

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

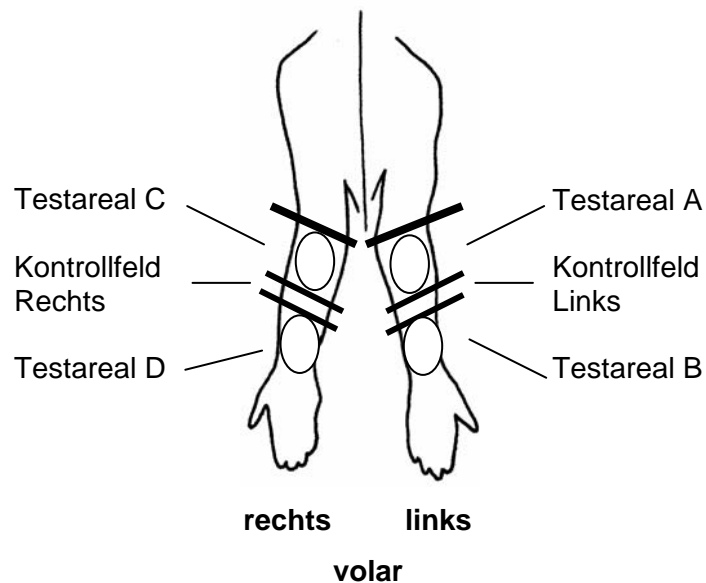


Abb. 8 Applikationsschema für die Prüfung der Wirksamkeit, Dosisfindung und Wirkdauer von Agmatinsulfat

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.

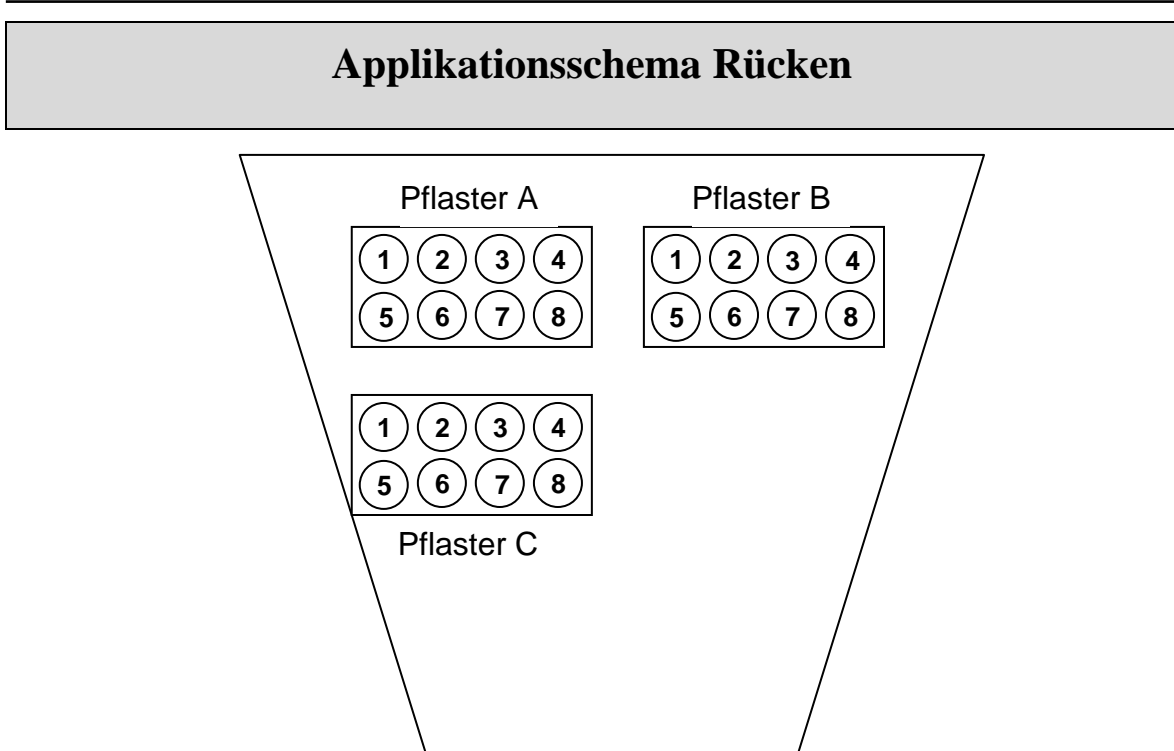


Abb. 9 Applikationsschema für die Prüfung der Verträglichkeit von Agmatinsulfat

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.