

Aus der Universitätsklinik und Poliklinik für Dermatologie und Venerologie
an der Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg
(Direktor: Prof. Dr. med. habil. W. Ch. Marsch)



Klinische Wirksamkeit und Verträglichkeit von topisch appliziertem Agmatin

Dissertation

Zur Erlangung des akademischen Grades
Doktor der Medizin (Dr. med.)

vorgelegt

der Medizinischen Fakultät
der Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg

von Dana Ehrich, geb. Weiner
geboren am 13. Dezember 1977 in Halle/Saale

Betreuer: Privatdozent Dr. med. habil. J. Wohlrab

Gutachter:

PD Dr. med. Wohlrab, Halle/S.

Prof. Dr. med. Augustin, Hamburg-Eppendorf

Prof. Dr. med. Küster, Marburg

26.07.2005

21.12.2006

urn:nbn:de:gbv:3-000011515

[<http://nbn-resolving.de/urn/resolver.pl?urn=nbn%3Ade%3Agbv%3A3-000011515>]

Referat

Die vorliegende Arbeit befasst sich mit der Untersuchung der Wirksamkeit und Verträglichkeit von topisch appliziertem Agmatin im Rahmen einer prospektiven, randomisierten, doppelblinden, vehikel- und referenzkontrollierten, ICH-GCP-konformen klinischen Studie. Agmatin, ein Metabolit der Aminosäure Arginin, ist eine physiologisch vorkommende Substanz. Wie in umfangreichen präklinischen Untersuchungen belegt, führt Agmatin zu einer Induktion der intrakeratinozytären Harnstoffsynthese. Es stellt somit eine neuartige Therapiealternative der trockenen Haut zu den bisher bekannten Harnstoff-Präparaten dar, da irritative Effekte und galenische Verarbeitungsprobleme nicht zu erwarten sind.

Die Untersuchung der Testpräparationen (Agmatin 2% und 5% Monopräparate) sowie der Vergleichspräparationen (Agmatin 2% + Harnstoff 5% -, Agmatin 5% + Harnstoff 5% Kombinationspräparate, Harnstoff 5% Monopräparat, Vehikel) erfolgte an 24 Patienten mit atopischer Dermatitis durch zweimal tägliche Applikation über 21 Tage. Durch nicht-invasive, validierte Messmethoden wurden als Zielparameter die Hydratation der Hornschicht sowie der transepidermale Wasserverlust ermittelt. Für die Agmatin 2% und 5% Monopräparate ist eine Wirksamkeit auf die Hydratation und Barrierefunktion der Hornschicht nicht nachweisbar. Im Gegensatz dazu verbessert aber Agmatin 5% in Kombination mit Harnstoff 5% die Wirkung des Harnstoffs und führt zu einer schnelleren Erhöhung der Hydratation und somit der Barrierefunktion der Hornschicht als Harnstoff 5% allein. Bereits 24 Stunden nach Absetzen der Präparate ist eine anhaltende Wirkung nicht nachweisbar. Agmatinhaltige Präparate werden sehr gut vertragen. Es ergeben sich auch anhand von Erythrometrie-Messungen sowie eines visuellen klinischen Scores in der Verträglichkeitstestung keine Hinweise für toxisch irritative Reaktionen.

Die Studiendaten zeigen, dass Agmatin über eine gesteigerte endogene Harnstoffsynthese Einfluss auf die Wasserbindungskapazität und somit auf die Barrierefunktion der Hornschicht nehmen kann. Es ist daher lohnenswert und sinnvoll, anhand weiterer Untersuchungen die Stellung von Agmatin-Monopräparaten oder Zusätzen als klinisch relevante Therapieoption zu klären.

Ehrich, Dana: Klinische Wirksamkeit und Verträglichkeit von topisch appliziertem Agmatin
Halle, Univ., Med. Fak., Diss., 70 Seiten, 2005

Inhaltsverzeichnis

Verzeichnis der Abkürzungen und Symbole

	<u>Seite</u>
<u>1. Einleitung</u>	1
1.1. <u>Aufbau und Funktion der menschlichen Haut</u>	1
1.1.1. Die Epidermis	2
1.1.2. Struktur und Funktion des Stratum corneum	3
1.2. <u>Penetration von Arzneimitteln durch die Haut</u>	6
1.2.1. Einflussfaktoren für die Penetration durch die Haut	7
1.2.2. Passiver Transport (Diffusion)	8
1.2.3. Solvent Drag (Konvektion)	9
1.2.4. Verteilungsverhalten und Thermodynamische Aktivität	9
1.3. <u>Der Harnstoff</u>	10
1.3.1. Allgemeine chemische Eigenschaften	10
1.3.2. Vorkommen und Synthese	11
1.3.3. Pharmakodynamik - Wirkung in der Haut	12
1.3.4. Pharmakokinetik	13
1.4. <u>L-Arginin</u>	14
1.4.1. Physiologische Bedeutung	14
1.4.2. Metabolismus	14
1.4.3. L-Arginin und Haut	16
1.5. <u>Agmatin</u>	17
1.5.1. Allgemeine chemische Eigenschaften	17
1.5.2. Vorkommen und Bedeutung	18
1.5.3. Synthese und Abbau	21
1.5.4. Transport	23
1.5.5. Agmatin und Haut	24
<u>2. Zielstellung</u>	26

<u>3. Material und Methodik</u>	27
3.1. <u>Studiendesign</u>	27
3.2. <u>Studienziele</u>	27
3.3. <u>Patienten</u>	27
3.3.1. Einschlusskriterien	28
3.3.2. Ausschlusskriterien	28
3.4. <u>Studienmedikation</u>	29
3.4.1. Testpräparationen	29
3.4.2. Vergleichspräparationen	29
3.5. <u>Prüfung der Wirksamkeit, Dosisfindung und Wirkdauer von Agmatinsulfat</u>	30
3.5.1. Prüfung der Wirksamkeit und Dosisfindung von Agmatinsulfat	30
3.5.2. Prüfung der Wirkdauer von Agmatinsulfat	32
3.5.3. Zielparameter für die Prüfung der Wirksamkeit, Dosisfindung und Wirkdauer von Agmatinsulfat	32
3.6. <u>Prüfung der Verträglichkeit von Agmatinsulfat</u>	32
3.6.1. Zielparameter für die Prüfung der Verträglichkeit von Agmatinsulfat	33
3.7. <u>Corneometrie</u>	33
3.8. <u>Tewametrie</u>	34
3.9. <u>Visueller Klinischer Score</u>	35
3.10. <u>Erythrometrie</u>	36
3.11. <u>Adverse Events</u>	37
3.12. <u>Statistische Auswertung</u>	37
<u>4. Ergebnisse</u>	39
4.1. <u>Patienten</u>	39
4.2. <u>Corneometrie</u>	39
4.2.1. Prüfung der Wirksamkeit von Agmatinsulfat	39
4.2.2. Dosisfindung von Agmatinsulfat	42
4.2.3. Prüfung der Wirkdauer von Agmatinsulfat	42
4.3. <u>Tewametrie</u>	43
4.3.1. Prüfung der Wirksamkeit von Agmatinsulfat	43

4.3.2.	Dosisfindung von Agmatinsulfat	45
4.3.3.	Prüfung der Wirkdauer von Agmatinsulfat	45
4.4.	<u>Erythrometrie</u>	47
4.5.	<u>Visueller Klinischer Score</u>	48
4.6.	<u>Adverse Events</u>	49
 <u>5. Diskussion</u>		50
5.1.	<u>Wirksamkeit</u>	50
5.1.1.	Ist nach topischer Applikation von Agmatinsulfat ein Einfluss auf die Hydratation und Barrierefunktion der Haut klinisch nachweisbar?	51
5.2.	<u>Dosisfindung</u>	54
5.2.1.	Bei welcher Konzentration von Agmatinsulfat können diese Effekte aufgezeigt werden?	54
5.3.	<u>Wirkdauer</u>	54
5.3.1.	Ist die Wirkung des Agmatins nach Beendigung der Applikation anhaltend?	55
5.4.	<u>Verträglichkeit</u>	55
5.4.1.	Wie werden topische agmatinhaltige Präparate von Patienten mit atopischer Dermatitis vertragen?	55
 <u>6. Zusammenfassung</u>		57
 <u>7. Literaturverzeichnis</u>		58
 <u>8. Thesen</u>		68

Verzeichnis der Abkürzungen und Symbole

α_2	alpha 2
Abb.	Abbildung
ad	bis auf
ADC	Arginindekarboxylase
Agm	Agmatin
ANOVA	Ein-Weg-Varianz-Analyse
°C	Grad Celsius
Ca ²⁺	Calcium-Ion
CIE	Commission International de l'Éclairage
cm	Zentimeter
Co ²⁺	Kobalt-Ion
CO ₂	Kohlendioxid
Da	Dalton
DAC	Deutscher Arzneimittelcodex
DAO	Diaminoxidase
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Deoxyribonucleic acid (Desoxyribonucleinsäure)
EEMCO	European Expert Group on Efficacy Measurement of Cosmetics and Other Topical Products
g	Gramm
g/mol	Gramm pro Mol
GBA	4-Guanidinobutyrat
ggf.	gegebenenfalls
h	hour (Stunde)
HET-CAM	Hen's Egg Test-Chorio-Allantois-Membran
ICH-GCP	International Conference on Harmonisation Good Clinical Practice
IgA	Immunglobulin A
i.v.	intravenös
kDa	Kilodalton
L-	Levo-
LF	Leerfeld
LH-RH	luteinisierendes Hormon-Releasing Hormon

LPS	Lipopolysaccharid
m	Masse
m ²	Quadratmeter
min	Minute
mm	Millimeter
µm	Mikrometer
Mn ²⁺	Mangan-Ion
mRNA	Messenger-Ribonucleic acid (Boten-Ribonucleinsäure)
n	Anzahl
Na ⁺	Natrium-Ion
NADPH	Nicotinsäureamid-adenin-dinucleotidphosphat
ng/g	Nanogramm pro Gramm
ng/ml	Nanogramm pro Milliliter
NHEK	native humane epidermale Keratinozyten
NMDA	N-Methyl-D-Aspartat
NMF	Natural Moisturizing Factor
NO	Stickstoffmonoxid
NOS	Stickstoffmonoxid-Synthase
eNOS	endotheliale NOS
iNOS	induzierbare NOS
nNOS	neuronale NOS
ODC	Ornithindekarboxylase
O/W	Öl-in-Wasser
p	Irrtumswahrscheinlichkeit
Ph. Eur.	Pharmakopöe, Europäische
Tab.	Tabelle
TEWL	Transepidermal Water Loss (transepidermaler Wasserverlust)
W/O	Wasser-in-Öl
z.B.	zum Beispiel

1. Einleitung

1.1 Aufbau und Funktion der menschlichen Haut

Die menschliche Haut stellt mit einer Gesamtfläche von 1,5-2 m² und einem Gewicht von etwa 16% des Körpergewichtes (ca. 3,5-10 kg) das größte Organ des Menschen dar. Die Dicke der Haut (ohne Fettgewebe) schwankt zwischen 1,5 und 4 mm. Die Oberfläche ist von einem Fettfilm, hauptsächlich bestehend aus Talg und Schweiß, bedeckt. Dieser besitzt einen pH-Wert von etwa 5,7, somit herrscht ein saures Milieu auf der Hautoberfläche [16, 36].

Als Abgrenzung des Organismus zur äußeren Umwelt besitzt sie zahlreiche Funktionen, die sie aufgrund ihres komplexen Aufbaus und speziellen Eigenschaften, wie z.B. ihre Zugfestigkeit, Dehnbarkeit und Elastizität, ausüben kann [36]:

- Sie schützt:
den Organismus gegen äußere mechanische, chemische und physikalische Einflüsse, sowie vor dem Eindringen von Mikroorganismen. Eine wesentliche Rolle spielt die sogenannte Barrierefunktion, die einen Stoffaustausch zwischen Organismus und Umwelt weitestgehend unterbindet [14, 16, 36, 59].
- Als Regulator des Wasserhaushaltes:
verhindert sie einerseits die Austrocknung des Körpers, ermöglicht aber andererseits auch eine Wasserverdunstung [16, 59].
- Als Thermoregulator:
wirkt sie mit Hilfe einer äußeren (Haarkleid) und inneren (Fettschicht) Isolationsschicht einem Wärmeverlust entgegen. Eine dosierte Wärmeabgabe wird durch Verengung oder Erweiterung der Hautgefäße, Schweißbildung und Wasserdiffusion ermöglicht [16, 36, 59].

- Sie erfüllt Sinnesfunktionen:
durch in der Haut befindliche Rezeptoren für Wärme, Kälte, Schmerz und Tastreize [16, 36, 59].

- Sie wirkt als „Immunorgan“:
da sie eigene antigenpräsentierende Zellen- die Langerhans-Zellen und auch im Normalzustand Lymphozyten besitzt. Ferner wird durch Drüsen produziertes sekretorisches IgA, auf die Hautoberfläche abgegeben [16].

- In der Funktion eines Ausscheidungsorganes:
wird über die Haut eine Reihe von Substanzen, neben Wasser auch Elektrolyte, Proteine, Aminosäuren, Harnstoff sowie körperfremde Stoffe abgegeben [16, 59].

Die Haut ist von außen nach innen aus folgenden drei Schichten aufgebaut:

1. Epidermis (Epithel)
2. Dermis (Bindegewebe, Gefäße, Nerven)
3. Subkutis (Fettgewebspolster) (Abb. 1)

Die Hautanhangsorgane (Haare, Nägel, Talg- und Schweißdrüsen) sind epidermaler Herkunft, sind aber in der Dermis eingebettet [16].

1.1.1. Die Epidermis

Die Epidermis ist ein mehrschichtig verhorntes Plattenepithel. Ihre Dicke variiert zwischen 30 und 300 µm je nach Lokalisation, Alter und Geschlecht. Sie ist neural versorgt, jedoch frei von Gefäßen, so dass die Versorgung durch die darunter liegende gefäßreiche Dermis durch Diffusion erfolgt [36]. Die Keratinozyten machen mit 90% den Hauptanteil der Epidermis aus. Des weiteren beherbergt sie auch melaninproduzierende Melanozyten, antigenpräsentierende Langerhans-Zellen, Merkelzellen (Druckrezeptorzellen) sowie in kleiner Anzahl auch Lymphozyten [16, 36]. Die Epidermis stellt ein klassisches Proliferationsgewebe dar, welches einer ständigen Erneuerung unterliegt. Die Keratinozyten entstehen im Stratum basale aus Stammzellen und wandern mit zunehmender

Differenzierung unter Abflachung und Verhornung an die Oberfläche, wo sie als Hornschüppchen abgeschilfert werden [36, 59]. Ein solcher Zyklus ausgehend von der Stammzelle bis zur Abschuppung dauert etwa 4 Wochen [36]. Je nach Differenzierungsgrad der Keratinozyten wird die Epidermis in vier Schichten unterteilt:

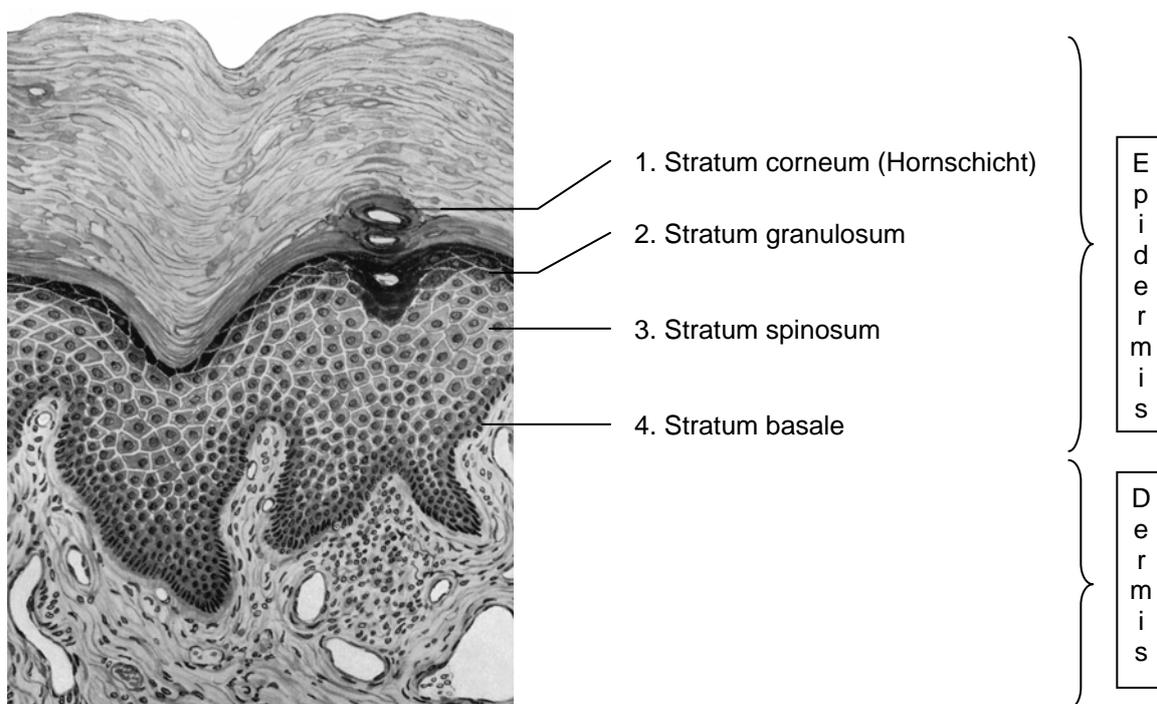


Abb. 1 Histologischer Schnitt durch die menschliche Haut (Fingerbeere) [aus 4]

Um wichtige Funktionen der Haut zu gewährleisten, produzieren die Keratinozyten Keratin und Lipide, sie sind aber auch in der Lage verschiedenste Substanzen im Rahmen von entzündlichen und immunologischen Reaktionen zu sezernieren [16]. Der Interzellularraum beinhaltet Glykosaminoglykane und ist bis auf Höhe des Stratum granulosum auch für höhermolekulare Stoffe durchgängig. Ab dem Übergang zum Stratum corneum wird der Interzellularraum aufgrund einer starren impermeablen Kittsubstanz undurchlässig [16].

1.1.2. Struktur und Funktion des Stratum corneum

Das Stratum corneum bildet die äußerste Hautschicht des Organismus. Es ist Träger der Barrierefunktion und besitzt außerdem eine Reservoirfunktion [16, 14, 24, 59] (Abb. 2).

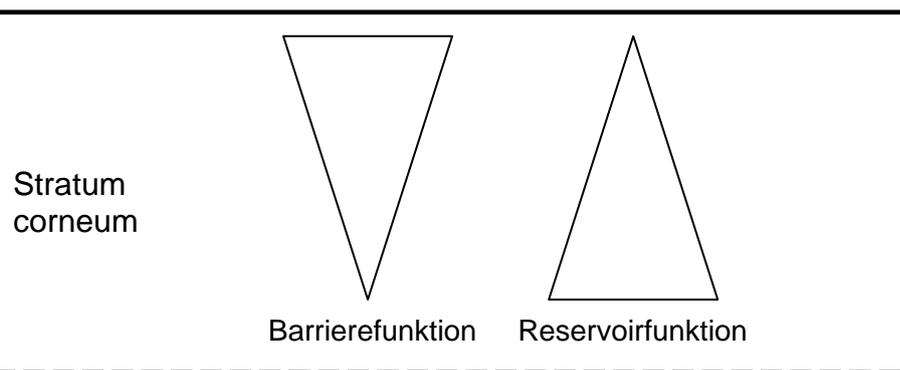


Abb. 2 Barriere- und Reservoirfunktion der Hornschicht

Die Hornschicht ist reißfest und für Wasser sowie auch für wasserlösliche Substanzen fast völlig undurchlässig. Niedermolekulare Stoffe, bevorzugt lipidlösliche Substanzen, können in geringem Umfang eindringen [16]. Relativ empfindlich ist sie gegenüber organischen Lösungsmitteln und Detergenzien [16]. Es kommt in Richtung der Hornschichtoberfläche zu einer starken Abnahme des Wassergehaltes, von ca. 65% in den tiefen Lagen der Hornschicht auf ca. 20% an der Oberfläche [9, 19]. Das Wasser ist vor allem in den Corneozyten lokalisiert [22]. Es liegt im Stratum corneum 1.) in freier Form, 2.) in elektrostatisch an hydrophile Substanzen leicht gebundener Form sowie 3.) zu 20-30% in durch kovalente Bindungen an Proteine fest gebundener Form vor [19, 22, 33]. Aufgrund des Aminosäure- und Proteingehaltes der Hornzellen wirkt die Hornschicht hygroskopisch, was bei längerer Wasserexposition zu einer Schwellung führt. Aufgebaut ist die Hornschicht aus 10-20 Lagen flacher, abgestorbener, starrer, mit Keratin in einer amorphen Proteinmatrix dicht gefüllter, vollständig verhornter Zellen. Sie stellen das Endprodukt der Differenzierung dar. Die Corneozyten sind von der sogenannten Cornified Envelope umhüllt, einer Schale, die hauptsächlich Proteine und in der äußersten Schicht spezielle Lipide enthält [27]. Der Zusammenhalt der Hornschicht selbst wird vor allem durch interzelluläre Proteinstrukturen, den Corneodesmosomen, erreicht, deren Abbau zur Abschilferung der Corneozyten führt [27, 75].

Der Interzellularraum beherbergt hier im wesentlichen hydrophobe Substanzen: Ceramide, Cholesterol und freie Fettsäuren [27, 75]. Diese sind in breiten, parallel gerichteten Lipidlamellen angeordnet, wobei sich hydrophile und lipophile Schichten abwechseln. Sie bewirken somit als eine Art Kittsubstanz einen wasserdichten Abschluss des Interzellularraumes [16, 22, 23]. Die Art, Menge und

Organisation der Lipide sind verantwortlich für die Aufrechterhaltung der Barrierefunktion der Hornschicht [27, 48, 49, 75].

Neben den lipophilen sind aber auch hydrophile Elemente vorhanden, die für die Funktionsweise der Hornschicht essentiell sind. Substanzen, die Wasser innerhalb der Hornschicht binden, werden als Wasserbindungsfaktoren oder Natural Moisturizing Factor (NMF) bezeichnet [24]. Dieser ist ein Mix aus verschiedenen niedermolekularen, wasserlöslichen Substanzen, der neben Harnstoff, ein wichtiger Vertreter hinsichtlich therapeutischer Verwendung, hauptsächlich aus Aminosäuren, Lactat, Pyrrolidincarbonsäure und verschiedenen anorganischen Ionen besteht (Tab. 1) [24, 48, 75]. Der NMF ist vor allem in den Corneozyten lokalisiert und macht rund 10% der Corneozytenmasse aus [48]. Bestandteile des NMF sind auch extrazellulär zu finden, insbesondere Harnstoff, Lactat und Zucker [61, 75]. Die Komponenten des NMF werden in erster Linie im Corneozyten erzeugt, durch komplette Hydrolyse eines Proteins, des Filaggrins [27]. Durch Anziehen und Binden von Wasser in der Hornschicht ist der NMF verantwortlich für die Regulation der Hydratation [48].

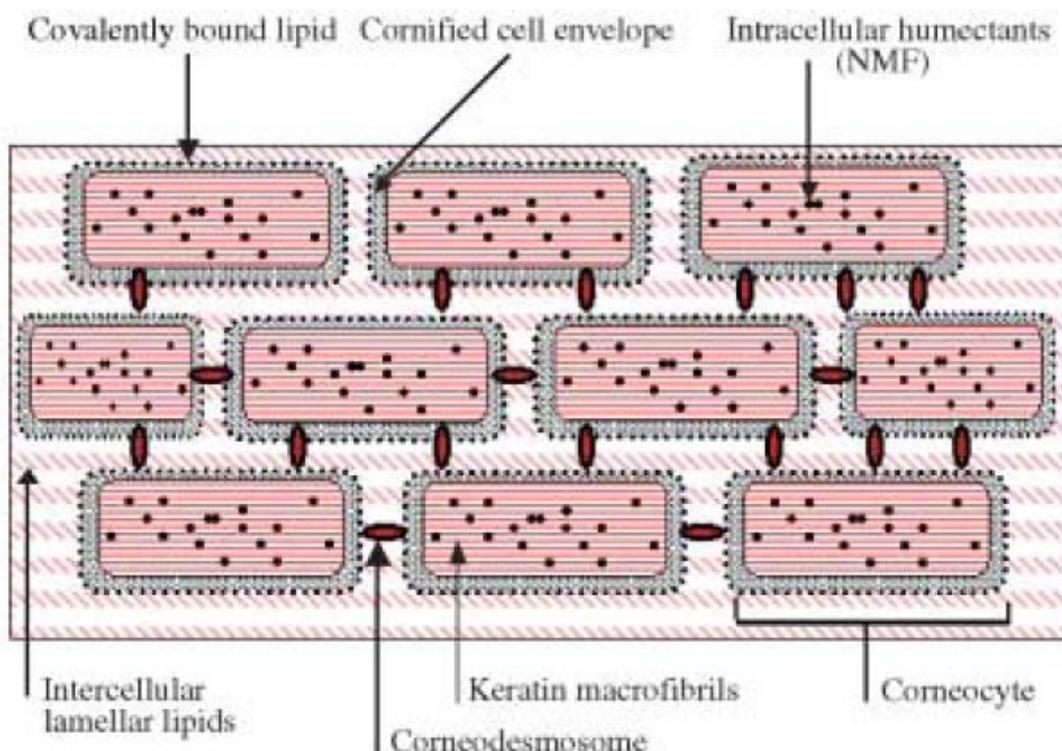


Abb. 3 Schematische Darstellung der strukturellen und funktionellen Komponenten des Stratum corneum als „Ziegel und Mörtel“ Modell [aus 75]

Tab. 1 Chemische Zusammensetzung des Natural Moisturizing Factor (NMF), [nach 75]

Bestandteil	Anteil am NMF (%)
freie Aminosäuren	40
Pyrrolidoncarbonsäure	12
Lactat	12
Zucker	8,5
Harnstoff	7
Anorganische Ionen (Chlorid, Natrium, Kalium, Calcium, Magnesium)	18
Ammoniak, Harnsäure, Glucosamin, Kreatin	1,5
Phosphat	0,5
Citrat, Formiat	0,5

1.2. Penetration von Arzneimitteln durch die Haut

Die Hautoberfläche stellt für viele Substanzen eine schlecht zu durchdringende Barriere dar [14].

Zielort der Arzneimittel sind meist tiefere Schichten der Haut, wie das Stratum germinativum (Stratum basale und spinosum auch malpighische Schicht genannt) und die Dermis [16].

Es gibt zwei Möglichkeiten für Arzneimittel, die Haut zu penetrieren:

1. transepidermal : interzellulär (unpolare) oder transzellulär (polare Wirkstoffe)
2. durch Poren: über Haarbälge mit Talgdrüsen und Ausführungsgänge von Schweißdrüsen [14, 22, 24].

Insbesondere gilt die Hornschicht als Hauptbarriere gegenüber Dermatika. Sie ermöglicht niedermolekularen, bevorzugt lipidlöslichen, Stoffen in geringem Umfang zu penetrieren, hochmolekularen Stoffen jedoch nicht [16]. Eine erleichterte Aufnahme von Substanzen über Öffnungen der Hautanhangsgebilde ist möglich [14, 24], jedoch spielt dieser Penetrationsweg quantitativ eine untergeordnete Rolle, da die Porenfläche nur etwa 0,1 % der Hautoberfläche ausmacht [16]. Aufgrund ihrer Eigenschaft eindringende Substanzen binden zu

können und diese nur langsam wieder freizusetzen, fungiert die Hornschicht als Reservoir [14, 16, 24, 59].

1.2.1. Einflussfaktoren für die Penetration von Arzneimitteln

Die Aufnahme von Substanzen in die Haut ist von zahlreichen Faktoren abhängig. Man kann diese in folgende drei Gruppen unterteilen [24]:

1. Beschaffenheit der Haut

Alter, Hauttyp, Größe und Lokalisation der Applikationsfläche spielen eine Rolle für den Umfang der Penetration. Vorliegende Barrierefunktionsstörungen und eine Erhöhung des Wassergehaltes (Okklusivverbände) steigern diesen [14, 24, 36, 59].

2. Einfluss des Arzneistoffes:

Die Stoffkonzentration sowie seine physikochemische Eigenschaften haben Einfluss auf die Penetration, so ist neben einer guten Lipidlöslichkeit auch eine ausreichende Wasserlöslichkeit für eine gute Aufnahme der Substanz in die Haut nötig [14, 24].

3. Einfluss der Arzneiform:

Hierbei müssen Eigenschaften des Vehikels sowie Wechselwirkungen mit Hilfsstoffen beachtet werden [24]. Sogenannte Penetrationsvermittler wie Dimethylsulfoxid (DMSO), Dimethylacetamid und Dimethylformamid können den Durchtritt durch die Haut erleichtern [14, 24]. Durch die Vehikelapplikation steigt die Hydratation der Hornschicht, wodurch die Penetration verbessert wird [16]. Eine große Rolle spielt das Löslichkeitsverhältnis der penetrierenden Substanz zwischen Vehikel und Hornschicht. Der Wirkstoff wird um so besser aus seiner Grundlage abgegeben, je schlechter er sich in dieser löst und je leichter er sich im Akzeptor (Hornschicht) löst [14, 16, 24, 59].

1.2.2. Passiver Transport (Diffusion)

Sowohl für die Wirkstofffreigabe aus dem Vehikel als auch für den Wirkstofftransport durch die Haut ist die Diffusion maßgebend [24]. Dieser Prozess gehorcht dem Fick'schen Diffusionsgesetz [16]:

$$\frac{dm}{dt} = -D \cdot \frac{A}{d} \cdot \Delta c$$

$\frac{dm}{dt}$: Massestrom (steady state)

D: Diffusionskoeffizient

A: Applikationsfläche

d: Diffusionsstrecke

Δc : Konzentrationsdifferenz

Hierbei wird die Hornschicht als isotrope Verteilungsmembran angesehen, der Einfluss des Vehikelsystems (Lipidzusammensetzung, Hydratation) und die Interaktion mit Hautbestandteilen (Affinität, Metabolisierung) bleiben unberücksichtigt. Die pro Zeiteinheit diffundierte Stoffmenge ist umso größer, je größer die Applikationsfläche, die Konzentrationsdifferenz, der Diffusionskoeffizient und je kürzer die Diffusionsstrecke (Dicke der Hornschicht) [16]. Der Diffusionskoeffizient D ist abhängig von der Temperatur, der Viskosität des Diffusionsmediums und des Molekülradius:

$$D = \frac{R \cdot T}{6 \cdot \pi \cdot \eta \cdot r \cdot N}$$

R: Gaskonstante

T: absolute Temperatur

η : dynamische Viskosität

r: Teilchenradius

N: Avogadrozahl

1.2.3. Solvent drag (Konvektion)

Bei diesem Vorgang wird der Einfluss coapplizierter Lösungsmittel berücksichtigt. Der Wirkstoff wird transportiert, indem er den Strömungskräften dieser folgt. Im Hagen-Poiseuille'schen Gesetz ist der hydrodynamische Druckgradient, an den dieser Kotransport gebunden ist, mit einbezogen:

$$\frac{dm}{dt} = \frac{n \cdot \pi \cdot r^4}{8 \cdot \eta} \cdot \frac{dp}{dx}$$

n : Porenzahl

r : Porenradius

$\frac{dp}{dx}$: hydrodynamischer Druckgradient

η : Viskositätskonstante

1.2.4. Verteilungsverhalten und Thermodynamische Aktivität

Während der Penetration unterliegt der Wirkstoff verschiedenen Verteilungsprozessen. Um Aussagen zum Penetrationsverhalten treffen zu können, wird der Verteilungskoeffizient V_k , in dem das Verteilungsverhalten und die Löslichkeit des Wirkstoffes einbezogen werden, bestimmt:

$$V_k = \frac{C_{\text{lipophil}}}{C_{\text{hydrophil}}}$$

C_{lipophil} : Löslichkeit des Wirkstoffes im lipophilen Lösungsmittel

$C_{\text{hydrophil}}$: Löslichkeit des Wirkstoffes im hydrophilen Lösungsmittel

Dabei wird in einem vereinfachten Modell Oktanol als lipophile und Wasser als hydrophile Komponente verwendet. Durch sowohl lipophile als auch hydrophile Bereiche im Stratum corneum kann ein Verteilungskoeffizient um 1 als ideal für eine rasche Penetration angesehen werden.

In engem Zusammenhang mit dem Verteilungskoeffizienten steht die thermodynamische Aktivität, welche die Bereitschaft des Wirkstoffes das Vehikel unter minimalem Energieaufwand zu verlassen, um in den Akzeptor (Hornschicht) überzugehen, ausdrückt.

Die thermodynamische Aktivität ist abhängig vom Molenbruch und vom effektiven lösungsmittelspezifischen Aktivitätskoeffizienten:

$$a = x \cdot y$$

a: thermodynamische Aktivität

x: Molenbruch

y: Aktivitätskoeffizient (lösungsmittelspezifisch)

Bei gleichbleibendem Aktivitätskoeffizienten wächst die thermodynamische Aktivität mit der Konzentration des gelösten Stoffes.

1.3. Der Harnstoff

1.3.1. Allgemeine chemische Eigenschaften

Harnstoff ist eine physiologisch vorkommende Substanz. Wichtige chemische Kenngrößen und Eigenschaften sind nachfolgend zusammengefasst:

Synonyme	Kohlensäurediamid, Carbamid, Carbonyldiamid, Urea
Strukturformel	$\begin{array}{c} \text{NH}_2 \\ \diagup \\ \text{O} = \text{C} \\ \diagdown \\ \text{NH}_2 \end{array}$
Summenformel	CH ₄ N ₂ O
Molmasse	60,06 g/mol
Schmelzpunkt	132-133 °C
Relative Dichte	1,335 g/mol
Eigenschaften	<ul style="list-style-type: none"> - farb- und geruchlos - salpeterartig schmeckend - Zustandsform: Kristalle, oder weißes , kristallines Pulver - schwach hygroskopisch - sehr leicht wasserlöslich - langsamer Zerfall in wässriger Lösung in CO₂ und Ammoniak - diffundiert durch biologische Membranen

1.3.2. Vorkommen und Synthese

Der Harnstoff ist das Stoffwechselendprodukt des Proteinabbaus beim Menschen und Säugetier und kommt praktisch in allen Körperflüssigkeiten vor [72, 97]. Die Harnstoffbildung läuft in der Leber im sogenannten Harnstoffzyklus oder Krebs-Henseleit-Zyklus ab und dient der Entgiftung des beim Eiweißstoffwechsel anfallenden Ammoniaks (Abb. 4). Aus Ammoniak und Kohlendioxid entsteht über einige Zwischenprodukte L-Arginin, welches unter Einfluss der hepatischen Arginase zu L-Ornithin und Harnstoff umgesetzt wird [72].

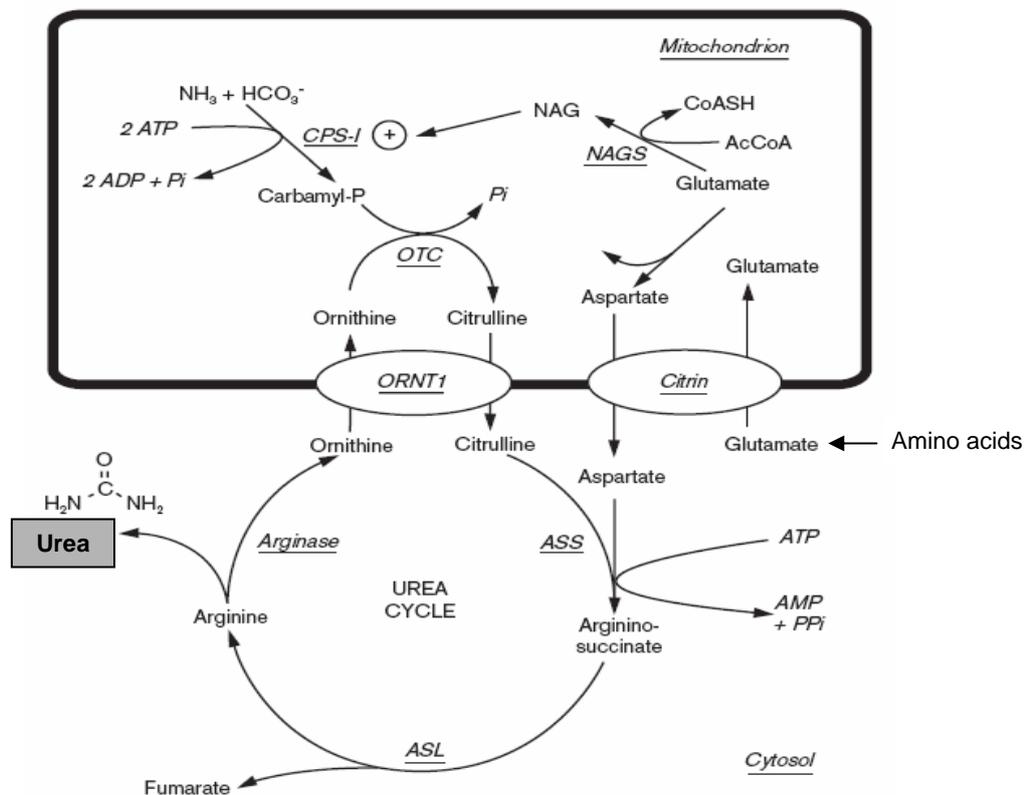
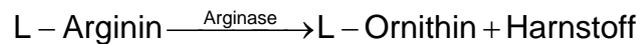


Abb. 4 Harnstoffzyklus nach Krebs und Henseleit [aus 54]

In der Epidermis liegt der Harnstoffgehalt bei 1,42g pro 100g entfettetem Trockengewebe [57, 72], bei Männern etwas höher als bei Frauen und ansteigend bis zum 45. Lebensjahr [57]. Der Hauptanteil dieses Harnstoffs stammt aus dem Schweiß [57, 72]. Die maximale Konzentration an Harnstoff ist daher in den oberflächlichen Hornschichtlagen zu finden, sie nimmt mit zunehmender Tiefe stark ab [9]. Ein kleiner Teil entsteht während des Verhornungsprozesses

bedingten Eiweißum- und -abbau im Zytoplasma des Keratinozyten aus L-Arginin durch die extrahepatische Arginase [57, 72]:



Im Stratum basale und unterem Stratum granulosum konnte eine hohe Arginaseaktivität nachgewiesen werden, die jedoch in Richtung Stratum corneum, wo keine Arginaseaktivität vorliegt, abnimmt [93, 96]. In der Hornschicht stellt der Harnstoff einen wesentlichen Bestandteil des Natural Moisturizing Factors dar und ist somit für die Aufrechterhaltung der Wasserbindungskapazität verantwortlich [57, 72]. Durch die Bindung an intrazelluläre, nichtfibrinöse Proteine verursacht der Harnstoff vor allem eine Steigerung des intrazellulären Wasseranteils [24, 97]. Bei Hauterkrankungen mit vorliegenden Barrierefunktionsstörungen und bei der Altershaut besteht ein Harnstoffdefizit im Stratum corneum [57, 72, 89, 97, 98].

1.3.3. Pharmakodynamik - Wirkung in der Haut

Der Harnstoff wird bereits seit langem aufgrund seiner Eigenschaften erfolgreich in der dermatologischen Therapie und Hautpflege verwendet (Abb.5).

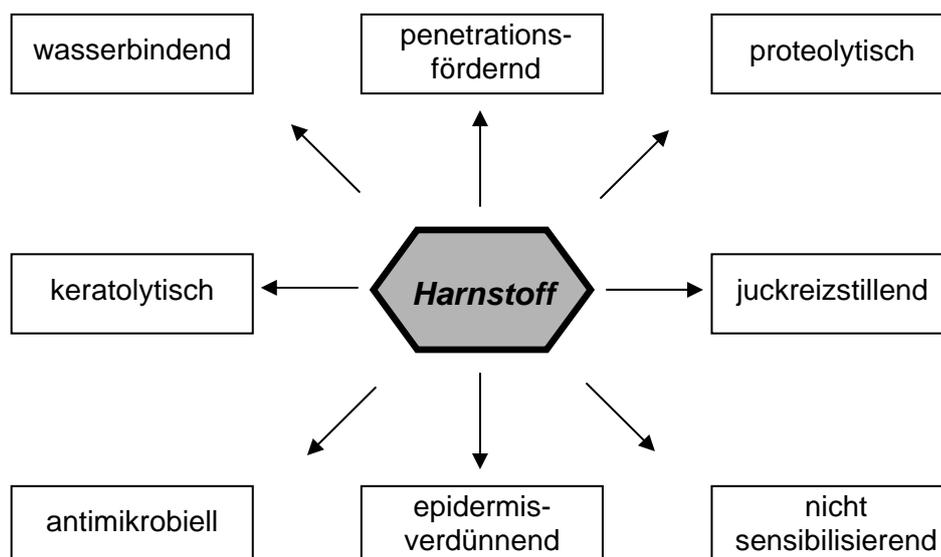


Abb.5 dermatologische Eigenschaften von Harnstoff [nach 97]

Dabei kommt er zum einen als Monotherapie bei vor allem xerotischen, juckenden Dermatosen sowie schuppenden Läsionen und Hyperkeratosen zum

Einsatz, um die Hautfeuchte und die Hautbarriere zu verbessern, den Juckreiz zu vermindern, Schuppen zu lösen und die Therapie durch einen zusätzlich antimikrobiellen Effekt [20] zu unterstützen. Zum anderen wird der Harnstoff in Kombination mit weiteren Arzneistoffen verwendet, da er sowohl die Liberation aus dem Vehikel als auch die Penetration dieser verbessert [6, 12, 71, 72, 89, 92, 97, 98]. Die häufigste Nebenwirkung ist das Auftreten eines brennenden Schmerzes beim Auftragen auf Hautläsionen, für die der niedrige pH-Wert der Präparate zur Stabilisierung des Harnstoffs verantwortlich gemacht wird [6, 12, 57, 89, 90, 92]. Auf gesunder Haut werden Konzentrationen bis 20% Harnstoff reaktionslos vertragen [72], bei Neurodermitikern treten allerdings ab etwa 10% Harnstoff Hautirritationen auf [90]. Als gut verträglich und gleichzeitig therapeutisch wirksam haben sich Präparationen mit 5-10% Harnstoffgehalt bewährt [21, 44, 46, 88, 89, 97].

1.3.4. Pharmakokinetik

Für die Harnstoffwirksamkeit spielt seine Penetrationskinetik, das heißt wie viel Harnstoff in Abhängigkeit von der Zeit in die Hautschichten eindringt, eine entscheidende Rolle. Dies ist von verschiedenen Faktoren, wie zum Beispiel der Konzentration abhängig. Die größte Bedeutung ist jedoch der Abhängigkeit vom Vehikel beizumessen [58, 90, 97]. Um eine intensivere und länger andauernde Steigerung der Hydratationsfähigkeit der Haut zu bewirken, ist eine W/O-Emulsion einer O/W-Emulsion vorzuziehen. Hier ist eine gleichmäßigere Verteilung des Harnstoffs über die gesamte Hornschicht sowie eine erhöhte Konzentration in der Epidermis zu finden. Generell sind ca. 80% der penetrierten Harnstoffmenge nur in den äußeren Hornschichtlagen zu finden. In die Epidermis und Dermis penetrieren nur vergleichsweise geringe Konzentrationen [97].

Aus diesem Grund wäre eine Erhöhung der Harnstoffkonzentration im Präparat theoretisch sinnvoll, um eine erhöhte Wirksamkeit zu erzielen, dem steht jedoch erstens ein dabei ebenfalls erhöhtes irritatives Potential und zweitens eine erhöhte Schwierigkeit bei der galenischen Verarbeitung aufgrund der Instabilität der Substanz gegenüber.

Daher wurden Untersuchungen hinsichtlich der Induktion der endogenen Harnstoffsynthese durchgeführt. Dem L-Arginin als Vorstufe des Harnstoffes im Keratinozyten galt besondere Aufmerksamkeit.

1.4. L-Arginin

1.4.1. Physiologische Bedeutung

L-Arginin ist eine semi-essentielle Aminosäure, nicht essentiell für erwachsene, gesunde Organismen, da eine endogene Synthese möglich und ausreichend ist, jedoch essentiell bei Wachstum und Krankheit. Wie alle proteinogenen Aminosäuren liegt auch das Arginin physiologisch in der L-Form vor [37, 93]. Der L-Arginin Metabolismus spielt in vielen Bereichen eine große Rolle. So dient L-Arginin als Vorstufe von Proteinen, NO, Harnstoff, Kreatin, Prolin, Polyaminen, Agmatin und Glutamat und ist somit unter anderem an der Steuerung von Vasodilatation, Immun- und Entzündungsreaktionen (NO), Zellproliferation und – differenzierung (Polyamine), der Harnstoffbildung im Harnstoffzyklus der Leber, an der Kollagensynthese (Prolin), sowie an der Bildung von Zell-Signal-Molekülen (NO, Glutamat, Agmatin) beteiligt [99]. Ferner kann L-Arginin die Sekretion von Hormonen, wie Insulin, Wachstumshormon, Glukagon, Prolaktin, stimulieren [93, 99].

1.4.2. Metabolismus

Die Aufnahme von L-Arginin in die Zelle erfolgt über spezifische Transportsysteme, unspezifische Aminosäuretransportsysteme, wie das A-, ASC-, L-System, spielen quantitativ eine untergeordnete Rolle. Unter den spezifischen Transportsystemen ist neben dem $b^{0,+}$, $B^{0,+}$ und y^+L -System das y^+ -System von größter Bedeutung, ein Na^+ -unabhängiger, für Arginin, Lysin und Ornithin hoch affiner Transporter [54, 95, 96, 99]. Die Expression dieser Transportsysteme ist zellspezifisch und unterliegt einer dynamischen Regulation, induzierbar durch bakterielle Endotoxine und inflammatorische Zytokine [99].

Der L-Arginin Metabolismus ist sehr komplex mit einer Reihe von Interaktionen, neben der Verwendung für die Proteinsynthese, dient es als Substrat für vier Enzyme (Abb. 6):

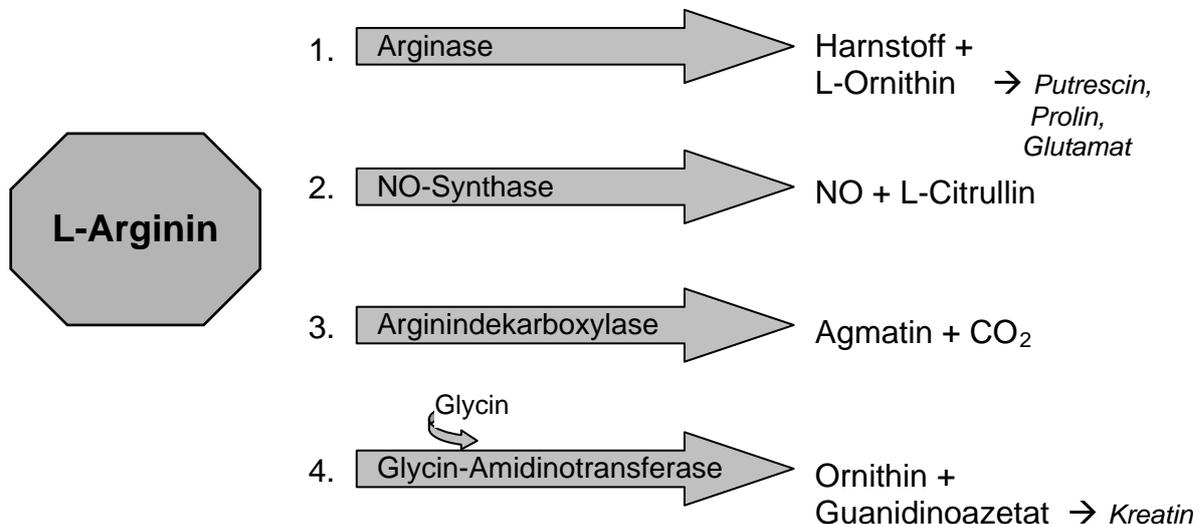


Abb.6 Stoffwechselwege des L-Arginins in Säugetierzellen

Die durch die hepatische Arginase katalysierte Reaktion in der Leber ist Bestandteil des Harnstoffzyklus. Die extrahepatische Arginase konnte in vielen verschiedenen Geweben nachgewiesen werden, das gebildete L-Ornithin dient als Vorläufer für die Prolin-, Glutamat- und über Putrescin für die Polyaminsynthese [93, 99]. In der menschlichen Haut ist die extrahepatische Isoform auch in Keratinozyten, für die Harnstoffproduktion, und in mikrohämovaskulären Endothelzellen zu finden [93, 95, 96].

L-Arginin kann durch die drei Isoformen der NO-Synthase, 1. nNOS (neuronale NOS, konstitutiv), 2. eNOS (endotheliale NOS, konstitutiv), 3. iNOS (induzierbare NOS) unter Bildung von NO umgesetzt werden [67, 99]. Die NOS kommt in verschiedensten Zelltypen vor, Keratinozyten exprimieren konstitutiv die nNOS, wohingegen Fibroblasten in der Dermis und andere Zelltypen in der Haut die eNOS exprimieren [8]. Unter dem Einfluss von bakteriellen Endotoxinen oder Zytokinen scheinen alle Hautzellen in der Lage zu sein, auch die iNOS zu exprimieren, so konnte beispielsweise eine erhöhte iNOS-Aktivität in Psoriasisherden sowie bei anderen entzündlichen Hauterkrankungen gefunden werden [8, 67]. In der Haut spielt NO eine wesentliche Rolle in der Steuerung normaler physiologischer und auch pathophysiologischer Prozesse. In geringen

Konzentrationen ist es für die Regulation und Aufrechterhaltung der Barrierefunktion und der mikrovaskulären Perfusion von Bedeutung [8].

Die Aktivität der Arginindekarboxylase variiert erheblich in den verschiedenen Geweben, bei der Ratte wurde die höchste in Aorta und abfallend in Niere, Leber, Magen entdeckt [76].

Ein großer Teil des Gesamtkörper-Arginins wird mit Glycin in der Niere für die Kreatinsynthese verbraucht. [99]

1.4.3. L-Arginin und Haut

Wohlrab et al. [93, 96] konnte in präklinischen Untersuchungen an nativen Keratinozyten zeigen, dass L-Arginin die Aktivität, nicht jedoch die Expression, der extrahepatischen Arginase erhöht und somit die intrazelluläre Harnstoffproduktion steigert. Proliferationshemmende sowie zytotoxische Effekte werden bei praktisch relevanten Konzentrationen nicht beobachtet, genauso wenig irritative Effekte am HET-CAM-Modell. Auffällig ist die Beobachtung, dass bei relativ geringen L-Arginin Konzentrationen eine Perfusionserhöhung am HET-CAM-Modell mittels Laser-Doppler-Fluxmetrie messbar ist. Die Ursache scheint in der Aktivität der eNOS zu liegen, welche L-Arginin unter NO-Freisetzung umsetzt und somit eine Vasodilatation und Perfusionserhöhung verursacht. Ein relevantes Konzentrations-Zeit-Profil konnte nachgewiesen werden, galenisch lässt sich das L-Arginin gut verarbeiten. L-Arginin schien hinsichtlich der Wirksamkeit und Verträglichkeit eine geeignete Option für die topische Applikation auf trockener Haut zu sein [93]. Auch die Ergebnisse bei der Anwendung an hautgesunden Probanden, Neurodermitis Patienten und an Altershaut waren vielversprechend. So konnte sowohl bei topischer Applikation von 10% L-Arginin im Rahmen einer Pilotstudie [93] als auch bei Applikation von 2,5% Argininhydrochlorid-haltiger Salbe [62] eine Reduktion des transepidermalen Wasserverlustes als auch eine Verbesserung der Hydratation der Hornschicht festgestellt werden, ein Anstieg des Harnstoffgehaltes war nachweisbar. Irritativ-toxische Reaktionen traten nicht auf. Jedoch konnte bei längerer Anwendung des L-Arginins bei einem größeren Patientengut häufig das Auftreten von Entzündungen und eine Verschlechterung des Hautbildes beobachtet werden [94, 95]. Somit zeigte sich eine praktische Relevanz, der schon von Wohlrab et al. beobachteten Induktion der NO-Synthese. In der

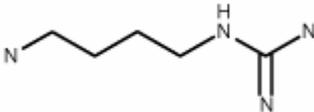
menschlichen Haut konnten in vivo proinflammatorische und zytotoxische Effekte von NO beschrieben werden [67]. Die proinflammatorischen Effekte sind gekennzeichnet durch das Auftreten von Erythemen, Hautverdickungen, Lymphozyten- und Neutrophileninfiltraten, Schwellung der Keratinozyten sowie die erhöhte Expression spezieller Marker. Zytotoxische Effekte treten, bedingt durch die Kombination von NO mit Superoxiden zu Peroxidnitriten, aufgrund der Veränderungen bzw. Zerstörung von Enzymen, Zellmembranen und DNA auf [67]. Wegen der proinflammatorischen Effekte des NOs ist eine Anwendung von L-Arginin bei chronisch entzündlichen Hauterkrankungen nicht angebracht.

Aus diesen Gründen wurden weitergehende Untersuchungen zur selektiven Induktion der endogenen Harnstoffsynthese durchgeführt.

1.5. Agmatin

1.5.1. Allgemeine chemische Eigenschaften

Agmatin, ein Argininmetabolit, ist eine physiologisch vorkommende Substanz. Wichtige chemische Kenngrößen und Eigenschaften sind nachfolgend zusammengefasst:

chemische Bezeichnung	4 - Guanidinobutylamin 1 - Amino - 4 - guanidinobutan N - (4 - Aminobutyl) guanidin
Strukturformel	
Summenformel	$C_5H_{14}N_4$
Molekulargewicht	130 Da
Eigenschaften	<ul style="list-style-type: none"> - organisches Kation (bei physiologischem pH-Wert) - aliphatische Struktur - sehr gut wasserlöslich bei pH 6-10

1.5.2. Vorkommen und Bedeutung

Agmatin, das Dekarboxylierungsprodukt der Aminosäure Arginin, ist erstmals 1910 von Kossel im Sperma von Heringen entdeckt worden [74]. Obwohl die Synthese und Speicherung von Agmatin in Pflanzen, Bakterien und Wirbellosen schon lange bekannt ist, ist es erst 1994 erstmals in Säugetieren identifiziert worden [38], zuerst im Gehirn von Ratten und Rindern, später auch in verschiedenen Zellen sowie im Blutserum. Agmatin wird über den Blutkreislauf in die verschiedenen Gewebe verteilt und ist in fast allen Organen in unterschiedlichen Konzentrationen nachweisbar. Bei Ratten wurde die höchste Konzentration im Magen (71 ng/g), in der Aorta sowie im Dünndarm gefunden, gefolgt von niedrigeren Konzentrationen in Milz, adrenergen Drüsen, Niere, Herz, Leber, Skelettmuskel und Gehirn [73]. Im humanen Blutplasma wurden Agmatinkonzentrationen von $38,5 \pm 5,4$ ng/ml [26] bzw. 47 ng/ml bestimmt [74]. Auf subzellulärer Ebene ist Agmatin hauptsächlich in Vesikeln im Zytoplasma nahe dem endoplasmatischen Retikulum und den Mitochondrien lokalisiert [74].

Die Funktion in Prokaryoten als intermediäre Substanz im Polyaminmetabolismus hat sich in Säugetieren wesentlich weiterentwickelt hin zu regulatorischen Funktionen [82]. Die physiologische Rolle ist zum großen Teil noch unklar, in Studien mit exogen applizierten Agmatin konnte jedoch eine Reihe von durch Agmatin beeinflussten Vorgängen aufgezeigt werden:

a.) in der Leber:

- regulatorische Rolle bei der Entgiftung von Ammoniak im Harnstoffzyklus [64]

b.) im Nervensystem:

- Funktion als Neurotransmitter/ Neuromodulator [38, 73, 78]
- Schmerzmodulation [26, 63, 74, 78]
- Verstärkung der Morphinanalgesie [63, 74, 78]
- Hemmung der Entwicklung einer Morphintoleranz [26, 63, 74, 78]
- Linderung von Symptomen des Naloxon induzierten Morphin-Abstinenz-Syndroms [26, 63, 74, 78]

- Hemmung der Manifestation von Ethanolentzugsserscheinungen [63]
- Neuroprotektion, Reduktion von hypoxisch ischämischen Hirnschäden [15, 26, 63, 74, 78]
- Stressreduktion [26]
- antikonvulsive Wirkung [63]

c.) in der Niere:

- Erhöhung der glomerulären Filtrationsrate [5, 34, 47]
- Natriurese [63]
- Erhöhung der osmolaren Clearance [63]
- Minderung der Auswirkungen einer Glomerulonephritis [34]

d.) im Magen:

- Steigerung der Magensäure- und Pepsinsekretion [63, 74]
- Reduktion der Schleimquantität [63, 74]

e.) Hormonsekretion:

- Induktion der Freisetzung von Insulin aus Inselzellen des Pankreas [63, 74, 78]
- von Katecholaminen aus adrenergen chromaffinen Zellen [38, 63, 74]
- von luteinisierendem Hormon-Releasing Hormon (LH-RH) aus dem Hypothalamus [26]

f.) im Herz-Kreislauf-System:

- hypotensive Effekte bei Applikation i.v.; hypertensive bei zentraler Applikation [29, 40, 63, 74]
- Vasodilatation [29, 39, 40]
- Verminderung der Herzfrequenz [63, 74]

g.) antiproliferative Wirkung:

- Hemmung von Zellproliferation und –differenzierung über Regulation des Polyamingehalts in der Zelle [5, 13, 82, 83, 84]

h.) antiinflammatorische Wirkung:

- Hemmung der iNOS Aktivität [15, 18, 77, 81, 86, 99]

Viele Effekte sind rezeptorabhängig und werden durch Bindung des Agmatins an α_2 -adrenerge und Imidazolin-Rezeptoren sowie Blockade von NMDA-Rezeptor-Kanälen und anderen Liganden gesteuerten Kationen Kanälen vermittelt [26, 38, 40, 73, 74, 78]. Zu den nicht rezeptorabhängigen Funktionen zählen die Regulation des Polyamingehalts in der Zelle und der Einfluss auf NO-Synthasen. Polyamine (z.B. Putrescin, Spermidin, Spermin) sind kleine ubiquitär vorkommende organische Kationen, die für den regelrechten Ablauf des Zellzyklus essentiell sind und somit wichtig für Zellproliferation und -differenzierung. Schlüsselenzym für die Polyaminsynthese ist die Ornithindekarboxylase. Agmatin senkt den Polyamingehalt intrazellulär durch Induktion von Antizym, ein Protein, welches sowohl die Ornithindekarboxylase als auch den Putrescintransporter hemmt, sowie durch Induktion der Spermidin-Spermin-Azetyltransferase [13, 83]. Bedeutend ist Regulation der NO-Produktion durch Agmatin. Die antiinflammatorische Wirkung beruht auf der Hemmung der induzierbaren NO-Synthase (iNOS) durch das Agmatinaldehyd [2, 18, 77, 86]. Agmatin hemmt ebenfalls die Aktivität der neuronalen NO-Synthase (nNOS). Dies geschieht durch eine Erhöhung der NADPH-Oxidase Aktivität der nNOS, das hierbei gebildete Wasserstoffperoxid verursacht durch oxidativen Stress die Inaktivierung der nNOS [11]. Gegensätzlich sind die Ansichten über den Einfluss auf die endotheliale NO-Synthase (eNOS). Untersuchungen haben gezeigt, dass Agmatin alle drei Isoformen der NOS hemmt [18]. Demgegenüber stehen Arbeiten, die von einer Erhöhung der NO-Produktion durch Agmatin aufgrund einer Aktivierung der eNOS ausgehen, wodurch eine Vasodilatation verursacht wird [5, 34, 56, 82,]. In anderen Untersuchungen konnte jedoch gezeigt werden, dass die Vasodilatation Endothel- und NOS-unabhängig gesteuert wird [29, 39].

1.5.3. Synthese und Abbau

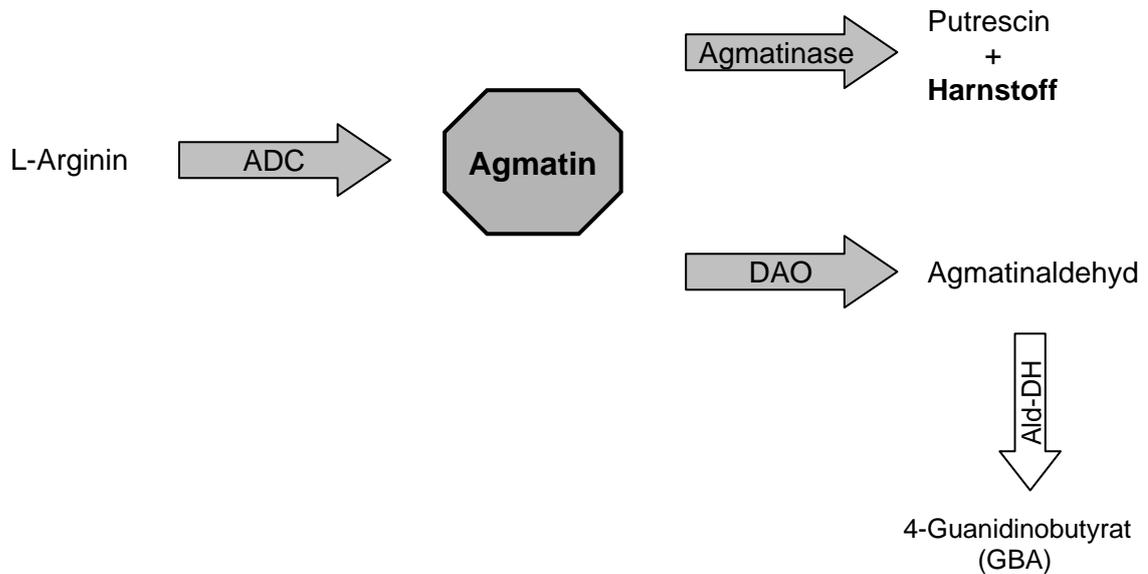


Abb. 7 Metabolismus von Agmatin im Säugetierorganismus

Arginindekarboxylase (ADC)

Agmatin entsteht durch Dekarboxylierung von L-Arginin durch das Enzym Arginindekarboxylase. Dieser Syntheseschritt ist bereits seit langem in Bakterien, Pflanzen und niederen Lebensformen bekannt, der Nachweis der ADC-Aktivität in Säugetieren gelang jedoch erst 1994 [38]. Die ADC existiert in verschiedenen Isoformen, die bereits, einschließlich der humanen ADC, geklont und charakterisiert wurden. Die ADC Isoform der Säuger unterscheidet sich hinsichtlich der Aminosäure Sequenzen, der subzellulären Verteilung sowie der biologischen und biochemischen Charakteristika von denen der Nicht-Säuger [74, 76] (Tab. 2).

Tab. 2 Eigenschaften der ADC von Säugetieren [76]

Eigenschaft	ADC
Lokalisation	Membran assoziiert in Mitochondrien
Substrat	Arginin, Ornithin
Temperaturoptimum	25 °C
pH-Optimum	8,23
Stabilität	thermisch instabil
hemmende Substanzen	Ca ²⁺ , Co ²⁺ , Polyamine

Die ADC Aktivität variiert zwischen den einzelnen Organen. Vorherrschend ist sie in der Niere; in Gehirn, Leber, Magen, Darm und adrenergen Drüsen ist ebenfalls eine Aktivität in Ratten nachweisbar [31, 47, 76]. In menschlichen Geweben ist die Expression der ADC im Gehirn am höchsten, gefolgt von Herz, Niere, Lunge und Skelettmuskulatur [100]. Die humane ADC besteht aus 460 Aminosäuren und wird durch ein Gen auf Chromosom 1 codiert. Auf der Ebene der Aminosäuren ist sie zu 48% mit der humanen Ornithindekarboxylase (ODC) identisch, weist jedoch keine ODC Aktivität auf. Im Gegensatz zu der bisher bekannten Säuger ADC dekarboxyliert sie nur Arginin, nicht Ornithin [100]. Aufgrund der relativ geringen Aktivität der ADC ist vermutlich nur ein kleiner Teil des Agmatins im Gewebe diesen Ursprungs. Das restliche Agmatin stammt wahrscheinlich aus der aufgenommenen Nahrung, sowie aus dem von Magen-Darm-Bakterien synthetisierten und freigesetzten Agmatin [7, 52].

Diamin-Oxidase (DAO)

Agmatin wird durch die Diamin-Oxidase zum Agmatinaldehyd (= 4-Guanidinobutyraldehyd) unter Bildung von Wasserstoffperoxid und Ammoniak umgesetzt. Das chemisch instabile Aldehyd wird durch die Aldehyddehydrogenase zur stabilen Säure 4-Guanidinobutyrat (GBA) metabolisiert [86]. Dies ist wahrscheinlich der Hauptabbauweg von Agmatin in Säugetieren [7]. Die DAO kommt sowohl bei der Maus als auch beim Menschen in folgenden Geweben/Zellen vor: Nierenglomeruli, Plazenta, Dünndarmepithel, Eosinophilen, Makrophagen, Bronchiolen, Magen und Epidermis [47]. Bei Entzündungsprozessen kommt es zu einer erhöhten Aktivität der DAO, während die Aktivität der Aldehyddehydrogenase vermindert wird, woraus eine Erhöhung an Agmatinaldehyd resultiert [86]. Dieses wirkt regulierend auf die NO-Produktion durch Hemmung der iNOS.

Agmatinase

Agmatin wird durch die Agmatinase zu Putrescin und Harnstoff hydrolisiert. In Bakterien und Pflanzen ist dies der Hauptabbauweg des Agmatins und dient der Polyaminbiosynthese aus dem gebildeten Putrescin [1, 78]. In Säugetieren ist die

physiologische und pathophysiologische Rolle der Agmatinase noch nicht genau geklärt. Sie scheint aber weniger der Synthese von Polyaminen zu dienen, als mehr der Regulation der biologischen Effekte des Agmatins [50, 54]. Im Gegensatz zu den Bakterien und Pflanzen wird Agmatin in Säugetieren nur zu einem kleinen Teil durch die Agmatinase umgesetzt, da diese im Vergleich zur DAO eine geringere Affinität zum Agmatin besitzt. Der Katabolismus von Agmatin durch die Agmatinase beträgt nur ein Fünftel des Katabolismus durch die DAO [7, 74]. Die Agmatinase konnte in Makrophagen der Maus, sowie im Gehirn und Leber der Ratte nachgewiesen werden [7, 81]. Es handelt sich um ein aus sechs Monomeren aufgebautes Mangan-Metalloenzym, das zur Ureohydrolase- bzw. Arginase-Superfamilie gerechnet wird [1, 55] (Tab. 3).

Tab. 3 Eigenschaften der Agmatinase von Säugetieren und Menschen¹⁾ [50, 55, 74, 78,81]

Eigenschaft	Agmatinase
Lokalisation	in Mitochondrien ¹⁾
Substrat	Agmatin ¹⁾
Kofaktor	Mn ²⁺ ¹⁾
pH-Optimum	alkalischer Bereich
stimulierende Substanzen	LPS

Die humane Agmatinase besteht aus 352 Aminosäuren und besitzt ein Molekulargewicht von 37,688 kDa. Das codierende Gen ist auf Chromosom 1 lokalisiert. Die humane Agmatinase ist zu 30% identisch bzw. zu 56% ähnlich der bakteriellen Agmatinase, sowie <20% identisch mit der Arginase von Säugern [35, 50]. Die Expression der Agmatinase beim Menschen ist gewebsspezifisch, mit der größten Menge an mRNA in Leber und Niere und geringere Mengen in Skelettmuskulatur, Gehirn, Testis, Gastrointestinaltrakt sowie in der Haut [50]. Eine erhöhte Expression in humanen Hepatozyten konnte nach einer Hepatitis-B-Virus Infektion gezeigt werden [50].

1.5.4 Transport

Da Agmatin bei physiologischem pH-Wert als positiv geladenes Molekül vorliegt, ist eine Penetration biologischer Membranen durch einfache Diffusion kaum

möglich. Da aber in vielen Untersuchungen eine intrazelluläre Anreicherung exogen applizierten Agmatins gezeigt werden konnte, ist von der Existenz eines Transporters in Zellmembranen auszugehen. Dies konnte jedoch bislang durch molekularbiologische Techniken nicht bestätigt werden.

Ein selektiver Aufnahmemechanismus wurde erstmals in Synaptosomen des Rattengehirns beschrieben, bei dem für die Aufnahme von Agmatin in Neurons spannungs- oder ligandengesteuerte Ca^{2+} -Kanäle möglicherweise eine Rolle spielen [78]. In Untersuchungen am Rattenmagen und -hepatozyten, an Hamsternierenzellen, humanen Gliom- und intestinalen Tumorzelllinien sowie an anderen Zelllinien von Säugern konnten übereinstimmende pharmakologische Eigenschaften eines spezifischen Agmatin Transportmechanismus gezeigt werden [7, 30, 51, 52, 53, 85] (Tab. 4). Aufgrund dieser ist der Agmatin Transporter kein Aminosäure- oder Monoamincarrier, kein Ca^{2+} -Kanal und ist nicht identisch mit dem Putrescinttransporter, dem Transporter in Synaptosomen des Rattengehirns sowie einem derzeit bekannten organischen Kationen-Transportsystem.

Tab. 4 Charakteristika des Agmatin Transports

Charakteristika des Agmatin Transports
<ul style="list-style-type: none"> ➤ energieabhängig ➤ Sättigung möglich ➤ Carrier vermittelt ➤ Membranpotential über Plasmamembran nötig ➤ Hemmung durch Phentolamin, Putrescin, Spermin, Spermidin, Clonidin, Paraquat, Histamin ➤ keine Beeinflussung durch kationische Moleküle, Verapamil, Nifedipin, Desipramin, Moxonidin, Kortikosteron, O-Methylisoprenalin

1.5.5 Agmatin und Haut

Agmatin ist für die Haut von Interesse, da bei der Metabolisierung durch die Agmatinase neben Putrescin auch Harnstoff gebildet wird. Im Gegensatz zum L-Arginin ist keine proinflammatorische sondern sogar eine antiinflammatorische Wirkung aufgrund der Hemmung der iNOS und somit der NO-Produktion zu erwarten. Beide Agmatin metabolisierenden Enzyme (Agmatinase, Diamin-Oxidase) sind in der menschlichen Haut vorhanden [47, 50,]. Rzepka et al. [80]

konnte in umfangreichen präklinischen Untersuchungen die toxikologische Unbedenklichkeit des Agmatins belegen. In durchgeführten Vitalitätstests an nativen humanen epidermalen Keratinozyten (NHEK) traten im therapeutisch relevanten Konzentrationsbereich keine zytotoxischen Effekte auf. Ebenso gab es keinen Hinweis für eine erhöhte Apoptose- oder Nekroserate. Daten aus in vivo Untersuchungen am HET-CAM-Modell (Hen's Egg Test-Chorio-Allantois-Membran-Modell), wo agmatinsulfathaltige Lösungen am extrakorporalen Gefäßsystem der Chorioallantoismembran von Hühnereiern getestet wurden, geben keinen Anhalt für eine Schädigung von Haut und Schleimhaut bei topischer Applikation. In nativen Keratinozyten konnte eine Steigerung der endogenen Harnstoffsynthese durch Agmatinapplikation gezeigt werden. Für die topische Applikation von Agmatin auf trockene Haut ist als Grundlage die amphiphile Basiscreme DAC hinsichtlich des Liberations- und Penetrationsverhaltens, sowie der therapeutischen Eigenwirkung einer lipophilen und hydrophilen Grundlage vorzuziehen [60, 80].

Bisher ist nicht bekannt, ob die exogene Substitution von Agmatin auch tatsächlich über die Steigerung der endogenen Harnstoffproduktion zu einer praktisch relevanten Erhöhung der Wasserbindungskapazität der Hornschicht und damit zu einem Barriere fördernden Effekt führt. Aus diesem Grunde werden in der hier vorliegenden Studie verschiedene Konzentrationen von Agmatin in einem Standardvehikelsystem bezüglich des klinischen Effektes und der Verträglichkeit unter praktisch nahen Applikationsbedingungen untersucht.

2. Zielstellung

Es liegen umfangreiche präklinische Untersuchungen vor, in denen zum einen die toxikologische Unbedenklichkeit von Agmatinsulfat belegt und zum anderen eine erhöhte endogene Harnstoffsynthese in Keratinozyten durch Agmatinsulfat nachgewiesen wurde.

In der hier durchgeführten klinischen Studie wurden die Verträglichkeit und Wirksamkeit am Patienten hinsichtlich folgender Fragestellungen untersucht:

1. Ist nach topischer Applikation von Agmatinsulfat ein Einfluss auf die Hydratation und Barrierefunktion der Haut klinisch nachweisbar?
2. Bei welcher Konzentration von Agmatinsulfat können diese Effekte aufgezeigt werden?
3. Ist die Wirkung des Agmatins nach Beendigung der Applikation anhaltend?
4. Wie werden topische agmatinhaltige Präparate von Patienten mit atopischer Dermatitis vertragen?

3. Material und Methodik

3.1. Studiendesign

Bei der hier durchgeführten Pilotstudie handelte es sich um eine monozentrische, prospektive, randomisierte, doppelblinde, vehikel- und referenzkontrollierte Verträglichkeits- und Wirksamkeitsstudie.

Die Durchführung fand mit positivem Votum der Ethik-Kommission der Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg gemäß den ICH-GCP-Richtlinien und unter Berücksichtigung der Deklaration von Helsinki statt [32].

Die Studie erstreckte sich über 24 Tage, wobei die Erhebung der Zielparameter am Patienten an den Tagen 0, 7, 14, 21, 22, 23, 24 erfolgte und in einem probanden-bezogenen Prüfprotokoll festgehalten wurde.

3.2. Studienziele

Die Studie diente der Evaluation der Verträglichkeit, der Wirksamkeit, der Wirkdauer und der Dosisfindung topisch applizierter agmatinhaltiger Formulierungen im Vergleich zu topisch applizierten harnstoffhaltigen Formulierungen sowie zum Vehikel.

3.3. Patienten

Da es sich hier um eine Pilotstudie handelte, wurde eine relativ kleine Anzahl von insgesamt 24 Patienten in die Studie eingeschlossen. Der Einschluss erfolgte, nachdem die Patienten schriftlich und mündlich über die Inhalte und den Ablauf der Studie informiert worden waren, ihr schriftliches Einverständnis abgegeben, sowie die Eingangsuntersuchung erfolgreich absolviert hatten.

In der Eingangsuntersuchung wurden neben der Prüfung der Ein- und Ausschlusskriterien folgende Daten erhoben: Alter, Geschlecht, Körpergewicht und -größe, Hauttyp, sowie das Vorliegen von allergischen, dermatologischen,

kardiovaskulären, pulmonalen, endokrinologischen, psychiatrischen und sonstigen Erkrankungen.

3.3.1. Einschlusskriterien

Die Patienten mussten folgende Kriterien erfüllen:

- freiwillige Teilnahme
- Alter: 18-50 Jahre
- Patienten, die an einer atopischen Dermatitis leiden und sich im symptomfreien Intervall befinden
- Kaukasischer Hauttyp (Hauttyp II)

3.3.2. Ausschlusskriterien

Die Patienten durften keines der folgenden Kriterien erfüllen:

- Vorliegen einer chronisch entzündlichen oder die Barrierefunktion des Hautorgans beeinflussenden Haut- oder Systemerkrankung, mit Ausnahme der atopischen Dermatitis
- Vorliegen einer Unverträglichkeit und/oder Überempfindlichkeit gegen einen der Inhaltsstoffe
- immunsupprimierte Patienten
- Transplantatträger (außer Autotransplantate)
- Einnahme systemischer Arzneimittel innerhalb der 8 Wochen vor Studienbeginn (ausgenommen orale Kontrazeptiva)
- Anwendung topischer Arzneimittel im Bereich der Arme und Hände innerhalb der 8 Wochen vor Studienbeginn
- Anwendung von Kosmetika und/oder Pflegemitteln im Bereich der Arme und Hände innerhalb der 4 Wochen vor Studienbeginn
- Schwangerschaft oder stillend
- Unzuverlässigkeit oder mangelnde Kooperation des Patienten

3.4. Studienmedikation

Es wurden 6 verschiedene topische Präparationen verwendet, welche durch die Universitätsapotheke der Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg her- und bereitgestellt wurden. Dabei diente als Grundlage die amphiphile Basiscreme DAC, die sich in vorausgegangenen Penetrationsuntersuchungen als gut geeignet erwies [60, 80]. Die 6 Präparationen lagen in jeweils 50 ml Behältern versehen mit einer Code-Nummerierung entsprechend einer doppelblinden und randomisierten Studie vor. Die Verblindung wurde durch eine, an der Studie unbeteiligte, fachkundige Person, Herrn Prof. Dr. R. Neubert (Institut für pharmazeutische Technologie und Biopharmazie) randomisiert vorgenommen.

3.4.1. Testpräparationen

Die Testpräparationen enthielten als Wirkstoff das Agmatinsulfat. Es wurden zwei verschiedene Konzentrationen verwendet (Tab. 5):

Tab. 5 Zusammensetzung der Agmatin Monopräparate

Agmatin 2% Präparation		m [g]	% [m/m]
Agmatinsulfat	Ph.Eur.	2	2
Basis Creme	DAC	ad 100	ad 100

Agmatin 5% Präparation		m [g]	% [m/m]
Agmatinsulfat	Ph.Eur.	5	5
Basis Creme	DAC	ad 100	ad 100

3.4.2. Vergleichspräparationen

Die Vergleichspräparationen enthielten als Wirkstoff den Harnstoff allein sowie Harnstoff und Agmatinsulfat in Kombination. Als Placebo diente das wirkstofffreie Vehikel Basiscreme DAC.

Es wurden folgende Konzentrationen verwendet (Tab. 6):

Tab. 6 Zusammensetzung der Vergleichspräparate

Harnstoff 5% Präparation		m [g]	% [m/m]
Harnstoff	Ph.Eur.	5	5
Basis Creme	DAC	ad 100	ad 100

Harnstoff 5% + Agmatin 2% Präparation		m [g]	% [m/m]
Agmatinsulfat	Ph.Eur.	2	2
Harnstoff	Ph.Eur.	5	5
Basis Creme	DAC	ad 100	ad 100

Harnstoff 5% + Agmatin 5% Präparation		m [g]	% [m/m]
Agmatinsulfat	Ph.Eur.	5	5
Harnstoff	Ph.Eur.	5	5
Basis Creme	DAC	ad 100	ad 100

Vehikel		m [g]	% [m/m]
Basis Creme	DAC		

3.5. Prüfung der Wirksamkeit, Dosisfindung und Wirkdauer von Agmatinsulfat

3.5.1. Prüfung der Wirksamkeit und Dosisfindung von Agmatinsulfat

Jeder Patient erhielt, entsprechend eines Randomisierungsplanes, 4 Prüfpräparate gekennzeichnet mit A-D, ein Applikationsschema sowie einen Applikationsplan (Abb. 8).

Applikationsschema Unterarme

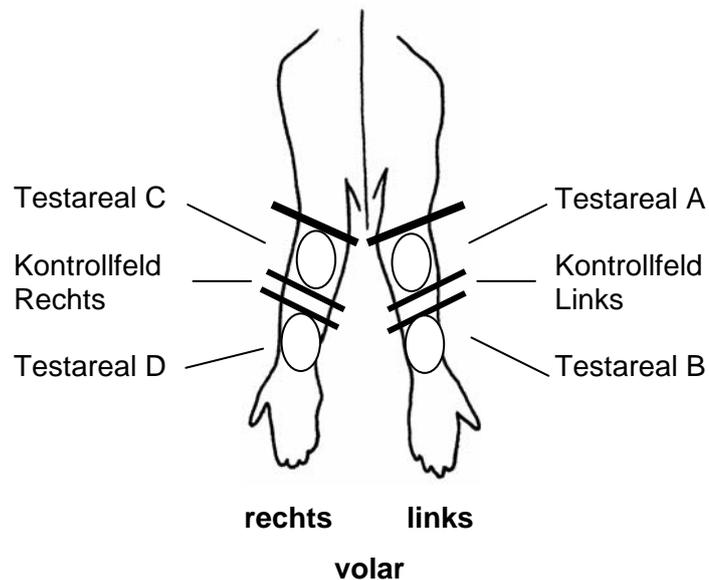


Abb. 8 Applikationsschema für die Prüfung der Wirksamkeit, Dosisfindung und Wirkdauer von Agmatinsulfat

Auf den Innenseiten beider Unterarme wurden mit einem Hautmarker die jeweils 5x4 cm großen Testfelder A und B links, sowie C und D rechts und zusätzlich ein ebenso großes Kontrollfeld je Unterarm markiert. Die distalen Testfelder befanden sich mindestens 4cm entfernt vom Handgelenk, da im Bereich der Handgelenke erhöhte Messwerte und Schwankungen des TEWL bekannt sind [10, 68, 69]. Die Applikation der Prüfpräparate A-D erfolgte über 21 Tage zweimal täglich dünn auf die entsprechenden Prüfareale A-D durch die Patienten selbst. Die Kontrollfelder blieben unbehandelt. Die Verwendung weiterer topischer Arzneimittel und Pflegemittel (auch Seife bzw. Duschgel) auf den Unterarmen war nicht erlaubt. Die Erhebung der Zielparameter erfolgte zunächst als Basismessung vor Präparatapplikation am Tag 0 und nachfolgend am 7., 14. und 21. Tag.

3.5.2 Prüfung der Wirkdauer von Agmatinsulfat

Nach Beendigung der Applikation der Prüfpräparate am 21. Tag wurden die Zielparameter nach 24, 48 sowie 72 h erneut erhoben. Während dieser drei Tage war die Verwendung topischer Präparate auf den Unterarmen ebenfalls nicht erlaubt.

3.5.3 Zielparameter für die Prüfung der Wirksamkeit, Dosisfindung und Wirkdauer von Agmatinsulfat

Als Hauptzielparameter galt die Hydratation der Hornschicht, welche mittels der Corneometrie bestimmt wurde.

Als Nebenzielparameter galt der transepidermale Wasserverlust als Maß für die Barrierefunktion der Hornschicht, welcher mittels Tewametrie bestimmt wurde.

3.6. Prüfung der Verträglichkeit von Agmatinsulfat

An jedem Patienten erfolgte eine Verträglichkeitstestung aller 6 Präparate auf dem Rücken unter Verwendung von Testpflastern (Haye's Test Chambers, Amsterdam, The Netherlands) mit jeweils 8 Kammern. Mit je 20mg der verschiedenen sechs Prüfpräparate und zwei Leerfeldern bestückt wurden drei dieser Pflaster (Pflaster A, B, C) auf den Rücken aufgeklebt (Abb. 9) und jeweils nach 24h, 48h sowie nach 72h ein Pflaster entfernt. Da die Haut unmittelbar nach dem Abreißen der Pflaster häufig etwas gerötet war, erfolgten die Messungen der Zielparameter erst nach einer „Erholungszeit“ von 10 Minuten.

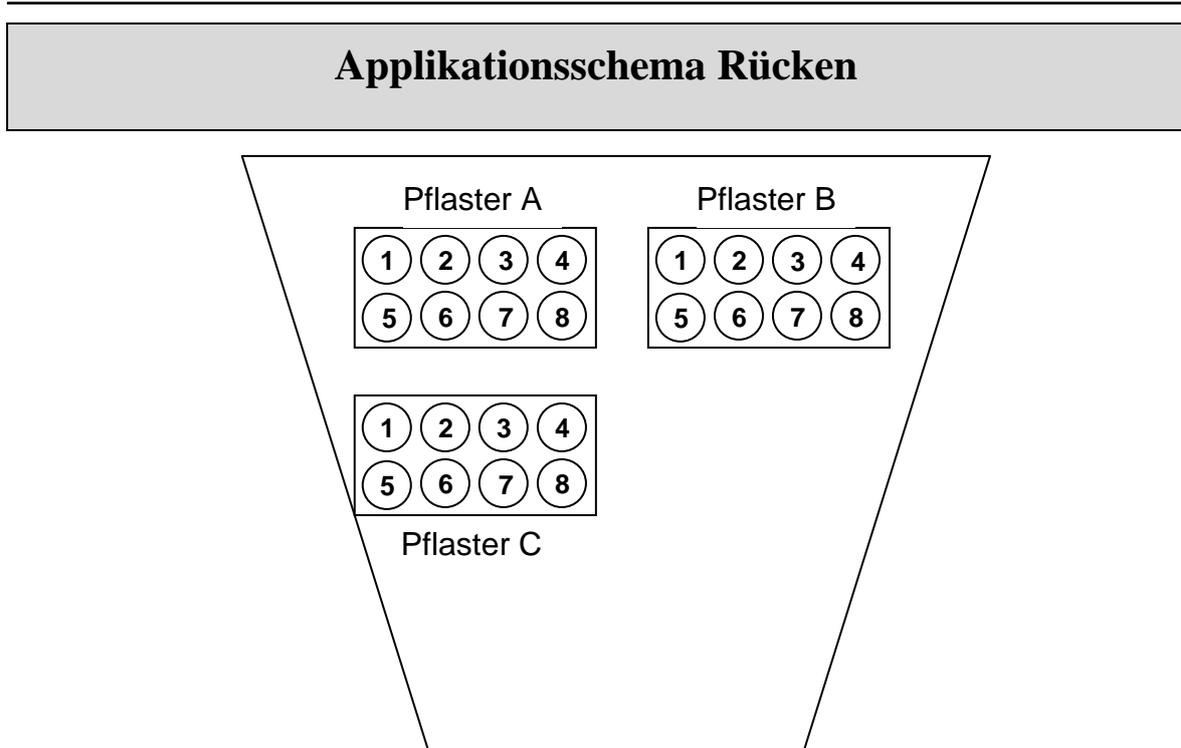


Abb. 9 Applikationsschema für die Prüfung der Verträglichkeit von Agmatinsulfat

3.6.1 Zielparameter für die Prüfung der Verträglichkeit von Agmatinsulfat

Als Hauptzielparameter galt die sichtbare Irritation der Haut, welche mittels eines Klinischen Scores bestimmt wurde.

Als Nebenzielparameter galt die Rötung der Haut, welche mittels Erythrometrie bestimmt wurde.

3.7. Corneometrie

Die Messung der Hydratation der Hornschicht als Maß für deren Wassergehalt wurde mit einem Corneometer (CM 820, COURAGE + KHAZAKA electronic GmbH, Köln, Deutschland), das die Kapazität über der Hautoberfläche (Messtiefe ca. 30µm) misst, durchgeführt.

Durch gegeneinander isolierte gitterförmige Metallplatten in der Messsonde, die als Kondensator wirken, wird die Änderung der Kapazität entsprechend des Wassergehaltes der Hornschicht als dimensionsloser Wert bestimmt. Mit steigendem Wassergehalt steigt somit auch der Messwert.

Die Patienten akklimatisierten sich zunächst in der für die Tewametrie-Messungen geforderten Art und Weise. Die Raumtemperatur betrug stets 20-22°C, die Luftfeuchtigkeit lag zwischen 35 und 45%, besondere Lichteinstrahlung gab es nicht. Die Messungen erfolgten am Unterarm, mit der Innenseite nach oben auf einen Tisch aufliegend, indem die Messsonde mit leichtem Druck auf die Haut plan aufgesetzt wurde.

Zur besseren Vergleichbarkeit wurde ein Corneometrie-Index berechnet, der zu den jeweiligen Zeitpunkten den Corneometrie-Wert des Testareals ($\text{Corneo}_{\text{Test}}$) mit dem Corneometrie-Wert des Kontrollfeldes der selben Seite ($\text{Corneo}_{\text{Kontrolle}}$) ins Verhältnis setzt.

$$\text{Corneometrie – Index} = \frac{\text{Corneo}_{\text{Test}}}{\text{Corneo}_{\text{Kontrolle}}}$$

3.8. Tewametrie

Die Bestimmung der Wasserbindungskapazität der Hornschicht erfolgte mit einem Tewameter (TM 210, COURAGE + KHAZAKA electronic GmbH, Köln, Deutschland), welches den transepidermalen Wasserverlust misst. Dieser setzt sich aus zwei Komponenten zusammen. Zum einen ist dies der Wasserverlust durch passive Diffusion von Wasser durch die Hornschicht hindurch, zum anderen der Wasserverlust aufgrund der Schweißdrüsenaktivität. Die Messung des TEWL ist eine geeignete und empfohlene nicht-invasive Methode für die Bestimmung der Hautbarrierefunktion [3, 65].

Die Messsonde besteht aus einem offenen Zylinder, der zwei Hygrosensoren sowie zwei Thermistoren in unterschiedlichem Abstand von der Haut angeordnet, enthält. An diesen zwei unterschiedlichen Punkten wird jeweils die lokale relative Feuchtigkeit und die Temperatur gemessen, daraus der entsprechende Dampfdruck errechnet und der Wasserverlust aufgrund der Verdunstung von der Hautoberfläche bestimmt. Das Ergebnis wird in $\text{g}/(\text{m}^2\text{h})$ (Gramm pro Quadratmeter und Stunde) angegeben. Die Messungen wurden gemäß den EEMCO-Guidelines (European Expert Group on Efficacy Measurement of Cosmetics and Other Topical Products Guidance for the Assessment of Transepidermal Water Loss in Cosmetic Sciences) durchgeführt [79]. Um eine Beeinflussung der Tewametrie-Messungen durch innere und äußere Faktoren möglichst zu vermeiden, wurde die

Prüfung am volaren Unterarm durchgeführt, nachdem sich die Patienten 15 Minuten mit unbedeckten Unterarmen im Raum akklimatisiert hatten. Die Temperatur wurde mit Hilfe einer Klimaanlage konstant bei 20-22°C gehalten, die Luftfeuchte betrug stets 40-60%, besondere Lichteinstrahlung gab es nicht. Die Messungen wurden in einer nach allen Seiten geschlossenen Kammer durchgeführt, um eine Beeinflussung durch Luftzug zu vermeiden. Die Messung erfolgte am Unterarm, mit der Innenseite nach oben auf einen Tisch aufliegend, indem die Messsonde mit Hilfe eines Halters senkrecht zur Hautoberfläche und mit nach oben zeigender Öffnung des Zylinders aufgesetzt wurde. Zur Erlangung verwertbarer Messergebnisse musste darauf geachtet werden, dass die Sonde einerseits nicht mit zu großem Druck in die Haut hineingedrückt wurde, andererseits auch möglichst kein Spalt zwischen Haut und Sonde auftrat. Zu Beginn der Messung kam es zunächst zu einem stetigen Anstieg bzw. zu Schwankungen der TEWL-Werte, bedingt durch die unterschiedliche Temperatur von Haut und Sonde. Nachdem sich die TEWL-Werte auf ein konstantes Niveau eingepegelt hatten, wurde der Messvorgang beendet. Vor dem erneuten Aufsetzen der Sonde auf die Haut, wurde durch vorsichtiges Hin- und Herbewegen derselben sich noch darin befindlicher Wasserdampf entfernt. Zur besseren Vergleichbarkeit wurde ein TEWL-Index berechnet, der zu den jeweiligen Zeitpunkten den TEWL des Testareals ($TEWL_{\text{Test}}$) mit dem TEWL des Kontrollfeldes der selben Seite ($TEWL_{\text{Kontrolle}}$) ins Verhältnis setzt.

$$\text{TEWL - Index} = \frac{TEWL_{\text{Test}}}{TEWL_{\text{Kontrolle}}}$$

3.9. Visueller Klinischer Score

Zur Objektivierung der irritativen bzw. toxischen Wirkung der Prüfpräparate wurden die Testareale auf dem Rücken mit Hilfe eines visuellen klinischen Scores eingeschätzt.

Dabei wurden folgende Einteilungskriterien definiert:

- 0 – keine Reaktion
- 1 – Schuppung, sehr schwaches Erythem
- 2 – schwaches Erythem, ggf. leichte Infiltration
- 3 – deutliches Erythem, ggf. Vesikel und Krusten
- 4 – deutliches Erythem, Infiltration, ggf. Vesikel, Blasen und/oder kräftige Krusten

3.10. Erythrometrie

Zur Objektivierung der irritativ-toxischen sowie einer vasoaktiven Wirkung der Prüfpräparate wurde zusätzlich die Rötung der Testareale auf dem Rücken mit einem Erythrometer (Minolta Chroma Meter CR-200; Minolta GmbH, Ahrensburg, Deutschland) bestimmt.

Die Messungen erfolgten nach der sogenannten Tristimulus Analyse (blau, rot, grün) des von der Haut reflektierten Lichts.

Im Messkopf dieses Gerätes befindet sich eine Xenon Bogenlampe, die blitzartig ein intensives weißes Licht auf die Hautoberfläche aussendet. Die Farbe des von der Hautoberfläche reflektierten Lichtes wird hinsichtlich des Blau-, Grün- und Rotanteils analysiert. Bei der Darstellung der Werte wurde das $L^*a^*b^*$ -Farbmaßsystem der Commission International de l'Éclairage (CIE) zugrunde gelegt. Bei diesem Farbmaßsystem wird eine Farbe in einem 3-dimensionalen Koordinatensystem dargestellt. Dieses ist aufgebaut aus drei Achsen: L^* (Schwarz-Weiß-Achse bzw. Helligkeit), a^* (Rot-Grün-Achse) und b^* (Blau-Gelb-Achse). Die Hautfarbe wird somit anhand ihrer $L^*a^*b^*$ -Koordinaten genau bestimmt. Die $L^*a^*b^*$ -Werte sind dimensionslos. Da eine akute irritativ-toxische Wirkung mit einer Rötung einhergeht, wäre dies an einer Erhöhung des a^* -Wertes erkennbar, welcher hierbei bestimmt wurde.

Die Messungen erfolgten gemäß den Richtlinien der Standardization Group of the European Society of Contact Dermatitis [17]. Wie empfohlen, wurde ein Messkopf mit einem offenen Licht-Leit-Tubus verwendet und als Lichtquelle im Gerät die CIE Standard Beleuchtung D_{65} gewählt. Zu Beginn eines jeden Messtages erfolgte eine Rekalibrierung mit der weißen Standard-Kalibrierkachel. Im Messraum wurde die Temperatur mittels einer Klimaanlage bei 20-22°C gehalten, Messungen in

direktem Sonnenlicht wurden vermieden. Die Patienten saßen zunächst 15 min, den Oberkörper mit einem T-Shirt bekleidet, im Messraum, wie es auch für die Tewametrie-Messungen nötig war. Der Messkopf wurde auf den Rücken des aufrecht sitzenden Patienten aufgesetzt. Dabei musste beachtet werden, dass der Messkopf senkrecht zur Hautoberfläche, ruhig und sanft, ohne großen Druck auf die Haut auszuüben, gehalten und der Messvorgang sofort ausgelöst wurde. Pro Testareal wurden drei Messungen hintereinander durchgeführt und der Mittelwert bestimmt.

Zur besseren Vergleichbarkeit wurde ein Erythrometrie-Index berechnet, der den Erythrometrie-Wert zum Zeitpunkt x (Erythrometrie_x) mit dem Erythrometrie-Wert vor Therapie (Erythrometrie₀) ins Verhältnis setzt.

$$\text{Erythrometrie – Index} = \frac{\text{Erythrometrie}_x}{\text{Erythrometrie}_0}$$

3.11. Adverse Events

Unter Adverse Events versteht man sämtliche unerwünschte Ereignisse, die während einer klinischen Studie auftreten, unabhängig von einem möglichen kausalen Zusammenhang mit der Behandlung. Durch Befragen der Patienten bei jeder Visite wurden diese, wenn möglicherweise eingetreten, erfasst und sorgfältig dokumentiert.

3.12. Statistische Auswertung

Die biometrische Auswertung wurde unter Zuhilfenahme der Software SigmaStat® 3.0 for Windows erstellt. Unterschiede wurden ab einer Irrtumswahrscheinlichkeit von $p < 0,05$ als signifikant bewertet.

Die Analyse von drei und mehr Stichproben einer normalverteilten Population mit gleicher Varianz erfolgte mit der Ein-Weg-Varianzanalyse (One Way Analysis of Variance [ANOVA]), da lediglich ein Faktor (Einfluss der Prüfsubstanz) in den verschiedenen Mittelwertgruppen untersucht werden sollte. Die Unterschiede zwischen den Mittelwerten wurden durch Paarvergleiche nach der Holm-Sidak-

Methode untersucht. Nicht normalverteilte Ergebnisse wurden mit dem nicht-parametrischen Kruskal-Wallis-Test analysiert. Dieser prüft die analoge Hypothese der One-Way-ANOVA verteilungsunabhängig.

Zur graphischen Darstellung der Ergebnisse wurden Boxplots mit Hilfe der Software SigmaPlot® 8.02 for Windows erstellt. Die untere bzw. obere Begrenzung der Box stellt die 10. bzw. 90. Perzentile dar, die horizontale Linie innerhalb der Box den Median. Die nach oben und unten abgetragenen „whiskers“ beschreiben die gesamte Spanne der Einzelwerte innerhalb der 5. und 95. Perzentile. Einzelwerte außerhalb der 5. bis 95. Perzentile wurden als Punkte dargestellt. Die Darstellung für den Visuellen Klinischen Score erfolgte mittels eines Balkendiagramms.

4. Ergebnisse

4.1. Patienten

Es wurden insgesamt 24 Patienten mit atopischer Dermatitis im symptomfreien Intervall, 19 Frauen und 5 Männer, in die Studie eingeschlossen. Das Durchschnittsalter der Patienten betrug 24,25 Jahre (20-34 Jahre). Aufgrund eines Drop out konnte die Verträglichkeitsprüfung nur an 23 Patienten durchgeführt werden.

Für die Evaluation der Wirksamkeit, Wirkdauer und Dosisfindung wurde jedes Prüfpräparat an jeweils 16 Patienten getestet. Für die Prüfung der Verträglichkeit wurden jedes Prüfpräparat und beide Kontrollfelder an allen 23 Patienten getestet.

4.2. Corneometrie

4.2.1. Prüfung der Wirksamkeit von Agmatinsulfat

Die Hydratation der Hornschicht steigt signifikant nach topischer Applikation des Harnstoff 5% Prüfpräparates sowie der Harnstoff 5% + Agmatinsulfat 2% und Harnstoff 5% + Agmatinsulfat 5% Kombinationspräparate.

Für das Vehikel sowie die Agmatinsulfat 2% und Agmatinsulfat 5% Monopräparate kann über eine Anwendungsdauer von 21 Tagen keine signifikante Steigerung der Hydratation nachgewiesen werden (Abb. 10).

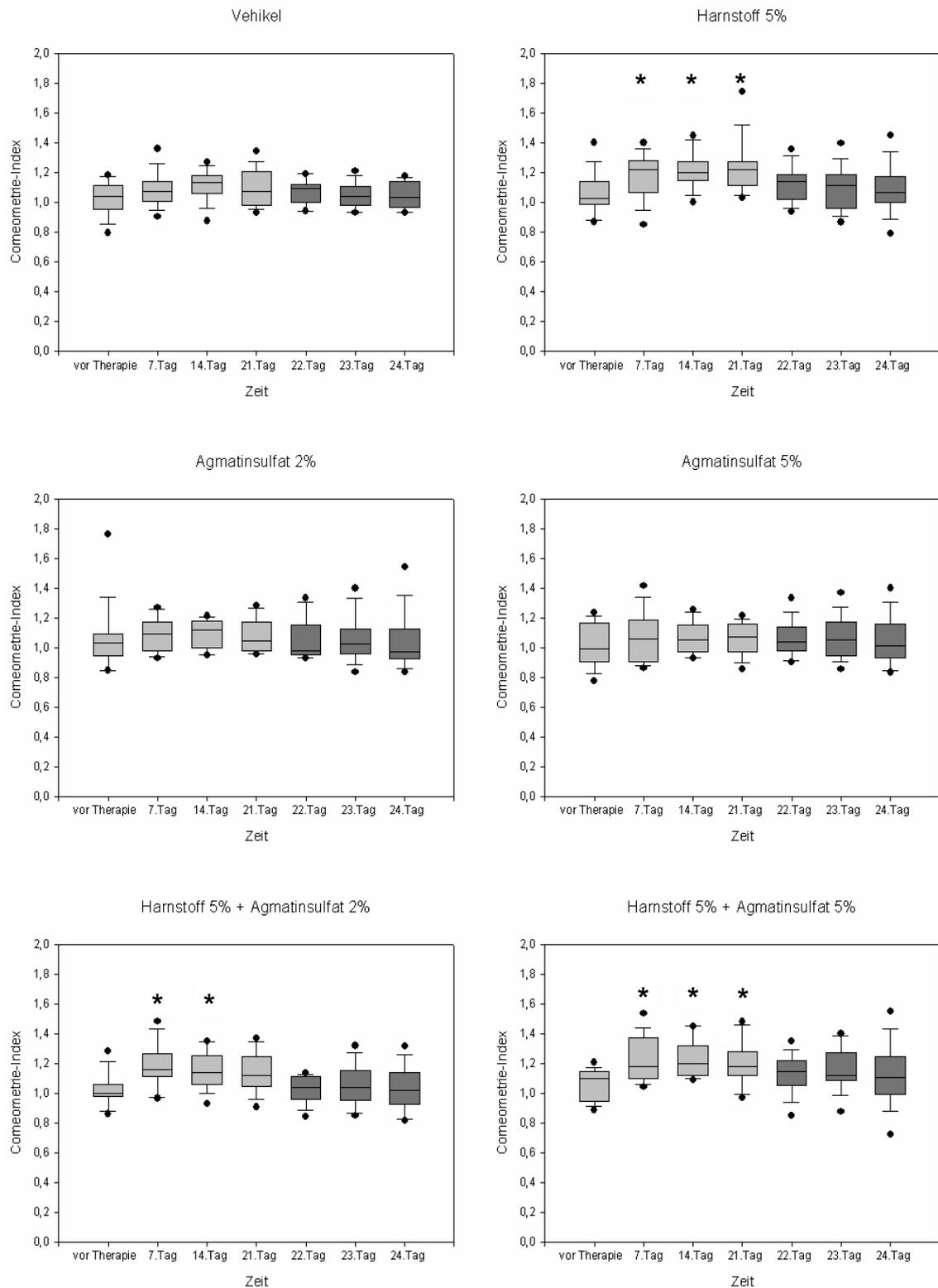


Abb. 10 Einfluss der Prüfpräparate auf die Hydratation der Hornschicht (Corneometrie-Index), n=16

- ☐ Applikation der jeweiligen Prüfpräparate bis zum 21.Tag
- ▒ keine Applikation der jeweiligen Prüfpräparate ab dem 21.Tag

* = signifikanter Unterschied zur Hydratation der Hornschicht vor Therapie, p<0,05

Gegenüber dem Vehikel ist bereits nach 7 Tagen allein für das Kombinationspräparat Harnstoff 5% + Agmatinsulfat 5% eine signifikante Erhöhung der Hydratation nachweisbar, die bis zum Ende der Applikationsdauer anhält.

Nach Applikation des Harnstoff 5% Monopräparates steigt die Hydratation signifikant gegenüber dem Vehikel ab dem 14. Applikationstag.

Für die Agmatinsulfat 2% und Agmatinsulfat 5% Monopräparate sowie das Harnstoff 5% + Agmatinsulfat 2% Kombinationspräparat kann keine signifikante Erhöhung der Hydratation gegenüber dem Vehikel nachgewiesen werden (Abb.11).

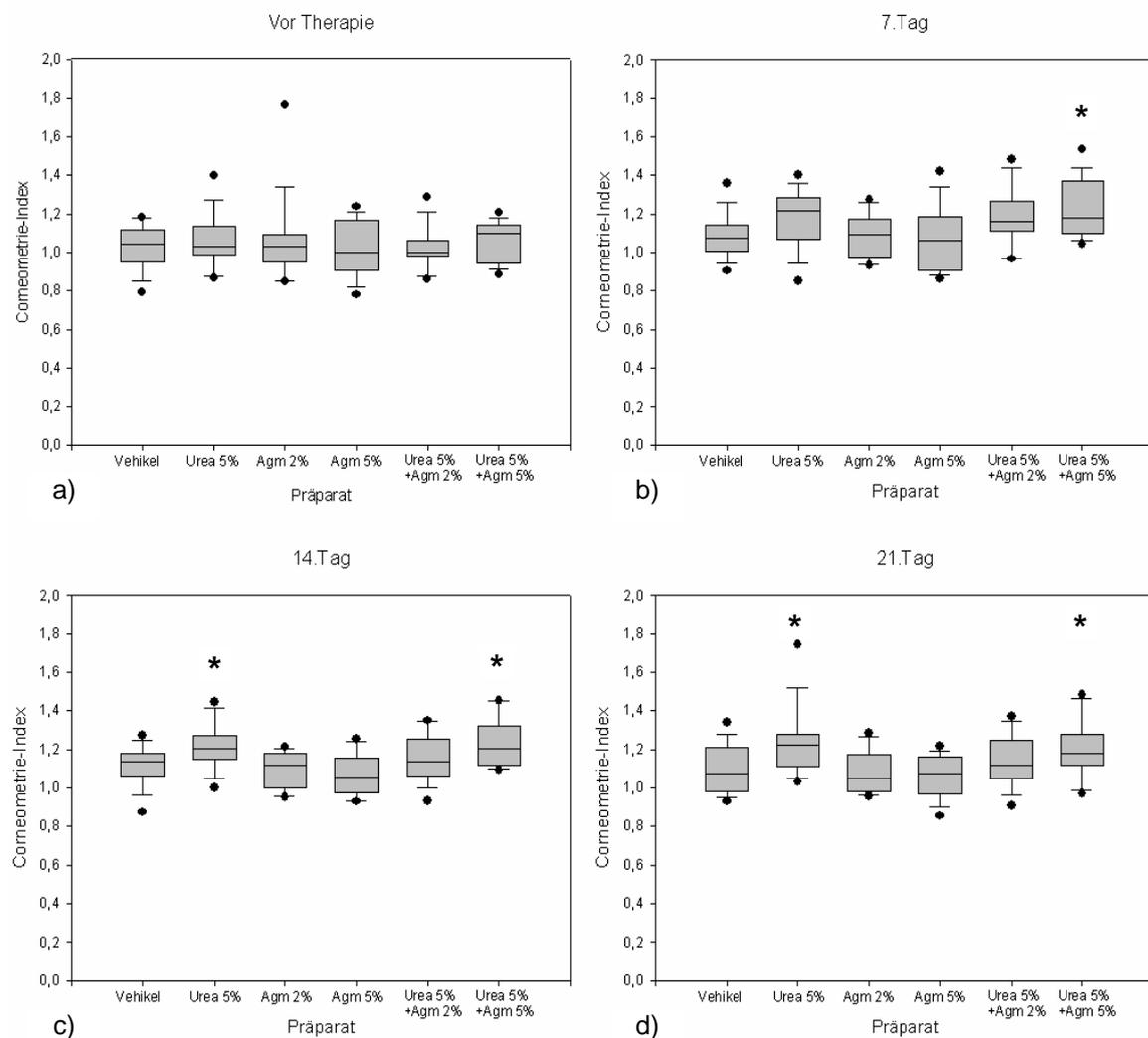


Abb. 11 Hydratation der Hornschicht (Corneometrie-Index)

a) vor Therapie, b) nach 7-, c) nach 14- und d) nach 21-tägiger Applikation der Prüfpräparate

* = signifikanter Unterschied zum Vehikel, $p < 0,05$, $n = 16$

Es besteht kein signifikanter Unterschied der Hydratation nach 14- bzw 21-tägiger Applikation für das Harnstoff 5% Monopräparat gegenüber dem Harnstoff 5% + Agmatinsulfat 5% Kombinationspräparat.

4.2.2. Dosisfindung von Agmatinsulfat

Es lässt sich kein Unterschied in der Wirksamkeit zwischen dem Agmatin 2% und dem Agmatin 5% Monopräparat feststellen (Abb. 10 und 11).

In Kombination mit Harnstoff 5% hat Agmatin 5% Vorteile gegenüber dem Harnstoff 5% + Agmatin 2% Kombinationspräparat (Abb. 11b).

4.2.3. Prüfung der Wirkdauer von Agmatinsulfat

Bereits 24 Stunden nach Beendigung der Applikation ist bei keinem der Prüfpräparate eine Wirkung mehr nachweisbar (Abb. 10 jeweils die dunkelgrauen Box Plots vom 22.-24.Tag und Abb. 12).

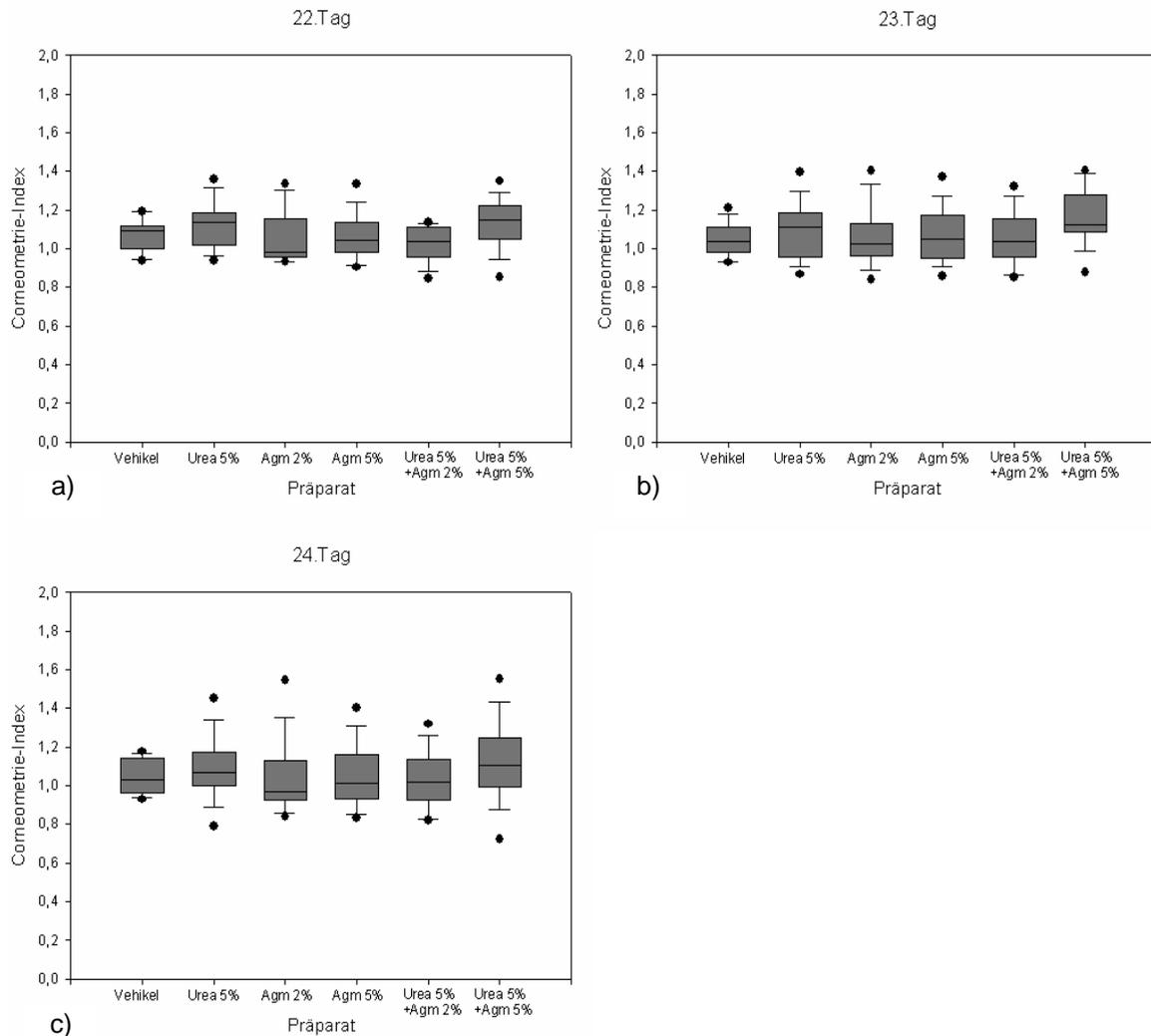


Abb. 12 Hydratation der Hornschicht (Corneometrie-Index)
 a) 24 Stunden, b) 48 Stunden und c) 72 Stunden nach Beendigung
 der Applikation der Prüfpräparate

* = signifikanter Unterschied zum Vehikel, $p < 0,05$, $n = 16$

4.3. Tewametrie

4.3.1. Prüfung der Wirksamkeit von Agmatinsulfat

Für keines der Prüfpräparate ist eine signifikante Reduktion des TEWL nachweisbar, jedoch tendiert der TEWL der mit Harnstoff 5%, mit Harnstoff 5% + Agmatinsulfat 2% und mit Harnstoff 5% + Agmatinsulfat 5% behandelten Testareale zu niedrigeren Werten. (Abb. 13 und gegenüber dem Vehikel Abb. 14).

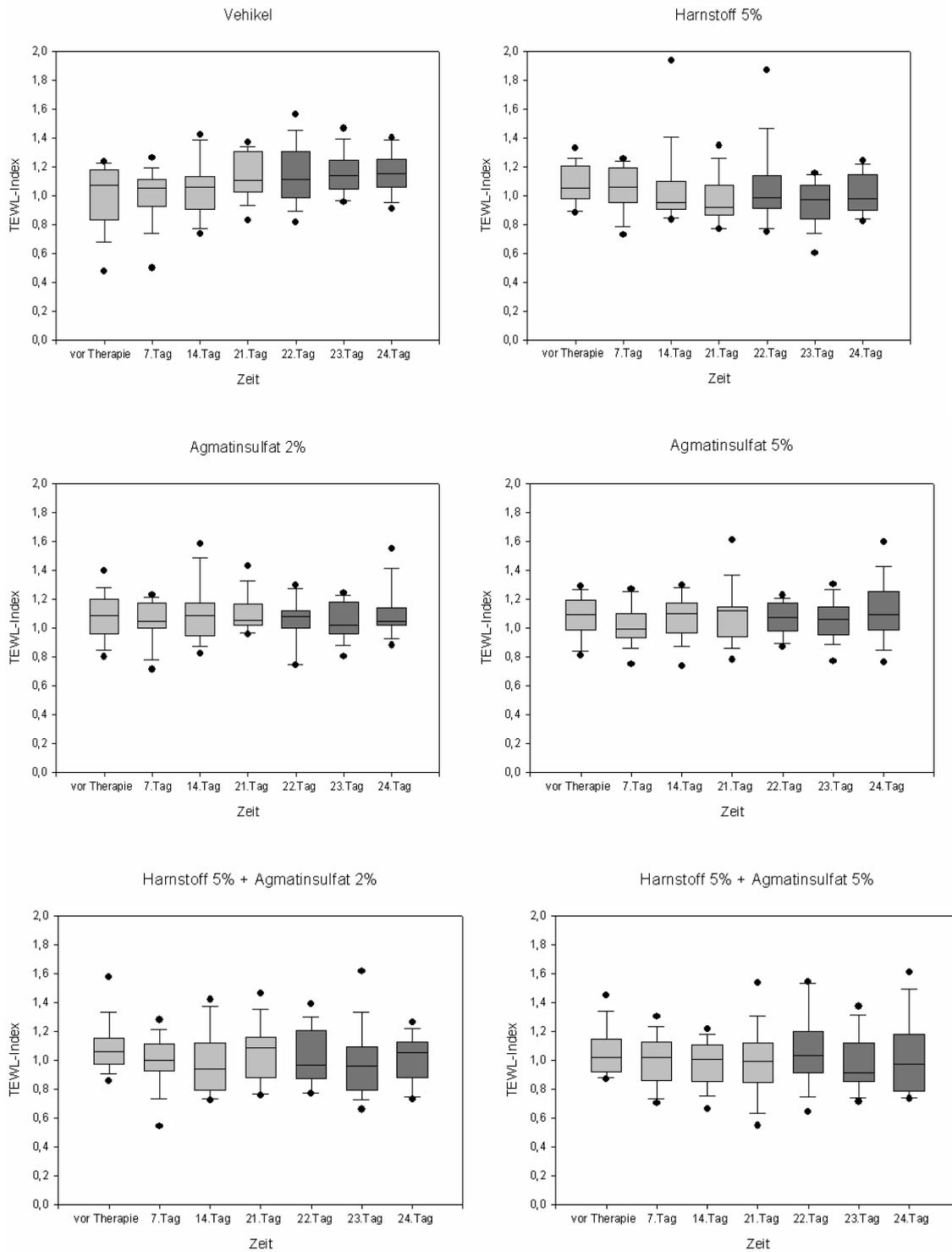


Abb. 13 Einfluss der Prüfpräparate auf den transepidermalen Wasserverlust der Haut (TEWL-Index)

- Applikation der jeweiligen Prüfpräparate bis zum 21.Tag
- keine Applikation der jeweiligen Prüfpräparate ab dem 21.Tag

* = signifikanter Unterschied zum transepidermalen Wasserverlust vor Therapie, $p < 0,05$, $n = 16$

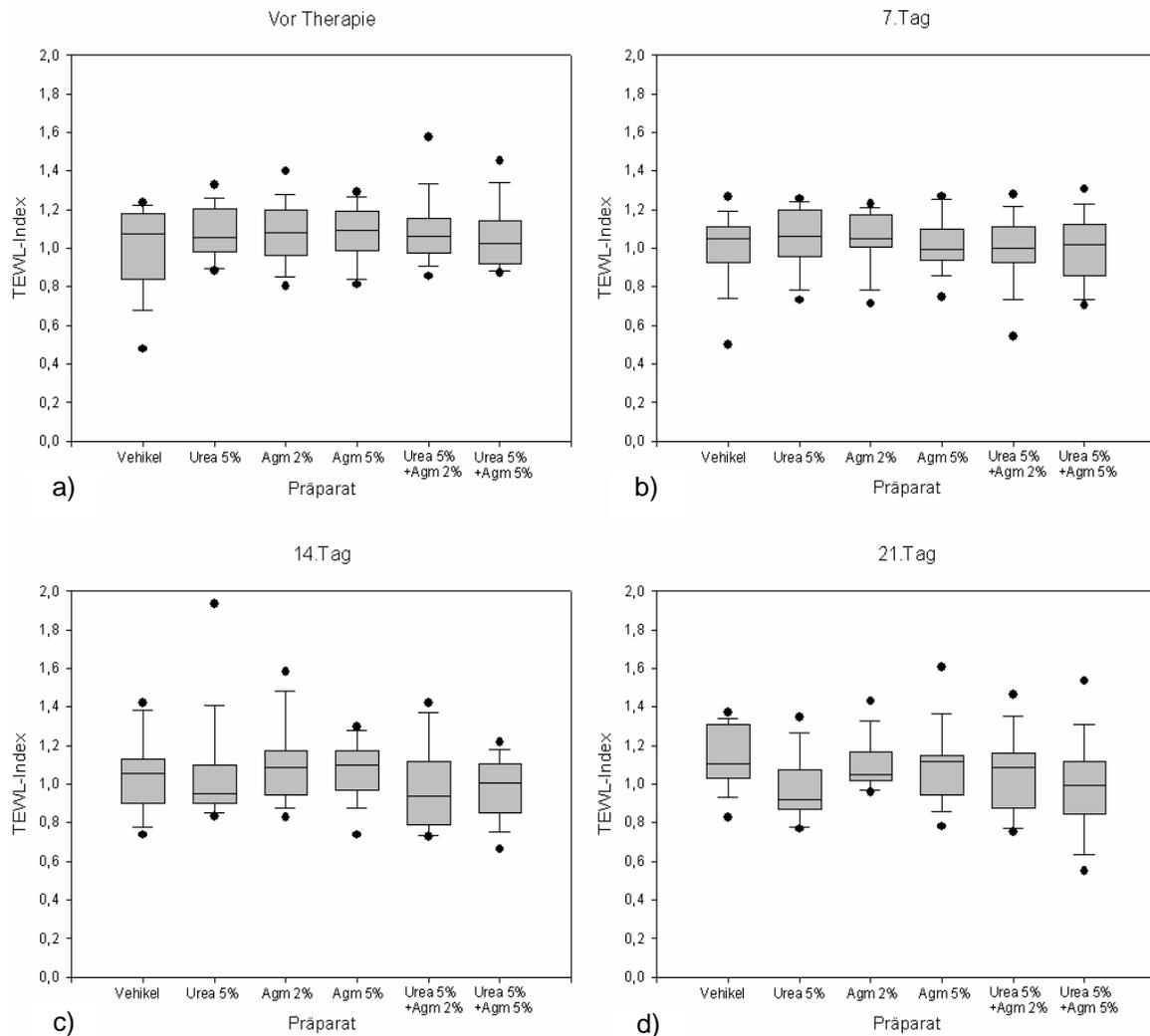


Abb. 14 Transepidermaler Wasserverlust der Haut (TEWL-Index)
 a) vor Therapie, b) nach 7-, c) nach 14- und d) nach 21-tägiger Applikation der Prüfpräparate

* = signifikanter Unterschied zum Vehikel, $p < 0,05$, $n = 16$

4.3.2. Dosisfindung von Agmatinsulfat

Es lässt sich kein Unterschied in der Wirksamkeit zwischen den agmatinhaltigen Mono- und Kombinationspräparaten feststellen (Abb. 13 und 14).

4.3.3 Prüfung der Wirkdauer von Agmatinsulfat

Eine Wirkdauer ist nicht nachweisbar (Abb. 13 jeweils die dunkelgrauen Box Plots vom 22.-24.Tag).

Gegenüber dem TEWL-Index der mit dem Vehikel behandelten Haut zeigt sich 48 Stunden nach Beendigung der Applikation (= 23.Tag) eine signifikante Reduktion des TEWL-Index der mit dem Harnstoff 5% Monopräparat, Harnstoff 5% + Agmatinsulfat 2% sowie Harnstoff 5% + Agmatinsulfat 5% Kombinationspräparat behandelten Haut. 72 Stunden nach Beendigung der Applikation (= 24.Tag) ist nur für das Harnstoff 5% + Agmatinsulfat 5% Kombinationspräparat eine signifikante Reduktion des TEWL-Index nachweisbar (Abb. 15).

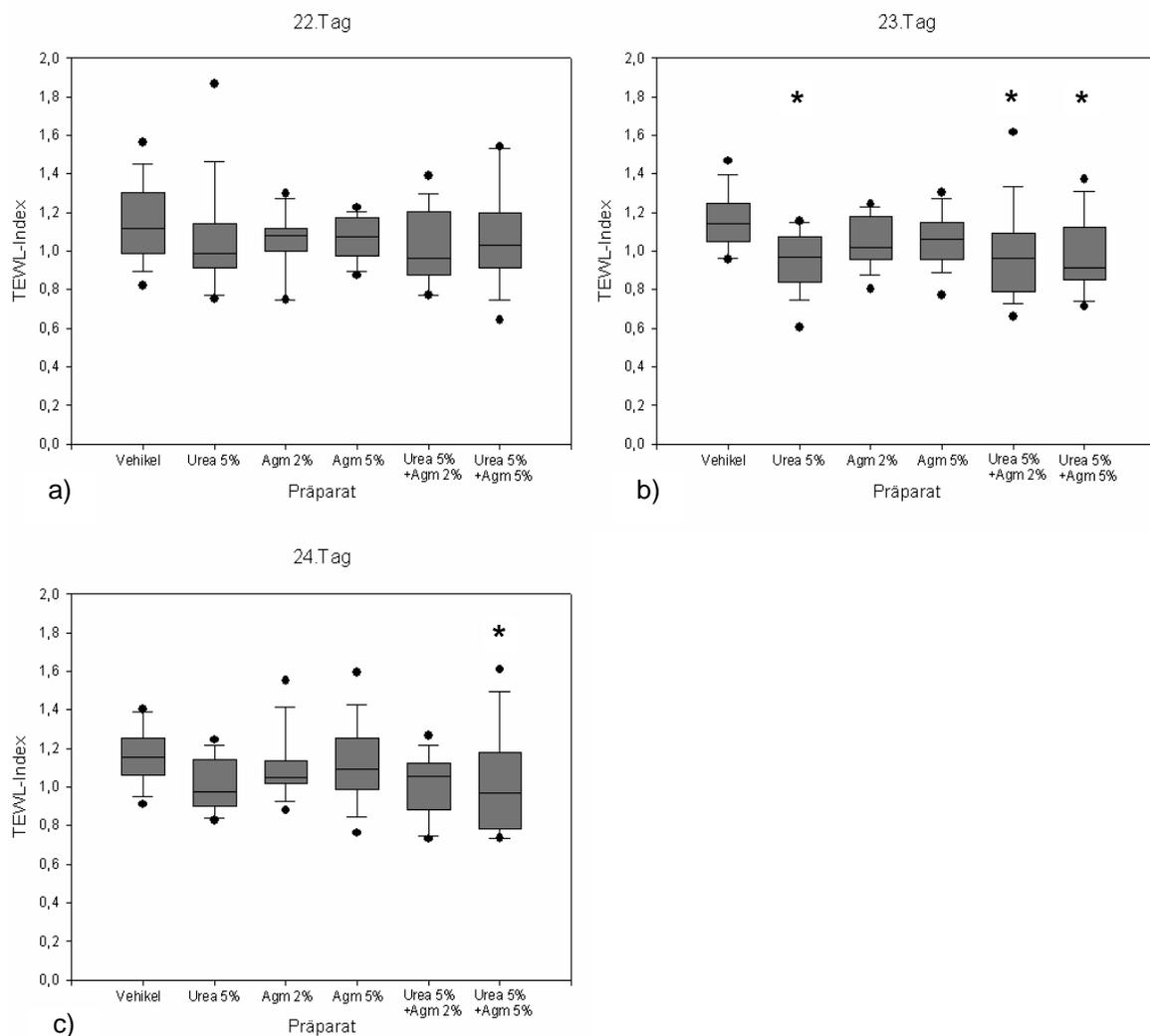


Abb. 15 Transepidermaler Wasserverlust der Haut (TEWL-Index)
a) 24 Stunden, b) 48 Stunden und c) 72 Stunden nach Beendigung der Applikation der Prüfpräparate

* = signifikanter Unterschied zum Vehikel, $p < 0,05$, $n = 16$

4.4. Erythrometrie

Bei keinem der Prüfpräparate ist eine signifikante Erhöhung der Erythrometrie-Werte über den gesamten Untersuchungszeitraum von 72 Stunden nachweisbar (Abb. 16).

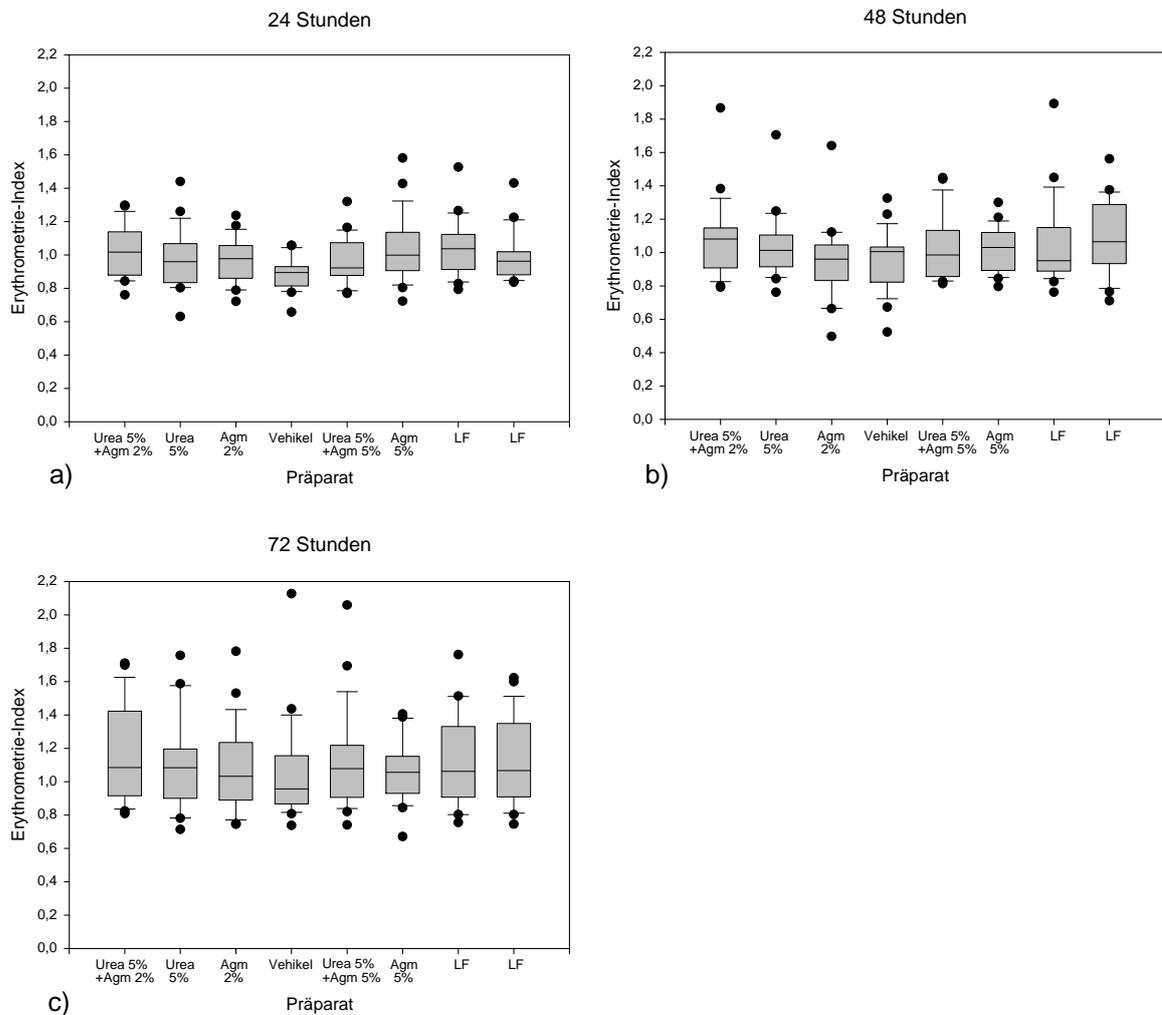


Abb. 16 Rötung der Haut (Erythrometrie-Index) in Abhängigkeit von den Prüfpräparaten

a) nach 24-stündiger, b) 48-stündiger und c) 72-stündiger Applikation

* = signifikanter Unterschied zum Erythrometrie-Wert vor Therapie, $p < 0,05$, $n = 23$

4.5. Visueller Klinischer Score

Nach 24-, 48-, bzw. 72-stündiger Applikation der Prüfpräparate traten vereinzelt sehr geringe Reaktionen in Form eines sehr schwachen Erythems auf, die mit einem Visuellen Klinischen Score von 1 bewertet wurden. Dies betraf Testareale, auf denen das Harnstoff 5% Monopräparat, die Harnstoff 5% + Agmatinsulfat 2% und Harnstoff 5% + Agmatinsulfat 5% Kombinationspräparate und das Agmatinsulfat 5% Monopräparat appliziert wurden sowie die beiden Kontrollfelder, auf denen leere Kammern geklebt wurden (Abb. 17).

Einmalig wurde ein Visueller Klinischer Score von 2 vergeben. Dies betraf ein Testareal nach 72-stündiger Applikation des Vehikels.

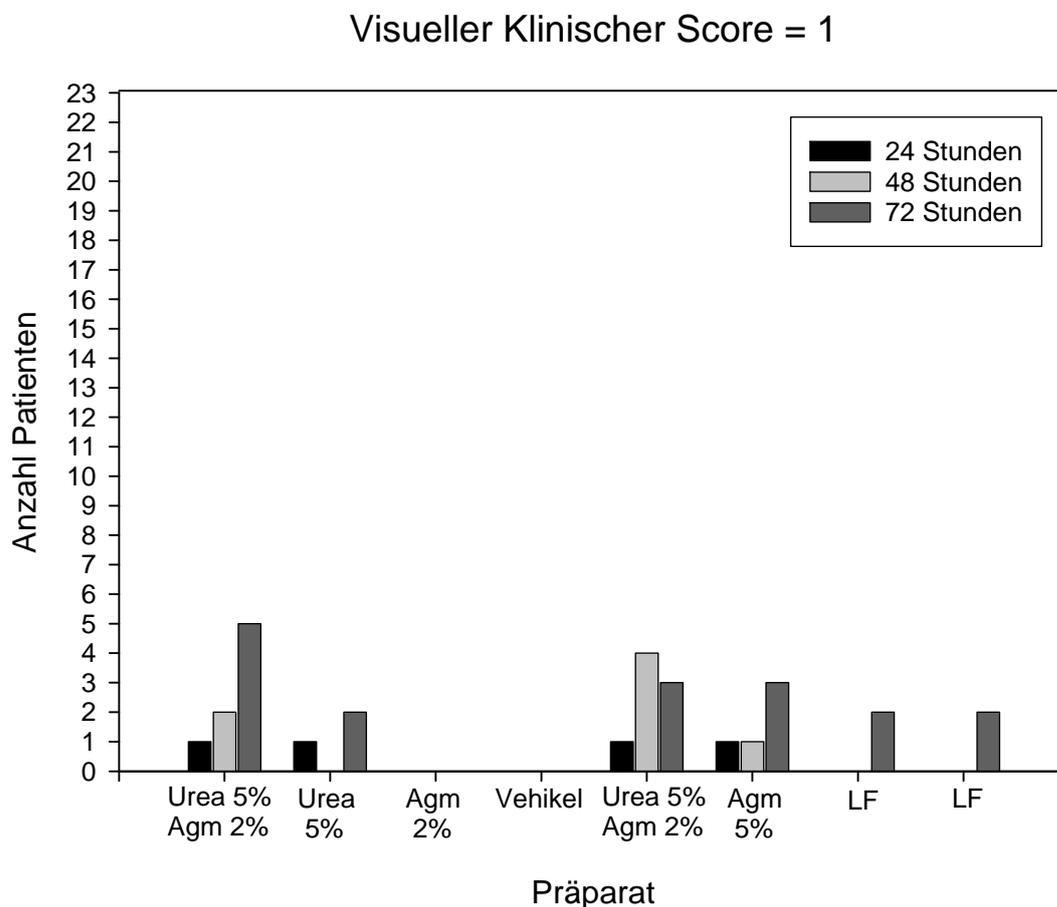


Abb. 17 Anzahl der Patienten mit einem Visuellen Klinischen Score von 1 nach 24-stündiger, 48-stündiger und 72-stündiger Applikation der Prüfpräparate bzw. der Kontrollfelder, n=23

4.6. Adverse Events

Insgesamt traten während der Durchführung der klinischen Studie bei sieben Patienten Adverse Events auf. In zwei Fällen wurde ein Zusammenhang mit den Prüfpräparaten als unwahrscheinlich bewertet (fiebrhafte Erkältung und Fahrradsturz). In fünf Fällen wurde ein Zusammenhang mit den Prüfpräparaten als wahrscheinlich bzw. möglich bewertet und der Schweregrad als 1 = mild eingestuft (Tab. 7).

Tab. 7 Während der klinischen Studie aufgetretene Adverse Events

Anzahl Patienten	Prüfpräparat	Art des Adverse Events
2	Vehikel	leichte Rötung, Papeln, Juckreiz
1	Harnstoff 5%	Rötung nach Auftragen für ½ h
2	Harnstoff 5% + Agmatin 5%	leichte Rötung, Papeln

5. Diskussion

Diese Arbeit beschäftigt sich mit der topischen Anwendung von Agmatinsulfat an Patienten mit atopischer Dermatitis im Rahmen einer klinischen Studie. Die atopische Dermatitis ist eine chronisch-entzündliche Hauterkrankung, die zum atopischen Formenkreis gezählt wird. Vererbt wird nur die genetische Krankheitsdisposition; durch endogene und/oder exogene Provokationsfaktoren kommt es zur Manifestation der Erkrankung. Charakteristisch ist die leicht reizbare, trockene Haut, auch im erscheinungsfreien Intervall. Diese klinische Eigenheit korrespondiert mit einer nachweisbar verringerten Wasserbindungskapazität, verminderter Hydratation sowie mit einer beeinträchtigten Barrierefunktion der Haut [41, 42, 43, 87]. Da in dieser klinischen Studie der Einfluss von topisch appliziertem Agmatin auf die Hydratation und die Barrierefunktion der Haut im Blickpunkt stand, wurde diese Patientengruppe im symptomfreien Intervall auserwählt. Es handelt sich hierbei um eine neuartige Therapieoption gegen trockene Haut, die erstmalig am Patienten angewendet wurde. Bisher existieren kaum Informationen in der Literatur hinsichtlich Agmatin und Haut.

5.1. Wirksamkeit

Da experimentell an nativen Keratinozyten eine erhöhte Harnstoffproduktion nach Applikation von Agmatinsulfat nachgewiesen werden konnte [80], sind die durch klinische Anwendung am Patienten zu erzielenden Effekte von besonderem Interesse. Um einen Einfluss auf die Hydratation und Barrierefunktion der Haut zu untersuchen, wurden definierte Testareale auf den Unterarmen von 24 Patienten 21 Tage lang zweimal täglich mit den Prüfpräparaten behandelt und nach 7, 14 und 21 Tagen untersucht.

5.1.1. Ist nach topischer Applikation von Agmatinsulfat ein Einfluss auf die Hydratation und Barrierefunktion der Haut klinisch nachweisbar?

Bei der Untersuchung der Hydratation und der Barrierefunktion der Haut fanden die Corneometrie und die Tewametrie Anwendung.

Die Corneometrie stellt eine etablierte und empfohlene nicht-invasive Methode zur Hautfeuchtigkeitsmessung dar [19, 66]. Bei Betrachtung der Wirkung der einzelnen Prüfpräparate gegenüber dem Hautzustand vor Therapiebeginn lässt sich eine signifikante Erhöhung der Hydratation der Hornschicht nach 7-tägiger Anwendung des Harnstoff 5% Monopräparates und der Harnstoff 5% + Agmatinsulfat 2% und Harnstoff 5% + Agmatinsulfat 5% Kombinationspräparate anhand signifikant erhöhter Corneometrie-Messwerte nachweisen. Diese bleibt bis zum Ende der Applikation am 21.Tag erhalten. Einen wesentlichen Einfluss auf den Feuchtigkeitshaushalt der Haut hat der sogenannte Natural Moisturizing Factor, dessen wichtiger Bestandteil der Harnstoff ist [24]. Dieser wird mittels der harnstoffhaltigen Präparate direkt topisch appliziert und entfaltet seine Wirkung hauptsächlich in der Hornschicht bzw. kann mittels des Agmatinsulfates im Keratinozyten der vitalen Epidermis neu synthetisiert werden. Harnstoff führt aufgrund einer Erhöhung der Wasserbindungskapazität zu einer Erhöhung der Hydratation der Hornschicht. Für harnstoffhaltige Präparate konnte schon in früheren Untersuchungen sowohl an gesunder als auch an trockener Haut eine Erhöhung der Corneometrie-Werte nachgewiesen werden [21, 25, 44, 46, 88, 89, 97].

Im Gegensatz dazu führen das Vehikel und die Agmatinsulfat 2% und Agmatinsulfat 5% Monopräparate zu keiner signifikanten Erhöhung des Feuchtigkeitsgehaltes der Hornschicht. Die Konzentrationen von 2% bzw. 5% Agmatinsulfat scheinen allein nicht ausreichend, um eine genügend hohe Harnstoffmenge zu synthetisieren, dass sich dies in einer signifikanten Erhöhung der Corneometrie-Werte niederschlägt. Eine Rolle spielt hier sicherlich die Frage nach Menge und Aktivität der Agmatinase in der Haut. Untersuchungen zur Expression der Agmatinase in menschlichem Gewebe ergaben, dass sich relativ geringe Mengen an mRNA in der Haut befinden [50]. Eine Induktion der Expression konnte an menschlichen Hepatozyten durch eine Hepatitis-B-Virus Infektion nachgewiesen werden [50]. Im Gegensatz zu Bakterien und Pflanzen

wurde an Ratten Hepatozyten gezeigt, dass Agmatin nur zu einem kleinen Teil (10% der aufgenommenen Agmatinmenge) von der Agmatinase zu Harnstoff und Putrescin umgesetzt wird [7]. Eine Steigerung der Aktivität des Enzyms ist jedoch möglich, wie es anhand der Makrophagen Agmatinase und LPS nachgewiesen wurde [81]. Im Rahmen von inflammatorischen Vorgängen konnte eine gleichsinnige Regulation der Agmatinase und der iNOS gezeigt werden. Die erhöhte Aktivität der Agmatinase führt zu einem Abfall des Agmatin Gehaltes in der Zelle, wodurch eine Hemmung der iNOS durch das Agmatinaldehyd verhindert wird [81]. Durch eine erhöhte Aktivität der Agmatinase in entzündeter Haut wäre eine stärkere Wirkung hinsichtlich der Harnstoffproduktion denkbar. Ebenso wäre es interessant, ob eine antiinflammatorische Wirkung durch Hemmung der iNOS klinisch nachweisbar ist.

Für das Vehikel selbst werden zwar keine signifikanten Erhöhungen der Corneometrie-Werte errechnet, es lässt sich aber eine Tendenz in diese Richtung erkennen (mögliche Eigenwirkung des Vehikels). Bei Betrachtung der Prüfpräparate gegenüber dem Vehikel ist auffällig, dass allein für das Harnstoff 5% + Agmatinsulfat 5% Kombinationspräparat bereits ab dem 7.Tag eine signifikante Erhöhung der Hydratation der Hornschicht nachweisbar ist. Dies kann als Bestätigung für eine tatsächliche Wirkung von Agmatin hinsichtlich der Steigerung der endogenen Harnstoffsynthese in vitaler humaner Haut angesehen werden. Die synergistische Wirkung des applizierten Harnstoffs und des Agmatins scheinen sich hierbei zu addieren, da der Harnstoff bzw. das Agmatin allein nach 7 Tagen keine signifikante Erhöhung der Hydratation bewirken. Eine entsprechende Konzentration des Agmatins von 5% ist wahrscheinlich mindestens nötig, da eine Kombination mit Agmatinsulfat 2% noch zu keiner signifikanten Steigerung der Hautfeuchtigkeit führt. Zusätzlich könnte die Wirkung des Agmatins aufgrund der bekannten penetrationsfördernden Eigenschaft des Harnstoffs verstärkt werden. Zwischen der ab dem 14.Tag gegenüber dem Vehikel gezeigten signifikanten Hydratationssteigerung des Harnstoff 5% Monopräparates und des Harnstoff 5% + Agmatinsulfat 5% Kombinationspräparates kann kein signifikanter Unterschied nachgewiesen werden. Hier wären weitergehende Untersuchungen mit einer größeren Anzahl an Patienten und einer höheren Konzentration an Agmatin von Interesse.

Der TEWL, gemessen mit Hilfe der Tewametrie, gilt als Maß für die Barrierefunktion der Hornschicht. Für keines der verwendeten Prüfpräparate kann eine signifikante Reduktion des TEWL nachgewiesen werden. Dies steht zumindest für Harnstoff im Gegensatz zu anderen Studien, wo eine Reduktion des TEWL sowohl an gesunder als auch an trockener Haut nachgewiesen wurde [21, 45]. Jedoch gibt es auch Untersuchungen an trockener Haut, wo eine Reduktion des TEWL erst bei einer Konzentration von Harnstoff 10% auftrat [88], oder wo ebenfalls nur eine Tendenz für Harnstoff 5% in Richtung niedrigere TEWL-Werte aufgezeigt wurde [44], bzw. wo für Harnstoff 4% keine signifikanten TEWL-Veränderungen gemessen wurden [25]. Die Ursache hierfür ist in einer für den barriereverbessernden Effekt möglicherweise zu geringen Konzentration der Wirkstoffe aber auch in der Methodik zu suchen. Die Tewametrie ist eine wichtige nicht-invasive und auch empfohlene Methode zur Einschätzung der Barrierefunktion der Haut [3, 65]. Sie ist einerseits gekennzeichnet durch eine hohe Sensitivität, andererseits ist eine ungewollte Beeinflussung der Messungen aufgrund einer Vielzahl von Einflussfaktoren (z.B. Umgebungsfaktoren [79], Menstruationszyklus [28], Händigkeit bei Messungen am Unterarm [91], mangelnde Ernährung an essentiellen Fettsäuren [10, 49]) möglich [25]. Bei der relativ kleinen Anzahl an Patienten kann dies erhebliche Auswirkungen für die statistische Auswertung haben. Die bei der Tewametrie gemessene Menge an austretendem Wasser besteht zum einen aus verdunstendem Wasserdampf (Menge abhängig vom Zustand der Hautbarriere) und zum anderen aus der Schweißsekretion. Da die Schweißsekretion die TEWL-Werte hinsichtlich der Rückschlüsse auf den Funktionszustand der epidermalen Barriere verfälschen würde, muss darauf geachtet werden, dass eine Schweißsekretion möglichst vermieden wird. Dies wurde umgesetzt, indem die Studie gemäß der Leitlinie für die Tewametrie "EEMCO Guidance for the Assessment of Transepidermal Water Loss in Cosmetic Sciences" [79] durchgeführt wurde. Hierdurch kann das Schwitzen aufgrund körperlicher und thermischer Stimuli vermieden werden. Jedoch ist es kaum möglich, die Schweißsekretion aufgrund emotionaler Stimuli zu beeinflussen. Dass dies einen wesentlichen Störfaktor darstellen kann, konnte in einer Untersuchung anhand vergleichender TEWL-Messungen mit und ohne anticholinergem Hemmung der Schweißdrüsen gezeigt werden [70]. Exakte TEWL

Messungen müssten nach einer anticholinergen Hemmung der Schweißdrüsen durchgeführt werden [70].

5.2. Dosisfindung

5.2.1. Bei welcher Konzentration von Agmatinsulfat können diese Effekte aufgezeigt werden?

Zwischen den beiden Monopräparaten mit 2% bzw. 5% Agmatin lässt sich kein Unterschied in der Wirksamkeit feststellen. Beide Konzentrationen sind nicht ausreichend für eine nachweisbare Erhöhung des Hydratationszustandes der Hornschicht.

In Kombination mit Harnstoff 5% hat Agmatin 5% Vorteile gegenüber Agmatin 2%. Hier lässt sich gegenüber dem Vehikel nachweisen, dass es als einzigstes Prüfpräparat bereits nach 7 Tagen zu einer signifikanten Verbesserung der Hautfeuchte führt.

Aufgrund der geringen Verfügbarkeit sowie der hohen Kosten des Agmatinsulfates wurden für diese Pilotstudie Präparate mit relativ geringen Konzentrationen von 2% bzw. 5% Agmatinsulfat gewählt. Es kann jedoch davon ausgegangen werden, dass höhere Konzentrationen an Agmatinsulfat zu einer verstärkten Steigerung der intrakeratinozytären Harnstoffsynthese und somit zu einem deutlicheren Effekt führen.

5.3. Wirkdauer

Um zu prüfen, ob und wie lange die Wirkung der Prüfpräparate über den Applikationszeitraum hinaus anhält, wurde die Applikation auf den Unterarmen nach 21 Tagen beendet und die Testareale nach 24, 48 sowie 72 Stunden weiterhin untersucht.

5.3.1. Ist die Wirkung des Agmatins nach Beendigung der Applikation anhaltend?

24 Stunden nach Beendigung der Applikation ist für keines der Prüfpräparate ein Effekt mehr nachweisbar. Die Wirkdauer des Agmatinsulfates liegt somit wahrscheinlich unter 24 Stunden. Dies deckt sich auch mit der Erkenntnis, dass bei topischer Harnstoffsubstitution Effekte hinsichtlich der Hydratation bereits nach einigen Stunden verschwinden [90, 97]. Für Untersuchungen der Wirkdauer des Agmatinsulfates sind daher kürzere Intervalle im Bereich von Stunden nach Absetzen der Therapie sinnvoll.

Es ist jedoch auch möglich, dass die endogene Harnstoffsynthese über 24 Stunden hinaus anhält, jedoch allein nicht ausreichend ist für signifikant erhöhte Messwerte.

5.4. Verträglichkeit

Für die Beurteilung der Verträglichkeit wurden alle Prüfpräparate bis zu 72 Stunden lang mittels Testpflaster auf den Rücken der Patienten appliziert. Nach 24, 48 und 72-stündiger Applikation erfolgte jeweils eine Einschätzung der Testareale anhand des Visuellen Klinischen Scores sowie eine Bestimmung der Hautröte mit Hilfe der Erythrometrie. Zusätzlich wurden während der gesamten Studienzeit aufgetretene Adverse Events dokumentiert.

5.4.1. Wie werden topische agmatinhaltige Präparate von Patienten mit atopischer Dermatitis vertragen?

Die Erythrometrie ist eine geeignete nicht-invasive Messmethode, um irritative Hautreaktionen und Gefäßreaktionen anhand auftretender Hautröte zu bestimmen [17]. Für kein Prüfpräparat kann eine signifikante Zunahme der Hautröte bei bis zu 72-stündiger Applikation nachgewiesen werden. Daraus ergibt sich kein Hinweis für eine toxisch-irritative Reaktion oder auch vaskuläre Effekte des Agmatins bei topischer Applikation. Dies bestätigen auch die Ergebnisse des Visuellen Klinischen Scores. Vereinzelt aufgetretene Reaktionen wurden durchweg mit 1

(Schuppung, sehr schwaches Erythem) bewertet und traten sowohl bei den Prüfpräparaten als auch auf den leeren Kontrollfeldern auf. Das einmalige Auftreten eines Visuellen Klinischen Scores von 2 bei einem Testareal, wo das Vehikel aufgetragen wurde, ist wahrscheinlich auf eine gleichzeitige Follikulitis zurückzuführen. Bei dieser Art der Verträglichkeitsprüfung muss man bedenken, dass zum einen die Haut der Patienten mit atopischer Dermatitis von vornherein oftmals empfindlich reagiert und zum anderen eine bis zu 72 Stunden lange Applikation unter Okklusivbedingungen eine weitaus extremere Belastung für die Haut darstellt, als es in der Praxis zu erwarten ist. Insgesamt decken sich die Ergebnisse mit vorangegangenen Untersuchungen des Agmatins am Modell der Chorioallantoismembran des Hühnereies, wo keinerlei Beeinflussung der Perfusion gezeigt werden konnte und die keine Hinweise auf eine akute Toxizität bei topischer Anwendung lieferten [80].

Während der 21-tägigen Behandlungsphase wurden die topischen Präparationen von allen Patienten gut toleriert. Einige Patienten berichteten über eine vorübergehende leichte Rötung und aufgetretene Papeln auf Testarealen die mit dem Vehikel, dem Harnstoff 5% Monopräparat bzw. dem Harnstoff 5% + Agmatinsulfat 5% Kombinationspräparat behandelt wurden. Diese Reaktionen sind wahrscheinlich auf den Harnstoff zurückzuführen, dessen irritative Wirkung bekannt ist. Für das Agmatinsulfat fanden sich keine Anzeichen einer Unverträglichkeit.

6. Zusammenfassung

In der vorliegenden Studie wurden erstmals die Effekte von topisch appliziertem Agmatin am Patienten untersucht.

Bei topischer Anwendung von Agmatin 2% sowie 5% ist eine Erhöhung der Hydratation der Hornschicht nicht feststellbar. Für die Agmatin 2% + Harnstoff 5% sowie Agmatin 5% + Harnstoff 5% Kombinationspräparate kann eine Erhöhung der Hydratation nachgewiesen werden. Es bestehen Vorteile in der Kombination mit Harnstoff. Die Kombination Agmatin 5% + Harnstoff 5% führt zu einer schnelleren Steigerung der Hydratation im Vergleich zum Monopräparat. Für diesen Effekt kann eine Addition der Wirkungen beider Substanzen verantwortlich gemacht werden: 1. Erhöhung des Harnstoffgehalts der Hornschicht durch Absorption aus der Creme + 2. Erhöhung des Harnstoffgehalts durch Steigerung der intrakeratinozytären Harnstoffsynthese. Für die Kombination Agmatin 2% + Harnstoff 5% ist dieser schnelle Effekt nicht nachweisbar.

Weder für Agmatin 2% und 5% allein noch für Agmatin 2% und 5% in Kombination mit Harnstoff 5% kann ein barriereverbessernder Effekt anhand einer Senkung des transepidermalen Wasserverlustes (TEWL) belegt werden.

Die Wirkdauer agmatinhaltiger Präparate scheint unter 24 Stunden zu liegen.

Während der 21-tägigen Behandlungsphase wurden agmatinhaltige Präparate von allen Patienten sehr gut toleriert. Es gibt keine Anzeichen für eine Unverträglichkeit topischer Agmatin-Präparate.

In der Testung der Verträglichkeit mit Hilfe der Erythrometrie und eines Visuellen Klinischen Scores finden sich keine Hinweise für eine irritativ-toxische Wirkung agmatinhaltiger Präparate auf der Haut.

Agmatin stellt eine mögliche Therapiealternative für trockene Haut, z.B. bei chronisch-entzündlichen Dermatosen wie der atopischer Dermatitis oder der Altershaut, dar. Weitergehende Untersuchungen mit höheren Agmatinkonzentrationen, einer größeren Patientenzahl, einer längeren Therapiedauer oder auch mit einem anderen Patientengut wären von großem Interesse.

7. Literaturverzeichnis

- [1] Ahn HJ, Kim KH, Lee J, Ha JY, Lee HH, Kim D, Yoon HJ, Kwon AR, Suh SW:
Crystal structure of agmatinase reveals structural conservation and inhibition mechanism of the ureohydrolase superfamily
J Biol Chem 279(48), Nov (2004) 50505-50513
- [2] Auguet M, Viossat I, Marin JG, Chabrier PE:
Selective inhibition of inducible nitric oxide synthase by agmatin
Jpn J Pharmacol 69(3) (1995) 285-287
- [3] Barel AO, Clarys P:
Study of the stratum corneum barrier function by transepidermal water loss measurements: comparison between two commercial instruments: evaporimeter and tewameter
Skin Pharmacol 8(4) (1995) 186-195
- [4] Bargmann W:
Histologie und Mikroskopische Anatomie des Menschen, 7. Aufl.
Georg Thieme, Stuttgart, 1977, S. 592
- [5] Blantz RC, Satriano J, Gabbai F, Kelly C:
Biological effects of arginine metabolites
Acta Physiol Scand 168 (2000) 21-25
- [6] Burkard G, Schmitt S:
Langzeitstudie „Neurodermitis-Therapie mit harnstoffhaltigen Externa“
Hautarzt 43, Suppl. 11 (1992) 13-17
- [7] Cabella C, Gardini G, Corpillo D, Testore G, Bedino S, Solinas SP, Cravanzola C, Vargiu C, Grillo MA, Colombatto S:
Transport and metabolism of agmatine in rat hepatocyte cultures
Eur J Biochem 268 (2001) 940-947
- [8] Cals-Grierson M-M, Ormerod AD:
Nitric oxide function in the skin
Nitric Oxide 10(4), Jun (2004) 179-193
- [9] Caspers PJ, Lucassen GW, Carter EA, Bruining HA Puppels GJ:
In vivo confocal raman microspectroscopy of the skin: noninvasive determination of molecular concentration profiles
J Invest Dermatol 116 (2001) 434-442
- [10] Chilcott RP; Farrar R:
Biophysical measurements of human forearm skin in vivo: effects of site, gender, chirality and time
Skin Res Technol 6 (2000) 64-69

-
- [11] Demady DR, Jianmongkol S, Vuletich JL, Bender AT, Osawa Y:
Agmatine enhances the NADPH oxidase activity of neuronal NO synthase
and leads to oxidative inactivation of the enzyme
Mol Pharmacol 59 (2001) 24-29
- [12] Drosner M:
Wege zur rationellen Kortisontherapie über Harnstoff-Zusätze - Begegnung
der Kortisonphobie
Hautarzt 43, Suppl. 11 (1992) 23-28
- [13] Dudkowska M, Lai J, Gardini G, Stachurska A, Grzelakowska-Sztaber B,
Colombatto S, Manteuffel-Cymborowska M:
Agmatine modulates the in vivo biosynthesis and interconversion of
polyamines and cell proliferation
Biochim Biophys Acta 1619(2) (2003) 159-166
- [14] Estler C-J:
Pharmakologie und Toxikologie, 4. Aufl.
Schattauer, Stuttgart, New York, 1999
- [15] Feng Y, Piletz JE, Leblanc MH:
Agmatine suppresses nitric oxide production and attenuates hypoxic-
ischemic brain injury in neonatal rats
Pediatr Res 52 (2002) 606-611
- [16] Fritsch P:
Dermatologie und Venerologie: Lehrbuch und Atlas
Springer, Berlin, Heidelberg, New York (usw.), 1998
- [17] Fullerton A, Fischer T, Lahti A, Wilhelm K-P, Takiwaki H, Serup J:
Guidelines for measurement of skin colour and erythema
A report from the Standardization Group of the European Society of Contact
Dermatitis
Contact Dermatitis 35(1), Jul (1996) 1-10
- [18] Galea E, Regunathan S, Eliopoulos V, Feinstein DL, Reis DJ:
Inhibition of mammalian nitric oxide synthases by agmatine, an endogenous
polyamine formed by decarboxylation of arginine
Biochem J 316 (1996) 247-249
- [19] Girad P, Beraud A, Sirvent A:
Study of three complementary techniques for measuring cutaneous
hydration in vivo in human subjects: NMR spectroscopy, transient thermal
transfer and corneometry – application to xerotic skin and cosmetics
Skin Res Technol 6 (2000) 205-213
- [20] Gloor M, Reichling J, Wasik B, Holzgang HE:
Antiseptic effect of a topical dermatological formulation that contains
hamamelis distillate and urea
Forsch Komplementärmed Klass Naturheilkd 9 (2002) 153-159
-

-
- [21] Gloor M, Fluhr J, Lehmann L, Gehring W, Thieroff-Ekerdt R:
Do urea/ammonium lactate combinations achieve better skin protection and hydration than either component alone?
Skin Pharmacol Appl Skin Physiol 15 (2002) 35-43
- [22] Gloor M, Gehring W:
Eigenwirkungen von Emulsionen auf die Hornschichtbarriere und –hydratation
Hautarzt 54 (2003) 324-330
- [23] Gloor M:
How do dermatological vehicles influence the horny layer?
Skin Pharmacol Physiol 17 (2004) 267-273
- [24] Gloor M:
Pharmakologie dermatologischer Externa
Springer, Berlin, Heidelberg, New York, 1982
- [25] Hagströmer L, Nyren M, Emtestam L:
Do urea and sodium chloride together increase the efficacy of moisturisers for atopic dermatitis skin?
Skin Pharmacol Appl Skin Physiol 14 (2001) 27-33
- [26] Halaris A, Piletz JE:
Relevance of imidazoline receptors and agmatine to psychiatry
Ann NY Acad Sci 1009 (2003) 1-19
- [27] Harding CR:
The stratum corneum: structure and function in health and disease
Dermatol Ther 17 (2004) 6-15
- [28] Harvell J, Hussona-Saeed I, Maibach HI:
Changes in transepidermal water loss and cutaneous blood flow during the menstrual cycle
Contact Dermatitis 27(5) Nov (1992) 294-301
- [29] Haulica I, Bild W, Iliescu R, Georgescu R, Frunza F:
Preliminary research on possible relationship of NO with agmatine at the vascular level
Rom J Physiol 36(1-2) (1999) 67-79
- [30] Heinen A, Brüss M, Bönisch H, Göthert M, Molderings GJ:
Pharmacological characteristics of the specific transporter for the endogenous cell growth inhibitor agmatine in six tumor cell lines
Int J Colorectal Dis 18 (2003) 314-319
- [31] Horyn O, Luhovyy B, Lazarow A, Daikhin Y, Nissim I, Yudkoff M, Nissim I:
Biosynthesis of agmatine in isolated mitochondria and perfused rat liver: Studies with ¹⁵N-labeled arginine
Biochem J 388(Pt 2), Jun (2005) 419-425
-

-
- [32] Hutchinson D:
GCP-Handbuch für Prüfärzte
Brookwood Medical Publications, Richmond, Surrey, UK, 2001
- [33] Inoue T, Tsujii K, Okamoto K, Toda K:
Differential scanning calorimetric studies on the melting behavior of water in stratum corneum
J Invest Dermatol 86(6) Jun (1986) 689-693
- [34] Ishizuka S, Cunard R, Poucell-Hatton S, Wead L, Lortie M, Thomson SC, Gabbai FB, Satriano J, Blantz RC:
Agmatine inhibits cell proliferation and improves renal function in anti-thy-1 glomerulonephritis
J Am Soc Nephrol 11 (2000) 2256-2264
- [35] Iyer RK, Kim HK, Tsoa RW, Grody WW, Cederbaum SD:
Cloning and characterization of human agmatinase
Mol Genet Metab 75(3), Mar (2002) 209-218
- [36] Jung EG:
Dermatologie, 4.Aufl.
Hippokrates, Stuttgart, 1998
- [37] Karlson P:
Kurzes Lehrbuch der Biochemie für Mediziner und Naturwissenschaftler, 14.Aufl.
Georg Thieme, Stuttgart, New York, 1994
- [38] Li G, Regunathan S, Barrow CJ, Eshragi J, Cooper R, Reis DJ:
Agmatine: an endogenous clonidine-displacing substance in the brain
Science 263(5149) (1994) 966-969
- [39] Li Q, He RR:
Action of agmatine on tension of isolated aortic artery and its receptor mechanism in rats
Sheng Li Xue Bao 53(2), April (2001) 133-136
- [40] Li XT, He RR:
Hemodynamic effects of agmatine and its cellular mechanism in anesthetized rats
Sheng Li Xue Bao 51(2) (1999) 229-233
- [41] Linde YW:
Dry skin in atopic dermatitis
Acta Derm Venereol Suppl (Stockh) 177 (1992) 9-13
- [42] Lodén M:
Do moisturizers work?
J Cosmet Dermat 2 (2004) 141-149
-

-
- [43] Lodén M, Olsson H, Axell T, Linde YW:
Friction, capacitance and transepidermal water loss (TEWL) in dry atopic and normal skin
Br J Dermatol 126(2) Feb (1992) 137-41
- [44] Lodén M, Andersson A-C, Lindberg M:
Improvement in skin barrier function in patients with atopic dermatitis after treatment with a moisturizing cream (Canoderm®)
Br J Dermatol 140 (1999) 264-267
- [45] Lodén M, Andersson AC, Andersson C, Frödin T, Öman H, Lindberg M:
Instrumental and dermatologist evaluation of the effect of glycerine and urea on dry skin in atopic dermatitis
Skin Res Technol 7(4) (2001) 209-213
- [46] Lodén M:
Urea-containing moisturizers influence barrier properties of normal skin
Arch Dermatol Res 288 (1996) 103-107
- [47] Lortie MJ, Novotny WF, Peterson OW, Vallon V, Malvey K, Mendonca M, Satriano J, Insel P, Thomson SC, Blantz RC:
Agmatine, a bioactive metabolite of arginine
Production, degradation, and functional effects in the kidney of the rat
J Clin Invest 97, No. 2 (1996) 413-420
- [48] Marty JP:
NMF and cosmetology of cutaneous hydration
Ann Dermatol Venereol 129(1 Pt 2) (2002) 131-136
- [49] Meguro S, Arai Y, Masukawa Y, Uie K, Tokimitsu I:
Relationship between covalently bound ceramides and transepidermal water loss (TEWL)
Arch Dermatol Res 292 (2000) 463-468
- [50] Mistry SK, Burwell TJ, Chambers RM, Rudolph-Owen L, Spaltmann F, Cook WJ, Morris SM Jr:
Cloning of human agmatinase. An alternate path for polyamine synthesis induced in liver by hepatitis B virus
Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol 282 (2002) G375-G381
- [51] Molderings GJ, Bönisch H, Göthert M, Brüss M:
Agmatine and putrescine uptake in the human glioma cell line SK-MG-1
Naunyn-Schmiedeberg's Arch Pharmacol 363 (2001) 671-679
- [52] Molderings GJ, Heinen A, Menzel S, Lübbecke F, Homann J, Göthert M:
Gastrointestinal uptake of agmatine
Distribution in tissues and organs and pathophysiologic relevance
Ann NY Acad Sci 1009 (2003) 44-51

-
- [53] Molderings GJ, Brüss M, Bönisch H, Göthert M:
Identification and pharmacological characterization of a specific agmatine transport system in human tumor cell lines
Ann NY Acad Sci 1009 (2003) 75-81
- [54] Morris SM Jr:
Recent advances in arginine metabolism
Curr Opin Clin Nutr Metab Care 7(1) (2004) 45-51
- [55] Morris SM Jr:
Vertebrate agmatinases: what role do they play in agmatine catabolism?
Ann NY Acad Sci 1009 (2003) 30-33
- [56] Morrissey JJ, Klahr S:
Agmatine activation of nitric oxide synthase in endothelial cells
Proc Assoc Am Physicians 109(1) (1997) 51-57
- [57] Müller KH, Pflugshaupt Ch:
Harnstoff in der Dermatologie I
Hautarzt 40, Suppl. 9 (1989) 1-12
- [58] Müller KH, Pflugshaupt Ch:
Harnstoff in der Dermatologie II
Hautarzt 40, Suppl. 9 (1989) 13-19
- [59] Mutschler E:
Arzneimittelwirkungen: Lehrbuch der Pharmakologie und Toxikologie, 7. Aufl.
Wissenschaftliche Verlagsgesellschaft, Stuttgart, 1997
- [60] Nagler M:
Skin-HET-CAM Ein in-vivo-Penetrationsmodell an perfundierter, vitaler Humanhaut
Diplomarbeit, Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg (2004)
- [61] Nakagawa N, Sakai S, Matsumoto M, Yamada K, Nagano M, Yuki T, Sumida Y, Uchiwa H:
Relationship between NMF (lactate and potassium) content and the physical properties of the stratum corneum in healthy subjects
J Invest Dermatol 122 (2004) 755-763
- [62] Nenoff P, Donaubaue K, Arndt T, Haustein U-F:
Topisch appliziertes Argininhydrochlorid
Hautarzt 55 (2004) 58-64
- [63] Nguyen HOX, Goracke-Postle CJ, Kaminski LL, Overland AC, Morgan AD, Fairbanks CA:
Neuropharmacokinetic and dynamic studies of agmatine (decarboxylated arginine)
Ann NY Acad Sci 1009 (2003) 82-105
-

-
- [64] Nissim I, Horyn O, Daikhin Y, Nissim I, Lazarow A, Yudkoff M:
Regulation of urea synthesis by agmatine in the perfused liver: studies with ^{15}N
Am J Physiol Endocrinol Metab 283 (2002) E1123-E1134
- [65] Oestmann E, Lavrijsen AP, Hermans J, Ponc M:
Skin barrier function in healthy volunteers as assessed by transepidermal water loss and vascular response to hexyl nicotinate: intra- and inter-individual variability
Br J Dermatol 128(2) Feb (1993) 130-136
- [66] O'goshi K, Serup J:
Inter-instrumental variation of skin capacitance measured with the corneometer
Skin Res Technol 11 (2005) 107-109
- [67] Ormerod AD, Copeland P, Hay I, Husain A, Ewen SWB:
The inflammatory and cytotoxic effects of a nitric oxide releasing cream on normal skin
J Invest Dermatol 113 (1999) 392-397
- [68] Panisset F, Treffel P, Faivre B, Lecomte PB, Agache P:
Transepidermal water loss related to volar forearm sites in humans
Acta Derm Venereol 72(1) (1992) 4-5
- [69] Pinnagoda J, Tupker RA, Smit JA, Coenraads PJ, Nater JP:
The intra- and inter-individual variability and reliability of transepidermal water loss measurements
Contact Dermatitis 21(4) Oct (1989) 255-259
- [70] Pinnagoda J, Tupker RA, Coenraads PJ, Nater JP:
Transepidermal water loss with and without sweat gland inactivation
Contact Dermatitis 21(1) Jul (1989) 16-22
- [71] Puschmann M, Gogoll K:
Verbesserung der Hautfeuchte und des Hautreliefs unter Harnstofftherapie
Hautarzt 40, Suppl. 9 (1989) 67-70
- [72] Raab W:
Biochemie, Pharmakologie und Toxikologie von Harnstoff
Hautarzt 40, Suppl. 9 (1989) 23-26
- [73] Raasch W, Regunathan S, Li G, Reis DJ:
Agmatine, the bacterial amine, is widely distributed in mammalian tissues
Life Sci 56(26) (1995) 2319-2330
- [74] Raasch W, Schäfer U, Chun J, Dominiak P:
Biological significance of agmatine, an endogenous ligand at imidazoline binding sites
Br J Pharmacol 133(6), Jul (2001) 755-780
-

- [75] Rawlings AV, Harding CR:
Moisturization and skin barrier function
Dermatol Ther 17 Suppl. 1 (2004) 43-48
- [76] Regunathan S, Reis DJ:
Characterization of arginine decarboxylase in rat brain and liver: distinction from ornithine decarboxylase
J Neurochem 74 (2000) 2201-2208
- [77] Regunathan S, Piletz JE:
Regulation of inducible nitric oxide synthase and agmatine synthesis in macrophages and astrocytes
Ann NY Acad Sci 1009 (2003) 20-29
- [78] Reis DJ, Regunathan S:
Is agmatine a novel neurotransmitter in brain?
Trends Pharmacol Sci 21(5), May (2000) 187-193
- [79] Rogiers V, EEMCO Group:
EEMCO guidance for the assessment of transepidermal water loss in cosmetic sciences
Skin Pharmacol Appl Skin Physiol 14 (2001) 117-128
- [80] Rzepka K:
Präklinische Charakterisierung von Agmatin zur epikutanen Applikation
Diplomarbeit, Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg (2003)
- [81] Sastre M, Galea E, Feinstein D, Reis DJ, Regunathan S:
Metabolism of agmatine in macrophages: modulation by lipopolysaccharide and inhibitory cytokines
Biochem J 330 (1998) 1405-1409
- [82] Satriano J:
Agmatine: at the crossroads of the arginine pathways
Ann NY Acad Sci 1009 (2003) 34-43
- [83] Satriano J, Matsufuji S, Murakami Y, Lortie MJ, Schwartz D, Kelly CJ, Hayashi S, Blantz RC:
Agmatine suppresses proliferation by frameshift induction of antizyme and attenuation of cellular polyamine levels
J Biol Chem 273(25), June 19, (1998) 15313-15316
- [84] Satriano J, Kelly CJ, Blantz RC:
An emerging role for agmatine
Kidney Int 56(4), Oct (1999) 1252-1253
- [85] Satriano J, Isome M, Casero jr. RA, Thomson SC, Blantz RC:
Polyamine transport system mediates agmatine transport in mammalian cells
Am J Physiol Cell Physiol 281 (2001) C329-C334

-
- [86] Satriano J, Schwartz D, Ishizuka S, Lortie MJ, Thomson SC, Gabbai F, Kelly CJ, Blantz RC:
Suppression of inducible nitric oxide generation by agmatine aldehyde: beneficial effects in sepsis
J Cell Physiol 188 (2001) 313-320
- [87] Seidenari S, Giusti G:
Objective assessment of the skin of children affected by atopic dermatitis: a study of pH, capacitance and TEWL in eczematous and clinically uninvolved skin
Acta Derm Venereol 75(6) Nov (1995) 429-433
- [88] Serup J:
A double-blind comparison of two creams containing urea as the active ingredient. Assessment of efficacy and side-effects by non-invasive techniques and a clinical scoring scheme
Acta Derm Venereol Suppl 177 (1992) 34-43
- [89] Swanbeck G:
Harnstoff als Monotherapie bei trockener Haut
Hautarzt 40, Suppl. 9 (1989) 42-43
- [90] Taube K-M:
Feuchthalteeffekt und Verträglichkeit von harnstoffhaltigen Externa bei Neurodermitikern
Hautarzt 43, Suppl. 11 (1992) 30-31
- [91] Treffel P, Panisset F, Faivre B, Agache P:
Hydration, transepidermal water loss, pH and skin surface parameters: correlations and variations between dominant and non-dominant forearms
Br J Dermatol 130(3) Mar (1994) 325-328
- [92] von Mayenburg J:
Langzeitstudie „Neurodermitistherapie mit harnstoffhaltigen Externa
Hautarzt 43, Suppl. 11 (1992) 18-19
- [93] Wohlrab J:
Der Einfluß von L-Arginin auf die Regulation der epidermalen Arginase
Habilitation, Med. Fak. Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg (2001)
- [94] Wohlrab J, Marsch WC:
Klinische Erfahrungen mit topisch appliziertem L-Arginin
Zschr Hautkr 75 (2000) 485
- [95] Wohlrab J:
L-Arginin oder Agmatin?
Hautarzt 55 (2004) 689-690
- [96] Wohlrab J, Siemes C, Marsch WCh:
The influence of L-arginine on the regulation of epidermal arginase
Skin Pharmacol Appl Skin Physiol 15 (2002) 44-54
-

- [97] Wohlrab W:
Bedeutung von Harnstoff in der externen Therapie
Hautarzt 40, Suppl. 9 (1989) 35-41
- [98] Wohlrab W:
Einführung Neurodermitis und Harnstoff
Hautarzt 43, Suppl. 11 (1992) 1-4
- [99] Wu G, Morris SM Jr:
Arginine metabolism: nitric oxide and beyond
Biochem J 336 (1998) 1-17
- [100] Zhu M-Y, Iyo A, Piletz JE, Regunathan S:
Expression of human arginine decarboxylase, the biosynthetic enzyme for
agmatine
Biochim Biophys Acta 1670(2) (2004) 156-164

Aus der Universitätsklinik und Poliklinik für Dermatologie und Venerologie
an der Martin-Luther-Universität Halle Wittenberg
(Direktor: Prof. Dr. med. habil. W. Ch. Marsch)

Thesen der Dissertation

Klinische Wirksamkeit und Verträglichkeit von topisch appliziertem Agmatin

zur Erlangung des akademischen Grades
Doktor der Medizin (Dr. med.)

vorgelegt
der Medizinischen Fakultät
der Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg

von Dana Ehrich, geb. Weiner
geboren am 13. Dezember 1977 in Halle/Saale

1. Erkenntnisse über die Rolle und Funktion des Agmatin im Hautorgan sind relativ neu und wenig umfassend.
2. Das Enzym Agmatinase metabolisiert Agmatin zu Putrescin und Harnstoff. Harnstoff ist ein wesentlicher Bestandteil des Natural Moisturizing Factor im Stratum corneum und dient der Regulation des Feuchtigkeitshaushaltes und der Barrierefunktion der Hornschicht.
3. Im Rahmen einer klinischen Studie wurde in einem prospektiven, randomisierten, doppelblinden, vehikel- und referenzkontrollierten Design gemäß den ICH-GCP-Richtlinien bei 24 Patienten mit atopischer Dermatitis die Wirksamkeit auf die Hydratation und Barrierefunktion der Hornschicht von Agmatin in Form des Agmatinsulfates nach topischer Applikation validiert.
4. Die Prüfsubstanz wurde in einer amphiphilen Grundlage galenisch formuliert und zweimal täglich über 21 Tage topisch appliziert. Dies entspricht dem präklinisch validierten Penetrationsoptimum.
5. Als Zielparameter wurden die Hydratation der Hornschicht sowie der transepidermale Wasserverlust als Maß der Barrierefunktion der Hornschicht mit nicht-invasiven, validierten Messmethoden ermittelt.
6. Vergleichend zu den 2%- und 5%-igen Agmatin-Zubereitungen wurden Positiv- (Harnstoff 5% Monopräparat, Agmatin 2% + Harnstoff 5% und Agmatin 5% + Harnstoff 5% Kombinationspräparate) sowie Negativkontrollen (Vehikel) mitgeführt.
7. In der Auswertung der Studiendaten wird deutlich, dass nach topischer Applikation von Agmatin 2% und 5% Monopräparaten eine Wirksamkeit auf die Hydratation und Barrierefunktion der Hornschicht nicht nachweisbar ist.

8. Im Gegensatz dazu lässt sich aber bei Kombination von Agmatin mit dem bekannten Moisturizer Harnstoff ein verbesserter Effekt von Harnstoff auf die Hydratation und somit die Barrierefunktion der Hornschicht belegen.
9. In Kombination mit Harnstoff 5% führt Agmatin 5% zu einer schneller nachweisbaren Erhöhung der Hydratation der Hornschicht als Harnstoff 5% allein.
10. Eine anhaltende Wirkung agmatinhaltiger Präparate kann bereits 24 Stunden nach Absetzen der Präparate nicht festgestellt werden.
11. Patienten mit atopischer Dermatitis vertragen agmatinhaltige Präparate bei regelmäßiger topischer Anwendung über 21 Tage sehr gut.
12. In der Verträglichkeitstestung ergeben sich keine Hinweise für toxisch-irritative Reaktionen agmatinhaltiger Präparate.
13. Die Ergebnisse der Studie rechtfertigen weitergehende Untersuchungen klinisch relevanter Effekte agmatinhaltiger Monopräparate und von Agmatin als Zusatz topischer Präparationen.

Lebenslauf

Persönliche Angaben

Name	Dana Ehrich, geb. Weiner
Anschrift	Ludwig-Wucherer-Str. 78, 06108 Halle/S.
Geburtsdatum	13.12.1977
Geburtsort	Halle/S.
Familienstand	verheiratet mit Dr. Dirk Ehrich, Arzt
Vater	Prof. Dr. Rüdiger Weiner, geb. 27.10.1953
Mutter	Tatjana Weiner, geb. Jablakowa; geb. 09.09.1954

Schulbildung

1984-1991	Polytechnische Oberschule „Gustav Borrmann“ in Halle/S.
1992-1996	Gymnasium „Adolf Reichwein“ in Halle/S.
1996	Erlangung der Allgemeinen Hochschulreife

Studium

1996	Immatrikulation an der Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg im Studiengang Humanmedizin
1998	Absolvierung der Ärztlichen Vorprüfung
1999	Erster Abschnitt der Ärztlichen Prüfung <u>Famulaturen:</u> <ul style="list-style-type: none">- Allgemeinmedizin- Anästhesie- Pädiatrie- Pathologie- Augenheilkunde
2002	Zweiter Abschnitt der Ärztlichen Prüfung

- 2002 Praktisches Jahr:
- Innere Medizin, BG-Kliniken Bergmannstrost, Halle/S.
 - Chirurgie, Krankenhaus St. Elisabeth, Halle/S
 - Dermatologie, Universitätsklinik für Dermatologie und Venerologie, Halle/S.
- 2003 Dritter Abschnitt der Ärztlichen Prüfung

Anstellungen

- 01.08.03–30.09.04 angestellt als Ärztin im Praktikum am Institut für Angewandte Dermatopharmazie e. V. an der Universitätsklinik und Poliklinik für Dermatologie und Venerologie der Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg
- 01.10.04–15.11.04 angestellt als Assistenzärztin am Institut für Angewandte Dermatopharmazie e. V. an der Universitätsklinik und Poliklinik für Dermatologie und Venerologie der Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg
- seit 01.07.2005 angestellt als Assistenzärztin bei Doz. Dr. med. habil. C.-J. Reiß, Arztpraxis für Haut- u. Geschlechtskrankheiten, Allergologie, Andrologie, Phlebologie, Halle/S.

Promotion

- seit 10/2003 Klinische Wirksamkeit und Verträglichkeit von topisch appliziertem Agmatin, PD Dr. med. habil. J. Wohlrab, Universitätsklinik und Poliklinik für Dermatologie und Venerologie der Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg

Kurse

- 09/2003 Teilnahme und erfolgreiche Absolvierung des zertifizierten Kurses „Investigator Support Initiative (ISI): Performing Clinical Trials according to ICH GCP“ in Leipzig

Halle im Juli 2005

Erklärung

Hiermit versichere ich, dass ich die vorliegende Arbeit selbstständig und ohne fremde Hilfe verfasst, keine anderen als die von mir angegebenen Quellen und Hilfsmittel benutzt und die den benutzten Werken wörtlich oder inhaltlich entnommenen Stellen als solche kenntlich gemacht habe.

Die Promotion wurde an keiner anderen Universität oder Hochschule vorgelegt.

Halle, den

Dana Ehrich

Danksagung

Ich danke *Herrn Prof. Dr. med. habil. W. Ch. Marsch* für die Möglichkeit meiner Promotion an der von ihm geleiteten Universitätsklinik und Poliklinik für Dermatologie und Venerologie der Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg.

Ganz herzlich möchte ich mich bei meinem Betreuer *PD Dr. med. habil. J. Wohlrab* für die Überlassung des Themas, die großzügige Unterstützung und besonders für das stets „offene Ohr“ und seine Beratung in allen Phasen meiner Arbeit bedanken.

Dem Studienteam des Zentrums für Klinische Studien Dermatologie *Kirsti Meinel, Fr. Fleischhauer* und *Antje Zimmermann* danke ich für die Unterstützung bei der Planung und Durchführung der klinischen Studie und vor allem für die liebe Arbeitsatmosphäre.

Kristin Recker, Karin Rzepka, Ferdinand Steierhoffer, Christian Kindler und *Michael Nagler* bin ich für zahlreiche Hilfestellungen sowie für herzliche und auch heitere Zeiten während meiner Arbeit sehr dankbar.

Ein großes Dankeschön geht an *meine Familie* und besonders lieb bedanken möchte ich mich bei *meinem Ehemann Dirk* für seinen Zuspruch, seine Aufmunterungen und Ratschläge.