

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 nerval 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:

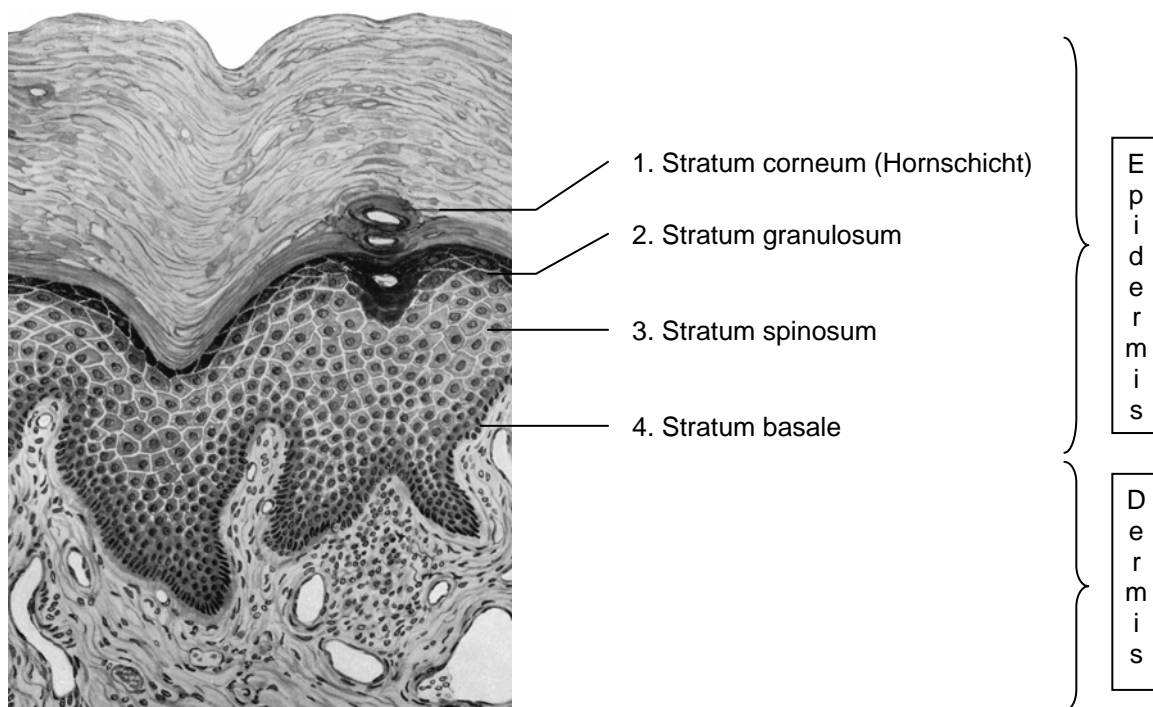


Abb. 1 Histologischer Schnitt durch die menschliche Haut (Fingerbeere) [aus 4]

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).

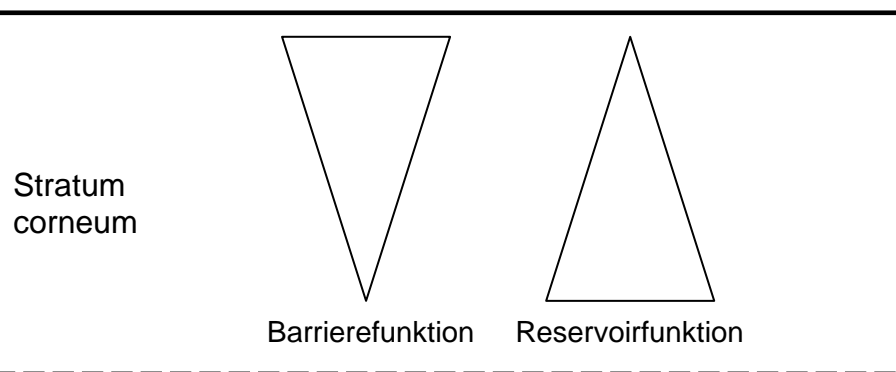


Abb. 2 Barriere- und Reservoirfunktion der Hornschicht

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, Pyrrolidoncarbonsäure 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].

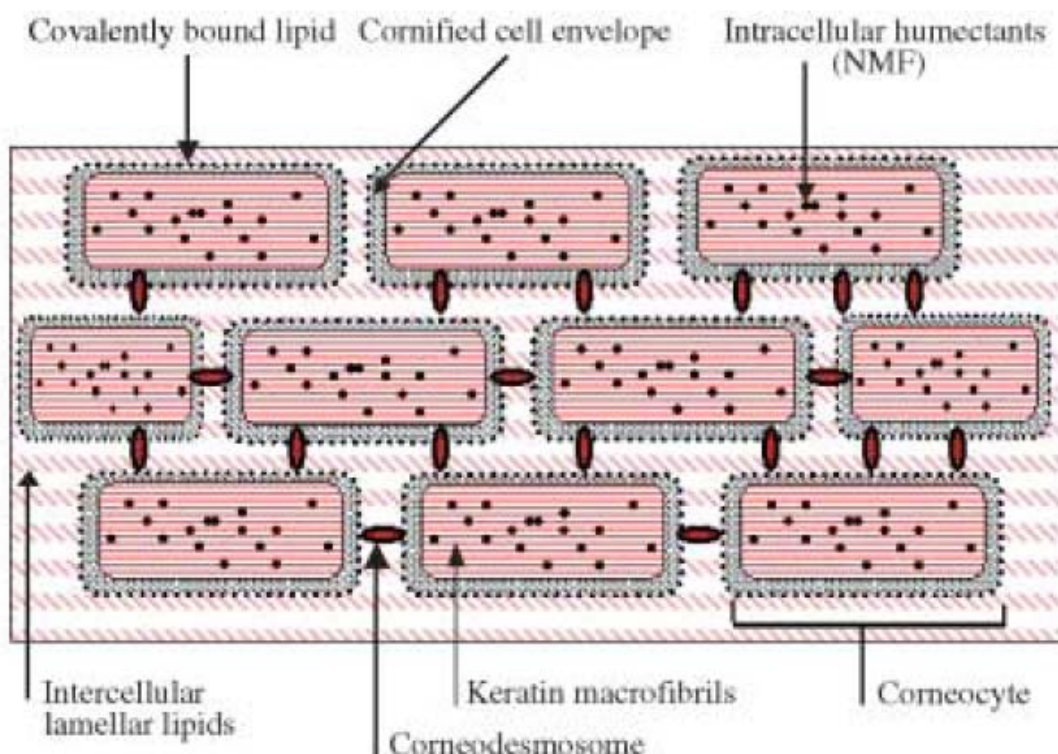


Abb. 3 Schematische Darstellung der strukturellen und funktionellen Komponenten des Stratum corneum als „Ziegel und Mörtel“ Modell [aus 75]

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].

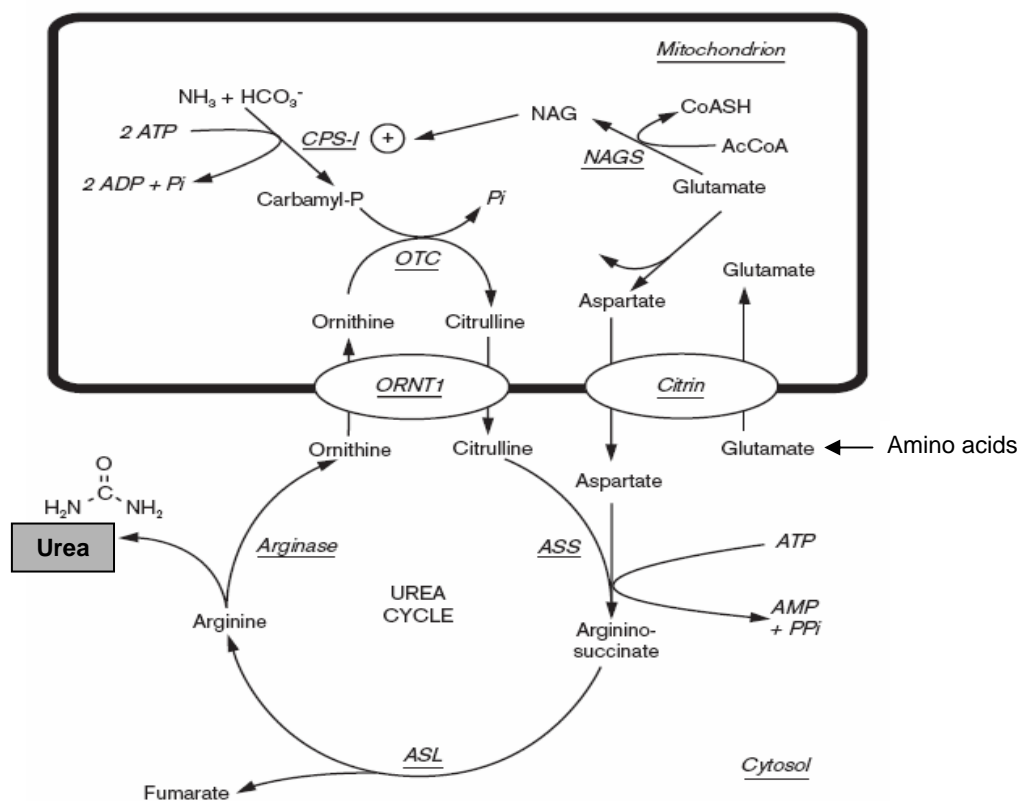
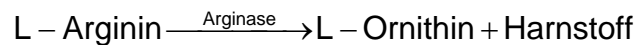


Abb. 4 Harnstoffzyklus nach Krebs und Henseleit [aus 54]

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).

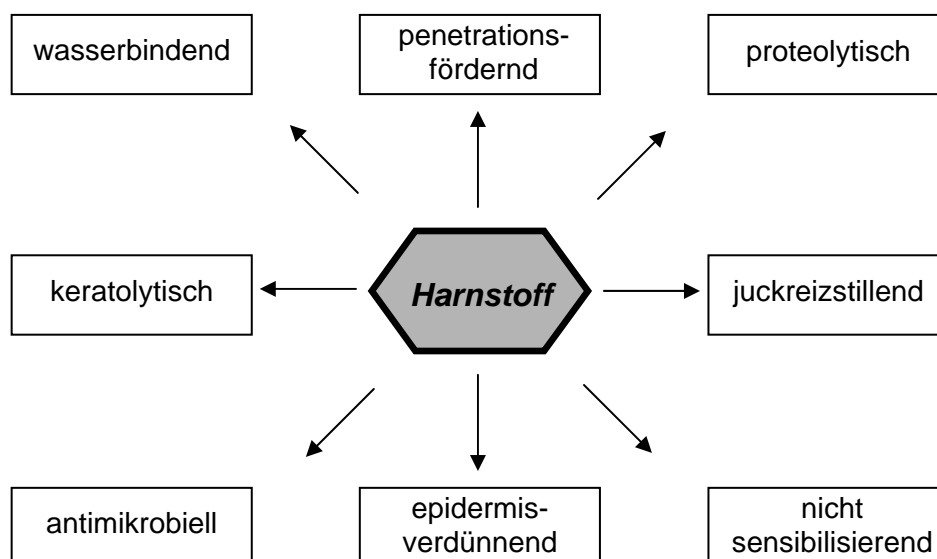


Abb.5 dermatologische Eigenschaften von Harnstoff [nach 97]

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 γ^+L -System das γ^+ -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):

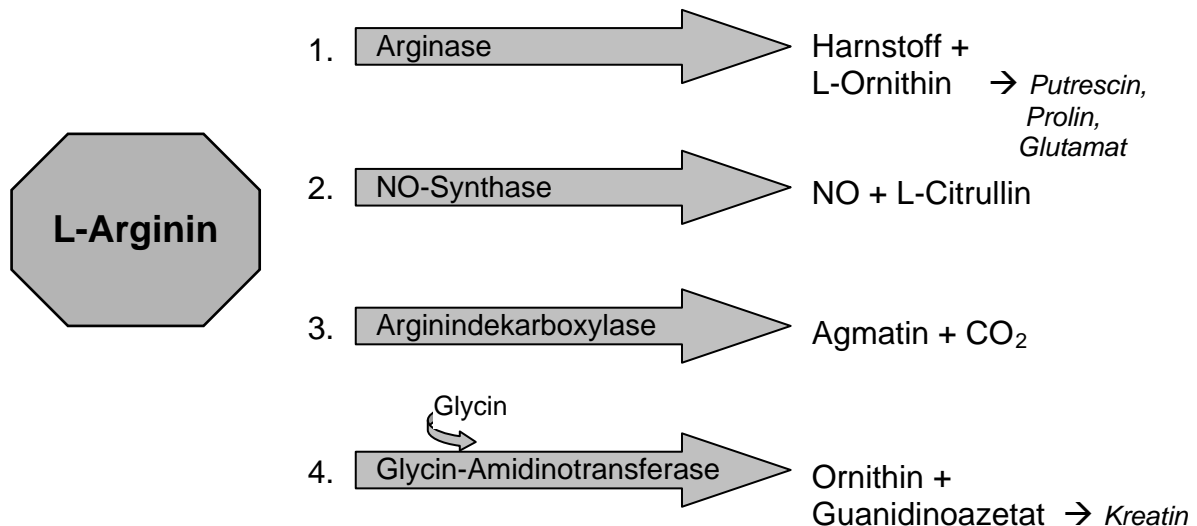


Abb.6 Stoffwechselwege des L-Arginins in Säugetierzellen

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

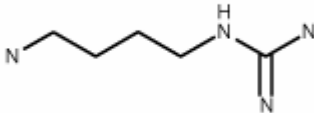
menschlichen Haut konnten in vivo proinflammatorische und zytotoxische Effekte von NO beschrieben werden [67]. Die proinflammatorischen Effekte sind gekennzeichnet durch das Auftreten von Erythemen, Hautverdickungen, Lymphozyten- und Neutrophileninfiltraten, Schwellung der Keratinozyten sowie die erhöhte 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. Arginin

1.5.1. Allgemeine chemische Eigenschaften

Arginin, 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 Ethanolentzugerscheinungen [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

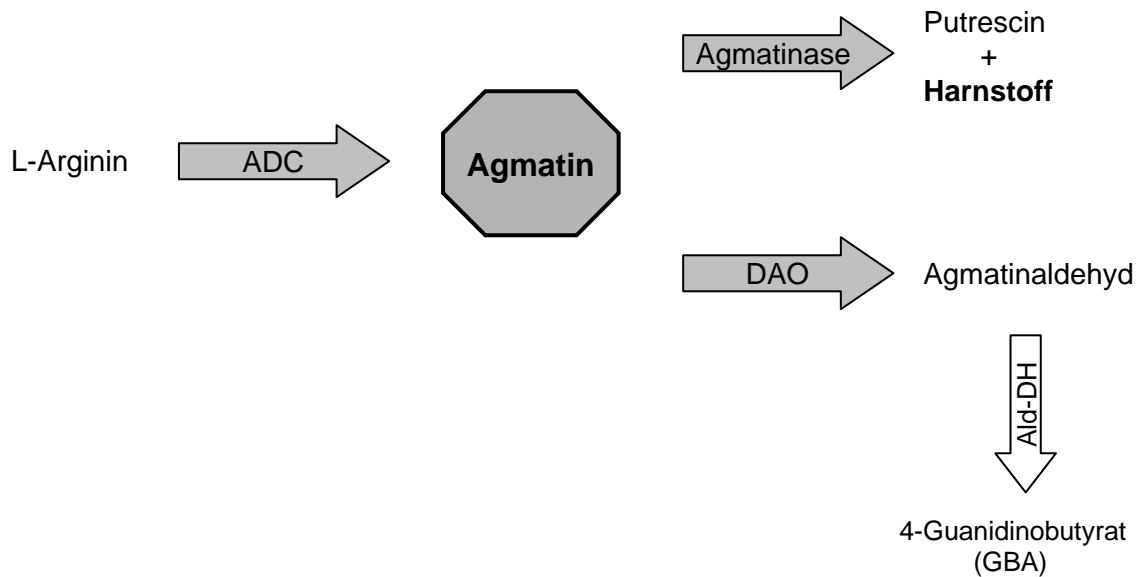


Abb. 7 Metabolismus von Agmatin im Säugetierorganismus

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.