

Universitätsklinik und Poliklinik für Dermatologie und Venerologie  
der Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg  
(Direktor: Prof. Dr. med. habil. Wolfgang Chr. Marsch)



# **Präklinische Validierung von L-Ornithin HCl für die topische Applikation**

## **Dissertation**

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

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

von Felix Höche  
geboren am 31. Oktober 1975 in Halle / Saale

Betreuer: PD Dr. med. J. Wohlrab

Eröffnungsdatum: 01.07.2003

Verteidigungsdatum: 29.03.2004

Gutachter:

1. Prof. Dr. med. P. Presek (Halle / Saale)
2. Prof. Dr. med. U. Mrowietz (Kiel)
3. PD Dr. med. J. Wohlrab (Halle / Saale)

**urn:nbn:de:gbv:3-000006574**

[<http://nbn-resolving.de/urn/resolver.pl?urn=nbn%3Ade%3Agbv%3A3-000006574>]

Meiner Großmutter Ilse Kochler  
in Dankbarkeit gewidmet.

L-Ornithin ist eine nicht-essentielle, nicht-proteinogene Aminosäure, die aufgrund ihrer komplexen metabolischen Einbindung von großem pharmakotherapeutischen Interesse ist. Im keratinozytären Stoffwechsel sind dabei insbesondere die Synthese von Harnstoff, Polyaminen und Vorstufen des Kollagens hervorzuheben.

In der vorliegenden Arbeit wurden neben der präklinischen Validierung der Toxizität und perkutanen Bioverfügbarkeit von L-Ornithin HCl der Einfluß auf die Harnstoff-Synthese und die Expression der Enzyme Arginase und Ornithin-Decarboxylase unter *In-vitro*-Bedingungen untersucht. Die Charakterisierung der *In-vitro*-Toxizität erfolgte an nativen humanen Keratinozyten. Es wurden die Vitalität (Gentianaviolett-Färbung) und das Proliferationsverhalten ( $[^3\text{H}]$ -Thymidin-Einbau) nach der Exposition mit L-Ornithin HCl untersucht. Zur Differenzierung des L-Ornithin-HCl-vermittelten Zelltodes wurden flowzytometrische Messungen mittels Annexin V / PI- bzw. APO 2.7-Färbung durchgeführt. Eine orientierende Beurteilung der *In-vivo*-Toxizität von L-Ornithin HCl erfolgte mit Hilfe des HET-CAM-Modells unter Verwendung der halbquantitativen Parameter Hämorrhagie, Membranverfärbung und Letalität. Zur Objektivierung dieser *In-vivo*-Ergebnisse erfolgte zusätzlich die Bestimmung der kapillären Perfusion der Chorio-Allantois-Membran unter der L-Ornithin-HCl-Exposition mittels Laser-Doppler-Fluxmetrie.

Die dermale Verfügbarkeit von L-Ornithin HCl nach topischer Applikation wurde unter Verwendung von L-Ornithin-HCl-haltigen halbfesten Zubereitungen (10 %) mit Hilfe der FRANZ'schen Diffusionszelle ermittelt. In die verwendeten halbfesten Zubereitungen wurde  $[^3\text{H}]$ -markierter Wirkstoff eingearbeitet, der der radiochemischen Detektion des in das Gewebe penetrierten Wirkstoffs diente. Die Penetrationsuntersuchungen wurden *ex vivo* an humaner Mammahaut durchgeführt.

Die pharmakodynamisch-metabolischen Effekte von L-Ornithin HCl wurden unter dem Aspekt der Modulation der Harnstoff-Synthese untersucht. Dazu wurde die *De-novo*-Harnstoff-Synthese nativer Keratinozyten *in vitro* mittels Urease-Methode ermittelt. Ergänzend wurde die Expression der für den Ornithin-Metabolismus kardinalen Enzyme Arginase und Ornithin-Decarboxylase mittels Westernblot erfaßt.

Zusammenfassend lassen sich die *In-vitro*- und *In-vivo*-Toxizität von L-Ornithin HCl bis zum 100-fachen der physiologischen Konzentration als unbedenklich einstufen. Unter *In-vitro*-Bedingungen kam es nach 24-stündiger Exposition mit L-Ornithin HCl ( $\geq 30$  mM) zur Apoptose-Induktion. Die Harnstoff-Synthese wurde, bei simultaner Erhöhung der Arginase-Expression, gehemmt. Die Expression der Ornithin-Decarboxylase blieb unbeeinflusst. Die Penetrationsuntersuchungen erbrachten für das amphiphile Vehikelsystem das beste Konzentration-Zeit-Profil. Eine topische Anwendung von L-Ornithin HCl ist möglich, bedarf aber einer weiteren galenischen Optimierung.

## Inhaltsverzeichnis

<b>1</b>	<b>Einleitung</b> .....	<b>1</b>
<b>2</b>	<b>Theoretische Grundlagen</b> .....	<b>3</b>
2.1	L-Ornithin .....	3
2.1.1	Physikochemische Eigenschaften.....	3
2.1.2	Vorkommen und Bedeutung .....	3
2.1.3	Transport von L-Ornithin in die Zelle.....	6
2.1.4	Dermatologische Relevanz von L-Ornithin.....	6
2.2	Harnstoff.....	6
2.2.1	Bedeutung von Harnstoff .....	6
2.2.2	Analytische Nachweismethoden .....	9
2.3	Arginase – Vorkommen und Bedeutung .....	10
2.4	Ornithin-Decarboxylase (ODC) – Vorkommen und Bedeutung .....	11
2.5	Charakterisierung des Zelltodes .....	11
2.5.1	Durchflußzytometrische Messungen zur Apoptose mittels Annexin V / PI .....	13
2.5.2	Durchflußzytometrische Bestimmung des Apoptose-Markers APO 2.7.....	14
<b>3</b>	<b>Material und Methoden</b> .....	<b>15</b>
3.1	Material .....	15
3.2	Zellkultur.....	21
3.2.1	Gewinnung humaner Keratinozyten, Primärkultur .....	21
3.2.2	Kultivierung von humanen Keratinozyten.....	22
3.2.3	Inkubation mit L-Ornithin HCl .....	22
3.2.4	Zellernte .....	22
3.2.5	Bestimmung der Zellanzahl.....	23
3.3	Untersuchung zur Vitalität (Gentianaviolett-Färbung).....	23
3.4	Untersuchung zum [ <sup>3</sup> H]-Thymidin-Einbau in die DNA.....	24
3.5	Charakterisierung des Zelltodes .....	24
3.5.1	Durchflußzytometrische Messungen zur Apoptose mittels Annexin V / PI .....	24
3.5.2	Durchflußzytometrische Bestimmung des Apoptose-Markers APO 2.7.....	25
3.6	Einfluß von L-Ornithin HCl auf die Harnstoff-Synthese nativer Keratinozyten – Vergleich mit L-Arginin HCl, D-Arginin HCl und L-Citrullin (Urease-Test).....	26
3.6.1	Zellkultivierung und Inkubation.....	26
3.6.2	Harnstoff-Nachweis im Kulturmedium (Urease-Methode).....	27
3.7	Westernblot-Untersuchungen zur Arginase- und ODC-Expression .....	29
3.7.1	Zellkultivierung und -aufschluß .....	29
3.7.2	Proteinbestimmung .....	30

3.7.3	SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese.....	30
3.7.4	Westernblot-Analyse .....	31
3.8	<i>In-vivo</i> -Untersuchungen am HET-CAM.....	32
3.8.1	Kultur und Präparation der Hühnereier .....	32
3.8.2	Bestimmung von Vitalität, Membranverfärbung und Hämorrhagie .....	32
3.8.3	Laser-Doppler-Fluxmetrie am HET-CAM-Modell .....	33
3.9	Herstellung L-Ornithin-HCl-haltiger topischer Präparationen.....	33
3.10	Penetrationsuntersuchungen an humaner Haut <i>ex vivo</i> .....	34
3.11	Statistik.....	36
<b>4</b>	<b>Ergebnisse.....</b>	<b>37</b>
4.1	Untersuchungen zum Einfluß von L-Ornithin HCl auf die Vitalität und die Proliferation humaner Keratinozyten .....	37
4.1.1	Einfluß von L-Ornithin HCl auf die Vitalität humaner Keratinozyten.....	37
4.1.2	Einfluß von L-Ornithin HCl auf den [ <sup>3</sup> H]-Thymidin-Einbau in die DNA .....	37
4.2	Charakterisierung des L-Ornithin-HCl-vermittelten Zelltodes.....	38
4.2.1	Durchflußzytometrische Untersuchung mittels Annexin V / PI.....	38
4.2.2	Durchflußzytometrische Bestimmung der APO 2.7-Expression.....	40
4.3	Untersuchungen zur <i>De-novo</i> -Harnstoff-Synthese nativer Keratinozyten .....	42
4.3.1	Einfluß von L-Ornithin HCl auf die keratinozytäre Harnstoff-Synthese .....	44
4.3.2	Vergleichende Untersuchung zur Beeinflussung der keratinozytären Harnstoff- Synthese .....	44
4.4	Westernblot-Untersuchungen zum Einfluß von L-Ornithin HCl auf die Expression der Enzyme Arginase und Ornithin-Decarboxylase .....	46
4.4.1	Arginase-Expression nativer Keratinozyten unter dem Einfluß von L-Ornithin HCl .....	46
4.4.2	ODC-Expression nativer Keratinozyten unter dem Einfluß von L-Ornithin HCl .....	47
4.5	HET-CAM-Untersuchungen zur <i>In-vivo</i> -Toxizität von L-Ornithin HCl .....	48
4.5.1	L-Ornithin-HCl-Toxizität im HET-CAM-Modell.....	48
4.5.2	Laser-Doppler-Fluxmetrie am HET-CAM-Modell zur Bestimmung der irritativ/toxischen und vasoaktiven Wirkung von L-Ornithin HCl .....	49
4.6	Untersuchungen zur Penetration 10 %iger L-Ornithin-HCl-Präparationen in humane Haut <i>ex vivo</i> .....	49
<b>5</b>	<b>Diskussion .....</b>	<b>51</b>
<b>6</b>	<b>Zusammenfassung .....</b>	<b>61</b>
<b>7</b>	<b>Anhang.....</b>	<b>63</b>
<b>8</b>	<b>Literatur.....</b>	<b>67</b>
<b>9</b>	<b>Thesen.....</b>	<b>75</b>

## Abkürzungs- und Symbolverzeichnis

Abb.	Abbildung
ad	zu, auf
ADC	Arginin-Decarboxylase
Agm	Agmatinsulfat
AK	Antikörper
ANOVA	Analysis of variance
APS	Ammoniumpersulfat
ASS	Argininosuccinat-Synthase
ASL	Argininosuccinat-Lyase
bidest.	bidestillata
BSA	Rinderserumalbumin
BPE	Rinderhypophysenextrakt
CAM	Chorio Allantois Membran
Ci	Cyrie
d	dies (Tag)
D-	Dextro-
DAB	Deutsches Arzneimittelbuch
DAC	Deutscher Arzneimittelcodex
DMEM	Dulbecco's modified Eagle's medium
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonukleinsäure (Säure engl. = acid)
DOC	Deoxycholsäure
dpm	desintegration per minute
E	Extinktion
EDTA	Ethylendiamino-N,N,N',N'-tetraessigsäure
EGF	epithelialer Wachstumsfaktor
FAD	Flavinadenindinukleotid
FITC	Fluoresceinisothiozyanat
FKS	fetales Kälberserum
GABA	$\gamma$ -Amino-Buttersäure
GLDH	Glutamatdehydrogenase
h	hour (Stunde)
[ <sup>3</sup> H]	Tritium
HBSS	Hank's Balanced Salt Solution
HCl	Salzsäure
HET	Hen's Egg Test

## Verzeichnis der Abkürzungen und Symbole

---

HPTLC	Hochdruckdünnschichtchromatographie
HR	Hämorrhagie
KCl	Kaliumchlorid
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	Kaliumhydrogenphosphat
Kont.	Kontrolle
L-	Levo-
L-Arg	L-Arginin HCl
L-Citr	L-Citrullin
L-Orn	L-Ornithin HCl
L-Val	L-Valin
LDF	Laser-Doppler-Flux
LPS	Lipopolysaccharid
mA	Milliampere
MD	Membranverfärbung
MG	Molekulargewicht
min	Minute
Mio	Million
m/m	Masse zu Masse
Mn <sup>2+</sup>	Mangan-Ion
MnCl <sub>2</sub>	Manganchlorid
MTP	Mikrotiterplatte
m/v	Masse zu Volumen
n	Anzahl
Na	Natrium
NaCl	Natriumchlorid
NaHCO <sub>3</sub>	Natriumhydrogencarbonat
NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	Natriumdihydrogenphosphat
NADH	Nicotinamidadenindinukleotid
NaOH	Natriumhydroxid
NHEK	native human epithelial keratinocyte
NH <sub>4</sub> <sup>+</sup>	Ammonium-Ion
nm	Nanometer
NMF	natural moisturizing factor
NO	Stickstoffmonoxid
NOS	Stickstoffmonoxid-Synthase (-Synthetase)
OAT	Ornithin-Aminotransferase
OCT	Ornithin-Carbamoyltransferase

## Verzeichnis der Abkürzungen und Symbole

---

ODC	Ornithin-Decarboxylase
p	probability (Irrtumswahrscheinlichkeit)
P5C	Pyrrolidin-5-Carboxylat
P5C-Dehydr.	Pyrrolidin-5-Carboxylat-Dehydrogenase
PAGE	Polyacrylamidgelelektrophorese
PBS	Phosphat buffered saline
PBS-B	PBS mit 2% FKS
PBS-T	PBS mit 0,1% Tween 20
PE	R-Phycoerythrin
PI	Propidiumiodid
POPOP	1,4-bis-2-(5-Phenylaxozolyt)-Benzen
PPO	2,5-Diphenoloxazol
PUCK-EDTA	EDTA modifiziert nach Puck
R	Regressionskoeffizient
red.	reduziert
RNA	Ribonukleinsäure
rpm	rotations per minute (Umdrehungen pro Minute)
SDS	sodium dodecyl sulfat
sek	Sekunde
SFM	serumfreies Medium
sign.	signifikant
t	time (Zeit)
Tab.	Tabelle
TEMED	N,N,N',N'-Tetramethylethylendiamin
TRIS	C,C,C-Tris(hydroxymethyl)-aminomethan
TEWL	transepidermal water loss
Urea	Harnstoff
UV	Ultraviolett
V	Volt
vgl.	vergleiche
vs.	versus (gegen)
∅	Durchmesser



## 1 Einleitung

Der keratinozytäre Metabolismus ist für das Verständnis vieler dermatologischer Erkrankungen und die Etablierung neuer therapeutischer Strategien von wachsendem Interesse. Neue Möglichkeiten der topischen Applikation von Wirkstoffen und der gezielte Eingriff in die pathogenetischen/pathophysiologischen Mechanismen einzelner Dermatosen lassen die topische Pharmakotherapie in der Dermatologie in den letzten Jahren eine Renaissance erfahren [120].

Die vorliegende Arbeit befaßt sich mit der Aminosäure L-Ornithin und deren Charakterisierung unter *In-vitro*- und *In-vivo*-Bedingungen. Die komplexe metabolische Einbindung dieser Aminosäure läßt sie insbesondere im keratinozytären Stoffwechsel im Kontext mit der Synthese von Harnstoff, Polyaminen und Vorstufen des Kollagens als eine wichtige und für neue pharmakotherapeutische Ansätze potente Wirksubstanz erscheinen. Es werden spezifische und unspezifische Wechselwirkungen von L-Ornithin HCl im Stoffwechsel von humanen Keratinozyten untersucht.

Als zellulärer Hauptbestandteil der Epidermis sind die Keratinozyten und die aus ihnen durch Differenzierung hervorgehenden Korneozyten maßgeblich für die Struktur und Funktion der Haut verantwortlich (*brick and mortar model*) [39, 41]. Unter Verwendung dieses metabolisch hochaktiven Zellsystems [120] wurden die *In-vitro*-Untersuchungen zur Toxizität und Beeinflussung des Harnstoff-Metabolismus durch L-Ornithin HCl durchgeführt.

L-Ornithin ist eine nicht-essentielle, nicht-proteinogene basische Aminosäure [78], die im Stoffwechsel ureotelischer Lebewesen aus L-Arginin unter Abspaltung von Harnstoff entsteht. Durch die Metabolisierung im Harnstoff-Zyklus trägt sie zur L-Arginin-Regenerierung [78] bei und ermöglicht damit die für den Organismus wichtige Stickstoffausscheidung in Form von Harnstoff. Desweiteren ist L-Ornithin als Substrat der Ornithin-Decarboxylase (ODC) essentiell für die Substrat-limitierte endogene Polyamin-Synthese [85, 128]. L-Ornithin nimmt somit direkten Einfluß auf die Regulation der zellulären Proliferation und Differenzierung. Dies ist insbesondere bei den hyperproliferativen Dermatosen, wie der Psoriasis vulgaris, und anderen, mit Differenzierungsstörungen einhergehenden Erkrankungen, z.B. Ichthyosis, von grosser Bedeutung [24, 75, 77, 81, 93, 129]. Über die Zwischenstufe des Pyrrolidin-5-Carboxylat trägt L-Ornithin zur Generierung der Neurotransmitter GABA und Glutamat sowie der für die Synthese von Matrixproteinen wichtigen Aminosäure L-Prolin bei [85, 129]. Letzteres ist im Hinblick auf Wundheilungsprozesse und deren therapeutische Beeinflussung von großem Interesse [7, 9, 10, 15].

Als Vertreter der kationischen Aminosäuren wird L-Ornithin über das spezifische  $\gamma^+$ -System in die Zellen transportiert [33, 34]. In diesem Zusammenhang ist die direkte Interaktion mit

L-Arginin und L-Lysin im Sinne einer kompetitiven Inhibierung [34] der zellulären Aufnahme und die damit verbundene intrazelluläre Verfügbarkeit dieser für die Aufrechterhaltung basaler zellulärer Funktionen wichtigen Aminosäure [78, 128] zu sehen.

Wichtig für das Verständnis der metabolischen Integration von L-Ornithin ist die L-Ornithin-vermittelte Hemmung der NO-Synthetase (NOS) [85, 128], welche die Regulation der hämo- und lymphovaskulären Perfusion und die Initiation und Promotion von Entzündungsprozessen moduliert.

Insgesamt stellt L-Ornithin somit einen interessanten und in der Komplexität seiner metabolischen Einbindung hochpotenten Wirkstoff für neue therapeutische und prophylaktische Anwendungen dar.

### **Zielstellungen dieser Arbeit:**

- *In-vitro*-Untersuchungen zur Toxizität von L-Ornithin HCl
  - Welchen Einfluß hat L-Ornithin HCl auf die Vitalität nativer Keratinozyten?
  - Wie wird die Proliferation nativer Keratinozyten durch L-Ornithin HCl beeinflusst?
  - Welche zytotoxischen Veränderungen werden durch L-Ornithin HCl verursacht?
- Welchen Einfluß hat L-Ornithin HCl auf die keratinozytäre Harnstoff-Synthese? Wie ist die Wirkung im Vergleich zu L-Arginin HCl, D-Arginin HCl und L-Citrullin einzuschätzen?
- Welchen Einfluß hat L-Ornithin HCl auf die Expression der Enzyme Arginase und Ornithin-Decarboxylase?
- Wie ist die Verträglichkeit von topisch appliziertem L-Ornithin HCl einzuschätzen?
- Penetriert L-Ornithin HCl aus topischen Standardpräparationen in die menschliche Haut?

*Bei allen durchgeführten Experimenten wurde aufgrund der Instabilität der freien Base sowie dem unphysiologischen pH-Wert der wässrigen Lösung L-Ornithin-Monohydrochlorid verwendet.*

## 2 Theoretische Grundlagen

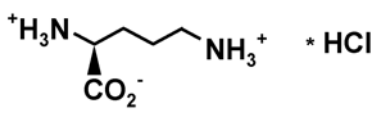
### 2.1 L-Ornithin

#### 2.1.1 Physikochemische Eigenschaften

L-Ornithin, L(+)-2,5-Diaminovaleriansäure, ist eine nicht-essentielle, nicht-proteinogene basische Aminosäure. Sie gehört zur Gruppe der Diaminomonocarbonsäuren, der auch L-Arginin, L-Lysin und L-Histidin angehören [78].

Bei allen durchgeführten Experimenten wurde aufgrund der Instabilität und des unphysiologischen pH-Wertes der wässrigen L-Ornithin-Lösung das Monohydrochlorid (Tab. 2.1-1) eingesetzt.

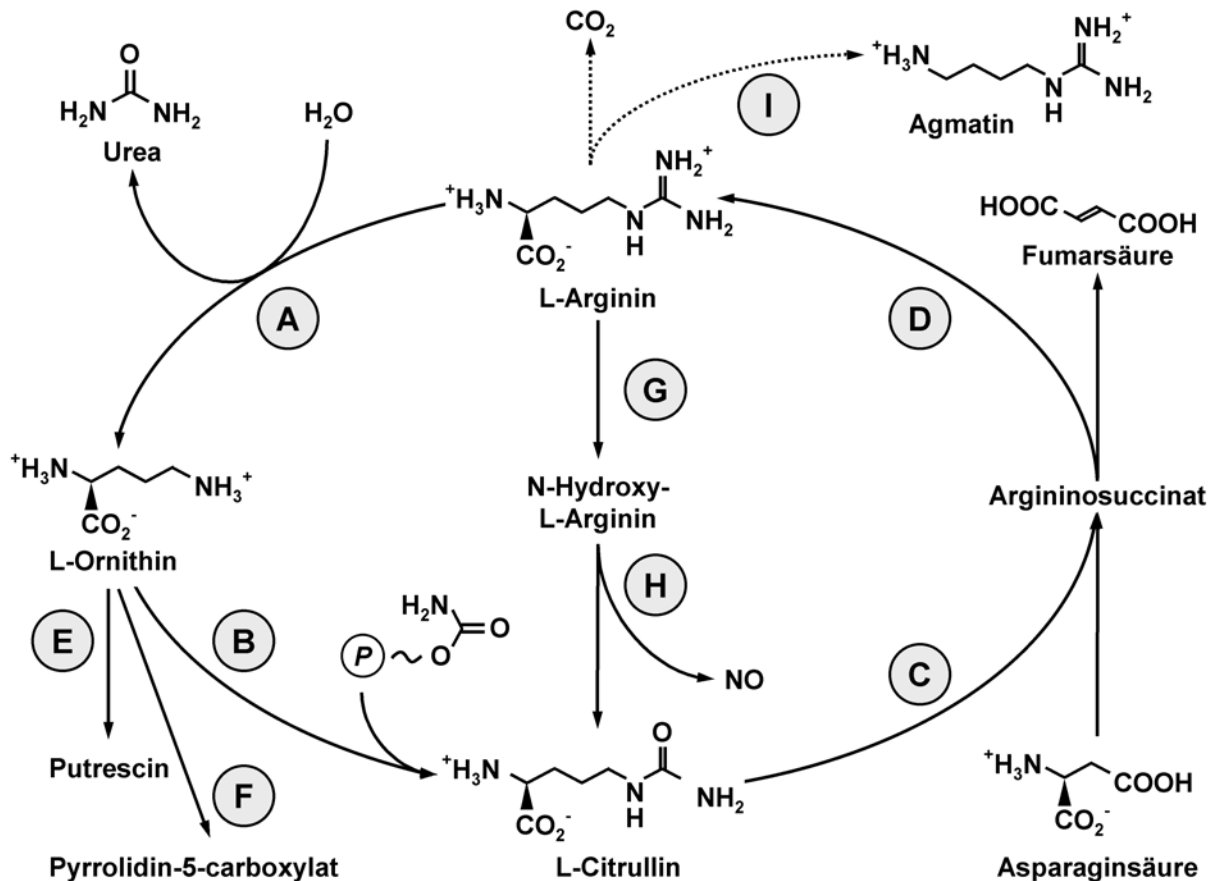
**Tab. 2.1-1** L-Ornithin HCl

Synonyme:	L(+)-2,5-Diaminovaleriansäurehydrochlorid, L-Ornithinmonohydrochlorid, L-Orn
Strukturformel:	
Summenformel:	C <sub>5</sub> H <sub>12</sub> N <sub>2</sub> O <sub>2</sub> * HCl
Molmasse:	168,62 g/mol
Beschreibung:	weißes, kristallines, geruchloses Pulver
Löslichkeit:	100 g/l (in Wasser, 25 °C)
Schmelzpunkt:	245 °C
thermische Zersetzung:	> 233 °C

#### 2.1.2 Vorkommen und Bedeutung

Im Intermediärstoffwechsel ureotelischer (Harnstoff-ausscheidender) Lebewesen nimmt L-Ornithin eine zentrale Stellung ein [94]. Neben der über die Nahrung aufgenommenen Menge der nicht-essentiellen, nicht-proteinogenen Aminosäure (ca. 5 g/d) [78] wird L-Ornithin endogen im Harnstoff-Zyklus synthetisiert (Abb. 2.1-1). Die Blutplasma-Konzentration beträgt beim Menschen  $67 \pm 9 \mu\text{mol/l}$  [78].

Neben Harnstoff ist L-Ornithin Endprodukt der enzymatischen Hydrolyse von L-Arginin. Die weitere Metabolisierung zu L-Citrullin und Argininosuccinat führt zur Regenerierung von Arginin (Abb. 2.1-1) und somit der Harnstoff-Synthese [128].



**Abb. 2.1-1** L-Ornithin-Metabolismus

Enzyme der beschriebenen Reaktionen: A – Arginase (EC 3.5.3.1); B – Ornithin-Carbamoyl-Transferase (OCT; EC 2.1.3.3); C – Argininosuccinat-Synthetase (ASS; EC 6.3.4.5); D – Argininosuccinat-Lyase (ASL; EC 4.3.2.1); E – Ornithin-Decarboxylase (ODC; EC 4.1.1.17); F – Ornithin-Aminotransferase (OAT; EC 2.6.1.13); G – Arginin-Hydroxylase (EC 3.5.3.6); H – NO-Synthetase (NOS; EC 1.14.13.39); I – Arginin-Decarboxylase (ADC; EC 4.1.1.19)

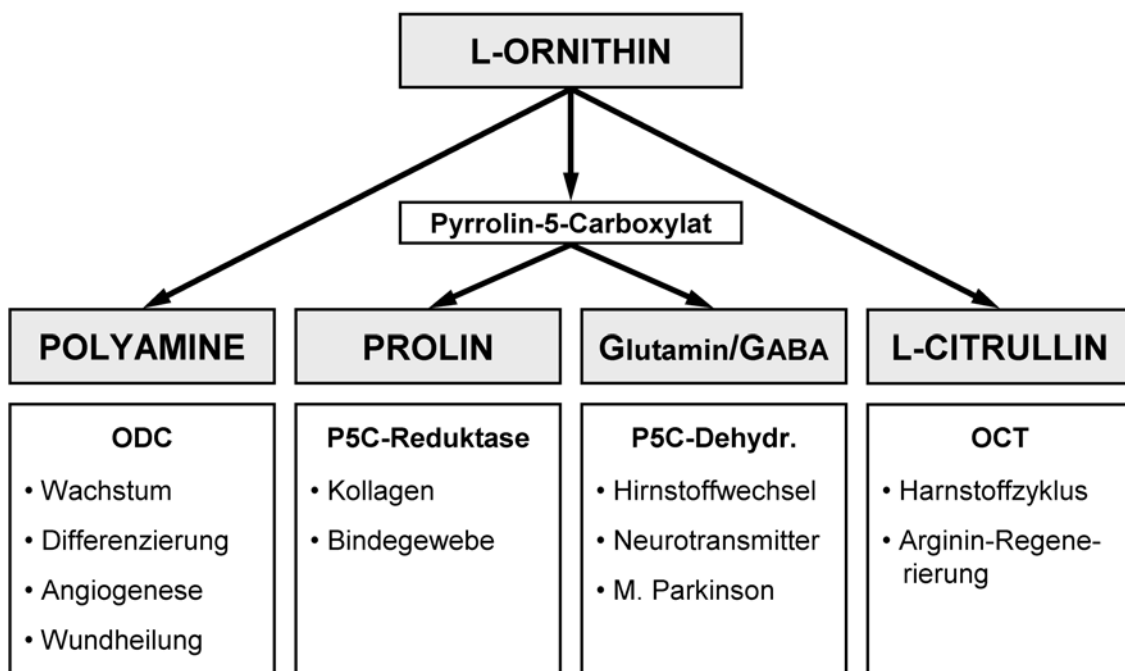
Desweiteren dient L-Ornithin der Polyamin-Synthese. Durch Decarboxylierung entsteht das niedermolekulare Putrescin, aus dem die Polyamine Spermin und Spermidin gebildet werden [78]. Polyamine sind in nahezu allen humanen Zellen nachweisbar und für die Zellproliferation und -differenzierung von großer Bedeutung [25, 27].

Als weiteres wichtiges Stoffwechselprodukt im Ornithin-Metabolismus ist Pyrrolidin-5-Carboxylat zu nennen, welches durch Desaminierung unter Ringschluß entsteht [128]. Über diese Zwischenstufe werden die biologisch wichtigen Aminosäuren L-Glutamat und L-Prolin gebildet. L-Glutamat dient der Synthese der Neurotransmitter Glutamin und GABA und nimmt somit eine Schlüsselfunktion im Stoffwechsel des ZNS ein [128]. Die proteinogene Aminosäure L-Prolin ist maßgeblich an der Bildung des extrazellulären Matrixproteins Kollagen beteiligt, so sind 15-26 % der Aminosäuren im Kollagen L-Prolin bzw. L-Hydroxyprolin [37, 38].

Von Bedeutung für die Funktion von L-Ornithin ist die kompetitive Hemmung der NO-Synthetase (NOS) [128]. Die Repression des für die Regulation der hämo- und lymphovaskulären Perfusion sowie der Initiation und Unterhaltung von Entzündungsprozessen wichtigen NO-Systems ist hierbei hervorzuheben. Daneben kommt es unter L-Ornithin-Einfluß zur Suppression der Kreatin-Synthese [78, 108]. Dies ist insbesondere bei systemischer Hyperornithinämie von Bedeutung, da es hierbei zu einer Einschränkung der anaeroben Energiereserven kommt [103, 108].

Über den Einfluß von L-Ornithin auf die Harnstoff-Synthese nativer Keratinozyten unter *In-vivo*- bzw. *In-vitro*-Bedingungen liegen keine Untersuchungen vor. Es ist bekannt, daß es unter dem Einfluß von Aminosäuren zu einer unspezifischen Steigerung des Stoffwechsels und somit auch des Umsatzes im Harnstoff-Zyklus kommt [46]. In Untersuchungen zur Enzymkinetik der Arginase, des Schlüsselenzyms der Harnstoff-Synthese, konnte eine L-Ornithin-vermittelte Enzymhemmung nachgewiesen werden [22]. Diese ist, in Übereinstimmung mit den von Michaelis und Menten verfassten Gesetzen zur Enzymkinetik, als Endprodukt-hemmung aufzufassen [78].

Welchen Einfluß L-Ornithin auf die keratinozytäre Harnstoff-Synthese unter *In-vitro*-Bedingungen ausübt, sollen Untersuchungen dieser Arbeit zeigen.



**Abb. 2.1-2** Stoffwechsel-Produkte des L-Ornithin

### 2.1.3 Transport von L-Ornithin in die Zelle

L-Ornithin gelangt über spezifische und unspezifische Transportvorgänge in die menschliche Zelle [34]. Neben unspezifischen Aminosäure-Transportern existiert das für kationische Aminosäuren spezifische  $\gamma^+$ -System [34]. Es dient der selektiven Aufnahme der Aminosäuren L-Arginin, L-Ornithin und L-Lysin in die Zelle [34, 128].

Ein weiterer für den Transport von L-Ornithin in der Zelle beschriebener Transporter stellt der L-Ornithin / L-Citrullin-Antiporter [59] dar. Dieser Antiporter ist in funktioneller Einheit mit einem L-Ornithin /  $H^+$ -Transportprotein [59, 83] zu betrachten. Er ist für die Aufrechterhaltung des auf zwei Kompartimenten (Mitochondrium und Zytosol) verteilten Harnstoff-Zyklus notwendig [73, 78, 128].

### 2.1.4 Dermatologische Relevanz von L-Ornithin

L-Ornithin ist Bestandteil des natürlichen Feuchthaltefaktors der Haut (NMF, Tab. 2.2-2) [88, 122, 123]. Über die spezielle Funktion dieser Aminosäure als NMF und ihre Bedeutung für den keratinozytären Stoffwechsel, insbesondere die keratinozytäre Harnstoff-Synthese ist wenig bekannt. Es gibt Anhaltspunkte für eine positive Beeinflussung von Wundheilungsvorgängen über eine vermehrte Prolin- und damit Kollagen-Synthese [9, 10]. Auch gibt es Hinweise auf eine vermehrte Polyamin-Synthese unter L-Ornithin-Einfluß [25, 129].

Unter den Aspekten der Wundheilung [9], Angiogenese [13], Kollagen-Synthese [9, 37, 100, 128] sowie der Modulation entzündlicher und proliferativer Prozesse [7, 85] ist der basischen Aminosäure L-Ornithin als Bestandteil neuer Therapeutika in der Dermatologie Bedeutung zuzumessen.

## 2.2 Harnstoff

Harnstoff wurde 1733 von Roule entdeckt und im Jahre 1828 durch Woehler erstmals synthetisiert [1]. Er ist das Diamid der Kohlensäure und Endprodukt des Proteinstoffwechsels. Bei Raumtemperatur liegt er als farb- und geruchlose, gut wasserlösliche kristalline Substanz vor [1], vgl. Tab. 2.2-1.

### 2.2.1 Bedeutung von Harnstoff

Harnstoff ist ein Endprodukt des Proteinstoffwechsels und wichtiges Exkretionsprodukt ureotelischer Lebewesen [78, 94]. Er ist selbst in relativ hohen Konzentrationen ungiftig. Aufgrund seiner stofflichen Eigenschaften liegt der Harnstoff im Körper in löslicher Form vor [107]. Der weitaus größte Teil des im Urin ausgeschiedenen Harnstoffs wird vom Körper selbst synthetisiert [78, 103]. Die Harnstoff-Synthese stellt einen wichtigen Teil der Stoffwechsellleistungen

der Leber dar (hepatische Arginase = Arginase I). Unter Einwirkung des Enzyms Arginase kommt es zur hydrolytischen Spaltung von L-Arginin unter Bildung von Harnstoff und L-Ornithin (Abb. 2.2-1). In geringem Umfang wird Harnstoff auch extrahepatisch (Arginase II), so in der Haut [107, 120], gebildet.



**Abb. 2.2-1** Arginase-Reaktion

**Tab. 2.2-1** Harnstoff – physikochemische Eigenschaften [78, 107]

Synonyme:	Harnstoff, Urea, Diamid der Kohlensäure, Amid der Carbaminsäure
Strukturformel:	
Summenformel:	CH <sub>4</sub> N <sub>2</sub> O
Molmasse:	60,06 g/mol
Beschreibung:	farblose Kristalle oder weißes, kristallines Pulver, geruchlos, salziger Geschmack, schwach hygro-skopisch
Löslichkeit:	sehr leicht löslich in Wasser; löslich in Ethanol, Methanol und Glycerol; praktisch unlöslich in Ether, Chloroform und Dichlormethan
Schmelzpunkt:	132-133 °C
Thermische Zersetzung:	> 132 °C
relative Dichte:	1,335 g/ml (20 °C)

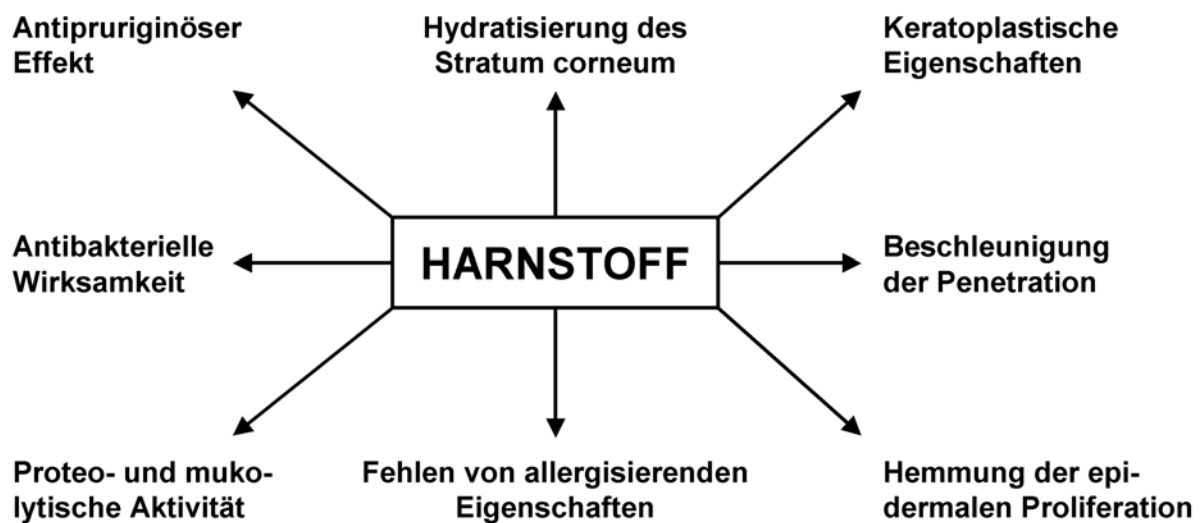
Harnstoff ist eine in der Dermatologie schon seit langer Zeit bekannte Substanz, die sowohl in der externen Therapie trockener Hautzustände, als auch unter kosmetischem Aspekt vielfach eingesetzt wird [122, 123, 125]. In der menschlichen Haut wird der Gehalt an Harnstoff mit 1,42 g pro 100 g Trockengewebe angegeben [107]. Als wichtiger Bestandteil des natürlichen Feuchthaltefaktors (Tab. 2.2-2) hat Harnstoff großen Einfluß auf den Hydratationsgrad des Stratum corneum [88].

Ausgangspunkt für den zunehmenden Einsatz von Harnstoff-Zubereitungen in der Dermatologie bilden einige Eigenschaften (Abb. 2.2-2), die Harnstoff aus dermatologischer und pharmakologischer Sicht als Therapeutikum besonders geeignet erscheinen lassen [88, 125]. Neben der Hydratisierung des Stratum corneum sind besonders der antipruriginöse Effekt und das Fehlen von allergisierenden Eigenschaften hervorzuheben [120].

**Tab. 2.2-2** Zusammensetzung des „natural moisturizing factor (NMF)“ der humanen Epidermis (nach Ziegenmeyer, 1992 [88, 89])

Zusammensetzung des „natural moisturizing factor“	
Bestandteil	Anteil in % (m/m)
- freie Carbonsäuren	ca. 32,0-42,0
- 2-Pyrrolidon-5-Carbonsäure	12,0
- Lactat	12,0
- Harnstoff	7,0
- Citrat, Formiat	0,5
- anorganische Ionen (Cl <sup>-</sup> , Na <sup>+</sup> , K <sup>+</sup> , ...)	18,0
- Ammoniumionen, Glucosamine, Kreatinin, Uronsäuren	1,5
- nichtidentifizierte Substanzen	10,0

In der Therapie trockener Hautzustände wird Harnstoff in topischen Zubereitungen (5 - 10%) verwendet [124]. Als wichtigste Nebenwirkung der Applikation dieser Zubereitungen auf excorierter oder erodierter Haut tritt ein brennendes Mißempfinden auf [120].



**Abb. 2.2-2** pharmakologische Wirkung von Harnstoff auf die menschliche Haut [86]



### 2.2.2 Analytische Nachweismethoden

In der Literatur wird eine Vielzahl an Verfahren zum quantitativen Nachweis von Harnstoff beschrieben. Neben gravimetrischen Bestimmungen und Titrations findet man kolorimetrische sowie enzymatische Nachweismethoden [69].

Als gravimetrische Bestimmung sind die Fällung mit Xanthydrol zu Dixanthylnharnstoff sowie die kristallinen Niederschläge von Harnstoff-Nitrat und -Oxalat zu nennen [107].

Die Hydrolyse von Harnstoff, katalysiert durch Alkalien bzw. Säuren, führt zu Ammoniak und Alkalicarbonat bzw. Kohlensäure und Ammoniumsalz. Durch eine anschließende Säure-Base-Titration des Ammoniumsalzes bzw. des Kohlendioxids kann die Harnstoff-Menge bestimmt werden [4]. Von Bedeutung sind weiterhin eine Formoltitration [107], als auch eine bromatometrische Bestimmung [96]. Außerdem ist die Stickstoffbestimmung nach Kjeldahl zu erwähnen [1], wobei jedoch Fehler in der Aufschlußphase durch das Entweichen von elementarem Stickstoff auftreten können [12, 107].

Weit verbreitet sind die kolorimetrischen Nachweismethoden. Sie basieren einerseits auf Reaktionen der Aminogruppe des Harnstoffs und andererseits auf der Umwandlung des Harnstoffs in andere Verbindungen, welche kolorimetrisch bestimmt werden können [63]. Als Beispiel ist die Reaktion von Harnstoff mit Diacetylmonoxim zu nennen. Die Absorption des gelbgefärbten Reaktionsprodukts wird bei einer Wellenlänge von 480 nm vermessen. Limitierender Faktor stellt bei dieser Methode die Nachweisgrenze dar [127].

Spezifisch und sehr empfindlich ist die enzymatische Harnstoff-Bestimmung [69]. Das Enzym Urease spaltet Harnstoff in Kohlendioxid und Ammoniak bzw. Ammoniumcarbonat (Kap. 3.6.2) [12]. Das entstehende Ammoniak kann direkt (Titration) oder indirekt quantifiziert werden. Der indirekte Nachweis erfolgt mit Hilfe von 2-Oxoglutarat und NADH, welche mit Ammoniak, durch die Glutamatdehydrogenase katalysiert, zu L-Glutamat, H<sub>2</sub>O und NAD<sup>+</sup> umgesetzt werden (Kap. 3.6.2). Die Abnahme der NADH-Menge kann absorptionsphotometrisch bestimmt werden (340 nm) und ist der umgesetzte Ammoniakmenge proportional [6]. Als Fehlerquellen dieser Methode sind die Verwendung von nicht-standardisierter Urease und der Einfluß atmosphärischen Ammoniaks zu berücksichtigen [63, 107].

In der vorliegenden Arbeit wurde die enzymatische Bestimmung von Harnstoff mittels Urease-Reaktion verwendet. Die Vorteile dieser Methode sind die hohe Sensitivität und die hohe Spezifität.

### 2.3 Arginase – Vorkommen und Bedeutung

Das Enzym Arginase (EC 3.5.3.1) stellt eine Hydrolase hoher Aktivität und Spezifität dar [20, 21, 63, 66]. Als wichtiges hepatisches Enzym katalysiert es bei ureotelen Lebewesen die finale Reaktion des Harnstoff-Zyklus [63, 94]. Der beträchtliche Gehalt an Harnstoff im Schweiß [63, 107] läßt weiterhin vermuten, daß auch im Epithel der Schweißdrüsen L-Arginin hydrolytisch in L-Ornithin und Harnstoff gespalten wird.

Die Arginase ist ein homotrimeres Metalloprotein (MG = 107-118 kDa) [60, 62, 63], welches im katalytischen Zentrum vier Mangan(II)-Ionen je Arginase-Molekül gebunden hat [30]. Kristallographische Studien haben gezeigt, daß das Mangan-Zentrum der Arginase aus zwei aufeinander abgestimmten, unterschiedlichen Manganionen besteht, welche durch Wassermoleküle und zwei Aspartatreste miteinander verbunden sind [30] [137]. Die Entfernung der Metallionen, z.B. durch den Chelatbildner EDTA, führt zu einer Dissoziation der Arginase in ihre vier inaktive Untereinheiten. Manganzusatz macht diesen Vorgang rückgängig [107]. Weiterhin wurde durch Manganzugabe eine Erhöhung der Arginase-Aktivität beobachtet [35]. Die Arginase ist ein hochspezifisches Enzym, welches nur Canavanin und das L-chirale Arginin, nicht aber die D-Form oder andere Guanidinverbindungen hydrolysiert [21, 98]. Ihr pH-Optimum ist metallionenabhängig und liegt in Gegenwart von  $Mn^{2+}$ -Ionen bei pH 10 [107]. Im sauren Milieu wird das Enzym zunehmend inaktiviert. Die trimere, aktive Form zerfällt reversibel in ihre Untereinheiten. Typische Inhibitoren der Arginase stellen die Aminosäuren L-Ornithin, L-Lysin, sowie die verzweigt-kettigen Aminosäuren L-Valin, L-Leucin und L-Isoleucin dar [128].

Aufgrund der intrazellulären und gewebespezifischen Lokalisation unterscheidet man zwei Formen der Arginase (Tab. 2.3-1). Die hepatische Isoform (Arginase I) ist im Zytosol lokalisiert und ist zentrales Enzym des Harnstoff-Zyklus. Die mitochondriale, extrahepatische Form findet sich insbesondere in Niere, Gehirn, Dünndarm, Milchdrüsen, Makrophagen und der Haut. Sie wird nur gering in der Leber exprimiert.

**Tab. 2.3-1** Arginase-Isoformen (nach Wu et al., 1998 [128])

ARGINASE I	ARGINASE II
<ul style="list-style-type: none"> <li>• Zytosolisch</li> <li>• vorwiegend hepatisch exprimiert</li> <li>• Harnstoff-Synthese</li> <li>• assoziiert mit ODC (channeling) ⇒ Polyaminsynthese</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• mitochondrial</li> <li>• extrahepatische Lokalisation</li> <li>• assoziiert mit OAT ⇒ Prolin-, Glutamat- und GABA-Synthese</li> </ul>

## 2.4 Ornithin-Decarboxylase (ODC) – Vorkommen und Bedeutung

Das zytosolisch lokalisierte Enzym Ornithin-Decarboxylase (EC 4.1.1.17) katalysiert die Synthese von Putrescin aus L-Ornithin. Putrescin sowie die aus ihm hervorgehenden biogenen Amine Spermin und Spermidin werden als Polyamine zusammengefaßt. Sie sind Bestandteil aller Zellen und für die zelluläre Proliferation und Differenzierung essentiell [114]. Jede Dysregulation im Polyamin-System führt zur Störung zellulärer Funktionen [131]. Erhöhte Polyamin-Level sind bei vielen hyperproliferativen und kanzerösen Prozessen beschrieben [27, 114]. Oft ist auch eine gesteigerte ODC-Aktivität nachweisbar [105, 114]. Die Blockade der Substrat-limitierten Ornithin-Decarboxylase führt zu einer Reduktion des zellulären Stoffwechsels und kann einen apoptotischen Zelluntergang initiieren [23, 91, 97]. Eine auf diesem Mechanismus basierende Anwendung in der Dermatologie stellt die Therapie des Hirsutismus mit Eflornithin-haltigen Externa (z.B. Vaniqa®) dar [74, 106, 109]. Durch Blockade der Ornithin-Decarboxylase gelingt es, das follikuläre Haarwachstum zu hemmen [74, 106].

Die Regulation dieses komplexen Systems der Polyaminsynthese erfolgt auf verschiedenen Ebenen (z.B. Transkription, Translation, Enzymaktivierung). Im Zusammenhang mit der *In-vitro*-Charakterisierung der nicht-essentiellen Aminosäure L-Ornithin soll in dieser Arbeit der Einfluß von L-Ornithin auf die Expression des initialen und für die Polyamin-Synthese limitierenden Enzyms ODC (Dimer, Monomer = 53 kDa) nativer Keratinozyten untersucht werden.

## 2.5 Charakterisierung des Zelltodes

Apoptose und Nekrose sind zwei Formen des Zelltodes, die spezifische Funktionen und Merkmale aufzeigen. Der physiologische Zelltod (Apoptose) dient der Eliminierung einzelner Zellen, die (a) keine Funktion haben, (b) im Überschuß gebildet werden, (c) sich falsch entwickeln, (d) bereits ihre Lebensspanne beendet haben, (e) schädlich sind und (f) der Produktion von toten Zellen für spezifische Funktionen (z.B. verhornendes Plattenepithel) [42, 45]. Dahingegen ist die Nekrose ein pathologischer Vorgang in Folge von starken und akuten, irreparablen Schädigungen an der Zelle, die z.B. durch Hypoxie, Substrat-Mangel oder physikochemische Noxen bedingt sind [56].

Eine Differenzierung dieser beiden Formen des Zelltodes ist aufgrund morphologischer, physikalischer und biochemischer Merkmale möglich (Tab. 2.5-1).

Der charakteristische Verlauf des programmierten Zelltodes (Apoptose) beginnt mit der Schrumpfung des Chromatins entlang der nukleären Membran, begleitet von der Schrumpfung der Zelle und Bildung von Protuberanzen an der Plasmamembran („membrane blebbing“), sowie spezifischer internukleosomaler Fragmentierung der DNA. Am Ende dieses Prozesses steht die Auflösung der Zelle in einzelne, membranumhüllte Fragmente, die apop-

otic bodies, welche durch Phagozytose durch Makrophagen und benachbarte Zellen beseitigt werden [67, 80]. Bereits vor der Ruptur kommt es zu Veränderungen der Struktur und Zusammensetzung der Plasmamembran. So führt die Exposition von Phosphatidylserinresten auf der Zellmembran zur Erkennung und Eliminierung apoptotischer Zellen, z.B. durch Makrophagen. Dadurch wird die Zellruptur und die damit verbundene Freisetzung von Zellinhalt mit konsekutiver Auslösung einer Entzündungsreaktion verhindert [102]. An den Mitochondrien zeigen sich keine größeren Veränderungen im Zuge der Apoptose [68, 130].

**Tab. 2.5-1** Unterschiede zwischen Nekrose und Apoptose (nach Stooss, 1999 [112])

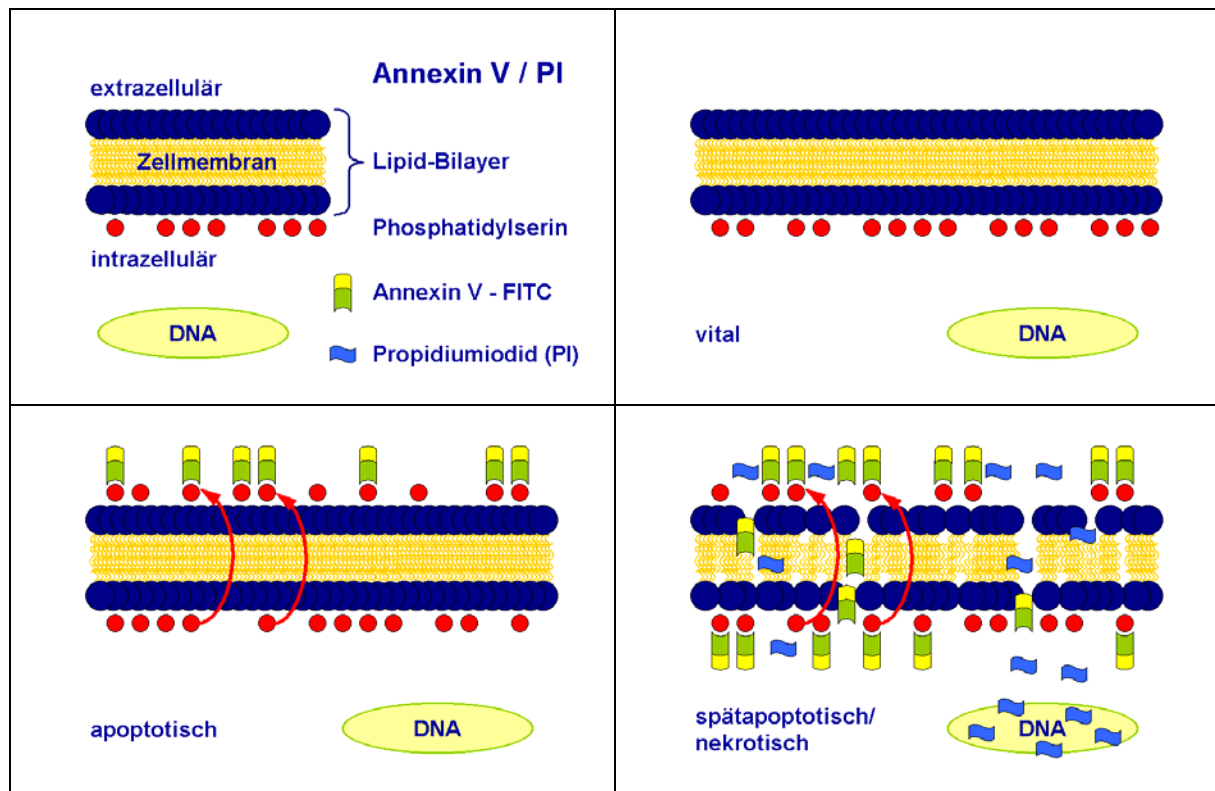
<b>Apoptose</b>	<b>Nekrose</b>
<b>morphologische Merkmale</b>	
<ul style="list-style-type: none"> <li>• intakte Zellmembran</li> <li>• Zellschrumpfung</li> <li>• Chromatinkondensation</li> <li>• apoptotic bodies</li> <li>• Erhalt der Zellorganelle</li> <li>• Verlust des Kontaktes zu Nachbarzellen/Basalmembran</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Verlust der Membranintegrität</li> <li>• Schwellung des Zytoplasmas (Onkose), Schwellung der Mitochondrien</li> <li>• Auflockerung des Chromatins</li> <li>• keine Vesikelformation, komplette Lyse</li> <li>• Zerstörung der Zellstruktur (Organellen schwellen und lysieren)</li> <li>• Adhäsion zwischen den Zellen und zur Basalmembran bleibt bestehen</li> </ul>
<b>physikalische Merkmale</b>	
<ul style="list-style-type: none"> <li>• genau regulierter Prozeß von Enzymfunktionen</li> <li>• Energie(ATP)-abhängig</li> <li>• internukleosomale DNA-Fragmentierung</li> <li>• prälytische DNA-Fragmentierung (frühes Ereignis des Zelltodes)</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Verlust der Regulation der Ionenhomöostase</li> <li>• keine Energie erforderlich</li> <li>• DNA-Fragmentierung an zufälliger Stelle (Karyolysis)</li> <li>• postlytische DNA-Fragmentierung (spätes Ereignis des Zelltodes)</li> </ul>
<b>biochemische Merkmale</b>	
<ul style="list-style-type: none"> <li>• gezielte Eliminierung von einzelnen Zellen</li> <li>• Zelltod durch physiologische Stimuli induziert</li> <li>• Phagozytose durch Makrophagen oder benachbarte Zellen ohne Entzündungsreaktion</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Tod von Zellgruppen</li> <li>• Zelltod durch unphysiologische Einflüsse hervorgerufen</li> <li>• Freisetzung lysosomaler Enzyme mit konsekutiver Leukotaxie und Entzündungsreaktion</li> </ul>

Bei der Nekrose hingegen kommt es zu keinem regelmäßigen Abbau von DNA und Proteinen. Infolge erhöhter Permeabilität der Plasmamembran kommt es kurz vor der Ruptur der Zellmembran zur Schwellung des Zytoplasmas (Onkosis) und der mitochondrialen Matrix [82].

Der Nachweis des programmierten Zelltodes kann mit Hilfe verschiedener Meßparameter qualitativ und quantitativ in verschiedenen Apoptose-Stadien erfolgen [95]. Für die vorliegenden Untersuchungen und Fragestellungen wurde zur Bestimmung der frühen Phase der Apoptose die Translokation von Phosphatidylserin an die Außenseite der Zellmembran und die Expression des Mitochondrien-spezifischen Membranproteins APO 2.7 untersucht [132].

### 2.5.1 Durchflußzytometrische Messungen zur Apoptose mittels Annexin V / PI

Die Translokation von Phosphatidylserin an die Außenseite der Zellmembran als früher Marker der Apoptose läßt sich immunologisch nachweisen. Die hohe Affinität von Annexin V - FITC zu Phosphatidylserin ermöglicht eine Quantifizierung dieser Membranveränderung [92]. Die gleichzeitig durchgeführte Kernfärbung mittels Propidiumiodid (PI) ermöglicht Aussagen über die Membranintegrität der Zellen, da der Farbstoff die intakte Zellmembran nicht durchdringen kann. Dies ermöglicht eine Differenzierung zwischen Apoptose und Nekrose (Kap. 2.5, 3.5.1 und Abb. 2.5-1).

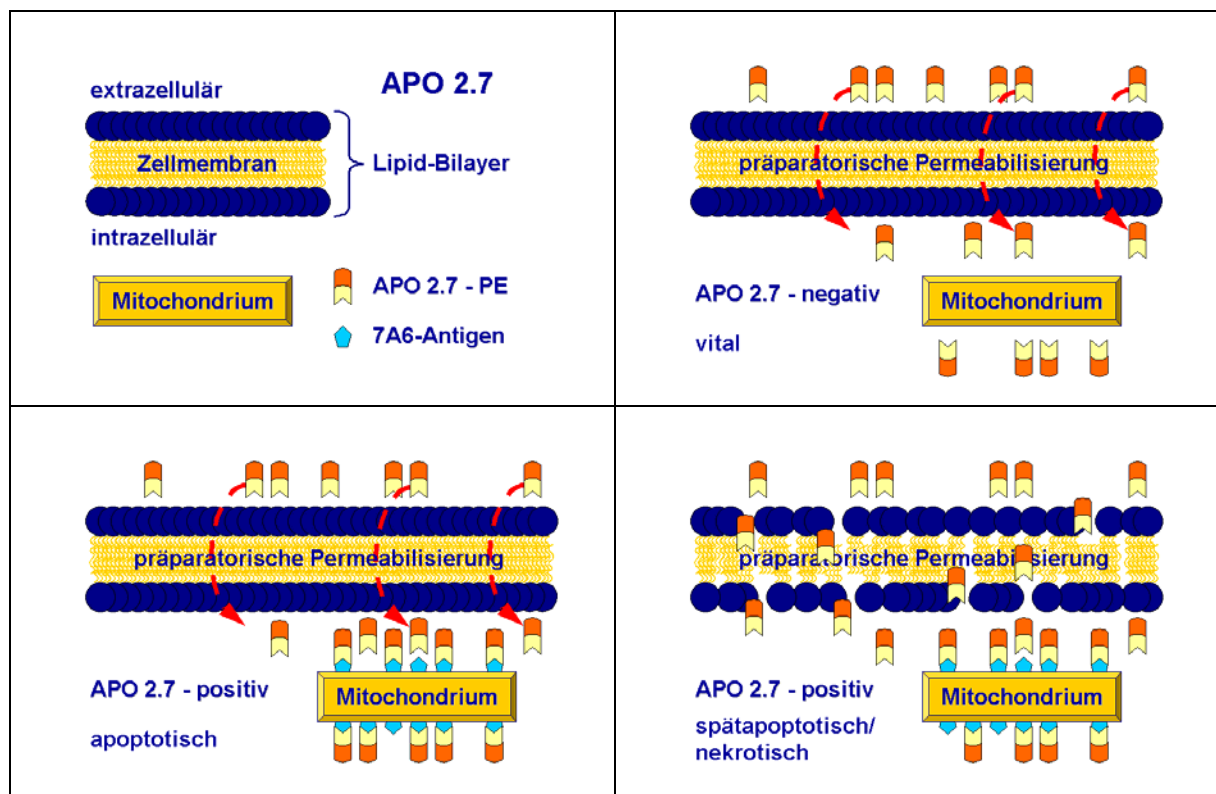


**Abb. 2.5-1** Schematische Darstellung der Annexin V / PI - Doppelfärbung

### 2.5.2 Durchflußzytometrische Bestimmung des Apoptose-Markers APO 2.7

Im frühen Stadium des apoptotischen Zelluntergangs wird das mitochondriale Membranprotein APO 2.7 (38 kDa) exponiert. Es wird vermutet, daß APO 2.7 in die molekulare Kaskade der Apoptose involviert ist und seine Expression eher ein frühes Ereignis der Apoptose als ein Endprodukt des Zelltodes darstellt [132].

Der flowzytometrische Nachweis von APO 2.7 erlaubt eine Quantifizierung apoptotischer Prozesse (Abb. 2.5-2). Bei dieser flowzytometrischen Einparameter-Messung ist die gemessene Fluoreszenz-Intensität proportional zur Expression von APO 2.7 und ermöglicht eine Detektion früher apoptotischer Ereignisse [3, 70].



**Abb. 2.5-2** Schematische Darstellung des Apoptose-Markers APO 2.7

### 3 Material und Methoden

#### 3.1 Material

##### **Chemikalien**

Acrylamid	Carl Roth GmbH & Co., Karlsruhe, Deutschland
APS (Ammoniumpersulfat)	Fluka Chemie AG, Buchs, Schweiz
L-Arginin HCl (L-Arg)	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Taufkirchen, Deutschland
D-Arginin HCl (D-Arg)	ICIN Biomedicals Inc., Aurora, Ohio, USA
Bromphenolblau	Fluka Chemie AG, Buchs, Schweiz
Calciumchlorid	Merck KGaA, Darmstadt, Deutschland
Coomassie® Brilliant Blue R250	Fluka Chemie AG, Buchs, Schweiz
L-Citrullin (L-Citr)	Fluka Chemie AG, Buchs, Schweiz
Dispase I ( <i>Bacillus polymyxa</i> )	Roche Diagnostics GmbH, Mannheim, Deutschland
DMSO	
ECL™ Western Blotting Analysis System	Amersham Biosciences, Buckinghamshire, England
EDTA	Fluka Chemie AG, Buchs, Schweiz
Eisessig (Essigsäure, 100 %)	Merck KGaA, Darmstadt, Deutschland
Eosin	Fluka Chemie AG, Buchs, Schweiz
Ethanol (absolut)	Carl Roth GmbH & Co.; Karlsruhe, Deutschland
Fetales Kälberserum (FKS)	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Taufkirchen, Deutschland
Gentamycin	Gibco Life Technologies GmbH, Eggenstein, Deutschland
Gentianaviolett	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Taufkirchen, Deutschland
D-Glukose (85 %)	Merck KGaA, Darmstadt, Deutschland
Glycerol	Merck KGaA, Darmstadt, Deutschland
Glycin	Merck KGaA, Darmstadt, Deutschland
Hanks' Balanced Salt Solution (HBSS)	Gibco Life Technologies GmbH, Eggenstein, Deutschland
HCl	Merck KGaA, Darmstadt, Deutschland
Isotonische Lösung ISOTON II	Coulter-Immunotech-Diagnostics, Krefeld, Deutschland
KCl	Merck KGaA, Darmstadt, Deutschland
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	Merck KGaA, Darmstadt, Deutschland
KOH	Merck KGaA, Darmstadt, Deutschland

Magermilchpulver Sucofin	Trade Service International, Zeven, Deutschland
MgCl	Merck KGaA, Darmstadt, Deutschland
$\beta$ -Mercaptoethanol	Fluka Chemie AG, Buchs, Schweiz
Methanol	Merck KGaA, Darmstadt, Deutschland
Natriumazid	Fluka Chemie AG, Buchs, Schweiz
Natriumcitrat	Merck KGaA, Darmstadt, Deutschland
NaCl	Merck KGaA, Darmstadt, Deutschland
$\text{NaH}_2\text{PO}_4$	Merck KGaA, Darmstadt, Deutschland
$\text{NaHCO}_3$	Merck KGaA, Darmstadt, Deutschland
NaOH	Carl Roth GmbH & Co.; Karlsruhe, Deutschland
L-Ornithin HCl (L-Orn)	Merck KGaA, Darmstadt, Deutschland
$[\text{}^3\text{H}]$ -L-Ornithin	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Taufkirchen, Deutschland
Ponceau-S-Lösung	Fluka Chemie AG, Buchs, Schweiz
Protein-Assay-Kit	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Taufkirchen, Deutschland
Rinderserumalbumin (BSA)	Serva Electrophoresis GmbH, Heidelberg, Deutschland
Salzsäure (HCl) 37%ig	Merck KGaA, Darmstadt, Deutschland
SDS ( <i>sodium dodecyl sulfat</i> )	Fluka Chemie AG, Buchs, Schweiz
Soluene 350	Packard Bioscience R.V., Groningen, Niederland
TEMED (N,N,N,N'-Tetra-methylethylendiamin)	Fluka Chemie AG, Buchs, Schweiz
$[\text{}^3\text{H}]$ -Thymidin	American Radiolabeled Chemicals Inc., St. Louis, USA
TRIS, TRIS-HCl	Merck KGaA, Darmstadt, Deutschland
Trypsin-EDTA (0,05 %)	Gibco Life Technologies GmbH, Eggenstein, Deutschland
Tween 20	Serva Feinbiochemica, Heidelberg, Deutschland
Ultrafin liquid SW-Negativentwickler	Tetenal Photowerk GmbH & Co KG, Norderstedt, Deutschland
Urea/Ammoniak (UV-Test)	R-Biopharm GmbH, Darmstadt, Deutschland
Variospeed Superfix Schnellfixierer-Konzentrat	Tetenal Photowerk GmbH & Co KG, Norderstedt, Deutschland
Western blotting detection reagents ECL <sup>®</sup>	Amersham Pharmacia Biotech, San Francisco, Kalifornien, USA



**Medien / Supplemente**

Dulbecco's Modified Eagle Medium, DMEM, DMEM (Phenolrot-frei)	Gibco Lifetechnology GmbH, Eggenstein, Deutschland
Serum free keratinocyte medium (SFM)	Gibco Lifetechnology GmbH, Eggenstein, Deutschland
fetales Kälberserum (FKS)	Gibco Lifetechnology GmbH, Eggenstein, Deutschland

**Antikörper und Marker**

Annexin V – FLUOS Kit	BD PharMingen, Heidelberg, Deutschland
APO 2.7-Antikörper	Immunotech, Marseille, Frankreich
Anti-Human Ornithin-Decarboxylase, Rabbit polyclonal	PROGEN Biotechnik GmbH, Heidelberg, Deutschland
Anti-Human Arginase, Rabbit polyclonal	Biogenesis Ltd., Poole, England, UK
Anti-Rabbit IgG, Peroxydase-konjugiert	Calbiochem-Novachem GmbH, Bad Soden, Deutschland
PI (Propidiumiodid)	Calbiochem-Novabiochem Corporation, Merck KGaA, Darmstadt, Deutschland

**Standards**

Protein-Längenstandard (29; 45; 66; 97; 116; 205 kDa)	High Molecular Weight Standard Mixture for SDS Gel Electrophoresis SDS-6H (30-200 kDa) Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Taufkirchen, Deutschland
L-Arginase (bovine liver) (Homotrimer, ~115 kDa)	Fluka, Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Taufkirchen, Deutschland

**Stammlösungen und Puffer**

Coomassie-Entfärbe-Lösung	Eisessig/Methanol/Wasser 1:4:5
Coomassie-Färbe-Lösung	0,2 % Coomassieblau in Eisessig/Methanol/Wasser 1:4:5
Cryo-SFM (Gefriermedium)	33 ml SFM + 10 ml FKS + 7 ml DMSO
Elektrophoresepuffer	25 mM TRIS pH 8,3, 192 mM Glycin, 0,1 % SDS in Aqua bidest.
Gentianaviolett-Lösung	0,1 % Gentianaviolett in Ethanol / Wasser 1:49
Natriumcitrat-Lösung	0,1 M Na-Citrat in Ethanol / Wasser 1:1
PBS-Puffer (phosphat buffered saline)	8 g NaCl + 0,2 g KCl + 1,44 g Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> + 0,2 g KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> × 2 H <sub>2</sub> O ad 1000 ml Aqua bidest.; pH 7,4 (mit 1 N NaOH bzw. 1 N HCl)
PBS-B	2 % FKS in PBS

PBS-T	0,1 % Tween 20 in PBS
Puck/EDTA	0,4 g KCl + 8,0 g NaCl + 0,35 g NaHCO <sub>3</sub> + 1,0 g D-Glucose + 5 mg Phenolrot + 0,255 g EDTA ad 1.000 ml Aqua bidest.
Sammelgelpuffer (10 %)	0,5 M TRIS-HCl (pH 6,5), 0,8 % SDS in Aqua bidest.
SDS-Probenpuffer	5 % Mercaptoethanol, 2,8 % SDS, 14 % Glycin, 90 mM TRIS pH 6,8, 0,1 % Bromphenolblau in Aqua bidest.
TBS-Puffer (10 ×)	0,1 M TRIS pH 7,4, 1,54 M NaCl in Aqua bidest.
Trenngelpuffer	1,5 M TRIS-HCl pH 8,8, 0,8 % SDS in Aqua bidest.
Tyrode-Eosin-Lösung	8 g NaCl + 0,2 g KCl + 0,2 g CaCl <sub>2</sub> + 0,1 g MgCl <sub>2</sub> + 0,05 g NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> + 1,0 g NaHCO <sub>3</sub> + 1,0 g Glucose + 0,625 g Eosin ad 1.000 ml Aqua bidest.
Westernblot-Puffer	20 mM TRIS pH 8,8, 150 mM Glycin, 0,02 % SDS, 20 % Methanol in Aqua bidest.
NADH-Lösung	NADH (0,4 mg/ml) gelöst in Triethanolamin-Puffer [(pH 8,0) + 2-Oxoglutarat (3,6 mg/ml)]
Urease-Lösung	wässrige Urease-Lösung (ca. 5 Units/ml)
GLDH-Lösung	wässrige GLDH-Lösung (ca. 40 Units/ml)
Szintillatorflüssigkeit	4 g PPO [2,5-Diphenoloxazol] + 0,1 g POPOP [1,4-bis-2- (5-Phenyloxazolyl)-Benzen] ad 1.000 ml Toluol

### **Geräte und Gebrauchswaren**

Absorptionsreader iEMS Reader (Urease)	Labsystems MF, Helsinki, Finnland
Absorptionsreader FluoStar Galaxy (Vitalität)	BMG Labtechnologies GmbH, Offenburg, Deutschland
Analysenwaage	Typ MC5-OCE, Sartorius AG, Göttingen, Deutschland
Blot-Apparatur für Westernblot Hoefler SemiPhor	Hoefler, Amersham Pharmacia Biotech, San Francisco, Kalifornien, USA
Brutschrank INCO 2 (Zellkultur)	Memmert GmbH & Co. KG, Schwabach, Deutschland
Brutschrank Vitromat mytron, sbs-11 (Hühnereier)	mytron, Heiligenstadt, Deutschland
Cell-Harvester und Vakuum- Controller	INOTECH, Wohlen, Schweiz
Durchlichtmikroskop	Zetopan, Reichert AG Wien, Österreich
Durchflußcytometer FACScan®	Becton Dickinson, San Jose, USA
Elektrophorese-Apparatur (vertikal)	Hoefler, Amersham Pharmacia Biotech; San Francisco, Kalifornien, USA

Eppendorf-Gefäße (1,5 ml)	Eppendorf-Netheler-Hinz GmbH, Hamburg, Deutschland
Falcon-Tubes	Becton Dickinson, San Jose, USA
Flüssigkeitsszintillationszähler WinSpectral 1414	WALLAC-ADL-GmbH, Freiburg, Deutschland
Fuchs-Rosenthal-Zählkammer	Faust GmbH, Halle, Deutschland
Gewebekulturflaschen und -schalen (25 cm <sup>2</sup> , 75 cm <sup>2</sup> , Ø 60 mm)	Greiner GmbH, Frickenhausen, Deutschland
Glasfiberfilter Typ G-7	INOTECH, Wohlen, Schweiz
Küvette (4,5 ml)	Coulter-Immunotech-Diagnostics, Krefeld, Deutschland
Laminarbox HS 12	Heraeus Instruments, Hanau, Deutschland
Magnetrührer MLW	Rührerätewerk Medingen, Sitz Freital, Deutschland
Mikroskope: - Telaval 3 - Olympus CK 2 und BX50	Carl Zeiss Jena, Deutschland Olympus, Tokyo, Japan
Mikrotiterplatten (MTP) (24er, 48er und 96er)	Greiner Labortechnik GmbH, Frickenhausen, Deutschland
Mikrowelle Typ M 633	Samsung Electronics GmbH, Steinbach, Deutschland
Nitrocellulose Blotting Membran (0,45 µm)	Sartorius AG, Göttingen, Deutschland
pH-Meter (Digital pH 525)	Wissenschaftlich-Technische Werkstätten GmbH, Weilheim, Deutschland
Pipetten	Eppendorf-Netheler-Hinz GmbH, Hamburg, Deutschland
Präzisionswaagen: - Typ 870-13 - UMC 5	G. Kern & Sohn, Albstadt, Deutschland Sartorius AG Göttingen, Deutschland
Röntgenfilm (XBD – x-ray Retina, 13×18 cm)	Fotochemische Werke GmbH Berlin, Berlin, Deutschland
Schüttler: - Heidolph unimax 2010	Heidolph; Schwabach, Deutschland
Sterilfilter	Sartorius Minisat, steril, 600 kPa max, 0,22 µm
Szintillationsmeßgefäße	Canberra-Packard GmbH, Dreieich, Deutschland
Vortex genie 2	Scientific Industries, USA
Thermostad B3-DC 1	Haake, Karlsruhe, Deutschland
Zellcoulter (Coulter® Z-Serie)	Beckman Coulter, Coulter GmbH, Krefeld, Deutschland
Zellsieb (100 µm)	Becton Dickinson, NJ, USA
Zentrifuge EC 5402	Eppendorf-Netheler-Hinz GmbH, Hamburg, Deutschland

**Software**

Software für ImageMaster VDS	Pharmacia Biotech, San Francisco, Kalifornien, USA
SigmaStat 1.0	Jandel GmbH, Erkrath, Deutschland
WinMDI 2.8	The Scripps Research Institute, La Jolla CA 92037, USA ( <a href="http://www.scripps.edu/">http://www.scripps.edu/</a> )
CELLQuest™ (Flowzytometrie)	BectonDickinson, San Jose, CA 95131-1807, USA
Software FlouStar® V4.21	BMG Labtechnologies GmbH, Offenburg, Deutschland
SPSS® 10.0.5	SPSS Inc., Chicago, Illinois 60606, USA
Sero Calc® Version 4.0	DEMOS Computer GmbH, Köln, Deutschland
1414 WinSpectral™ V1.3	Perkin Elmer Wallac, Freiburg, Deutschland
Microsoft® Office 2000 (Word, Excel, Powerpoint)	Microsoft® Corporation, One Microsoft Way, Redmond, WA 98052-6399, USA

## 3.2 Zellkultur

### 3.2.1 Gewinnung humaner Keratinozyten, Primärkultur

Die in den Experimenten verwendeten nativen Keratinozyten wurden aus juvenilem Vorhautgewebe ein- bis zehnjähriger Spender gewonnen. Um spenderspezifische Unterschiede möglichst gering zu halten, wurden gepoolte Keratinozytenkulturen verwendet. Die bei der Zirkumzision exzidierten Gewebestücke wurden dazu direkt nach der Entnahme in serumfreies Keratinozytenmedium (SFM) mit Antibiotika-Zusatz (5 µl/ml Gentamycin) gegeben und bei 4 °C für maximal 5 Stunden gelagert. Zur mechanischen Gewebezerkleinerung wurden die Präparate in eine PBS-Waschlösung (ohne Ca<sup>2+</sup> und Mg<sup>2+</sup>, mit 20 µg/ml Gentamycin) überführt und mit einem Skalpell in ca. (3-5 mm)<sup>3</sup> große Stücke zerkleinert. Anschließend wurden die Gewebestücke in „Hank's balanced salt solution“ (HBSS) mit Dispase (25 kaseinolytische Einheiten/ml) und Antibiotikazusatz (5 µg/ml Gentamycin) überführt und für ca. 18 Stunden bei 4 °C enzymatisch angedaut. Danach konnte die Epidermis von der Dermis abgelöst werden. Eine weitere Zellvereinzlung erfolgte durch Inkubation mit 2 ml Trypsin-EDTA bei 37 °C über 20-30 min und unterstützende Suspendierung durch mehrmaliges Durchwirbeln mit einer Pipette. Durch Zugabe von 10-13 ml in PBS steril gelösten Sojabohnen-Trypsin-Inhibitors (Endkonzentration 10mg/ml, ohne Ca<sup>2+</sup> und Mg<sup>2+</sup>) wurde die Trypsinierung gestoppt. Die somit erhaltene Zellsuspension wurde bei Raumtemperatur und 1.520 rpm über 10 min zentrifugiert und das Pellet anschließend in 5 ml Komplettmedium (SFM mit 25 µg/ml Rinderhypophysenextrakt (BPE) und 0,2 ng/ml rekombinatem epithelialem Wachstumsfaktor (EGF)) aufgenommen. Zur Kultivierung wurden 3x10<sup>6</sup> Zellen (Kap. 3.2.5) mit 15 ml Komplettmedium (SFM) in eine T-75-Kulturflasche (Greiner) überimpft und bei 37 °C, 5 % pCO<sub>2</sub> und 90 % Luftfeuchtigkeit inkubiert. Das Medium wurde alle 2-3 Tage gewechselt.

Nach ca. 14 Tagen wurden die Zellen geerntet. Dazu wurde das Medium aus den gut bewachsenen Kulturflaschen dekantiert und mit PUCK-EDTA nachgespült. Anschließend wurden die Zellen durch Zugabe von 2 ml Trypsin-EDTA und 10 minütiger Inkubation im Brutschrank (37 °C) vom Boden der Kulturflasche gelöst. Die Zellen wurden unter Nachspülen mit Medium (SFM) in Zentrifugenröhrchen (15 ml) überführt. Die Zellsuspension wurde bei Raumtemperatur und 1.520 rpm für 7 min pelletiert und erneut in SFM aufgenommen. Die Zellzahl wurde in der Fuchs-Rosenthal-Kammer bestimmt und 2 Mio. Zellen in 1 ml Cryo-SFM aufgenommen. Die Zellsuspensionen wurden in flüssigem Stickstoff für maximal 6 Monate gelagert.

### 3.2.2 Kultivierung von humanen Keratinozyten

In den durchgeführten Zellkultur-Experimenten wurden ausschließlich native Keratinozyten verwendet. Die Einsaat erfolgte in SFM (Tab. 3.2-1). Die Zellen wurden bei einer Temperatur von 37 °C, einem CO<sub>2</sub>-Gehalt von 5 % und 90 % Luftfeuchtigkeit im Brutschrank kultiviert. Der Mediumwechsel erfolgte alle 2-3 Tage. Bei 30-40 %iger Konfluenz wurden die Zellen auf Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM) mit 5 % FKS und 1 % Antibiotika-Antimykotika-Zusatz umgesetzt und bei 37 °C, 5 % CO<sub>2</sub>-Gehalt und 90 % Luftfeuchtigkeit weiter kultiviert.

**Tab. 3.2-1** Zelleinsaat nativer Keratinozyten

Zell-Kulturgefäß	Zell-Einsaat
48er MTP	10.000 Zellen / 400 µl Medium / Well
24er MTP	25.000 Zellen / 1 ml Medium / Well
Kulturschalen (60 mm Durchmesser)	300.000 Zellen / 5 ml Medium

Alle Experimente wurden bei 70-80 %iger Konfluenz in FKS-freiem DMEM mit 1 % Antibiotika-Antimykotika-Zusatz (10.000 E/ml Penicillin G, 10 mg/ml Streptomycin, 25 µg/ml Amphotericin B) durchgeführt. Zur Harnstoff-Bestimmung wurde Phenolrot-freies DMEM verwendet.

### 3.2.3 Inkubation mit L-Ornithin HCl

In allen Zellkultur-Experimenten wurde L-Ornithin als Monohydrochlorid eingesetzt. L-Ornithin HCl wurde in PBS gelöst und als Stammlösung steril filtriert. Die Zugabe zum Kulturmedium erfolgte im Verhältnis 1:10.

### 3.2.4 Zellernte

Die kultivierten nativen Keratinozyten wurden durch schonende Trypsinierung (Trypsin-EDTA) aus den Kulturgefäßen gelöst. Dazu wurde das Medium entfernt und die Kulturschalen mit PUCK-EDTA (2-4 ml) gespült. Anschließend wurde 1 ml Trypsin-Lösung (37 °C) dazugegeben und für 8-10 min im Brutschrank (37 °C) inkubiert. Nach lichtmikroskopischer Kontrolle wurden der Trypsinierungsprozeß durch Zugabe von 1 ml 2 % FKS (in PBS) gestoppt und die Zellen in ein Zentrifugenröhrchen überführt. Nach Pelletierung (1.500 rpm, 5 min) wurden die Zellen in PBS resuspendiert.

### 3.2.5 Bestimmung der Zellanzahl

Aus den vielen zur Verfügung stehenden Methoden der Zellzahlbestimmung wurden die Zählung in der Fuchs-Rosenthal-Kammer und die durchflußzytometrische Methode am CellCoulter® verwendet.

Zur Bestimmung der Zellzahl in der Fuchs-Rosenthal-Kammer wurden die Zellen in einem definierten Volumen suspendiert und 100 µl der Einzelzellsuspension in 400 µl Thyrode-Eosin-Lösung gegeben, vermischt und in die Zählkammer überführt. Die vitalen Zellen (farblos) wurden in fünf Gruppenquadraten gezählt. Die Gesamtzellanzahl berechnet sich aus der Summe der gezählten vitalen Zellen der fünf Gruppenquadrate multipliziert mit 1.000 (Kammerindex), 5 (Verdünnung) und mit dem Volumen (ml) der Gesamtsuspension.

Bei der Zellzahlbestimmung mittels CellCoulter® wurden alle Partikel einer vorher definierten Größe (8-30 µm Durchmesser) gezählt. Dabei wird keine Differenzierung der Partikel vorgenommen, sodaß in der erhaltenen Zellanzahl auch avitale Zellen, Zellkonglomerate u.a. mit erfaßt werden.

### 3.3 Untersuchung zur Vitalität (Gentianaviolett-Färbung)

Zytotoxische Einflüsse auf Zellen lassen sich mittels Vitalitätstest erfassen. Werden native Keratinozyten stark geschädigt, so verlieren sie die Fähigkeit, am Boden des Kulturgefäßes zu haften und werden durch die im Vitalitätstest durchgeführte Methanol-Fixierung nicht erfaßt. Somit führt die anschließende Zellfärbung (Proteinfärbung) mittels Gentianaviolett zur Quantifizierung der vitalen Zellpopulation im Kulturgefäß [236].

Die Untersuchungen zum Einfluß von L-Ornithin HCl auf die Vitalität nativer Keratinozyten wurden in 48er MTP durchgeführt. Nach Erreichen einer 70-80 %igen Konfluenz wurden die Zellen in FKS-freiem DMEM mit L-Ornithin HCl für 6, 12, 24 bzw. 48 Stunden inkubiert.

Nach der entsprechenden Inkubationzeit wurden der Zellüberstand entfernt und die adhären-ten Zellen durch Zugabe von absolutem Methanol (400 µl/well, 20 min) fixiert. Nach mehrmaligem Waschen mit Wasser erfolgte der Zusatz von 200 µl einer 0,1 %igen ethanolischen Gentianaviolett-Lösung für 10 min in jedes Well. Die Gentianaviolett-Lösung enthält einen kationischen Triarylmethan-Farbstoff, der an Proteine bindet und somit die fixierten Zellen anfärbt. Ein erneutes Waschen dient der Entfernung nicht gebundenen Farbstoffs. Nach Aufnahme des Farbstoffes in 200 µl (je Well) einer 0,1 molaren ethanolischen Natrium-Citrat-Lösung wurde die Absorption mittels FluoStar®-Mikroplattenphotometer bei 620 nm bestimmt.

Die Absorption ist ein direktes Maß für die an die Zellen gebundene Farbstoffmenge und so für die Anzahl vitaler Zellen im Well, da nur diese fixiert und angefärbt werden [47, 50, 51].

### 3.4 Untersuchung zum [<sup>3</sup>H]-Thymidin-Einbau in die DNA

Die DNA-Synthese einer Zelle steht in direktem Verhältnis zu deren Proliferation [9]. Die Erfassung des Einbaus radioaktiv markierter DNA-Basen ermöglicht eine Bestimmung der Proliferationsleistung. Die Messung der [<sup>3</sup>H]-Thymidin-Inkorporation in die DNA stellt ein weit verbreitetes und gut etabliertes Verfahren dar [25, 55] und wurde im Rahmen dieser Arbeit zur Untersuchung des Proliferationsverhaltens nativer Keratinozyten nach Inkubation mit L-Ornithin HCl angewandt.

Native Keratinozyten wurden für diesen Versuch in 24er MTP kultiviert und bei Erreichen einer 70-80 %igen Konfluenz mit L-Ornithin HCl (0; 1; 5; 10; 20; 30; 40; 50 mM) für 6, 12, 24 bzw. 48 Stunden inkubiert.

Nach der jeweiligen Inkubationszeit mit L-Ornithin HCl wurde zu jedem Well 20 µl einer [<sup>3</sup>H]-Thymidin-Lösung (0,5 µCi / 20 µl) pipettiert und für eine Stunde inkubiert. Das Medium wurde anschließend mit Hilfe des Cell-Harvester<sup>®</sup> entfernt und die Wells mit Aqua bidest. gespült. Danach wurden die Zellen mit 500 µl/well Trypsin-EDTA versetzt und für ca. 10 min im Brutschrank bei 37 °C enzymatisch abgelöst. Nach mikroskopischer Kontrolle des Trypsinierungsprozesses wurden durch Absaugen der Wells mit dem Cell-Harvester<sup>®</sup> die Zellen auf Filterpapierblättchen transferiert. Durch erneutes Spülen mit Aqua bidest. und visuelle Kontrolle wurde sichergestellt, daß alle Zellen erfaßt wurden.

Nach dem Überführen der Filterpapierblättchen in Szintillatortröhrchen und einer 24-stündigen Trocknung wurden die Proben mit jeweils 3 ml Szintillatorflüssigkeit versetzt und im WinSpectral 1414 Liquid Scintillation Counter vermessen.

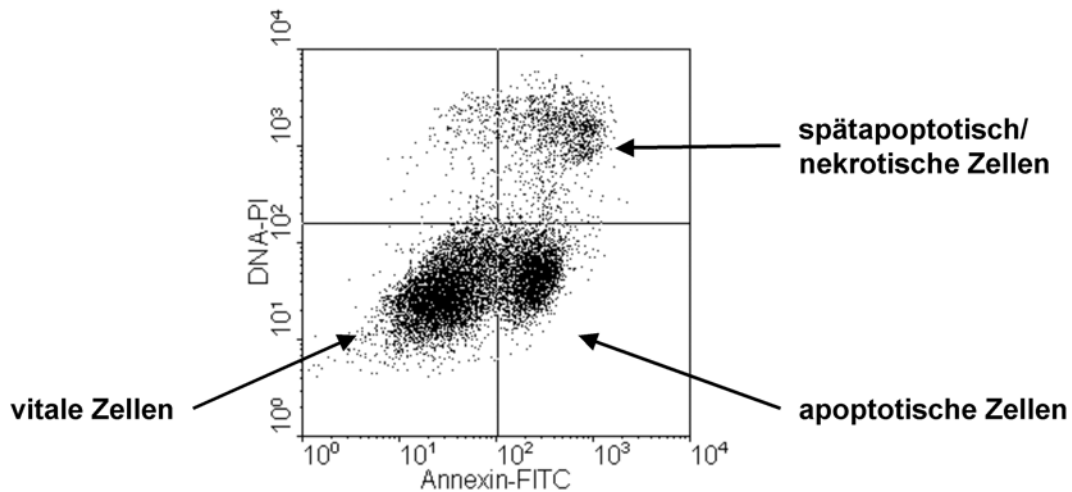
### 3.5 Charakterisierung des Zelltodes

#### 3.5.1 Durchflußzytometrische Messungen zur Apoptose mittels Annexin V / PI

Es wurden mit L-Ornithin HCl behandelte native Keratinozyten geerntet (Kap. 3.2.4) und in PBS resuspendiert ( $10^6$  Zellen / ml PBS). Für die Präparation wurden  $5 \times 10^5$  Zellen in ein Falcon-Tube überführt, erneut pelletiert und überstehendes Medium dekantiert. Es folgte eine 15-minütige Inkubation mit 5 µl Annexin V-FITC-Stammlösung und 10 µl PI [50 µg/ml] im Dunkeln. Danach wurden 400 µl Inkubationspuffer (10 mM Hepes, 140 mM NaCl, 5 mM CaCl<sub>2</sub>, pH 7,4) zugegeben und die Zellsuspension im FACScan<sup>®</sup> (Anregung 488 nm) vermessen. Dabei wurde die Fluoreszenz des Annexin V-FITC-Signals mit einem Bandpaß von  $530 \pm 30$  nm und die des PI-Signals mit einem Bandpaß von  $585 \pm 42$  nm erfaßt.

Das Ergebnis der flowzytometrischen Zweiparametermessung wurde als Dotplot dargestellt und mit Hilfe der Quadrantenanalyse ausgewertet. Die Unterscheidung in vitale, apoptotische und spätapoptotisch/nekrotische Zellen erfolgte anhand der unterschiedlichen Fluoreszenzintensitäten im Annexin V- und PI-Signal (Abb. 3.5-1).





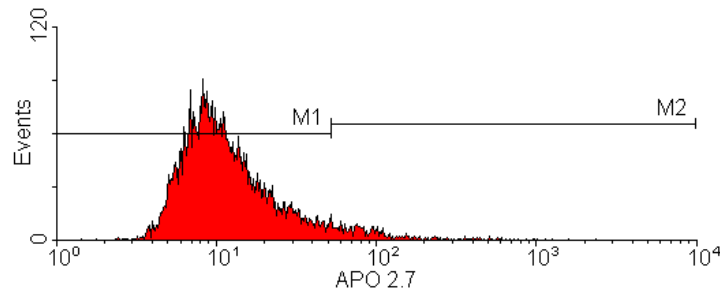
**Abb. 3.5-1** Beispielhafte Darstellung eines Dotplots einer flowzytometrischen Zweiparametermessung an mit Annexin V-FITC und Propidiumiodid (PI) markierten nativen Keratinozyten nach 16-stündiger Inkubation mit 50 mM L-Ornithin HCl

Zur Auswertung der Annexin V / PI - Messungen wurden die prozentuale Verteilung der Zellfraktionen an der Gesamtpopulation (10.000 Zellen) nativer Keratinozyten berechnet und die Abhängigkeit von der Inkubation mit L-Ornithin HCl untersucht.

### 3.5.2 Durchflußzytometrische Bestimmung des Apoptose-Markers APO 2.7

Native Keratinozyten wurden mit L-Ornithin HCl inkubiert und geerntet (Kap. 3.2.4). Es wurden je  $5 \times 10^5$  Zellen zur Präparation verwendet. Die Zellsuspension wurde zentrifugiert (3 min, 1.250 rpm), der Überstand dekantiert und das Pellet aufgeklöpft. Zur Permeabilisierung wurden die Zellen mit 0,1 % Tween 20 behandelt (100  $\mu$ l, 5 min bei Raumtemperatur). Danach wurde die Zellen in 1 ml PBS-B aufgenommen und erneut zentrifugiert. Das aufgeklöpfte Pellet wurde mit 10  $\mu$ l des R-Phycoerythrin konjugierten APO 2.7-Antikörpers (Immunotech®) inkubiert (30 min bei Raumtemperatur). Anschließend wurde die Suspension mit 2 ml PBS verdünnt und weitere 5 min inkubiert. Nach erneuter Zentrifugation wurden die Zellen in 0,5 ml PBS aufgenommen und das Fluoreszenz-Signal im FACScan® (Anregung 488 nm) mit einem Bandpaß von  $585 \pm 42$  nm vermessen.

Zur Auswertung wurde der Anteil APO 2.7-negativer Zellen in der Kontroll-Population mit 95 % definiert (M1 in Abb. 3.5-2). Anhand der damit definierten maximalen Fluoreszenz APO 2.7-negativer Zellen wurden die Histogramme der Einparameter-Messung ausgewertet und der Anteil positiver und negativer Zellen in Prozent der Gesamtpopulation (10.000 Zellen) verglichen.



**Abb. 3.5-2** Exemplarische Darstellung der APO 2.7-Messung anhand einer unbehandelten Kontroll-Population nativer Keratinozyten  
(M1 = APO 2.7-negativ; M2 = APO 2.7-positiv)

### 3.6 Einfluß von L-Ornithin HCl auf die Harnstoff-Synthese nativer Keratinozyten – Vergleich mit L-Arginin HCl, D-Arginin HCl und L-Citrullin (Urease-Test)

Um den Einfluß extern zugeführten L-Ornithin HCl auf den Harnstoff-Metabolismus nativer Keratinozyten (Abb. 2.1-1) zu verstehen, wurde die *De-novo*-Harnstoff-Synthese unter Zellkultur-Bedingungen untersucht. Dazu wurde der Harnstoff-Gehalt des Kulturmediums nach 24-stündiger Inkubation mit 0,1; 1 bzw. 10 mM L-Ornithin HCl bestimmt. Die vergleichenden Untersuchungen wurden mit äquimolaren Mengen L-Arginin HCl, D-Arginin HCl bzw. L-Citrullin durchgeführt. Alle verwendeten Substanzen wurden in Vorexperimenten auf ihre *In-vitro*-Toxizität untersucht und in sicher untoxischen Konzentrationen eingesetzt.

#### 3.6.1 Zellkultivierung und Inkubation

Die absorptionsphotometrische Bestimmung von Harnstoff mittels Urease-Reaktion erfordert in der Zellkultur den Einsatz von Medien mit geringer Eigenextinktion im verwendeten Spektralbereich von 334 bis 365 nm. In Voruntersuchungen konnte gezeigt werden, daß der dem Medium (DMEM) zugesetzte pH-Indikator Phenolrot aufgrund seiner Eigenextinktion die Harnstoff-Bestimmung mittels Urease-Reaktion stört. Aus diesem Grund erfolgte abweichend zu den anderen Zellkulturexperimenten die Kultivierung nativer Keratinozyten in Phenolrot-freiem Medium (DMEM). Die Einsaat und Kultivierung der nativen Keratinozyten erfolgte hierfür in Kulturschalen ( $\varnothing = 60$  mm). Nach Erreichen einer 70-80 %igen Konfluenz erfolgte die Inkubation mit den Testsubstanzen in Phenolrot-freiem DMEM (ohne FKS) (Kap. 3.2.3). Nach 24 Stunden wurden das Medium separiert und die Zellen zur Bestimmung der Zellzahl (CellCoulter<sup>®</sup>, Kap. 3.2.5) durch 10 min Trypsinierung (1 ml Trypsin-EDTA) bei 37 °C geerntet (Kap. 3.2.4). Das abgenommene Kulturmedium wurde zentrifugiert (20 min bei 4.000 rpm) und vom Überstand die Probe (1,5 ml) in ein Eppendorf-Tube überführt und zur Protein-De-naturierung erhitzt (10 min bei 95 °C). Nach erneuter Zentrifugation der Proben (10 min bei

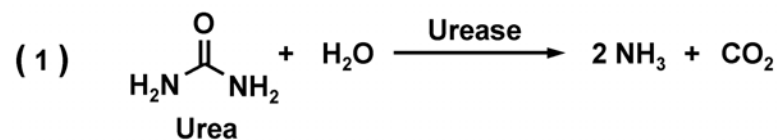
13.000 rpm) wurde der Überstand bei Raumtemperatur im Urease-Test eingesetzt (Volumen 100 µl, Dreifachbestimmung).

### 3.6.2 Harnstoff-Nachweis im Kulturmedium (Urease-Methode)

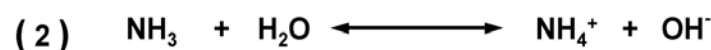
Der quantitative Harnstoff-Nachweis im Medium erfolgte nach der Urease-Methode (Kap. 2.2.2) unter Verwendung des Urea/Ammoniak-Kit (UV-Test) von R-Biopharm®.

Das Prinzip der Urease-Methode basiert auf folgenden Reaktionen [6]:

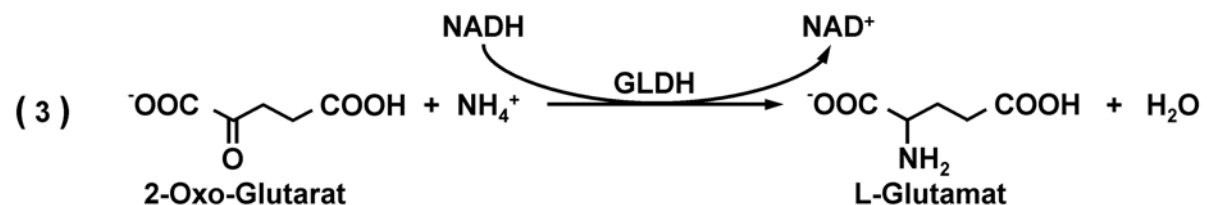
Harnstoff wird in Gegenwart des Enzyms Urease zu Ammoniak und Kohlendioxid metabolisiert:



Aus Ammoniak bildet sich im wässrigen Milieu ein Ammonium-Ion:



Dieses kann mit 2-Oxoglutarat in Gegenwart von Glutamat-Dehydrogenase (GLDH) unter Oxidation von reduziertem Nicotinamidadenindinucleotid (NADH) zu L-Glutamat umgesetzt werden:



Dabei werden NADH und Ammoniak äquimolar umgesetzt. Die Oxidation von NADH lässt sich absorptionsphotometrisch bestimmen, da das reduzierte NADH eine höhere Absorption im Bereich von 334 bis 365 nm besitzt. Der Extinktionsabfall ist proportional zum NADH-Umsatz und ermöglicht somit eine quantitative Bestimmung sowohl des NADH-Umsatzes als auch der Menge des gebildeten Ammoniaks. Um den Gehalt an Harnstoff zu bestimmen wurden die Proben einmal mit Zusatz von Urease, Urease(+), und einmal ohne Zusatz, Urease(-), vermessen. Aus der Differenz des gemessenen Ammoniak-Gehalts der so umgesetzten Proben lässt sich die Harnstoff-Menge in der Probe bestimmen.

Die Proben wurden gegen einen Blank (Phenolrot-freies DMEM) vermessen. Die Extinktionsdifferenz  $\Delta E$  der Proben wurde durch:

$$\Delta E = [ E_{\text{Probe}}(120\text{min}) - E_{\text{Probe}}(0\text{min}) ] - [ E_{\text{Blank}}(120\text{min}) - E_{\text{Blank}}(0\text{min}) ]$$

bestimmt. Aus der Differenz der Extinktionsänderungen der Urease(+) - und Urease(-) – Probe läßt sich der Harnstoff-Anteil am NADH-Umsatz berechnen:

$$\Delta E_{\text{Harnstoff}} = \Delta E_{\text{Urease}(+)} - \Delta E_{\text{Urease}(-)} = \Delta E_{\text{Harnstoff+Ammoniak}} - \Delta E_{\text{Ammoniak}}$$

Zur Ermittlung der Harnstoff-Konzentration der Proben wurde ein Harnstoff-Standard aus dem linearen Messbereich (0,15 mM Harnstoff in Phenolrot-freiem DMEM, vgl. Abb. 4.3-1) mitgeführt. Die Vermessung der Proben erfolgte in einer 96er MTP.

Folgende Reagenzien wurden eingesetzt:

- (1) NADH-Lösung: NADH (0,4 mg/ml) gelöst in Triethanolamin-Puffer (pH 8,0; 2-Oxoglutarat (3,6 mg/ml))
- (2) Urease-Lösung: wässrige Urease-Lösung (ca. 5 U/ml)
- (3) GLDH-Lösung: wässrige GLDH-Lösung (ca. 40 U/ml)
- (4) Enzym-Gemisch I: Urease-Lösung : GLDH-Lösung = 1 : 1
- (5) Enzym-Gemisch II: GLDH-Lösung : Aqua purificata = 1 : 1

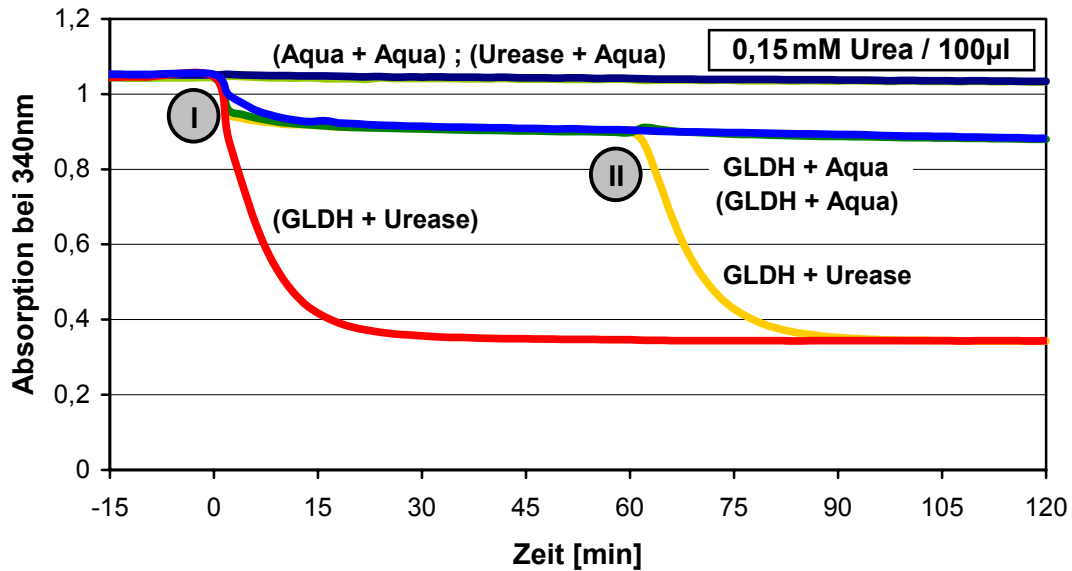
Zu Beginn wurde in die zu vermessenden Wells je 75 µl der NADH-Lösung gegeben. Danach erfolgte der Probenauftrag (100 µl, Dreifachbestimmung) nach folgendem Schema:

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	
A	0	0,15	P0_1	P0_2	P0_3	P1_1	P1_2	P1_3	P2_1	P2_2	P2_3	P3_1	Urease(+)
B	0	0,15	P0_1	P0_2	P0_3	P1_1	P1_2	P1_3	P2_1	P2_2	P2_3	P3_1	
C	0	0,15	P0_1	P0_2	P0_3	P1_1	P1_2	P1_3	P2_1	P2_2	P2_3	P3_1	
D	P3_2	P3_2	P3_2	P3_3	P3_3	P3_3							
E	0	0,15	P0_1	P0_2	P0_3	P1_1	P1_2	P1_3	P2_1	P2_2	P2_3	P3_1	Urease(-)
F	0	0,15	P0_1	P0_2	P0_3	P1_1	P1_2	P1_3	P2_1	P2_2	P2_3	P3_1	
G	0	0,15	P0_1	P0_2	P0_3	P1_1	P1_2	P1_3	P2_1	P2_2	P2_3	P3_1	
H	P3_2	P3_2	P3_2	P3_3	P3_3	P3_3							

**Abb. 3.6-1** Beispiel für den Probenauftrag bei der Harnstoff-Bestimmung in 96er MTP

Es wurde die Absorption E(0 min) bei 340 nm vermessen. Nach Zugabe von 40 µl Enzym-Gemisch I in die Wells der Urease(+) - Proben bzw. 40 µl Enzym-Gemisch II in die Wells der Urease(-) - Proben wurde der zeitliche Verlauf der Absorption E(t) bei 340 nm bis zur Einstellung konstanter Absorptionswerte (ca. 120 min) gemessen (Abb. 3.6-2).

Zur Auswertung wurde die Gesamtmenge an Harnstoff in den Proben anhand des mitgeführten Harnstoff-Standards unter Verwendung des Lambert-Beer'schen Gesetzes [1] berechnet und auf die Zellzahl der Probe bezogen [nmol/Mio. Zellen].



**Abb. 3.6-2** Exemplarische Darstellung der Absorptionsänderung (340 nm) bei der Harnstoff-Bestimmung nach der Urease-Methode (75 µl NADH)

I = Enzym-Zugabe 1: (Aqua+Aqua), (Urease+Aqua), (GLDH+Urease),  
(GLDH+AQUA) bzw. GLDH

II = Enzym-Zugabe 2: Urease bzw. Aqua

### 3.7 Westernblot-Untersuchungen zur Arginase- und ODC-Expression

Der Einfluß von L-Ornithin HCl auf die Expression der Enzyme Arginase und Ornithin-Decarboxylase (ODC) in nativen Keratinozyten wurde mittels Westernblot untersucht.

#### 3.7.1 Zellkultivierung und -aufschluß

Es wurden native Keratinozyten in Kulturschalen bei 70-80 %iger Konfluenz mit L-Ornithin HCl (0; 1; 5; 10; 20 mM) für 24 Stunden inkubiert. Anschließend wurden die Zellen gemerzt (Kap. 3.2.5) und für die Proteinbestimmung 1 Mio. Zellen in 100 µl SDS-Puffer überführt und aufgeschlossen (3 min Ultraschall-Behandlung, 10 min Erhitzen bei 95 °C). Der Proteingehalt der auf Raumtemperatur abgekühlten Suspension (Rohextrakt) wurde nach der Methode von LOWRY [2] bestimmt. 20 µg der Proben wurden in der SDS-Polyacryl-Gelelektrophorese (PAGE) eingesetzt.

### 3.7.2 Proteinbestimmung

Um quantitative Aussagen zur Expression eines Proteins mittels Westernblot treffen zu können müssen äquivalente Gesamt-Protein-Mengen eingesetzt werden. Die Proteinbestimmung erfolgte nach der Methode von LOWRY [2] (Protein-Assay-Kit, Sigma-Aldrich®).

Es wurden 10 µl der aufgeschlossenen Proben mit Aqua purificata ad 1 ml zur Protein-Bestimmung verwendet. Die 1:100 verdünnten Proben-Lösungen wurden unter Mitführung eines Proteinstandards (50 – 400 µg/ml) gegen Aqua bidest. (Blank) vermessen. Zu den Proben wurden jeweils 100 µl DOC-Lösung gegeben und 10 min bei Raumtemperatur inkubiert. Anschließend wurden die Proteine mit 100 µl Trichloressigsäure (72 % m/v) gefällt und abzentrifugiert (5 min, 10.000 rpm). Das Pellet wurde in 1 ml Lowry-Reagenz (+ 1 ml Aqua bidest.) aufgenommen und bei Raumtemperatur 20 min inkubiert. Nach Zugabe von 0,5 ml Folin & Ciocalteu's Phenol Reagenz und 30-minütiger Inkubation im Dunkeln wurden die Proben zur Vermessung der Extinktion bei 690 nm in 96er MTP überführt (Dreifachbestimmung, Probenvolumen 200 µl). Die Bestimmung der Proteinkonzentrationen erfolgte anhand der mitgeführten Proteinstandards unter Verwendung des Lambert-Beer'schen Gesetzes [1].

### 3.7.3 SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese

Die Ladung eines Proteins ist abhängig von der Aminosäure-Sequenz und dem pH-Wert. Um konstante Bedingungen für die elektrophoretische Auftrennung zu schaffen und Unterschiede in der Ladungsdichte der Proteine auszugleichen erfolgte die Auftrennung in einem SDS-Gel [104]. Das amphiphile Natriumdodecylsulfat (SDS) bildet mit den Proteinen einen Komplex mit negativer Oberflächen-Ladung. Die Eigenladung des Proteins wird kupiert und ein konstantes Ladung/Masse-Verhältnis erreicht. Dies ermöglicht die gelelektrophoretische Auftrennung der Protein-Proben nach dem Molekulargewicht und die spätere Zuordnung der Westernblot-Banden.

**Tab. 3.7-1** SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese

	<b>Sammelgel</b>	<b>Trenngel (10%)</b>
Aqua bidest.	2,5 ml	5 ml
Sammelgel-Puffer	1 ml	-
Trenngel-Puffer	-	2,5 ml
Acrylamid (38 %)	0,5 ml	3,0 ml
TEMED	5 µl	5 µl
APS (10 %)	36 µl	75 µl

Mit Hilfe der vertikalen Gelelektrophorese wurden die einzelnen Proteine in einem 10 %igen SDS-Polyacrylamid-Gel (Tab. 3.7-1) aufgetrennt. Zur Identifikation der Proteinbanden wurde ein Protein-Marker mitgeführt (29; 45; 66; 97,4; 116 und 205 kDa, Sigma-Aldrich Chemie GmbH). Es wurden jeweils 20 µg der Proteinproben mit 5 µl SDS-Probenpuffer versetzt und in die Geltaschen gegeben. Die elektrophoretische Auftrennung erfolgte in zwei Stufen (Einbringen ins Sammelgel: 80 V, 20 min; Auftrennung der Proteine: 120 V, 150 min).

### 3.7.4 Westernblot-Analyse

Der Protein-Transfer der im SDS-Gel aufgetrennten Proteinproben auf die Nitrocellulose-Membran (Porengröße 0,45 µm) erfolgte semi-dry im „Sandwich“-Verfahren. Zwischen jeweils drei Westernblot-Puffer-getränkten Whatman-Papieren wurde das SDS-Gel luftblasenfrei auf eine vorbehandelte Nitrocellulose-Membran (Westernblot-Puffer getränkt, 90 sek bei 100 °C erhitzt) gelegt. Der Blot erfolgte in einer Blot-Apparatur über 90 min bei einem mittleren Stromfluß von 1 mA/cm<sup>2</sup>.

Zur Detektion der Protein-Marker-Banden wurde die geblottete Membran mit 2 %iger Ponceau-Lösung gefärbt. Nach mehreren Waschschritten (1xTBS) wurde die Nitrocellulose-Membran über Nacht mit Blocking-Reagenz (1xTBS + 5 % Magermilchpulver) bei leichtem Schütteln inkubiert. Nach Entfernung der Blocking-Reagenz wurde die Membran mit dem primären Antikörper (polyklonal Rabbit-anti-human Arginase; 1:1.000 bzw. polyklonal Rabbit-anti-human ODC; 1:1.000 in 1xTBS + 5 % Magermilchpulver + 0,05 % Natriumazid) zwei Stunden inkubiert (Raumtemperatur, leichtes Schütteln). Anschließend wurde die Membran mehrfach intensiv gewaschen (1xTBS), bevor sie mit dem sekundären Antikörper (Mouse-anti-Rabbit-IgG, Peroxidase-konjugiert; 1:2.000 in 1xTBS) für eine Stunde bei Raumtemperatur inkubiert wurde. Nachdem die Membran erneut intensiv gewaschen wurde (1xTBS) erfolgte die Detektion der spezifischen Proteinbanden mittels Peroxidase-vermittelter (sekundärer Antikörper) Chemilumineszenz unter Umsetzung von ECL<sup>®</sup>-Detection-Reagenz. Es folgte die Exposition auf einen Röntgenfilm. Nach Entwicklung und Fixierung wurde der Röntgenfilm gescannt und die spezifischen Proteinbanden densitometrisch mit Hilfe der digitalen Bildverarbeitung (ImageMaster<sup>®</sup>) analysiert.

### 3.8 *In-vivo*-Untersuchungen am HET-CAM

#### 3.8.1 Kultur und Präparation der Hühnereier

Für die HET-CAM-Versuche wurden Hühnereier der Rasse „New Hampshire“ verwendet, die am Legetag durch das Nutztierwissenschaftliche Zentrum Merbitz der Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg bereitgestellt wurden. Nach dem Transport wurden die Eier über acht Tage bei 37 °C und 55 % Luftfeuchtigkeit in einem Brutschrank bebrütet. Alle 12 Stunden wurden die Eier gewendet, ausgenommen die letzten 24 Stunden. Nach Ablauf der Brutzeit wurden die Eier am schwächer konvexen Pol geöffnet ( $\varnothing \approx 1,5$  cm). Die Chorio-Allantois-Membran (CAM) wurde mikrochirurgisch unter Entfernung der äußeren Eihaut freigelegt. Für die Untersuchungen wurden nur Eier mit gut ausgebildetem Gefäßnetz der CAM verwendet. Um konstante Versuchsbedingungen zu erreichen, wurden die Eier vor dem Versuchsbeginn abgedeckt und für eine weitere Stunde im Brutschrank bebrütet. Anschließend wurden die Eier erneut auf Vitalität sowie Membran- und Kapillarschädigungen untersucht. Nur die intakten Eier wurden weiter verwendet.

Die Applikation von L-Ornithin HCl erfolgte durch Auftrag von 100  $\mu$ l [88, 120] einer wässrigen Lösung (0; 5; 10; 25; 50; 100 und 1.000 mM in PBS) auf die Chorio-Allantois-Membran. Die Experimente wurden an jeweils 12 Eiern durchgeführt.

#### 3.8.2 Bestimmung von Vitalität, Membranverfärbung und Hämorrhagie

Das Ausmaß toxisch-irritativer Wirkungen von L-Ornithin HCl wurde durch die Parameter Vitalität, Membranverfärbung und Hämorrhagie erfaßt.

Dabei wurde die Lyse sowie das Transparentwerden von Gefäßen nach 10 min, 30 min bzw. 24 h als Membranverfärbung gewertet [71, 110, 111]. Es wurden vier Kategorien unterschieden. Vereinzelt transparente Kapillarabschnitte wurden als leichte, die Transparenz von ganzen Kapillaren als mittlere und das Auftreten von Lysen als schwere Membranverfärbungen bewertet [120]. Die Hämorrhagie wurde entsprechend des Ausmaßes von Erythrozytenextravasaten ebenfalls nach einer Applikationszeit von 10 min, 30 min bzw. 24 h in vier Kategorien halbquantitativ beurteilt [120]. Einzelne Kapillarblutungen bei morphologisch intakten Kapillaren wurden als leichte, multiple Kapillarblutungen bei morphologisch intakten Kapillaren als mittlere und morphologisch geschädigte Kapillaren mit Kapillar- oder Massenblutungen als schwere Hämorrhagien eingestuft [120].

Die Vitalität wurde in einem Zeitraum bis 24 Stunden nach Applikation erfaßt. Dabei galt der Embryo als avital, wenn lichtmikroskopisch kein Blutfluß in den Kapillaren meßbar, keine Herzbewegungen erkennbar oder eine Eiweißgerinnung bzw. Thrombosierung auf dem überwiegenden Anteil der CAM nachweisbar waren. Die Auswertung aller Parameter erfolgte anhand der Verteilung der Merkmalsausprägung in den einzelnen Populationen.



### 3.8.3 Laser-Doppler-Fluxmetrie am HET-CAM-Modell

Zur Erfassung des irritativ-toxischen, vasoaktiven Effekts [8, 90] von L-Ornithin im *In-vivo*-HET-CAM-Modell wurde mittels Laser-Doppler-Fluxmetrie (LDF) der Blutfluß in den Kapillaren der Chorio-Allantois-Membran (CAM) bestimmt. Die Messung erfolgte mit einem Helium-Neon Laser (632,8 nm).

Zur Bestimmung des Laser-Doppler-Flux der basalen Perfusion,  $LDF(t_0)$ , wurden die präparierten Eier vor Wirkstoff-Applikation bei Raumtemperatur für ca. 10 min vermessen. Der kapilläre Blutfluß nach L-Ornithin-HCl-Applikation wurde über 30 min gemessen,  $LDF(t_x)$ . Der relative Flux, rel.  $LDF(t_x)$ , ergibt sich aus:

$$\text{rel. LDF}(t_x) = \frac{LDF(t_x)}{LDF(t_0)}$$

Anhand der Änderung der mittleren kapillären Perfusion lässt sich die irritativ-toxische, vasoaktive Potenz von L-Ornithin HCl einschätzen.

### 3.9 Herstellung L-Ornithin-HCl-haltiger topischer Präparationen

Die Herstellung L-Ornithin-HCl-haltiger halbfester Zubereitungen erfolgte in der Universitätsapotheke der Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg durch einen Apotheker. Als Vehikelsysteme für die L-Ornithin-HCl-haltigen Präparationen wurden eingesetzt:

**Tab. 3.9-1** verwendete Vehikelsysteme L-Ornithin-HCl-haltiger topischer Präparationen

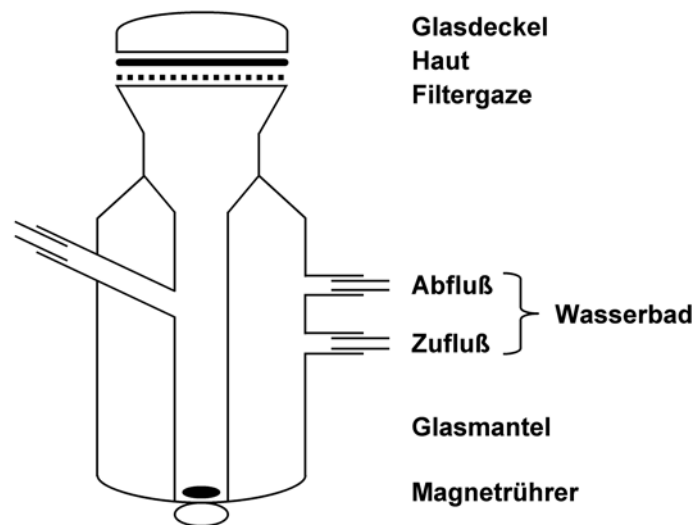
Zubereitung	Vehikelsystem
Hydrophil	Wasserhaltige Hydrophile Salbe (DAB 2002, [4])
Amphiphil	Basiscreme DAC [5]
Lipophil	Wasserhaltige Wollwachsalkoholsalbe (DAB 2002, [4])

L-Ornithin HCl wurde zu 10 % (m/m) in die halbfesten Präparationen eingearbeitet. Es wurden nur frisch hergestellte Zubereitungen in den Experimenten verwendet.

### 3.10 Penetrationsuntersuchungen an humaner Haut *ex vivo*

Die topische Anwendbarkeit L-Ornithin-HCl-haltiger Externa wurde präklinisch durch Penetrationsversuche an humaner Haut *ex vivo* untersucht. Dabei wurde ein Konzentrations-Zeit-Profil der Wirkstoffverteilung im Gewebe in Abhängigkeit vom Vehikelsystem erstellt.

Zur Charakterisierung des Penetrationsverhaltens von L-Ornithin aus 10 %igen Zubereitungen (Kap. 3.9) in humane Haut wurde das *In-vitro*-Modell der Diffusionszelle nach FRANZ gewählt. Die Auswahl des Modells stützte sich auf die Erfahrungen der Autoren, die korrelierende Ergebnisse zwischen den *In-vitro*-Daten des Modells und *In-vivo*-Resultaten feststellen konnten [44, 48].



**Abb. 3.10-1** Aufbau der FRANZ'schen Diffusionszelle (Franz, 1975 [48])

Der Aufbau der FRANZ'schen Diffusionszelle ist schematisch in Abb. 3.10-1 dargestellt. Der Grundkörper besteht aus einem doppelwandigen, temperierbaren Glaszylinder. Darin befindet sich die durch Röhren ständig in homogenem Zustand gehaltene Akzeptorflüssigkeit (0,9 % NaCl-Lösung). Im direkten Kontakt zum Akzeptor liegt das Probenmaterial auf einer Gaze, die durch einen Glasring und eine Metallklammer stabilisiert wird. Eine Glasbedeckung dient als Verdunstungsschutz zur Einhaltung weitgehend konstanter Hydratationsbedingungen während des Untersuchungszeitraumes.

Das Einkammersystem, wie es die FRANZ'sche Diffusionszelle darstellt, bietet für Penetrationsuntersuchungen von Wirkstoffen an exzidiierter humaner Haut den Vorteil, daß es nicht an die Verwendung von „unendlich“ großen Wirkstoffmengen in überdimensionierten Donatoren (*infinite dose*-Technik) gebunden ist [49]. So konnte bei den Experimenten zur Penetration von L-Ornithin in humane Haut *ex vivo* eine pharmakologisch relevante Konzentration von 10 % Arzneistoff (20 mg Salbe) aufgetragen werden (*finite dose*-Technik).

Die Untersuchungen wurden an gesunder, humaner Haut durchgeführt. Die Präparate wurden bei Mamma-Reduktionsplastiken gewonnen, postoperativ mit isotoner NaCl-Lösung ge-

säubert und das subkutane Fettgewebe abpräpariert. Aus der aufbereiteten Haut wurden Stanzen entnommen ( $\varnothing = 20\text{mm}$ ) und bis zur weiteren Verwendung luftdicht bei  $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$  für maximal drei Monate gelagert.

Zur Testung klinisch relevanter Dosierungen haben sich in der Dermatopharmazie  $2\text{-}5\text{ mg/cm}^2$  für halbfeste bzw.  $5\text{-}7\text{ }\mu\text{l/cm}^2$  für flüssige Formulierungen als günstig erwiesen [118]. Dieser Empfehlung wurde durch die Applikation von  $20\text{ mg} / 3,14\text{ cm}^2$  für die Emulsionssysteme entsprochen.

Zur Detektion des in das Gewebe penetrierten L-Ornithins wurde [ $^3\text{H}$ ]-markiertes L-Ornithin (L-Ornithin-[ $2,3\text{-}^3\text{H}$ ], Sigma) mit einer spezifischen Aktivität von  $38\text{ Ci/mol}$  in die halbfesten Zubereitungen eingearbeitet ( $1\text{ }\mu\text{Ci/mg}$  Vehikel). Das zugrunde liegende Modell des indirekten Wirkstoff-Nachweises geht davon aus, daß unter *Ex-vivo*-Bedingungen bei der Wirkstoff-Penetration keine nennenswerte Metabolisierung des Wirkstoffes stattfindet [88].

Die Messungen erfolgten an Hautproben von drei Spendern, wobei jede Hautprobe in drei separaten Testpräparationen untersucht wurde. Um Informationen über das Penetrationsausmaß des Wirkstoffes im Kurzzeit- als auch im Langzeitbereich zu erhalten, wurde die L-Ornithin-Konzentration im Gewebe nach 30-, 300- bzw. 1.000-minütiger Wirkstoff-Applikation bestimmt. Dazu wurde im folgenden eine Unterscheidung der Vehikelsysteme anhand der ermittelten Wirkstoff-Konzentrationen in den einzelnen Hautschichten Stratum corneum, Epidermis und Dermis getroffen.

### **Durchführung:**

Das vollständig aufgetaute Probenmaterial wurde auf die Gaze der FRANZ'schen Diffusionszelle platziert und die Oberfläche mit einem Wattestäbchen gesäubert und getrocknet. Danach wurden  $20\text{ mg}$  der L-Ornithin-Zubereitungen appliziert und homogen verteilt. Die Proben wurden nun in die vorgewärmte Diffusionszelle ( $32\text{ }^{\circ}\text{C}$ , entspricht physiologischer Hauttemperatur) gespannt, so daß die Hautunterseite mit der Gaze direkten Kontakt zum Akzeptor hatte. Der Akzeptor dient der Aufnahme und Verdünnung des vollständig permeierten Wirkstoffanteils und simuliert somit physiologische Verhältnisse. Nach Ablauf der jeweiligen Applikationszeit wurde die Hautprobe der Diffusionszelle entnommen und die nicht-penetrierten Anteile der Präparation mit einem Wattestäbchen vorsichtig von der Oberfläche entfernt. Zur Untersuchung des Penetrationsprofils erfolgte eine schichtweise Auftrennung der Haut-Präparate parallel zur Epidermis nach folgendem Schema:

- |                                 |                                                                           |
|---------------------------------|---------------------------------------------------------------------------|
| - nicht-penetrierter Wirkstoff: | Tupfer                                                                    |
| - Stratum corneum:              | 20 Tesafilm-Abrisse                                                       |
| - vitale Epidermis:             | 4-10 Mikrotomschnitte ( $20\text{ }\mu\text{m}$ ), je nach Epidermisdicke |
| - Corium:                       | 15 Mikrotomschnitte ( $80\text{ }\mu\text{m}$ ) + Reststumpf              |
| - permeierter Wirkstoff:        | Akzeptorflüssigkeit                                                       |

Die schichtweise Entfernung der Hornschicht erfolgte durch 20 Tesafilm-Abrisse. Unter Verwendung einer Schablone (kreisrundes Fenster,  $\varnothing = 16 \text{ mm}$ ) konnte das Stratum corneum einer definierten Fläche ( $2,0106 \text{ cm}^2$ ) gewonnen werden. Jeweils zwei aufeinanderfolgende Abrisse wurden für die weiteren Messungen zusammengefaßt. Aus dem Zentrum der verbliebenen Epidermis wurden drei Hautzylinder ( $\varnothing = 6 \text{ mm}$ ) gestanzt und im Gefriermikrotom bei  $-40 \text{ }^\circ\text{C}$  horizontal zur Epidermis nach angegebenem Schema geschnitten. Die so erhaltenen Hautfraktionen wurden einzeln in Szintillationsröhrchen überführt und zur Gewebeauflösung mit jeweils  $0,2 \text{ ml}$  Soluene 350 für 12 Stunden bei Zimmertemperatur inkubiert. Anschließend wurden die Proben mit  $1 \text{ ml}$  Methanol versetzt. Für die Messung im WinSpectral 1414 Liquid-Szintillation-Counter wurden  $2 \text{ ml}$  Szintillatorflüssigkeit zu jeder Probe hinzugegeben. Die Proben wurden gegen die Eigenszintillation der Szintillatorflüssigkeit vermessen und als desintegration per minute (dpm) erfaßt. Anhand mitgeführter Wirkstoffproben bekannter Radioaktivität konnte die Auswertung in  $\mu\text{Ci}$  erfolgen.

Zur Auswertung wurde die Konzentration des penetrierten L-Ornithins [ $\text{mM}$ ] in den einzelnen Hautfraktionen berechnet. Es erfolgte ein Vergleich der Penetrationsraten aus den verschiedenen Vehikelsystemen in Abhängigkeit von der Applikationszeit.

### 3.11 Statistik

Die statistische Auswertung der Daten erfolgte mit Hilfe der Software Sigma-Stat 1.0 und SPSS 10.0.5 (Scheffé-Test). Unterschiede wurden als statistisch signifikant bewertet, wenn die Irrtumswahrscheinlichkeit  $p \leq 0,05$  betrug.

Die deskriptive Statistik wurde aus den Ergebnissen der unabhängigen Einzelexperimente berechnet und unter Verwendung des Mittelwertes, als Maß für die durchschnittliche Meßwertgröße, und der Standardabweichung, als Maßzahl der Streuung der Meßergebnisse, dargestellt.

Zum statistischen Vergleich von drei und mehr unabhängigen Stichproben einer normalverteilten Population mit gleicher Varianz wurde in dieser Arbeit die einfache Varianzanalyse (One-Way ANOVA) verwendet. Die statistische Auswertung der Ergebnisse nicht normalverteilter Grundgesamtheiten erfolgte unter Verwendung des parameterfreien Kruskal-Wallis Tests (One-Way-Analysis of Variance on Ranks).

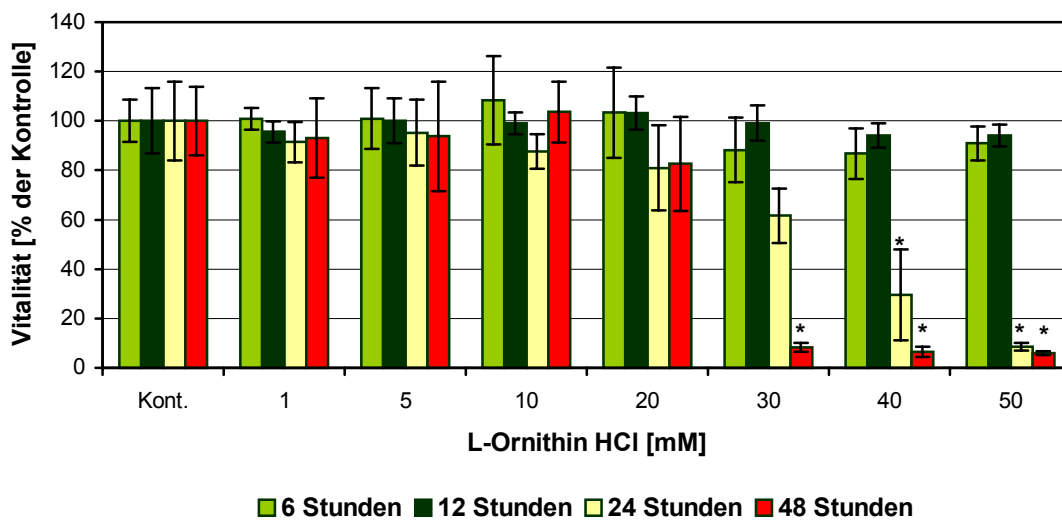
Die statistische Auswertung der vergleichenden Untersuchungen zur Beeinflussung der keratinozytären Harnstoff-Synthese erfolgte anhand der zweifaktorielle Varianzanalyse mit Interaktion nach dem post-hoc-Modell von Scheffé.

## 4 Ergebnisse

### 4.1 Untersuchungen zum Einfluß von L-Ornithin HCl auf die Vitalität und die Proliferation humaner Keratinozyten

#### 4.1.1 Einfluß von L-Ornithin HCl auf die Vitalität humaner Keratinozyten

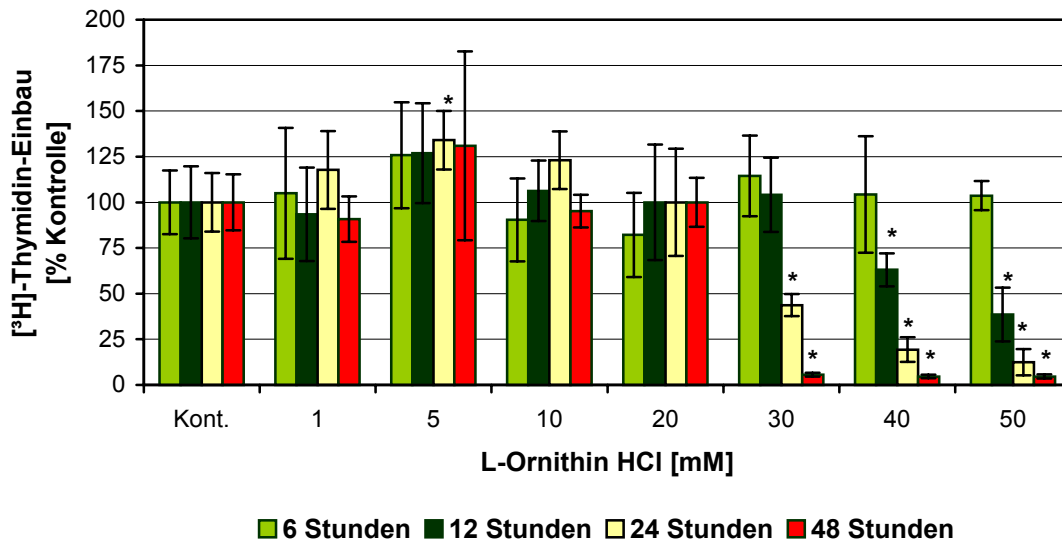
Im Vitalitätstest zeigte sich nach Inkubation mit L-Ornithin HCl bis zu einer Konzentration von 20 mM keine Änderung der Absorption bei 690 nm. Toxische Schädigungen der Zellen traten nach 24-stündiger Inkubation mit 40 mM L-Ornithin HCl auf. Es kam zu einer signifikanten Reduktion der Absorption nach Gentianaviolett-Färbung. Dieser Effekt verstärkte sich bei höheren L-Ornithin-HCl-Konzentrationen (Abb. 4.1-1) und längerer Inkubation (48 Stunden:  $\geq 30$  mM).



**Abb. 4.1-1** Vitalität nativer Keratinozyten nach Inkubation mit L-Ornithin HCl mittels Vitalfärbung (\* = signifikant vs. Kontrolle(t):  $p \leq 0,05$ ,  $n = 6$ , One-Way ANOVA)

#### 4.1.2 Einfluß von L-Ornithin HCl auf den [<sup>3</sup>H]-Thymidin-Einbau in die DNA

Die Untersuchungen zum Proliferationsverhalten nativer Keratinozyten zeigten einen vermehrten [<sup>3</sup>H]-Thymidin-Einbau nach Inkubation mit 5 mM L-Ornithin HCl (signifikant nach 24 Stunden). Bei höheren L-Ornithin-HCl-Konzentrationen kam es zu einer Reduktion der DNA-Syntheserate. Unterschiede sind nach 12-stündiger Inkubation ab 40 mM nachzuweisen. Bei längerer Inkubation ( $\geq 24$  Stunden) zeigt sich dieser suppressive Effekt bereits ab 30 mM L-Ornithin HCl (Abb. 4.1-2).



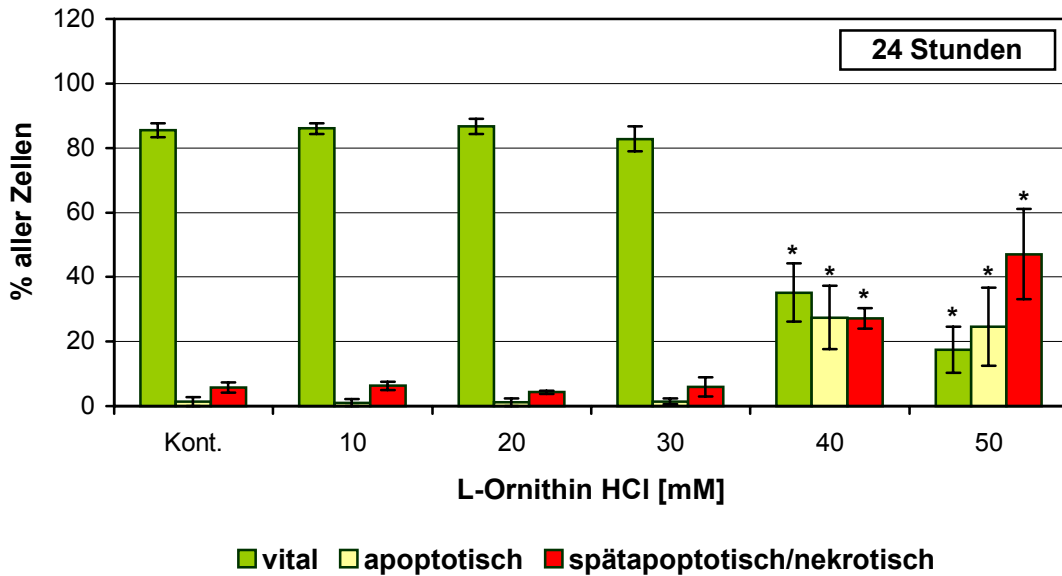
**Abb. 4.1-2** [<sup>3</sup>H]-Thymidin-Einbau nativer Keratinozyten in die DNA nach Inkubation mit L-Ornithin HCl (\* = signifikant vs. Kontrolle(t): p ≤ 0,05, n = 6, One-Way ANOVA)

## 4.2 Charakterisierung des L-Ornithin-HCl-vermittelten Zelltodes

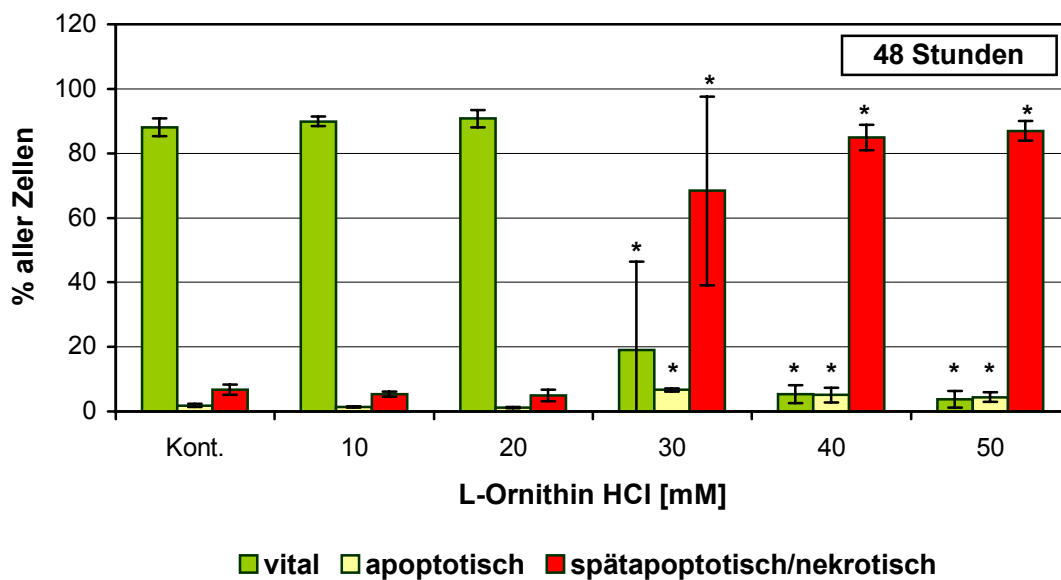
### 4.2.1 Durchflußzytometrische Untersuchung mittels Annexin V / PI

Die Beeinflussung des Apoptoseverhaltens nativer Keratinozyten durch L-Ornithin HCl zeigte in der flowzytometrischen Zweiparametermessung mit Annexin V-FITC und PI (Anhang: Abb. 7.0-1) eine Zunahme der apoptotischen und spätapoptotisch/nekrotischen Zellfraktion nach 24-stündiger Inkubation mit 40 mM L-Ornithin HCl (Abb. 4.2-1). Höhere L-Ornithin-HCl-Konzentrationen verstärkten diesen Effekt. Nach 48-stündiger Inkubation kam es bereits ab 30 mM zu dieser Zellschädigung (Abb. 4.2-2).

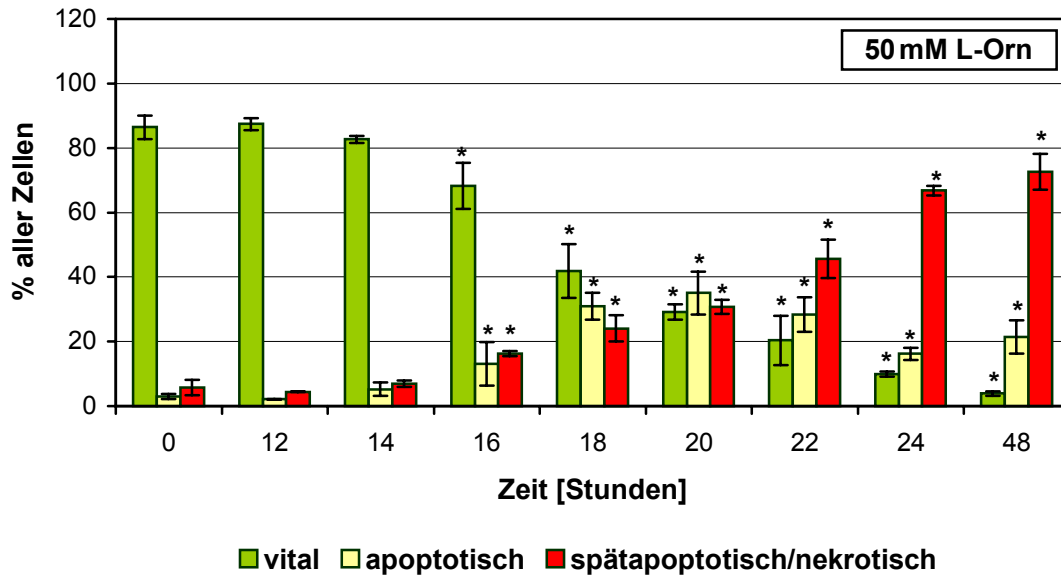
Bei der Untersuchung des zeitlichen Verlaufs des Zelluntergangs wurden native Keratinozyten mit 50 mM L-Ornithin HCl inkubiert. Nach 16-stündiger Inkubation kam es zu einer Reduktion der vitalen Zellpopulation, wobei gleichzeitig eine Zunahme in der apoptotischen und in der spätapoptotisch/nekrotischen Fraktion zu verzeichnen war. Der Anteil apoptotischer Zellen nahm im weiteren zeitlichen Verlauf zugunsten der spätapoptotisch/nekrotischen Zellen ab (Abb. 4.2-3).



**Abb. 4.2-1** Ergebnisse der flowzytometrischen Untersuchung an nativen Keratinozyten mittels Annexin V / PI nach 24-stündiger Inkubation mit L-Ornithin HCl (\* = signifikant vs. Kontrolle: n = 3,  $p \leq 0,05$ , One-Way ANOVA)



**Abb. 4.2-2** Ergebnisse der flowzytometrischen Untersuchung an nativen Keratinozyten mittels Annexin V / PI nach 48-stündiger Inkubation mit L-Ornithin HCl (\* = signifikant vs. Kontrolle: n = 3,  $p \leq 0,05$ , One-Way ANOVA)



**Abb. 4.2-3** Ergebnisse der flowzytometrischen Untersuchung an nativen Keratinozyten mittels Annexin V / PI nach Inkubation mit 50 mM L-Ornithin HCl (\* = signifikant vs. Kontrolle: n = 3,  $p \leq 0,05$ , One-Way ANOVA)

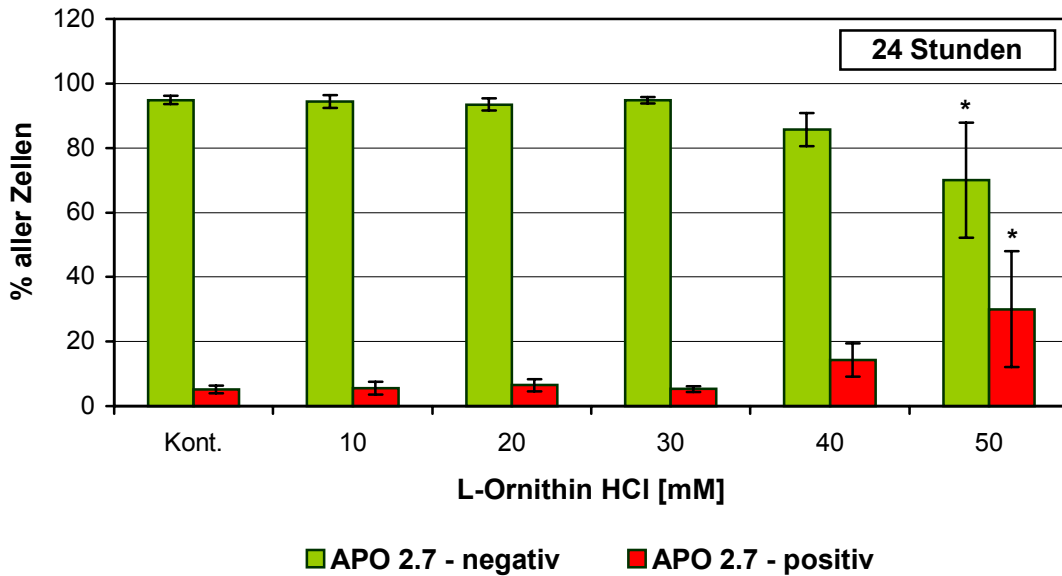
#### 4.2.2 Durchflußzytometrische Bestimmung der APO 2.7-Expression

Die flowzytometrischen Messungen der APO 2.7-Exposition an der Mitochondrienmembran nativer Keratinozyten nach Inkubation mit L-Ornithin HCl (Anhang: Abb. 7-0.1) bestätigten die in der Annexin V / PI-Doppelfärbung erhaltenen Ergebnisse einer L-Ornithin-HCl-vermittelten Apoptose-Induktion (Kap. 4.2.1).

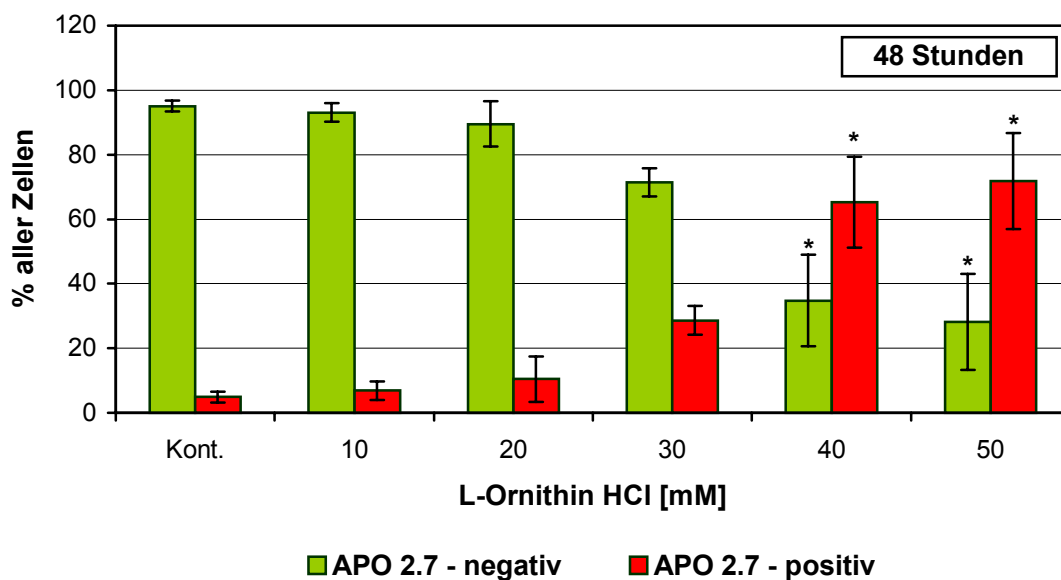
Bis zu einer Konzentration von 20 mM traten keine Veränderungen der APO 2.7-Expression auf. Nach 24-stündiger Inkubation zeigte sich ab 40 mM eine Zunahme der APO 2.7-positiven Zellfraktion (Abb. 4.2-4). Dieser Effekt trat nach 48-stündiger Inkubation mit L-Ornithin HCl bereits ab 30 mM auf (Abb. 4.2-5).

Die Inkubation mit 50 mM L-Ornithin HCl induzierte nach 22 Stunden einen Anstieg der APO 2.7-positiven Zellpopulation, der sich mit zunehmender Inkubationszeit verstärkte (Abb. 4.2-6).

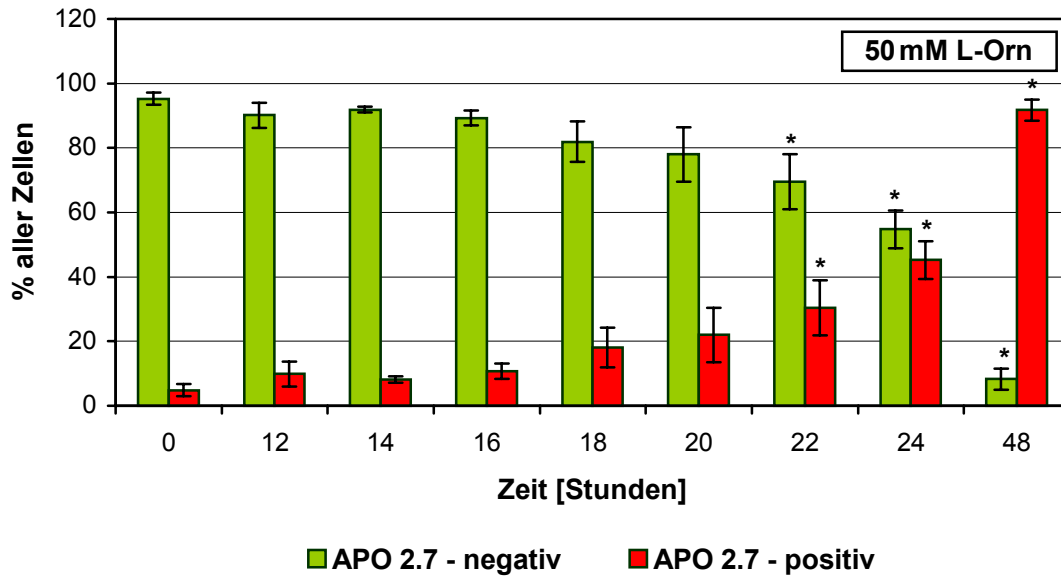




**Abb. 4.2-4** Ergebnisse der flowzytometrischen Untersuchung an nativen Keratinozyten mittels APO 2.7-Markierung nach 24-stündiger Inkubation mit L-Ornithin HCl (\* = signifikant vs. Kontrolle:  $n = 3$ ,  $p \leq 0,05$ , One-Way ANOVA)



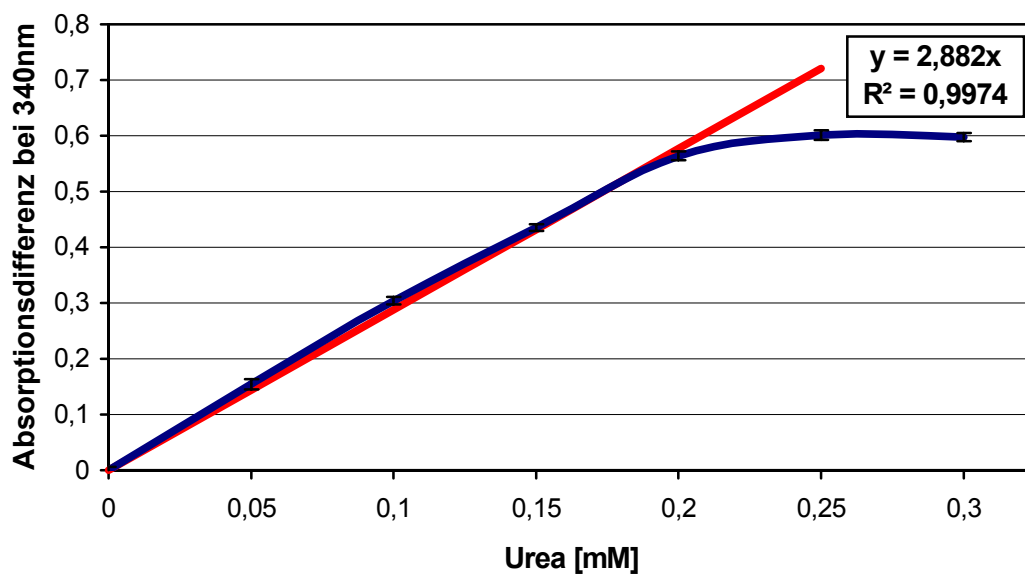
**Abb. 4.2-5** Ergebnisse der flowzytometrischen Untersuchung an nativen Keratinozyten mittels APO 2.7-Markierung nach 48-stündiger Inkubation mit L-Ornithin HCl (\* = signifikant vs. Kontrolle:  $n = 3$ ,  $p \leq 0,05$ , One-Way ANOVA)



**Abb. 4.2-6** Ergebnisse der flowzytometrischen Untersuchung an nativen Keratinozyten mittels APO 2.7-Markierung nach Inkubation mit 50 mM L-Ornithin HCl (\* = signifikant vs. Kontrolle: n = 3,  $p \leq 0,05$ , One-Way ANOVA)

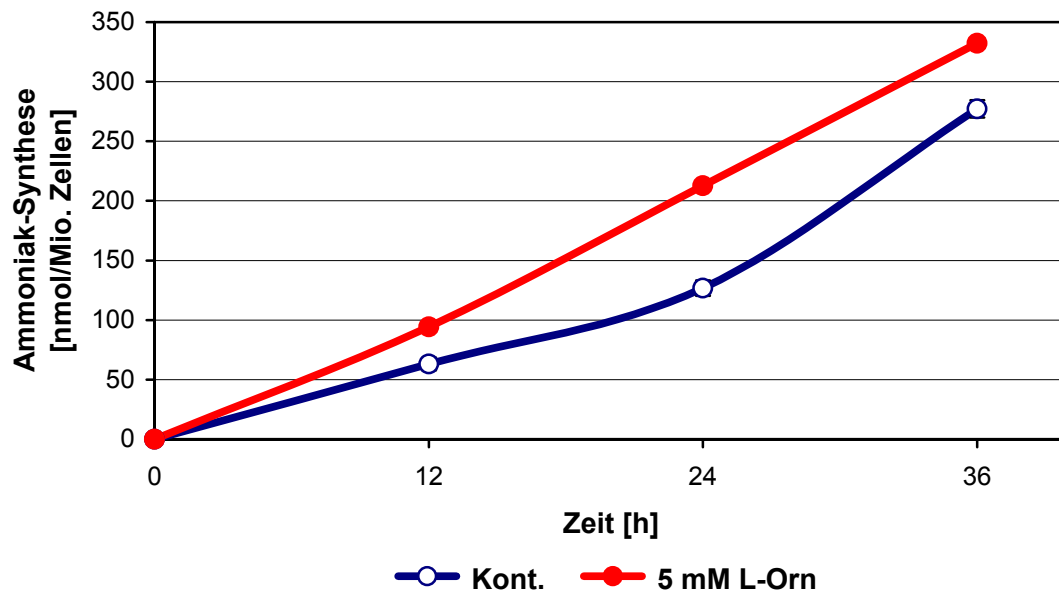
#### 4.3 Untersuchungen zur *De-novo*-Harnstoff-Synthese nativer Keratinozyten

In Vorexperimenten wurde die Urease-Methode zur Bestimmung von Harnstoff in Kulturmedien etabliert. Dabei zeigte sich, daß neben den dem Medium beigefügten Supplementen (insbesondere FKS und der pH-Indikator Phenolrot) das im Medium gelöste Ammoniak großen Einfluß auf die Messungen hat.

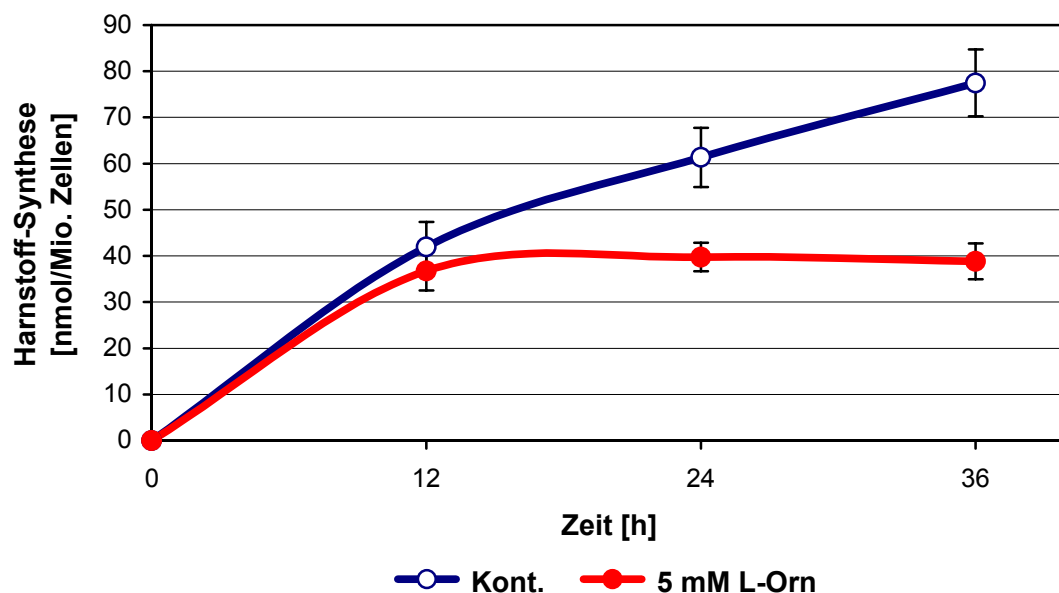


**Abb. 4.3-1** Eichkurve und lineare Regression der Harnstoff-Bestimmung nach Urease-Methode (Probenvolumen = 100  $\mu$ l, NADH = 75  $\mu$ l, Dreifachbestimmung)

Aufgrund des sehr engen linearen Meßbereiches der absorptionsphotometrischen Urease-Methode (Abb. 4.3-1) und dem mit der Inkubationszeit ansteigenden Ammoniak-Gehalt des Mediums (Abb. 4.3-2), war die Bestimmung des im Medium gelösten Harnstoffs nur bis zu einer Inkubationszeit von 36 Stunden meßtechnisch zu erfassen (Abb. 3.6-2 und 4.3-3).



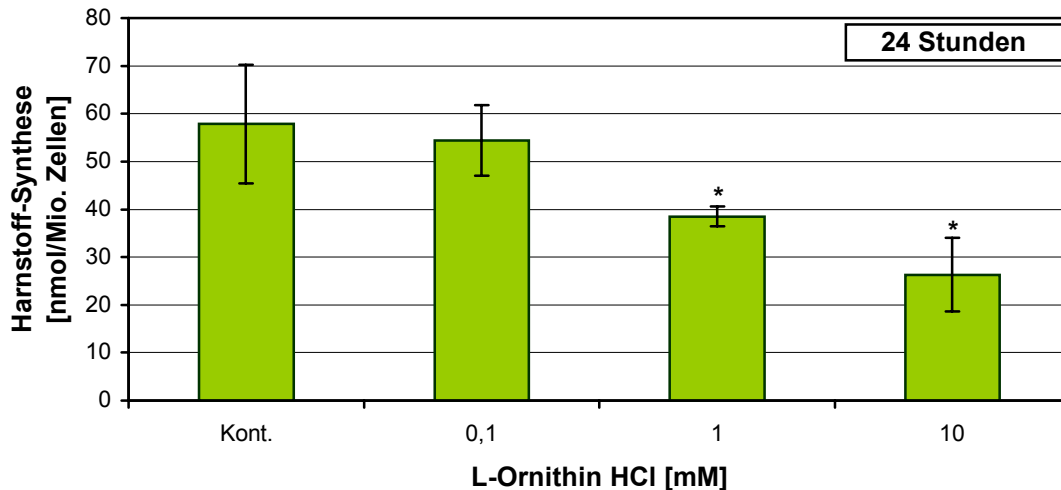
**Abb. 4.3-2** Zeitlicher Verlauf der Ammoniak-Synthese nativer Keratinozyten: Vergleich unbehandelter mit behandelten Zellen (5 mM L-Ornithin HCl), n = 3



**Abb. 4.3-3** Zeitlicher Verlauf der Harnstoff-Synthese nativer Keratinozyten: Vergleich unbehandelter mit behandelten Zellen (5 mM L-Ornithin HCl), n = 3

### 4.3.1 Einfluß von L-Ornithin HCl auf die keratinozytäre Harnstoff-Synthese

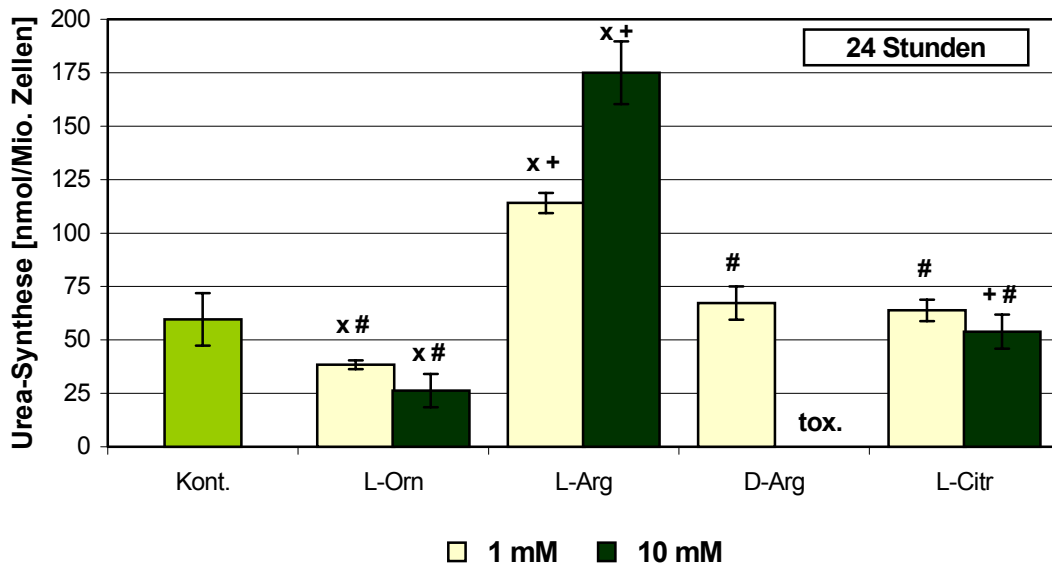
In den Untersuchungen zum Einfluß von L-Ornithin HCl auf die keratinozytäre Harnstoff-Synthese zeigte sich eine Hemmung im Vergleich zur unbehandelten Kontrolle (Abb. 4.3-4). Zur signifikanten Reduktion kam es nach 24-stündiger Inkubation ab einer L-Ornithin-HCl-Konzentration von 1 mM.



**Abb. 4.3-4** Harnstoff-Synthese nativer Keratinozyten bei 24-stündiger Inkubation mit L-Ornithin HCl (\* = signifikant vs. Kontrolle: n = 3-12,  $p \leq 0,05$ , One-Way ANOVA)

### 4.3.2 Vergleichende Untersuchung zur Beeinflussung der keratinozytären Harnstoff-Synthese

Unter *In-vitro*-Bedingungen ist die keratinozytäre Harnstoff-Synthese durch die am Harnstoff-Zyklus beteiligten Aminosäuren wechselseitig zu beeinflussen (Abb. 4.3-5 und Tab. 4.3-1). Eine deutliche Stimulation ist unter Einfluß von L-Arginin HCl festzustellen. Die Inkubation mit 1 mM L-Arginin HCl führt zu einer Verdopplung der Harnstoff-Produktion, 10 mM L-Arginin HCl bewirken einen Anstieg auf das Dreifache der basalen Synthese. Das D-chirale Enantiomer sowie L-Citrullin haben hingegen keinen meßbaren Effekt auf die keratinozytäre Harnstoff-Synthese. Eine Hemmung der enzymatischen Harnstoff-Synthese zeigt sich bei Inkubation mit L-Ornithin HCl (vgl. Kap. 4.3). Bereits ab 1 mM L-Ornithin HCl kommt es zur Reduktion der Harnstoff-Menge um ein Drittel.



**Abb. 4.3-5** Harnstoff-Synthese nativer Keratinozyten unter 24-stündiger Inkubation mit 1 bzw. 10 mM L-Orn, L-Arg; D-Arg bzw. L-Citr ( x = sign. vs. Kontrolle; + = sign. vs. L-Orn (isomolar); # = sign. vs. L-Arg (isomolar): n = 3-8 , p ≤ 0,05, Scheffé post hoc multiple comparison test), tox. = in Zellkultur toxisch

**Tab. 4.3-1** Darstellung der Ergebnisse der statistischen Auswertung (Scheffé post hoc multiple comparison Test) der vergleichenden Untersuchungen zum Einfluß von L-Ornithin HCl, L-Arginin HCl, D-Arginin HCl und L-Citrullin auf die keratinozytäre Harnstoff-Synthese (24 h)

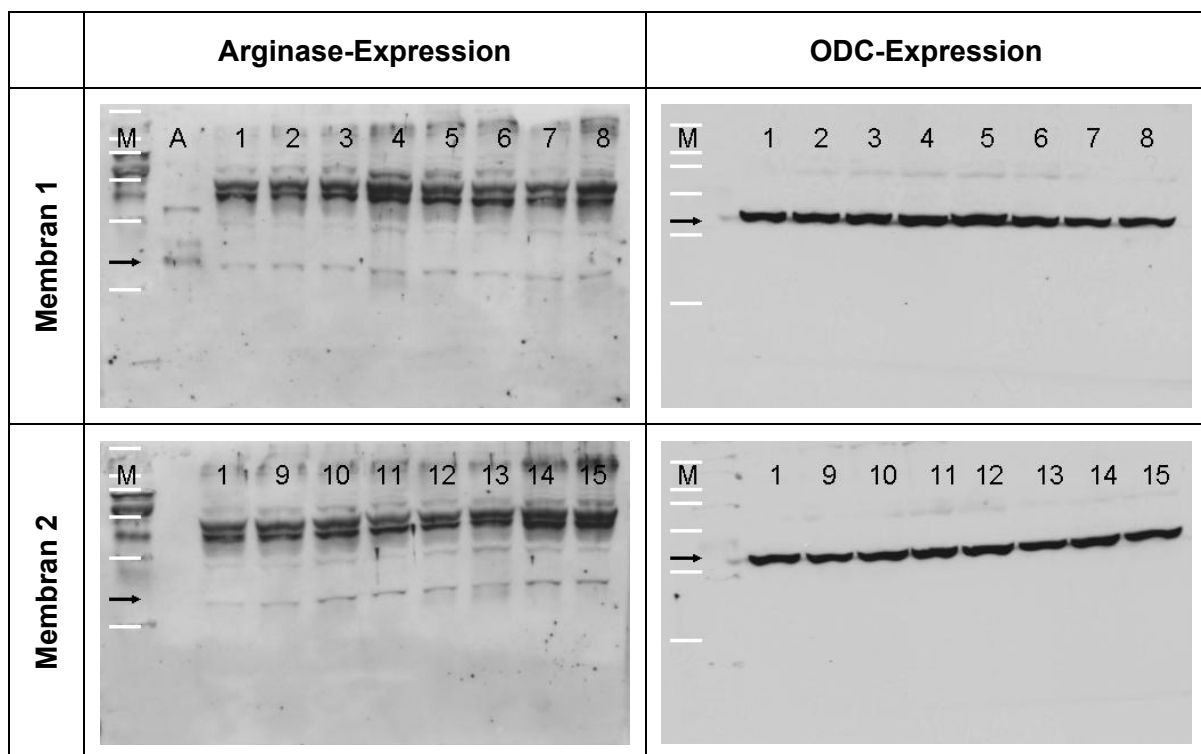
		Kont.	L-Orn		L-Arg		D-Arg		L-Citr	
			1 mM	10 mM	1 mM	10 mM	1 mM	10 mM	1 mM	10 mM
<b>Kont.</b>				+	+	+				
<b>L-Orn</b>	1 mM				+	+				
	10 mM	+			+	+	+		+	+
<b>L-Arg</b>	1 mM	+	+	+		+	+		+	+
	10 mM	+	+	+	+		+		+	+
<b>D-Arg</b>	1 mM			+	+	+				
	10 mM									
<b>L-Citr</b>	1 mM			+	+	+				
	10 mM			+	+	+				

+ = sign. Unterschied (n = 3, p ≤ 0,05, Scheffé post hoc multiple comparison test)  
 hellgrau unterlegt: in Zellkultur toxisch (10 mM D-Arg)

#### 4.4 Westernblot-Untersuchungen zum Einfluß von L-Ornithin HCl auf die Expression der Enzyme Arginase und Ornithin-Decarboxylase

##### 4.4.1 Arginase-Expression nativer Keratinozyten unter dem Einfluß von L-Ornithin HCl

In den Westernblot-Untersuchungen zur Protein-Expression nativer Keratinozyten zeigte sich eine vermehrte Arginase-Expression (Abb. 4.4-1 und 4.4-2) unter dem Einfluß von L-Ornithin HCl. Nach 24-stündiger Inkubation zeigte sich ab einer Konzentration von 10 mM eine Steigerung der Expression des Enzyms Arginase gegenüber der unbehandelten Kontroll-Population.



**spezifische Banden:**      **Arginase:** 35 kDa [20]  
 (schwarzer Pfeil)            **ODC:** 52 - 53 kDa [131]

**M** = Marker (weiße Striche: 29; 45; 66; 97,4; 116 und 205 kDa)

**A** = Arginase (~ 2 µg)

**4, 5, 6** = 1 mM L-Ornithin HCl

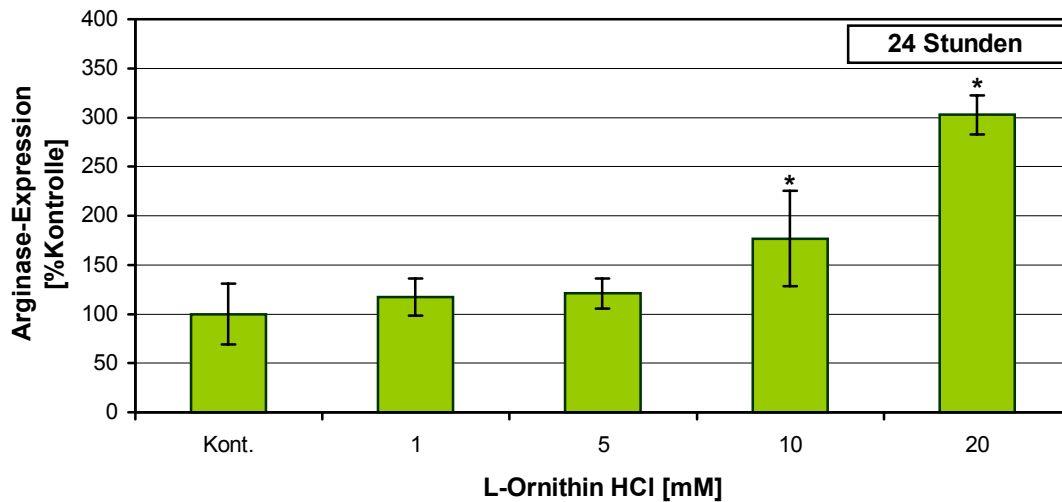
**10, 11, 12** = 10 mM L-Ornithin HCl

**1, 2, 3** = Kontrolle

**7, 8, 9** = 5 mM L-Ornithin HCl

**13, 14, 15** = 20 mM L-Ornithin HCl

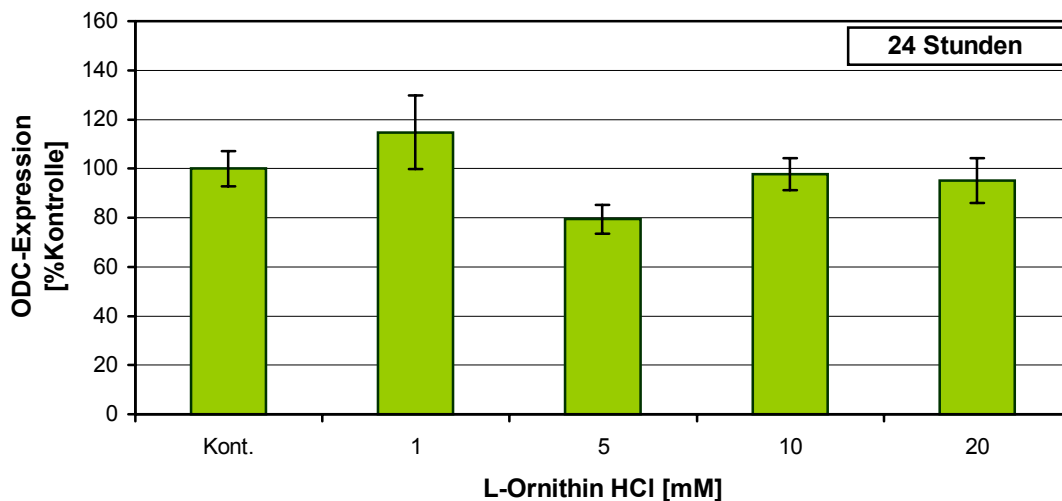
**Abb. 4.4-1** Westernblot-Untersuchungen zur Expression der Enzyme Arginase und ODC nach Inkubation mit L-Ornithin HCl (24 Stunden) an nativen Keratinozyten (exemplarische Abbildungen)



**Abb. 4.4-2** Arginase-Protein-Expression nativer Keratinozyten nach 24-stündiger Inkubation mit L-Ornithin HCl ( \* = sign. vs. Kontrolle: n = 3,  $p \leq 0,05$ , One-Way ANOVA)

#### 4.4.2 ODC-Expression nativer Keratinozyten unter dem Einfluß von L-Ornithin HCl

Nach Inkubation nativer Keratinozyten mit L-Ornithin HCl (0; 1; 5; 10 und 20 mM) ist im Westernblot (Abb. 4.4-1) keine signifikante Veränderung der Expression der Ornithin-Decarboxylase (ODC) nachzuweisen (Abb. 4.4-3).



**Abb. 4.4-3** ODC-Protein-Expression nativer Keratinozyten nach 24-stündiger Inkubation mit L-Ornithin HCl ( \* = sign. vs. Kontrolle: n = 3,  $p \leq 0,05$ , One-Way ANOVA)

#### 4.5 HET-CAM-Untersuchungen zur *In-vivo*-Toxizität von L-Ornithin HCl

##### 4.5.1 L-Ornithin-HCl-Toxizität im HET-CAM-Modell

In den Untersuchungen zur L-Ornithin-HCl-Toxizität im HET-CAM-Modell zeigten sich erst bei der höchsten der eingesetzten Konzentrationen (1 M) nach 30 min erste Veränderungen in der Membranfärbung, später auch in der Hämorrhagie. Eine Erhöhung der Letalität war nach Applikation von 1 M L-Ornithin HCl nach 24 Stunden zu verzeichnen (Tab. 4.5-1).

Tab. 4.5-1 L-Ornithin-HCl-Toxizität im HET-CAM-Modell

	L-Orn [mM]	Membranverfärbung				Hämorrhagie				Letalität
		keine	leicht	mittel	schwer	keine	leicht	mittel	schwer	
10 min	0	11	1	0	0	12	0	0	0	0
	5	12	0	0	0	12	0	0	0	0
	10	12	0	0	0	12	0	0	0	0
	25	12	0	0	0	12	0	0	0	0
	50	12	0	0	0	11	1	0	0	0
	100	11	1	0	0	12	0	0	0	0
	1.000	9	3	0	0	12	0	0	0	0
30 min	0	12	0	0	0	12	0	0	0	0
	5	11	1	0	0	12	0	0	0	0
	10	11	0	1	0	12	0	0	0	0
	25	12	0	0	0	12	0	0	0	0
	50	9	2	0	1	11	0	0	1	1
	100	8	4	0	0	10	2	0	0	0
	1.000	4	6	0	2	7	3	0	2	2
24 h	0	0	9	0	3	8	1	0	3	3
	5	3	4	1	4	8	0	0	4	4
	10	5	5	1	1	11	0	0	1	1
	25	4	3	1	4	7	1	0	4	4
	50	4	3	1	4	7	1	0	4	4
	100	4	3	2	3	7	2	0	3	3
	1.000	0	0	0	12	0	0	0	12	12

grau hinterlegt = signifikant vs. Kontrolle: n = 12,  $p \leq 0,05$ , One-Way ANOVA

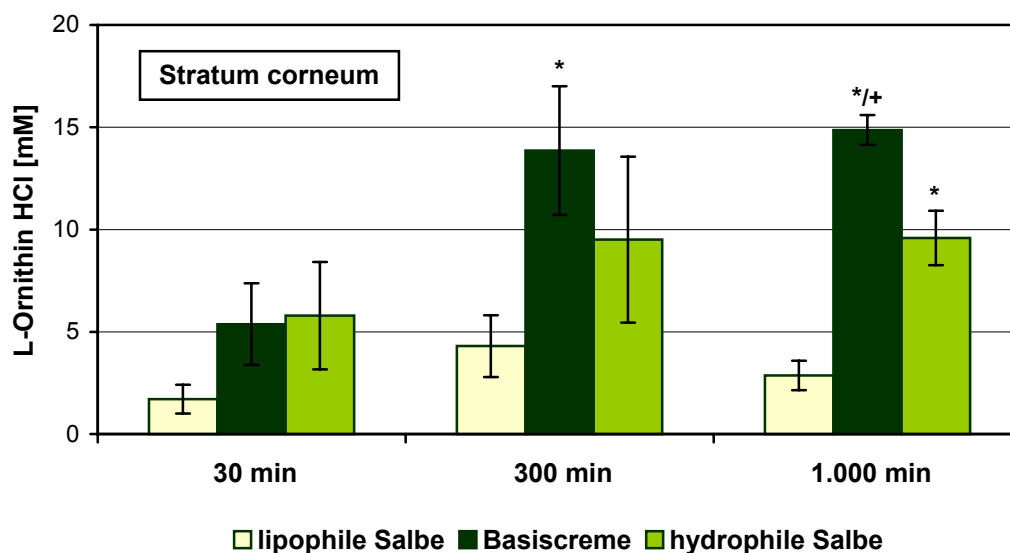


#### 4.5.2 Laser-Doppler-Fluxmetrie am HET-CAM-Modell zur Bestimmung der irritativ/toxischen und vasoaktiven Wirkung von L-Ornithin HCl

In der Laser-Doppler-Fluxmetrie zeigten sich keine signifikanten Veränderungen der kapillären Perfusion der Chorio-Allantois-Membran nach Applikation von L-Ornithin HCl bis zu einer Konzentration von 100 mM (Anhang: Abb. 7.0-3 und 7.0-4). Eine deutliche Erhöhung des kapillären Blutflusses konnte nach Applikation von 1 M L-Ornithin-HCl-Lösung (100 µl) beobachtet werden (Anhang: Abb. 7.0-4).

#### 4.6 Untersuchungen zur Penetration 10 %iger L-Ornithin-HCl-Präparationen in humane Haut *ex vivo*

Nach topischer Applikation L-Ornithin-HCl-haltiger halbfester Zubereitungen wurden die penetrierte Wirkstoff-Menge in den verschiedenen Hautschichten gemessen und die effektive Wirkstoff-Konzentration im Gewebe bestimmt (Kap. 3.10).

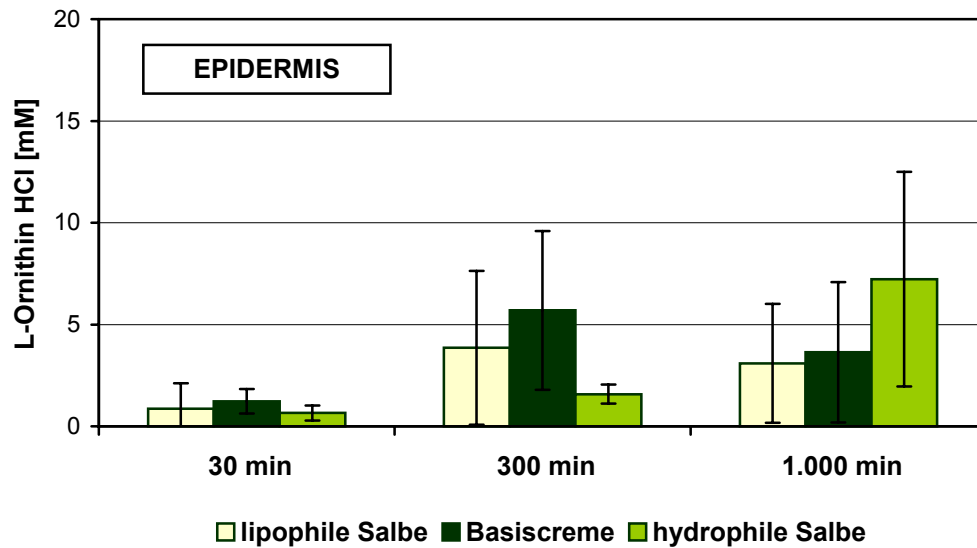


**Abb. 4.6-1** L-Ornithin-HCl-Penetration ins Stratum corneum

(\* = sign. vs. lipophile Salbe, + = sign. vs. hydrophile Salbe: n = 3, p ≤ 0,05, One-Way ANOVA)

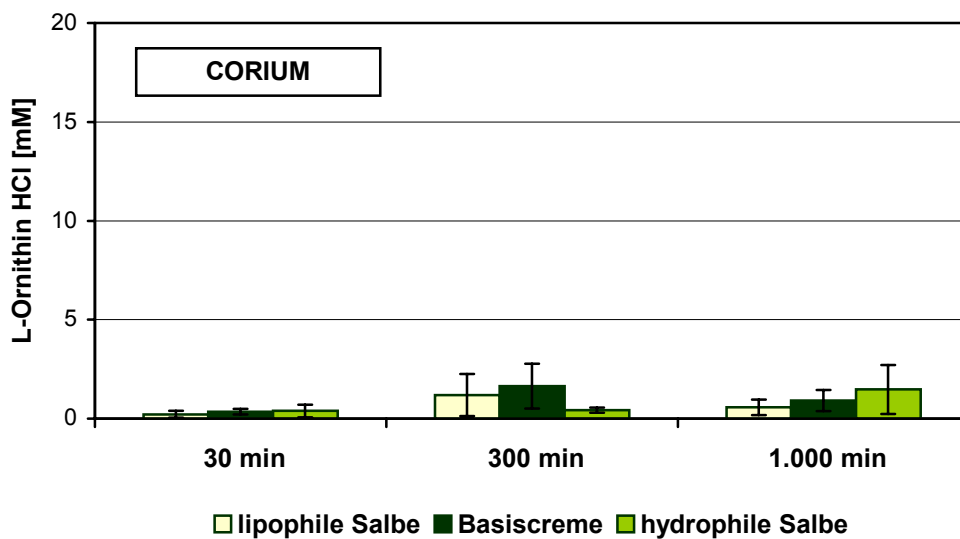
Dabei zeigte sich, daß die Liberation und Penetration aus der amphiphilen Grundlage am stärksten war. Im Stratum corneum (Abb. 4.6-1) wurden nach 300 min L-Ornithin-HCl-Konzentrationen von 10-15 mM erreicht. Die Penetration in die Epidermis war geringer ausgeprägt (Abb. 4.6-2). Im Vergleich zur amphiphilen Präparation war die gemessene L-Ornithin-HCl-Konzentration im Stratum corneum nach Applikation der hydrophilen Salbe geringer, erreichte in der Epidermis jedoch vergleichbare Werte. Aus der lipophilen Salbe wurden die geringsten L-Ornithin-HCl-Mengen freigesetzt und nur geringe Gewebe-Konzentrationen

erzielt. Die Penetration ins Corium war bei allen Präparationen gering. Es gab keinen Unterschied zwischen den Vehikelsystemen (Abb. 4.6-3). Ein Vergleich der in den Akzeptor permeierten Wirkstoff-Menge war aufgrund der sehr inhomogenen Dicke der verwendeten Hautpräparate nicht möglich. Zusammenfassend ist festzuhalten, daß bei Verwendung der genannten Vehikelsysteme 10-30 % der applizierten Wirkstoff-Menge im Akzeptor wiedergefunden wurde.



**Abb. 4.6-2** L-Ornithin-HCl-Penetration in die Epidermis

(\* = sign. vs. lipophile Salbe, + = sign. vs. hydrophile Salbe: n = 3, p ≤ 0,05, One-Way ANOVA)



**Abb. 4.6-3** L-Ornithin-HCl-Penetration ins Corium

(\* = sign. vs. lipophile Salbe, + = sign. vs. hydrophile Salbe: n = 3, p ≤ 0,05, One-Way ANOVA)

## 5 Diskussion

### *In-vitro-Untersuchungen zur Toxizität von L-Ornithin HCl*

Zytotoxische Effekte lassen sich anhand mehrerer Parameter beschreiben. Ein aussagekräftiger Test ist die Untersuchung des Teilungsverhaltens von Zellen [120]. Der Einfluß auf die proliferative Aktivität läßt sich anhand der Anzahl vitaler Zellen nach Inkubation mit der Wirksubstanz abschätzen [116, 119]. In den vorliegenden Untersuchungen (Kap. 4.1.1) zeigte sich eine deutliche zytotoxische Wirkung von L-Ornithin HCl ab 30 mM bei einer Inkubationszeit von 24 Stunden. Dieser Effekt verstärkte sich bei länger andauernder Inkubation. Die zytotoxischen Eigenschaften von L-Ornithin HCl unter *In-vitro*-Bedingungen treten erst weit über den physiologischen Plasmakonzentrationen auf. Sie sind *in vivo* nicht relevant und durch eine topische Applikation praktisch unerreichbar [120].

Um die zellschädigende Wirkung von L-Ornithin HCl auf native Keratinozyten zu charakterisieren ist es notwendig, das Proliferationsverhalten unter dem Einfluß von L-Ornithin HCl zu erfassen. Bei den Untersuchungen zur DNA-Synthese, ermittelt anhand der Messung der Einbaurate des [<sup>3</sup>H]-markierten Nukleotids Thymidin (Kap. 4.1.2), zeigte sich eine Hemmung der Proliferation nach 24-stündiger Inkubation mit hohen Konzentrationen von L-Ornithin HCl ( $\geq 30$  mM). Es kam zu einer verstärkten Proliferationshemmung mit zunehmender Inkubationszeit. Niedrige Konzentrationen (1 bis 5 mM) führten hingegen zu einer geringen Steigerung der Proliferationsrate. Ähnliche Beobachtungen machten Byus CV et al. [25] an Leberzellen (H35) bei Konzentrationen bis 0,5 mM. Dies ist mit der metabolischen Funktion von L-Ornithin in Einklang zu bringen, da diese Aminosäure als Precursor der Polyamin-Synthese einen direkten Einfluß auf die Regulation zellulärer Proliferation und Differenzierung ausübt. In der Literatur wurde auch eine allgemeine Stoffwechsel-Aktivierung unter Applikation von Aminosäuren beschrieben [16, 18, 43].

Für das Verständnis der zellschädigenden Wirkung von L-Ornithin HCl ist weiterhin die differenzierende Betrachtung des L-Ornithin-HCl-induzierten Zellunterganges von Interesse. Eine Unterscheidung zwischen apoptotischem Zelltod und Nekrose ist von besonderer Bedeutung, da Keratinozyten unter physiologischen Bedingungen während des Differenzierungsprozesses in der Epidermis der Apoptose unterliegen [40]. Die, bis ins Stratum granulosum reversible, Apoptose der Keratinozyten ist ein sehr komplexer und zugleich vulnerabler Prozeß [40]. Die durch Apoptose aus den Keratinozyten hervorgehenden Korneozyten sind wichtiger Bestandteil der Epidermis und bilden die Grundlage für den Aufbau und die Funktion verhornenden Plattenepithels (*brick and mortar model*) [39, 41].

Die flowzytometrischen Untersuchungen anhand Annexin V / PI-markierter Zellen (Kap. 4.2.1) zeigten eine deutliche Apoptose-Induktion durch L-Ornithin HCl. Nach Inkuba-

tion mit 40 mM L-Ornithin HCl über 24 Stunden war eine Erhöhung der apoptotischen Zellfraktion nachzuweisen, die nach 48 Stunden bereits ab einer Konzentration von 30 mM auftrat. Ein Apoptose-induzierender Effekt zeigte sich bei Behandlung mit 50 mM L-Ornithin HCl bereits nach 16 Stunden. Im Vergleich dazu wurde die Apoptose-assoziierte Expression des mitochondrialen Membranproteins APO 2.7 (Kap. 4.2.2) erst nach 22-stündiger Inkubation mit 50 mM L-Ornithin HCl signifikant erhöht. Desweiteren wurde eine Zunahme der APO 2.7-positiven Zellfraktion nach 24- bzw. 48-stündiger Inkubation erst bei Konzentrationen  $\geq 50$  mM bzw.  $\geq 40$  mM beobachtet. Zusammenfassend kann festgestellt werden, daß die Apoptose-induzierende Wirkung von L-Ornithin HCl konzentrations- und zeitabhängig ist. Die für die Apoptose-Induktion notwendige Konzentration lag deutlich über der physiologischen Konzentration (Blutplasma:  $67 \pm 9$   $\mu$ M, [78]) und ist im Hinblick auf eine topische Anwendung ohne Relevanz [120].

Gray et al. [53] konnten eine Hemmung von Proliferations- und Differenzierungsprozessen humaner nativer dermaler Fibroblasten unter *In-vitro*-Bedingungen bei Inkubation mit L-Ornithin ab 15 mM nachweisen. Ando et al. [11] beschrieben im Rahmen der Untersuchungen zur Pathogenese der Gyrate Atrophy (chorio-retinale Degeneration aufgrund einer Hyperornithinämie, assoziiert mit einem Mangel an Ornithin-Aminotransferase (OAT)) an retinalen Epithelzellen (RPE) die zytotoxische Wirkung von L-Ornithin bei OAT-Blockade ab 10 mM. Eine mögliche Erklärung liegt im Anstieg der intrazellulären Polyamin-Spiegel (insbesondere Putrescin, vgl. [54]) und einer damit einhergehenden Entkopplung kardinaler metabolischer Prozesse. So konnten Bratton et al. [23] die Apoptose-Induktion durch erhöhte intrazelluläre Putrescin-Konzentrationen am Modell der humanen Leukämiezelllinie HL-60 nachwiesen. Ähnliche Mechanismen können auch für die durch L-Ornithin HCl an nativen Keratinozyten beschriebene Apoptose-Induktion angenommen werden.

Zur Überprüfung dieser Vermutung sollten vergleichende Untersuchungen zur Zytotoxizität von L-Ornithin HCl unter simultaner Blockade der Ornithin-Decarboxylase (z.B. durch Difluoromethylornithin, DFMO) durchgeführt werden.

**Welchen Einfluß hat L-Ornithin HCl auf die keratinozytäre Harnstoff-Synthese? Wie ist die Wirkung im Vergleich zu L-Arginin HCl, D-Arginin HCl und L-Citrullin einzuschätzen?**

Unter *In-vitro*-Bedingungen hemmt L-Ornithin HCl die keratinozytäre Harnstoff-Synthese. Eine Reduktion der freigesetzten Harnstoff-Menge war nach 24-stündiger Inkubation mit L-Ornithin HCl ab einer Konzentration von 1 mM nachzuweisen (Kap. 4.3.1).

Für diese suppressive Wirkung lassen sich folgende Mechanismen diskutieren:

- 1.) Die für die Harnstoff-Synthese verantwortlichen Enzyme werden in ihrer Aktivität gehemmt.
- 2.) Ein Substrat-Mangel verhindert die Synthese von Harnstoff.

Als Endprodukt der Arginase-Reaktion verschiebt L-Ornithin das Reaktionsgleichgewicht, es kommt zur Hemmung der enzymatischen Hydrolyse von L-Arginin, vgl. [22, 66] und Michaelis-Menten-Gesetz [78]. Dieser allein auf die Arginase-Reaktion beschränkte Mechanismus muß im Gesamtkontext des zellulären Stoffwechsels und hier insbesondere unter dem Aspekt des Harnstoff-Zyklus betrachtet werden. Bei diesem über zwei Kompartimente (Zytosol und Mitochondrium) aufgeteilten und unter Beteiligung von verschiedenen Enzymen und Transportern komplexen metabolischen Prozeß [78] ist eine multiple Interaktion von L-Ornithin denkbar.

Meijer et al. konnten die Hemmung der Argininosuccinat-Lyase (ASL) durch L-Ornithin nachweisen [84]. Der für die Aufrechterhaltung des Henseleit-Krebs-Zyklus wichtige, Substrat-limitierte L-Ornithin / L-Citrullin-Austausch über die Mitochondrienmembran unterliegt direkt dem Einfluß von L-Ornithin [78]. Ein weiteres Transportsystem für L-Ornithin an der Mitochondrienmembran stellt der L-Ornithin / H<sup>+</sup>-Antiporter dar. Wie Cohen et al. [28] zeigen konnten wird L-Ornithin direkt über diesen Antiporter der Ornithin-Carbamoyl-Transferase (OCT) zugeführt und in L-Citrullin umgewandelt. Erhöhte L-Ornithin-Konzentrationen führen zur Dysbalance des Transportgleichgewichts [83] und zu Veränderungen der zytosolischen und mitochondrialen Konzentrationen von z.B. L-Ornithin und L-Arginin. Diese haben wiederum Einfluß auf die Aktivität der am Harnstoff-Zyklus beteiligten Enzyme. So wurde von Krebs et al. [72] eine L-Ornithin-vermittelte Aktivierung der Carbamoyl-Phosphat-Synthetase, dem limitierenden Enzym des Harnstoff-Zyklus, beschrieben.

Die obigen Überlegungen sind auf physiologische Bedingungen im intrazellulären Stoffwechsel zu übertragen. Dabei ist hervorzuheben, daß *in vivo* der Umsatz im hepatischen Harnstoff-Zyklus nur 20-50 % der maximalen Kapazität erreicht [29] und somit eine große Anpassungsfähigkeit an metabolische Anforderungen besteht. Außerdem ist die Zellspezifität metabolischer Funktionen zu berücksichtigen. So ist nach Untersuchungen von Crouse et al. [31] zur Evaluierung der Enzyme des Henseleit-Krebs-Zyklus in nativen humanen Keratino-

zyten von einer sehr geringen und für den Gesamtstoffwechsel der Keratinozyten unbedeutenden funktionellen Aktivität der Ornithin-Carbamoyl-Transferase und der Arginin-Synthetase auszugehen. Dies steht im Einklang mit der Funktion der extrahepatischen Arginase [60, 62], die im Vergleich zur hepatischen Isoform nicht primär der Synthese von Harnstoff als Stoffwechselendprodukt des (ureotelischen) Aminosäure-Katabolismus und damit nicht der Bindung biogenen Stickstoffs dient. Vielmehr liegt ihre Bedeutung in der Synthese von L-Ornithin als Precursor für die Polyamin- und Proteinsynthese. Hervorzuheben ist die Generierung der für Matrixproteine (z.B. Kollagen) essentiellen Aminosäure L-Prolin.

Für das Verständnis der in dieser Arbeit nachgewiesenen Hemmung der *De-novo*-Harnstoff-Synthese nativer Keratinozyten unter *In-vitro*-Bedingungen durch L-Ornithin HCl sind auch die Transport-Mechanismen kationischer Aminosäuren an der Zellmembran zu betrachten. Die kationischen Aminosäuren L-Arginin, L-Lysin und L-Ornithin werden (unter physiologischen Bedingungen) über das hochspezifische und komplexe  $\gamma^+$ -System in die Zelle aufgenommen [34]. Es handelt sich hierbei um einen kompetitiven Transport kationischer Aminosäuren. Somit kommt es unter Behandlung mit L-Ornithin zur Reduktion der Transport-Kapazität für L-Arginin und L-Lysin [33]. Dies wiederum limitiert den zellulären L-Arginin-Pool [33] und senkt dadurch den Umsatz der Arginase-Reaktion [85, 128].

Es soll hervorgehoben werden, daß die in den Experimenten nachgewiesene Suppression der Harnstoff-Synthese in Zusammenhang mit einem verminderten intrazellulären L-Arginin-Angebot und der negativen Rückkopplung durch L-Ornithin in der terminalen Arginase-Reaktion gebracht werden kann.

Unter diesen Gesichtspunkten können auch die Untersuchungen zum Einfluß von L-Arginin HCl, D-Arginin HCl und L-Citrullin auf die Harnstoff-Produktion nativer Keratinozyten diskutiert werden (Kap. 4.3.2). L-Arginin führt als Substrat zu einem erhöhten Umsatz der Arginase-Reaktion. Das D-chirale Enantiomer übt keinen signifikanten Einfluß auf den Umsatz der stereospezifischen Arginase aus [21, 30, 98, 121]. L-Citrullin greift als Intermediat des Henseleit-Krebs-Zyklus in nur vergleichbar geringem Umfang in die Gesamtkinetik der keratinozytären Harnstoff-Synthese ein. Dies ist u.a. auf die stark reduzierte Aktivität der keratinozytären Arginin-Synthetase [31] und der damit einhergehenden eingeschränkten metabolischen Integration der nicht-essentiellen Aminosäure zurückzuführen. L-Citrullin trägt somit im keratinozytären Stoffwechsel nur unzureichend zur Generierung des für die Harnstoff-Synthese wichtigen L-Arginins bei.

Die keratinozytäre Harnstoff-Synthese wurde mit der sehr sensitiven und spezifischen enzymatischen Urease-Methode [69] bestimmt. Es wurde die ins Kulturmedium abgegebene Harnstoff-Menge als Maß der endogenen *De-novo*-Synthese gemessen und auf die Anzahl vitaler Zellen in der Kulturschale bezogen. Dieses Modell geht davon aus, daß das Stoff-

wechselndprodukt Harnstoff aus der Zelle ausgeschleust wird. Jedoch sind die dafür zuständigen Transport-Mechanismen nicht endgültig geklärt [121]. So wird neben der freien Diffusion ein erleichterter, energiegebundener Transport diskutiert [120]. Es ist davon auszugehen, daß sich intrazellulär kein größeres Reservoir bildet und somit der extrazellulär bestimmte Anteil als Maß der Gesamtsynthese betrachtet werden kann.

Hinsichtlich möglicher therapeutischer Anwendungen unter dem Gesichtspunkt der Regulation der endogenen Harnstoff-Synthese zur Beeinflussung der Zusammensetzung des NMF (vgl. NMF-Übersicht, Kap. 2.2.1) und des damit verbundenen Hydratationsgrades der Haut ist die *in vivo* im Interzellularraum freie und an Wasser gebundene Harnstoff-Menge wichtig [122, 125, 126]. Sie ist vergleichbar mit der *in vitro* extrazellulär bestimmten Harnstoff-Menge.

Die zur Bestimmung der extrazellulären Harnstoff-Konzentration verwendete Urease-Methode wurde an die spezifischen *In-vitro*-Bedingungen angepaßt. Diese absorptionsphotometrische Methode beruht auf der enzymatischen Spaltung von Harnstoff und dem Nachweis des Spaltproduktes Ammoniak. Als Stoffwechselprodukt wird Ammoniak auch von den Zellen ins Medium abgegeben. Mit zunehmender Inkubationszeit kommt es somit zum Anstieg des Gehalts an Ammoniak im Medium (Abb. 4.3-2). Dies wiederum ist limitierend für die Harnstoff-Bestimmung nach der Urease-Methode, da bei hohen basalen Ammoniak-Spiegeln das durch die enzymatische Harnstoff-Spaltung entstehende Ammoniak zu gering ist, um meßtechnisch erfaßt zu werden (Abb. 3.6-2 und 4.3-3). Über eine vorgeschaltete Ammoniak-Elimination, z.B. durch Erhitzen im basischen Milieu oder über einen Kationen-Austauscher ( $\text{NH}_4^+$ ), kann die Harnstoff-Konzentration im Medium auch nach langer Inkubationszeit mit der Urease-Methode bestimmt werden. Eine initiale Ammoniak-Elimination aus den Proben erfolgte im Rahmen dieser Arbeit nicht. Bei Beschränkung der Untersuchungen auf einen Inkubationszeitraum von 24 Stunden war das zu erwartende Harnstoff/Ammoniak-Verhältnis ausgeglichen. Die absorptions-photometrische Bestimmung des Glutamat-Dehydrogenase-medierten NADH-Umsatzes erfolgte im linearen Bereich (Abb. 4.3-1, Lambert-Beer'sches Gesetz [1]).

Eine Aussage über Langzeit-Effekte der Inkubation mit L-Ornithin HCl ( $\geq 36$  Stunden) auf die Harnstoff-Synthese nativer Keratinozyten ist nur nach vorangestellter Probenaufbereitung (s.o.) möglich. Ein Vergleich der extrazellulär bestimmten Harnstoff-Menge mit dem intrazellulären Harnstoff-Gehalt ist für das tiefere Verständnis möglicher therapeutischer Ansätze zur Modulation der endogenen Harnstoff-Synthese von großem Interesse. In weiterführenden Experimenten sollten diese Aspekte Berücksichtigung finden.

### **Welchen Einfluß hat L-Ornithin HCl auf die Expression der Enzyme Arginase und Ornithin-Decarboxylase?**

Die quantitative Bestimmung der Expression spezifischer Proteine erfolgte mit der Methode des Westernblot. Es handelt sich dabei um eine etablierte und anerkannte Methode, die auf der spezifischen Antikörper-vermittelten Protein-Detektion nach gelelektrophoretischer Auftrennung basiert.

In den Westernblot-Untersuchungen zeigte sich unter der Applikation von L-Ornithin HCl eine geringe Induktion der Arginase-Proteinexpression, wohingegen die Expression der Ornithin-Decarboxylase (ODC) unbeeinflusst blieb (Kap. 4.4).

Die L-Ornithin-HCl-vermittelte Stimulation der *Arginase-Expression* (Kap. 4.4.1) kann als Gegenregulation der Enzym-Inhibierung und dem damit einhergehenden Substratstau betrachtet werden. Desweiteren ist eine über Polyamine moderierte Expressionssteigerung zu diskutieren. So ist bekannt, daß in Geweben mit gesteigerter Stoffwechselaktivität (z.B. Tumoren, entzündetes Gewebe und Regenerationsgewebe) eine Erhöhung der Arginase- und ODC-Aktivität auftritt [14, 27, 61, 75, 105, 114]. Über die Kausalität dieser Zusammenhänge gibt es abweichende Vorstellungen. So wird neben einer primären Aktivitätssteigerung der ODC [105] auch ein vermehrter Umsatz der Arginase-Reaktion [52, 61] als primäres Regulatoriv diskutiert. Gesichert ist, daß es unter Applikation von L-Ornithin zu einer vermehrten Akkumulation von Putrescin kommt [25, 115]. Die weiteren regulatorischen Prozesse müssen zum jetzigen Zeitpunkt als ungeklärt gelten und bedürfen weiterer eingehender molekularbiologischer Untersuchungen.

Aufgrund des verwendeten Arginase-Antikörpers (fehlende Isotyp-Spezifität) und möglicher posttranskriptioneller Veränderungen war eine Typisierung des Arginase-Enzyms mittels Westernblot nicht möglich. Die vorliegenden Ergebnisse belegen aber die Existenz einer Arginase-Isoform in nativen Keratinozyten. Rein deskriptiv handelt es sich hierbei um eine extrahepatische Form. Durch molekularbiologische Untersuchungen (Proteinsequenzierung) ist der genaue Isotyp noch zu bestimmen.

Die Expression der *Ornithin-Decarboxylase* nativer Keratinozyten wurde durch L-Ornithin HCl nicht beeinflusst (Kap. 4.4.2).

Die Transkription und Translation der ODC werden durch sehr komplexe Vorgänge reguliert. Z.B. wird *in vitro* eine Induktion der ODC sowohl durch erhöhte Aminosäure-Konzentrationen als auch durch einen Mangel an Aminosäuren beschrieben [43]. Neben der Regulation der Expression der ODC ist die Enzymaktivität für die metabolische Funktion wichtig. So konnten Beeman et al. [19] eine Erhöhung des Umsatzes der ODC nach der Applikation von L-Ornithin nachweisen. Hingegen wurde in den Arbeiten von Chabanon et al. [26] eine Reduktion der ODC-Aktivität durch 10 mM L-Ornithin unter *In-vitro*-Bedingungen in der humanen Kolon-



Karzinom-Zelllinie Caco-2 beschrieben. Auch konnten Wu et al. [129] eine Hemmung der ODC-Aktivität durch L-Ornithin (0,1 - 1 mM) in der humanen Leberzelllinie H35 nachweisen. Es ist denkbar, daß die intrazelluläre Konzentration an L-Ornithin, unabhängig von der der Polyamine, durch Veränderung der Antizym-Konzentration oder durch direkte Inaktivierung Auswirkung auf die ODC-Aktivität hat [25]. So ist bekannt, daß ein Mangel an stabilisierenden Thiolen zur L-Ornithin-vermittelten ODC-Inaktivierung führt [32].

Um den Einfluß von L-Ornithin auf die ODC nativer Keratinozyten und somit auf die Regulation der endogenen Polyamine vollständig zu verstehen, muß die Aktivität der ODC sowie der anderen an der Polyamin-Synthese beteiligten Enzyme aufgeklärt werden.

### **Wie ist die Verträglichkeit von topisch appliziertem L-Ornithin HCl einzuschätzen?**

Zur Evaluierung toxikologischer Eigenschaften unter *In-vivo*-Bedingungen wurden bislang weitgehend Tierversuche durchgeführt [120]. In den letzten Jahren ist man zunehmend bemüht, Alternativen zu den Tierversuchen zu entwickeln [64, 65, 101]. So hat sich für die Evaluation des irritativ-toxischen Potentials topisch applizierter Substanzen der HET-CAM-Test durchgesetzt [79, 87, 99, 110, 111]. Er stellt inzwischen eine validierte Methode dar, die in der Aussagefähigkeit dem von Draizé et al. [36] beschriebenen Test am Auge des Albinokaninchens als gleichwertig gelten kann [120]. Beim HET-CAM-Test handelt es sich nicht um einen Tierversuch. Er unterliegt nicht dem Embryonenschutzgesetz der Europäischen Union [120]. Bis zum ca. achten (Entwicklungs-)Tag hat sich zwar ein dichtes Gefäßnetz der Chorio-Allantois-Membran (CAM) ausgebildet, es sind aber keine Nervenfasern eingewachsen, so daß ein schmerzfeies System vorliegt [76]. Daraus ergeben sich gegen die Verwendung der HET-CAM für Versuchszwecke bis zum zehnten Tag nach Befruchtung keine ethischen Bedenken [71, 76].

Die Erfassung der Reaktionsparameter Membranverfärbung (MD), Hämorrhagie (HR) und Letalität wird für die Beurteilung der Verträglichkeit am HET-CAM-Modell empfohlen [71]. Zur Objektivierung der Aussagefähigkeit der beschriebenen Parameter wurde in der vorliegenden Arbeit, zusätzlich zum empfohlenen Standard, die kapilläre Perfusion der Chorio-Allantois-Membran unter Wirkstoff-Applikation mittels Laser-Doppler-Fluxmetrie (LDF) beurteilt. Bei der Evaluation der irritativ-toxisch, vasoaktiven Potenz von Wirkstoffen mittels LDF am HET-CAM-Modell müssen die besonderen Versuchsbedingungen beachtet werden. Die Perfusion der mikrochirurgisch präparierten Chorio-Allantois-Membran wurde in Ruhe (Zimmertemperatur, kein Lärm, keine Erschütterungen) für ca. 10 min vermessen. Nach der Applikation von 100 µl der Probenlösung erfolgte für weitere 30 min die Messung der Perfusion. Fehlerquellen dieses Versuchsaufbaus sind in der durch den Auftrag der Probenlösung verursachten Veränderungen der optischen Verhältnisse (zusätzlicher dünner Probenfilm, geringe Änderung der Lage der Kapillaren der Chorio-Allantois-Membran zum Laserstrahl)

zu sehen. Dies erklärt auch die verhältnismäßig hohen Standardabweichungen der LDF-Messungen und erlaubt nur die Beschreibung großer Effekte auf die kapilläre Perfusion der CAM. Neben der auf die Chorio-Allantois-Membran beschränkten, lokalen Reaktion auf die L-Ornithin-HCl-Applikation ist auch eine systemische Wirkung auf den Embryo (Toxizität) zu diskutieren. Sie läßt sich jedoch mittels Laser-Doppler-Fluxmetrie nicht isoliert beschreiben.

Die Auswertung (Kap. 4.5.1) der halbquantitativen Parameter Membranverfärbung, Hämorrhagie und Letalität ergab für L-Ornithin-HCl-Konzentrationen bis 100 mM keine signifikante Änderung der Merkmalsausprägungen im Vergleich zur Kontrollgruppe (Applikation des reinen Lösungsmittels: PBS). Bei Applikation von 100 µl einmolarer L-Ornithin-HCl-Lösung kam es bereits nach 30 Minuten zu deutlich sichtbaren Membranverfärbungen und vermehrtem Auftreten von Hämorrhagien. Nach 24-stündiger Applikation waren alle untersuchten Hühnerembryonen avital. Es wurde ein breites Spektrum makroskopischer Veränderungen (MD und HR) beobachtet.

Die mittels Laser-Doppler-Fluxmetrie erhobenen Daten zur Toxizität und Irritabilität von L-Ornithin HCl (Kap. 4.5.2) unterstreichen die Ergebnisse der obigen Beobachtungen. Erst unter der Applikation von 100 µl einmolarer L-Ornithin-HCl-Lösung kam es zu einer deutlichen Veränderung der kapillären Perfusion der Chorio-Allantois-Membran. Aufgrund der indirekt vasokonstriktorischen Wirkung von L-Ornithin durch die Hemmung der NO-Synthase [128], ist die vorliegende Erhöhung der Durchblutung als Zeichen einer irritativ-toxischen Reaktion zu werten.

Zusammenfassend kann festgestellt werden, daß die perkutane Applikation von L-Ornithin HCl bis zu einer Konzentration von 100 mM als unbedenklich eingestuft werden kann.

### ***Penetriert L-Ornithin HCl aus topischen Standardpräparationen in die menschliche Haut?***

Das Ausmaß und der zeitliche Verlauf der Aufnahme von Wirksubstanzen durch das Hautorgan sind von verschiedenen Faktoren abhängig. Von Bedeutung sind neben den physikochemischen Eigenschaften und der applizierten Konzentration des Wirkstoffes [113] die Applikationsfläche, die morphologischen, biochemischen und physiologischen Eigenschaften der Haut [88], die Charakteristika des verwendeten Vehikelsystems [57], sowie externe Faktoren (Okklusion, Temperatur, Luftfeuchtigkeit) [17, 117].

Das gebräuchlichste *In-vitro*-Modell zum Studium des dermalen Wirkstofftransportes ist die Diffusionszelle nach Franz [88]. Der in diesem Modellsystem simulierte Wirkstofftransport kann als *in-vivo*-äquivalent und therapeutisch relevant angesehen werden [88]. Ein weiterer Vorteil dieses Einkammersystems liegt in der Applikation klinisch relevanter Wirkstoff-Mengen (finite-dose-Technik) in dermatologisch gebräuchlichen Zubereitungen [57].

Unter Verwendung von Standard-Vehikelsystemen (Kap. 3.9) wurden hydrophile, amphiphile bzw. lipophile Donatorbedingungen simuliert. Die Vergleichbarkeit der Penetrationsbedingungen wurde durch die Konstanz der äußeren Faktoren (Temperatur, Luftfeuchte) und die Verwendung vergleichbarer Akzeptoren humaner Haut (*ex vivo*) von konstanter Lokalisation und identischen Spendern gewährleistet (Kap. 3.10).

Die Untersuchungen zur Penetration hydrophiler Wirkstoffe stellt eine Besonderheit dar, da die Barrierefunktion der lipophilen Hornschicht für hydrophile Substanzen nur schwer zu überwinden ist. Durch die Auswahl geeigneter Vehikelsysteme und den Einsatz von Penetrationenhancern ist eine Verbesserung des Konzentrations-Zeit-Profiles der Wirkstoff-Penetration möglich. Die Beeinflussung des Hydratationsgrades des Stratum corneum und der damit veränderte transepidermale Wasserverlust (TEWL) sind für die topische Applikation der hydrophilen Aminosäure L-Ornithin von großer Bedeutung. Unter Verwendung von Standard-Vehikelsystemen kann eine erste orientierende Aussage zum Penetrationsvermögen von L-Ornithin HCl getroffen werden. Eine Differenzierung der möglichen Penetrationswege (interzellulär, transzellulär, transglandulär bzw. transfollikulär) ist anhand der durchgeführten Untersuchungen nicht möglich [88].

Unter Verwendung der *hydrophilen* Zubereitung konnte eine schnelle und deutliche L-Ornithin-HCl-Liberation aus dem Vehikel und Penetration ins Stratum corneum erzielt werden (Kap. 4.6). Es kam zur Akkumulation von L-Ornithin HCl und begrenzter Permeation in die vitale Epidermis.

Die Liberation von L-Ornithin HCl aus der *amphiphilen* Grundlage und deren Penetration in die Hornschicht war hingegen nach Langzeitexposition deutlich höher. Es kam, im Vergleich zur hydrophilen Präparation, zu einer stärkeren Anreicherung im Stratum corneum. Die Permeation in tiefere Hautschichten erfolgte deutlich verzögert.

Wie aufgrund der galenischen Zusammensetzung zu vermuten war, erfolgte nur eine geringe Penetration von L-Ornithin HCl aus dem *lipophilen* Vehikelsystem. Es konnte nur eine vergleichsweise geringe Wirkstoff-Konzentration im Gewebe nachgewiesen werden.

Der hydrophile Wirkstoff L-Ornithin HCl liegt in der wässrigen Phase der halbfesten Zubereitungen vor. Im *lipophilen System* ist L-Ornithin HCl zum größten Teil in der inneren (wässrigen) Phase gelöst. Die Liberation aus dem Vehikel kann erst nach Diffusion durch die lipophile äußere Phase erfolgen. Beim *hydrophilen System* ist dagegen die äußere Phase hydrophil und enthält den größten Anteil des Wirkstoffs. Das *amphiphile System* nimmt durch seine hydro- und lipophilen Eigenschaften eine Sonderstellung ein. Hervorzuheben ist, daß aufgrund des lipophilen Charakters die Kopplung an die Hornschicht und dadurch die Penetration erleichtert werden.

Ein Vergleich der in den Akzeptor permeierten Wirkstoff-Menge war aufgrund der inhomogenen Dicke der verwendeten Hautpräparate nicht möglich. Die systemische Verfügbarkeit unter *In-vivo*-Bedingungen kann anhand dieses *Ex-vivo*-Modells nicht ausreichend eingeschätzt werden und bedarf eingehender *In-vivo*-Untersuchungen.

Für die topische Anwendung von L-Ornithin HCl an intaktem Integument erscheint die amphiphile Zubereitung am geeignetsten. Die Anwendung bei barrieregeschädigter Haut bedarf hingegen einer hydrophilen galenischen Darreichung, da aufgrund der fehlenden Hornschicht und der damit verbundenen fehlenden Lipid-Barriere die Penetration durch eine hydrophile Grundlage begünstigt wird [88]. Die topische Applikation bedarf einer weiteren galenischen Optimierung. Es ist gegebenenfalls auch der Einsatz moderner Trägersysteme zu erwägen [58].

### ***Welche Anwendungsmöglichkeiten eröffnen sich?***

Die mögliche dermatotherapeutische Potenz der basischen Aminosäure L-Ornithin ist in weiterführenden Experimenten zu untersuchen. Besondere Aufmerksamkeit sollte dabei auf die Modulation Polyamin-vermittelter Prozesse und die Generierung der für die Synthese von Matrixproteinen (z.B. Kollagen) wichtigen Aminosäure L-Prolin gerichtet werden.

Mögliche Anwendungen könnten sich dadurch in der supportiven Therapie entzündlicher, regenerativer (Wundheilung, Angiogenese) und hyperproliferativer (z.B. Psoriasis vulgaris) Prozesse ergeben. Auch ist aufgrund der metabolischen Interaktion im Polyamin- und Kollagen-Stoffwechsel ein Einsatz als Supplement in der Therapie von Störungen des Haarwuchses denkbar.

## 6 Zusammenfassung

In den Untersuchungen zur Charakterisierung der Toxizität der nicht-essentiellen, nicht-proteinogenen basischen Aminosäure L-Ornithin konnte unter Verwendung des Monohydrochlorids die Unbedenklichkeit von L-Ornithin HCl bis zum 100-fachen der physiologischen Konzentration nachgewiesen werden. Unter *In-vitro*-Bedingungen zeigte sich eine konzentrations- und zeitabhängige toxische Wirkung ab 20 mM L-Ornithin HCl. Die Applikation hoher Konzentrationen ( $\geq 20$  mM) führte in nativen Keratinozyten zur Apoptose-Induktion, die anhand flowzytometrischer Messungen (Annexin V / PI und APO 2.7) nachgewiesen werden konnte.

Das irritativ-toxische Potential von L-Ornithin HCl wurde *in vivo* am HET-CAM-Modell bestimmt. Dabei zeigte sich in Übereinstimmung der halbquantitativ erfaßten Parameter Membranverfärbung, Hämorrhagie und Letalität mit der quantitativ gemessenen kapillären Perfusion der Chorio-Allantois-Membran unter L-Ornithin-HCl-Applikation, daß die externe Anwendung von L-Ornithin HCl in Konzentrationen bis 100 mM als unbedenklich eingestuft werden kann.

Die Konfrontation nativer Keratinozyten mit L-Ornithin HCl führte ab einer Konzentration von 1 mM *in vitro* zur signifikanten Suppression der *De-novo*-Harnstoff-Synthese. Diese kann über die kompetitive Hemmung des L-Arginin Transportes in die Zelle ( $\gamma^+$ -System) und der damit verbundenen Reduktion des intrazellulären Arginin-Pools sowie einer direkten Arginase-Hemmung erklärt werden.

Die in den Westernblot-Untersuchungen nachgewiesene L-Ornithin-HCl-vermittelte Erhöhung der Arginase-Expression kann als kompensatorische Gegenregulation der Enzym-Inhibierung und der intrazellulären Dysbalance im Arginin-Ornithin-Metabolismus aufgefaßt werden.

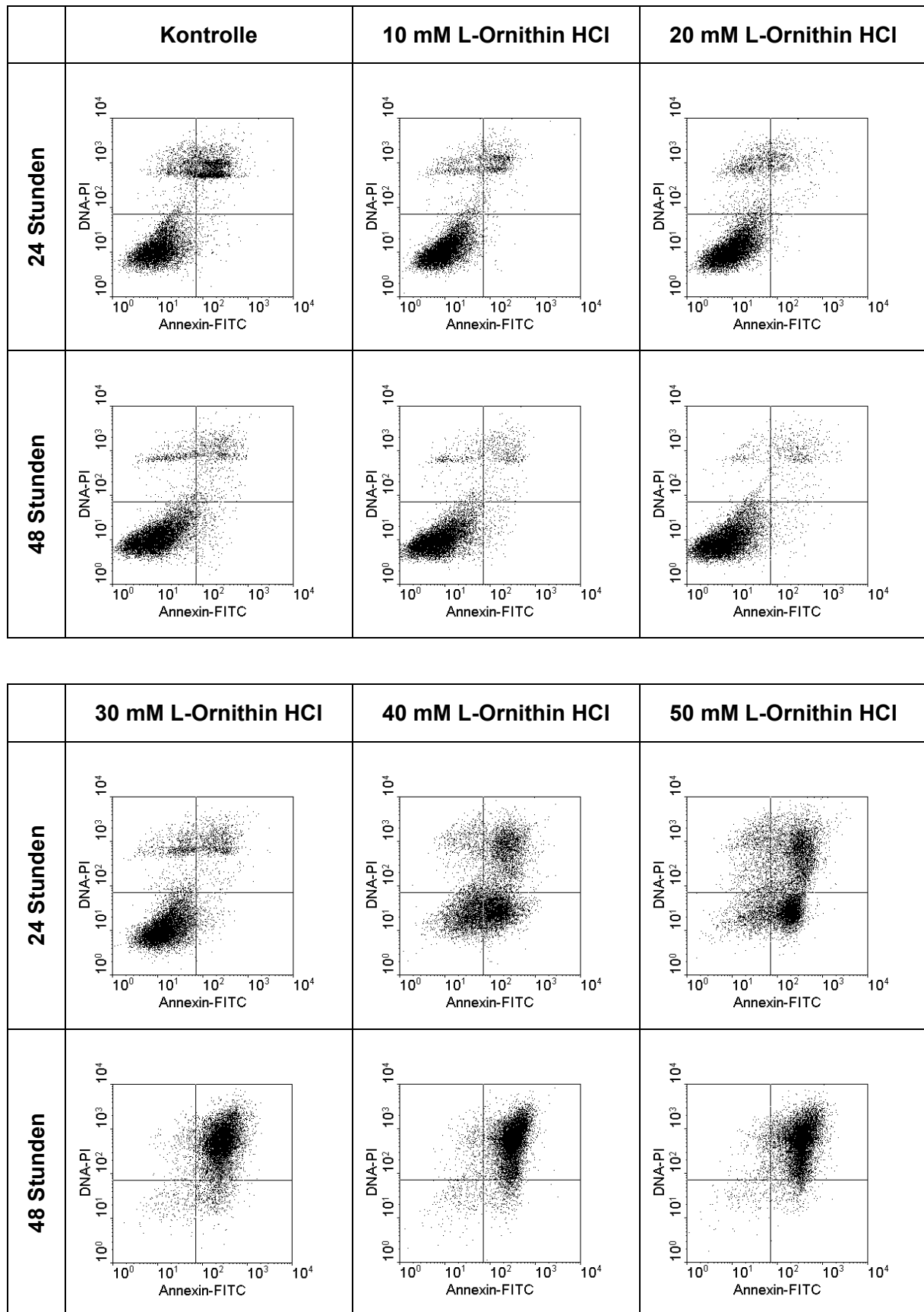
In den vergleichenden Untersuchungen zur Beeinflussung der keratinozytären Arginase-Aktivität wurden die Aminosäuren L-Arginin, D-Arginin und L-Citrullin der Wirkung von L-Ornithin gegenübergestellt. Es zeigte sich, daß L-Arginin HCl unter *In-vitro*-Bedingungen den Umsatz der Arginase-Reaktion signifikant steigern kann. D-Arginin HCl und L-Citrullin hingegen üben keinen nachweisbaren Einfluß aus.

Die Expression der keratinozytären Ornithin-Decarboxylase wurde durch L-Ornithin HCl nicht beeinflusst. Für das Verständnis dieses für den L-Ornithin-Metabolismus und die Aufrechterhaltung der zellulären Funktionen (Proliferation und Differenzierung) wichtigen Enzyms sind weitere Untersuchungen notwendig. Besonderes Interesse besteht an der Aktivität der Ornithin-Decarboxylase sowie der Zusammensetzung des intrazellulären Polyamin-Pools unter dem Einfluß von L-Ornithin.

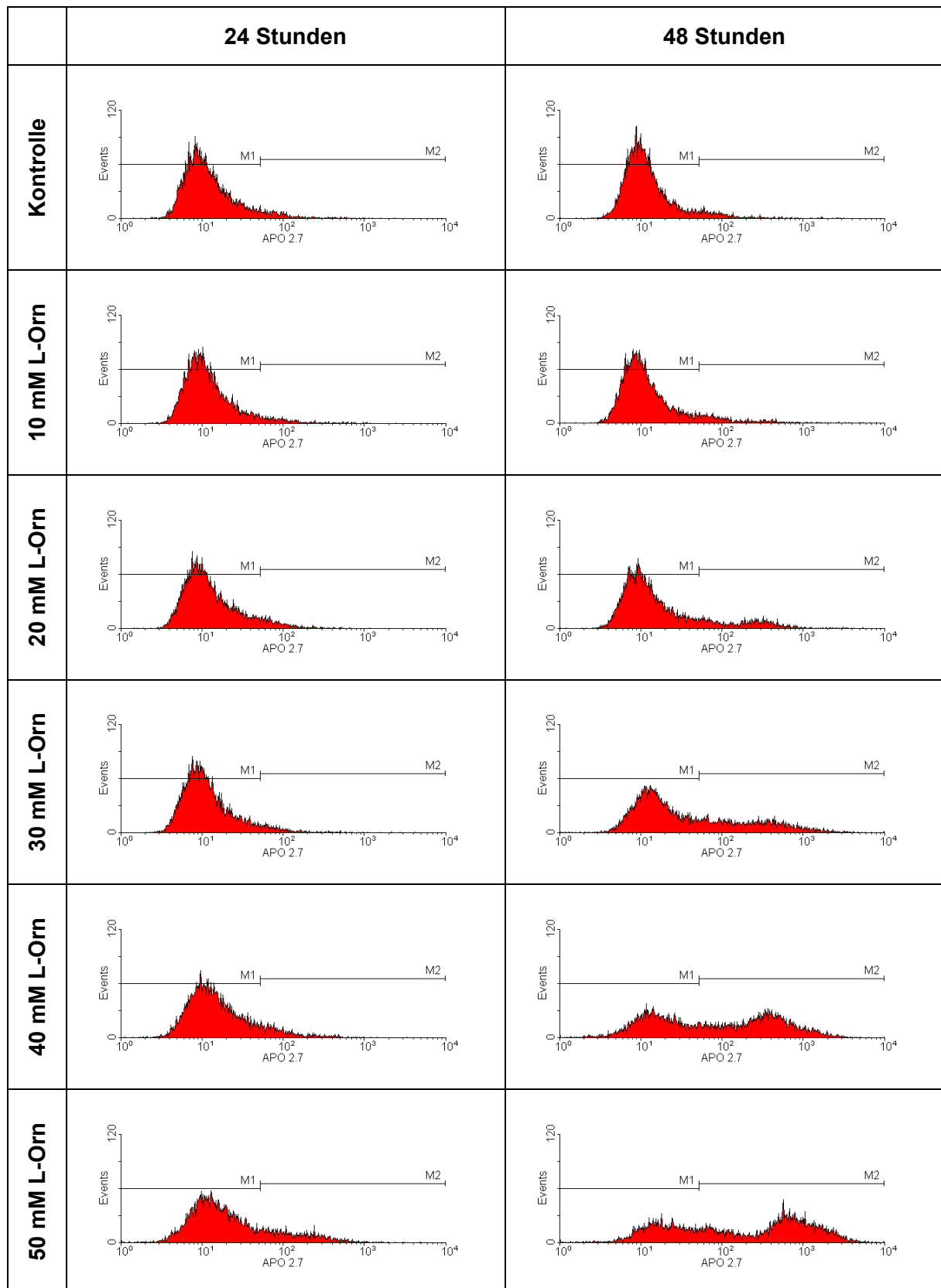
Aufgrund seiner günstigen physikochemischen Eigenschaften ließ sich L-Ornithin HCl in halb feste Standard-Vehikelsysteme zu 10 % einarbeiten. Die physikalische Stabilität wurde nicht beeinflusst. Nach kutaner Applikation kam es zu einer schnellen Liberation des Wirkstoffes aus dem hydrophilen und amphiphilen Vehikelsystem. Unter Verwendung des amphiphilen Systems penetrierten die größten Wirkstoff-Mengen ins Gewebe, es konnte die höchste Wirkstoff-Konzentration im Gewebe erreicht werden. Die lipophile Zubereitung hingegen war nur unzureichend für die kutane Applikation von L-Ornithin HCl geeignet. Es ist davon auszugehen, daß unter *In-vivo*-Bedingungen nach kutaner Applikation L-Ornithin-HCl-haltiger Zubereitungen (10 %) ein ausreichendes Konzentrations-Zeit-Profil in der Haut zu erreichen ist. Das amphiphile System erscheint für die Anwendung von L-Ornithin HCl an gesunder Haut am geeignetsten. Eine mögliche therapeutische, supportive oder kosmetisch Anwendung bedarf einer weiterer galenischen Optimierung.

Die dermatotherapeutische Potenz der nicht-essentiellen, nicht-proteinogenen basischen Aminosäure L-Ornithin ist insbesondere unter dem Aspekt der Modulation des Polyamin- und Prolin-Stoffwechsels sowie der Hemmung des NO-Systems in weiteren Untersuchungen aufzuklären. Eine mögliche Anwendung ist in der supportiven externen Therapie entzündlicher, regenerativer und hyperproliferativer Prozesse vorstellbar.

## 7 Anhang

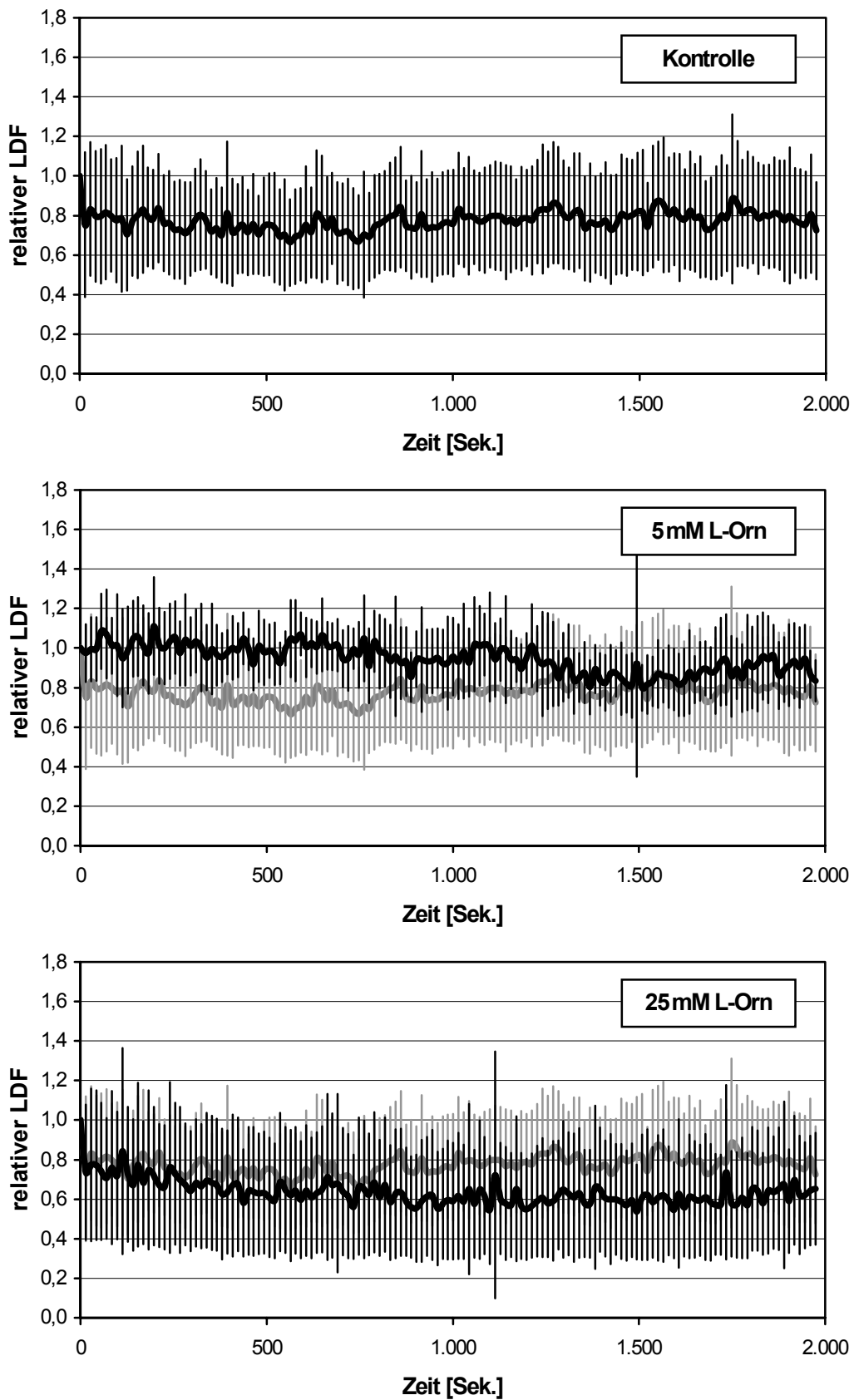


**Abb. 7.0-1** Exemplarische Dotplot-Darstellungen der Annexin V / PI-Doppelfärbung nativer Keratinozyten nach Inkubation mit L-Ornithin HCl (24 bzw. 48 h)

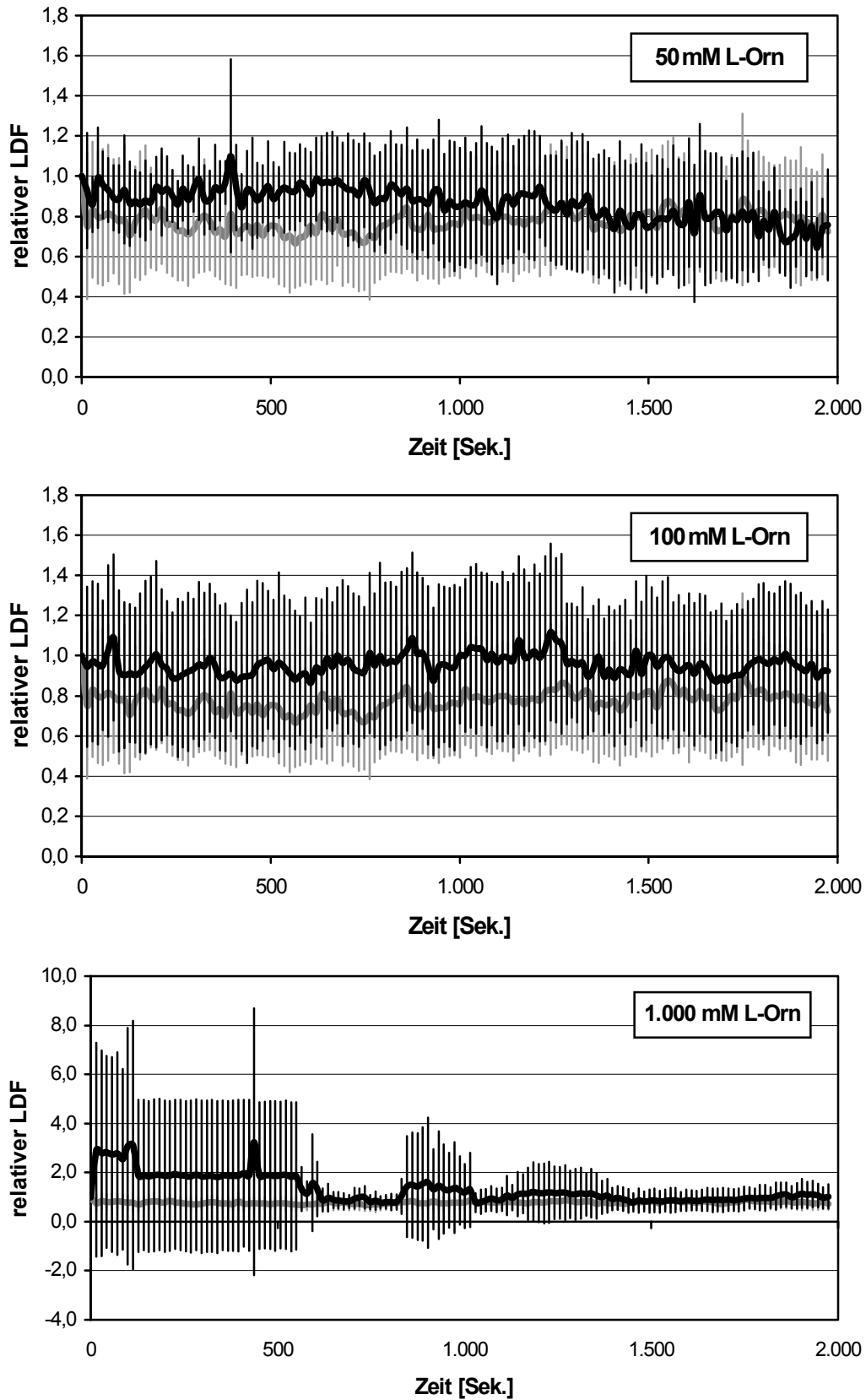


**Abb. 7.0-2** Exemplarische Darstellung der APO 2.7-Markierung nativer Keratinozyten nach Inkubation mit L-Ornithin HCl, M1 = vitaler Anteil (APO 2.7-negativ), M2 = apoptotischer Anteil (APO 2.7-positiv)





**Abb. 7.0-3** Änderungen des relativen Laser-Doppler-Fluxes (LDF) im HET-CAM-Modell nach Applikation von 100  $\mu$ l L-Ornithin-HCl-Lösung (0; 5 bzw. 25 mM); n=12



**Abb. 7.0-4** Änderungen des relativen Laser-Doppler-Fluxes (LDF) im HET-CAM-Modell nach Applikation von 100  $\mu$ l L-Ornithin-HCl-Lösung (50; 100 bzw. 1.000 mM); n=12 (beachte veränderten Maßstab des relativen LDF in 1.000 mM)

## 8 Literatur

1. Roche - Lexikon Medizin. 3., neubearbeitete Auflage, Urban und Schwarzenberg, München, Wien, Baltimore, 1993
2. Wissenschaftliche Begleitinformation zum Protein Assay Kit, Sigma Diagnostics. (1994)
3. Wissenschaftliche Begleitinformation zu APO 2.7 - PE Antikörper, Immunotech Marseille. (1998)
4. DAB 2002 - Deutsches Arzneibuch 2002. Deutscher Apotheker Verlag, Stuttgart, 2002
5. DAC - Deutscher Arzneimittel-Codex. Band I, Ergänzung: Stand 1. Nov. 2002, Deutscher Apotheker Verlag, Stuttgart, 2002
6. Wissenschaftliche Begleitinformation zu Harnstoff / Ammoniak UV-Test; R-Biopharm. (2002)
7. Abd-El-Aleem SA, Ferguson MWJ et al.: Expression of nitric oxide synthase isoforms and arginase in normal human skin and chronic venous leg ulcers. *J Pathol* 191 (2000) 434-442
8. Agner T and Serup J: Skin reactions to irritants assessed by non-invasive bioengineering methods. *Contact Dermatitis* (1989)352
9. Albina JE, Abate JA et al.: Role of ornithine as proline precursor in healing wounds. *J Surg Res* 55 (1993) 97-102
10. Albina JE, Mills CD et al.: Temporal expression of different pathways of l-arginine metabolism in healing wounds. *J Immunol* 144 (1990) 3877-3880
11. Ando A, Ueda M et al.: Heterogeneity in ornithine cytotoxicity of bovine retinal pigment epithelial cells in primary culture. *Exp Eye Res* 70 (2000) 89-96
12. Auterhoff H, Knabe J, Höltje HD: Lehrbuch der Pharmazeutischen Chemie. 13. Auflage, Wissenschaftliche Verlagsgesellschaft mbH, Stuttgart, 1994, S. 310-312
13. Auvinen M, Laine A et al.: Human ornithine decarboxylase - overproducing NIH3T3 cells induce rapidly growing, highly vascularized tumors in nude mice. *Cancer Res* 57 (1997) 3016-3025
14. Auvinen M, Paasinen A et al.: Ornithine decarboxylase activity is critical for cell transformation. *Nature* 360 (1992) 355-358
15. Barbul B, Lazarou SA et al.: Arginine enhances wound healing and lymphocyte immune responses in humans. *Surgery* 108 (1990) 331-336
16. Barron JT, Gu L et al.: Effect of serum albumin on vascular smooth muscle metabolism. *BBA - Bioenergetics* 1459 (2000) 35-48
17. Bauer A and Elsner P: The environment and the skin. *Curr Probl Dermatol* 28 (1999) 153-160

18. Bayuet A, Lavoine A et al.: Comparison of the effects of various amino acids on glycogen synthesis, lipogenesis and ketogenesis in isolated rat hepatocytes. *Biochem J* 273 (1991) 57-62
19. Beeman CS and Rossamondo EF: Assay of ornithine decarboxylase activity by reversed-phase high-performance liquid chromatography. *J Chromatogr* 496 (1989) 101-110
20. Beruter J, Colombo JP et al.: Purification and properties of arginase from human liver and erythrocytes. *Biochem J* 175 (1978) 449-454
21. Bewley MC, Jeffrey PD et al.: Crystal structures of *Bacillus Caldovelox* arginase in complex with substrate and inhibitors reveal new insight into activation, inhibition and catalysis in the arginase superfamily. *Structure* 7 (1999) 435-448
22. Bommarius AS, Makryaleas K et al.: An enzymatic route to L-ornithine from L-arginine - activation and stabilisation studies on L-arginase. *Biomed Biochim Acta* 50 (1991) 249-255
23. Bratton DL, Fadok VA et al.: Polyamine regulation of plasma membrane phospholipid flip-flop during apoptosis. *J Biol Chem* 274 (1999) 28113-28120
24. Bruch-Gerharz D, Schnorr O et al.: Arginase 1 overexpression in psoriasis: Limitation of inducible nitric oxide synthase activity as a molecular mechanism for keratinocyte hyperproliferation. *Am J Pathol* 162 (2003) 203-211
25. Byus CV and Wu VS: The level of substrate ornithine can alter polyamine-dependent DNA synthesis following phorbol ester stimulation of cultured hepatoma cells. *J Cell Physiol* 149 (1991) 9-17
26. Chabanon H, Persson L et al.: Increased translation efficiency and antizyme-dependent stabilisation of ornithine decarboxylase in amino acid-supplemented human colon adenocarcinoma cells, Caco-2. *Biochem J* 348 (2000) 401-408
27. Clifford A, Morgan D et al.: Role of ornithine decarboxylase in epidermal tumorigenesis. *Cancer Res* 55 (1995) 1680-1686
28. Cohen NS, Cheung CW et al.: Channeling of extramitochondrial ornithine to matrix ornithine transcarbamylase. *J Biol Chem* 262 (1987) 203-208
29. Cooper AJL, Nieves E et al.: Short-term metabolic fate of [<sup>13</sup>N]ammonia in rat liver in vivo. *J Biol Chem* 262 (1987) 1073-1080
30. Cox JD, Cama E et al.: Mechanistic and metabolic inferences from binding analogues and products to arginase. *Biochemistry* 40 (2001) 2689-2701
31. Crouse RG and Rothberg S: Evaluation of the enzymes of the krebs-henseleit cycle in human epidermis. *J Invest Dermatol* 36 (1961) 287-292
32. Danzin C and Persson L: L-ornithine-induced inactivation of mammalian ornithine decarboxylase in vitro. *Eur J Biochem* 166 (1987) 45-48
33. DeGeorge GL, Heck DE et al.: Arginine metabolism in keratinocytes and macrophages during nitric oxide biosynthesis. *Biochemical Pharmacology* 54 (1997) 103-112
34. Devés R and Boyd CAR: Transport for cationic amino acids in animal cells: discovery, structure, and function. *Physiol Rev* 78 (1998) 487-545

35. Diez AM, Campo ML et al.: Trypsin digestion of arginase: evidence for stable conformation manganese directed. *Int J Biochem* 24 (1992) 1925-1932
36. Draize JH, Woodard G et al.: Methods for the study of irritation and toxicity of substances applied topically to the skin and mucous membranes. *J Pharm* 82 (1944) 377-390
37. Durante W, Liao L et al.: Physiological cyclic stretch directs L-arginine transport and metabolism to collagen synthesis in vascular smooth muscle. *FASEB J* 14 (2000) 1775-1783
38. Durante W, Liao L et al.: Transforming growth factor- $\beta$ 1 stimulates L-Arginine transport and metabolism in vascular smooth muscle cells - Role in polyamine and collagen synthesis. *Circulation* 103 (2001) 1124-1127
39. Elias PM: Epidermal lipids, barrier function and desquamation. *J Invest Dermatol* 80 (1983) 44-49
40. Elias PM: Epidermal lipids, membranes and keratinization. *J Invest Dermatol* 80 (1983) 44-47
41. Elias PM: Epidermal barrier function: intercellular lamellar lipid structures, origin, composition and metabolism. *J Contr Release* 15 (1991) 199-208
42. Ellis RE, Yuan JY et al.: Mechanisms and functions of cell death. *Annu Rev Cell Biol* 7 (1991) 663-698
43. Fafournoux P, Bruhat A et al.: Amino acid regulation of gene expression. *Biochem J* 351 (2000) 1-12
44. Feldmann RJ and Maibach HJ: Absorption of some organic compounds through the skin in man. *J Invest Dermatol* 54 (1970) 399-404
45. Fesus L, Davies PJ et al.: Apoptosis: molecular mechanisms in programmed cell death. *Eur J Cell Biol* 56 (1991) 170-177
46. Filho PY, Bracht A et al.: The urea cycle in the liver of arthric rats. *Mol Cell Biochem* 243 (2003) 97-106
47. Flick DA and Gifford GE: Comparison of in vitro cytotoxic assays for tumor necrosis factor. *J Immun Meth* 68 (1984) 167-175
48. Franz TJ: Percutaneous absorption on the relevance of in vitro data. *J Invest Dermatol* 64 (1975) 190-195
49. Franz TJ: The finite dose technique as a valid in vitro model for the study of percutaneous absorption in man. *Curr Probl Dermatol* 7 (1978) 58-68
50. Gentry MK and Dalrymple JM: Quantitative microtiter cytotoxicity assay for shigella toxin. *J Clin Microbiol* 12 (1980) 361-366
51. Gillies RJ, Didier N et al.: Determination of cell number in monolayer cultures. *Anal Biochem* 159 (1986) 109-113
52. Gokmen SS, Aygit AC et al.: Significance of arginase and ornithine in malignant tumors of the skin. *J Lab Clin Med* 137 (2001) 340-344

53. Gray RGF, Hill SE et al.: Studies on the pathway from ornithine to proline in cultured skin fibroblasts with reference to the defect in hyperornithinaemia with hyperammonaemia and homocitrullinuria. *J Inher Metab Dis* 6 (1983) 143-148
54. Hawel L 3rd, Tjandrawinata RR et al.: Selective putrescine export is regulated by insulin and ornithine in reuber H35 hepatoma cells. *Biochim Biophys Acta* 1222 (1994) 15-26
55. Hirsch A, Tozzi CA et al.: Flow cytometric determination of cell proliferation in hypertensive blood vessels. *Cytometry* 37 (1999) 81-84
56. Hirsch T, Marchetti P et al.: The apoptosis-necrosis paradox. Apoptogenic proteases activated after mitochondrial permeability transition determine the mode of cell death. *Oncogene* 15 (1997) 1573-1581
57. Huschka C: Untersuchung zur Wirkung von Biotin auf humane Keratinozyten und zur Modulation der Biotinpenetration in humane Haut. Halle, Univ., Math.-nat.-tech. Fak., Diss., 1998
58. Huschka C, Wohlrab J et al.: Moderne Vehikelsysteme für die topische Therapie. *Akt Dermatol* 26 (2000) 355-361
59. Indiveri C, Tonazzi A et al.: The purified and reconstituted ornithine/citrulline carrier from rat liver mitochondria catalyses a second transport mode: ornithine<sup>+</sup>/H<sup>+</sup> exchange. *Biochem J* 341 (1999) 705-711
60. Iyer R, Jenkinson CP et al.: The human arginases and arginase deficiency. *J Inher Metab Dis* 21 (1998) 86-100
61. Jamshidzadeh A, Aminlari M et al.: Rhodanese and arginase activity in normal and cancerous tissues of human breast, esophagus, stomach and lung. *Arch Irn Med* 4 (2001) 88-92
62. Jenkinson CP, Grody WW et al.: Comparative properties of arginases. *Comp Biochem Physiol B Biochem Mol Biol* 114 (1996) 107-132
63. Kakác B, Vejdeck ZJ: Handbuch der Kolometrie, BAND III: Kolometrie in der Biologie, Biochemie und Medizin. Gustav Fischer Verlag, Jena, 1962
64. Kalweit S, Gerner I et al.: Validation project of alternatives for the Draize eye test. *Mol Toxicol* 1 (1987) 597-603
65. Kaspar K, Vogt M et al.: 100-MHz-Sonographie zur Darstellung des Stratum corneum an der Palmarhaut nach Anwendung verschiedener Externa. *Ultraschall Med* 20 (1999) 110-114
66. Kaysen GA and Strecker HJ: Purification and properties of arginase of rat kidney. *Biochem J* 133 (1973) 779-788
67. Kerr JF, Winterford CM et al.: Apoptosis. Its significance in cancer and cancer therapy. *Cancer* 73 (1994) 2013-2026
68. Kerr JF, Wyllie AH et al.: Apoptosis: a basic biological phenomenon with wide-ranging implications in tissue kinetics. *Br J Cancer* 26 (1972) 239-257
69. Knorst MT, Neubert R et al.: Analytical methods for measuring urea in pharmaceutical formulations. *J Pharm Biomed Anal* 15 (1997) 1627-1632

70. Koester SK, Roth P et al.: Monitoring early cellular responses in apoptosis is aided by the mitochondrial membrane protein-specific monoclonal antibody APO 2.7. *Cytometry* 29 (1997) 306-312
71. Köszegi D, Nothhelfer B et al.: Der HET-CAM-Test. *Euro Cosmetics* 6 (1999) 29-33
72. Krebs HA, Hems R et al.: Some regulatory mechanism in the synthesis of urea in the mammalian liver. *Adv Enzyme Regul* 11 (1973) 361-377
73. Krebs HA and Hesneleit K: Untersuchungen über die Harnstoffbildung im Tierkörper. *Hoppe-Seyler's Z.Physiol Chem* 210 (1932) 33-66
74. Kunte C and Wolff H: Aktuelle Therapie der Hypertrichose. *Hautarzt* 52 (2001) 993-997
75. Lauharanta J and Käpyaho K: Arginase activity and polyamine biosynthesis in psoriasis. *Acta Derm Venereol* 63 (1983) 277-282
76. Leighton J, Nassauer J et al.: The chick embryo in toxicology: an alternative to the rabbit eye. *Fd Chem Toxic* 23 (1985) 293-298
77. Lowe NJ, Breeding J et al.: Cutaneous polyamines in psoriasis. *Br J Dermatol* 107 (1982) 21-25
78. Löffler G, Petrides PE: *Biochemie und Pathobiochemie*. 6. Auflage, Springer-Verlag, Berlin, Heidelberg, New York usw., 1998
79. Luepke NP: Hen's egg chorioallantoic membrane test for irritation potential. *Fd Chem Toxic* 23 (1985) 287-291
80. Majno G and Joris I: Apoptosis, oncosis, and necrosis. An overview of cell death. *Am J Pathol* 146 (1995) 3-15
81. McCullough JL, Peckham P et al.: Regulation of epidermal proliferation in mouse epidermis by combination of difluoromethyl ornithine (DFMO) and methylglyoxal bis (guanylylhydrazone) (MGBG). *J Invest Dermatol* 85 (1985) 518-521
82. Mehendale HM: Amplified interactive toxicity of chemicals at nontoxic levels: mechanistic considerations and implications to public health. *Environ Health Perspect* 102 (1994) 139-149
83. Meijer AJ, Gimpel JA et al.: Role of anion translocation across the mitochondrial membrane in the regulation of urea synthesis from ammonia by isolated rat hepatocytes. *J Biol Chem* 250 (1975) 7728-7738
84. Meijer AJ, Lof C et al.: Control of ureogenesis. *Eur J Biochem* 148 (1985) 189-196
85. Morris SM Jr: Regulation of enzymes of the urea cycle and arginine metabolism. *Annu Rev Nutr* 22 (2002) 87-105
86. Neubert R, Schmalfuß U et al.: Neuere Entwicklung auf dem Gebiet der dermalen Wirkstoffapplikation. *Pharm Ind* 60 (1998) 149-156
87. Neubert R and Wohlrab W: In vitro methods for the biopharmaceutical evaluation of topical formulations. *Acta Pharm Technol* 36 (1990) 197-206
88. Neubert R, Wohlrab W, Marsch WC: *Dermatopharmazie*. Wissenschaftliche Verlagsgesellschaft mbH, Stuttgart, 2001

89. Niedner R, Ziegenmeyer J: Dermatika: therapeutischer Einsatz, Pharmakologie und Pharmazie. Wissenschaftliche Verlagsgesellschaft mbH, Stuttgart, 1992
90. Nilsson EG, Tenland T et al.: Evaluation of a laser Doppler flowmeter for measurement of tissue blood flow. *Trans Biomed Eng* 27 (1980) 597-604
91. Nitta T, Igarashi K et al.: Polyamine depletion induces apoptosis through mitochondria-mediated pathway. *Exp Cell Res* 276 (2002) 120-128
92. O'Brien IEW, Reutelingsperger CPM et al.: Annexin-V and TUNEL use in monitoring the progression of apoptosis in plants. *Cytometry* 29 (1997) 28-33
93. Ohtsuka T, Koibuchi N et al.: Elevated expression of epidermal ornithine decarboxylase mRNA in scleroderma. *Br J Dermatol* 139 (1998) 1047-1048
94. Penzlin H: Lehrbuch der Tierphysiologie. 6. Auflage, Gustav Fischer Verlag, Jena, Stuttgart, 1996
95. Pepper C, Thomas A et al.: Flow cytometric assessment of three different methods for the measurement of in vitro apoptosis. *Leuk Res* 22 (1998) 439-444
96. Pohloudek R, Beyrick T: Organische Analyse. Akademische Verlagsgesellschaft, Leipzig, 1975
97. Ray RM, Viar MJ et al.: Polyamine depletion delays apoptosis of rat intestinal epithelial cells. *Am J Physiol Cell Physiol* 278 (2000) 480-489
98. Reczkowski RS and Ash DE: Rat liver arginase: kinetic mechanism, alternate substrates and inhibitors. *Arch Biochem Biophys* 312 (1994) 31-37
99. Rosenbruch M and Holst A: The chick embryo yolk-sac blood vessel system as an experiment model for irritation and inflammation. *Toxic In Vitro* 4 (1990) 327-331
100. Santos MF, Viar MJ et al.: Polyamines are important for attachment of IEC-6 cells to extracellular matrix. *Am J Physiol* 273 (1997) G175-G183
101. Saria A: Alternativen zum Tierversuch. G. Thieme, Stuttgart; 1988, S. 121-125
102. Savill J: Phagocyte recognition of apoptotic cells. *Biochem Soc Trans* 24 (1996) 1065-1069
103. Schmidt RF, Thews G: Physiologie des Menschen. 24. Auflage, Springer-Verlag, Berlin, Heidelberg, New York usw., 1990
104. Seyffert W, Gassen HG, Hess O, Jäckle H, Fischbach KF: Lehrbuch der Genetik. Gustav Fischer Verlag, Stuttgart, Jena, Lübeck, Ulm, 1998
105. Shantz LM and Pegg AE: Translational regulation of ornithine decarboxylase and other enzymes of the polyamine pathway. *Int J Biochem Cell Biol* 31 (1999) 107-122
106. Shapiro J and Lui H: Vaniqa - eflornithine 13.9% cream. *Skin Therapy Lett* 6 (2001) 1-3
107. Siemes C: Die Einflußnahme von L-Arginin auf den epidermalen Harnstoff-Metabolismus. Halle, Univ., Math.-nat.-tech. Fak., Dipl., 2000
108. Sipila I, Rapola J et al.: Supplementary creatine as a treatment for gyrate atrophy of the choroid and retina. *N Engl J Med* 304 (1981) 867-870



109. Soler AP, Gilliard G et al.: Modulation of murine hair follicle function by alterations in ornithine decarboxylase activity. *J Invest Dermatol* 106 (1996) 1108-1113
110. Spanel-Borowski K: The chick chorioallantoic membrane as test system for biocompatible materials. *Res Exp Med* 189 (1989) 69-75
111. Spielmann H: HET-CAM test. *Methods Mol Biol* 43 (1995) 199-204
112. Stooss A: Die Rolle des Transkriptionsfaktors AP-1 bei der Ceramid-induzierten Apoptose in der humanen Keratinozytenzelllinie HaCaT. Berlin, Univ., Med. Fak., Diss., 1999
113. Swarbrick J, Lee G et al.: Drug permeation through human skin. *J Pharm Sci* 73 (1984) 1352-1355
114. Thomas T and Thomas TJ: Polyamines in cell growth and cell death: molecular mechanisms and therapeutic applications. *Cell Mol Life Sci* 58 (2001) 244-258
115. Tobias KE and Kahana C: Exposure to ornithine results in excessive accumulation of putrescine and apoptotic cell death in ornithine decarboxylase overproducing mouse myeloma cells. *Cell Growth Differ* 6 (1995) 1279-1285
116. Tomakidi P, Koke U et al.: Assessment of acute cyto- and genotoxicity of corrosion eluates obtained from orthodontic materials using monolayer cultures of immortalized human gingival keratinocytes. *J Orofac Orthop* 61 (1999) 2-19
117. Tronnier H: Zur Bedeutung der Grundlage in der dermatologischen Therapie. *Haut Geschl Krkh* 44 (1968) 155-168
118. Walker M, Chambers LA et al.: Significance of vehicle thickness to skin penetration of halcinonide. *Int J Pharm* 70 (1991) 167-172
119. Wiegler K, Lange N et al.: Zur Anwendung des HET-CAM-Testes für die Ermittlung irritativer Effekte von Huminsäuren. *Dtsch Tierarztl Wschr* 100 (1993) 412-416
120. Wohlrab J: Der Einfluß von L-Arginin auf die Regulation der epidermalen Arginase. Shaker Verlag, Aachen, 2001
121. Wohlrab J, Siemes C et al.: The influence of l-arginine on the regulation of epidermal arginase. *Skin Pharmacol Appl Skin Physiol* 15 (2002) 44-54
122. Wohlrab W: Die therapeutische Harnstoffwirkung auf die Haut. *Dermatologica* 155 (1977) 97-107
123. Wohlrab W: Der Einfluß von Harnstoff auf die Wasserbindungskapazität der menschlichen Hornschicht. *Dermatol Monatsschr* 174 (1988) 622-627
124. Wohlrab W: Welche Harnstoffkonzentration ist für die externe Therapie notwendig? *Dermatol Monatsschr* 174 (1988) 94-98
125. Wohlrab W: Bedeutung von Harnstoff in der externen Therapie. *Hautarzt* 40 (1989) 935-941
126. Wohlrab W: Einführung Neurodermitis und Harnstoff. *Hautarzt* 43 (1992) 111-114
127. Wohlrab W and Wellner K: Quantitative evaluation of urea in stratum corneum of human skin. *Arch Dermatol Res* 285 (1993) 239-240

128. Wu G and Morris SM: Arginine metabolism: nitric oxide and beyond. *Biochem J* 336 (1998) 1-17
129. Wu VS and Byus CV: A role for ornithine in the regulation of putrescine accumulation and ornithine decarboxylase activity in reuber H35 hepatoma cells. *Biochim Biophys Acta* 804 (1984) 89-99
130. Wyllie AH, Kerr JF et al.: Cell death: the significance of apoptosis. *Int Rev Cytol* 68 (1980) 251-306
131. Yuan Q, Ray RM et al.: Polyamine regulation of ornithine decarboxylase and its antizyme in intestinal epithelial cells. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 280 (2001) G130-G138
132. Zhang C, Ao Z et al.: A mitochondrial membrane protein defined by a novel monoclonal antibody is preferentially detected in apoptotic cells. *J Immunol* 157 (1996) 3980-3987

## 9 Thesen

- L-Ornithin ist eine nicht-essentielle, nicht-proteinogene basische Aminosäure, die im Stoffwechsel ureotelischer (Harnstoff-ausscheidender) Lebewesen aus L-Arginin unter Abspaltung von Harnstoff gebildet wird.
- Die komplexe metabolische Einbindung von L-Ornithin im keratinozytären Stoffwechsel läßt diese Aminosäure, insbesondere im Kontext mit der Synthese von Harnstoff, Polyaminen und Vorstufen des Kollagens, als eine wichtige und für neue pharmakotherapeutische Ansätze potente Wirksubstanz erscheinen.
- Gegenstand der Untersuchungen der vorliegenden Arbeit war die präklinische Validierung von L-Ornithin für die topische Applikation unter Verwendung des Monohydrochlorids.
- In den *In-vitro*-Untersuchungen zur Toxizität von L-Ornithin HCl zeigte sich ein konzentrations- und zeitabhängiger Einfluß auf die Vitalität und das Proliferationsverhalten nativer Keratinozyten.
- Nach 24-stündiger Inkubation mit L-Ornithin HCl kam es zur Reduktion der Vitalität (Gentianaviolett-Färbung) ab einer Konzentration von 40 mM, nach 48 Stunden bereits ab 30 mM.
- Die Proliferation nativer Keratinozyten, erfaßt mittels [<sup>3</sup>H]-Thymidin-Einbau, wurde nach 12-stündiger Inkubation mit L-Ornithin HCl  $\geq 40$  mM gehemmt. Nach 24 Stunden trat dieser Effekt bereits ab 30 mM auf.
- *In vitro* führte die Inkubation mit hohen Konzentrationen L-Ornithin HCl ( $\geq 30$  mM) konzentrations- und zeitabhängig zur Apoptose-Induktion nativer Keratinozyten. Diese konnte übereinstimmend flowzytometrisch anhand der Annexin V / PI- und APO 2.7-Färbung nachgewiesen werden.
- Unter *In-vivo*-Bedingungen zeigten sich im HET-CAM-Modell zeit- und konzentrationsabhängig irritativ-toxische Effekte nach Applikation von L-Ornithin HCl. Die halbquantitativ bestimmten Parameter Hämorrhagie, Membranverfärbung und Letalität, sowie die Ergebnisse der Laser-Doppler-Fluxmetrie lassen extern applizierte L-Ornithin-HCl-Lösung ( $\leq 100$  mM) als unbedenklich erscheinen.
- L-Ornithin HCl ließ sich komplikationslos in herkömmliche halbfeste Standard-Vehikelsysteme zu 10 % einarbeiten und beeinflusste deren physikalische Stabilität nicht.

- Die dermale Bioverfügbarkeit von L-Ornithin HCl nach topischer Applikation halbfester Zubereitungen war für das amphiphile Vehikelsystem am günstigsten. Die lipophile Zubereitung war dagegen für die kutane Applikation von L-Ornithin HCl nur unzureichend geeignet.
- Unter *In-vitro*-Bedingungen hemmt L-Ornithin HCl die keratinozytäre Harnstoff-Synthese nach 24-stündiger Inkubation ab einer Konzentration von 1 mM. Dieser Effekt kann in Zusammenhang mit einem verminderten intrazellulären L-Arginin-Angebot ( $\gamma^+$ -System) und einer L-Ornithin-vermittelten negativen Rückkopplung in der terminalen Arginase-Reaktion gebracht werden.
- In den *In-vitro*-Untersuchungen zur Modulation der keratinozytären Harnstoff-Synthese zeigte sich nach 24-stündiger Inkubation mit L-Arginin HCl ( $\geq 1$  mM) eine Steigerung der Arginase-Aktivität. Die Inkubation mit D-Arginin HCl bzw. L-Citrullin führte zu keinen meßbaren Veränderungen.
- L-Ornithin HCl ( $\geq 10$  mM, 24 Stunden) induzierte *in vitro* die Expression der keratinozytären Arginase.
- Unter *In-vitro*-Bedingungen konnte kein Einfluß von L-Ornithin HCl auf die Expression der Ornithin-Decarboxylase nativer Keratinozyten nachgewiesen werden.

Die vorliegenden Ergebnisse lassen die Verwendung von L-Ornithin HCl für die topische Applikation möglich erscheinen. Die Beurteilung der dermatotherapeutischen Potenz der Aminosäure L-Ornithin, insbesondere unter dem Aspekt der Modulation des Polyamin- und Prolin-Stoffwechsels sowie der Hemmung des NO-Systems, bedarf zusätzlicher Untersuchungen. Eine mögliche Anwendung ist in der supportiven externen Therapie entzündlicher, regenerativer und hyperproliferativer Prozesse zu sehen.

## Danksagung

---

Die vorliegende Doktorarbeit entstand in der Arbeitsgemeinschaft Experimentelle Dermatologie an der Universitätsklinik und Poliklinik für Dermatologie und Venerologie der Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg.

Für die Bereitstellung der Promotionsstelle bedanke ich mich bei der Leitung des Institutes für Angewandte Dermatopharmazie an der Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg e.V..

Mein besonderer Dank gilt Herrn PD Dr. med. Johannes Wohlrab für die Überlassung des interessanten Themas, für die stetige Unterstützung und inspirierenden Diskussionen.

Sehr dankbar bin ich Frau Karin Hölsken und Frau Ursula Schramm für die liebevolle Unterstützung und Betreuung sowie die ständige Hilfsbereitschaft.

Mein Dank gilt auch allen Mitarbeitern der Arbeitsgemeinschaft Experimentelle Dermatologie, die durch ihre stetige Unterstützung zum Gelingen dieser Arbeit beigetragen haben.

Besonderen Dank gilt meinen Eltern und Geschwistern.

**Persönliche Angaben:**

Name: Felix Höche  
Familienstand: ledig  
Staatsangehörigkeit: deutsch  
Geburtsdatum: 31. Oktober 1975  
Geburtsort: Halle / Saale

**schulische Ausbildung**

1982 – 1990 10. Polytechnische Oberschule „Dr. Theodor Neubauer“, Halle / Saale  
  
1990 – 1994 Spezialschule math.-nat.-techn. Richtung (Georg-Cantor-Gymnasium),  
Halle / Saale; Abschluß: Abitur

**berufliche Ausbildung**

1994 – 1995 Zivildienst, Institut für Transfusionsmedizin,  
Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg  
  
1995 – 2001 Studium der Humanmedizin,  
Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg; Abschluß: Staatsexamen

**berufliche Weiterbildung**

01/02 – 06/02 Wissenschaftlicher Mitarbeiter, Institut für Angewandte Dermatophar-  
mazie, Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg  
  
07/02 – 06/03 Arzt im Praktikum, Zentrum für Klinische Studien Dermatologie,  
Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg  
  
seit 07/03 Arzt im Praktikum, Klinik für Dermatologie und Venerologie,  
Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg

## Erklärung

---

Hiermit erkläre ich an Eides statt, die vorliegende Promotionsarbeit selbständig 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 zu haben. Diese Dissertation wurde bisher noch an keiner anderen Hochschule oder Universität vorgelegt.

Halle / Saale, im Juli 2003

Höche F, Recker K, Wohlrab J: Einfluß von L-Ornithin auf den keratinozytären Stoffwechsel. Z Hautkr 76 (2002) 511

Höche F, Recker K, Wohlrab J: Untersuchungen zur In-vitro- und In-vivo-Toxizität von L-Ornithin. JDDG 1, Suppl. 1 (2003) 169

Höche F, Rzepka K, Recker K, Wohlrab J: Beeinflussung der keratinozytären Harnstoffsynthese. JDDG 1, Suppl. 1 (2003) 169

Recker K, Höche F, Wohlrab J: Beeinflussung der Genexpression und Proteinbiosynthese des  $\gamma^+$ -Transporters durch kationische Aminosäuren in Keratinozyten. Z Hautkr 76 (2002) 511

Recker K, Höche F, Wohlrab J: Expression des  $\gamma^+$ -Systems in Keratinozyten und humanen dermalen mikrovaskulären Endothelzellen (HDMEC). JDDG 1, Suppl. 1 (2003) 168

Recker K, Höche F, Wohlrab J: Regulation des zellulären Transports kationischer Aminosäuren in der Haut. JDDG 1, Suppl. 1 (2003) 168

Rzepka K, Höche F, Recker K, Wohlrab J: Untersuchungen zum Einfluss von Agmatinsulfat auf den Stoffwechsel humaner nativer Keratinozyten. JDDG 1, Suppl. 1 (2003) 168