben noch im Larven- oder frühen Nymphen-Stadium bereits mit dem Talgfluss herausgeschwemmt werden

könnten und dadurch unterentwickelt an der Hautoberfläche ankommen. Dies könnte zu ihrem Untergang und einer damit einhergehenden herabgesetzten Milbendichte auf der Haut führen.

Sebostatische Substanzen würden möglicherweise wiederum in entgegengesetzter Richtung intervenieren. Der Talgfluss wäre hier vermindert, Milben verblieben länger als „optimal“ in den Haarfollikeln. Dies könnte die Milbenproliferation auf noch bisher unbekannte Weise negativ beeinflussen oder der adulten Milbe entscheidende Zeit kosten, sich zunächst aus dem Follikel zu bewegen und sich dann in einen neuen Follikel zur Paarung zu begeben.

Eine weitere Möglichkeit zur auf die Demodexmilbendichte negativen Wirkung sebostatischer Substanzen könnte in einer veränderten Zusammensetzung des Sebums liegen. Der Talg ist viskoser und für die Milben möglicherweise schwerer zu durchdringen. So wäre das Hineinkommen in den Follikel für die begattete Milbe zur Eiablage erschwert und Protonymphen respektive adulte Milben könnten erschwert den Weg aus dem Follikel hinausfinden. Allerdings ist auch hier festzuhalten, dass es sich hierbei um ein erstes Experiment hin zu einem validen Modell handelt und noch weiterer Forschung bedarf. So ist beispielsweise noch die Frage nach der idealen Konzentration der gewählten Stoffe zu beantworten. Hierzu sind in der Literatur nach unserem Wissen noch keine belastbaren Daten zu finden. Auch deshalb wurde für dieses Experiment als erster Anhaltspunkt jeweils eine Konzentration von 0,1mg/ml für die getesteten Substanzen gewählt, da in dieser Log-Stufe Tretinoin auch therapeutisch angewendet wird (siehe DAC/NRF-Rezeptur 11.100., in welcher Konzentrationen von 0,025%, 0,05% und 0,1% zum Einsatz kommen⁷⁷). Die hier aufgeführten Ergebnisse zeigen demnach zunächst einen generellen Effekt der Substanzen auf die Milbenpopulationsdichte auf.

Ebenfalls bemerkenswert ist, dass alle getesteten Substanzen den gewünschten akariziden Effekt aufwiesen. Dabei zeigte die als einzige in der Praxis für die Behandlung von Rosacea eingesetzte Substanz (Isotretinoin) den stärksten Effekt, im konkreten Fall also die stärkste Verminderung der Milbendichte nach 30 Tagen Inkubation mit der Substanz im Vergleich zur ebenfalls 30 Tage inkubierten, mit keiner zusätzlichen Substanz behandelten Negativkontrolle.

Eine mögliche Limitation des hier etablierten hOSEC-Demodex-Milben-Kultivierungsmodells ist die begrenzte Überlebensfähigkeit der inkubierten Hautproben. Es zeigten sich nach Verstreichen der 90 Tage deutliche Mazerationen. Dies ist auf die sehr hohe Luftfeuchtigkeit von nahezu 100% im Inkubator zurückzuführen. Hier hat das Modell noch Optimierungsbedarf. Eine Überlegung dahingehend wäre, in künftigen Experimenten für eine Abtrennung der Epidermis der Hautproben vom unteren Teil des Modells zu sorgen und sie somit nicht so hoher Luftfeuchtigkeit auszusetzen. So könnte möglicherweise eine Kultivierung weit über die bisher getesteten 90 Tage hinaus erfolgen und womöglich auch durch Optimierung der Umweltbedingungen für die Demodex-Milben zu höheren Proliferationsraten führen. Auch hier bedarf es weiterer experimenteller Forschung um künftig validere Aussagen zu einer sinnvollen, beziehungsweise optimalen Inkubationszeit und auch optimalen Inkubationsbedingungen treffen zu können. Nachdem Frade et al. zunächst die Überlebensfähigkeit des hOSEC-Modells von mindestens 75 Tagen beweisen konnten⁷¹, wäre es von Nutzen, dieses Modell auch weit über die bisher getesteten Zeiten von 75, beziehungsweise in dieser Dissertation 90 Tagen zu erforschen und nach Möglichkeiten zu suchen, die Hautstückchen des hOSEC-Modells über lange Zeiträume vital zu halten. Gegenstand künftiger Forschung könnte auch die Suche nach einer Substanz sein, welche, anders als die bisher getesteten Substanzen, die Milbenpopulationsdichte nicht

verringert, sondern erhöht. Interessant wäre in diesem Zusammenhang die genauere Erforschung von Glucocorticosteroiden und deren Wirkung auf die Demodexpopulationsdichte. Hierbei böte sich die Chance, den Mechanismus der Entstehung von glucocorticosteroid-induzierten Demodikosen genauer zu beleuchten. Es ließe sich im hOSEC-Modell differenzieren, ob der Pathomechanismus systemisch auf der Beeinflussung des Immunsystems des Wirts oder auf lokalen, das Immunsystem der Haut betreffenden Mechanismen, beruht. Im ersten Fall wäre somit bei Zugabe von Glucocorticosteroiden in das hOSEC-Modell nicht mit einem Anstieg der Demodexpopulationsdichte zu rechnen. Daher würde ein Anstieg der Milbendichte im ex-vivo Modell auf einen das lokale Hautimmunsystem betreffenden Pathomechanismus hinweisen. Ebenfalls nötig wäre es, die optimale Talgzusammensetzung und Talgdrüsenproduktivität zu ermitteln.

Eine weitere Überlegung zur Optimierung dieses Modells ist die begleitende, nichtinvasive Bildgebung vor und während der Experimente. Zur Debatte stünden hier zum Beispiel die CLSM ("confocal laser scanning microscopy", Konfokallasermikroskopie) oder auch die OCT (optische Kohärenztomografie). Singh et al. zeigten in einer 2020 im *British Journal of Dermatology* publizierten Arbeit, dass es sogar noch einfacher gehen würde. Sie demonstrierten, dass es möglich ist, sich bewegende Demodex-Milben durch UV-Dermatoskopie mittels passendem Smartphone Aufsatz in-vivo sichtbar zu machen.⁷⁸ Diese Methode limitiert die Darstellung der Demodex-Milben allerdings auf die jene Milben, welche sich außerhalb der Haarfollikel bewegen oder sich gerade an der Follikelöffnung befinden. Ebenfalls kann die hochauflösende optische Kohärenztomografie es ermöglichen, in-vivo oder in diesem konkreten Fall im hOSEC-Modell, Demodex-Milben zu detektieren.⁷⁶ Auch die konfokale Lasermikroskopie stellt eine valide Option zur in-vivo Milbendetektion dar.⁷⁵ So hätte in diesem Experiment die Annahme überprüft werden können, ob in den elf milbenlosen

Hautproben tatsächlich von Beginn an keine Milben vorhanden waren oder ob, und gegebenenfalls wann, es zum Absterben der Milben kam. Ebenfalls hätte die mikroskopische Evaluation der Hautproben vor Inkubation neben dem qualitativen auch den quantitativen Erfolg des Kultivierungsexperiments aufzeigen können. Die in-vivo-Detektion und Beobachtung von Demodex-Milben könnte es ermöglichen, Milben bei Bedarf, beispielsweise zur Verlängerung der ex-vivo-Kultivierung, auf ein neues hOSEC-Modell zu transferieren. Nützlich könnte sich in diesem Zusammenhang auch erweisen, dass Demodex-Milben sich mittels flüssigem Stickstoff schockgefrieren lassen, was eventuellen Transfer erleichtern und komplikationsarm gestalten können würde.⁷⁹ Dies ließe bei Gelingen auch eine erstmalige durchgängige ex-vivo Kultur der Demodex-Milbe zu, welche möglicherweise lange Zeiträume, theoretisch über Jahre, fortlaufen könnte.

Zusammenfassend lässt sich sagen, dass das hier präsentierte hOSEC ex-vivo-Modell zur Kultivierung der Milbe *Demodex* spp. die erste Methode zur wirtsunabhängigen Kultivierung der Milben etabliert hat. Es ist zu hoffen, dass der Wissenschaft hiermit neue Möglichkeiten eröffnet wurden, am komplexesten Mitglied des menschlichen Mikrobioms zu forschen, seine Anatomie, Biologie, Physiologie und nicht zuletzt auch die Rolle in der Pathogenität primärer und sekundärer Demodikosen und der Rosacea im Speziellen zu verstehen und neue Therapien hierfür entwickeln zu können.

Literaturverzeichnis

1. van Zuuren, E. J., Fedorowicz, Z., Carter, B., van der Linden, M. M. D. & Charland, L. Interventions for rosacea. *Cochrane Database Syst. Rev.* CD003262 (2015)
doi:10.1002/14651858.CD003262.pub5.
2. Wollina, U. Is rosacea a systemic disease? *Clin. Dermatol.* 37, 629–635 (2019).
3. Agnoletti, A. F. *et al.* Etiopathogenesis of rosacea: a prospective study with a three-year follow-up. *G. Ital. Dermatol. E Venereol. Organo Uff. Soc. Ital. Dermatol. E Sifilogr.* 152, 418–423 (2017).
4. Spöndlin, J., Voegel, J. J., Jick, S. S. & Meier, C. R. A study on the epidemiology of rosacea in the U.K. *Br. J. Dermatol.* 167, 598–605 (2012).
5. Kroshinsky, D. & Glick, S. A. Pediatric rosacea. *Dermatol. Ther.* 19, 196–201 (2006).
6. Gether, L., Overgaard, L. K., Egeberg, A. & Thyssen, J. P. Incidence and prevalence of rosacea: a systematic review and meta-analysis. *Br. J. Dermatol.* 179, 282–289 (2018).
7. Abram, K., Silm, H., Maarros, H.-I. & Oona, M. Risk factors associated with rosacea. *J. Eur. Acad. Dermatol. Venereol. JEADV* 24, 565–571 (2010).
8. Chang, A. L. S. *et al.* Assessment of the Genetic Basis of Rosacea by Genome-Wide Association Study. *J. Invest. Dermatol.* 135, 1548–1555 (2015).
9. Yazici, A. C. *et al.* GSTM1 and GSTT1 null genotypes as possible heritable factors of rosacea. *Photodermatol. Photoimmunol. Photomed.* 22, 208–210 (2006).
10. Karpouzis, A. *et al.* Assessment of Tachykinin Receptor 3' Gene Polymorphism rs3733631 in Rosacea. *Int. Sch. Res. Not.* 2015, 469402 (2015).

11. Clanner-Engelshofen, B. M. et al. S2k-Leitlinie: Rosacea. *J Dtsch Dermatol Ges* 20, 1147–1167 (2022).
12. Jarmuda, S. et al. Potential role of Demodex mites and bacteria in the induction of rosacea. *J. Med. Microbiol.* 61, 1504–1510 (2012).
13. Bonnar, E., Eustace, P. & Powell, F. C. The Demodex mite population in rosacea. *J. Am. Acad. Dermatol.* 28, 443–448 (1993).
14. Steinhoff, M. et al. Clinical, cellular, and molecular aspects in the pathophysiology of rosacea. *J. Investig. Dermatol. Symp. Proc.* 15, 2–11 (2011).
15. Buhl, T. et al. Molecular and Morphological Characterization of Inflammatory Infiltrate in Rosacea Reveals Activation of Th1/Th17 Pathways. *J. Invest. Dermatol.* 135, 2198–2208 (2015).
16. Drummond, P. D. & Su, D. Endothelial and axon reflex vasodilatation to acetylcholine in rosacea-affected skin. *Arch. Dermatol. Res.* 304, 133–137 (2012).
17. Steinhoff, M. et al. Modern aspects of cutaneous neurogenic inflammation. *Arch. Dermatol.* 139, 1479–1488 (2003).
18. Yamasaki, K. et al. Increased serine protease activity and cathelicidin promotes skin inflammation in rosacea. *Nat. Med.* 13, 975–980 (2007).
19. Yamasaki, K. et al. TLR2 expression is increased in rosacea and stimulates enhanced serine protease production by keratinocytes. *J. Invest. Dermatol.* 131, 688–697 (2011).
20. Plewig, G, Ruzicka, T, Kaufmann, R, Hertl, M. *Braun Falco´s Dermatologie, Venerologie und Allergologie.* vol. 2 (Springer, 2018).
21. van Zuuren, E. J. et al. Rosacea: New Concepts in Classification and Treatment. *Am. J. Clin. Dermatol.* 22, 457–465 (2021).

22. Schaller, M. *et al.* Recommendations for rosacea diagnosis, classification and management: update from the global ROSacea COnsensus 2019 panel. *Br. J. Dermatol.* 182, 1269–1276 (2020).
23. Elewski, B. E. *et al.* Rosacea - global diversity and optimized outcome: proposed international consensus from the Rosacea International Expert Group. *J. Eur. Acad. Dermatol. Venereol. JEADV* 25, 188–200 (2011).
24. Two, A. M., Wu, W., Gallo, R. L. & Hata, T. R. Rosacea: part II. Topical and systemic therapies in the treatment of rosacea. *J. Am. Acad. Dermatol.* 72, 761–770; quiz 771–772 (2015).
25. Steinhoff, M., Schaubert, J. & Leyden, J. J. New insights into rosacea pathophysiology: a review of recent findings. *J. Am. Acad. Dermatol.* 69, S15-26 (2013).
26. Gonser, L. I., Gonser, C. E. & Schaller, M. [Pathogenesis, clinical picture, and current therapy of rosacea]. *Hautarzt Z. Dermatol. Venerol. Verwandte Geb.* 67, 69–82; quiz 83–84 (2016).
27. Maddin, S. A comparison of topical azelaic acid 20% cream and topical metronidazole 0.75% cream in the treatment of patients with papulopustular rosacea. *J. Am. Acad. Dermatol.* 40, 961–965 (1999).
28. Elewski, B. E., Fleischer, A. B. & Pariser, D. M. A comparison of 15% azelaic acid gel and 0.75% metronidazole gel in the topical treatment of papulopustular rosacea: results of a randomized trial. *Arch. Dermatol.* 139, 1444–1450 (2003).
29. Zhao, Y. E., Wu, L. P., Peng, Y. & Cheng, H. Retrospective analysis of the association between Demodex infestation and rosacea. *Arch. Dermatol.* 146, 896–902 (2010).

30. Kanada, K. N., Nakatsuji, T. & Gallo, R. L. Doxycycline indirectly inhibits proteolytic activation of tryptic kallikrein-related peptidases and activation of cathelicidin. *J. Invest. Dermatol.* 132, 1435–1442 (2012).
31. Nikolowski, J. & Plewig, G. [Rosacea. Oral therapy with 13-cis retinoic acid]. *Hautarzt Z. Dermatol. Venerol. Verwandte Geb.* 31, 660–661 (1980).
32. Schmidt, J. B. & Raff, M. [13-Cis-retinoic acid: a new form of treatment of rosacea (author's transl)]. *Wien. Klin. Wochenschr.* 94, 115–118 (1982).
33. Hoting, E., Paul, E. & Plewig, G. Treatment of rosacea with isotretinoin. *Int. J. Dermatol.* 25, 660–663 (1986).
34. Bagatin, E. & Costa, C. S. The use of isotretinoin for acne - an update on optimal dosing, surveillance, and adverse effects. *Expert Rev. Clin. Pharmacol.* 13, 885–897 (2020).
35. Fowler, J. F. Combined effect of anti-inflammatory dose doxycycline (40-mg doxycycline, usp monohydrate controlled-release capsules) and metronidazole topical gel 1% in the treatment of rosacea. *J. Drugs Dermatol. JDD* 6, 641–645 (2007).
36. Del Rosso, J. Q., Bruce, S., Jarratt, M., Menter, A. & Staedtler, G. Efficacy of topical azelaic acid (AzA) gel 15% plus oral doxycycline 40 mg versus metronidazole gel 1% plus oral doxycycline 40 mg in mild-to-moderate papulopustular rosacea. *J. Drugs Dermatol. JDD* 9, 607–613 (2010).
37. Schaller, M. *et al.* A randomized phase 3b/4 study to evaluate concomitant use of topical ivermectin 1% cream and doxycycline 40-mg modified-release capsules, versus topical ivermectin 1% cream and placebo in the treatment of severe rosacea. *J. Am. Acad. Dermatol.* 82, 336–343 (2020).

38. Nybaek, H. & Jemec, G. B. E. Photodynamic therapy in the treatment of rosacea. *Dermatol. Basel Switz.* 211, 135–138 (2005).
39. Bryld, L. E. & Jemec, G. B. E. Photodynamic therapy in a series of rosacea patients. *J. Eur. Acad. Dermatol. Venereol. JEADV* 21, 1199–1202 (2007).
40. Fan, L., Yin, R., Lan, T. & Hamblin, M. R. Photodynamic therapy for rosacea in Chinese patients. *Photodiagnosis Photodyn. Ther.* 24, 82–87 (2018).
41. Dahan, S. Laser and intense pulsed light management of couperose and rosacea. *Ann. Dermatol. Venereol.* 138 Suppl 3, S219-222 (2011).
42. Neuhaus, I. M., Zane, L. T. & Tope, W. D. Comparative efficacy of nonpurpuragenic pulsed dye laser and intense pulsed light for erythematotelangiectatic rosacea. *Dermatol. Surg. Off. Publ. Am. Soc. Dermatol. Surg. AI* 35, 920–928 (2009).
43. Goon, P. K. Y., Dalal, M. & Peart, F. C. The gold standard for decortication of rhinophyma: combined erbium-YAG/CO₂ laser. *Aesthetic Plast. Surg.* 28, 456–460 (2004).
44. Simo, R. & Sharma, V. L. The use of the CO₂ laser in rhinophyma surgery: personal technique and experience, complications, and long-term results. *Facial Plast. Surg. FPS* 14, 287–295 (1998).
45. Sadick, H., Riedel, F. & Bran, G. [Rhinophyma in rosacea. What does surgery achieve?]. *Hautarzt Z. Dermatol. Venerol. Verwandte Geb.* 62, 834–841 (2011).
46. Aksoy, B., Altaykan-Hapa, A., Egemen, D., Karagöz, F. & Atakan, N. The impact of rosacea on quality of life: effects of demographic and clinical characteristics and various treatment modalities. *Br. J. Dermatol.* 163, 719–725 (2010).

47. Baldwin, H. E. A community-based study of the effectiveness of doxycycline 40 mg (30-mg immediate-release and 10-mg delayed-release beads) on quality of life and satisfaction with treatment in participants with rosacea. *Cutis* 86, 26–36 (2010).
48. Böhm, D., Schwanitz, P., Stock Gissendanner, S., Schmid-Ott, G. & Schulz, W. Symptom severity and psychological sequelae in rosacea: results of a survey. *Psychol. Health Med.* 19, 586–591 (2014).
49. Wu, Y., Fu, C., Zhang, W., Li, C. & Zhang, J. The dermatology life quality index (DLQI) and the hospital anxiety and depression (HADS) in Chinese rosacea patients. *Psychol. Health Med.* 23, 369–374 (2018).
50. Egeberg, A., Hansen, P. R., Gislason, G. H. & Thyssen, J. P. Patients with Rosacea Have Increased Risk of Depression and Anxiety Disorders: A Danish Nationwide Cohort Study. *Dermatol. Basel Switz.* 232, 208–213 (2016).
51. van der Linden, M. M. D. *et al.* Health-related quality of life in patients with cutaneous rosacea: a systematic review. *Acta Derm. Venereol.* 95, 395–400 (2015).
52. Ferrer, L., Ravera, I. & Silbermayr, K. Immunology and pathogenesis of canine demodicosis. *Vet. Dermatol.* 25, 427-e65 (2014).
53. Desch, C. & Nutting, W. B. *Demodex folliculorum* (Simon) and *D. brevis akbulatova* of man: redescription and reevaluation. *J. Parasitol.* 58, 169–177 (1972).
54. Chen, W. & Plewig, G. Human demodicosis: revisit and a proposed classification. *Br. J. Dermatol.* 170, 1219–1225 (2014).
55. Aylesworth, R. & Vance, J. C. *Demodex folliculorum* and *Demodex brevis* in cutaneous biopsies. *J. Am. Acad. Dermatol.* 7, 583–589 (1982).

56. Benessahraoui, M., Paratte, F., Plouvier, E., Humbert, P. & Aubin, F. Demodicidosis in a child with xantholeukaemia associated with type 1 neurofibromatosis. *Eur. J. Dermatol. EJD* 13, 311–312 (2003).
57. Damian, D. & Rogers, M. Demodex infestation in a child with leukaemia: treatment with ivermectin and permethrin. *Int. J. Dermatol.* 42, 724–726 (2003).
58. Herron, M. D., O'reilly, M. A. & Vanderhooft, S. L. Refractory Demodex folliculitis in five children with acute lymphoblastic leukemia. *Pediatr. Dermatol.* 22, 407–411 (2005).
59. Jansen, T., Kastner, U., Kreuter, A. & Altmeyer, P. Rosacea-like demodicidosis associated with acquired immunodeficiency syndrome. *Br. J. Dermatol.* 144, 139–142 (2001).
60. Lübbe, J., Stucky, L. & Saurat, J.-H. Rosaceiform dermatitis with follicular Demodex after treatment of facial atopic dermatitis with 1% pimecrolimus cream. *Dermatol. Basel Switz.* 207, 204–205 (2003).
61. Antille, C., Saurat, J.-H. & Lübbe, J. Induction of rosaceiform dermatitis during treatment of facial inflammatory dermatoses with tacrolimus ointment. *Arch. Dermatol.* 140, 457–460 (2004).
62. Hirst, S. (1919) Studies on Acari.—No. 1. The genus Demodex, Owen. By Stanley Hirst. Published by Order of the Trustees of the British Museum (Natural History). London, 1919. ii–44 pp., 13 plates, and 4 text-figures. Price 10s., *Annals and Magazine of Natural History*, 4:24, 411–412, DOI: 10.1080/00222931908673911. (1919) doi:DOI: 10.1080/00222931908673911.
63. Spickett, S. G. Studies on Demodex folliculorum Simon (1842). I. Life history. *Parasitology* 51, 181–192 (1961).

64. Akilov, O. E., Butov, Y. S. & Mumcuoglu, K. Y. A clinico-pathological approach to the classification of human demodicosis. *J. Dtsch. Dermatol. Ges. J. Ger. Soc. Dermatol. JDDG* 3, 607–614 (2005).
65. Forton, F., Seys, B., Marchal, J. L. & Song, A. M. Demodex folliculorum and topical treatment: acaricidal action evaluated by standardized skin surface biopsy. *Br. J. Dermatol.* 138, 461–466 (1998).
66. Forton, F. & Seys, B. Density of Demodex folliculorum in rosacea: a case-control study using standardized skin-surface biopsy. *Br. J. Dermatol.* 128, 650–659 (1993).
67. Forton, F. M. N. Papulopustular rosacea, skin immunity and Demodex: pityriasis folliculorum as a missing link. *J. Eur. Acad. Dermatol. Venereol. JEADV* 26, 19–28 (2012).
68. Aydogan, K., Alver, O., Tore, O. & Karadogan, S. K. Facial abscess-like conglomerates associated with Demodex mites. *J. Eur. Acad. Dermatol. Venereol. JEADV* 20, 1002–1004 (2006).
69. Schaller, M., Sander, C. A. & Plewig, G. Demodex abscesses: clinical and therapeutic challenges. *J. Am. Acad. Dermatol.* 49, S272-274 (2003).
70. Darji, K. & Burkemper, N. M. Pityriasis Folliculorum: Response to Topical Ivermectin. *J. Drugs Dermatol. JDD* 16, 1290–1292 (2017).
71. Frade, M. A. C. *et al.* Prolonged viability of human organotypic skin explant in culture method (hOSEC). *An. Bras. Dermatol.* 90, 347–350 (2015).
72. Clanner-Engelshofen, B. M., French, L. E. & Reinholz, M. *Corynebacterium kroppenstedtii* subsp. *demodicis* is the endobacterium of Demodex folliculorum. *J. Eur. Acad. Dermatol. Venereol. JEADV* 34, 1043–1049 (2020).

73. Clanner-Engelshofen, B. M. *et al.* First ex vivo cultivation of human Demodex mites and evaluation of different drugs on mite proliferation. *J. Eur. Acad. Dermatol. Venereol. JEADV* 36, 2499–2503 (2022).
74. Foley, R., Kelly, P., Gatault, S. & Powell, F. Demodex: a skin resident in man and his best friend. *J. Eur. Acad. Dermatol. Venereol. JEADV* 35, 62–72 (2021).
75. Sattler, E. C. *et al.* Noninvasive in vivo detection and quantification of Demodex mites by confocal laser scanning microscopy. *Br. J. Dermatol.* 167, 1042–1047 (2012).
76. Maier, T., Sattler, E., Braun-Falco, M., Ruzicka, T. & Berking, C. High-definition optical coherence tomography for the in vivo detection of demodex mites. *Dermatol. Basel Switz.* 225, 271–276 (2012).
77. Motamedi, M., Chehade, A., Sanghera, R. & Grewal, P. A Clinician’s Guide to Topical Retinoids. *J. Cutan. Med. Surg.* 26, 71–78 (2022).
78. Singh, N., Yang, H., Pradhan, S., Ran, X. & Ran, Y. Image Gallery: Wandering Demodex mite in vivo under ultraviolet dermoscopy of rosacea. *Br. J. Dermatol.* 182, e2 (2020).
79. Clanner-Engelshofen, B. M., French, L. E. & Reinholz, M. Methods for extraction and ex-vivo experimentation with the most complex human commensal, Demodex spp. *Exp. Appl. Acarol.* 80, 59–70 (2020).

Danksagung

Ich möchte mich bei meinem Doktorvater, Herrn Prof. Dr. Dr. Markus Reinholz, für die Vergabe der Dissertation und die Betreuung während dieser bedanken. Auch gilt mein Dank meinem Betreuer, Herrn Dr. Dr. Benjamin Clanner-Engelshofen, für seine Hilfestellungen während der Dissertation. Herzlichen Dank auch an Herrn Prof. Dr. French, für seine besondere Unterstützung. Danken möchte ich auch meinen Eltern Ojdana und Dr. Michael Ständer, deren Unterstützung ich mir immer sicher sein konnte. Ein besonderer Dank gilt vor allem meinem Bruder PD Dr. Sascha Ständer, der immer an meiner Seite stand.

Vielen Dank!

Publikationsliste

1. Evaluation of hand hygiene and onset of hand eczema after the outbreak of SARS-CoV-2 in Munich.

Kenziora B, Guertler A, Ständer L, Frey S, French LE, Wollenberg A, Reinholz M. Eur J Dermatol. 2020 Dec 1;30(6):668-673.

2. First ex vivo cultivation of human Demodex mites and evaluation of sebogenesis-modifying drugs.

BM Clanner-Engelshofen, LM Ständer, T Kämmerer, LH Frommherz, PC Stadler, A Gürtler, M Reinholz. J. Eur. Acad. Dermatol. Venereol. JEADV 36, 2499–2503 (2022).



LUDWIG-
MAXIMILIANS-
UNIVERSITÄT
MÜNCHEN

Dekanat Medizinische Fakultät
Promotionsbüro



Eidesstattliche Versicherung

Ständer, Luka Michele

Name, Vorname

Ich erkläre hiermit an Eides statt, dass ich die vorliegende Dissertation mit dem Thema

Kultivierung der humanen Milbe Demodex spp. und Untersuchung seborrhoe-modifizierender Substanzen

selbständig verfasst, mich außer der angegebenen keiner weiteren Hilfsmittel bedient und alle Erkenntnisse, die aus dem Schrifttum ganz oder annähernd übernommen sind, als solche kenntlich gemacht und nach ihrer Herkunft unter Bezeichnung der Fundstelle einzeln nachgewiesen habe.

Ich erkläre des Weiteren, dass die hier vorgelegte Dissertation nicht in gleicher oder in ähnlicher Form bei einer anderen Stelle zur Erlangung eines akademischen Grades eingereicht wurde.

München, 08.10.2024

Ort, Datum

Luka Ständer

Unterschrift Luka Michele Ständer