

Eine vierarmige, doppelblinde, randomisierte, placebo-kontrollierte Studie bezüglich der Wirksamkeit einer Zink-*Octopirox* Shampoo Formulierung vs. einer *Oxiconazol*- bzw. einer Zink-*Pyrithion*-haltigen Formulierung bei *Pityriasis simplex capilliti* (Kopfschuppen).

Inaugural-Dissertation  
zur Erlangung des Grades eines Doktors der Medizin  
des Fachbereiches Medizin  
der Justus-Liebig-Universität Giessen

vorgelegt von Marcus Blömer  
aus Pretoria/Süd-Afrika  
Giessen 2005

Aus dem Medizinischen Zentrum für Dermatologie und Andrologie  
des Universitätsklinikums Giessen

Kommissarischer Leiter: Prof. Dr. med. P. Mayser

Betreuer: Prof. Dr. med. P. Mayser

Gutachter: Prof. Dr. med. P. Mayser

Gutachter: Frau Prof. Dr. med. vet. R. Füssle

Tag der Disputation: 2.11.2005

<b>1 Einleitung</b>	<b>Seite: 5</b>
1.1 Themenübersicht	5
1.2 Historischer Überblick über die Gattung <i>Malassezia</i> („ <i>Pityrosporum</i> “)	7
1.3 Wissenstand über die Spezies <i>Malassezia</i>	9
<hr/>	
<b>2 Klinik und Pathogenese</b>	<b>Seite: 12</b>
2.1 Klinik	12
2.2 Pathogenese	14
2.3 Prädispositionsalter / Geographische Unterschiede	16
2.4 Endokrine Einflüsse	17
2.5 Interaktion mit dem Immunsystem	18
2.6 Diagnostik	22
2.7 Therapieansätze	25
2.8 Problemstellung	30
<hr/>	
<b>3 Material und Methoden</b>	<b>Seite: 31</b>
3.1 Kulturgewinnung und Anzucht	31
3.1.1 Zusammensetzung der verwendeten Nährmedien	31
3.2 Inokulationsverfahren	33
3.3 Differenzierungsgrundlage	36
3.4 <i>Tween</i> assimilation, Pigmentbildung und Cremophor-Assimilation	39
<hr/>	
<b>4 Studiendesign</b>	<b>Seite: 40</b>
4.1 Studienplan	40
4.2 Anzahl der Probanden	41
4.3 Ein- und Ausschlußkriterien	41
4.4 Randomisierung	41
4.5 Studienarme	42
4.6 Studienablauf	43
4.7 Beurteilung von Schuppengröße und Schuppenmenge ( <i>Score</i> )	44
4.8 Ethische Voraussetzungen	46
4.9 Versicherung (AMG)	46
4.10 Statistik	46
<hr/>	
<b>5 Ergebnisse</b>	<b>Seite: 47</b>
5.1 Allgemeines	47
5.2 Patientenkollektiv	48
5.3 Versuchsergebnisse	48
5.4 Haarlänge und Medikationsverbrauch	49
5.5 Scoreverteilung	50
5.6 Differenzierung der <i>Malassezia</i> -Spezies ( <i>Score</i> und Kulturergebnis)	56
5.7 Pigmentbildung	63
5.8 Cremophorassimilation	65
5.9 Effizienz der Testpräparate	66
5.10 Schweregradausprägung	66
5.11 Schuppenmenge	68
5.12 Schuppengröße	70
5.13 Itchingscore	72
5.14 Effizienz und Schweregradausprägung	73
5.15 Kulturergebnisse	74
5.16 Verträglichkeit der Testpräparate	76
5.17 Gesamtscore (Dandruff Assessment)	78
<hr/>	

<b>6 Diskussion und Schlussfolgerung</b>	<b>Seite: 81</b>
<hr/>	
<b>7 Literaturverzeichnis</b>	<b>Seite: 88</b>
<hr/>	
<b>8 Anhang</b>	<b>Seite: 97</b>
8.1 Anleitung zur Applikation der Prüfmedikation	97
8.2 Probandenaufklärung	98
8.3 Einverständniserklärung	99
8.4 Probandentagebuch	100
8.5 Randomisierungsliste	101
8.6 Abbildungs-, Tabellen- und Abkürzungsverzeichnis	102
<hr/>	
<b>9 Zusammenfassung / Summary</b>	<b>Seite: 107</b>
<hr/>	
<b>10 Danksagung</b>	<b>Seite: 111</b>
<hr/>	
<b>11 Lebenslauf</b>	<b>Seite: 112</b>
<hr/>	

# 1. Einleitung

## 1.1 Themenübersicht

Die Hefen der Gattung *Malassezia* sind die einzigen Hefen, die zur residenten Hautflora des (erwachsenen) Menschen gehören. Zum Teil werden die Hefen noch immer unter dem früheren Namen *Pityrosporum* in der Literatur geführt. Mittels molekularer Methoden konnte die Gattung *Malassezia* jedoch überarbeitet werden (Guého et al., 1996, Gemmer et al., 2002). Die Daten zeigen, dass die früher als *Pityrosporum* bekannten Arten mit denen der Gattung *Malassezia* identisch sind. Aus historischen Gründen gebührt der Bezeichnung *Malassezia* der Vorzug. Da ihr Wachstum abhängig von einer externen Lipidquelle ist, können sie vor allem in den seborrhoischen, talgdrüsenreichen Arealen nachgewiesen werden. Insbesondere an Kopf, Stirn, Nase, und am oberen Körperstamm, weniger an den Extremitäten. Zusätzlich zu ihrer Bedeutung als Saprophyt wird den *Malassezia*-Hefen auch eine bedeutsame Rolle bei der Pathogenese verschiedener Hauterkrankungen zugeschrieben. Dazu zählen neben der *Pityriasis Versicolor*, der *Malassezia Follikulitis* und der seborrhoischen Dermatitis auch die *Pityriasis simplex capillitii*- die Kopfschuppenerkrankung (Hay et al., 1992, Shuster, 1984).

Es ist noch unbekannt, wie die *Malassezia*-Hefen diese Hautveränderungen hervorrufen (Hay, 1997). Bedeutsame Pathogenitätsfaktoren können Stoffwechselleistungen einzelner *Malassezia*-Spezies sein. Die Beziehung zwischen *Malassezia* und Kopfschuppen wurde ex iuvantibus durch eine Reihe von Behandlungsstudien hergestellt, die zeigen konnten, dass Antimykotika eine klinische Besserung hervorrufen konnten, während die Rekolonisation mit diesen Hefen zu erneuten Krankheitserscheinungen führte (Aron-Brunetière et al., 1977, Barber, 1977, Carr et al., 1986, Hay et al., 1997, Shuster, 1984). Im Gegensatz dazu konnten einige Studien eine konstante und signifikante Erhöhung der Hefezahl bei Erkrankten im Vergleich zu Gesunden nicht aufzeigen (Barber, 1977, Heng et al., 1990, Vanderwyk et al., 1964, Yarrow et al., 1984, Bergbrant et al., 1989, Clift et al., 1988, Van Abbe, 1964, Gemmer et al., 2002).

Als bedeutsam sind daher eher qualitative als quantitative Veränderungen der residenten Kopfhautflora (*Malassezia* Spp., aerobe Kokken, *Corynebakterien*) anzusehen (McGinley et al. 1975).

Ziel der vorliegenden klinischen Studie war die Weiterentwicklung des auf Basis der Polyoxysorbitanfettsäureester („*Tween*“-)-Assimilation basierenden Differenzierungssystems zur einfachen klinischen Quantifizierung und Differenzierung auf das Spezies-Niveau von *Malassezia*-Hefen.

Erweitert um die Cremophorassimilation und Pigmentbildung werden mittels einer modifizierten Bürstenmethode Kulturisolate aus den Kopfschuppen von Probanden gewonnen. Durch den Einsatz und Vergleich dreier antimykotisch wirksamer Shampoos gegenüber einem Placebo soll es bei der Spezifizierung von Hefen der Gattung *Malassezia* aus den Isolaten möglich werden, interindividuelle quantitative und qualitative Besonderheiten und Unterschiede festzustellen.

Diese Ergebnisse sollen bezüglich der Pathogenese und Therapie der Kopfschuppenerkrankung neue Erkenntnisse liefern.

## 1.2 Historischer Überblick über die Gattung *Malassezia* („*Pityrosporum*“)

Die Hefen der Gattung *Malassezia* sind in erster Linie als Erreger der Pityriasis versicolor bekannt. Die Bezeichnung „Pityriasis versicolor“, geprägt durch die charakteristische klinische Ausprägung des Krankheitsbildes, wurde bereits **1801** von Willian vorgestellt. **1829** folgte erstmalig eine deutsche Publikation zum Krankheitsbild der Pityriasis versicolor von Batemann. **1846** gelang es Eichstedt mit Hilfe der damaligen neuen Technik der Mikroskopie Pilzfäden im Schuppenmaterial einer Pityriasis versicolor zu entdecken. Als Erstbeschreiber gilt jedoch Robin (**1853**), der den Erreger der Pityriasis versicolor „*Micorsporum furfur*“ nannte. **1892** ordnete Baillon „*Micorsporum furfur*“ unter der Bezeichnung „*Malassezia furfur*“ in die neu geschaffene Gattung „*Malassezia*“ ein, nachdem Malassez **1874** überwiegende Formen ovaler Zellen in Kopfschuppen fand und diese als Sporen bezeichnete. Sabouraud (**1904**) nannte diese Sporen von Malassez „*Pityrosporum*“ („Spore der Schuppe“), da er einen Zusammenhang zwischen Kopfschuppen und einer Hefepilz-Infektion vermutete und *Pityrosporum* als eine der Ursachen der Kopfschuppenerkrankung ansah.

Castellani (**1905** und **1908**) ordnete ebenfalls in Kopfschuppen gefundene Sprosszellen der Gattung *Pityrosporum* zu. Aufgrund des mikromorphologischen Erscheinungsbildes des Erregers und als Anlehnung an Bizzozeros Arbeit über „Microphyten der normalen Oberhaut“ (**1884**) und seiner Beschreibung von *Saccharomyces ovalis* führte Castellani (Castellani und Chambers, **1913**) mit dem Namen „*Pityrosporum ovale*“ jedoch noch eine weitere Bezeichnung ein. **1927** vermuteten Panja und Acton mit ihren Ergebnissen über die erste Kultivierung von *Pityrosporum ovale* aber die Identität von *Pityrosporum* und *Malassezia* und wollten dieses mit der Namensgebung „*Malassezia ovalis*“ unterstreichen. Diese Auffassung konnte sich jedoch zur damaligen Zeit nicht durchsetzen.

**1939** wurden von Benham erstmalig Studien über die Wachstumsoptima von *Pityrosporum ovale* veröffentlicht. Eine Sonderstellung hat hierbei *Pityrosporum (P.) pachydermatis*, **1925** von Weidmann aus den Hautschuppen eines Tieres isoliert, da *P. pachydermatis* nicht obligat-lipiddependent ist. Mit *Pityrosporum (P.) orbiculare* fügte Gordon **1951** eine weitere Spezies hinzu, nachdem es ihm gelang, „runde“ Sporen eines Hefe-ähnlichen Pilzes, sowohl aus den Hautschuppen Pityriasis versicolor erkrankter Haut, als auch aus den Hautschuppen normaler Haut zu kultivieren.

*Pityrosporum ovale* und *Pityrosporum orbiculare* wurden zunächst aufgrund mikromorphologischer Daten differenziert (Yarrow et al., 1984) und konnten häufig zusammen, sowohl auf erkrankter, als auch auf gesunder Haut, beobachtet werden. Eine Differenzierung war oft nicht möglich (Gordon, 1951), da auch Übergänge zwischen „runden“ und „ovalen“ *Pityrosporum* Spezies in Abhängigkeit von den verwendeten Inkubationsmedien und der Inkubationszeit zu beobachten waren (Midgley, 1989, Salkin et al., 1977). 1977 konnte elektronenmikroskopisch und mikromorphologisch (Dorn et al., Nazarro Porro et al., 1977) nachgewiesen werden, dass isolierte Kulturen von *P. orbiculare* und *P. ovale* identisch mit denen von *Malassezia furfur* bei Pityriasis versicolor waren. 1986 erkannte die Internationale Kommission zur Taxonomie der Pilze aufgrund der historischen Priorität die Bezeichnung *Malassezia* an und reduzierte die Gattung auf zwei Arten: *Malassezia furfur* [(Robin, 1853) Baillon, 1889] und *M. pachydermatis* [(Weidmann) Dodge, 1935]. 1989 wurde durch Genom-Analysen (Guého et al., 1989) die Identität von *P. ovale* und *P. orbiculare* mit *M. furfur* nochmals bestätigt und durch weitere Untersuchungen konnte 1990 als weitere Gattung *Malassezia sympodialis* (Simmons, 1990) abgegrenzt werden. Weitere Genom-Analysen zeigten 1995 und 1996 (Guillot, 1995, Guého, 1996) eine Differenzierung der Gattung *Malassezia* in weitere Spezies. Hierbei handelt es sich um *M. globosa*, *M. obtusa*, *M. restricta* und *M. slooffiae*. Diese nun 7 Spezies umfassende Reklassifikation muss durch Ergebnisse der jüngsten Vergangenheit (2003, 2004) jedoch noch erweitert werden. Es handelt sich hierbei um die *Malassezia* Gattungen, *M. japonica*, *M. yamatoensis*, *M. nana* und *M. dermatis* (Sugita et al. 2003 u. 2004, Velegraki et al., 2004, Hirai et al., 2003). Die Rolle der neueren Gattungen bezüglich der *Pityriasis simplex capillitii* ist noch ungeklärt und diese wurden auch nicht mit in diese Studie einbezogen, da das Differenzierungssystem von Guého (et al., 1996) und Guillot (1996) diese neuen *Malassezia* Gattungen nicht erfasste.

Dieser kurze historische Überblick verdeutlicht die Schwierigkeiten bezüglich der Interpretation älterer Studien, die für die taxonomische Unterteilung als Hauptmethode morphologische Beschreibungen benutzten. Weitere Differenzierungen sind durch objektivere Methoden, wie die in jüngerer Zeit durchgeführten Genom-Analysen, serologischen- und Stoffwechseluntersuchungen zu erwarten.

Nachfolgend werden einige Erkenntnisse zur Differenzierung einzelner *Malassezia* Spezies dargestellt. Diese Kenntnisse, in Anlehnung an die Ergebnisse von Guillot (1995) und Guého (1996), dienten als Grundlage der hier erstmals durchgeführten Spezifizierung bis auf das Spezies-Niveau bei der Kopfschuppenerkrankung (*Pityriasis simplex capillitii*).

### 1.3 Wissenstand über die Spezies „*Malassezia*“

Hefen der Gattung *Malassezia* gelten als die einzigen Hefen, die zur residenten Hautflora des Menschen gehören. Die lipiddependenten *Malassezia*-Hefen können insbesondere in den talgdrüsenreichen Arealen der Haut nachgewiesen werden (Marples, 1965). Mit Ausnahme der Gattung *Malassezia pachydermatis* sind die lipophilen Hefen auf die Versorgung mit längerkettigen Fettsäuren als Nährsubstrate angewiesen. Auf den Extremitäten ist die Besiedlungsdichte daher vergleichsweise geringer, da hier weniger Lipide als Nährsubstrate bereitstehen als auf Körperstamm, Kopfhaut, Stirn und Nase (McGinley, 1975, Roberts, 1969). Jedoch kann die Besiedlungsdichte sehr variabel (Roberts, 1969) sein. Eine valide Taxonomie scheiterte oftmals an der fehlenden Reproduzierbarkeit von publizierten Ergebnissen, bei denen die Autoren *P. ovale* und *P. orbiculare* hinsichtlich ihrer mikro- und makromorphologischen Auffälligkeiten unterteilten. Übergänge zwischen beiden Formen wurden beobachtet (Gordon, Roberts, 1969, Sloof, 1970, Salkin, Gordon, 1977), während andere Autoren (Roberts, 1969, Midgley, 1989, Cunningham, 1990) auch stabile Varianten beschrieben. Fortschritte konnten durch molekularbiologische Untersuchungen mittels rDNA-Sequenzanalysen („internal transcribed spacer<sub>1</sub>“, ITS<sub>1</sub>), Karyotypisierung (RAPD), 28S RNA und Guanin/Cytosin-Verhältnis (Guého et al., 1996, Gemmer et al., 2002) erzielt werden: neben den bekannten Spezies *Malassezia furfur*, *M. pachydermatis* und *M. sympodialis* wurden die Spezies *M. globosa*, *M. obtusa*, *M. restricta* und *M. slooffiae* abgegrenzt. Erweitert werden muss diese Spezifizierung durch die Gattungen *M. japonica*, *M. yamatoensis*, *M. nana* und *M. dermatis* (Sugita et al., 2003 u. 2004, Velegraki et al., 2004, Hirai et al., 2003). Diese Spezies waren aber zum Zeitpunkt der Studie noch nicht differenziert und konnten deshalb nicht in diese Arbeit einbezogen werden. Die Tabelle 1 zeigt einen Überblick über die in dieser Studie untersuchten *Malassezia* Gattungen (mit Erstbeschreiber).

Tab. 1: Überblick über *Malassezia* Spp. (nach Guého 1996)

1. <i>Malassezia furfur</i>	(Robin) Baillon	1889
2. <i>Malassezia pachydermatis</i>	(Weidmann) Dodge	1935
3. <i>Malassezia sympodialis</i>	(Simmons und Guého)	1990
4. <i>Malassezia globosa</i>	(Midgley, Guého, Gulliot)	1996
5. <i>Malassezia obtusa</i>	(Midgley, Gulliot, Guého)	1996
6. <i>Malassezia restricta</i>	(Guého, Gulliot und Midgley)	1996
7. <i>Malassezia slooffiae</i>	(Guillot, Midgley, Guého)	1996

## **Makromorphologische Charakteristika**

Die für die Differenzierung notwendigen makromorphologischen Charakteristika, werden im Folgenden kurz vorgestellt. Diese Charakteristika können erste makroskopische Hinweise auf die Differenzierung geben, die mittels *Tween*- und *Cremophor*assimilation überprüft werden.

### ***Malassezia furfur* [(Robin) Baillon 1889]**

Als Charakteristikum findet sich eine instabile Morphologie, die neben runden Zellen (~2,5-4,0 µm Durchmesser) auch lang-ovale/zylindrische Zellen (~1,5 x 2,5-8 µm) zeigen können. Nach 7-tägiger Inkubation auf *mDixon* Agar bei 32°C zeigen sich Kulturen mit einem ungefähren Durchmesser von 5 mm, die stumpf-glänzend, creme-farben imponieren.

### ***Malassezia pachydermatis* [(Weidmann) Dodge 1935]**

Aufgrund der nicht obligaten Lipiddependenz nimmt *M. pachydermatis* eine Sonderstellung ein. Auf Glucose/Pepton-Agar zeichnet sich das Wachstum durch stumpf-glänzende und glatte Kulturen von ~5 mm Durchmesser aus, bei einer Größe von rund 2,5-3,5 x 4,0-5,0 µm können sich ovoide Zellen zeigen.

### ***Malassezia sympodialis* (Simmons und Guého) 1990**

*Malassezia sympodialis* entspricht *Pityrosporum ovale Form 3* (Midgley, 1989), *Malassezia furfur Serovar A* (Cunningham et al., 1990) und *Malassezia ovalis Form 3* (Midgley, 1993). Auf *mDixon* Agar lassen sich nach 7-tägigem Wachstum bei 32°C glänzende, glatte Kulturen mit einem Durchmesser von etwa 5 mm finden. Die Sprosszellen können oval bis rund sein mit einer Größe von 1,5-2,5 x 2,5-6 µm. Sympodiale Sprosszellen sind für die Namensgebung verantwortlich.

### ***Malassezia globosa* (Midgley, Guého, Gulliot) 1996**

*Malassezia globosa* ist identisch mit *M. furfur Serovar B* (Cunningham et al., 1996) und *M. furfur* sensu Midgley (Midgley, 1993). Auf *mDixon* Agar werden nach 7 Tagen Wachstum kleine (~4mm) zerklüftete Kulturen beobachtet. Eine stabile Mikromorphologie (2,5-8 µm Durchmesser) liegt vor.

### ***Malassezia obtusa* (Midgley, Guillot, Guého) 1996**

*Pityrosporum ovale* Form 2 (Midgley, 1989) und *Malassezia ovalis* Form 2 (Midgley 1993) sind identisch mit *M. obtusa*. Die Kulturen zeigen nach 7 Tagen Wachstum auf *mDixon* Agar glatte, abgerundete Spitzen („Namensgebung“) von etwa 4 mm Durchmesser. *M. obtusa* gilt als schwer anzüchtbar und kultivierbar.

### ***Malassezia restricta* (Guého, Guillot und Midgley) 1996**

*Malassezia restricta* entspricht *M. furfur* Serovar C (Cunningham et al., 1990). Die Namensgebung erfolgte aufgrund des nur eingeschränkten Wachstums. Auf *mDixon* Agar finden sich nach 7 Tagen und 32 °C matt-glänzende spröde Zellen von ungefähr 3 mm Durchmesser.

### ***Malassezia slooffiae* ( Guillot, Midgley, Guého ) 1996**

*Malassezia slooffiae* ist identisch mit *P. ovale* Form 1 (Midgley 1989) und *Malassezia ovalis* Form 1 (Midgley 1993). Das Wachstum bei 32 °C nach 7 Tagen zeichnet sich durch matt-glänzende Kolonien, mit rauer Oberfläche und einem Durchmesser von ungefähr 3 mm aus. Die Zellen sehen kurz zylindrisch mit einer Größe von 1-2 x 1,5-4 µm aus.

Die Morphologie kann demnach bei 7-tägiger Inkubation auf *mDixon* Agar (Guillot, 1997) hinweisend sein (Tab. 2):

Tab. 2: Charakteristika der einzelnen *Malassezia* Spezies (Guillot, 1997).

Morphologie	<b>hinweisend auf:</b>
lange, zylindrische, ovoide oder runde Zellen	<i>M. furfur</i>
schmale, ovoide Zellen mit einer sehr breiten Basis	<i>M. pachydermatis</i>
sphärische Zellen	<i>M. globosa</i>
sympodiale Sprossung	<i>M. sympodialis</i>
lange zylindrische Zellen	<i>M. obtusa</i>
kleine sphärische oder ovoide Zellen mit relativer schmaler Basis	<i>M. restricta</i>
kurze zylindrische Zellen	<i>M. slooffiae</i>

## 2. Klinik und Pathogenese

### 2.1 Klinik

Von der Kopfschuppenerkrankung (*Pityriasis simplex capillitii* oder *Dandruff* im englischen Sprachgebrauch) sind etwa zehn Prozent der globalen Bevölkerung (Breuer 2003) permanent betroffen und ca. 50 % mindestens einmal im Leben davon affiziert (Harding 2002). Die Erkrankung wird häufig als kosmetisch lästig empfunden, ein rein medizinisches Interesse ist aber gering (Hay et al., 1997). Die Anzahl der Patienten, die sich ärztlich behandeln lassen, ist nur ein geringer Prozentsatz derjenigen, die erkrankt sind (Kligman et al., 1976). Meist wird die Kopfschuppenerkrankung nur als ein „triviales“ Problem angesehen, bis es zum Auftreten schwerwiegender Dermatosen kommt. Die Erkrankung manifestiert sich vor allem in einer übermäßigen Abschuppung der Kopfhaut, die in ihrer Ausprägung in sehr variablen Zuständen gefunden werden kann. Die Symptome können variieren von einer kaum erkennbaren, milden Abschuppung ohne sonstige Symptome bis hin zu einer starken Abschuppung, die mit Juckreiz und erythematösen Hautläsionen einhergehen kann. Konsens ist, dass die Kopfschuppenerkrankung meist chronisch verläuft, zu Rückfällen neigt, nicht tödlich, aber bisher auch medikamentös nicht dauerhaft heilbar ist. Selten kommt es zu spontanen Remissionen (Van Abbe, 1964). Die Abschuppung der Kopfhaut mit oder ohne Irritation hat ein großes öffentliches Interesse gefunden. Eine große Anzahl an Personen verwendet daher schon gewohnheitsmäßig Anti-Schuppenshampoos (Kligman et al., 1976, Leyden et al., 1976, McGinley et al., 1975).

Bezüglich Definitionsversuchen der „Kopfschuppenerkrankung“ kann man eine Übereinkunft in der Zugehörigkeit zum „*Seborrhoischen Formenkreis*“ finden, zu dem neben den verschiedensten Ausprägung der Akne, die Rosazea, die periorale (Rosazea-artige) Dermatitis und das Seborrhoische Ekzem zählen. Die Abschuppung selbst gehört zu den Sekundäreffloreszenzen, die Schuppe (*Squama*) kann durch eine Hyper-, oder Parakeratose und nach Blasenbildung entstehen.

Die Tabelle 3 soll hierzu einen historischen Überblick über verschiedene Definitionsversuche der „Kopfschuppenerkrankung“ liefern.

Tab. 3: Historischer Überblick über Definitionen der „Kopfschuppenerkrankung“

Sabouraud	1904	Pityriasis simplex (seborrhoea sicca) vs. Pityriasis steatoides vs. Seborrhoea oleosa
Templeton	1929	<i>Pityriasis simplex capillitii</i> -trockene Variante der Seborrhoe ( Steatorrhoe→ True seborrhoe→ Pity. Cap. simp.)
Van Abbe	1964	Excessive desquamation / seborrheic disorder
Spoor	1966	Normaler, unmerklicher Abwurf der äußeren Epidermis Missverhältnis zwischen Produktion und Destruktion
Priestley	1976	Non-inflammatory increased scaling
Shah	1976	Desquamation of visible scales from a parakeratotic stratum corneum
Kligman	1976	Excessive clinically non-inflammatory scaling of the scalp
Leyden	1979	Excessive scaling [...] without clinical signs of inflammation
Hay	1996	Mild non-inflammatory type of seborrheic dermatitis
Bulmer	1999/2000	seborrheic dermatitis=dandruff
Nolting	1999	Mildeste Ausprägung der seborrhoischen Dermatitis
Piérard-Franchimont	2000	[...] abnormality of the desquamative process [...] strictly confined to the scalp
Lodén	2000	[...] chronic scalp condition characterized by scaling [...] itching [...] redness
Piérard-Franchimont	2001	[...] increased scaling [...] expression of the same disorder (seborrheic dermatitis)
Perkins	2002	[...] Papulosquamous Dermatitis [...] nonerythematous [...] subclinical inflammation [...]

In Anlehnung an diese Autoren kann demnach die *Pityriasis simplex capillitii* definiert werden als ein variabler Zustand der Kopfhaut, der gekennzeichnet ist durch eine chronisch vermehrte, nicht erythematöse, meist trockene Abschuppung des Stratum corneum, die mit Juckreiz einhergehen kann. Zu Konglomeraten gehäuft wird der unmerkliche Abwurf dann auf der Kopfhaut sichtbar. Diskrepanz besteht aber weiterhin in der Frage, ob die Kopfschuppenerkrankung als eigenständige Erkrankung angesehen werden soll (Kligman, 1976, Rulison et al., 1924) oder nur als mildere Ausprägung der seborrhoischen Dermatitis (Acton, 1917, Goldsmith, 1963, Shuster, 1984).

## 2.2 Pathogenese

Normalerweise brauchen neue Hautzellen 28 Tage, um als Hornzellen abgeschilfert zu werden. Bei der Schuppenbildung ist dieser Vorgang deutlich beschleunigt (Hyperkeratose). Die sonst winzigen Einzelzellen werden als Zellhaufen abgestoßen. Die sichtbare Abschuppung ist eine Ansammlung (Konglomerat) von Korneozyten, die sich von der Oberfläche des veränderten Stratum corneum (Pièrard-Franchimont et al., 2000, Gemmer et al., 2001, Hardin et al., 2002, Warner et al., 2001) ablösen. Mittels Elektronenmikroskopie konnte der veränderte Aufbau des Stratum corneum über die „scalp tape stripes“ (SebuTape®) Methode aufgezeigt werden (Gemmer et al., 2001, Perkins 2002). Diese Veränderung der Ultrastruktur geht oftmals mit einer Parakeratose (Van Abbe, 1964, Pièrard-Franchimont et al., 2000) einher. Diese Unterbrechung zwischen den Korneozyten kann episodisch, rekurrend oder konstant sein und damit auch für verschiedene Ausprägungen des oft mit Kopfschuppen einhergehenden Juckreizes verantwortlich sein. Andere Autoren zeigten eine vermehrte Nachweisbarkeit von interzellulären Lipiden im Stratum corneum (Warner et al., 2002), deren Bedeutung jedoch noch unklar ist. Die *Pityriasis simplex capillitii*, als strenge Begrenzung auf die Kopfhaut, kommt nicht im Tierreich vor, obwohl die tierische Haut gleichen Regenerationsmechanismen unterliegt (Spoor, 1966). Die Frage, ob Kopfschuppenpatienten eine größere Anzahl an Hornzellen produzieren, oder, ob die Zellen nur aufgrund von Konglomeratbildung besser sichtbar sind, ist nicht geklärt. Die Art der individuellen Ausprägung soll von der Anzahl der affektierten, involvierten Haarpapillen abhängen.

Uneinigkeit besteht in der Literatur über die „normale“-mikrobielle Zusammensetzung der Kopfhaut. In der Literatur finden sich sehr uneinheitliche Zahlen bezüglich der Quantität von *Malassezia*-Hefen bei Kopfschuppenpatienten: Templeton stellte schon 1929 fest, dass *Malassezia*-Hefen zu 69 % bei „gesunden“ Probanden gefunden werden konnten. Spätere Studien (Van Abbe et al., 1968, Roia et al., 1968, Roberts et al., 1971) zeigten, dass *Pityrosporum* / *Malassezia*- Hefen als residente Bewohner der gesamten Hautflora des Menschen zu 96.4 % bzw. 82.1 % bei Kopfschuppenpatienten im Vergleich zu 75 % bei der gesunden Kontrollgruppe gefunden werden konnten. Noble konnte diese Ergebnisse 1987 unterstützen: bei gesunden Kindern wies er einen Anteil von *P. ovale* / *P. orbiculare* zu 74 % nach. Goldsmith et al. (1963) und Vanderwyk et al. (1964) fanden einen Anteil von *Pityrosporum*-Hefen von 80 % bei der Kontrollgruppe, McGinley et al. konnten 1975 eine Inzidenz an *Malassezia* von 100 % bei Kopfschuppenpatienten im Vergleich zu 98 % bei Hautgesunden nachweisen.

Entscheidend waren jedoch die Differenzen hinsichtlich des Anteils von *Pityrosporum/Malassezia* an der Kopfhautflora. Bei Hautgesunden betrug er 46 % gegenüber 74 % bei Kopfschuppen und 82 % bei Patienten mit seborrhoischem Ekzem. Widersprüchliche Angaben gibt es bezüglich der qualitativen Zusammensetzung der Kopfhaut bei Kontrollgruppen und bei Patienten mit *Pityriasis simplex capilliti*. *Malassezia* Hefen können immer nachgewiesen werden, ebenso wie Staphylokokken (*S. aureus*, *S. epidermidis*), Streptokokken ( $\alpha$  und  $\beta$ -haemolysierende S.), Propionibakterien (*P. acnes*) (MacKnee, 1938, Roberts, 1969, Vanderwyk et al., 1964, Broberg, 1989, Clift, 1988, Sommerville, 1969, Leyden, 1979, Leeming, 1989). Des Weiteren sind noch *Candida* (u.a. *C. albicans*)-Hefen, *Proteus* (*P. mirabilis*), Neisserien, Pseudomonaden, Corynebakterien und Dermatophyten nachgewiesen worden (Sommerville, 1969).

Die Spezifizierung von *Malassezia*-Hefen war aber bisher bei Klärung der Pathogenese kaum von Belang.

Den Zusammenhang zwischen einer Hypersekretion von Talg und dem Wachstum von Mikroorganismen sah Malassez schon 1874. Einige Autoren (Faergemann et al., 1981 & 1983) fanden, dass die betroffene Haut eine vermehrte Talgproduktion aufweist, während andere Autoren keinen quantitativen oder qualitativen Zusammenhang bezüglich der Talgproduktion finden konnten. Da das Wachstum von *Malassezia* Spp., mit Ausnahme von *M. pachydermatis*, auf die Zufuhr exogener Lipidquellen angewiesen ist (Arrese et al., 1994, Benham, 1939, Caprilli et al., 1973, Meinhof et al., 1967, Shifrine et al., 1963, Weary, 1968, Wilde et al., 1986), bietet so die Anwesenheit von Talg bzw. dessen Hypersekretion optimale Nährbedingungen. Medikamentöse Talgreduktion z.B. mittels der topischen Applikation von Isotretinoin wurde deshalb Ziel einiger Studien und es zeigte sich, dass die medikamentös induzierte Talgreduktion den Krankheitsverlauf positiv beeinflussen kann (Cowley et al., 1990). Andere Autoren (Kligman 1976) sind aber auch der Meinung, dass die Schwere der Kopfschuppenerkrankung völlig unabhängig von der Intensität der Sebumproduktion betrachtet werden muss.

## 2.3 Prädispositionsalter / Geographische Unterschiede

Das Auftreten der Kopfschuppenerkrankung beginnt allmählich, eine Erkrankung im Kindesalter ist eine Rarität (Leyden, 1979, Kligman et al., 1976, Faergemann et al., 1983, Whitlock, 1953, Pièrard-Franchimont et al., 2000) und wird eher als ein Anzeichen für die Affektion im Sinne einer atopischen Dermatitis angesehen, die allerdings nie vor dem dritten Lebensmonat beginnt. Im Säuglingsalter kann die Abgrenzung zur seborrhoischen Dermatitis differentialdiagnostisch schwierig sein. Schuppen, die fettglänzend, gelblich imponieren, sowie Bevorzugung der intertriginösen Räume, der nicht vorhandene Juckreiz und die meist problemlose Therapie bzw. Spontanheilung können Argumente für die seborrhoische Dermatitis sein. Eine positive Anamnese bezüglich Allergien in Kindheit oder Familie kann zur endgültigen Unterscheidung und Abgrenzung zur seborrhoischen Dermatitis hilfreich sein (Leyden, 1979). Einigkeit besteht darüber, dass das individuelle Alter die Kopfhautflora beeinflusst (Sommerville, 1969). Die Anzahl an *Malassezia* Hefen zeigt einen dramatischen Anstieg zu Beginn der Pubertät (Noble et al., 1978, Kligman et al., 1976, Leyden, 1979, McGinley et al., 1975, Whitlock, 1953), während andererseits *Malassezia* Spezies bei Personen über 75 Jahre reduziert und Kopfschuppen bei Personen über 85 Jahre praktisch verschwunden sind (Leyden, 1976 & 1979, Gosse et al., 1969). Jedoch sollen auch im höheren Alter Veränderungen der Haarpapillen die Reduktion der Talgproduktion und das Verschwinden der Kopfschuppen erklären (Kligman et al., 1976). Außerdem wird vermutet, dass das Vorkommen der Akne und Pityriasis aufgrund von Analogien in der Verwertung des Substratangebots korreliert (Leyden 1976 & 1979). Bisher konnten Studien diese These aber weder widerlegen noch bekräftigen, da auch Corynebakterien zu Beginn der Pubertät ansteigen und so in erhöhter Anzahl von erkrankter Haut isoliert werden können. Daher kann hier eher von einem Epiphänomen mit einer erhöhten Keimdichte von *Malassezia*-Hefen aufgrund des veränderten Substratangebotes ausgegangen werden (Marples et al., 1974).

### Geographische Unterschiede

Das Auftreten von *Pityriasis simplex capillitii* bei verschiedenen Gruppen unterschiedlicher ethnischer Herkunft wird ebenso kontrovers beurteilt; einige Autoren fanden eine erhöhte Anzahl an *M. Spp.* bei Kaukasiern im Vergleich zu Negroiden (Noble et al., 1978), während wiederum andere (Leyden et al., 1976) keinen Unterschied fanden.

## 2.4 Endokrine Einflüsse

Bezüglich endokriner Einflüsse gibt es zwar keinen Konsens, aber die altersabhängige Inzidenz *Malassezia* induzierter Dermatosen weist auf eine Beziehung im speziellen zu Androgenen hin. Untersuchungen an graviden Frauen im letzten Schwangerschaftsdrittel, zu einem Zeitpunkt an dem der Östrogenspiegel im Serum am höchsten ist, ergaben zwar keinen Anhalt für die These, dass zirkulierendes Östrogen eine Abnahme oder Verbesserung einer Infektion durch *Malassezia Spp.* verursacht (Whitlock 1953), jedoch konnte durch den fehlenden stimulierenden Effekt von Androgenen auf die Talgdrüsen eine abnehmende Inzidenz z.B. der seborrhoischen Dermatitis gezeigt werden (Nenoff 2001). Menstruelle Beeinflussung wird ebenfalls diskutiert, war aber bisher bei Studien nicht von Belang (Leyden 1979). Es ist aber allgemein anerkannt, dass der Verlust von Haaren mit Schuppenbefall zusammenhängt (Alexander et al., 1967). Bei Frauen mit androgenetischer Alopezie sollte nach Zyklusunregelmäßigkeiten, Schwangerschaft und Geburten gefragt werden. Die bei Männern typische progressive, erworbene diffuse Alopezie (Alopecia androgenetica), geht neben einer genetischen und individuellen Veranlagung mit einer erhöhten Empfindlichkeit der Kopfhhaarfollikel auf Androgene zurück. Auch die Parakeratose und dem verdickten Stratum corneum ist über ein Nahrungsdefizit für die Haarwurzel ein weiterer Grund für diffusen Haarausfall. Schuppenbefall ist häufig ein Begleiter der Telogenphase des Kopfhhaares und kann so eventuell Haarausfall exazerbieren, aber dieses Phänomen ist noch nicht ausreichend geklärt (Baroni 2000). Des Weiteren muss natürlich auch die Medikamentenanamnese in Betracht gezogen werden.

Whitlock (1953) fand schwerwiegendere Fälle von Kopfschuppen bei Frauen und eine erhöhte Anzahl von *M. Spp.* als bei den männlichen Vergleichspersonen. Andere Autoren (Leyden et al., 1976) fanden allerdings keinen Unterschied zwischen den Geschlechtern. Männer hätten ebenso viele Kopfschuppen wie Frauen. Über eine Kontagiosität oder gar Vererbung ist nichts bekannt.

## 2.5 Interaktion mit dem Immunsystem

Es besteht keine Einigkeit bezüglich der An- oder Abwesenheit von *Malassezia*-Hefen und der Interaktion mit dem Immunsystem bei der Kopfschuppenerkrankung. Meist liegen nur Ergebnisse zur Untersuchung bezüglich Immunaktivität bei der seborrhoischen Dermatitis und Pityriasis versicolor vor. Daher zeigen die bisherigen Ergebnisse ein sehr uneinheitliches Bild. Ashbee et al., (1994, 2002) waren z.B. der Meinung, dass *Malassezia* Hefen als Bewohner der *normalen*, gesunden Mikroflora des Menschen potente Aktivatoren des Immunsystems sind. 1997 konnte das erste „major“ Antigen aufgeschlüsselt werden und im Laufe der letzten Jahre wurde festgestellt, dass die verschiedenen *Malassezia* Spp. während ihres Wachstumszykluses völlig unterschiedliche Antigene präsentieren können. Einige Autoren (Hay, 1997) fanden bei Patienten mit Kopfschuppen eine gesteigerte Immunantwort gegenüber *Malassezia* Hefen, so dass möglicherweise bei diesen Patienten ein Defekt der Immunabwehr in Frage kommen könnte. Doch fanden die Autoren im Vergleich zur gesunden Kontrollgruppe keine signifikanten Unterschiede. Eine Zunahme der klinischen Symptomatik kann jedoch bei exzessiver Aktivität und Stress der betroffenen Person über die Veränderung des Lipidstoffwechsels mit gesteigerter Empfindlichkeit gegenüber *Malassezia* und vermehrter Ausschüttung von veränderten *Malassezia* assoziierten-Entzündungsmediatoren in Zusammenhang gebracht werden. Dieser veränderte Metabolismus ist auch bei HIV/AIDS-Patienten, bei denen die seborrhoische Dermatitis/Ekzem mit einer deutlich erhöhten Prävalenz (30-83 %, Ashbee et al., 2002) auftritt und oft erstes klinisches Erscheinungsbild einer Infektion sein kann, von Belang. Die Reaktivität der von Kopfschuppen affektierten Epidermis soll die Expression von Calprotein mit der fokalen Ausschüttung von TNF- $\alpha$  verursachen (Pièrard-Franchimont et al., 2000). Über zirkulierende Interferone, insbesondere Interferon- $\alpha$  und Tumornekrosefaktoren (TNF- $\alpha$ ) werden Cholesterol und Triglyzeride vermehrt bereitgestellt (Nenoff 2001). Andere Autoren sind der Meinung, dass auch das Neuro-Immunsystem impliziert ist und so pro-inflammatorische Zytokine ausschütten kann (Pièrard-Franchimont et al., 2000). Außerdem ist bei Stress ist das Mittelhirn als Regulationszentrum für die Talgproduktion gestört (Spoor 1966) und kann Bindeglied von *Malassezia* induzierten Dermatosen bei der Parkinson-Erkrankung sein. Harding et al. (2002) und Parry et al. (1989) konnten aufgrund einer erhöhten Anzahl von interzellulären Lipiden eine geschwächte Schrankenfunktion des Stratum corneum durch einen *Malassezia* induzierten Mediator („lipid-like leukocyte activator“ Parry et al. 1989) nachweisen. Die dermalen Papillen sind verändert und die Kapillaren dilatiert, so dass die Migration von neutrophilen und mononukleären Zellen in die Dermis möglich ist.

Mit zunehmender Parakeratose, die als Segment die normale epidermale Hornschicht überzieht, bessert sich die Inflammation der Kopfhaut in ihrem klinischen Erscheinungsbild (Leyden, 1976). *Malassezia*-Hefen haben die Fähigkeit, pro-inflammatorische Zytokine zu supprimieren (Guého et al., 1996), was den geringen inflammatorischen Charakter der *Pityriasis simplex capillitii* im Vergleich zum seborrhoischen Ekzem erklären kann (Pièrard-Franchimont et al., 2000). Diese trockene Parakeratose äußert sich dann in der typischen Abschuppung der Kopfhaut. Neuere Untersuchungen (Perkins 2002) konnten jedoch mittels der adhäsiven Tape-Methode spezifische Interleukine bei der seborrhoischen Dermatitis, bei der Kopfschuppenerkrankung und gesunden Kontrollgruppen identifizieren. TNF- $\alpha$  wird hierbei als Marker für eine Affektion mit Kopfschuppen angesehen, da er im Vergleich zwischen der *SD* und gesunden Kontrollgruppen signifikant häufiger auftritt. Sohnle et al. (1978) vermuteten bei Pat. mit *PV* anhand einer geringeren lymphozytären Immunantwort einen zell-induzierten Immundefekt, während Wu und Chen (1985) mit derselben Methode im Vergleich zwischen Patienten mit *PV* und einer Kontrollgruppe zu gegensätzlichen Ergebnissen kamen. Ashbee (1994) konnte bei der *PV* keinerlei defizitäre zelluläre Immunantworten zeigen, jedoch im Vergleich mit Pat. mit *SD* kam sie zu dem Schluss, dass die Hautläsionen bei *SD* anders als bei der *PV* aufgrund ihres mehr inflammatorischen Charakters *Malassezia*-Hefen eher die Möglichkeit zur Aktivierung des Immunsystems geben. Nenoff (2001) fand T-Zell Abnormitäten bei Pat mit *SD* und umgekehrte Korrelationen zwischen dem Spiegel der IgG-Antikörper gegen *Malassezia* und der Schweregradausprägung der seborrhoischen Dermatitis. Epikutanteste zeigten keinerlei Kontaktsensibilisierungen, jedoch konnte eine hohe Anzahl HLA-DR<sub>4</sub>-positiver Lymphozyten bei Pat. mit *SD* nachgewiesen werden. Außerdem ein Überwiegen von Cd4-pos.-Lymphozyten in Hautläsionen, während die Anzahl CD<sub>1a</sub>-positiver epidermaler Zellen, denen auf nicht erkrankter Haut ähnlich ist. Kontrolluntersuchungen bezüglich IgG und C<sub>3b</sub> sind widersprüchlich. Auch die Il-10 Sekretion steigt nach Stimulation mit *Malassezia*-Extrakt an und soll so über eine Reduktion von Il-2 eine gestörte Immunreaktion zur Folge haben (Nenoff 2001). Bergbrant et al. (1989) fanden höhere IgG Antikörper Titer gegen *Malassezia* Spp. bei Patienten mit Kopfschuppen gegenüber der Kontrollgruppe, die Höhe des Titers korrelierte jedoch nicht mit der klinischen Ausprägung (Alexander et al. 1967). Ingham und Cunnigham (1993) konnten im Gegensatz dazu keine spezifischen Antikörper nachweisen. Die humorale Antwort bezüglich *Malassezia* induzierter Dermatosen ist ungeklärt, jedoch können die einzelnen *Malassezia* Spp. Komplement über den klassischen wie alternativen Weg aktivieren. Eine Konversion von C<sub>3</sub> zu C<sub>3b</sub> konnte ebenso wie eine Aktivierung von Faktor B nachgewiesen werden (Ashbee et al., 1994, Belew et al., 1980, Heng

et al., 1990). Die Fähigkeit der Aktivierung von Komplement wird als ein möglicher Auslöser für die *SD*-assoziierte Inflammation diskutiert, während im Gegensatz dazu dieses für die *PV* nicht gezeigt werden konnte (Ashbee et al. 2002).

Momentan muss davon ausgegangen werden, dass die Anwesenheit von *Malassezia*, sowohl auf erkrankter als auch auf gesunder Haut, und der Fähigkeit zur Aktivierung von Antikörpern (IgG und IgM), auch in Abwesenheit von *Malassezia* induzierten Dermatosen eine einfache Konsequenz der Tatsache ist, dass *Malassezia*-Hefen als Bewohner der normalen Mikroflora der Haut betrachtet werden müssen. Für die ätiologische Bedeutung von *Malassezia*-induzierten Erkrankungen werden daher als wichtiger die Eigenschaften und der Immunstatus des Wirtsorganismus angesehen. Während die Interaktionen mit dem humoralen und zellulären Immunantworten auf *Malassezia* recht gut untersucht sind, gibt es nur wenige Studien über die nicht spezifischen Immunreaktionen.

Bezüglich neuerer Klassifikation von *Malassezia*-Hefen und der historisch gewachsenen Unterteilung und Differenzierung zwischen *P. ovale* und *P. orbiculare* ist außerdem nicht mit endgültiger Sicherheit eine Interpretation und Übertragung älterer Studien auf die heutige Taxonomie anwendbar. Einigkeit besteht aber bezüglich der Lipiddependenz. Darüber hinaus produzieren Hefen der *Malassezia* Spp. jedoch auch eine Vielzahl irritierender Stoffwechselprodukte: z. B. Lipaseaktivität, Spaltung freier Fettsäuren (Weary, 1970, Caprilli et al., 1973, Midgley, 1983), Produktion von Toxinen und Lipoxygenase-Aktivität (Hay et al., 1992 & 1997, Parry et al., 1989). Die Ergebnisse von in vitro-kultivierten *M. furfur* zeigten, dass die Zusammensetzung der Fettsäuren abhängig von den Lipidzugaben im Nährmedium ist und dass die Fähigkeit besteht, gesättigte in ungesättigte Fettsäuren umzuwandeln. Des Weiteren zeigen *Malassezia*-Hefen eine relative Resistenz gegenüber einer Phagozytose, da die Zellwände von *Malassezia* einen eher ungewöhnlich hohen Anteil an Lipiden (15-20 %), (Nazarro 1976, Shifrine und Marr 1963, Guého, 1996 et al.) enthalten. Die Autoren Nazarro et al. (1979) waren auch der Meinung, dass *Malassezia* Stämme unter der Anzucht mit verschiedenen Lipidzugaben auch unterschiedliche biochemische Eigenschaften entwickeln können. Nur wenig ist darüber bekannt, welche Klassen von Lipiden verstoffwechselt werden können und, ob es bezüglich der einzelnen Spezies Unterschiede gibt. Meist wurden in Studien freie Fettsäuren, Triacylglyceride oder Polyoxysorbitanfettsäureester (*Tween*) eingesetzt und finden heute noch Anwendung. Weary (1968) schrieb den *Malassezia*-Hefen einen maßgeblichen Anteil an der Bildung freier Fettsäuren auf der Haut zu und Marples et al. (1972) überprüften diese Theorie hinsichtlich der Pathogenese bei der Akne und konnten zeigen, dass *Malassezia*-Hefen zur

Bildung freier Fettsäuren auf der Haut beitragen, wenn die Population von Corynebakterien gering ist.

Diese Ergebnisse basieren jedoch auf In-vitro-Kultivierungen. Der in-vivo Nachweis einer Lipaseaktivität ist bisher nicht gelungen. Die Lipaseaktivität als Bedeutung für die Pathogenese *Malassezia*-assoziierter Krankheitsbilder ist daher umstritten. Spekulativ ist demnach noch die Vermutung, dass unterschiedliche, sowohl quantitative als auch qualitative Zusammensetzungen der verwendeten Nährmedien und der damit verbundenen möglichen „suppressiven“ oder „adjuvanten“ Effekte und Charakteristika der einzelnen *Malassezia*-Hefen, bei korrespondierenden Bedingungen auf menschlicher (Kopf-) Haut ähnliche Effekte haben können.

## 2.6 Diagnostik

Da sich in den letzten Jahren zunehmend die Meinung etabliert hat, dass die Kopfschuppenerkrankung eine durch Hefepilzinfektion verursachte Erkrankung ist, haben verschiedene Autoren unterschiedliche Methoden zur Nachweisbarkeit der Hefen auf menschlicher Kopfhaut entwickelt. Oftmals haben diese Methoden gemein, dass versucht wird, ein „Abklatschpräparat“ der Kopfhaut, mit ihren zu Konglomeraten gehäuften Kopfschuppen, durch adhäsive Methoden auf geeignete Nährmedien zu bringen. Neben der mikroskopischen Identifikation werden zur in-vitro Kultivierung häufig ein lipidhaltiges Medium, entweder ein Basalmedium mit einem Lipid als Zusatz (beispielsweise Olivenöl) oder modifizierte Spezialböden (*Sabourad-4%-Glukose-Nährboden + 2% Olivenöl + 0,2% Tween 80* u.a. und *Dixon-Agar*) benutzt, das Temperaturoptimum liegt etwa zwischen 32 und 37° C, bei einem pH-Wert von 5,5-6,5 (Leeming et al., 1989). Nährböden wird häufig noch Cycloheximid und Chloramphenicol zur Reduktion des Kontaminationsrisikos beigegeben. *Malassezia* Hefen zeigen gegenüber diesen Zugaben Resistenz.

Es zeigte sich aber frühzeitig, dass die Ergebnisse sowohl vom Untersucher als auch von den verwendeten Nährlösungen abhängig sind. Der wichtigste Parameter für die Diagnose ist die Größe und damit Sichtbarkeit der Abschuppung (Pièrard-Franchimont et al., 2000). Kopfschuppen sind bis zu einer Größe von 0,2 mm nicht für das bloße Auge sichtbar (Leyden, 1979) und erst eine Größe von rund 0,2 mm wird als sichtbare Abschuppung bezeichnet (Kligman, 1976). Zur Inokulation haben einige Autoren die non-invasive „*Bürstenmethode*“ benutzt (Van Abbe, 1964, Gosse et al., 1969, Lóden 2000), indem in zuvor festgelegter Weise Kopfhalthalbseitenversuche unternommen wurden und in Gebieten sichtbaren Schuppenbefalles versucht wurde, Kulturen über ein „Abkämmen“ auf Nährmedien zu kultivieren. Auch mittels eines „*Vacuumcleaners*“ (u.a. Vanderwyk 1964 und 1967, Gosse et al. 1969, Roia et al. 1968), einer Art „Handstaubsauger“, der in definierter Weise über die Kopfhaut gestrichen wurde, konnte ein Nachweis der Hefen erfolgen. Daneben wurde zusätzlich noch ein Mindestgewicht an Konglomeraten von Schuppen bestimmt und 40 mg als untere Grenze angesetzt, an bei der es zu sichtbaren Schuppenbefall kommt, wobei sich aber zeigte, dass nicht alle Personen, die ein Abschuppungsgewicht von über 40 mg hatten, auch nachweislich Kopfschuppen hatten. Unklar ist außerdem, ab welcher Menge oder Größe man bei den, durch den „Vakuumcleaner“ gesammelten Kopfschuppen, von milder, mittlerer oder extremer Ausprägung der *Pityriasis simplex capillitii* spricht.

Des weiteren sind die Ergebnisse aufgrund der verwirrenden Taxonomie (*P. ovale* / *P. orbiculare*, *Malassezia* Spp.) nicht immer valide reproduzierbar. Auch über das Filtrieren des

Wassers nach Haarwaschung (Leeming 1989) wurde der Nachweis versucht. Dabei wurde das Sediment von einem Schwamm, der über die Kopfhaut gestrichen wurde, gewonnen. Etabliert haben sich aber eher neben der Bürstenmethode die non-invasive Tape (Patchmethode) sowie die invasive Scrub oder Scinscrapingmethode (Abkratzen von epidermalen Hautanteilen mittels einer sterilen Lanzette, z.B. *Broq-Curretage*, *Stainless steel ring*). Durch die Einführung kommerzieller Testpatches (SebuTape®, z.B. *C und K electronics* Köln, *PMS Delasco* Texas) konnte auch eine Reproduzierbarkeit der Ergebnisse erfolgen (Cowley 1992, Pièrard-Franchimont 2000, Baroni 2000, Warner 2001, Perkins 2002). Daneben wurden in Studien oftmals der *visuelle analoge Score* (VAS) oder „*severity score scales*“ zur subjektiven Einschätzung der Wirksamkeit verwendeter Präparate benutzt.

Die Nachweisbarkeit spezifischer Zytokine durch Anwendung der Tape-Methode soll auch eine Unterscheidung zwischen der Kopfschuppenerkrankung und der seborrhoischen Dermatitis ermöglichen (Perkins 2002).

Die Tabelle 4 zeigt hierbei einen Überblick über historisch gewachsene Differenzierungsmethoden mit Erstbeschreiber und Methodik.

Tab. 4: Überblick über Differenzierungsmethoden zur Diagnostik der Kopfschuppenerkrankung

Autor	Jahr	Methode
Mac Knee	1937	Klinische Beobachtung, Bakteriologie, Mykologie
Vanderwyk	1964	Gewicht und Mikroskopie
Van Abbe	1964	Mehrseitenversuche, Bürste, Scaling Severity Score
Sommerville	1969	steriler Tupfer und Zahnstocher, Scrubtechnik
Vanderwyk	1967	Vakuumcleaner, Mehrseitenversuche
Kligman	1976	Scrubtechnik
Leyden	1976	Scaling Severity Score, Scrubtechnik (Broq-Curretage®), VAS
Aron-Brunetière	1977	Broq-Curretage
Faergemann	1983	Stainless steel ring
Ford	1984	VAS
Green	1986	VAS
Clift	1988	Scrubtechnik (Williamson-Scrub-Methode), Identifikation nach Kommerziellen Tests (Cowan)
Bergbrant	1989	Scrubtechnik, Stainless steel ring
Broberg	1989	Mikroskopie, Zellophan Patches
Leeming	1989	Scrub (stainless steel ring), Schwamm (Sediment nach Auswaschung mit sterilen Wasser)
Heng	1990	SkinScrapings
Cowley	1992	Klebefilterpapierpatches
Bulmer	1999/2000	Mikroskopie, Skinscraping
Piérard-Franchimont	2000	Scaling Severity Score, Patches
Baroni	2000	Patch
Lodén	2000	Mehrseitenversuche, Bürste, VAS
Piérard-Franchimont	2001	Scaling Severity Score, Self Adhesive Disk®
Warner	2001	Elektronen Mikroskopie, Patches
Gemmer	2002	Molekularbiologie
Squire	2002	clinical assessment of signs and symptoms, VAS
Piérard-Franchimont	2002	Scaling Severity Score
Perkins	2002	SebuTape®

Die Tabelle 4 zeigt einen historischen Ausschnitt über verschiedene Differenzierungsmethoden. Gezeigt wird u.a., dass auch ältere Methoden zur Differenzierung von Autoren in jüngerer Zeit immer wieder aufgegriffen wurden.

## 2.7 Therapieansätze

In früheren Arbeiten konnte gezeigt werden, dass eine Verbesserung der klinischen Symptomatik durch Beeinflussung der Mikroflora mittels antifungal wirksamer Agenzien erreicht werden kann. Seit den 70 Jahren konnte man epidermale Parakeratose bei der seborrhoischen Dermatitis demonstrieren und den Erfolg der Behandlung bei Applikation von Salicylsäure und später topischen Kortikosteroiden nachweisen. Eine weitere Veränderung kam mit der Einführung von Azol-Derivaten, als gezeigt werden konnte, dass bei Patienten nach Applikation dieser Medikamente eine signifikante Verbesserung ihrer Erkrankung eintrat, die Anzahl an lipophilen Hefen zurückging und eine Re-Kolonisation mit einem Rückfall einherging (Aron-Brunetière et al., 1977, Hay et al., 1997). Jedes Shampoo häufig genug angewendet kann eine Verbesserung der Kopfschuppenerkrankung bewirken, ebenso wie vermehrtes Haarewaschen. Häufiges Haarewaschen trocknet aus und verhindert, dass die „*Flakes*“ konglomerieren können und so sichtbar werden. Der Effekt des *Shampooen* im Sinne einer Kopfmassage mit Verbesserung der inflammatorischen Reaktion oder des Juckreizes ist ungeklärt, wird jedoch vermutet. Einige andere Autoren sind der Meinung, dass antifungale Agenzien, die zur einer Suppression von *M. Spp.* führen, überhaupt keine Auswirkungen auf die Verbesserung der Symptome haben (Leyden, 1979). Früher wurden häufig Teerpräparate in Arzneimitteln zur Behandlung von fettiger Kopfhaut und starkem Juckreiz verwendet. Steinkohlenteer ist wegen seiner möglichen kanzerogenen Eigenschaften jedoch nicht für Kosmetika zugelassen. Leichter Befall mit Kopfschuppen kann man durch eine gute Haarpflege beeinflussen. Das Haar sollte nicht zu häufig (zweimal pro Woche) mit milden, proliferationshemmenden und rückfettenden Shampoos gewaschen werden. Anfänglich kann der Eindruck entstehen, dass es zu einer stärkeren Schuppenbildung kommt. Das ist oftmals ein Zeichen für die Wirksamkeit. Zum Ablösen sehr starker Schuppenauflagerungen können Keratolytika eingesetzt werden. Hierzu zählt z.B. die Salicylsäure. Zielsetzung der medikamentösen Beeinflussung der Kopfhaut bei Kopfschuppen ist jedoch, nach Annahme der Hefepilzinfektion als Auslöser der Erkrankung, die Entwicklung spezifischer Antimykotika zur Behandlung.

In klinischen Untersuchungen haben sich daher in neuerer Zeit fünf Substanzgruppen als effektive Antischuppenpräparate erwiesen. Neben den zuvor erwähnten Verbindungen mit Teer, stehen im Vordergrund vor allem Präparate wie Selenium Sulphide, Azolverbindungen, Hydroxypyridone sowie Verbindungen auf Pyridinbasis, auf die im Folgenden etwas näher eingegangen werden soll.

**Azolverbindungen** sind weltweit als potentes Mittel gegen systemische und topische Mykosen akzeptiert und eines der am häufigsten eingesetzten antimykotisch wirksamen Präparate. Man unterscheidet dabei Imidazole, die fast nur lokal verwendet werden und Triazole, die sowohl lokal als auch systemisch verabreicht werden. Azole wirken als Inhibitoren der Ergosterolbiosynthese. Damit wird die Umwandlung von Lanosterol zu Ergosterol inhibiert. Durch Einlagerungen von Ergosterolvorstufen wird die Zellwandstruktur gestört. Azolverbindungen sind innerhalb der Therapie der Kopfschuppenerkrankung schon weitreichend untersucht worden. Die MHK bei z.B. Ketoconazol (KET) als dem wahrscheinlich zur Kopfschuppentherapie am häufigsten eingesetzten Medikamentes soll gegenüber *Malassezia* bereits bei Konzentrationen um 0.02-0.05 mg/l liegen (Nenoff et al., 1994). Ab einer Konzentration von 0.5 % (entspr. 0,5 mg/l) soll es bei Kopfschuppen wirksam sein (Pièrard-Franchimont et al., 2000, 2001). Gupta et al. (2000) konnten bei in-vitro Untersuchungen mit variablen Konzentrationen (0.03-64.0 µg/ml) mit KET, Itraconazol (*Sempera*<sup>®</sup>, *Itracol*<sup>®</sup>) und Voriconazol (*VFend*<sup>®</sup>) eine sehr unterschiedliche Wirksamkeit gegenüber *M. furfur*, *M. slooffiae*, *M. pachydermatis*, *M. globosa*, *M. obtusa* und *M. restricta* zeigen. KET und Itraconazol zeigten mit einer MHK < oder = 0.03 bis 0.125 µ/ml auch hier die besten Ergebnisse (Nenoff 1994). Bezüglich der Wirksamkeit 1 %-iger und 2 %-iger Konzentrationen bestehen Differenzen innerhalb der Literatur. KET 2 % soll bei schweren Fällen besser wirken (Danby 1993, Peter 1995), 1 % bei leichten Fällen ausreichend sein, aber keinen direkten Effekt auf die inflammatorische Reaktion zeigen (Pièrard-Franchimont et al., 2001). Meist wird jedoch Ketoconazol 2 % in Shampoos verwendet (z. B. *Nizoral*<sup>®</sup>, Squire et al., 2002). Die Wirksamkeit innerhalb klinischer Studien von 2 % KET schwankten zwischen 80 % und 88 % gegenüber 23 % in der Placebogruppe (Peter et al., 1995) bzw. in einer Kombination von KET 2% und *Zink-Pyrithion* 1% bis zu 90 % (Saple, 2000) Eine Verbesserung der klinischen Symptome wie Juckreiz und Erythemen ohne das Auftreten unerwünschter Ereignisse und mit einer hohen Akzeptanz konnte beobachtet werden (Go et al., 1992).

Für die (systemische) Therapie ist Ketoconazol jedoch heute weitgehend von besser verträglichen Substanzen abgelöst worden. KET kann bei systemischer Anwendung oder/und über längere Dauer eine Hepatotoxizität (Beeinflussung des humanen Leber-Zytochrom-P450) verursachen und ist z.B. in Österreich nicht mehr in der Humanmedizin zugelassen.

Auch zeigte Climbazol in einer Konzentration von 0,65 % ein gutes Ergebnis bei 80 % der Probanden mit Kopfschuppen, allerdings nur bei milder oder mittlerer Ausprägungsstärke (Wigger-Alberti et al., 2000). Nur bei 20 % der Patienten zeigte sich eine Wirkung bei schwerer Ausprägung.

Danby und Maddin (1993) verglichen Selenium Sulphid und Ketoconazol Shampoos miteinander, beide waren signifikant besser als Placebo. Einige Autoren (Rigoni et al., 1989) fanden eine bessere Wirksamkeit von Econazol im Vergleich zu Ketoconazol. Bezüglich der Verträglichkeit unterschieden sich beide Substanzgruppen nicht. Bezüglich *Oxiconazol* (Produktbeispiele: *Myfungar*<sup>®</sup>, *Oceral*<sup>®</sup>, *Trosyd*<sup>®</sup>) zeigten in vitro-Testergebnisse, dass die Empfindlichkeit von *Malassezia*-Hefen gegenüber dieser Substanz reduziert sein kann. Shadomy et al. (1988) konnten zeigen, dass eine Kreuzresistenz von *Oxiconazol* und Econazol gegenüber einigen *M. furfur* Isolaten bestand und Ketoconazol gegenüber *M. furfur* die besten Effekte zeigte.

***Oxiconazol*** (2',4'-Dichlor-2-[1-imidazolyl]acetophenon-(Z)-[O-(2,4-dichlorbenzyl)]oxim) ist ein Breitspektrum-Antimykotikum aus der Klasse der Imidazole. Es wird vornehmlich topisch eingesetzt. Es zeigt Aktivität gegenüber Schimmeln, Hefen, Dermatophyten, sowie gegenüber gram-positiven und gram-negativen Bakterien. Es wird heute meist zur lokalen Behandlung von Vaginalmykosen eingesetzt. Als Antischuppenmedikament ist es bisher kaum in Erscheinung getreten. Es ist in Deutschland rezeptpflichtig.

Lokale Nebenwirkungen, die über ein verstärktes Jucken oder Brennen hinausgehen (z.B. eine Kontaktdermatitis), sind außerordentlich selten. Aufgrund der geringen Resorption sind bisher keine systemischen Nebenwirkungen bekannt geworden.

**Hydroxypyridone** bilden eine eigene, neuere Klasse von Antimykotika (Korting 1997). Lange Zeit war *Ciclopirox* hierbei als einziger Wirkstoff in Gebrauch. In den letzten Jahren konnten neben *Ciclopirox* ( *Ciclopiroxolamin* [*Inimur*<sup>®</sup>, *Batrafen*<sup>®</sup>] ) weitere Hydroxypyridone (*Octopirox*<sup>®</sup>, *Alpecin*<sup>®</sup> [+ Fumarsäure], *Eucerin*<sup>®</sup> [+ Climbazol und Polidocanol] ) als neuere, nicht auf Azolbasis basierende Antischuppenmedikamente etabliert werden. Als Shampoozusatz werden Konzentrationen von 0,1-1,0% verwendet, Wirksamkeit soll aber schon ab 0,05% nachgewiesen sein (*Clariant* 2003). Standardlösungen enthalten üblicherweise aber 0,5%. Diese Standardlösungen sollen nach neueren Untersuchungen effektiver sein als 0,5%-1% ZnPt-Verbindungen (Lodén 2002). Auch gegenüber Azolverbindungen sollen die Hydroxypyridone signifikant besser wirksam sein. In Tierversuchen über 1 Jahr konnte bei der topischen Applikation von Konzentrationen zwischen 0,5-1,0 % kein nachteiliger systemischer Effekt gezeigt werden.

Des Weiteren konnten auch keine teratogenen, mutagenen oder embryotoxischen Effekte nachgewiesen werden und die Verträglichkeit soll ausgezeichnet sein.

**Octopirox**<sup>®</sup> (1-Hydroxy-4-methyl-6-(2,4,4-trimethylpentyl)-2-(1H)-pyridonmonoethanolamin-salz) ist eine antimyketisch und antibakteriell wirksame Substanz aus der Klasse der Pyridone. Fungizide Aktivität besteht gegen alle medizinisch relevanten Dermatophyten, Hefen und Schimmelpilze. Wie andere Pyridone übt es seine Wirkung über eine Aufnahmehemmung essentieller Substanzen in die Pilzzelle auf. Durch Komplexierung von Metall-Ionen (bes. Fe<sup>3+</sup>) hemmen Pyridone zudem den Energiestoffwechsel in den Mitochondrien der Pilze. Neben seiner antifungalen Aktivität weist *Octopirox* auch eine bakterizide Aktivität sowohl gegen gram-positive als auch gegen gram-negative Bakterien auf. Shampoos, die 0,2 %-1,0 % *Octopirox* enthielten, zeigten nach vierwöchiger Anwendung gute Verträglichkeit ohne irritierende Effekte (*Clariant* 2003). Für *Ciclopirox* hingegen sind Kontaktallergien beschrieben worden (Foti 2001). Als eines der neueren Präparate bei der Kopfschuppenbehandlung war deshalb gerade *Octopirox* in letzten Jahren Ziel einiger Studien (Jue et al., 1985, Boegart et al., 1986, Yamaguchi et al., 1986, Kokjohn et al., 2003, Black et al., 1988). Die MHK schwankt gegenüber einer antibakteriellen Wirksamkeit im Agardiffusionstest von 31 µg/ml bei *Staph. aureus* bis hin zu einer MHK von 500 µg/ml bei z.B. *Proteus* Spp. und *Pseudomonas aerug.* Das antifungale Spektrum reicht von einer MHK von 0,5 µg/ml bei *Trichophyton rubrum* bis 4 µg/ml bei *Aspergillus fumigatus*. Gegenüber *Malassezia*-Hefen liegt die MHK etwa zwischen 4 und 16 µg/ml.

### **Zink-Pyrithion (ZPT/ZnPt)**

Der Benefit einer medikamentösen Zinkzugabe ist bei vielen Dermatosen (Akne, Acrodermatitis enteropathica u.a.) bekannt. In Tierexperimenten konnte z.B. mit einer Zinkdefizit-Diät eine Parakeratose erzeugt werden (Shah et al., 1976). *Zink-Pyrithion* ist ein Chelat-Komplex aus Zink und 2-Pyridinethiol-1-Oxid, auch bekannt als Bis[1-hydroxy-2(1H)-pyridinethionato-O,S]- (T-4) Zink. Es ist effektiv gegen gram-positive und gram-negative Bakterien, Dermatophyten, Hefen und Schimmelpilzen. Die Kopfhaut bei Kopfschuppenpatienten ist durchlässiger für Medikamente, diese können schneller und in höheren Konzentrationen in das Stratum germinativum vordringen. Dieses soll u.a. den Benefit von *Zink-Pyrithion* erklären (Kligman 1976). Hierbei werden oftmals 1% Lösungen eingesetzt, die gegenüber Placebo zu einer signifikanten Reduktion der Kopfschuppen führen (Marks 1985). Studien kamen mit einer Kombination von *Zink-Pyrithion*/Ketoconazol auf einen Therapieerfolg von über 90% (Saple et al., 2000) gegenüber einer Placebobehandlung.

Nenoff (1994) konnte die gute Effizienz (MHK von 0.78-1.56 µg/ml) von *Zink-Pyrithion* durch in vitro Untersuchungen mit *Pityrosporum/Malassezia* zeigen. Vergleichbar positive Effekte von *Zink-Pyrithion* und *Octopirox* finden sich auch in anderen Studien. Der interne Datenreport von *Procter and Gamble* zeigt in einer Studie von 1 % *Zink-Pyrithion* vs. 0,85 % *Octopirox* vs. Placebo an 467 Patienten einen Rückgang des Schuppenscores um 70% vs. 62% vs. 30 % (*Procter and Gamble* data, 1993-1999). In früheren Untersuchungen konnte die MHK von *Octopirox* bzw. *Zink-Pyrithion* gegenüber *M. sympodialis* in einer Shampoogrundlage (Zusammensetzung 15% NaLES 2EO; 2% CAPB; 0,5% ABS; 0,1% Laureth 23) mit 25-50 bzw. 5-10 µg/ml bestimmt werden (Nenoff et al., 1994, Mayser 1999). Durch eine Kombination beider Therapeutika ist eine sichere und effektive Behandlung der Kopfschuppen möglich. Rückfälle zeigten sich bei allen Patienten, die später mit Placebo weiterbehandelt wurden (Peter et al., 1995). In niedrigen Konzentrationen soll *Zink-Pyrithion*/Ketoconazol einen fungistatischen Effekt aufweisen, während es in hohen Konzentrationen eher eine direkte Schädigung der Zellmembran verursacht.

In Konzentrationen von 0.1-05 µg/ml soll *Zink-Pyrithion* einen toxischen Effekt auf die menschliche Epidermis haben, Natrium-pyrithion wird dagegen etwa 100 mal besser toleriert (Priestley et al., 1980). Dieses lässt vermuten, dass der Effekt von *Zink-Pyrithion* gegen Schuppen mehr aufgrund einer nicht spezifischen Toxizität gegenüber epidermalen Zellen zu Stande kommt, als aufgrund eines lokalen Zink-Defizits (Priestley et al., 1980), was andere Autoren vermuten (Kligman et al., 1976). Im Tierversuch erwies sich *Zink-Pyrithion* aber um ein Vielfaches giftiger als vergleichbare Wirkstoffe, etwa Hydroxypyridone (Bundesinstitut für Arzneimittel). Dem Bundesinstitut für Arzneimittel liegen Berichte über Nebenwirkungen *Zink-Pyrithion*-haltiger Medikamente wie Jucken, Ausschlag und Entzündungen der Haut sowie Haarverfärbungen und Augenreizungen vor.

Obwohl letztlich die Kopfschuppenerkrankung in ihrer Pathogenese unklar ist, zeigt sich der Benefit der Behandlung der Kopfschuppen mit antimykotischen wirksamen Präparaten.

## 2.8 Problemstellung

Den Hefen der Gattung *Malassezia* wird bezüglich der Pathogenese verschiedener Erkrankungen, wie der Pityriasis versicolor, der seborrhoischen Dermatitis, der *Malassezia Follikulitis* und der *Pityriasis simplex capillitii* - der Kopfschuppenerkrankung, eine tragende, jedoch nicht exakt definierte Rolle zugewiesen.

Bereits in früheren Arbeiten konnte die Wirksamkeit von antimykotisch wirksamen Shampoos vs. Placebo bei der Kopfschuppenerkrankung gezeigt werden. Dabei wurde aber kein Zusammenhang zwischen der Wirksamkeit der Präparate und dem Vorhandensein von Spezies der Gattung *Malassezia* bei unterschiedlicher Schweregradausprägung der Erkrankung hergestellt.

Ziel dieser Studie ist daher die Überprüfung der einfachen und im klinischen Alltag rasch durchzuführenden Methode zur Spezifizierung und Nachweisbarkeit von Hefen der Gattung *Malassezia* durch Anwendung einer modifizierten Bürstenapplikation unter dem Einsatz Antimykotikahaltiger Shampoos bei der *Pityriasis simplex capillitii*.

Dabei sollten die folgenden Fragen geklärt werden:

1. Inwieweit ist die Inokulationsmethode für eine Gewinnung und Differenzierung von *Malassezia*-Hefen geeignet ?
2. Kann die Erweiterung der Differenzierung mit Hilfe des Pigmentnachweises und der Cremophorassimilation zum Nachweis einzelner *Malassezia* Spezies hilfreich sein ?
3. Kann ein Zusammenhang zwischen dem Nachweis einzelner *Malassezia* Spezies und dem Ausprägungsgrad der *Pityriasis simplex capillitii* nachgewiesen werden ?
4. Kann unter der Anwendung Antimykotika-haltiger Formulierungen eine Reduktion von *Malassezia* Spp. gefunden werden und korreliert diese mit der klinischen Besserung ?
5. Wie verändert sich der Anteil einzelner *Malassezia* Spezies auf der Kopfhautflora unter dem Einfluss Antimykotika-haltiger Formulierungen ?

### 3. Material und Methoden

Die intakte menschliche Haut bietet einen guten Schutz und eine relative Resistenz gegenüber Infektionen mit Mikroorganismen, aber schon 1874 sah Malassez den Zusammenhang zwischen *Malassezia* Hefen und einer veränderten Hautkondition - einer Abschuppung der Kopfhaut.

Diese Veränderung der beharrten Kopfhaut soll mit den bisher bekannten Methoden zur Differenzierung von *Malassezia* Hefen näher untersucht werden. Die hierfür in Anspruch genommenen Methoden werden im Folgenden näher erläutert.

#### 3.1 Kulturgewinnung und Anzuchtung

##### 3.1.1 Zusammensetzung der verwendeten Nährmedien

Zubereitung des Nährbodens für den Agardiffusionstest unter Verwendung von *Tween* 20-80 (nach Guillot): Frisch zubereiteter *mDixon* Agar wird nach Abkühlung auf rund 50 °C mit etwa 2-5 ml der zuvor mittels einer sterilen, ausgeglühten Platinöse vorsichtig von der ursprünglichen mit Bürstenabdruck und Randausstrich versehenen Kulturplatte abgeimpften Kultur (2-5 ml Aq. dest + Öse) vermischt und in Petrischalen (10 cm Durchmesser) ausgegossen. Nach Verfestigung des Mediums werden 4 Löcher mit einer 2 mm Stanze in den Agar gestanzt und mit ~ 5 µl *Tween* 20, 40, 60, und 80 aufgefüllt.

Zur Kulturgewinnung wurde das ursprüngliche *Dixon*-Medium (Van Abbe 1964) modifiziert:

##### *Dixon-Agar*

Malzextrakt 6 %  
Getrocknete Ochsen-galle 2 %  
*Tween* 40 1%  
Glycerolmonooleat 0.25 %  
Streptomycin 40 µg/ml  
Cycloheximid 250 µg/ml  
Agar 1.2 %  
Aq. dest auf 100 %

##### *mDixon-Agar (nach Guého et al., 1996)*

Malzextrakt 3.6 %  
Pepton 0.6 %  
Getrocknete Ochsen-galle 2%  
*Tween* 40 1 %  
Glycerol 0.2 %  
Ölsäure 0.2 %  
Agar 1.2 %  
Aq. dest auf 100 %

Kostenersparnis: statt Glycerol und Ölsäure: 0.4 % Olivenöl; *Chloramphenicol* und *Cycloheximid* zur Verringerung des Kontaminationsrisikos

Die entsprechenden Lösungen wurden steril filtriert und dem Medium nach Autoklavieren und Abkühlen auf etwa 50 °C zugesetzt, da beide Substanzen temperaturempfindlich sind (*Merck Index* 1996). Autoklavieren erfolgte mit einem *Melag Autoklaven Typ 23* (*Melag*, Berlin, Deutschland) bei 1 bar über 30 min.

Tab. 5 zeigt die Zusammensetzung des verwandten *mDixon-Agar* für 250 ml

3,6 % Malzextrakt	9 g	Malzextrakt-Bouillon, Merck, Darmstadt, Deutschland
0,6 % Pepton (Casein)	1,5 g	Pepton aus Casein, Merck
2,0 % Ochsen-galle	5,0 g	Difco, Detroit, USA
1,0 % Tween 40	2,5 ml Tween 40	Tween 40 Atlas, Sigma, St. Louis, USA
0,4 % Olivenöl	1,0 ml	Apotheke des Klinikums d. JLU, Giessen, kaltsterilisiert
1,2 % Agar	5 g	Agar Agar reinst, Merck
0,04 % Cycloheximid	0,1 % g	Sigma-Aldrich, Steinheim, Deutschland
0,005% Chloramphenicol	0,0125 g* auf 250 ml mit Aqua. Dest. auffüllen	Merck

\*die Stammlösung besteht aus 6,25 mg Chloramphenicol / 1 ml H<sub>2</sub>O und wurde sterilfiltriert abgefüllt und bei -20°C gelagert; 2 ml der Stammlösung wurden zugegeben.

Jeweils 10 ml des Mediums wurde unter einer der Laminar-Air-Flow Arbeitsbank (*Uniflow UUUB 1200 Biohazard*) in sterile Kunststoffpetrischalen von ~10 cm Durchmesser (*Nunc*, Roskilde DK) gegossen.

Tab. 6 zeigt die Zusammensetzung des verwandten *I b Agar* für 1000 ml

➤ 30 ml Tween 80 ultra (Sigma)
➤ 3,0 g L-Tryptophan (Trp; Sigma)
➤ 20,0 g Agar (Merck)
➤ ad Aq. dest 100 %

Nach Autoklavieren und Abkühlen auf 50°C wurde L-Tryptophan zugesetzt und das Medium zu je 10 ml in die sterilen Petrischalen ausgegossen (~ 10 cm Durchmesser).

### 3.2 Inokulation (Bürstenabruck)

Um eine Bestimmung und Differenzierung einzelner *Malassezia* Spezies nach Quantität und Qualität der Kopfhautflora zu ermöglichen, wurde die Kopfhaut dreimal (rechts/links parietal und sagittal) mit einer Spezialbürste (runde Kunststoffbürste mit 50 Zinken, siehe Abbildung Nr. 1 ) gebürstet und diese in modifizierten *Dixon-Agar* (*mDixon*) gedrückt (Methoden nach van Abbe, 1964, modifiziert nach Blömer). Die Entscheidung zur Durchführung der Bürstenmethode wurde mitgetragen von der Überlegung, dass zur Diagnostik ein für den Probanden möglichst schonendes, non-invasives Verfahren angewandt werden sollte. Von Vorteil war hierbei auch, dass im Gegensatz zur „Scrub-Methode“, hierbei epidermale Anteile der Kopfhaut, die möglicherweise schon entzündlich verändert sind, nicht weiter gereizt werden sollten. Die ursprünglich größeren Bürsten ( $\varnothing \sim 9$  cm) hatten an ihren Außenrändern längere Zinken als in der Mitte, verfälschten so in Vorversuchen die Testergebnisse und mussten daher modifiziert und verkleinert werden. Die kleineren Bürsten wiesen bei einem Durchmesser von rund 5 cm eine konstante Zinkenlänge auf und konnten so problemlos in die gebräuchlichen Petrischalen (*Nunclon Delta*, Roskilde DK.) von rund 10 cm Durchmesser gedrückt werden. Dabei erwies sich die Reduktion der Zinken auf eine Anzahl von 50 für die spätere, prozentuale Berechnung der Testabdrücke von Vorteil.

Abb. 1

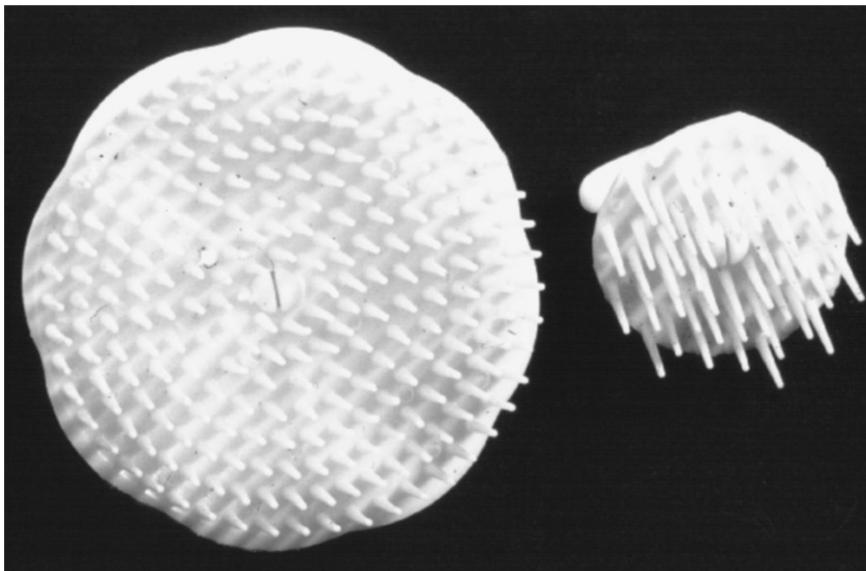
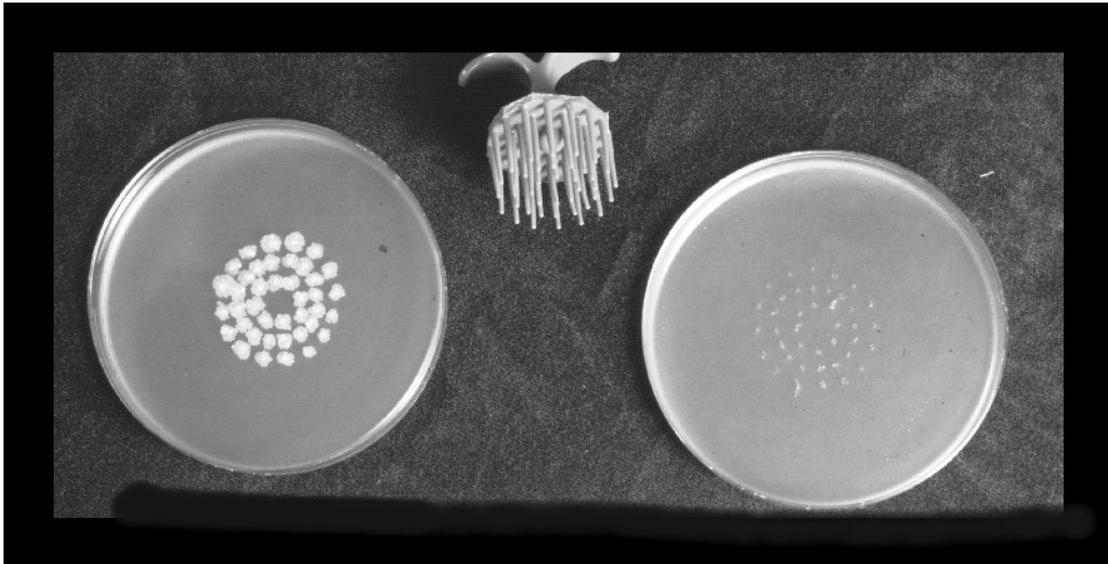


Abb. 1 zeigt neben der handelsüblichen Kopfmassagebürste eine auf 50 Zinken modifizierte Bürste.

Abb. 2



Die Abbildung 2 zeigt eine modifizierte Bürste inmitten zweier Bürstenabdrücke auf *mDixon*-Agar (rechts, 3 Tage alt, entnommen vom Kopf eines Probanden ohne Kopfschuppen, links ein 100 % positives Testergebnis nach Abdruck in einer mit CBS 1878 [Referenzkultur für *M. furfur*] beimpften Agarplatte, ebenfalls 3 Tage alt.).

Anhand von Vorversuchen mit Probanden, sowohl Freiwilligen mit Kopfschuppen, als auch Probanden, die nach eigener Einschätzung keine Kopfschuppen hatten, konnte die Reproduzierbarkeit der Inokulation mittels der modifizierten Bürste gezeigt werden. Dazu wurden an fünf aufeinander folgenden Tagen Abdrücke der Kopfhaut mittels der modifizierten Bürste genommen und über 10 Tage kultiviert (Abb. 3). Auch hierbei konnte, wie Eingangs erwähnt, unabhängig von der Diagnose „Kopfschuppen“ bei fast allen Probanden ein positiver Testabdruck gewonnen werden. Bei nur einem Probanden konnten aufgrund negativer Inokulation keinerlei Kulturergebnisse gewonnen werden.

In den gleichen Vorversuchen konnte gemäß den Richtlinien und Empfehlungen des Robert Koch-Institutes und der *DGHM* für medizinische Instrumentendesinfektion die Wirksamkeit der Desinfektion der Haarbürsten nach Gebrauch gezeigt werden. Verwendet wurde dazu *Minutil*<sup>®</sup> (Ecolab Deutschland GmbH) in einer Konzentration von 0,25%.

Abb. 3

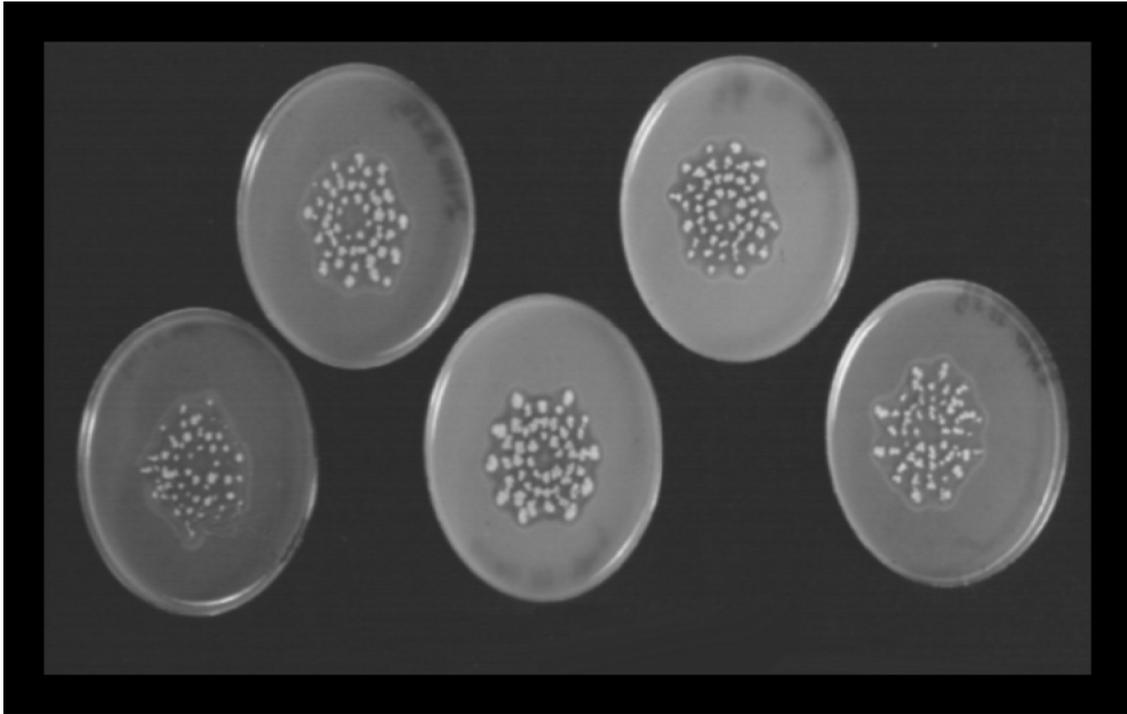


Abb. 3: Die Abbildung zeigt einen solchen Vorversuch bei einem Probanden mit Kopfschuppen

Die beimpften Agarplatten wurden direkt nach dem Bürstenabdruck mittels Deckel und einem Klebeband verschlossen und für jeden Probanden selektiv beschriftet. Anschließend wurden die Agarplatten sieben bis zehn Tage lang aerob bei 32°C im Brutschrank (*Heraeus*, Hanau, FRG) angezüchtet, bis die aus den Abdrücken der Bürstenzinken gewachsenen Pilzkolonien unter einer Stereolupe (Vergrößerung 10-fach) betrachtet, berechnet und prozentual auf die Gesamtzahl bezogen werden konnten. Mittels steriler Wattetupfer wurde die Pilzkolonie unter der Laminar-Air-Flow Arbeitsbank (*Uniflow UUUB 1200 Biohazard*) an den Rand der Agar-Platte ausgestrichen (siehe Abb. 5), so dass eine Weiterverimpfung und Stammhaltung des mittels Bürstenabdruck gewonnen Pilzmaterials möglich wurde. Diese Ausstriche wurden wiederum für mind. drei und höchstens zehn Tage lang weiterinkubiert, um genügend Material für die weitere Differenzierung zu gewinnen.

### 3.3 Differenzierungsgrundlage

Die Grundlage für die Differenzierung der einzelnen *Malassezia* Hefen in der vorliegenden Arbeit bietet ein von Guillot et al., (1996, siehe Abbildung Nr. 4) publiziertes Testungsverfahren und erlaubt mittels *Tween* Assimilation eine Differenzierung der *Malassezia* Hefen bis auf das Spezies Niveau.

Abb. 4

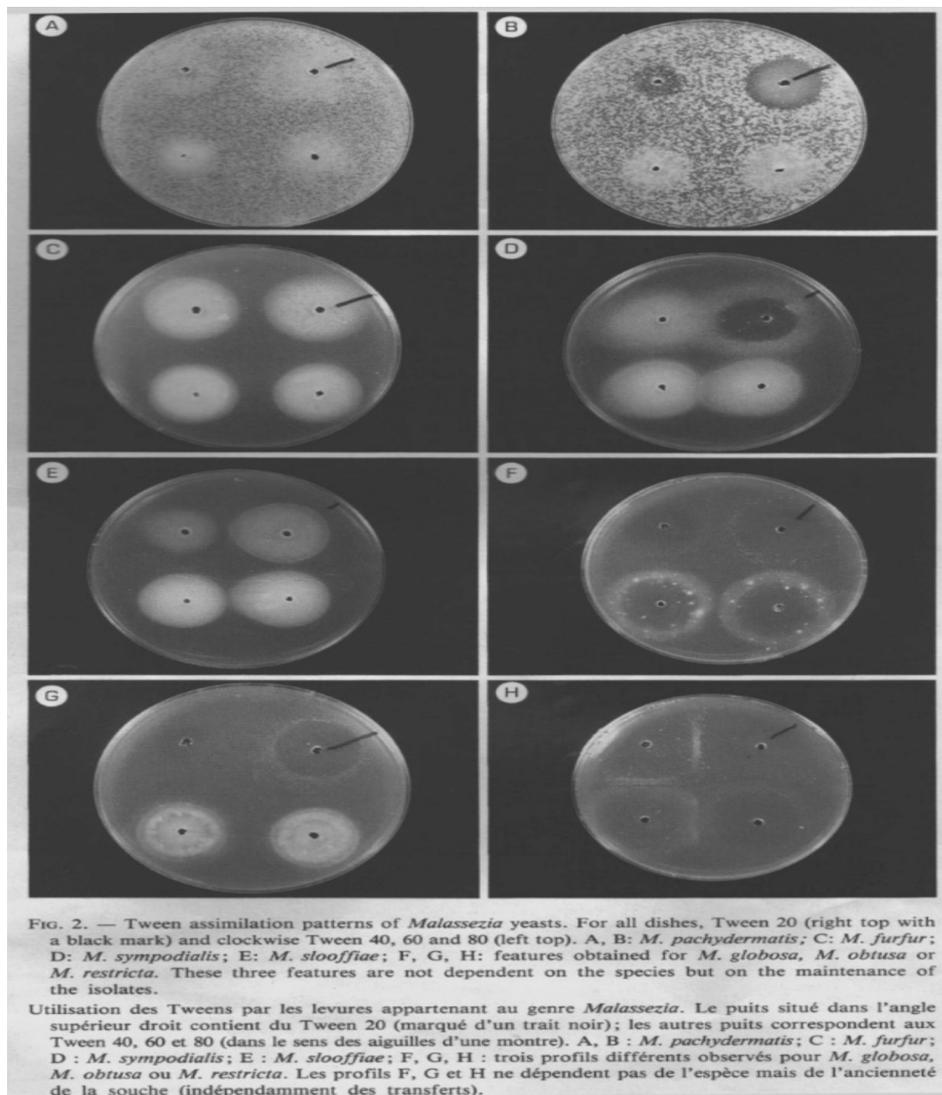


Abb. 4: Originalscan des von Guillot et al., 1996 publizierten Testungsverfahrens des Assimilations-Muster für *Malassezia* Spp. unter Verwendung von *mDixon*-Agar und *Tween* 20-80.

Das von Guillot et al., (1996, siehe Abbildung Nr. 4) publizierte Testungsverfahren wurde jedoch mit Referenzkulturen durchgeführt. Wir haben deshalb versucht mittels eines Bürstenrandstriches aus den positiven Testabdrücken Einzelkolonien zur weiteren Differenzierung zu gewinnen (siehe Abb. 5).

Abb. 5

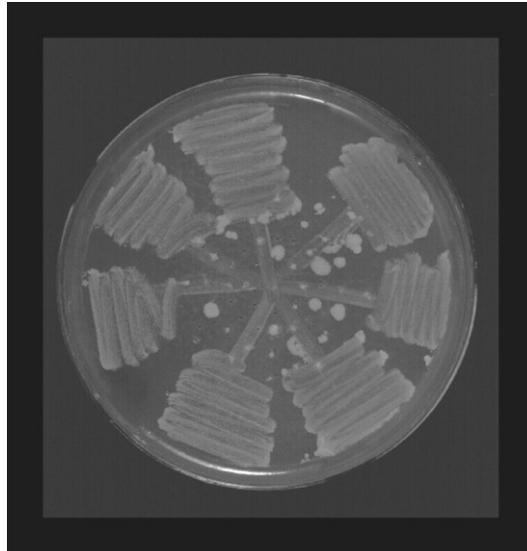


Abb. 5 zeigt einen Randabstriches nach positiven Bürstenabdruck, bei dem die Pilzkolonie mittels einer sterilen Öse an den Rand der Agarplatte gestrichen wurden.

Des weiteren wurden zur Differenzierung noch die makromorphologischen Charakteristika einzelner *Malassezia*-Spp. herangezogen werden (nach Guillot et al., 1996).

#### ***Malassezia furfur* ( Robin ) Baillon 1889**

Als Charakteristika finden sich eine instabile Morphologie, die neben runden Zellen ( ~ 2,5 –4,0 µm Durchmesser) auch lange-ovale/zylindrische Zellen ( ~ 1,5 x 2,5-8 µm ) zeigen kann. Nach 7 tägiger Inkubation auf *mDixon* Agar bei 32°C zeigen sich Kulturen mit einem ~ Durchmesser von 5 mm, die stumpf-glänzend imponieren.

#### ***Malassezia pachydermatis* ( Weidmann ) Dodge 1935**

Aufgrund der nicht obligaten Lipiddependenz nimmt *M. pachydermatis* eine Sonderstellung ein. Auf Glucose/Pepton-Agar zeichnet sich das Wachstum durch stumpf-glänzende und glatte Kulturen von ~ 5 mm Durchmesser aus, eine Größe von rund 2.5-3,5 x 4,0-5,0 µm können ovoide Zellen haben.

### ***Malassezia sympodialis* ( Simmons und Guého ) 1990**

Entspricht *Pityrosporum ovale* Form 3 (Midgley 1989), *Malassezia furfur* Serovar A (Cunningham et al., 1990) und *Malassezia ovalis* Form 3 (Midgley 1993). Auf *mDixon* Agar lassen sich nach 7 tägigem Wachstum bei 32°C glänzende, glatte Kulturen mit einem Durchmesser von etwa 5 mm finden, die Sproßzellen können oval bis rund sein mit einer Größe von 1,5-2,5x2,5-6 µm. Sympodiale Sproßzellen sind für die Namensgebung verantwortlich.

### ***Malassezia globosa* (Midgley, Guého, Guillot ) 1996**

Identität besteht mit *M. furfur* Serovar B (Cunningham et al., 1996) und *M. furfur* sensu Midgley (Midgley 1993). Auf *mDixon* Agar werden nach 7 Tagen Wachstum kleine (~ 4 mm) zerklüftete Kulturen beobachtet, eine stabile Mikromorphologie ( 2,5-8 µm Durchmesser) liegt vor.

### ***Malassezia obtusa* ( Midgley, Guillot, Guého) 1996**

*Pityrosporum ovale* Form 2 (Midgley 1989) und *Malassezia ovalis* Form 2 (Midgley 1993) haben Identität mit *M. obtusa*. Die Kulturen zeigen nach 7 Tagen Wachstum auf *mDixon*-Agar glatte, abgerundete Spitzen (Namensgebung) von ~ 4 mm Durchmesser. *M. obtusa* gilt als schwer anzüchtbar und kultivierbar.

### ***Malassezia restricta* (Guého, Guillot und Midgley) 1996**

Identität besteht mit *M. furfur* Serovar C (Cunningham et al., 1990). Die Namensgebung erfolgte aufgrund des nur eingeschränkten Wachstums. Auf *mDixon*-Agar finden sich nach 7 Tagen und 32°C matt-glänzende, spröde Zellen von ~ 3 mm Durchmesser.

### ***Malassezia slooffiae* (Guillot, Midgley, Guého) 1996**

Identisch mit *P. ovale* Form 1 (Midgley 1989) und *Malassezia ovalis* Form 1 (Midgley 1993). Das Wachstum bei 32 °C nach 7 Tagen zeichnet sich durch matt-glänzende, mit rauher Oberfläche und einem Durchmesser von ~ 3 mm aus. Die Zellen sehen kurz zylindrisch mit einer Größe von 1-2 x 1,5-4 µm aus.

Zusätzlich wurden zur Differenzierung noch die *Tween*- und *Cremophor*assimilation sowie die Pigmentbildung herangezogen.

### 3.4 Tweenester, Cremophorassimilation, Pigmentbildung

#### **Tween-Ester**

Das nichtionische, amphiphile Tensid *Tween* (Polyoxysorbitanfettsäureester) kann als Transportsubstanz für die im Molekül als Ester gebundenen Fettsäuren dienen. *Tween* -Ester finden als Salben-Creme-Bestandteile und Lösungsvermittler Anwendung.

Die *Tween*-Substanzen wurden für diese Studie verwendet, da diese als Bestandteil des Nährbodens zum einen als Emulgator für die Herstellung der Agarplatten dienen, zum anderen aber auch lipidhaltige Nährsubstrate enthalten und damit von *Malassezia*-Spezies verstoffwechselt werden können. In Tabelle Nr. 7 sind einige handelsübliche *Tween*-Ester, die unter anderem auch in dieser Studie verwendet wurden, mit ihrer Bezeichnung und den jeweiligen Fettsäureanteil aufgelistet.

Tab. 7: Bezeichnung und Fettsäureanteil einiger handelsüblicher *Tween*-Ester

Bezeichnung	Fettsäureanteil
<i>Tween</i> -20 = Polyoxysorbitanmonolaurat	50 % C 12:0 + C 14:0, C 16:0 und 18:0
<i>Tween</i> -40 = Polyoxysorbitanmonopalmitat	90 % C 16:0, 10 % C 18:0
<i>Tween</i> -60 = Polyoxysorbitanmonostearat	50 % C 16:0, 50 % C 18:0
<i>Tween</i> -80 = Polyoxysorbitanmonooleat	70 % C 18:1 + C 18:2, C 16:0 und C 18:0

Ergänzt und modifiziert wurde die Differenzierung durch Ergänzung eines weiteren Stanzloches in der Mitte in das ~5 µl *Cremophor-EL*<sup>®</sup> gefüllt wurden, sowie durch die Beurteilung der Pigmentreaktion.

#### **Cremophor Assimilation**

Unter Einsatz von *Cremophor-EL*<sup>®</sup> lässt sich das von Guillot et al., 1996 publizierte Testungsverfahren mit geringem Aufwand ergänzen. *Cremophor-EL*<sup>®</sup> (PEG-(35)-Rizinusöl, *Sigma*) ist als Lösungsmittelformulierung für verschiedene lipophile Pharmaka bekannt. *Cremophor* wird ausschließlich von *M. furfur* verstoffwechselt und zeigt einen homogenen Wachstumshof um das Stanzloch. Die charakteristische und selektive Utilisation von *Cremophor-EL*<sup>®</sup> kann daher bei der Identifizierung und Abgrenzung von *M. furfur* gegenüber den anderen *Malassezia* Spp. hilfreich sein.

#### **Pigmentbildung**

Ergänzt wurde die Differenzierung durch die Beurteilung der Pigmentreaktion.

In der vorliegenden Arbeit sollen so Population von *Malassezia*-Hefen auf einem Kulturmedium (*I b Agar* s.o.) abgegrenzt werden, welches neben einer Lipidquelle die Aminosäure Tryptophan enthält. Ausschließlich lässt sich dieser Effekt bei *Malassezia furfur* induzieren. Mittels eines

sterilen Wattetupfers wurden unter der Laminar-Air-Flow Arbeitsbank (*Uniflow UUUB 1200 Biohazard*) vorsichtig Kolonien von den durch Bürstenabdruck positiven Kulturplatten entnommen und auf dem modifizierten Agar (*1 b*) ausgestrichen. Da nur der Nachweis einer positiven Reaktion erfolgen sollte, zeigte es sich in Vorversuchen als ausreichend, die handelsüblichen Petrischalen (~ Ø 10 cm) in vier Quadranten zu unterteilen, so dass direkt vier Proben auf ihre Pigmentreaktion untersucht werden konnten. Eine positive Reaktion zeigt sich bei einer Inkubation von 32° C Zufuhr im Brutschrank (*Heraeus*, Hanau, FRG) als ein in den Agar diffundierendes Pigment mit bräunlicher Verfärbung des Kulturmediums.

#### 4. Studiendesign:

Nach dem positiven Votum der Ethik-Kommission wurden für die vorliegende Studie Probanden mit Kopfschuppen gesucht. Die Probanden stellten sich in dem Zeitraum von Januar bis März 2000 zur Screening-Visite vor. Von 132 vorgestellten Probanden erfüllten 88 die Einschlusskriterien und konnten in die Studie aufgenommen werden.

#### 4.1 Studienplan:

Tab. 8: Ablauf des Studienplanes über 5 Visiten

Visit	Bestimmung Schuppen-Menge	Bestimmung Schuppen-größe	Subj. Empfinden	Kultur	Unerwünschte Ereignisse	Einverständnis	Ausgabe Prüfpräparat
1	X	X	X	X	X	X	Grundlage
2	X	X	X	X	X	-	Randomisiertes Prüfpräparat
3	X	X	X	X	X	-	-
4	X	X	X	X	X	-	-
5	X	X	X	X	X	-	-

#### 4.2 Anzahl der Probanden:

Je Studienarm waren 22, insgesamt also 88 Probanden vorgesehen. Dies entsprach einer erwarteten Zahl von 80 auswertbaren Probanden. Für jeden Probanden wurde ein eigenes Prüfprotokoll (*case report form*) angelegt, sowie die Ein- und Ausschlusskriterien überprüft. Das Prüfprotokoll ist im Anhang einsehbar.

### **4.3 Ein- und Ausschlusskriterien:**

#### **Einschlusskriterien:**

- Alter  $\geq$  18 Jahre
- keine schwerwiegenden Grunderkrankungen
- Diagnose chronischer Kopfschuppen (chronisch rezidivierend für zumindest 6 Monate) des Scoregrades mittel, nachweisbar bei der Screeninguntersuchung und nach der 2-wöchigen run-in phase
- bei Frauen im gebärfähigen Alter wirksame antikonzeptive Maßnahmen
- schriftliches Einverständnis

#### **Ausschlusskriterien:**

- Psoriasis der Kopfhaut
- topische Behandlung der Kopfhaut mit Antimykotika oder Corticosteroiden 4 Wochen vor Beginn der aktiven Behandlungsphase, systemische Behandlung mit Antimykotika in den letzten 3 Monaten, systemische Behandlung mit Corticosteroiden, Retinoiden, Zytostatika oder Immunmodulantien 4 Wochen vor Beginn der aktiven Behandlungsphase
- Überempfindlichkeit gegenüber der Studienmedikation bzw. von Komponenten der Grundlage
- Schwangerschaft oder Stillzeit
- anzunehmende eingeschränkte Compliance

### **4.4 Randomisierung**

Die Zuteilung der Probanden zu den einzelnen Studienarmen erfolgte randomisiert nach einem zuvor festgelegten Schlüssel. Weder Projektleiter noch Proband wussten, welchem Therapiearm der jeweilige Proband zugehörig ist („Doppelblind“). Für den Notfall oder im Falle schwerer unerwünschter Ereignisse konnte der Code gebrochen werden. Am Ende der Studie wurde der Code für alle Beteiligten offen gelegt. Die Randomisierungsliste findet sich im Anhang.

## 4.5 Studienarme (Testpräparate)

Die Probanden wurden parallel in 4 Studienarmen zugeteilt, die folgenderweise bezeichnet waren:

- **1- Placebo (auswaschbare Cremegrundlage)**
- **2- Octopirox in Cremegrundlage** (*Octopirox*<sup>®</sup> in einer Konzentration von 0.5 % und ZnCl<sub>2</sub> in einer Konzentration von 0.35 %, da diese Kombination in in-vitro Vorversuchen einen synergistischen Effekt versprach)
- **3- Zink-Pyrithion in Cremegrundlage** (*Zink-Pyrithion* 0,5 % w/w)
- **4- Oxiconazol in Cremegrundlage** (*Oxiconazol* 0,25 % w/w)

Jede Applikation der Test-Creme umfasste ca. 5 ml (Patienten mit mehr als schulterlangem Haar sollten jeweils 10 ml verwenden).

### Placebo- bzw. run-in Medikation (Tab. 9):

Tabelle. 9: auswaschbare Cremegrundlage

Genapol LRO liquid (Sodium Laureth Sulfate)	30 %
Citrid Acid (50 %)	0.50 %
Verdickungsmittel	2.00 %
Polyquaternium-10	0.30 %
Genapol LAA liquid (Sodium Lauroamphoacetate)	12.00 %
Cosi Silk Soluble	0.50 %
Parfüm	q.s.
Preservative Euxyl K 400 (0,05 %, es besteht aus Dibromdicyanobutan und Phenoxyethanol)	q.s.
Trübungsmittel	2.00 %
Wasser	ad 100.00 %

## 4.6 Studienablauf

Es wurden 5 Visiten nach folgendem Schema durchgeführt (Tab. 10)

Tab. 10: Studienablauf

Visit	1: Voruntersuchung (screening)	2: Therapie, Ausgabe rand. Prüfpräparat. (baseline)	3: Therapie, intermitt. Visit	4: Therapie, Ende d. Therapiephase	5: Nachkontrolltermin
Studientag	0	14-18	26-30	42-46	54-58
Wochen	~ 2	~ 2	~ 2	~ 2	~ 2

### Visit 1- screening (Tag 0)

Ausmaß und Größe des Kopfschuppenbefalls wurde festgelegt. Er sollte mindestens die Score-Wertung "mittel" erreichen. Eine erste Kultur wurde gemäß der Bürstenmethode angesetzt. Ein- und Ausschlusskriterien wurden abgefragt. Nach Klärung aller Fragen erfolgte das schriftliche Einverständnis des Probanden auf dem vorgegebenen Einverständnissbogen (im Anhang einsehbar). Der Proband erhielt die Creme-Grundlage, eine Anleitung zur Anwendung, sowie ein Therapietagebuch ausgehändigt. In der nun beginnenden 2-wöchigen run-in wusch er sich hiermit gemäß seinen bisherigen Gepflogenheiten die Haare. Zwei Tage vor Aufnahme in die Studie durfte keinerlei Antischuppen-Shampoo verwendet werden.

### Visit 2- baseline (Tag 14-18)

Erneut wurde der Schuppenscore bestimmt (Wertung zumindest "mittel") und eine Kultur entnommen. Der Patient wurde dem jeweiligen Prüfarm randomisiert, doppelblind zugeteilt und die entsprechende Prüfmedikation ausgegeben. Mögliche unerwünschte Ereignisse wurden abgefragt. In der nun folgenden 4-wöchigen Behandlungsphase wurden die Haare 3-mal pro Woche mit dem jeweiligen Prüfpräparat gewaschen. Hierzu wurde das Präparat eine Minute in das bereits angefeuchtete Haar einmassiert und nach einer Einwirkzeit von 2 Minuten abgespült.

### Visit 3- Kontrolle während der Behandlungsphase (Tag 26-30)

Nach 2 Wochen der aktiven Phase wurde bei einem Kontrolltermin der Schuppenscore bestimmt, eine Kultur entnommen und mögliche unerwünschte Ereignisse abgefragt.

#### **Visit 4- Ende der aktiven 4-wöchigen Behandlungsphase (Tag 42-44)**

Nach exakt 4 Wochen der aktiven Phase wurde bei einem Kontrolltermin der Schuppenscore bestimmt, eine Kultur entnommen und mögliche unerwünschte Ereignisse abgefragt. Die restliche Studienmedikation wurde vom Probanden zurückgegeben und vom Untersucher grob quantifiziert.

#### **Visit 5- etwa 2 Wochen nach Ende der aktiven Phase (Tag 54-58)**

Der Proband führte seine Haarpflege wieder nach Wunsch durch. Einzig Antimykotika-haltige Shampoos sollten in dieser Zeit nicht verwendet werden. Schuppenscore und Kulturen wurden unter der Frage eines möglichen Rezidives entnommen.

### **4.7 Beurteilung von Schuppengröße und Schuppenmenge (Score)**

Bei den 5 erforderlichen Besuchsterminen wurden von jedem Probanden jeweils Schuppenmenge und Schuppengröße durch Ausschütteln der Haare über einer schwarzen DIN-A3 großen Photopappe bestimmt. Das Ausschütteln erfolgte definiert durch eine je dreimalige Vor- und Rückwärtsbewegung beider Hände des Probanden in 3 definierten Zonen (sagittal in Kopfmittle sowie beidseitig parietal). Eine Anleitung dazu erhielt jeder Proband mit seinen Studienunterlagen. Diese Anleitung ist im Anhang beigefügt. 2 Tage vor sowie am Untersuchungstag durften kein Haarspray, Haarlack oder Festiger verwendet sowie die Haare nicht gewaschen werden.

Bestimmt wurden:

#### 1. **Schuppenmenge** nach einer Score-Einteilung

- ***stark:*** **der Karton war dicht mit Schuppen bedeckt.**
- ***mittel:*** **es waren deutlich Schuppen auf dem Karton wahrnehmbar.**
- ***schwach oder keine:*** **es waren nur vereinzelt oder keine Schuppen erkennbar.**

#### 2. **Schuppengröße**

- **$\geq 2$  mm**
- **$\leq 2$  mm**

Das Verhältnis der beiden Schuppengrößen unter den ausgeschüttelten Schuppen wurde in Prozent angegeben (Gesamt immer = 100 %). Des Weiteren wurde auch die subjektive Veränderung der Studienerkrankung unter der Prüfmedikation (Verbesserung, Verschlechterung) bei jedem Visit notiert. Folgende Parameter wurden von Seiten des Probanden bewertet: Juckreiz, Schuppung, Entzündung.

Die Skalierung umfasste folgende Einteilung:

- **+++** *sehr stark;*
- **++** *mittel stark;*
- **+** *schwach;*
- **0** *keine Symptome;*

Die einzelnen Visits sowie die durchzuführenden Maßnahmen sind im Studienplan zusammengefasst. Eine Effektivitätsbewertung wurde am Visit 4 durchgeführt. Sie umfasste die Veränderung der Schuppenerkrankung vor und nach Therapie auf einer Skalierung von:

- **- 1 (Verschlechterung) nach + 5 (Komplette Heilung).**
- **0= keine Heilung;**
- **1= schwach gebessert;**
- **2= mäßig gebessert;**
- **3= deutlich gebessert;**
- **4= nahezu komplett geheilt;**

## **4.8 Ethische Voraussetzungen**

Die Studie wurde am 10.1.2000 durch die Ethik-Kommission des FB Humanmedizin der Justus-Liebig-Universität Gießen (Vorsitzender Prof. Dr. E. Habermann) unter der Nummer 79-99 genehmigt. Die Einverständniserklärung wurde gemäß §40 I/II AMG und den Vorgaben der Ethikkommission abgefasst. Sie beinhaltete die Aufklärung über die bekannten Ursachen der Kopfschuppenerkrankung, die bisherigen Ergebnisse einer Antimykotika-Anwendung bei dieser Erkrankung, die Erklärung des Doppelblindcharakters sowie der Möglichkeit, der Placebo-Gruppe zuzugehören. Die Art der Verabreichung, mögliche Nebenwirkungen und Angaben über Art und Umfang des wissenschaftlichen Untersuchungsprogrammes, des weiteren Aufklärung über den Versicherungsschutz und die Möglichkeit, jederzeit vom Einverständnis zurücktreten zu können. Das Einverständnis wurde jeweils schriftlich abgegeben und vom betreuenden Arzt gegengezeichnet. Eine Kopie der Einverständniserklärung findet sich im Anhang.

## **4.9 Versicherung**

Da die Anwendung von *Oxiconazol* den Bedingungen des AMG unterliegt, wurde für jeden Probanden eine Versicherung unter der Versicherungsscheinnummer: 70-005307844-1 abgeschlossen. Der Versicherer war die Gerling Industrie-Service GmbH Südwest, die Versicherungssumme betrug je Proband 1 Million DM.

## **4.10 Statistik**

Zur statistischen Auswertung der Daten wurde das *Statistical Package for the Social Science* (SPSS® GmbH, Software, München) Version 9.0 verwandt. Angewendet wurden übliche parametrische Tests (T-Test, Korrelation nach Pearson). Als Maß für die Straffheit des Zusammenhangs dient für nominal und ordinal skalierte Parameter der Kontingenzkoeffizient nach Pearson. Bei den Gruppenanalysen wurde ein Signifikanzniveau von  $p \leq 0,05$  gewählt.

## 5. Ergebnisse

### 5.1 Allgemeines

In den folgenden Kapiteln kommen zunächst probandenspezifische Parameter zur Darstellung. Neben der Darstellung der Alters- und Geschlechtsverteilung der Probanden und deren Haarlänge werden Medikations- bzw. Placeboverbrauch gezeigt. Die Patienten werden je nach Ausprägung der Schuppenerkrankung in drei Scores (nach Schuppenmenge, Schuppengröße und subjektives Empfinden) eingeteilt und die Kulturergebnisse der Bürstenabdrücke bezogen auf die Scoreverteilung dargestellt. Um Unterschiede zwischen den Behandlungsarmen zu zeigen, werden diese Ergebnisse im Anschluss gemäß den vier Studienarmen für jede Medikation bzw. Placebo aufgeführt. Zunächst werden dabei die quantitativen Kulturergebnisse gezeigt, danach die Verteilung der *Malassezia* Spp. als qualitatives Ergebnis betrachtet.

Die Pigmentbildung als weiteres qualitatives Merkmal wird zunächst insgesamt und anschließend verteilt auf die vier Studienarme aufgezeigt. Des Weiteren wird der Zusammenhang zwischen der Pigmentbildung und der *Cremophor El*<sup>®</sup>-Assimilation gezeigt.

Am Ende des Kapitels wird zusammenfassend die Effizienz der Testpräparate sowohl quantitativ (Score) als auch qualitativ (Kulturergebnisse isolierter *Malassezia* Spp.) dargestellt: Dabei stehen zunächst die Veränderungen der Schweregradausprägung am Ende der Behandlungsphase dann die Veränderungen bezüglich der Schuppenmenge, Schuppengröße und schließlich Veränderungen beim Itching-Score (Juckreiz) im Vordergrund.

## 5.2 Patientenkollektiv

88 Probanden haben an der Studie teilgenommen, 6 Probanden haben die Studie nicht regelrecht beendet und gingen daher nicht in die Auswertung mit ein. Abbildung 6 zeigt die Alters- und Geschlechtsverteilung der Probanden (alle Studienarme). Das Durchschnittsalter betrug 32,9 Jahre.

Abb. 6

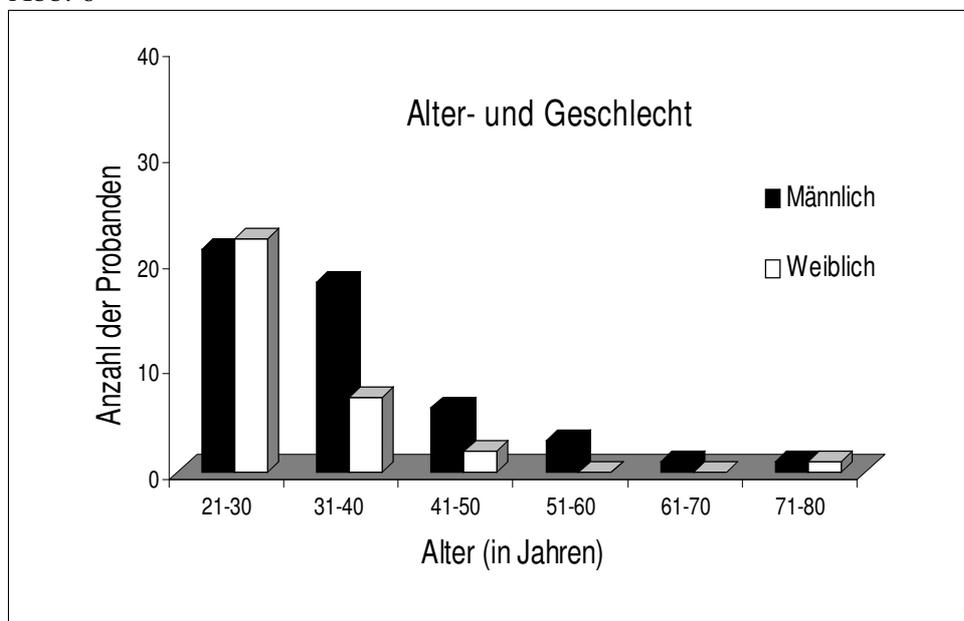


Abb.6: Alters- und Geschlechtsverteilung der Probanden.

## 5.3 Versuchsergebnisse

Die auswertbaren 82 Probanden (50 m, 32 w, Abb. 6) verteilen sich wie folgt auf die doppelblind randomisierten Studienarme (Tabelle 11).

Tab.11 zeigt die Geschlechts- und Altersverteilung der Probanden

Gruppe / Gesch.	M / W	Alter (Mw)	S*
<i>Octopirox</i> <sup>®</sup>	16 / 5	36,5	13,5
<i>Zink-Pyrithion</i>	9 / 11	28	5,9
<i>Oxiconazol</i>	9 / 10	33,3	12,9
Placebo	16 / 6	33,7	9,8

S\*=standardabweichung

Die Verteilung der Probanden zu den einzelnen Behandlungsarmen zeigte sich als gleichmäßig. Signifikante Unterschiede bestanden nicht.

## 5.4 Haarlänge und Medikationsverbrauch

Durch Rückgabe der Prüfmedikation konnte der Verbrauch der Testpräparate ermittelt werden. Die folgenden Tabellen 12 ff. zeigen dies für die einzelnen Therapiearme:

Tabelle 12 a-d: Verbrauch von Shampoo-Base und Prüfpräparat (in ml.).

Tab. 12a: *Oxiconazol-Gruppe*

<b>Shampoo-Base (125 ml) u. Medikation Oxiconazol (250 ml)</b>			
	Base Visit2	<i>Oxiconazol</i> Visit3	<i>Oxiconazol</i> Visit4
Mittelwert	48,8	58,1	48,5
S*	24,8	44,2	47,4

Tab. 12b: *Octopirox® Gruppe-Gruppe*

<b>Shampoo-Base (125 ml) u. Medikation Octopirox® (250 ml)</b>			
	Base Visit2	<i>Octopirox®</i> Visit3	<i>Octopirox®</i> Visit4
Mittelwert	43,7	65	52,1
S*	16,4	37,2	48,1

Tab 12c: *Zink-Pyrithion-Gruppe*

<b>Shampoo-Base (125 ml) u. Medikation Zink-Pyr. (250 ml)</b>			
	Base Visit2	<i>Zink-Pyr.</i> Visit3	<i>Zink-Pyr.</i> Visit4
Mittelwert	50,3	55,5	53,4
S*	21,5	34,8	36,2

Tab. 12d: **Placebo-Gruppe**

<b>Shampoo Base (125 ml) u. Medikation Placebo (250 ml)</b>			
	Base Visit2	Placebo Visit3	Placebo Visit4
Mittelwert	46,2	69,4	47,7
S*	24,7	46,9	46,7

S\*=standardabweichung

Unterschiede im Verbrauch der Baseline- und der Prüfmedikation, die sich möglicherweise auf differente Haarlängen der Probanden in den einzelnen Armen zurückführen (Tab. 13) lassen, waren nicht signifikant.

Tab.13: Durchschnittliche Haarlänge der Probanden in den einzelnen Gruppen

Haarlänge in cm		
Gruppe	Mittelwert	S*
<i>Oxiconazol</i>	20,7	8
<i>Octopirox</i> <sup>®</sup>	13,2	5
<i>Zink-Pyrithion</i>	24,5	20
Placebo	8,8	6,5

S\*=standardabweichung

Die Probanden in der Placebo-Gruppe zeigen hierbei die geringsten Werte. Trotz differenter Haarlänge ist der Verbrauch erstaunlicherweise weitgehend gleich. Die Haarlänge stellt somit keinen signifikanten Einflussfaktor auf den Verbrauch der Testpräparate dar. In Abbildung 7 wird dieser Zusammenhang grafisch dargestellt.

Abb.7

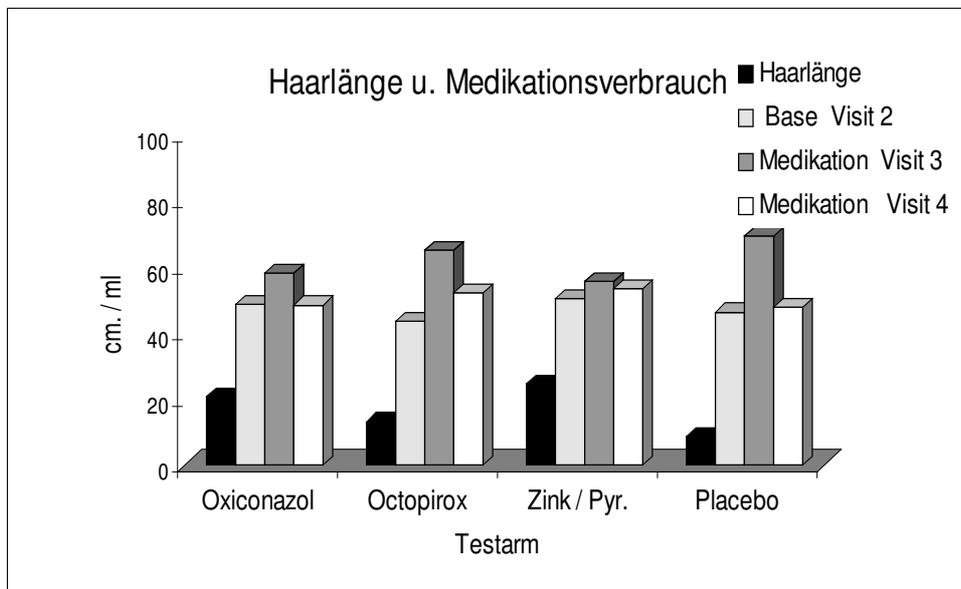


Abb. 7: Haarlänge (Mw. in cm.) und Medikationsverbrauch (Mw. in ml.).

Die differente Haarlänge ist für den Verbrauch der Präparate nicht maßgeblich.

## 5.5 Scoreverteilung

Um eine mögliche Korrelation zwischen der Schwere der Kopfschuppenerkrankung (Scoreverteilung gemäß Schuppenmenge und Schuppengröße) und der Zahl der positiven Zinken des Bürstenabdruckes zu zeigen, erfolgte die Unterteilung aller Probanden bezüglich Score und der Zahl der positiven Zinken. So soll gezeigt werden, in wieweit die Prüfmedikation bzw. die Shampooabgabe (Placebo) bei unterschiedlichem Score wirksam ist und, ob differente signifikante Merkmale bezüglich einzelner *M. Spp.* bestehen.

Die Tabellen 14 ff. sollen den Zusammenhang von Schuppenscore (in Klammern Anzahl der Probanden) und der Zahl der positiven Zinken (in %) tabellarisch verdeutlichen.

Tab. 14a: Visit 2

	<b>Zahl der positiven Zinken in %</b>			
	Mw	S*	Min.	Max.
Score1 <sup>+</sup> (0)	-	-	-	-
Score2 (46)	24,7	27,5	0	100
Score3 (36)	29,8	36,7	0	100

\* für den Einschluss eines Probanden in die Studie musste mindestens Score 2 vorliegen.

Tab. 14b: Visit 3

	<b>Zahl der positiven Zinken in %</b>			
	Mw	S*	Min.	Max.
Score1 (33)	22,7	32,9	0	100
Score2 (35)	18,9	29,8	0	100
Score3 (14)	11,4	13,5	0	44

Tab. 14c: Visit 4

	<b>Zahl der positiven Zinken in %</b>			
	Mw	S*	Min.	Max.
Score1 (42)	17,6	29,2	0	100
Score2 (32)	8,1	20,5	0	98
Score3 (8)	11,75	22	0	68

Tab. 14d: Visit 5

	<b>Zahl der positiven Zinken in %</b>			
	Mw	S*	Min.	Max.
Score1 (30)	22,9	33,9	0	100
Score2 (33)	15,6	30,2	0	98
Score3 (19)	9,7	19,6	0	84

Es zeigt sich hier bereits, dass die maximale Anzahl der positiven Zinken in den Scoreausprägungen 2 und 3 rückläufig ist. Probanden mit starker Kopfschuppung neigen zu einem reziproken Trend: eine geringere Nachweisbarkeit von *Malassezia*-Hefen.

Die Unterschiede zu Patienten mit Score 1 waren aufgrund der hohen Standardabweichung aber nicht signifikant. Um mögliche Einflüsse der verwendeten Präparate innerhalb der Testarme auf den Score zu verdeutlichen, sollen in den Tabellen Nr. 15-, 16-, 17- und 18 ff., in Anlehnung an die Tabelle 14 ff., die Unterteilung nach den jeweiligen Testarmen dargestellt werden.

### **Zink-Pyrithion-Gruppe**

Tabellen 15 ff. Verhältnis von Schuppenscore (in Klammern Anzahl der Probanden) und Zahl der positiven Zinken in % – mit *Zink-Pyrithion* behandelte Probanden: (n = 20).

Tab. 15a: Visit 2

	<b>Zahl der positiven Zinken in %</b>			
	Mw	S*	Min.	Max.
Score1 <sup>+</sup> (0)	-	-	-	-
Score2 (8)	35,75	33,7	0	98
Score3 (12)	21,7	25,5	0	76

\* für den Einschluss eines Probanden in die Studie musste mindestens Score 2 vorliegen.

Tab. 15b: Visit 3

	<b>Zahl der positiven Zinken in %</b>			
	Mw	S*	Min.	Max.
Score1 (9)	17,3	32,3	0	92
Score2 (10)	9,8	17,6	0	60
Score3 (1)	2	0	2	2

Tab. 15c: Visit 4

	<b>Zahl der positiven Zinken in %</b>			
	Mw	S*	Min.	Max.
Score1 (13)	4,5	7,9	0	24
Score2 (6)	1,7	2,4	0	6
Score3 (1)	0		0	0

Tab. 15d: Visit 5

	<b>Zahl der positiven Zinken in %</b>			
	Mw	S*	Min.	Max.
Score1 (7)	25,7	36,4	0	88
Score2 (9)	11,1	25,9	0	84
Score3 (4)	9,5	6,8	0	16

S\*=standardabweichung

Unter der Therapiephase tritt eine deutliche Reduktion der positiven Zinken auf, auch findet sich eine geringere Anzahl von Probanden in den Scores 2 und 3. Dieser Trend ist in der Nachbeobachtungsphase rückläufig.

### ***Octopirox® Gruppe***

Tabellen 16 ff.: Verhältnis von Schuppenscore (in Klammern Zahl der Probanden) der Zahl der positiven Zinken – mit *Octopirox®* behandelte Probanden (n = 21).

Tab. 16a: Visit 2

	<b>Zahl der positiven Zinken in %</b>			
	Mittelwert	S*	Min.	Max.
Score1 <sup>+</sup> (0)	-	-	-	-
Score2 (11)	11,8	14,7	0	52
Score3 (10)	50,4	42,7	0	100

<sup>+</sup> für den Einschluss eines Probanden in die Studie musste mindestens Score 2 vorliegen.

Tab. 16b : Visit 3

	<b>Zahl der positiven Zinken in %</b>			
	Mittelwert	S*	Min.	Max.
Score1 (9)	14,4	29,75	0	98
Score2 (9)	21,3	37,4	0	98
Score3 (3)	12	14,2	0	32

Tab. 16c: Visit 4

	<b>Zahl der positiven Zinken in %</b>			
	Mittelwert	S*	Min.	Max.
Score1 (13)	14,1	27	0	100
Score2 (6)	20	23,2	0	60
Score3 (2)	34	34	0	68

Tab. 16d: Visit 5

	<b>Zahl der positiven Zinken in %</b>			
	Mittelwert	S*	Min.	Max.
Score1 (5)	4,8	3,9	0	12
Score2 (11)	18,4	33,4	0	98
Score3 (5)	3,6	4,45	0	12

S\*=standardabweichung

Auch in dieser Gruppe fällt die Reduktion der Probanden von Score 2 und 3 während der Therapiephase auf. Auch die Anzahl an nachweisbaren positiven Abdruckkulturen ist rückläufig. In der Nachbeobachtungsphase steigt die Anzahl der Probanden mit hohem Score an. Es besteht jedoch kein Zusammenhang zu den positiven Kulturergebnissen.

### ***Oxiconazol-Gruppe***

Tabellen 17 ff.: Verhältnis von Schuppenscore (in Klammern Zahl der Probanden) und der Zahl der positiven Zinken – mit *Oxiconazol* behandelte Probanden (n = 19).

Tab. 17a: Visit 2

	<b>Zahl der positiven Zinken in %</b>			
	Mittelwert	S*	Min.	Max.
Score1 <sup>+</sup> (0)	-	-	-	-
Score2 (16)	27,6	33,7	0	100
Score3 (3)	30,7	51,4	0	90

<sup>+</sup> für den Einschluss eines Probanden in die Studie musste mindestens Score 2 vorliegen.

Tab. 17b: Visit 3

	<b>Zahl der positiven Zinken in %</b>			
	Mittelwert	S*	Min.	Max.
Score1 (11)	33,8	35,5	0	100
Score2 (5)	20,8	30	0	78
Score3 (3)	4	2,8	0	6

Tab. 17c: Visit 4

	<b>Zahl der positiven Zinken in %</b>			
	Mittelwert	S*	Min.	Max.
Score1 (10)	41,6	40,2	0	100
Score2 (8)	0,25	0,7	0	2
Score3 (1)	0	-	0	0

Tab. 17d: Visit 5

	<b>Zahl der positiven Zinken in %</b>			
	Mittelwert	S*	Min.	Max.
Score1 (11)	36,5	37,7	0	100
Score2 (4)	2,5	2,6	0	6
Score3 (4)	1,5	2,6	0	6

S\*=standardabweichung

Innerhalb der *Oxiconazol*-Gruppe findet sich eine Reduktion der positiven Bürstenabdrücke von Visit 2 bis Visit 5. Innerhalb der Scoreverteilung zeigt sich eine gleichmäßige Verteilung der Probanden.

### Placebogruppe

Tabellen 18 ff.: Verhältnis von Schuppenscore (in Klammern Zahl der Probanden) und der Zahl der positiven Zinken – mit **Placebo** behandelte Probanden (n = 22).

Tab. 18a: Visit 2

	<b>Zahl der positiven Zinken in %</b>			
	Mittelwert	S*	Min.	Max.
Score1 <sup>+</sup> (0)	-	-	-	-
Score2 (11)	28	16,3	8	64
Score3 (11)	19,8	31,8	0	98

<sup>+</sup> für den Einschluss eines Probanden in die Studie musste mindestens Score 2 vorliegen.

Tab. 18b: Visit 3

	<b>Zahl der positiven Zinken in %</b>			
	Mittelwert	S*	Min.	Max.
Score1 (4)	22,5	24,3	0	58
Score2 (11)	24,5	29,7	0	100
Score3 (7)	15,7	14,7	0	44

Tab. 18c: Visit 4

	<b>Zahl der positiven Zinken in %</b>			
	Mittelwert	S*	Min.	Max.
Score1 (6)	14	13,8	0	40
Score2 (13)	9,7	25,8	0	98
Score3 (3)	4,7	6,6	0	14

Tab. 18d: Visit 5

	<b>Zahl der positiven Zinken in %</b>			
	Mittelwert	S*	Min.	Max.
Score1 (7)	11,7	23,1	0	68
Score2 (10)	28,8	36	0	88
Score3 (5)	18,8	32,8	0	84

S\*=standardabweichung

Erstaunlicherweise findet sich auch in der Placebogruppe eine Reduktion der nachweisbaren positiven Zinken zur Therapiephase. Die Scoreverteilung verlagert sich mehr zu den leichteren Schweregradausprägungen.

Zusammenfassend lässt sich sagen, dass in allen Studienarmen eine Reduktion der positiven Testabdrücke während der Therapiephase (Visit 3 und Visit 4) zu beobachten ist und ein Trend zur Verlagerung in niedrigere Scoreverteilungen stattfindet. Bemerkenswert ist außerdem, dass ein positiver Effekt auch unter der Placebobehandlung nachzuweisen ist.

## **6.5 Differenzierung der *Malassezia*-Spezies**

In Analogie zu den Tabellen 15-18 zeigen die folgenden Ergebnisse die Erfolge der Spezifizierung der *Malassezia*-Kulturen innerhalb der einzelnen Testarme. Die folgenden Tabellen sind somit als Weiterdifferenzierung der Scoreverteilung zu sehen. Unter dem Aspekt der Differenzierung der bei den Probanden isolierten Spezies soll verdeutlicht werden, wie sich die Kulturergebnisse auf die Scoreverteilung verteilen.

Tabelle 19 zeigt eine Übersicht über die Gesamtanzahl aller in dieser Studie isolierten Spezies an den jeweiligen Visiten:

- *Visit 1*                      *-Screening*
- *Visit 2*                        *-Baseline*
- *Visit 3 / 4*                    *-Therapiephase*
- *Visit 5*                        *-Nachuntersuchung*

Tab.19: Bei allen Probanden (n=82) isolierte *Malassezia*-Spezies

Visit / Kultur	<i>M. globosa</i> / % Isolate	<i>M. symp./</i> % Isolate	<i>M. furfur</i> / % Isolate	<i>M. pachy.</i> / % Isolate	Misch+ / % Isolate	Negativ / % Isolate
Visit 1	27 / 21,8	19 / 19,8	3 / 23,1	0 / 0	7 / 58,4	35 / 21,3
Visit 2	42 / 33,9	17 / 17,7	2 / 15,4	0 / 0	1 / 8,3	18 / 11
Visit 3	26 / 21	15 / 15,6	2 / 15,4	0 / 0	3 / 25	32 / 19,5
Visit 4	19 / 15,3	15 / 15,6	4 / 30,7	0 / 0	0 / 0	43 / 26,2
Visit 5	10 / 8	30 / 31,3	2 / 15,4	1 / 100	1 / 8,3	36 / 22
Σ	124	96	13	1	12	164
S*	11,8	6,3	0,9	0,4	2,8	9,2
MW	24,8	19,2	2,6	0,2	2,4	23,8

\* Mischkulturen

Übersicht über die Gesamtanzahl (Σ), die Standardabweichung (S\*) und die Mittelwerte (Mw) der mittels Bürstenabdruck isolierten Kulturen bzw. negativen Kultureregebnisse im Verlauf der Studie (Visit 1-5).

Sämtliche Isolate wurden über die modifizierte Bürstenmethode gewonnen.

*M. globosa* und *M. sympodialis* wurden dabei mit Abstand am häufigsten isoliert. Im Verlauf der Studie nahm die Zahl der *M. globosa* - Isolate ab. Bemerkenswert ist die hohe Anzahl von Probanden mit sichtbarer Kopfschuppung, bei denen keine *Malassezia*-Hefen isoliert werden konnten. Zur Verdeutlichung zeigt Abb. 8 die Summe der Kultureregebnisse bzw. der negativen Kultureregebnisse von Visit 1 bis Visit 5.

Abb. 8

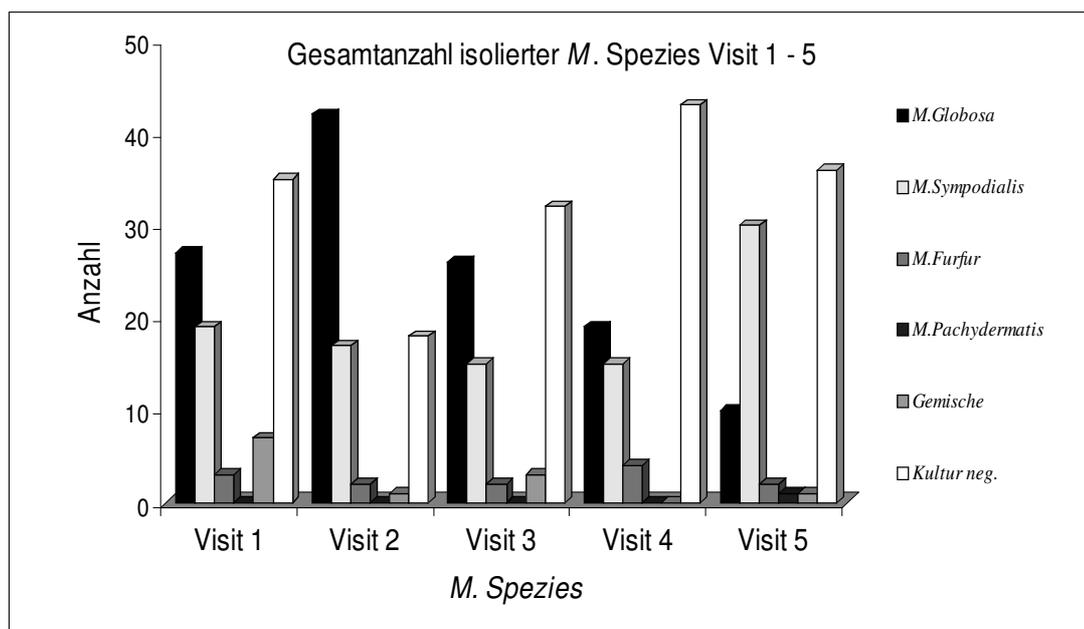


Abb. 8: Gesamtanzahl isolierter *Malassezia*-Spp. von Visit 1 bis Visit 5.

*M. sympodialis* und „negative Kulturergebnisse“ konnten signifikant ( $p \leq 0,01$ , T-Test) häufiger als die *M. Spp: furfur, pachydermatis* sowie den „Mischkulturen“ gefunden werden. Ebenfalls konnte *M. globosa* signifikant häufiger nachgewiesen werden ( $p \leq 0,05$ , T-Test). *M. furfur* wurde nur im Vergleich mit *M. pachydermatis* ( $p \leq 0,01$ , T-Test) signifikant häufiger gefunden. Um einen Einfluss der Testpräparate auf die einzelnen Spezies zu erhalten, wurden die Kulturergebnisse in ihrer Spezifizierung in die einzelnen Testarmen unterteilt.

Die Tabellen 20-24 ff. zeigen zur Verdeutlichung die Anzahl isolierter Kulturen innerhalb der einzelnen Testarme (*Tabelle a*) und der Scoreverteilung (*Tabelle b*). Somit zeigt sich für die mit *Zink-Pyrithion* behandelten Probanden:

Tab. 20a:

Ergebnisse für die isolierten Spezies in der *Zink-Pyrithion*-Gruppe

	<i>M. globosa</i>	<i>M. symp.</i>	<i>M. furfur</i>	<i>M. pachy.</i>	Misch	negativ
Visit 2	8	4	2	0	0	6
Visit 3	5	1	1	0	1**	10
Visit 4	1	3	1	0	0	14
Visit 5	4	6	1	0	0	8
S*	2,9	2,1	0,5	0	0,5	3,4
Mw	4,5	3,5	1,3	0	0,3	9,5

\*\**: M. sympodialis und M. globosa*

*M. globosa, M. sympodialis* und *M. furfur* finden sich innerhalb der *Zink-Pyrithion*-Gruppe signifikant häufiger als *M. pachydermatis* und als „Mischkulturen“ ( $p \leq 0,05$ , T-Test). Die Anzahl der „negativen Kulturergebnisse“ war signifikant höher als die Anzahl der *Malassezia Spp.: furfur, pachydermatis* ( $p \leq 0,01$ , T-Test), *sympodialis* ( $p \leq 0,05$ , T-Test) und der „Mischkulturen“ ( $p \leq 0,01$ , T-Test). Im Vergleich mit *M. globosa* hingegen zeigte sich kein signifikanter Unterschied.

Tab. Nr. 20b

<i>Zink-Pyr.</i>	$\Sigma$	Score1 / % Isolate	Score2 / % Isolate	Score3 / % Isolate
<i>M. globosa</i>	18	4 / 22,2	8 / 44,4	6 / 33,3
<i>M. sympodialis</i>	14	5 / 35,7	6 / 42,9	3 / 21,4
<i>M. furfur</i>	5	2 / 40	2 / 40	1 / 20
<i>M. pachydermatis</i>	0	0 / 0	0 / 0	0 / 0
Kein Kulturergebnis	38	18 / 47,4	15 / 39,5	5 / 13,1
Mischkulturen	1	0 / 0	1 / 100	0 / 0

Hierbei zeigt sich ein vermehrtes Auftreten von *M. globosa* in den Scores 2 und 3, während *M. sympodialis* und *M. furfur* eher bei den Scores 1 und 2 gefunden werden. Beachtenswert ist auch, dass in der *Zink-Pyrithion*-Gruppe die Anzahl der „negativen Kulturergebnisse“, im Gegensatz zum Gesamttrend, eher bei leichter Schweregradausprägung gefunden werden konnten. Auch hier findet sich eine Reduktion von *M. globosa* sowie ein Anstieg der Kultur-negativen Probanden unter Therapie.

Tabelle 21a zeigt die Ergebnisse für die isolierten Spezies in der *Octopirox*<sup>®</sup>-Gruppe

Tab. 21a:

	<i>M. globosa</i>	<i>M. symp.</i>	<i>M. furfur</i>	<i>M pachy.</i>	Misch	Negativ
Visit 2	12	3	0	0	0	4
Visit 3	7	5	0	0	0	8
Visit 4	6	7	0	0	0	8
Visit 5	0	11	0	0	0	10
S*	4,9	3,4	0	0	0	2,51
Mw	6,3	6,5	0	0	0	7,5

Die Anzahl von *M. globosa* geht unter der Therapie mit *Octopirox*<sup>®</sup> gegen Null, während sich *M. sympodialis* dazu reziprok verhält. Einzig die Anzahl an „negativen Kulturergebnissen“ steigt im Verlauf signifikant ( $p \leq 0,01$ , T-Test) gegenüber *M. furfur*, *M. pachydermatis* und den „Mischkulturen“ an. *Octopirox*<sup>®</sup> ist somit wirksam zur Reduktion der Nachweisbarkeit von *M. globosa*.

Tab. 21b zeigt die Unterteilung der *M. Spp.* innerhalb der Scoreverteilung im Testarm *Octopirox*<sup>®</sup>

Tab. 21b

<i>Octopirox</i> <sup>®</sup>	$\Sigma$	Score1/ % Isolate	Score2 / % Isolate	Score3 / % Isolate
<i>M. globosa</i>	25	6 / 24	11 / 44	8 / 32
<i>M. sympodialis</i>	26	10 / 38,5	11 / 42,3	5 / 19,2
<i>M. furfur</i>	0	0 / 0	0 / 0	0 / 0
<i>M. pachydermatis</i>	0	0 / 0	0 / 0	0 / 0
Kein Kulturergebnis	30	10 / 33,3	14 / 46,7	6 / 20
Mischkulturen	0	0 / 0	0 / 0	0 / 0

Innerhalb der *Octopirox*<sup>®</sup>-Gruppe kann beobachtet werden, dass *M. globosa* prozentual häufiger in höheren Scores auftritt und negative Ergebnisse eher bei Score 1 und 2 gefunden werden können. *M. furfur* sowie *M. pachydermatis* konnten nicht nachgewiesen werden. Unter Therapie mit *Octopirox*<sup>®</sup> geht die Nachweisbarkeit der Spezies *M. globosa* gegen Null, während *M. sympodialis* kontinuierlich zunimmt.

Tab. 22a und b zeigen die Ergebnisse für die isolierten Spezies in der *Oxiconazol*-Gruppe

Tab. 22a:

	<i>M. globosa</i>	<i>M. symp.</i>	<i>M. furfur</i>	<i>M pachy.</i>	Misch	Negativ
Visit 2	10	5	0	0	1**	3
Visit 3	8	2	0	0	1***	8
Visit 4	7	0	1	0	0	11
Visit 5	3	6	1	0	0	9
S*	2,9	2,8	0,6	0	0,6	3,4
Mw	7,0	3,3	0,5	0	0,5	7,8

\*\* : *M. furfur* und *M. globosa*; \*\*\* *M sympodialis* und *M. globosa*

*M. globosa* tritt innerhalb der *Oxiconazol*-Gruppe signifikant häufiger als *M. furfur*, *M. pachydermatis* und den „Mischkulturen“ auf ( $p \leq 0,05$ , T-Test). Die Anzahl der gefundenen „negativen Kultureregebnissen“ ist auch hier hoch signifikant gegenüber der Nachweisbarkeit von *M. furfur*, *M. pachydermatis* und den „Mischkulturen“ ( $p \leq 0,01$ , T-Test).

Tabelle 22b dient zur Verdeutlichung innerhalb welchen Scores *Oxiconazol* wirksam ist.

Tab. 22b:

<i>Oxiconazol</i>	$\Sigma$	Score1 / % Isolate	Score2 / % Isolate	Score3 / % Isolate
<i>M. globosa</i>	28	12 / 42,9	14 / 50	2 / 7,1
<i>M. sympodialis</i>	13	5 / 38,5	5 / 38,5	3 / 23
<i>M. furfur</i>	2	1 / 50	1 / 50	0 / 0
<i>M. pachydermatis</i>	0	0 / 0	0 / 0	0 / 0
Kein Kulturergebnis	31	12 / 38,7	13 / 41,9	6 / 19,4
Mischkulturen	2	1 / 50	1 / 50	0 / 0

Gezeigt wird in den Tabellen 22 ff., dass die Anzahl von *M. globosa* innerhalb des Score 3 gering ist, während *M. sympodialis* sowie *M. furfur* gleichmäßig in den Scores 1 und 2 gefunden werden. Negative Kultureregebnisse waren hier eher bei leichteren Scores zu finden.

Auch hier findet sich eine Abnahme der *M. globosa* - Isolate. Ferner ein deutlicher Anstieg der Anzahl von Probanden, bei denen ein negatives Kulturergebnis zu verzeichnen war.

Tabellen 23a und b zeigen die Ergebnisse für die isolierten Spezies in der Placebo-Gruppe.

Tab. 23a:

	<i>M. globosa</i>	<i>M. symp.</i>	<i>M. furfur</i>	<i>M. pachy.</i>	Misch	negativ
Visit 2	12	5	0	0	0	5
Visit 3	6	7	1	0	1**	6
Visit 4	5	5	2	0	0	10
Visit 5	3	7	0	1	1***	9
S*	3,9	1,2	0,9	0,5	0,6	2,4
Mw	6,5	6,0	0,75	0,25	0,5	7,5

\*\* *M. furfur* und *M. sympodialis*; \*\*\* *M. sympodialis* und *M. globosa*

Innerhalb der Placebogruppe ließen sich signifikant häufiger ( $p \leq 0,05$ , T-Test) *M. globosa*, *M. sympodialis* ( $p \leq 0,01$ , T-Test) und die „negativen Kulturergebnisse“ im Vergleich zu *M. furfur*, *M. pachydermatis* und den „Mischkulturen“ nachweisen.

Tabelle 23b zeigt die Wirksamkeit der Basismedikation auf die Schweregradausprägung und zeigt so Hinweise auf einen alleinigen Benefit der Placebomedikation.

Tab. 23b:

Placebo	$\Sigma$	Score1 / % Isolate	Score2 / % Isolate	Score3 / % Isolate
<i>M. globosa</i>	26	3 / 11,5	14 / 53,9	9 / 34,6
<i>M. sympodialis</i>	24	3 / 12,5	15 / 62,5	6 / 25
<i>M. furfur</i>	3	2 / 66,7	1 / 33,3	0 / 0
<i>M. pachydermatis</i>	1	1 / 100	0 / 0	0 / 0
Kein Kulturergebnis	30	7 / 23,3	11 / 36,7	12 / 40
Mischkulturen	2	1 / 50	1 / 50	0 / 0

Innerhalb des Testarmes „Placebo“ kann gezeigt werden, dass *M. globosa* eher bei höherem Score isoliert werden kann, *M. furfur* eher bei Score 1 und 2 vorkommt und die Anzahl der negativen Kulturergebnisse gleichmäßig mit der Tendenz zu höheren Scores ansteigt. Bemerkenswerterweise findet sich auch hier eine Reduktion der *M. globosa* - Isolate sowie eine Zunahme der Kultur-negativen Probanden.

Tabelle 24 zeigt den Zusammenhang zwischen Score und isolierter Spezies für alle Isolate ab Baseline / Visit 2

Tab. 24

Kultur	Σ	Score1/ % Isolate	Score2 / % Isolate	Score3 / % Isolate
<i>M. globosa</i>	97	25 / 26	47 / 48	25 / 26
<i>M. sympodialis</i>	77	23 / 30	37 / 48	17 / 22
<i>M. furfur</i>	10	5 / 50	4 / 40	1 / 10
<i>M. pachydermatis</i>	1	1 / 100	0 / 0	0 / 0
Kein Kulturergebnis	129	47 / 36	53 / 41	29 / 23
Mischkulturen	5	2 / 40	3 / 60	0 / 0

*M. globosa* scheint tendenziell bei schwereren Schuppenscores verstärkt aufzutreten. Es findet sich eine Reduktion dieser Spezies in allen Gruppen im Verlauf der Studie, ohne jedoch zwischen den einzelnen Armen zu differieren. *M. furfur* als vermutlicher Erreger der Pityriasis versicolor ließ sich deutlich seltener isolieren. *M. pachydermatis* als vornehmlich bei Tieren auftretende Spezies konnte nur in einem Fall nachgewiesen werden.

Zusammenfassung der Score und Kulturergebnisse:

Es lässt sich beobachten, dass eine Korrelation zwischen der Zahl der positiven Zinken und dem Schuppenscore:

- **stark (Score 3):** der Karton war dicht mit Schuppen bedeckt
- **mittel (Score 2):** es waren deutlich Schuppen auf dem Karton wahrnehmbar
- **schwach oder keine (Score 1):** es waren nur vereinzelt oder keine Schuppen erkennbar

sich weder für den Ausgangswert noch unter Therapie ergibt.

Die Werte (Tabellen 20 bis 24) zeigen zudem sehr starke Schwankungen, was an der jeweils angegebenen Standardabweichung deutlich wird. Eine positive Korrelation zwischen Schwere der Schuppenerkrankung und Besiedlung der Kopfhaut mit *Malassezia*-Hefen lässt sich somit mittels der verwendeten Methode der Bürstinokulation nicht ableiten.

## 5.7 Pigmentbildung

Neben der Spezifizierung nach Score und Visit wurden die *M. Spp.* noch bezüglich einer möglichen Pigmentbildung getestet. Es wurden 17 *Malassezia Spp.* gefunden, die hinsichtlich des Merkmales der Pigmentbildung eine positive Testreaktion zeigten (Abb. 9).

Die Unterteilung der pro Visit gefundenen pigmentpositiven *M. Spp.*:

Abb. 9

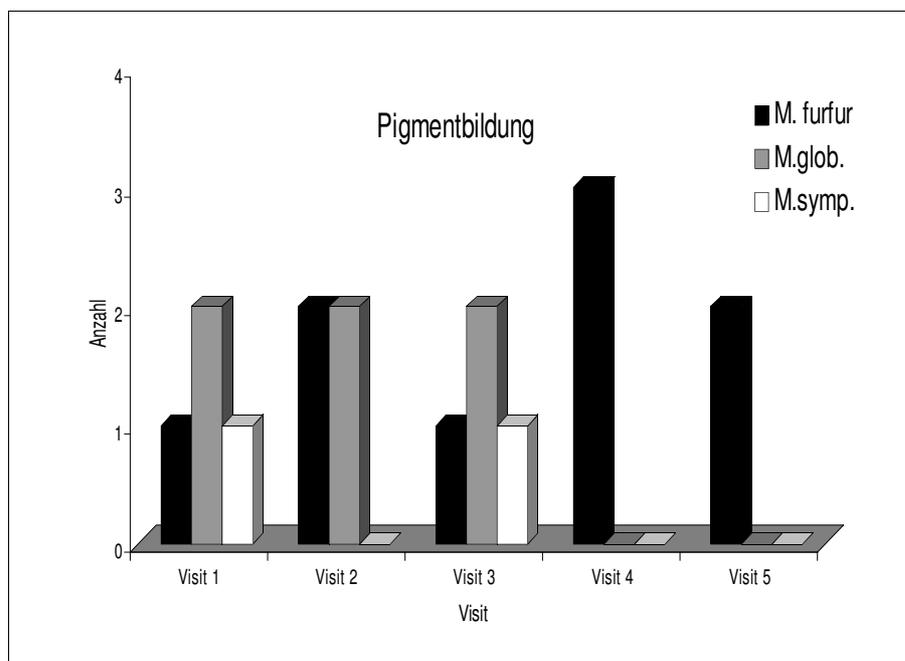


Abb. 9: Anzahl der pigmentpositiven *M. Spp.*

Hierbei zeigt sich, dass die Gesamtanzahl der gefundenen pigmentpositiven *M. Spp.* von Visit 1 bis Visit 5 weitgehend konstant bleibt. Ab Visit 4 zeigten sich jedoch nur noch pigmentpositive *M. furfur*, die dabei signifikant ( $p \geq 0,05$ , T-Test) häufiger gefunden wurden als *M. symp.*, jedoch nicht signifikant häufiger als *M. globosa*. Auch unterschied sich das Vorkommen von *M. glob.* und *M. symp.* nicht signifikant voneinander.

Jedoch können Verunreinigungen einzelner *M. Spp.* untereinander nicht ausgeschlossen werden.

Um eventuelle Einflüsse der Wirkstoff-/Placebogruppen auf die Pigmentbildung zu verdeutlichen wurden die pigmentpositiven Probanden nach Visit und Gruppenzugehörigkeit aufgesplittet (Abbildung 10).

Abb. 10

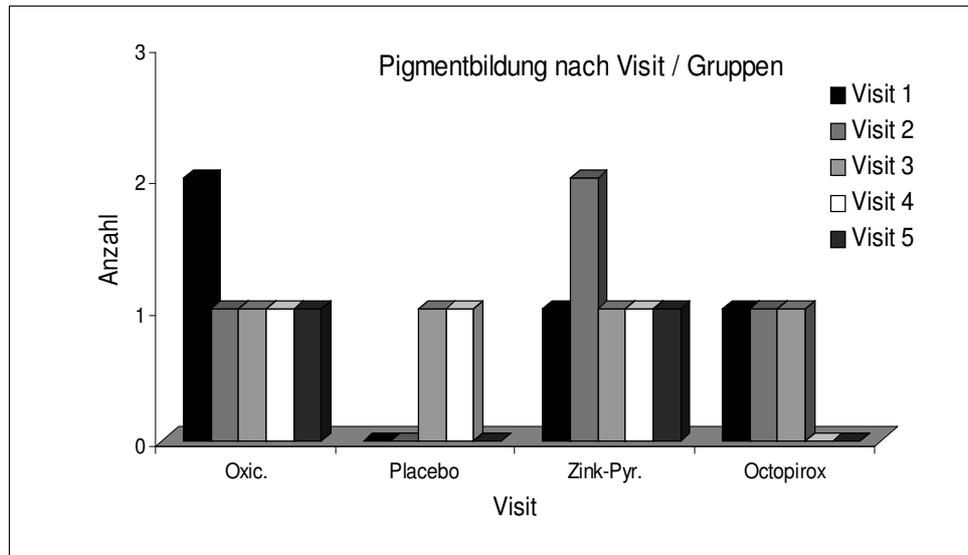


Abb. 10: Pigmentbildung nach Medikationsgruppe.

Erstaunlich ist hierbei, dass in der Placebogruppe die wenigsten pigmentpositiven *M. Spp.* gefunden werden, während, bis auf die Probanden in der *Octopirox*<sup>®</sup>-Gruppe, sich in den anderen Gruppen bei jeder Visite mindestens ein pigment-positiver *M. Spp.* isolieren ließ. Hierbei fand sich ein signifikant ( $p \leq 0.05$ , T-Test) häufigeres Auftreten der Pigmentbildung innerhalb der *Zink-Pyrithion*- und der *Oxiconazol*-Gruppe gegenüber Placebo und ein tendenziell höheres Auftreten im Vergleich zur *Octopirox*<sup>®</sup>-Gruppe.

Des Weiteren wurden noch die pigment-positiven *M. Spp.* der Probanden in ihre Zugehörigkeit zur Wirkstoff/Placebogruppe aufgesplittet (Abb. 11).

Abb. 11

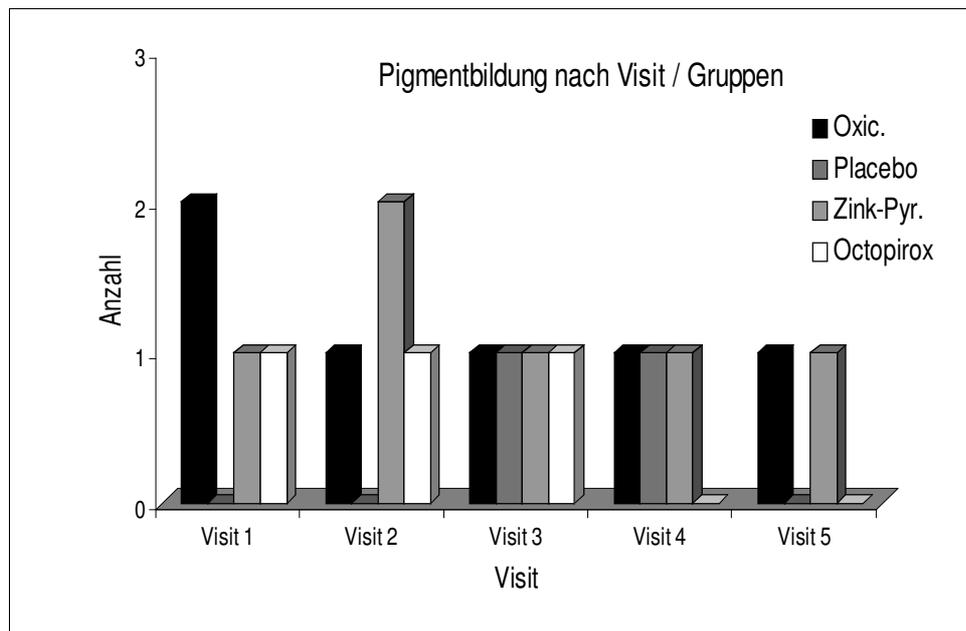


Abb. 11 zeigt die Pigmentbildung nach Gruppen unterteilt.

Es zeigt sich, dass pigmentpositive *M. globosa* konstant von Visit 1 bis Visit 5 nachzuweisen waren. *M. furfur* konnte nicht in der *Oxiconazol*-Gruppe gefunden werden, jedoch in der *Zink-Pyrithion*-Gruppe dominierte. *M. sympodialis* dagegen nur in der *Oxiconazol*-Gruppe nachzuweisen war. Hierbei muss jedoch zur Diskussion gestellt werden, ob die verwendete Methode sensitiv genug zur Identifizierung pigmentpositiver *Malassezia*-Hefen ist, da bisher davon ausgegangen werden muss, dass sich dieses Phänomen nur bei *M. furfur* finden lässt.

### 5.8 *Cremophor-EL*<sup>®</sup>-Assimilation

Um mögliche Zusammenhänge zwischen der Pigmentbildung und der Assimilation von *Cremophor EL*<sup>®</sup> zu zeigen wurden die Pigmentpositiven *M. Spp.* nochmalig spezifiziert: Die Anzahl der pigment positiven *M. Spp.*, die gleichzeitig auch *Cremophor EL* assimilierten, war jedoch sehr gering (n= 5) und wurden daher nicht weiter ausgewertet.

## 5.9 Effizienz der Testpräparate

Basierend auf den zuvor dargestellten Ergebnissen wird zusammenfassend die Effizienz der Prüfmedikationen bzw. der Placebobehandlung dargestellt

## 5.10 Schweregradausprägung

Die Veränderung des Schweregrades der Schuppenerkrankung zeigt Abbildung 12 in den einzelnen Behandlungsarmen zwischen Beginn (Visit 2) und Ende der Behandlungsphase (Visit 4).

Abb. 12

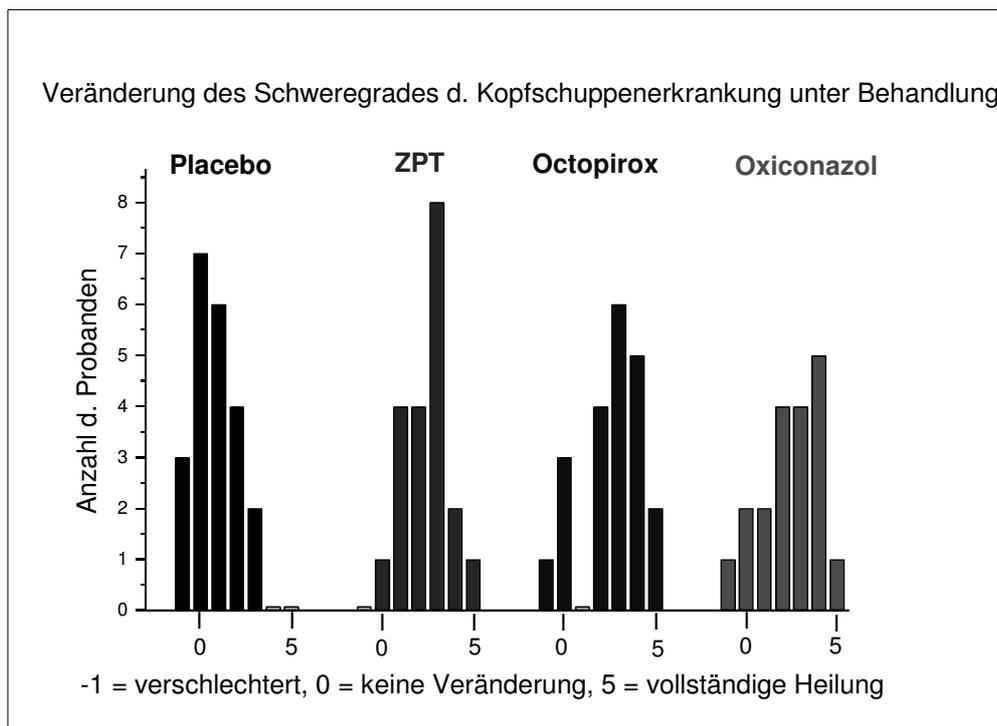


Abb. 12: Schwere der Kopfschuppenerkrankung gemäß Schweregradeinteilung:  
(-1 = verschlechtert, 0 = keine Veränderung, [...], 5 = vollständige Heilung)

Die Einteilung entspricht der Skalierung, die am Visit 4 (Ende der aktiven Behandlung) abgefragt wurde: (-1 = Verschlechterung; 0 = keine Besserung, 1 = schwach gebessert, 2 = mäßig gebessert, 3 = deutlich gebessert, 4 = nahezu komplett gebessert, 5 = vollständige Besserung). Vollständige Heilung wurde mit *Octopirox*<sup>®</sup> in 2 Fällen, mit *Zink-Pyrithion* und *Oxiconazol* in jeweils 1 Fall und mit Placebo in keinem Fall erreicht.

Die Beurteilung der Effizienz in den einzelnen Behandlungsgruppen gemäß der Einteilung

- **-1** = **Verschlechterung**
- **0** = **keine Heilung**
- **1** = **schwach gebessert**
- **2** = **mäßig gebessert**
- **3** = **deutlich gebessert**
- **4** = **nahezu komplett geheilt**
- **5** = **vollständige Heilung**

ist nochmals in Tabelle 25 zusammengefasst.

Tab. 25: Beurteilung der Effizienz in den einzelnen Behandlungsgruppen zum Ende der aktiven Behandlungsphase:

Studienarm	Score							∑: n
	-1	0	1	2	3	4	5	
Placebo (n=22)	3	7	6	4	2	0	0	0,77
<i>Octopirox</i> <sup>®</sup> (n=21)	1	3	0	4	6	5	2	2,57
<i>Zink-Pyrithion</i> (n=20)	0	1	4	4	8	2	1	2,6
<i>Oxiconazol</i> (n=19)	1	2	2	4	4	5	1	2,42

Es findet sich in der Placebo-Gruppe die geringste Tendenz zur Verbesserung. Bemerkenswerterweise findet sich in der Placebo-Gruppe auch die geringste Haarlänge (Tab.13) Die Summe der erreichten Score-Punkte geteilt durch die Zahl der Probanden erreicht in dieser Gruppe den geringsten Wert, während die Werte für die drei Therapiegruppen nahezu gleichauf liegen. Dies wird auch in der folgenden Abbildung (Abb. 13) bestätigt.

Abb. 13

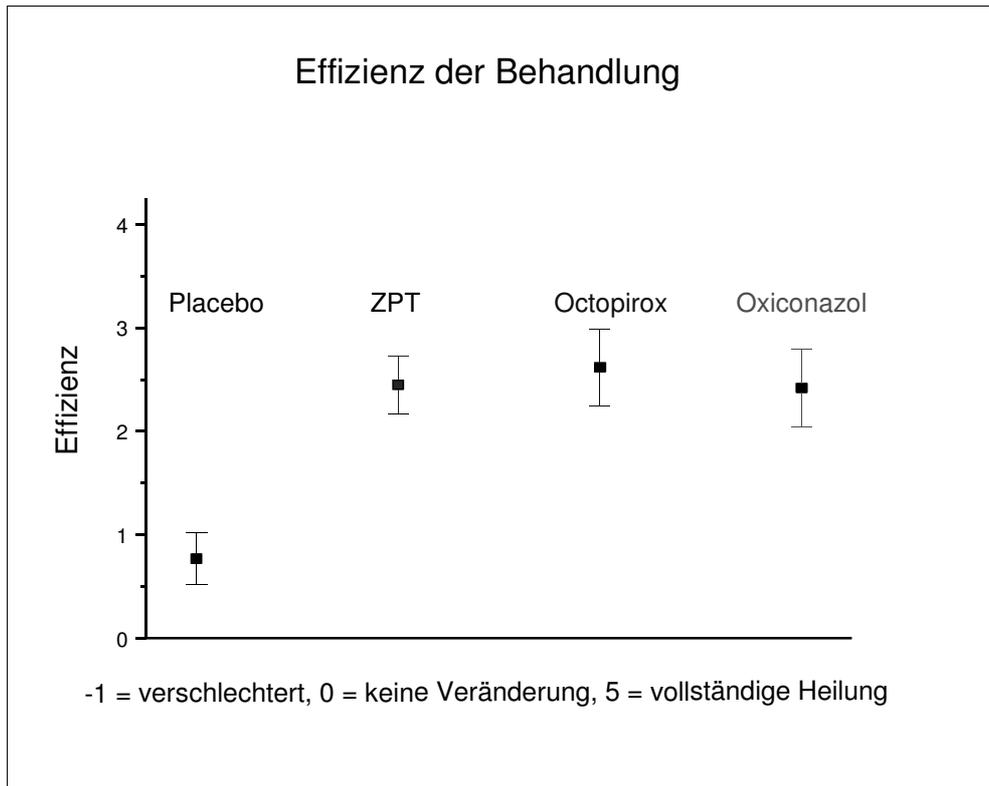


Abb. 13: Effizienz für die einzelnen Behandlungsarme als Mittelwert mit Standardfehler.

Die Effizienz der drei aktiven Behandlungsarme ist signifikant besser als die Effizienz des Placebos ( $p \leq 0,01$ , T-Test), ohne jedoch untereinander signifikant zu differieren.

### 5.11 Schuppenmenge

Der Verlauf der Schuppenmenge (Score 1-3: [1 = schwach, 2 = mittel, 3 = stark]) wird in der Abbildung 14 für Visit 1 bis Visit 5 dargestellt.

Abb. 14

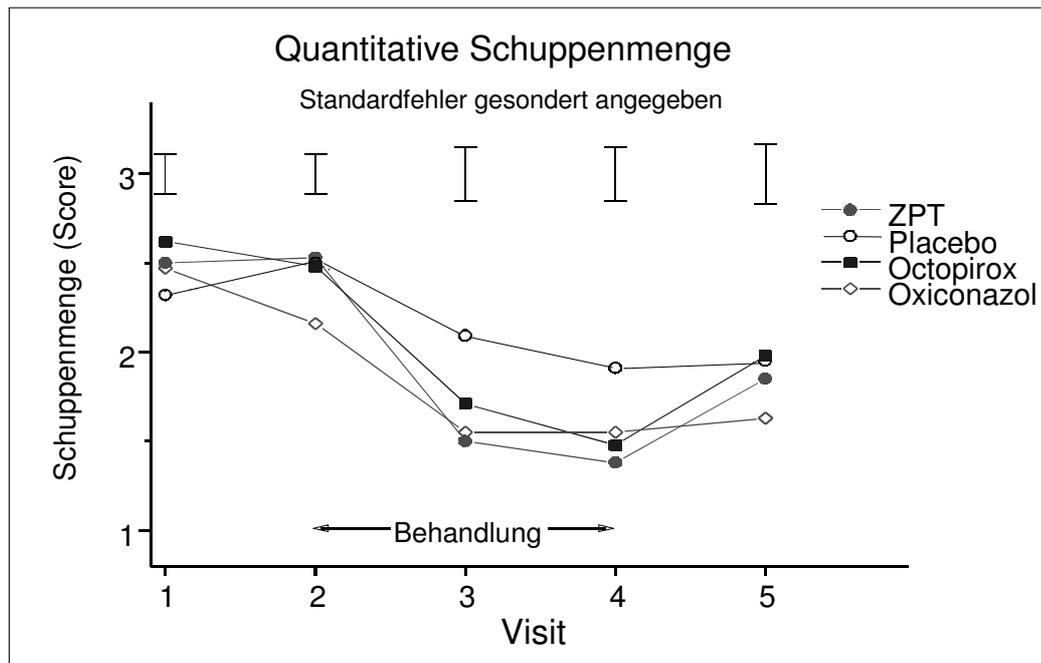


Abb. 14: Verlauf der Schuppenmenge von Visit 1 bis Visit 5.

Es findet sich eine nahezu gleichförmige Besserung in den Behandlungsgruppen um etwa einen Scorepunkt, aber nur eine leichte Besserung in der Placebogruppe um etwa 0,5 Scorepunkte. Es wird auch deutlich, dass mit Ausnahme der *Oxiconazol*-Gruppe, die Ausgangswerte für die Schuppenmenge am Visit 2 vergleichbar waren. Damit wird ein deutlicher Rebound nach Absetzen der Medikation gezeigt.

Abbildung 15 zeigt die Veränderungen des Scores für die Schuppenmenge an den einzelnen Visiten relativ zur Baseline (Visit 2). Es finden sich deutliche Effekte in der Therapiephase für die einzelnen Therapiegruppen, weniger jedoch für Placebo. Die Veränderungen sind am stärksten ausgeprägt für *Zink-Pyrithion*, gefolgt von *Octopirox*<sup>®</sup> und letztlich von *Oxiconazol*, welches sich jedoch nur gering von Placebo unterscheidet. Bemerkenswert ist, dass zum Ende der Nachtherapiephase (Visit 5) die Schuppenmenge wieder zunimmt und sich in allen Behandlungsarmen synchronisiert.

Abb. 15

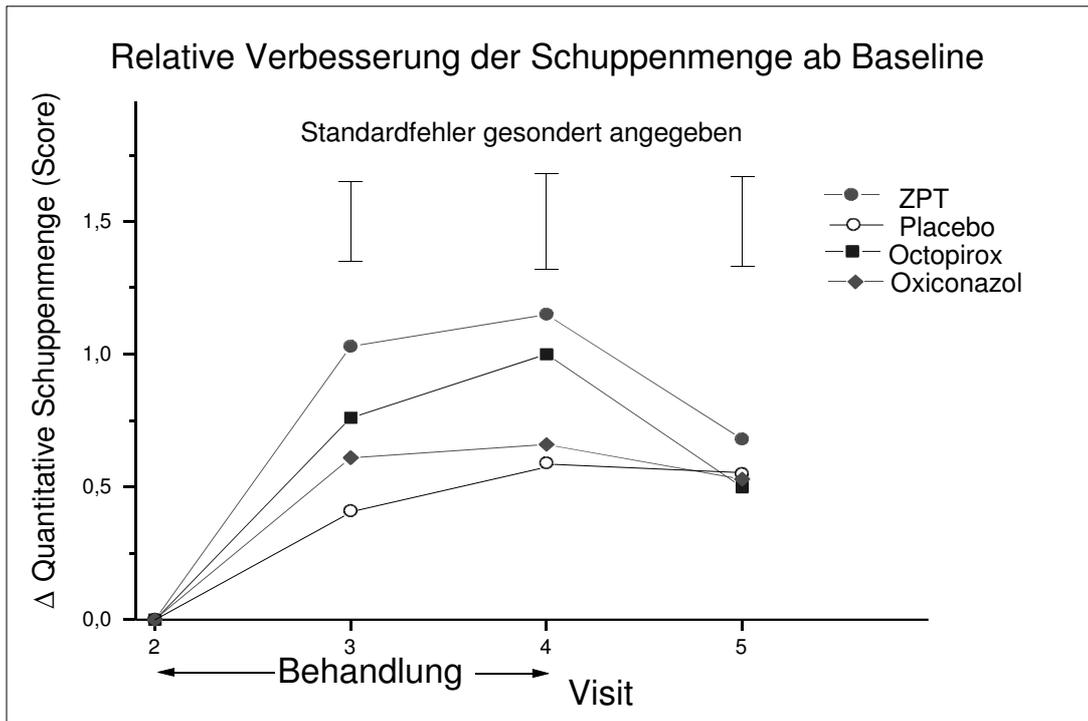


Abb. 15: Schuppenmenge ab Baseline, der Standardfehler ist gesondert angegeben.

Es ist immer noch eine Besserung im Vergleich zum Visit 2 festzustellen, diese ist aber nun für alle Gruppen gleich. Somit konnte ein deutlicher Einfluss der aktiven Behandlung auf die Schuppenmenge festgestellt werden, ohne dass jedoch signifikante Unterschiede zwischen den aktiven Behandlungsgruppen nachweisbar waren. Es besteht jedoch ein statistisch signifikanter Unterschied zur Placebo-Behandlung.

## 5.12 Schuppengröße

Des Weiteren zeigt sich bezüglich der Effizienz und des Parameters Schuppengröße, dass unter Placebobehandlung ein Trend zu größeren Schuppen besteht (Abb. 16), während dieser Effekt unter den aktiven Behandlungsformen nicht auftritt. Hier lassen sich nur geringe Veränderungen hinsichtlich des Anteils von Schuppen mit einer Größe von mehr als 2 mm nachweisen. Den günstigsten Effekt auf die Schuppengröße weist *Octopirox*<sup>®</sup> auf. Angaben über die Veränderung der Schuppengröße zeigen die Abbildungen 16 und 17. Sie wurden klassifiziert in  $\geq 2\text{ mm}$  und  $\leq 2\text{ mm}$ , wobei das Verhältnis der beiden Schuppengrößen unter den ausgeschüttelten Schuppen in Prozent angegeben wurde (Gesamt immer = 100 %).

Abb. 16

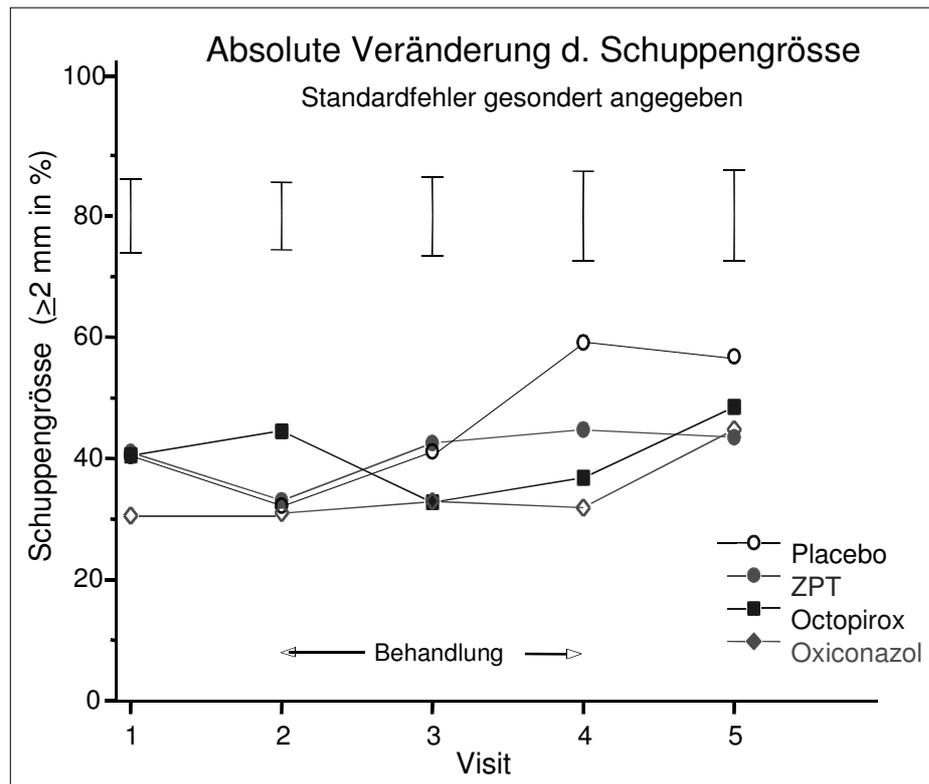


Abb. 16: Veränderung der Schuppengröße ab Visit 1. Angegeben ist der Anteil an Schuppen von einer Größe  $\geq$  als 2 mm (in %).

Abb. 17

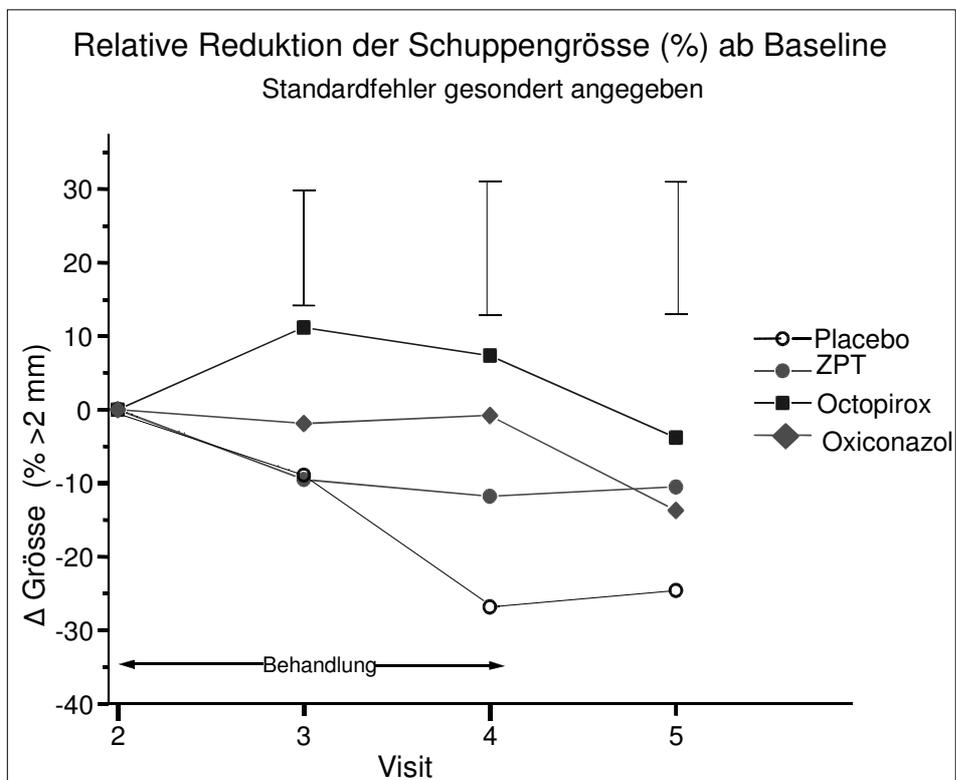


Abb. 17: Reduktion der Menge an Schuppen größer 2 mm (in %) ab Baseline (Visit 2).

### 5.13 Itching Score

Für den subjektiven Parameter Juckreiz findet sich unter der Therapie eine Abnahme in allen 4 Studienarmen (Abbildung 18).

Die Skalierung umfasste folgende Einteilung:

- **+++** (= 3) **sehr stark;**
- **++** (= 2) **mittel stark;**
- **+** (= 1) **schwach;**
- **0** **keine Symptome.**

Abb. 18

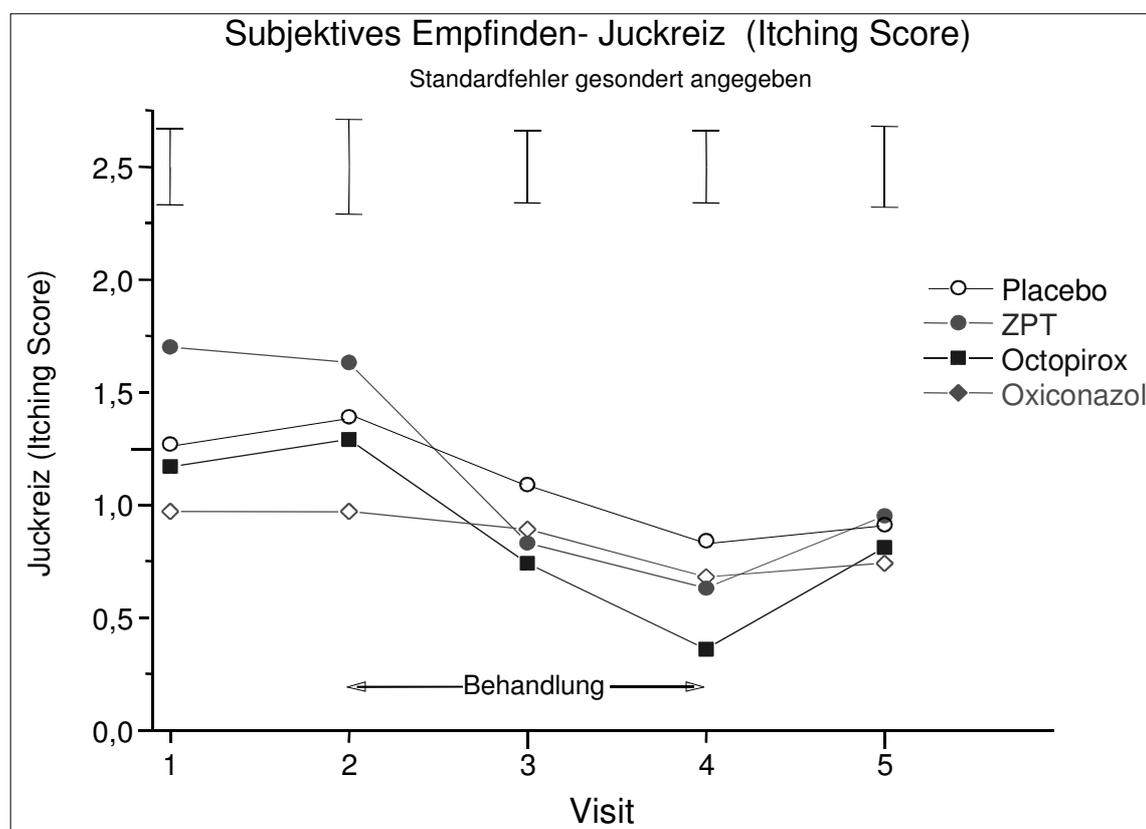


Abb. 18: Ergebnisse für den sekundären Parameter „Juckreiz“ (Itching Score). Gezeigt sind Mittelwerte und Standardfehler.

Die Abnahme ist am stärksten ausgeprägt bei der Anwendung von *Octopirox*<sup>®</sup>, ohne sich jedoch im Vergleich mit den anderen Studienarmen signifikant zu unterscheiden. In der *Zink-Pyrithion*- sowie in der *Octopirox*<sup>®</sup>-Gruppe findet sich ein Anstieg des Parameters Juckreiz in der Nachbeobachtungsphase. Der Parameter Entzündung wurde nicht ausgewertet, da zu wenig Probanden diesen Parameter aufwiesen.

## 5.14 Effizienz und Schweregradausprägung

Der Zusammenhang zwischen Effizienz der Behandlung und Schweregrad der Kopfschuppenerkrankung ist in Abb. 19 dargestellt. Die Einteilung der Effizienz erfolgt gemäß der Skalierung, die am Visit 4 abgefragt wurde (siehe Abb. 12), die der Schweregradausprägung gemäß Tabelle 29. Der Korellationskoeffizient ist unten (Tabelle 26) gesondert angegeben.

Abb. 19

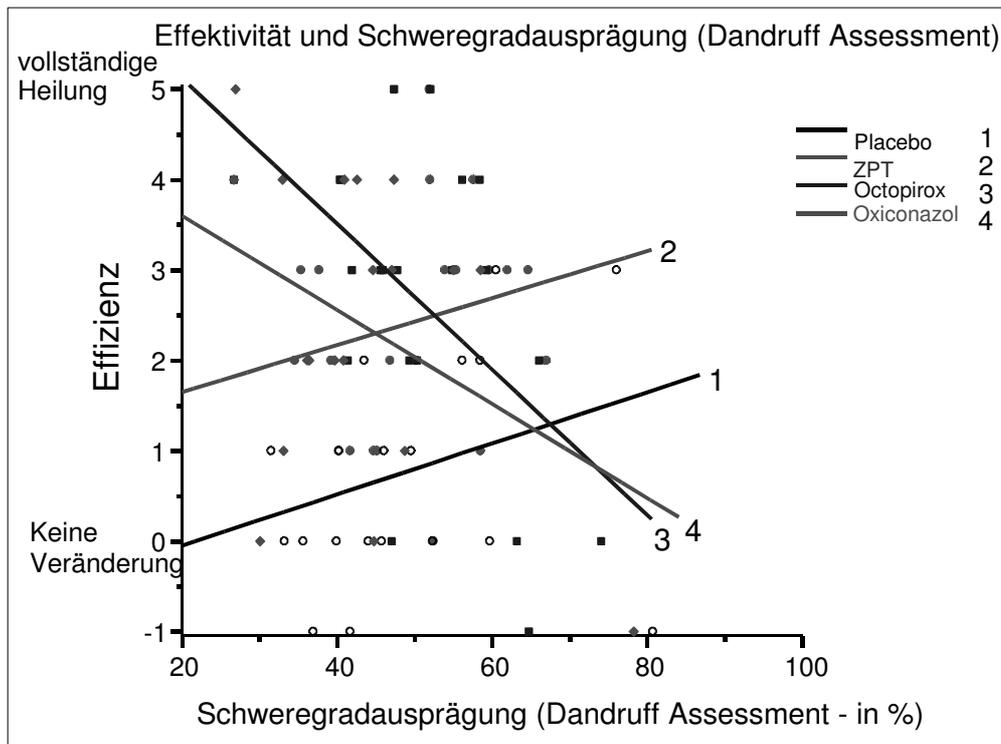


Abb. 19: Effektivität der Testpräparate

Tabelle 26 zeigt den Korellationskoeffizient zur Abb. 19

Gruppe	$r^2$	p	signifikant
Placebo	0,091	0,19	nein
ZPT	0,042	0,38	nein
Octopirox®	0,27	0,016	ja
Oxiconazol	0,15	0,10	nein

Es zeigt sich, dass *Octopirox*® in leichten Fällen besonders effektiv ist, in schweren Fällen jedoch weniger effektiv wirkt. Hierfür lässt sich ein signifikanter Korrelationskoeffizient nachweisen. Signifikante Unterschiede zwischen den aktiven Behandlungsarmen ließen sich jedoch nicht zeigen, jedoch bestand ein signifikanter Unterschied zur Placebobehandlung. Zusammenfassend konnten die Zielparmeter Schuppenmenge und Schuppengröße durch die Wirkstoffbehandlung günstiger beeinflusst werden als durch Placebobehandlung.

## 5.15 Kulturergebnisse

Die Abbildung 20, 21 und 22 geben die Ergebnisse der quantitativen Auswertung wieder.

Abb. 20 zeigt die relative Anzahl der Bürstenspitzen in Prozent, die ein positives Kulturergebnis erbrachten.

Abb. 20

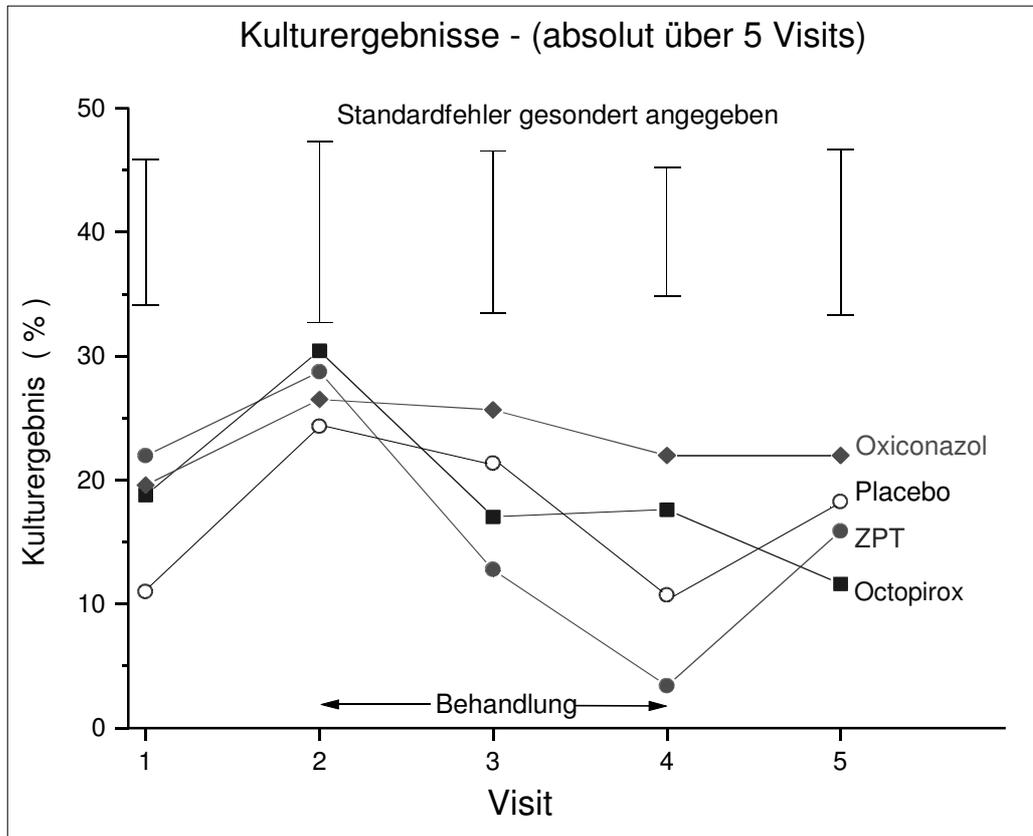


Abb. 20: quantitative Kulturergebnisse von Visit 1 - Visit 5.

Bemerkenswert ist ein Anstieg in allen 4 Behandlungsarmen in der Auswaschphase (2 Wochen Grundlagen-Behandlung zwischen Visit 1 und Visit 2) mit einer weitgehenden Synchronisation der ursprünglich differierenden Screening-Werte (Abbildung 20). Die zweiwöchige Auswaschphase hat sich somit als sinnvoll erwiesen. Unter Therapie findet sich ein Abfall des Kulturergebnisses besonders in der mit *Zink-Pyrithion* behandelten, aber auch in der Placebo-Gruppe.

Nach Beendigung der Therapiephase steigen die Werte in der *Zink-Pyrithion*-Gruppe wieder an. Signifikante Unterschiede lassen sich jedoch nicht ableiten. Dies wird unter Berücksichtigung der Standardabweichungen deutlich (Abb. 20). In Abbildung 21 ist die Differenz (Baseline-Kulturergebnis zum jeweiligen Visit), in Abbildung 22 die mittlere Abnahme der Kulturergebnisses für Visit 1 bis Visit 5.

Abb. 21

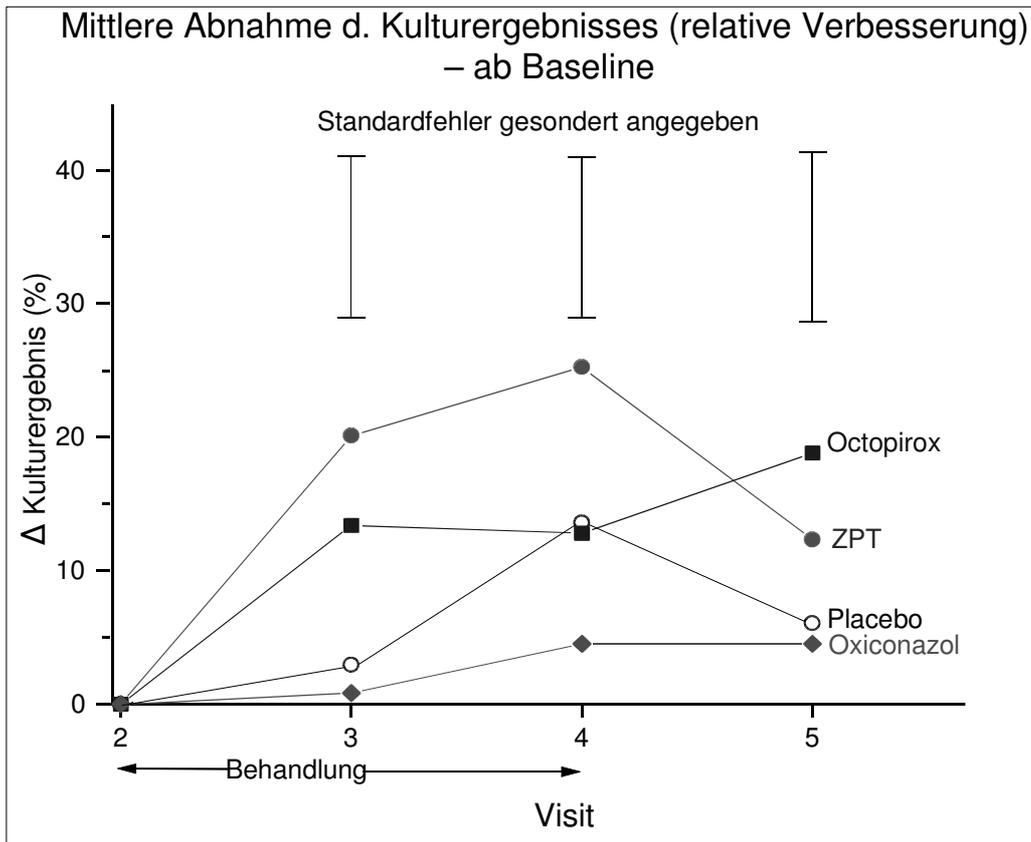


Abb. 21: Differenz der Kulturegebnisse (relative Verbesserung) ab Baseline (Visit 2).

Abb. 22

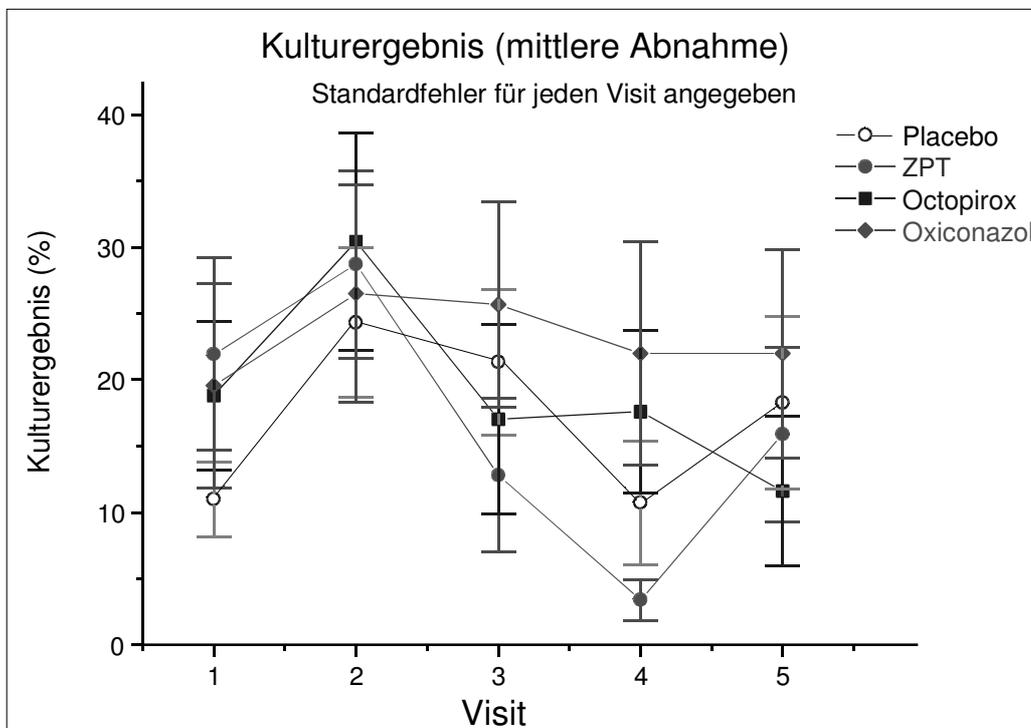


Abb. 22: mittlere Abnahme der quantitativen Kulturegebnisse

Der fehlende positive Nachweis von *Malassezia*-Hefen ist am Ende der Therapiephase (Visit 4) am höchsten für *Zink-Pyrithion*, gefolgt von *Octopirox*<sup>®</sup> und Placebo und zuletzt von *Oxiconazol*. Werden Visit 3 und Visit 4 zusammen betrachtet, so ist nur *Zink-Pyrithion* signifikant besser wirksam als Placebo ( $p \leq 0,02$ ; T-Test). Unter alleiniger Betrachtung von Visit 4, ist *Zink-Pyrithion* nur tendenziell besser wirksam ( $p \leq 0,1$ , T-Test). In der *Octopirox*<sup>®</sup>-Gruppe nimmt das Kulturergebnis auch nach Absetzen der aktiven Phase weiter ab, was auf mögliche Langzeiteffekte verweisen könnte.

## 5.16 Verträglichkeit der Testpräparate

Die Anwendung von Shampoo-Base und Prüfmedikation erwies sich als sicher, unerwünschte Ereignisse wurden nicht beobachtet. Keiner der Probanden musste aufgrund unerwünschter Ereignisse von der Studie ausgeschlossen werden. Die Tabellen 27-28 zeigen den Zusammenhang von Effizienz und Verträglichkeit (subjektiven Einschätzung von Proband und Beobachter) am Visit 4, am Ende der aktiven Behandlungsphase.

Tab. 27: Zusammenhang zw. Effizienz und Verträglichkeit

Studienarm	Bewertung: Effizienz	Bewertung: Verträglichkeit <i>Investigator</i>	Bewertung: Verträglichkeit <i>Proband</i>
<i>Oxiconazol</i>	2,42	2,31	2,31
<i>Octopirox</i> <sup>®</sup>	2,57	2,19	2,09
<i>Zink-Pyr.</i>	2,6	2,1	1,95
Placebo	0,77	2,54	2,4

Die Bewertung folgte folgenden Kriterien:

**Effizienz:**

- -1 = Verschlechterung
- 0 = keine Heilung,
- 1 = schwach gebessert
- 2 = mäßig gebessert
- 3 = deutlich gebessert
- 4 = nahezu komplett geheilt
- 5 = vollständige Heilung

**Verträglichkeit:**

- 1 = sehr gut
- 2 = gut
- 3 = mäßig
- 4 = schlecht
- 5 = sehr schlecht

Für die einzelnen Behandlungsarmen wird dies in den Tab. 28 ff. noch einmal dargestellt:

Tab. 28a: Bewertung: Effizienz und Verträglichkeit – *Oxiconazol*

	Effizienz	Verträglichkeit Investigator	Verträglichkeit Proband
Mittelwert	2,4	2,3	2,3
S*	1,6	0,5	1,1

Tab. 28b: Bewertung: Effizienz und Verträglichkeit - *Octopirox*<sup>®</sup>

	Effizienz	Verträglichkeit Investigator	Verträglichkeit Proband
Mittelwert	2,6	2,2	2, 1
S*	1,7	0,7	0,8

Tab. 28c: Bewertung: Effizienz und Verträglichkeit - *Zink-Pyrithion*

	Effizienz	Verträglichkeit Investigator	Verträglichkeit Proband
Mittelwert	2,6	2,1	1,95
S*	1,6	0,3	0,7

Tab. 28d: Bewertung of Effizienz und Verträglichkeit – Placebo

	Effizienz	Verträglichkeit Investigator	Verträglichkeit Proband
Mittelwert	0,8	2,5	2,4
S*	1,2	0,5	0,8

S\*= Standardabweichung

In Abb. 23 ist dies noch einmal graphisch dargestellt:

Abb. 23

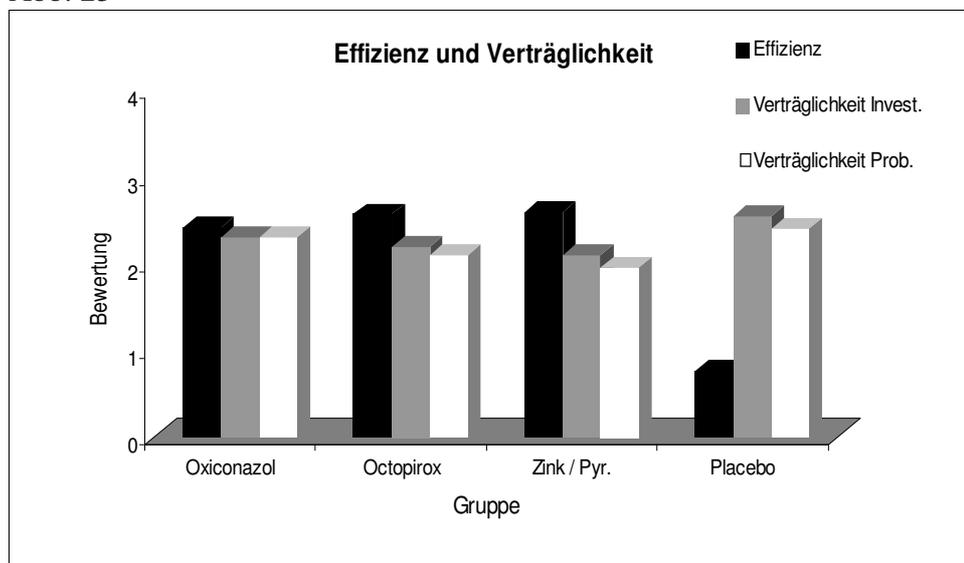


Abb. 23: subjektive Einschätzung der Verträglichkeit und Effizienz der Medikation innerhalb der einzelnen Studienarme.

Es wird deutlich, dass sich die Bewertung der Verträglichkeit des Placebos gegenüber den Behandlungsarmen nicht signifikant unterscheidet, jedoch die Effizienz deutlich reduziert ist.

### 5.17 Gesamtscore

Alle gemessenen Parameter wurden noch in einen Gesamtscore eingegeben (Abb. 24). Hierzu wurden die Kriterien in eine 0-100 % Skala umgesetzt und entsprechend Tabelle 29 gewichtet. Gemäß der Eingangsuntersuchung wurden Score und Schuppengröße höher gewichtet.

Tab. 29

	Gesamtscore (Dandruff Assessment): 0 = kein Ergebnis, 100 = max.					
	Score	Grösse(% >2)	Kulturen	Juckreiz	Abschuppung	Inflammation
Gewichtung %	40	20	10	10	10	10
Original Einteilung	0 – 3	0 - 100	0 - 100	0 - 3	0 - 3	0 - 3

Abbildung 24 zeigt die Veränderung des Schuppengesamtscore (Dandruff-Assessment)

Abb. 24

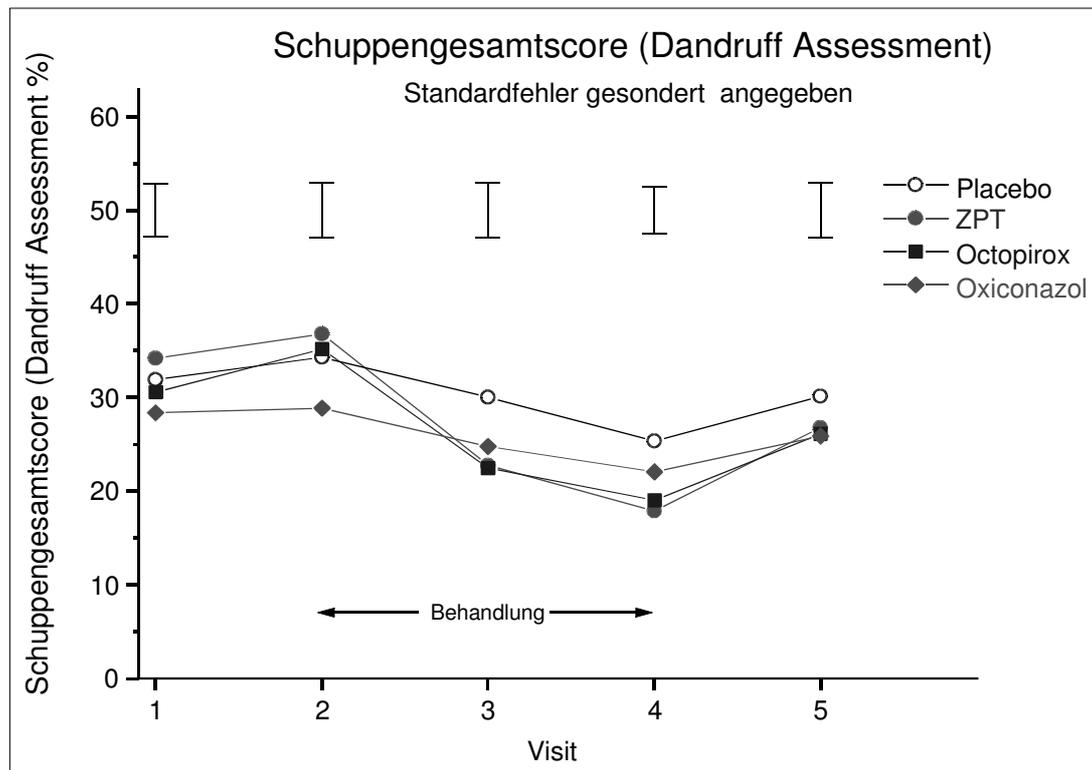


Abb. 24: Ergebnis der unterschiedlichen Gewichtung des Schuppengesamtscore.

Am günstigsten schneiden *Zink-Pyrithion* und *Octopirox*<sup>®</sup> ab, ohne dass die Veränderungen Signifikanz erreichen.

Abbildung 25 zeigt die Veränderung des Dandruff-Assessment relativ zum Wert bei Baseline (Visit 2), der gleich 0 gesetzt wurde.

Abb. 25

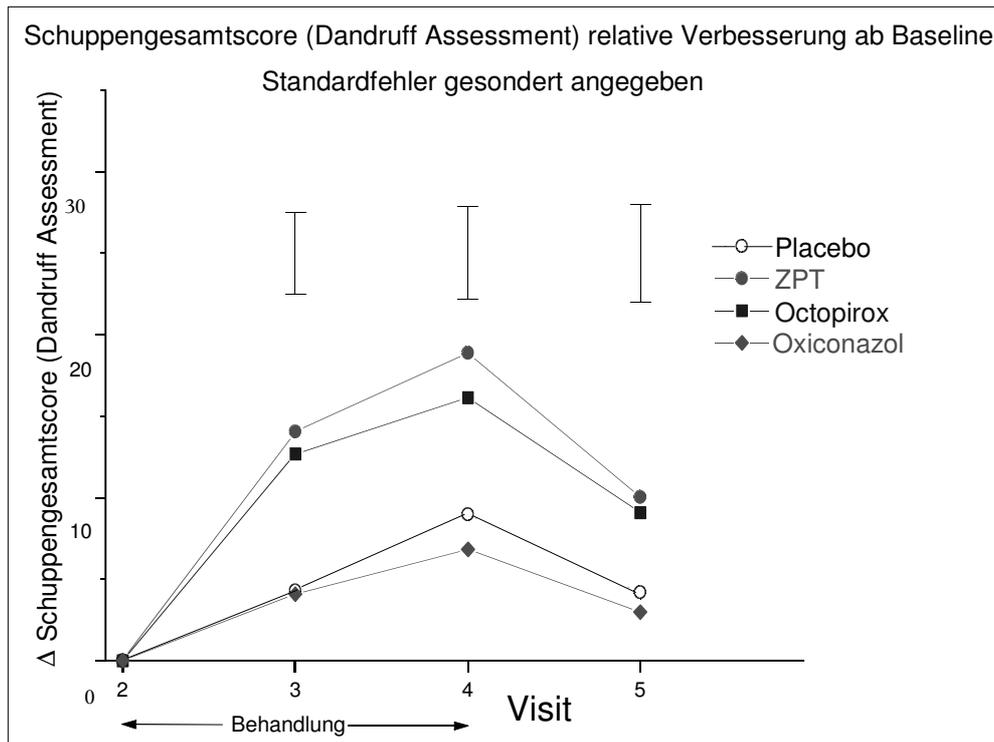


Abb. 25: Differenz des Gesamtscores ab Baseline (Visit 2)

Hier zeigt sich eine vergleichbare Wirksamkeit von *Octopirox*<sup>®</sup> und *Zink-Pyrithion*, während *Oxiconazol* deutlich schlechter und sogar schlechter als Placebo abschneidet. In allen Gruppen kommt es jedoch zu einer Verringerung des Effektes in der Nachbeobachtungsphase.

## 6. Diskussion und Schlussfolgerung

Die obligat lipophilen Hefen der Gattung *Malassezia* sind seit über 150 Jahren als Bestandteile der Mikroflora sowohl der menschlichen Haut als auch vieler Warmblüter bekannt. Neben ihrer Bedeutung als Saprophyt spielen *Malassezia* Spezies als Krankheitserreger der Pityriasis versicolor, des seborrhoischen Ekzems und seiner Minimalvariante, der Kopfschuppen, (*Pityriasis simplex capillitii*), eine Rolle (Hay et al., 1992, Shuster, 1984). Die Hefen der Gattung *Malassezia* scheinen bezüglich der Pathologie und Behandlung der eine entscheidende, wenn auch nicht die alleinige Rolle zu spielen. Die Beziehung zwischen *Malassezia* und Kopfschuppen wurde ex iuvantibus durch eine Reihe von Behandlungsstudien hergestellt, die zeigen konnten, dass Antimykotika eine klinische Besserung hervorrufen konnten, während die Rekolonisation mit diesen Hefen zu erneuten Krankheitserscheinungen führte (Aron-Brunetiere et al., 1977, Barber, 1977, Carr et al., 1986, Hay et al., 1997, Shuster, 1984).

Die Klassifikation der *Malassezia*-Hefen konnte in den letzten Jahren durch molekularbiologische Methoden reklassifiziert und erweitert werden, so dass neben den bekannten Arten *Malassezia furfur* (Robin) Baillon (1889) und *Malassezia pachydermatis* (Weidmann) Dodge (1935) auch die Arten *Malassezia sympodialis* (Simmons u. Guého 1990), *Malassezia globosa* (Midgley, Guého u. Guillot 1996), *Malassezia obtusa* (Midgley, Guillot u. Guého 1996), *Malassezia restricta* (Guého, Guillot u. Midgley 1996), *Malassezia slooffiae* (Guillot, Midgley u. Guého 1996) abgegrenzt wurden. Diese nun 7 Spezies umfassende Reklassifikation muss durch Ergebnisse der jüngsten Vergangenheit jedoch noch erweitert werden. Es handelt sich hierbei um die *Malassezia* Spezies, *M. japonica*, *M. yamatoensis*, *M. nana* und *M. dermatis* (Sugita et al. 2003 u. 2004, Velegraki et al. 2004, Hirai et al. 2003). Die Rolle der neueren Spezies bezüglich der *Pityriasis simplex capillitii* ist noch ungeklärt und diese wurden auch nicht in diese Studie einbezogen, da das Differenzierungssystem von Guého (et al. 1996) und Guillot (1996) diese neuen *Malassezia* Spezies nicht erfasste.

Es fehlt auch noch immer an praxisgerechten, für die tägliche Routinediagnostik raschen und preiswerten Verfahren zur Differenzierung der *Malassezia* Hefen. Vor diesem Hintergrund und im Einklang mit diesen Beobachtungen wurden im Rahmen der vorliegenden Studie drei antimykotisch wirksame Shampoos (*Octopirox*<sup>®</sup>, *Zink-Pyrithion* und *Oxiconazol*) gegenüber einer wirkstofffreien Placeboformulierung unter Berücksichtigung der Spezifizierung von Hefen der Gattung *Malassezia* miteinander verglichen. Insbesondere wurde daher in dieser Studie der Frage nachgegangen, ob die Kopfschuppenerkrankung möglicherweise durch bestimmte, einzelne *Malassezia*-Spezies ausgelöst und unterhalten wird. In diesem Sinne wurde erstmals in einer Studie eine Differenzierung der isolierten *Malassezia*-Hefen auf das Spezies-Niveau

mittels des Versuches der Kultivierung der Einzelkolonien durchgeführt. Angewandt wurde dabei eine diagnostische Screeningmethode, mit einem Bürstenabdruck von der Kopfhaut betroffener Patienten. Diese Screeningmethode erwies sich in Vorversuchen an Probanden mit und ohne Kopfschuppen als valide und leicht durchzuführen.

88 Probanden wurden in die Studie eingeschlossen, von denen 82 sie regulär beendeten (Abb.6, Tab.11). 6 Probanden erschienen nicht zu allen Visits und mussten ausgeschlossen werden. Es resultierten damit geringe Differenzen in der Probandenzahl, die in den einzelnen Studienarmen verblieben (Placebo n = 22, *Octopirox*<sup>®</sup> n= 21, *Zink-Pyrithion* n = 20 und *Oxiconazol* n = 19).

Am häufigsten waren Probanden aus der Altersgruppe der 21-30 jährigen und 31-40 jährigen (Durchschnitt ~ 32,9 Jahre) vertreten. Da die Anwendung von *Oxiconazol* den Bedingungen des AMG unterliegt, wurden Probanden erst ab dem 18 Lebensjahr zur Studie zugelassen. Daher konnte der Anstieg der Nachweisbarkeit an *Malassezia* Hefen zu Beginn der Pubertät (Noble et al., 1978, Kligman et al., 1976, Leyden, 1979, McGinley et al., 1975, Whitlock, 1953), sowie die Reduktion der Anzahl an *Malassezia* Hefen bei Personen über 75 Jahren (Leyden, 1976 u. 1979, Gosse et al., 1969) aufgrund der geringen Teilnehmerzahl in dieser Altersklasse nicht nachgewiesen werden.

Insbesondere in der Gruppe der 21-30 jährigen zeigte sich eine homogene Geschlechtsverteilung, die sich erst bei zunehmenden Alter zu Gunsten der männlichen Probanden verschiebt, ohne jedoch Signifikanz zu erreichen. Die Angaben in der Literatur zur Geschlechtsverteilung werden jedoch auch sehr kontrovers diskutiert (Kligman 1976, Herbert 1966, Leyden 1976). Es besteht kein Konsens über ein geschlechtsdifferentes Vorkommen von Kopfschuppen bei Männern oder Frauen.

Im einzelnen erzielten die Applikationen von *Octopirox*<sup>®</sup>, *Zink-Pyrithion* und *Oxiconazol* gegenüber der Cremegrundlage alleine (Placebo) bezüglich Zufriedenheit und Verträglichkeit ausgezeichnete Werte (Tab.27, 28). Es konnten keine unerwünschten Wirkungen oder Komplikationen beobachtet werden. Der subjektive Verträglichkeits- (*1 sehr gut,-..., 5 sehr schlecht*) und der Effizienz Score (*-1 Verschlechterung, 0 keine Heilung,- ..., 5 vollständige Heilung*) wurde am Ende der Studie abgefragt. Getrennt ermittelt für Therapeut und Probanden, lag der Score in einer Spanne zwischen 1,95 und 2,54 bzw. 0,77 und 2,6 (Tab. 27).

Die Placeboformulierung fällt in Hinblick auf die Effizienz dabei hinter den wirkstoffhaltigen Formulierungen zurück, ohne jedoch Signifikanz zu erreichen (Abb. 23).

Als Ergebnis waren die Probanden der wirkstoffhaltigen Applikationen-Gruppen insgesamt zufriedener mit ihrer Prüfmedikation. Trotz der niedrigen absoluten Konzentration der Wirkstoffe in den einzelnen Zubereitungen ist es bemerkenswert, dass sich hinsichtlich der Effektivität die drei aktiven Behandlungsverfahren nach Beendigung der Therapiephase (Visit 4) deutlich und signifikant von der Placebo-Gruppe abhoben (Abb. 13). Zumal sich die geringste durchschnittliche Haarlänge der Probanden ebenfalls in der Placebogruppe (Tab.13 und Abb.7) fand, was einer Schuppenbildung eher entgegenstehen soll (Whitlock 1953, Spoor 1954). Ein weiterer Hinweis auf einen Zusammenhang zwischen Wirkstoff und Therapieergebnis ist die erneute Zunahme der Schuppenmenge in den 3 Verum-Armen nach Absetzen der Therapie in der 2-wöchigen Nachbeobachtungsphase. Dieses Reboundphänomen fiel für die *Oxiconazol*-Gruppe geringer aus (Abb. 14). Es ist anzumerken, dass die Varianz der ermittelten Werte innerhalb der einzelnen Arme sehr breit ausfiel, so dass für das Rebound-Phänomen keine Signifikanzen zu errechnen waren. In der relativen Besserung der Schuppenmenge zum Ausgangswert (Visit 2) schneiden *Zink-Pyrithion* und *Octopirox*<sup>®</sup> am besten ab (Abb. 15). Hinsichtlich der Schuppengröße lassen sich keine wesentlichen Veränderungen erkennen.

Unter Placebo-Behandlung besteht ein Trend zu größeren Schuppen, während dieser Effekt unter den aktiven Behandlungsformen nicht auftritt (Abb. 16).

Pièrard-Franchimont et al. (2000) gingen von einer Sichtbarkeit der Kopfschuppen ab einer Grösse von 0,2 mm aus und legten diese Grösse als wichtigsten Parameter zur Diagnostik fest. Auch eine Reihe weiterer Autoren (Mac Knee 1937, Vanderwyk 1964, Van Abbe 1964, Leyden 1976, Bergbrant 1989, Lodén 2000, Squire 2002) legten den sichtbaren Kopfschuppenbefall und die Grösse der Kopfschuppen als diagnostisches Kriterium fest. In der vorliegenden Studie konnte diese Vorgehensweise nicht bestätigt werden. Sichtbarer Kopfschuppenbefall korreliert nicht immer mit der Nachweisbarkeit an *Malassezia*-Hefen, noch kann eine ausreichende Schweregradeinteilung auf diese Weise erfolgen (McGinley 1975, Leyden 1976). Überraschenderweise korrelierte der günstige Einfluss der aktiven Behandlung auf die Schuppenmenge nicht mit Veränderungen von Quantität und Qualität der Kopfhautflora in der vorgelegten Studie. In der Eingangsbeurteilung (Tabellen 14-18) zeigen Probanden mit dem höchsten Schuppenscore von 3 (*1 schwache- bzw. keine-, 2 mittel-, 3 stark*) zwar ein geringgradig höheres Kulturergebnis (Zahl der positiven Zinken) als Probanden mit Score 2, allerdings sind diese Werte aufgrund der hohen Standardabweichung nicht aussagekräftig.

Dies bestätigt sich auch in den weiteren ermittelten Werten, in denen die Besiedlungsdichte ebenfalls nicht mit dem Schweregrad der Kopfschuppenerkrankung korrelierte. Dies ist jedoch nicht auf eine unzureichende Meßmethode zurückzuführen. Wie bereits erwähnt, finden sich

auch in der Literatur Angaben darüber, dass die alleinige Besiedlungsdichte mit *Malassezia*-Hefen nicht der entscheidende Pathogenitätsfaktor sein kann (Templeton 1929, Goldsmith et al. 1963, Vanderwyk et al., 1964, Van Abbe et al., 1968, Roia et al., 1968, Roberts et al., 1971, McGinley, 1975, Barber, 1977, Yarrow et al., 1984, Noble, 1987, Heng et al., 1990).

Im Rahmen der Therapie findet sich ein Abfall des Kulturergebnisses besonders in der mit *Zink-Pyrithion* behandelten Gruppe (Abb. 20 und Abb. 21). Signifikante Differenzen zu den anderen Behandlungsarmen ergaben sich aufgrund der großen Varianzen nicht (Abb. 22). Die am häufigsten isolierten Spezies waren mit Abstand *M. globosa* und *M. sympodialis*, wobei die Häufigkeit von *M. globosa* im Laufe der Studie abnahm (Tab. 19). *M. globosa* trat tendenziell eher bei höheren Score-Werten auf (Tab. 24). Die Spezies *M. furfur* konnte deutlich seltener und meist nur bei mildereren Verläufen nachgewiesen werden.

*M. pachydermatis* konnte nur einmal nachgewiesen werden. Da diese Spezies vornehmlich von Tieren stammt, wurde sie möglicherweise von einem Haustier (Maus) der Probandin übertragen. Nicht erklärt werden kann zudem, dass schon etwa 11 % der Probanden bei Visit 2 trotz eines hier mindestens zu fordernden Schuppenscores von 2 (Eingangskriterium) ein negatives Kulturergebnis aufwiesen (Tab. 19). Die Zahl der negativen Kulturergebnisse nahm bis zum Visit 4 zu, dies aber hauptsächlich durch den Einfluss der Verum-Anwendungen. Wie erwähnt, korrelierte das Ergebnis nicht mit der klinischen Besserung. Eine Zunahme der negativen Kulturergebnisse war jedoch auch in der Placebo-Gruppe zu beobachten. Dabei orientierte sich das Studiendesign an der unteren Grenze einer Einwirkzeit, wie sie beispielsweise für auch handelsübliche medizinische Antischuppen-Zubereitungen (z.B. *Terzolin*-Lösung enthält 2% Ketoconazol) empfohlen wird. Der eigentlichen Therapiephase wurde in dieser Studie eine 2-wöchige Auswaschphase vorgeschaltet, in der nur die Shampoo-Grundlage eingesetzt wurde. Dies erwies sich im Nachhinein als sinnvoll, da die Kulturausgangswerte der Probanden in den einzelnen Behandlungsarmen synchronisiert werden konnten (Abb. 20 und Abb. 21). Trotzdem muss auch ein Einfluss der Shampoo-Grundlage auf das Kulturergebnis diskutiert werden. Möglicherweise spielen Konservierungsmittel eine Rolle. Es handelte sich um Euxyl K 400 (Schülke + Mayr 0,05%, es besteht aus Dibromdicyanobutan und Phenoxyethanol). Daten über eine Wirksamkeit dieses Präparates gegenüber *Malassezia*-Hefen finden sich in der Literatur aber nicht.

Vergleichbare Effekte von *Zink-Pyrithion* und *Octopirox*<sup>®</sup> finden sich auch in anderen Studien. Der interne Datenreport von *Procter* und *Gamble* zeigt in einer Studie von 1% *Zink-Pyrithion* vs. 0,85% *Octopirox* vs. Placebo an 467 Patienten einen Rückgang des Schuppenscores um 70% vs. 62% vs. 30% (*Procter and Gamble* data, 1993-1999).

In früheren Untersuchungen konnte die MHK von *Octopirox*<sup>®</sup> bzw. *Zink-Pyrithion* gegenüber *M. sympodialis* in einer Shampoogrundlage (Zusammensetzung 15% NaLES 2EO; 2% CAPB; 0,5% ABS; 0,1% Laureth 23) mit 25-50 bzw. 5-10 µg/ml bestimmt werden (Nenoff et al., 1994, Mayser 1999). Hingegen zeigten die in vitro-Testergebnisse mit *Oxiconazol*, dass die Empfindlichkeit von *Malassezia*-Hefen gegenüber dieser Substanz reduziert sein kann. In der Untersuchung von Shadomy et al. (1988) zeigte Ketoconazol die besten Effekte gegenüber *M. furfur*. Eine Kreuzresistenz von *Oxiconazol* und Econazol gegenüber einigen *M. furfur* Isolaten konnte in dieser Studie nachgewiesen werden (Shadomy et al., 1988). Für den subjektiven Parameter Juckreiz findet sich eine Abnahme in allen 4 Studienarmen unter Therapie. Sie ist am stärksten ausgeprägt bei *Octopirox*<sup>®</sup>, ohne jedoch im Vergleich zu den anderen Studienarmen Signifikanz zu erreichen (Abb. 18).

Der Parameter Inflammation wurde zu selten angegeben und daher nicht gesondert ausgewertet.

Bezüglich des Parameters Pigmentbildung, sichtbar als in den Agar diffundierendes Pigment mit bräunlicher Verfärbung (Mayser et al. 1998), konnte *M. furfur* gegenüber *M. sympodialis* signifikant ( $p \leq 0,05$ ) häufiger isoliert werden, jedoch nicht im Vergleich zu *M. globosa*. Die Häufigkeit gefundener Isolate von *M. globosa* und *M. sympodialis* unterschieden sich nicht signifikant voneinander (Abb. 9). Auffällig war hier, dass sich die Pigmentbildung nicht nur bei *M. furfur* finden ließ, sondern auch bei *M. sympodialis* sowie *M. globosa*. Dieses widerspricht aber nicht bisherigen Ergebnissen in der Literatur (Mayser et al. 1997 & 1998). Vielmehr muss angenommen werden, dass es sich bei den anderen allesamt schwächer pigmentbildenden *M. Spp.* um Vermischungen einer anderen *Malassezia*-Species mit *M. furfur* handelt. Möglicherweise erschwerten Zellenadhäsionen einzelner *Malassezia* Species untereinander in den Stanzlöchern des Bürstenabdruckes auf den Agar-Platten die Kultivierung und Differenzierung.

Ein signifikant ( $p \leq 0,05$ ) höheres Auftreten von pigmentpositiven *M. Spp.* in der *Zink-Pyrithion* und *Oxiconazol*-Gruppe gegenüber Placebo konnte gefunden werden, sowie ein tendenziell höheres Auftreten im Vergleich zur *Octopirox*<sup>®</sup>-Gruppe (Abb. 10). Ob das vermehrte Auftreten von *M. furfur* in der *Zink-Pyrithion*-Gruppe bzw. das Auftreten von *M. sympodialis* nur in der *Oxiconazol*-Gruppe Rückschlüsse auf einen Zusammenhang zwischen verwendetem Wirkstoff und der Hemmung der Pigmentbildung einzelner *M. Spp.* haben kann, ist rein spekulativ. Neben der Wirkstoffkomponente können auch hier wiederum Mischkulturen einzelner *M. Spp.* nicht ausgeschlossen werden. Des Weiteren zeigte sich auch, dass nicht jeder gefundene *Malassezia furfur* in der Lage ist, Pigment zu bilden.

Möglicherweise ist zum Pigmentnachweis die Materialgewinnung aus den Haarfollikeln über die positiven Inokulationenabdrücke nicht ausreichend. Insbesondere auch da die neueren Gattungen der *Malassezia*-Hefen (*M. japonica*, *M. yamatoensis*, *M. dermatis*, *M. nana*) von der Differenzierung nicht erfasst wurden, so dass Mischkulturen auch hier nicht ausgeschlossen werden können.

Die Zugabe von *Cremophor-EL*<sup>®</sup> als lipidhaltige Nährsubstanz auf einem modifizierten Nährboden kann durchaus als weiteres einfaches diagnostisches Kriterium zur makromorphologischen Unterscheidung einzelner *Malassezia*-Hefen dienen (Mayser et al. 1997). Neben des schon in der Einleitung erwähnten bekannten Assimilationsmusters für *M. furfur* beschrieben Guillot et. al., 1996 auch ein charakterisches Wachstum von *M. sympodialis* bei Applikation verschiedener Lipidquellen (*Tween* 20-80) jedoch nur für die Reinkultur von *M. sympodialis*. Bei hohen Konzentrationen von *Tween* 20 soll das Wachstum um das in den Agar gestanzte Loch charakteristisch gehemmt werden. Ähnlich des Pigmentnachweises waren aber die Ergebnisse völlig uneinheitlich und zeigen, dass an Reinkulturen durchgeführte Differenzierungssysteme (u.a. das von Guillot et al., 1996) nicht in gleicherweise auf Wildisolate und damit auf mögliche Mischkulturen angewendet werden können.

Die Parameter Schweregradausprägung (*Score*), Schuppengröße (*Size*), Kultur (*culture*), Juckreiz (*Itching*), Abschuppung (*Scaling*), Entzündung (*Inflammation*) fanden letztendlich noch in unterschiedlicher Gewichtung (Tab. 29) Eingang in einen Gesamtscore, das „*Dandruff-Assessment*“ (Abb. 24). Dabei wurden *Score* und Schuppengröße, in Anlehnung an die Eingangsuntersuchung und des Einschlusskriteriums (*Score* "mittel"), höher gewichtet. Hier fanden sich wiederum die günstigsten Ergebnisse für *Zink-Pyrithion* und *Octopirox*<sup>®</sup>.

Über die Epidemiologie einzelner und insbesondere der neu abgegrenzten *Malassezia*-Spezies bezüglich der *Pityriasis simplex capillitii* gibt es nur wenige Daten. Zudem finden sich in vivo häufig Mischkulturen, und es mangelt derzeit immer noch an geeigneten Verfahren, Reinkulturen darzustellen. Unseres Wissens nach wurde innerhalb dieser Studie erstmalig das von Guého et. al. (1996) vorgestellte Verfahren zur Identifizierung von *Malassezia* Hefen mittels Polyoxysorbitanfettsäureester (*Tween*) – Assimilierung an Wildisolaten von Probanden angewandt und nicht wie bisher an Referenz- und Reinkulturen. Möglicherweise erschweren die Zelladhäsionen einzelner *Malassezia* Species aneinander, die Gewinnung von Reinkulturen. Unklar ist jedoch die Rolle der Erweiterung des diagnostischen Spektrums der makromorphologischen Identifikation durch die Ergebnisse der Pigmentbildung und *Cremophor-EL*<sup>®</sup> Verbrauches auf einem Nährboden bei verschiedenen Gattungen von

*Malassezia*-Hefen bezüglich der Pathogenese, Diagnostik und Therapie der Kopfschuppenerkrankung.

Bedeutsam scheinen immer noch eher qualitative als quantitative Veränderungen der residenten Kopfhautflora (*Malassezia* Spp., *Corynebakterien* Spp., *Staphylokokken* Spp., *Streptokokken* Spp. u.a.) zu sein. Möglicherweise spielt auch das Verhältnis zur bakteriellen Flora eine Rolle. Es ist auch immer noch unbekannt, wie die Hefe die Hautveränderungen hervorruft (Hay, 1997). Verstärktes Wachstum kann nicht der einzige Grund sein.

Zusammenfassend lässt sich kein eindeutiger Zusammenhang zwischen dem Therapieerfolg und der Qualität bzw. Quantität der *Malassezia*-Hefen auf der Kopfhaut nachweisen. Somit wurden die Ergebnisse vorheriger Studien, in denen die Besiedlungsdichte ebenfalls nicht mit dem Schweregrad der Kopfschuppenerkrankung korrelierte, bestätigt. Die Kulturgewinnung und Anzucht einzelner *Malassezia* Spezies über die standardisierte Bürstenmethode und ihre Nachweisbarkeit durch Kultivierung ist schnell und kostengünstig durchzuführen, jedoch bei weitem nicht ausreichend zur Differenzierung und Gewinnung von Reinkulturen einzelner *Malassezia* Spezies geeignet. Hier müssten noch weitere Differenzierungsgrundlagen geschaffen werden, der Versuch mittels Pigmentbildung und Cremophor Assimilation könnte in Zukunft dazu noch weiter beitragen.

Jedoch konnte in in der vorliegenden Studie ein deutlicher Einfluss einer Verum-Behandlung auf die Kopfschuppenerkrankung bei handelsüblichen Einsatzkonzentrationen durch die verwendeten Messverfahren festgestellt werden.

Der genaue Pathomechanismus der zur Bildung von Kopfschuppen führt ist immer noch unklar, jedoch wirken antimykotisch-wirksame Zubereitungen. Ältere Studien können aber auch nur unter Vorbehalt auf die heutige Taxonomie angewandt werden, da in einem Großteil der Literatur *Malassezia* noch immer unter dem früheren Namen *Pityrosporum* geführt wird und Studien oftmals an Referenz- und Reinkulturen durchgeführt wurden. Die Ergebnisse können daher nicht immer valide nachvollzogen werden.

## 7. Literaturverzeichnis

1. Acton H.W., Panja. G.: seborrheic dermatitis or pityriasis capitis. A lesion by caused by the *Malassezia ovale*. Indian med. Gaz. Bd. 62, Nr. 11,: 603-614, 1927
2. Alexander S., Lond, M.B.: Loss of Hair and Dandruff. Brit. J. Derm., 79, 519-522, 1967
3. Aron-Brunetièrè R.D., Domp martin-Pernot D., Drouhet E.: Treatment of pityriasis capitis (dandruff) with econazole nitrate. Acta Derm. Venereol. 57: 77-80, 1977
4. Arrese J.E., Pierard-Franchimont C. et al.: Effect of Ketoconazole-medicated shampoos on squamometry and *Malassezia ovalis* load in pityriasis capitis. Cutis 58 (3): 235-237, 1996
5. Ashbee, H.R., Fruin A., Holland K.T., Cunliffe W.J., Ingham E.: Humoral immunity to *Malassezia furfur* serovars A, B and C in patients with Pityriasis versicolor, seborrheic dermatitis and controls. Exp. Dermatol. 3: 227-233, 1994
6. Ashbee, H.R., Evans E.G.V.: Immunology of Diseases Associated with *Malassezia* Species. Clinical Microbial Reviews. Vol. 15, No. 1: 21-57, 2002
7. Barber L.C.: The aetiology of dandruff. PR No. 8. *Pityrosporum ovale* / amphotericin B dandruff aetiology study (DA-125). Cincinnati, Procter & Gamble internal report, 1977
8. Baroni A., De Rosa R., De Rose A., et al.: New Strategies in Dandruff Treatment: Growth Control of *Malassezia ovalis*, Derm. 201: 332-336, 2000
9. Belew P.W., Rosenberg E.W., Jennings B.R.: Activation of the alternative pathway of complement by *Malassezia ovalis*. Mycopath. 70: 187-191, 1980
10. Benham R.W.: The cultural characteristics of *Pityrosporum ovale*- a lipophilic fungus.: J. Invest. Derm. 2: 187-203, 1939
11. Beretty P.J.M., Neumann H.A.M., Hulsebosch H.J.: *Pityrosporum folliculitis*: is it a real entity? Brit. J. Derm. 103: 565, 1980.
12. Bergbrant I.M., Faergemann J.: seborrheic dermatitis and *Pityrosporum ovale*: a cultural and immunological study. Acta. Derm. Venereol. 69: 332-335, 1989.
13. Black J.G., Kamat V.B.: Percutaneous absorption of *Octopirox*. Food. Che. Tox. 26(1): 53-58, 1988
14. Boegart H., Cordero C., Ollague W., Savin R.C., Shalita A.R., Zaias N.: Multicentre double-blind clinical trials of *ciclopirox* olamine cream 1% in the treatment of tinea corporis and tinea cruris: J. Int. Med. Res. 14(4): 210-216, 1986
15. Breuer M.M.: Recent developments in dandruff prevention. Cosma. 11: 48-49, 2003

16. Bulmer A.C., Bulmer G.S.: The antifungal action of dandruff shampoos. *Mycopath.* 147: 63-64, 1999
17. Caprilli F., Mercantini R., Nazarro-Porro M., Passi S., Tonolo A.: Studies of the genus *Pityrosporum* in submerged culture. *Mycopath. Mycol. Appl.* 51: 171-198, 1973
18. Carr M.M., Pryce D., Ive F.A.: Treatment of seborrheic dermatitis of the scalp with 2% ketoconazole. *Br. J. Derm.* 116: 213-216, 1986
19. Ciffard C., Coiffard L., de Roeck-Holtzhauer Y.: Comparison of thermostability of natural (sulfoprolamine and sodium usnate) and synthetic (*climabazole* and piroctone olamine) antidandruff agents. *Ann. Phar. M. Fr.* 57(5): 392-396, 1999
20. Clariant GmbH: Exactly your chemistry, Anti dandruff Active Ingredient *Octopirox*. Product Data. [Http://fun. Clariant.com](http://fun.clariant.com), 2003
21. Clift D.C., Dodd H.J., Kirby J.D.T., Midgley G., Noble W.C.: seborrheic dermatitis and malignancy. An investigation of the skin flora. *Acta. Derm. Venereol.* 68: 48-52, 1988
22. Cowley N.C., Farr P.M., Shuster S.: The permissive effect of sebum in seborrheic dermatitis: an explanation of the rash in neurological disorders. *Brit. J. Derm.* 122: 71-76, 1990
23. Cunningham A.C., Leeming J.P., Ingham E., Gowland G.: Differentiation of three serovars of *M. furfur*. *J. Appl. Bacteriol.* 68: 439-446, 1990
24. Danby F.W., Maddin W.S., Margesson L.J., Rosenthal D.: A randomized, double blind, placebo-controlled trial of *Ketoconazole* 2% shampoo vs. selenium sulfide 2.5 % shampoo in the treatment of moderate to severe dandruff. *J. Am Acad. Derm.* 29 (6): 1008-1012, 1993
25. Dorn M. und Roehnert K: Dimorphism of *Pityrosporum orbiculare* in a defined culture Medium. *J. Invest. Derm.* 69: 244-248, 1977
26. Faergemann J., Aly R., Maibach H.I.: Quantitative Variations in Distribution of *Pityrosporum orbiculare* on Clinical Normal Scalp. *Acta. Derm. Venereol. (Stockh.)* 63: 346-348, 1983
27. Faergemann J.: Lipophilic yeasts in skin disease. *Seminars in Derm.* 4: 173-184, 1985
28. Faergemann J., Fredriksson T.: Experimental infections in rabbits and humans with *Pityrosporum orbiculare* and *P. ovale*. *J. Invest. Derm.* 77: 314-318, 1981
29. Ford G.F., Farr P.M., Ive F.A., Shuster S.: The Response of Seborrheic Dermatitis to Ketoconazole. *Brit. J. Derm.* 111: 603-607, 1984
30. Foti C., Diaferio A., Bonamonte D.: Allergic contact dermatitis from *ciclopirox* olamine. *Aus. J. Derm.* 42(2): 145, 2001

31. Gemmer C.M., De Angelis Y.M., Theelen B., Boekhout T., Dawson Jr TL.: Fast non invasive method for molecular detection and differentiation of *Malassezia* yeast species on human skin and application of the method to dandruff microbiology. *J. Clin. Microbiol.*: 40 (9): 3350-3357, 2002
32. Go I.H., Wientjens D.P., Koster M.A.: double blind trial of 1% ketoconazole shampoo vs. placebo in the treatment of dandruff. *Mycoses* 35: 103-105, 1992
33. Goldsmith, W.N.: Recent Advances. *Derm. Philadelphia*: 25, 1963
34. Gordon M.A.: The lipophilic mycoflora of the skin. In vitro culture of *Pityrosporum orbiculare* n. sp. *Mycologica* 43: 542-535, 1951
35. Gosse R.M., Vanderwyk R.W.: The Relationship of Nystatin Resistant Strain of *Pityrosporum ovale* to dandruff. *J. Soc. Cos. Chem.* 20: 603-613 , 8<sup>th</sup> Sept. 16 , 1969
36. Green C.A., Farr P.M., Shuster S.: Treatment of Seborr. Dermatitis with Ketoconazole: Response of seborrhic dermatitis of the face, scalp and trunk to topical Ketoconazole. *Brit. J. Derm.*: 116: 217-221, 1987
37. Guého E., Meyer S.A.: A re-evaluation of the genus *Malassezia* by means of genome comparison. *Antonie van Leeuwenhoek* 55: 245-251, 1989
38. Guého E., Midgley G., Guillot J.: The genus *Malassezia* with description of four new species. *Antonie van Leeuwenhoek* 69: 337-355, 1996
39. Guého E., Boekhout T., Ashbee H.R., Guillot J., Van Belkum A., Faergemann J.: The role of the *Malassezia* species in the ecology of human skin and as pathogens. *Med. Mycol.* 36, 1: 220-9, 1998
40. Guillot J., Guého E., Lesourd M., Midgley G., Chévrier G., Dupont B.: Identification of *Malassezia* Species, A practical approach. *J. Mycol. Méd.* 6: 103-110, 1996
41. Gupta A.K., Kuhli Y., Faergemann J. , Summerbell R.C.: In vitro susceptibility of the seven *Malassezia* species to Ketoconazole, voriconazole, itraconazole and terbinafine. *Brit. J. Derm.* 142: 758-765, 2000
42. Harding C.R., Moore A.E., Rodgers J.S, Meldrum H., McGlone F.P.: Dandruff: a condition characterized by decreased levels intercellular lipids in scalp stratum corneum and impaired barrier function. *Arch Derm. Res.* Jul; 294(5): 221-223, 2002
43. Hay R.J., Roberts S.O.B., Mackenzie D.W.R.: Pityriasis versicolor. *Textbook of Dermatology* (Champion RH, Burton JL, Ebling FJG, eds) 5<sup>th</sup> ed., Vol. 2. Oxford: Blackwell Scientific Publications: 1176-1178, 1992

44. Hay R.J., Graham-Brown C.: Dandruff and seborrheic dermatitis: causes and management. Clin. Exp. Derm. 22: 3-6, 1997
45. Heng M.C.Y., Henderson C.L., Barker D.C., Habberfelde G.: Correlation of *Pityrosporum ovale* density with clinical severity of seborrheic dermatitis assessed by a simplified technique. J. AM. Acad. Derm. 23: 82-86, 1990
46. Hirai A., Kano R., Makimura K., Duarte E.R., Hamdan J.S., Lachance M.A., Yamaguchi H., Hasegawa A.: *Malassezia nana* sp. nov., a novel lipid-dependent yeast species isolated from animals. Int. J. Syst. Evol. Microbiol. 54 (Pt 2): 623-7, 2004
47. Ingham E., Cunningham A.C.: *Malassezia furfur*. J. Vet. Med. Mycol. 31: 265-288, 1993
48. Johnson B.A., Nunley J.R.: Treatment of seborrheic dermatitis. AM. Fam. Physician 1; 61 (9): 2703-2710, 2713-2714, 2000
49. Jue S.G., Dawson G.W., Brodgen R.N.: Ciclopirox olamine 1% cream. A preliminary review of its antimicrobial activity and therapeutic use. Drugs 29(4): 330-341, 1985
50. Kligman A.M., McGinley J.K., Leyden J.J.: The Nature of Dandruff: J. Soc. Cosmet. Chem., 27: 111-139, 1976
51. Korting H.C., Grundmann-Kollmann M.: The hydroxypyridones: a class of antimycotics of its own. Mycoses, 40 (7-8): 243-247, 1997
52. Kokjohn K., Bradley M., Griffiths B., Ghannoum M.: Evaluation of in vitro activity of ciclopirox olamine, butenafine HCL and econazole nitrate against dermatophytes, yeasts and bacteria. Int. J. Derm. 42: 11-17, 2003
53. Leeming, J.P., Notman, F.H., Holland, K.T.: The distribution and ecology of *Malassezia furfur* and cutaneous bacteria on human skin. J. Appl. Bacteriol. 67: 47-52, 1989
54. Leyden J.J.: Dandruff-cause and Treatment. Cosmetics and Toiletries 94: 23-28, 1979
55. Leyden J.J., McGinley, K.J., Kligman, A.M.: Role of Microorganisms in Dandruff. Acta. Derm. Vol. 112.: 333-338, 1976
56. Lindmaier A., Lindmaier H., Schmidt J.B.: Dandruff-an atopic sign? Hautarzt 38 (3): 138-141, 1987
57. Lodén M., Wessman C.: The antidandruff efficacy of a shampoo containing piroctone olamine and salicylic acid in comparison to that of *Zink-Pyrithion* shampoo. Int. J. of Cos. Sci., 22.: 285-289, 2000
58. MacKee G., Lewis G.M., Pinkerton M.E., Hopper M.E.: Dandruff and seborrhea. J. Invest. Derm. 2: 31-41, 1938

59. Marks R., Pearse A.D., Walker A.P.: The effects of a shampoo containing zinc pyrithione on the control of dandruff. *Brit. J. Derm.* 112 (4): 412-422, 1985
60. Marples M.J.: The genus *Pityrosporum*. In: *The Ecology of the Human Skin*. Springfield: C.C. Thomas: 408-422, 1965
61. Marples R.R., Downing D.T., Kligman A.M.: Influence of *Pityrosporum* species in the generation of free fatty acids in human surface lipids. *J. Invest. Derm.* 58: 155-159; 1972
62. Marples R.R., Leyden J.J., Stewart R.N., Mills O.H., Kligman A.M.: The skin microflora in acne vulgaris. *J. Invest. Derm.* 62: 37-41, 1974
63. Mayser P., Haze P., Papavassilis C., Pickel M., Gründer K., Gueho E.: Differentiation of *Malassezia* Spp.- selectivity of cremophor EL, castor oil and ricinoleic acid for *M. furfur*. *Brit. J. Derma.* 137: 208-213, 1997
64. Mayser P. Wille G, Imkampe A, Thoma W, Arnold N, Monsees T.: Synthesis of fluorochromes and pigments in *Malassezia furfur* by use of tryptophane as single nitrogen source. *Mycoses* 41: 265-271, 1998
65. Mayser P.: Interner Zwischenbericht für Clariant "Antimyzetische Wirksamkeit von *Octopirox*, seinen Derivaten und seinen Kombinationen gegenüber *Malassezia*-Spezies in vitro", 1999
66. McGinley K.J., Leyden L.J., Marples R.R., Kligman A.M.: Quantitative microbiology of the scalp in non-dandruff, dandruff and seborrheic dermatitis. *J. Invest. Derm.* 64: 401-405, 1975
67. McGrath J., Murphy G.M.: The control of seborrheic dermatitis and dandruff by antipityrosporal drugs. *Drugs* 41 (2):187-184, 1991
68. Meinhof W., Braun-Falco O.: Über lipotrophe Hefen auf der menschlichen Haut und deren Bedarf an bestimmten Fettsäuren. *Fette Seifen Anstrichmittel* 69: 861-864, 1967
69. Midgley G.: Serological responses to *Pityrosporum* in seborrheic dermatitis demonstrated by ELISA and Western Blotting. *Bull soc. Fr. Mycol. Med.* 17: 267-269, 1988
70. Midgley G.: The diversity of *Pityrosporum (Malassezia)* yeasts in vivo and in vitro. *Mycopath.* 106: 143-153, 1989
71. Nazarro-Porro M., Passi S., Caprill F., Nazarro P., Morpurgo G.: Growth requirement and lipid metabolism of *Pityrosporum orbiculare*. *J. Invest. Derm.* 69: 531-534, 1976
72. Nenoff P., Hausteil U.F.: Der Effekt anti-seborrhoischer Substanzen gegenüber *Pityrosporum ovale* in vitro. *Hautarzt* 45: 464-467, 1994

- 73.Nenoff P., Reinl P., Haustein U.-F.: Der Hefepilz *Malassezia*. Hautarzt 52: 73-86; 2001
- 74.Noble W.C.: The skin microflora and microbial skin disease. Cambridge university press, 1992
- 75.Noble W.C., Midgley G.: Scalp Carriage of Pityrosporum Species: the Effect of Physiological Maturity, Sex and Race. Sabouraudia: 229-232; 1978
- 76.Nolting K-S.: Mikrobiologische Untersuchung des Canesten-Schuppen-Shampoos Plus im Vergleich zu den Referenzenpräparaten: Terzolin-Lösung, Cloderm-Lösung und Neutrogena-Basishampoo. Haut, Heft 5, 1999
- 77.Panja J.: The *Malassezia* of the Skin, their cultivation, morphology and species. Transactions of the 7<sup>th</sup>. congress of the Far Eastern Assoc. of Tropical Medicine, Thacker's Press 2, Calcutta, : 442-456,1927
- 78.Parry M.E., Sharpe G.R.: seborrheic dermatitis is not by an altered immune response to *Malassezia* yeast. Brit. J. Derm. 139: 254-263, 1989
- 79.Peter R.U., Barthhauer U.: Succesful treatment and prophylaxis of scalp seborrheic dermatitis and dandruff with 2% ketoconazole shampoo: results of a multicentre, doubleblind, placebo-controlled trial. Brit. J. Derm. 8 ; 132 (3): 441-445, 1995
- 80.Perkins M.A., Cardin C.W., Osterhus M.A., Robinson M.K.: A non-invasive tape aborption method for recovery of inflammatory mediators to differentiate normal from compromised scalp conditions. Skin Res. and Tech. 8: 187-193, 2002
- 81.Piérard-Franchimont C., Piérard G.E., Arrese J.E., De Donker P.: Effect of Ketoconazole 1% and 2% Shampoos on severe Dandruff and seborrheic Dermatitis: Clinical, Squamometric and Mycological Assessments. Derm.; 202: 171-176, 2001
- 82.Piérard-Franchimont C., Hermanns J.F., Degreeef H., Piérard G.E.: From Axioms to New Insights into Dandruff. Derm., 200: 93-98, 2000
- 83.Priestley G.C., Brown J.C.: Acute toxicity of Zinc pyrithion to human skin cells in vitro. Acta. Derm. Venerol.; 60 (2): 145-148, 1980
- 84.Priestley G.C., Savin J.A.: The Microbiology of Dandruff. Brit. J. Derm. 94: 469, 1976
- 85.Procter and Gamble data: clinical studies, 1993-1999
- 86.Rigoni C., Toffolo P., Cant, A., Beretta D., Terenzi C.G.: Derm. Venereol.: 124: 11-12, 1989
- 87.Roberts S.O.B.: *Pityrosporum orbiculare*: incidence and distribution on clinically normal skin. Brit. J. Derm. 81: 264-269, 1969

88. Roberts S.O.B.: The Mycology of the Clinically Normal Scalp. Brit. J. Derm. 94: 469-471, 1971
89. Rulison H.: Is dandruff seborrheal? Arch Derm. & Syph. 10: 429, 1924
90. Sabouraud R.: Maladies du cuir chevelu; II Les maladies desquamatives. Paris: Manson, 1904
91. Salkin I.F., Gordon M.A.: Polymorphism of *Malassezia furfur*. Canad. J. Microbiol. 23: 471-475, 1977
92. Saple D.G, Ravichandran G., Desai A.: Evaluation of safety and efficacy of Ketoconazole 2 % and zinc-pyrithion 1 % shampoo in patients with moderate to severe dandruff- a postmarketing study. J. Indian Med. Assoc. 98 (12): 810-811, 2000
93. Shah R.Z., Sudgen J.K.: Some aspects of the Role of *Pityrosporum ovale* in dandruff. Pharm Acta Helvet. 51: 209-211, 1976
94. Shadomy S., Wang H., Shadomy H.J.: Further in vitro studies with *Oxiconazole* nitrate. Diagn. Microbiol. Infect. Dis. 9: 231-237, 1988
95. Spoor H.J., Establishing Efficacy of Dermatologists to Support New Drug Applications, J. New Drugs, 5 No. 3: 127, 1966
96. Sugita T., Tajima M., Takashima M., Amaya M., Saito M.: A new yeast *Malassezia yamatoensis*, isolated from a patient with seborrheic dermatitis, and its distribution in patients and healthy subjects. Microbiol. Immunol., 48(8): 579-583, 2004
97. Sugita T., Takashima M., Kodama M., Tsuboi R., Nishikawa A.: Description of a new yeast species *Malassezia japonica* and its detection in patients with atopic dermatitis and healthy subjects. J. of Clin. Microbiol. Vol. 41, No. 10: 4695-4699, 2003
98. Shifrine M., Marr A.G.: the Requirement of fatty acids by *Pityrosporum ovale*. J. Gen. Microbiol. 32: 263-270, 1963
99. Shuster S.: The aetiology of dandruff and mode of action of therapeutic agents. Br. J. Derm. 111: 235-242, 1984
100. Simmons R.B., Guého, E.: A new species of *Malassezia*. Mycol. Res. 94: 1146-1149, 1990
101. Sloof W.C.: Genus *Pityrosporum* Sabouraud. The Yeasts-a taxonomic Study 2<sup>nd</sup>. Edition Amsterdam: North Holland Publishing Company: 1167-1186, 1970
102. Sommerville D.A.: The Normal Flora of the Skin in Different Age Groups. Brit. J. Derm. 81: 248, 1969

- 103.Sohnle P.G., Collins-Leech C.: Cell-mediated immunity to *Pityrosporum orbiculare* in Tinea versicolor. J. Cli. Invest. 62: 45-53, 1978
- 104.Spoor J.: Dandruff updated : American Perfumer and Cosmetics, Vol 81: 81, 1966
- 105.Squire R.A., Goode K.: A randomized, single-blind, single centered clinical trial to evaluate comparative clinical efficacy of shampoos containing ciclopirox oxalamine (1,5 %) an salicylic acid (3 %), or ketoconazol (2%, Nizoral) for the treatment of dandruff/seborrheic dermatitis. J. Derm. Treat.;13(2): 51-60, 2002
- 106.Templeton H.J: A Study of Dandruff and of the Pityrosporum of Malassez. Arch. Derm. Syph. 14: 270-279, 1929
- 107.Van Abbe N.J.: The investigation of dandruff. J. Soc. Cosm. Chemists 15: 609-630, 1964
- 108.Vanderwyk R.W., Roia F.C.: The relationship between dandruff and the microbial flora of the human scalp. J. Soc. Cosmet. Chem. 15: 761-768, 1964
- 109.Vanderwyk R.W., Hechemy K.E.: A comparison of the bacterial and yeast flora of the human scalp and their effect upon dandruff production. J. Soc. Cosm. Chemists 18: 629-639, 1967
- 110.Wigger-Alberti W., Kluge K., Elsner P.: Clinical effectiveness and tolerance of *climbazole* containing dandruff shampoo in patients with seborrheic scalp eczema. Schweiz. Rundsch. Med. Prax. 16: 90(33): 1346-1349, 2001
- 111.Warner R.R., Schwartz J.R., Boissy Y., Dawson T.L.: Dandruff has an altered stratum corneum ultrasctucture that is improved with zinc pyrithion shampoo. J. Acad. Derm., 45(6): 897-903, 2001
- 112.Weary P.E.: *Pityrosporum ovale*: observations on some aspects of host-parasite interrelationship. Arch. Derm. 98: 408-522, 1968
- 113.Weary P.E.: Comedogenic potential of the lipid extract of *Pityrosporum ovale*. Archives of Derm. 102: 84-91, 1970
- 114.Whitlock F.A: *Pityrosporum ovale* and some scaly Conditions of the scalp. Brit. Med. Journal: 484-487, 1953
- 115.Wilde P.F., Stewart P.S.: a study of the fatty acid metabolism of the yeast *Pityrosporum ovale*. Biochem. J. 108: 225-231, 1968
- 116.Wu C., Chen K.T.: Lymphocyte proliferation to crude extract of *Pityrosporum* species and natural killer activity in tinea versicolor. J. Med., Ass., Thailand 70: 45, 1985
- 117.Yarrow D., Ahearn D.G.: *Malassezia* Baillon. The yeasts: A taxonomic study (Kreger van Rij NJW, ed), 3<sup>rd</sup> ed., Amsterdam: North Holland Publishing Company: 882-885, 1984

118. Yamaguchi H., Uchida S., Hiratani T., Hara T., Fukuyasu H., Kazuno Y., Inouye S.: In vitro activity of ME 1401, a new antifungal agent.: *Anti. Ag. Chemo.*, 30(5): 705-712, 1986

## **8. Anhang**

### **8.1 Anleitung für die Probanden**

#### **Anwendung der Prüfmedikation:**

Prüfpräparat 1 Minute in das angefeuchtete Haar einmassieren (ca. 5 ml; bei schulterlangem Haar 10 ml) und nach Einwirkzeit von 2 Minuten ausspülen.

#### **Häufigkeit des Haarewaschens**

In den ersten 2 Wochen (Eingangsphase) nach Wunsch (Termine notieren); während der Therapiephase (4 Wochen) alle 3 Tage; In der 2 wöchigen Nachkontrollphase nach Wunsch mit eigenem Shampoo (kein Antischuppenshampoo)

**Vor einem Kontrolltermin 2 Tage keine Haarwäsche!**

#### **Verwendung zusätzlicher Haarpflege und Haarkosmetik**

Nach Möglichkeit darauf verzichten, sonst dokumentieren!; **Auf keinen Fall 2 Tage vor dem nächsten Kontrolltermin Haarlackfestiger oder-spray anwenden**

**Bei jedem Kontrolltermin restliches Shampoo und Prüfpräparat mitbringen!**

## 8.2 Probandenaufklärung

Probanden-Nr. ..

Initialen:

### Einverständniserklärung

Mir ist angeboten worden, an einer Studie teilzunehmen, in der der Einfluss von das Pilz-Wachstum hemmenden Substanzen (Antimykotika) auf die Kopfschuppenerkrankung untersucht wird. Nach neueren Erkenntnisse spielen in der Auslösung der Kopfschuppen Hefen der Gattung *Malassezia* eine Rolle, die zwar zur natürlichen Kopfhautflora des Menschen gehören, aber auch aus noch nicht vollständig geklärten Gründen Kopfschuppen verursachen können. Hier kann einerseits eine absolute Vermehrung dieser Hefen eine Rolle spielen, andererseits aber auch Verschiebung im Verhältnis einzelner Arten zueinander. Mit Antimykotika insbesondere in einer Shampoo-Grundlage, die rezeptfrei erhältlich sind, hat man schon seit Jahren Kopfschuppen erfolgreich behandeln können. Die folgende Studie möchte nun eine handelsübliche Dosierung dreier dieser Antimykotika (*Zink-Octopirox*, *Zink-Pyrithion*, *Oxiconazol*) mit der Frage vergleichen, ob diese unterschiedlich gut wirken und ob eine ggf. eine unterschiedlich lange Erscheinungsfreiheit zu erzielen ist. Eine vierte Gruppe von Probanden wird nur eine wirkstofffreie Shampoo-Grundlage erhalten, um die Wirksamkeit des Shampoos allein auf die Kopfschuppenerkrankung zu untersuchen. Um eine Einflussnahme von Seiten des Untersuchers als auch des Probanden auf das Ergebnis auszuschließen, wird die Verabreichung der Prüfpräparate doppelblind erfolgen. Da bedeutet, das weder Untersucher noch Proband wissen, welches Shampoo der einzelne Proband enthält. Sie als Proband könnten daher sowohl eines der wirkstoffhaltigen oder auch das wirkstofffreie Präparat erhalten. Nach einer Eingangsphase von 2 Wochen, in der alle Probanden die Shampoogrundlage erhalten, werden Sie für 4 Wochen dann Ihre Haare mit einem der 3 Prüfpräparate behandeln. Die Haare werden 3 mal pro Woche mit dem jeweiligen Prüfpräparat gewaschen. Hierzu wird das Präparat eine Minute in das bereits angefeuchtete Haar einmassiert und nach einer Einwirkzeit von 2 Minuten abgespült. Bei den 5 erforderlichen Besuchsterminen werden jeweils Schuppenmenge und Schuppengröße durch Ausschütteln der Haare über einer DIN-A3 grossen schwarzen Photopappe bestimmt. Zudem wird durch 3-maliges Bürsten des Haarbodens mit einer Spezialbürste Material für die kulturelle Anzucht der Pilze gewonnen. Nach Ende der 4-wöchigen Behandlungsphase können sie ihr Haar wieder wie gewohnt pflegen (Ausnahme Anti-Schuppen-Shampoos). Ein letzter Kontrolltermin nach 2 Wochen soll uns aber Aufschlüsse über den weiteren Krankheitsverlauf bzw. auf einen möglichen Rückfall geben.

Für jeden abgeschlossenen Besuch erhalten Sie eine pauschale Aufwandsentschädigung von 30,- DM, insgesamt 150,-DM.

Ich bin darüber informiert worden, dass die erhaltenen Daten den Bestimmungen des Datenschutzgesetzes unterliegen. Ich stimme ihrer Veröffentlichung unter der Voraussetzung zu, dass jeder Bezug zu meiner Person unkenntlich gemacht ist.

Ich bin damit einverstanden, dass die im Rahmen der Studie erhobenen Daten aufgezeichnet, von einem zur Verschwiegenheit verpflichteten Mitarbeiter oder Beauftragten der fördernden Einrichtung eingesehen bzw. abgefragt und in anonymisierter Form an die zuständige Überwachungsbehörde oder die zuständige Bundesoberbehörde weitergegeben, wissenschaftlich ausgewertet und den gesetzlichen Bestimmungen entsprechend archiviert werden. Mir ist außerdem bekannt, dass in seltenen Ausnahmefällen und nur unter Wahrung meiner Persönlichkeitsrechte eine Weitergabe nicht anonymisierter Daten erforderlich sein kann.

Ich bin ausreichend über Wesen und Inhalt der angesprochenen Studie aufgeklärt, habe keine weiteren Fragen mehr und möchte an dieser Studie teilnehmen. Einen Durchschlag der Einverständniserklärung habe ich erhalten.

Mein Einverständnis zu dieser Studie kann ich jederzeit ohne Angabe von Gründen zurücknehmen, ohne dass mir hieraus ein Schaden entsteht. Für eventuell auftretende unerwünschte Wirkungen, die auf die Studienmedikation zurückzuführen sind, wurde für mich eine Versicherung abgeschlossen, die in diesem Falle eintritt.

....., den

.....  
(Unterschrift des Probanden)

### 8.3 EINVERSTÄNDNISERKLÄRUNG

Name:..... Vorname:.....

Geburtsdatum:.....

Ich bin damit einverstanden, an der Studie teilzunehmen.

Ich bin schriftlich und mündlich aufgeklärt worden über ihr Ziel, die praktische Durchführung, den zu erwartenden Nutzen, die möglichen Risiken und die mit ihr verbundenen Belastungen.

Über den Versicherungsschutz bin ich in verständlicher Weise informiert worden. Eine Versicherungspolice ..... liegt vor.

Mein Einverständnis zu dieser Studie kann ich jederzeit ohne Angabe von Gründen zurücknehmen, ohne dass mir hieraus ein Schaden entsteht.

Ich bin darüber informiert worden, dass die erhaltenen Daten den Bestimmungen des Datenschutzgesetzes unterliegen. Ich stimme ihrer Veröffentlichung unter der Voraussetzung zu, dass jeder Bezug zu meiner Person unkenntlich gemacht ist.

Ich bin damit einverstanden, dass die im Rahmen der Studie erhobenen Daten aufgezeichnet, von einem zur Verschwiegenheit verpflichteten Mitarbeiter oder Beauftragten der fördernden Einrichtung eingesehen bzw. abgefragt und in anonymisierter Form an die zuständige Überwachungsbehörde oder die zuständige Bundesoberbehörde weitergegeben, wissenschaftlich ausgewertet und den gesetzlichen Bestimmungen entsprechend archiviert werden. Mir ist außerdem bekannt, dass in seltenen Ausnahmefällen und nur unter Wahrung meiner Persönlichkeitsrechte eine Weitergabe nicht anonymisierter Daten erforderlich sein kann.

Ich konnte Fragen stellen. Sie wurden zu meiner Zufriedenheit beantwortet.

Ich bin ausreichend über Wesen und Inhalt der angesprochenen Studie aufgeklärt, habe keine weiteren Fragen mehr und möchte an dieser Studie teilnehmen.

Ich habe keine weiteren Fragen mehr.

Ich habe eine Kopie der schriftlichen Aufklärung und dieser Einverständniserklärung erhalten.

....., den

.....

Unterschrift des Probanden

.....

Unterschrift des Studienleiters/  
Stellvertreters

## 8.4 Probandentagebuch

Probanden-Nr.:

Initialen:

### Therapietagebuch

**Termin 1:** Tag 0 - Datum ..... (bitte eintragen): Erhalt der Shampoogrundlage

**Termin 2 (nach 14-18 Tagen) Datum:**

Tage, an denen die Haare in der Zwischenzeit gewaschen wurden (bitte eintragen)

.....

Bitte bei allen Kontrollterminen 2 Tage vor Termin keine Haare mehr waschen und restliches Shampoo mitbringen. 2 Tage vor der Kontrolle und am Kontrolltermin darf kein Haarspray, Haarlack oder Festiger verwendet werden.

**Termin 3 (nach 26-30 Tagen) Datum:**

Tage, an denen die Haare in der Zwischenzeit gewaschen wurden (erforderlich - alle 3 Tage) - bitte eintragen:

.....

**Termin 4 (nach 42-44 Tagen) Datum:**

Tage, an denen die Haare in der Zwischenzeit gewaschen wurden (erforderlich - alle 3 Tage) - bitte eintragen:

.....

**Bitte restliches Prüfpräparat mitbringen!!**

**Termin 5 (nach 54-58 Tagen) Datum:**

Haarpflege nach Wunsch, aber kein Antischuppenshampoo verwenden; Präparat und Zeiten bitte eintragen; Verwendetes Präparat:

## 8.5 Randomisierungsliste

1	C
2	D
3	D
4	A
5	D
6	D
7	B
8	C
9	C
10	D
11	B
12	B
13	B
14	A
15	A
16	C
17	A
18	A
19	D
20	B
21	C
22	A
23	C
24	C
25	D
26	B
27	A
28	B
29	C
30	A
31	A
32	D
33	A
34	D
35	B
36	C
37	B
38	A
39	D
40	A
41	C
42	B
43	B
44	D
45	D

46	A
47	A
48	C
49	B
50	C
51	D
52	A
53	C
54	B
55	B
56	D
57	C
58	C
59	B
60	D
61	B
62	D
63	C
64	B
65	A
66	A
67	A
68	A
69	A
70	B
71	A
72	D
73	C
74	A
75	D
76	C
77	B
78	D
79	C
80	D
81	B
82	B
83	C
84	C
85	C
86	B
87	D
88	D

A	Zink-Pyrithion
B	Placebo
C	Octopirox
D	Oxiconazol

## 8.6 Abbildungs-, Tabellen- und Abkürzungsverzeichnis

### Abbildungsverzeichnis:

1. Abbildung:  
Original- und modifizierte Kopfmassagebürste Seite: 33
2. Abbildung:  
Bürstenabdrücke der modifizierten Kopfmassagebürste auf *mDixon* Agar Seite: 34
3. Abbildung:  
Bürstenabdrücke im Vorversuch mit modifizierter Bürste Seite: 35
4. Abbildung:  
Originalscan der Differenzierungsgrundlage Seite: 36
5. Abbildung:  
Randausstrich nach positiver Inokulation Seite: 37
6. Abbildung:  
Alters- und Geschlechtsverteilung der Probanden Seite: 48
7. Abbildung:  
Haarlänge und Medikationsverbrauch Seite: 50
8. Abbildung:  
Gesamtanzahl der isolierten *Malassezia* Spezies Seite: 57
9. Abbildung:  
Anzahl pigment positiver *Malassezia* Spezies Seite: 63
10. Abbildung:  
Unterteilung pigment positiver *Malassezia* Spezies nach Visit und Medikationsgruppen Seite: 64
11. Abbildung:  
Unterteilung pigment positiver *Malassezia* Spezies nach Medikationsgruppen Seite: 65
12. Abbildung:  
Veränderung des Schweregrades der Schuppenerkrankung Seite: 66
13. Abbildung:  
Effizienz der einzelnen Behandlungsarme Seite: 68
14. Abbildung:  
Quantitative Schuppenmenge Seite: 69

15.Abbildung:	
Relative Verbesserung der Schuppenmenge ab Baseline (Visit 2)	Seite: 70
16.Abbildung:	
Absolute Veränderung der Schuppengrösse	Seite: 71
17.Abbildung:	
Relative Reduktion der Schuppengrösse ab Baseline (Visit 2)	Seite: 71
18.Abbildung:	
Itching Score (Juckreiz)	Seite: 72
19.Abbildung:	
Effektivität und Schweregradausprägung mit Korrelationskoeffizient	Seite: 73
20.Abbildung:	
Kulturergebnis (absolut über 5 Visiten)	Seite: 74
21.Abbildung:	
Mittlere Abnahme des Kulturergebnis ab Baseline (Visit 2)	Seite: 75
22.Abbildung:	
Kulturergebnis (mittlere Abnahme)	Seite: 75
23.Abbildung:	
Effizienz und Verträglichkeit	Seite: 78
24.Abbildung:	
Schuppengesamtscore (Dandruff Assessment)	Seite: 79
25.Abbildung:	
Schuppengesamtscore (Dandruff Assessment), relative Verbesserung ab Baseline (Visit 2)	Seite: 80

## Tabellenverzeichnis:

1. Tabelle:		
Überblick über <i>Malassezia</i> Spp. (nach Guého 1996)		Seite: 9
2. Tabelle:		
Charakteristika der einzelnen <i>Malassezia</i> Spezies (Guillot, 1997)		Seite: 11
3. Tabelle:		
Historischer Überblick über Definitionen der „Kopfschuppenerkrankung“		Seite: 13
4. Tabelle:		
Differenzierungsmethoden zur Diagnostik der „Kopfschuppenerkrankung“		Seite: 24
5. Tabelle:		
Zusammensetzung des verwandten <i>mDixon-Agar</i>		Seite: 32
6. Tabelle:		
Zusammensetzung des verwandten <i>I b Agar</i>		Seite: 32
7. Tabelle:		
Bezeichnung und Fettsäureanteil einiger handelsüblicher <i>Tween</i> -Ester		Seite: 39
8. Tabelle:		
Ablauf des Studienplanes über 5 Visiten		Seite: 40
9. Tabelle:		
Zusammensetzung der Placebo- bzw. run-in Medikation		Seite: 42
10. Tabelle:		
Studienablauf		Seite: 43
11. Tabelle:		
Geschlechts- und Altersverteilung der Probanden		Seite: 48
12. Tabelle:		
Verbrauch von Shampoo-Base und Prüfpräparat		Seite: 49
13. Tabelle:		
Durchschnittliche Haarlänge der Probanden in den einzelnen Gruppen		Seite: 50
14. Tabelle:		
Score und positive Testabdrücke		Seite: 51
15. Tabelle:		
Score und positive Testabdrücke für <i>Zink-Pyrrithion</i>		Seite: 52
16. Tabelle:		
Score und positive Testabdrücke für <i>Octopirox</i> <sup>®</sup>		Seite: 53
17. Tabelle:		
Score und positive Testabdrücke für <i>Oxiconazol</i>		Seite: 54

18.Tabelle:		
	Score und positive Testabdrücke für Placebo	Seite: 55
19.Tabelle:		
	Bei allen Probanden (n=82) isolierte <i>Malassezia</i> -Spezies	Seite: 57
20.Tabelle:		
	Anzahl der isolierten Spezies in der <i>Zink-Pyrithion</i> Gruppe (Testarme und Scoreverteilung)	Seite: 58
21.Tabelle:		
	Anzahl der isolierten Spezies in der <i>Octopirox</i> <sup>®</sup> Gruppe (Testarme und Scoreverteilung)	Seite: 59
22.Tabelle:		
	Anzahl der isolierten Spezies in der <i>Oxiconazol</i> -Gruppe (Testarme und Scoreverteilung)	Seite: 60
23.Tabelle:		
	Anzahl der isolierten Spezies in der Placebo Gruppe (Testarme und Scoreverteilung)	Seite: 61
24.Tabelle:		
	Zusammenhang zwischen Score und isolierter Spezies ab Baseline (Visit 2)	Seite: 62
25.Tabelle:		
	Effizienz in den einzelnen Behandlungsgruppen zum Ende der aktiven Behandlungsphase	Seite: 67
26.Tabelle:		
	Korellationskoeffizient zur Abbildung 19	Seite: 73
27.Tabelle:		
	Zusammenhang von Effizienz und Verträglichkeit (Investigator / Proband)	Seite: 76
28.Tabelle:		
	Zusammenhang von Effizienz und Verträglichkeit für alle Studienarme	Seite: 77
29.Tabelle:		
	Schuppengesamtscore (Dandruff Assessment)	Seite: 78

## Abkürzungen:

- *M. Spp.(M.[...])* *Malassezia-Spezies*
- *M. glob.* *Malassezia globosa*
- *M. symp.* *Malassezia sympodialis*
- *M. pachy.* *Malassezia pachydermatis*
- *P.(orbiculare/ovale)* *Pityrosporum*
- *PV* Pityriasis versicolor
- *SD* Seborrhoische Dermatitis
- *mDixon* modifizierter Dixon
- *ZnPt/ZPT/Zink-Pyr.* *Zink-Pyrithion*
- *Zn* *Zink*
- *Oxic.* *Oxiconazol*
- *Octo.* *Octopirox*
- *KET* Ketoconazol
- *MHK* mittlere Hemm Konzentrationen
- *Pity. sim. cap.* *Pityriasis simplex capillitii*
- *DGHM* Deutsche Gesellschaft für Hygiene und Mikrobiologie e.V.
- *Mw* Mittelwerte
- *S\** Standardabweichung

Auch bei der Verwendung von Abkürzungen bzw. Namen und Begriffen, die nicht als urheberrechtlich geschützt gekennzeichnet sind, kann nicht von deren freier Verwendung als nicht eingetragenes Warenzeichen ausgegangen werden.

*Octopirox* ist eingetragenes Warenzeichen der Clariant AG

## 9. Zusammenfassung

In einer doppelblinden, randomisierten, vierarmigen Studie wurde die Wirksamkeit einer *Octopirox*<sup>®</sup>-Shampoo-Formulierung (enthaltend 0,5% *Octopirox*<sup>®</sup> sowie 0,35% ZnCl<sub>2</sub>) mit *Zink-Pyrithion* (0,5%) und *Oxiconazol* (0,25%) in gleicher Shampoo-Grundlage sowie der Shampoo-Grundlage allein (Placebo) auf die Kopfschuppenerkrankung (*Pityriasis simplex capillitii*) miteinander verglichen. Als Zielparameter wurden Schuppengröße, Schuppenmenge, die Quantität und Qualität der gefundenen *Malassezia*-Hefen, sowie das subjektive Befinden der Probanden, gewählt.

Nach einer 2-wöchigen Auswaschphase wurden die Patienten randomisiert einen der 4 Studienarme zugeteilt, die darauf folgende aktive Behandlungsphase umfasste 4 Wochen. Nach weiteren 2 Wochen wurde eine Kontrollvisite abgeschlossen.

88 Probanden wurden in die Studie eingeschlossen, von denen sie 82 regulär beendeten. 6 Probanden erschienen nicht zu allen Visits und mussten ausgeschlossen werden, schwerwiegende unerwünschte Wirkungen wurden nicht beobachtet. Im übrigen waren Effizienz und Verträglichkeit gut. Der Schweregrad der Kopfschuppenausprägung (Kopfschuppenmenge) hatte sich in den einzelnen Studienarmen nahezu gleichmäßig verringert (keine signifikanten Differenzen). In der Placebo-Gruppe ist nur eine geringe Veränderung nachweisbar. In der relativen Besserung zum Ausgangswert (Visit 2) schneiden *Zink-Pyrithion* und *Octopirox*<sup>®</sup> am besten ab. Hinsichtlich der Kopfschuppengröße lassen sich keine wesentlichen Veränderungen erkennen.

In der Nachtherapiephase nahm in den Verum-Gruppen die Schuppenmenge wieder zu, was als weiterer Hinweis für einen Einfluss der aktiven Behandlung auf die Schuppenmenge angesehen werden kann. Jedoch korreliert der günstige Einfluss der aktiven Behandlung auf die Schuppenmenge nicht mit Veränderungen von Quantität und Qualität der Kopfhautflora.

Die quantitative Besiedlung der Kopfhaut mit *Malassezia*-Hefen ließ sich durch die Auswaschphase in allen 4 Armen synchronisieren, jedoch korrelierte die Besiedlungsdichte nicht mit dem Schweregrad der Kopfschuppenausprägung (Kopfschuppenmenge und -größe). Unter Therapie findet sich ein Abfall des Kulturergebnisses besonders in der mit *Zink-Pyrithion* behandelten Gruppe, signifikante Differenzen ergaben sich jedoch nicht. Es ließ sich auch keine Korrelation der Schwere der Kopfschuppenerkrankung mit einzelnen *Malassezia* Spezies ableiten.

Die am häufigsten isolierten Spezies waren *M. globosa* und *M. sympodialis*, wobei die Häufigkeit von *M. globosa* im Laufe der Studie abnahm, die der negativen Kulturergebnisse hingegen zunahm. Da dies auch in Placebo-Gruppe zu beobachten war, muss ggf. auch ein

Einfluss der Shampoo-Grundlage diskutiert werden. Auch die Ergebnisse bezüglich der Pigmentbildung lassen einen Einfluss der Shampoo-Grundlage vermuten. Wie erwartet wurde *M. furfur* signifikant häufiger gefunden. Bezüglich der *Cremophor-EL*<sup>®</sup>-Assimilation wurde ein sehr uneinheitliches Ergebnis gefunden. Möglicherweise waren verunreinigte Kulturisolate und Vermischungen einzelner *Malassezia* Spezies untereinander hierfür verantwortlich. Ein Einfluss der Verum-Placebo-Gruppe auf die *Cremophor-EL*<sup>®</sup>-Assimilation zeigte sich jedoch nicht. Für den subjektiven Parameter Juckreiz findet sich eine Abnahme in allen 4 Studienarmen unter Therapie. Sie ist am stärksten ausgeprägt bei *Octopirox*<sup>®</sup>, ohne jedoch im Vergleich zu den anderen Studienarmen Signifikanz zu erreichen.

Zusammenfassend findet sich ein deutlicher Einfluss einer Verum-Behandlung auf die Kopfschuppenerkrankung.

Jedoch konnte in dieser Studie kein eindeutiger Zusammenhang zwischen dem klinischen Merkmal "Kopfschuppung" und der Besiedlung mit *Malassezia*-Hefen gefunden werden. Dennoch kann unter antimykotischer Therapie eine klinische Besserung erzielt werden, die mit einer Reduktion der Keimzahl einhergeht.

Dieses zunächst ungewöhnliche Ergebnis entspricht aber den bisher bereits publizierten Ergebnissen. Die Pathogenese der Kopfschuppenerkrankung ist letztlich nicht geklärt, jedoch wirken antimykotische Zubereitungen.

## 9. Summary

In a double-blind, randomized, four armed study the effectiveness of a *Octopirox*<sup>®</sup> shampoo formulation (containing 0.5% *Octopirox*<sup>®</sup> as well as 0.35% ZnCl<sub>2</sub>) with *Zinc-Pyrithion* (0.5%) and *Oxiconazol* (0.25%) in same shampoo base as well as the shampoo base alone (Placebo) compared with one another on dandruff (*Pityriasis simplex capillitii*). As primary goal parameters scale size and scale quantity were selected, as secondary goal parameter quantity and quality of the found *Malassezia* yeasts, as well as the subjective scalp condition.

After a two-week washing out phase (*screening*) the patients were assigned randomized one of the 4 study arms (*baseline*) The active treatment phase followed on it covered 4 weeks. After further 2 weeks a review was attached (*post treatment control*).

88 test persons were included into the study, from which 82 regularly terminated. 6 test persons published not to all Visits and have to be excluded. Serious unwanted effects were not observed. In all other respects efficiency and compatibility were good. The severity score level in the individual study arms had been reduced (no significant differences), while in the group of placebo only a small change was provable. Also regarding the reduction of the scale quantity is an almost homogeneous improvement in the groups of treatments, but only an easy improvement in the group of placebo

In the relative improvement to the initial value (baseline, Visit 2) *Zinc-Pyrithion* and *Octopirox*<sup>®</sup> fare best. Regarding the scale size no substantial changes were shown. In the post treatment control phase the scale quantity in the verum groups increased again, which can be regarded as a further note for an influence of the active treatment on scale quantity. However the favorable influence of the active treatment on scale quantity does not correlate with changes of quantity and quality of the individual scalp condition.

The quantitative colonisation of the scalp with *Malassezia* yeasts could be synchronized by the washing out phase (*screening*) in all 4 arms, however the population density did not correlate with the severity score level of dandruff. Especially in the group treated with *Zinc-Pyrithion* a decrease of positiv culture result is found, but without significant differences. Due to the individual dandruff condition no correlation could be derived with individual *Malassezia* species.

The most frequently isolated species were *M. globosa* and *M. sympodialis*. The frequency of *M. globosa* decreased in the course of the study, the negative culture results increased. This was also be observed in the placebo group, an influence of the shampoo base must be discussed.

Also the results concerning pigment formation let an influence of the shampoo base assume, as expected *Malassezia furfur* was found significantly more frequent. Concerning *Cremophor EL*<sup>®</sup>-

assimilation a very non-uniform result was found. Possibly contaminated culture isolate and mixtures of individual *Malassezia* species among themselves were for this responsible. However an influence of the verum or placebo group on the *Cremophor EL*<sup>®</sup> - assimilation did not show up. The subjective parameter itching is increased in all 4 study arms under therapy. It is most strongly pronounced with *Octopirox*<sup>®</sup>, without reaching significance compared with the other study arms.

Comprehensively a clear influence of a verum-treatment is found on dandruff. The severity score level of the disease and the therapy successes cannot be correlated however with the quality and/or quantity of the *Malassezia*-yeast on the scalp. This first of all unusual result however corresponds already with previously published results. In the end the pathogenesis of dandruff is not cleared, however anti mycotic preparations take effect.

## **10. Danksagung**

Zunächst danken möchte ich Herrn Prof. Dr. med. P. Mayser. Er stellte mir nicht nur das interessante Dissertationsthema zur Verfügung, sondern stand mir während der Durchführung des experimentellen Teils in den mykologischen Labors der Dermatologie immer mit neuen Fragestellungen und guten Einfällen zur Verfügung. Trotz seiner zeitraubenden, vielfältigen klinischen Tätigkeiten in der Dermatologie und Andrologie, möchte ich ihm ein grosses Lob für seine herausragenden Betreuung während des experimentellen Teils als auch bei der Verfassung der Doktorarbeit aussprechen.

Mein Dank geht auch an die gesamten Doktoranden und Mitarbeiter des mykologischen Labors, die mir während dieser Zeit nicht nur mit Rat und Tat zur Seite standen. Ein ganz besonderer Dank geht an Frau Ursula Förste, einfach meisterhaft und unschlagbar in der Zubereitung der notwendigen Kulturmedien.

VIELEN DANK

**Für Judith**

## 11. Lebenslauf

### Marcus Blömer

#### Persönliche Informationen

- Geburtsdatum : 23.08.1973
- Geburtsort : Pretoria / Süd-Afrika
- Nationalität : Deutsch
- Familienstand : Ledig

#### Schulbildung

- 08.80 – 07.84 : Astrid-Lindgren-Grundschule Düsseldorf
- 08.84 – 07.93 : Lessing-Gymnasium-Düsseldorf, Abschluss mit Abitur

#### Ersatzdienst

- 10.93 – 12.94 : MSHD der Stadt Düsseldorf

#### Praktische Tätigkeit

- 12.94 – 05.95 : Krankenpflegedienst am St. Vinzenz Krankenhaus Düsseldorf

#### Studium

- 05.95 – 11.01 : Humanmedizin : Justus-Liebig-Universität Gießen

#### Famulaturen

- 08.97 – 09.97 : Chirurgie : St. Vinzenz Krankenhaus Düsseldorf
- 07.98 – 08.98 : Anästhesiologie und Schmerztherapie : Uni-Klinikum Giessen
- 08.98 – 09.98 : Unfallchirurgie : St. Vinzenz Krankenhaus Düsseldorf
- 02.99 – 03.99 : Pädiatrie : Pädiatrische Allgemeinpraxis Giessen

#### Praktisches Jahr

- 10.00 – 02.01 : PJ-Tertial Anästhesiologie : Uni-Klinikum Giessen
- 02.01 – 05.01 : PJ-Tertial Chirurgie : Klinikum Wetzlar / Braunfels
- 05.01 – 09.01 : PJ-Tertial Innere Medizin : Ev. Krankenhaus Giessen

#### Ärztliche Tätigkeiten

- 01.02 – 09.03 : Hochwald Krankenhaus Bad Nauheim  
Abteilung für Anästhesiologie und Intensivmedizin
- 06.03 : Fachkundenachweis Rettungsdienst und notärztliche Tätigkeit
- seit 09.03 : Klinikum der Justus-Liebig-Universität-Giessen  
Abteilung für Anästhesiologie, Intensivmedizin, Schmerztherapie

Ich erkläre: Ich habe die vorgelegte Dissertation selbstständig, ohne unerlaubte fremde Hilfe und nur mit den Hilfen angefertigt, die ich in der Dissertation angegeben habe. Alle Textstellen, die wörtlich oder sinngemäß aus veröffentlichten oder nicht veröffentlichten Schriften entnommen sind, und alle Angaben, die auf mündlichen Auskünften beruhen, sind als solche kenntlich gemacht. Bei den von mir durchgeführten und in der Dissertation erwähnten Untersuchungen habe ich die Grundsätze guter wissenschaftlicher Praxis, wie sie in der „Satzung der Justus -Liebig- Universität Gießen zur Sicherung guter wissenschaftlicher Praxis“ niedergelegt sind, einhalten.

Gießen, im Mai 2005