

Aus der Universitätsklinik und Poliklinik für Dermatologie und Venerologie  
des Universitätsklinikums Halle (Saale)  
(Direktor: Prof. Dr. med. habil. Wolfgang Ch. Marsch)

## **„Ex-vivo-Untersuchungen zur kutanen Bioverfügbarkeit von L-Citrullin nach epikutaner Applikation“**

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

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

von Helen Sterz  
geboren am 20. Oktober 1986 in Halle/Saale

Betreuer: Prof. Dr. Johannes Wohlrab (Halle)

Eröffnungsdatum: 10.02.2015  
Verteidigungsdatum: 16.12.2015

Gutachter:  
1. Prof. Dr. Johannes Wohlrab (Halle)  
2. Prof. Dr. Reinhard Neubert (Halle)  
3. PD Dr. Joachim Fluhr (Berlin)

Meiner Großmutter Ingrid Sterz  
in Liebe gewidmet.

## Referat

Die vorliegende Arbeit beschäftigt sich mit der kutanen Bioverfügbarkeit der Aminosäure L-Citrullin nach epikutaner Applikation ex vivo. Im Vordergrund steht dabei die Untersuchung der Penetrations- und Permeationsdynamik. Die Versuche erfolgen an gesunden Hautexzisaten nach Mammareduktionsplastik in einer Diffusionszelle nach Franz. Dabei wird [<sup>3</sup>H]-markiertes radioaktives L-Citrullin in eine halb feste Zubereitung (10 %, definierte Wirkstoffmenge) eingearbeitet und der penetrierte Wirkstoff in den Zielkompartimenten radiochemisch detektiert.

Folgende gewünschte Wirkungen eines erhöhten L-Citrullin-Gehalts der Epidermis werden postuliert: Eine Verbesserung der Hygroskopizität, die Steigerung der keratinozytären Harnstoffsynthese, die Reduktion des inflammatorischen Radikals NO, die antioxidative Wirkung von L-Citrullin selbst als „Radikalfänger“ und die strukturelle Verbesserung des Stratum corneum (SC) über die vermehrte Bildung citrullinierter Strukturproteine. Daraus resultiert das dermatopharmazeutische Interesse an der nicht-essentiellen, nicht-proteinogenen Aminosäure L-Citrullin, die eine wichtige Position im Krebs-Heinseleit-Zyklus einnimmt.

Durch extern appliziertes L-Citrullin soll die NO-Synthase-Aktivität (NOS-Aktivität) über negative-Feedback-Hemmung gebremst und somit die NO-Entstehung inhibiert werden, um entzündliche Prozesse zu modulieren. L-Citrullin selbst kann dabei auch aufgrund seines antioxidativen Potenzials in vitalen Zellen die Folgen von oxidativem Stress neutralisieren. Weiterhin steht die Verbesserung des natürlichen Feuchthaltefaktors (NMF) im Vordergrund, um die Hydratation des Stratum corneum zu erhöhen und den transepidermalen Wasserverlust (TEWL) einzuschränken.

L-Citrullin lässt sich aufgrund seiner günstigen physikochemischen Eigenschaften gut in Standardvehikelsysteme einarbeiten. Als besonders geeignet erweist sich das amphiphile Donatorsystem, aus dem L-Citrullin am besten liberiert wird und am schnellsten in die Schichten der Epidermis penetriert. Im Stratum corneum bildet sich ein im zeitlichen Verlauf zunehmendes Depot. Das hydrophile Vehikelsystem realisiert nach prolongierter Applikationsdauer das beste Konzentrations-Zeit-Profil für die Tiefe.

Die Ergebnisse zeigen eine gute Bioverfügbarkeit der Aminosäure L-Citrullin nach epikutaner Applikation. Infolge ihrer günstigen Stellung im Stoffwechsel urothelischer Lebewesen ergeben sich vielfältige Perspektiven für künftige topische Anwendungsgebiete, die mittels klinischer Studien zu erforschen wären.

Helen, Sterz: „Ex-vivo-Untersuchungen zur kutanen Bioverfügbarkeit von L-Citrullin nach epikutaner Applikation“ Halle (Saale), Univ., Med. Fak., Diss., 53 Seiten, 2015

**INHALTSVERZEICHNIS**

|          |   |           |
|----------|---|-----------|
|          | Referat   |           |
|          | Inhaltsverzeichnis .....  | I         |
|          | Verzeichnis der Abkürzungen und Symbole .....   | III       |
| <b>1</b> | <b>Einleitung</b> .....   | <b>1</b>  |
| 1.1      | Einführung in das Thema .....   | 1         |
| 1.2      | L-Citrullin .....   | 3         |
| 1.2.1    | Biochemische und physikalische Eigenschaften von L-Citrullin .....                        | 3         |
| 1.2.2    | Vorkommen von L-Citrullin im humanen Organismus .....                                     | 4         |
| 1.3      | L-Citrullin und keratinozytärer Metabolismus .....  | 5         |
| 1.3.1    | Arginin – Citrullin – Ornithin – Zyklus .....   | 5         |
| 1.3.2    | NO-Synthase und ihre Isoformen .....  | 6         |
| 1.3.3    | Antioxidative Wirkung durch NOS-Inhibition und L-Citrullin .....                          | 8         |
| 1.3.4    | Citrullinierte Proteine .....   | 8         |
| 1.3.5    | L-Citrullin als Bestandteil des Natural Moisturizing Factor (NMF) .....                   | 9         |
| 1.4      | Permeabilität der Haut .....  | 10        |
| 1.4.1    | Dermale Substanzaufnahme .....  | 10        |
| 1.4.2    | Kutane Diffusionsrouten epikutan applizierter Wirkstoffe .....                            | 10        |
| 1.4.3    | Stationäres Penetrationsmodell .....  | 11        |
| 1.5      | Penetrationsverhalten von L-Citrullin in Abhängigkeit vom Vehikelsystem ....              | 12        |
| 1.6      | Zielstellung .....  | 13        |
| <b>2</b> | <b>Material und Methodik</b> .....  | <b>14</b> |
| 2.1      | Material .....  | 14        |
| 2.1.1    | Chemikalien und Lösungen .....  | 14        |
| 2.1.2    | Geräte und Zubehör .....  | 14        |
| 2.1.3    | Software .....  | 15        |
| 2.2      | Methoden .....  | 15        |
| 2.2.1    | Herstellung der Vehikelsysteme .....  | 15        |
| 2.2.2    | Gewinnung von Hautbiopsien und Aufbereitung .....   | 17        |
| 2.2.3    | Penetrationsversuche an humaner Haut ex vivo mittels Franz'scher<br>Diffusionszelle ..... | 17        |
| 2.2.4    | Messung der L-Citrullin-Konzentration .....   | 19        |
| 2.3      | Biometrie .....   | 20        |
| <b>3</b> | <b>Ergebnisse</b> .....   | <b>21</b> |
| 3.1      | Vorbetrachtung .....  | 21        |
| 3.2      | Penetrationsfähigkeit von L-Citrullin .....   | 21        |
| 3.3      | L-Citrullin Konzentration in Abhängigkeit von der Applikationsdauer .....                 | 21        |

|          |  |           |
|----------|--|-----------|
| 3.3.1    | Applikationsdauer 30 Minuten.....  | 21        |
| 3.3.2    | Applikationsdauer 300 Minuten.....   | 22        |
| 3.3.3    | Applikationsdauer 1000 Minuten.....  | 23        |
| 3.3.4    | Permeationsrate von L-Citrullin.....   | 24        |
| 3.4      | Penetrationsverhalten von L-Citrullin .....  | 24        |
| 3.4.1    | Penetration aus der amphiphilen Präparation.....                                       | 25        |
| 3.4.2    | Penetration aus der hydrophilen Präparation .....                                      | 27        |
| 3.4.3    | Penetration aus der lipophilen Präparation.....  | 29        |
| <b>4</b> | <b>Diskussion .....</b>  | <b>31</b> |
| 4.1      | Zeigen sich Unterschiede der verschiedenen Vehikelsysteme im<br>Diffusionsmodell?..... | 31        |
| 4.2      | Werden Unterschiede des Diffusionsmodells durch die Ergebnisse<br>bestätigt? .....     | 35        |
| 4.3      | Welche Effekte sind für die Zielkompartimente zu erwarten?.....                        | 37        |
| 4.3.1    | Hygroskopischer Effekt .....   | 37        |
| 4.3.2    | Erhöhung der antioxidativen Kapazität .....  | 38        |
| 4.3.3    | Citrullinierte Proteine.....   | 39        |
| 4.3.4    | Systemische Verfügbarkeit .....  | 40        |
| 4.4      | Welche Faktoren können die experimentellen Messergebnisse<br>beeinflussen? .....       | 42        |
| 4.4.1    | Franz'sche Diffusionszelle .....   | 42        |
| 4.4.2    | Kryokonservierte Hautproben .....  | 42        |
| 4.4.3    | Zuordnung des Hautkompartiments.....   | 43        |
| 4.4.4    | Beschaffenheit von Hautproben gleichen Ursprungs.....                                  | 43        |
| 4.4.5    | Applikationszeit .....   | 44        |
| <b>5</b> | <b>Zusammenfassung .....</b>   | <b>45</b> |
| <b>6</b> | <b>Literaturverzeichnis .....</b>  | <b>47</b> |
| <b>7</b> | <b>Thesen der Dissertation .....</b> Fehler! Textmarke nicht definiert.                |           |

**Anhang**

**Verzeichnis der Abkürzungen und Symbole**

| Abkürzung         | Bedeutung                                |
|-------------------|--|
| ACPA              | Antikörper gegen citrullinierte Proteine |
| ADC               | Arginin-Decarboxylase                    |
| ADMA              | Asymmetrisches-Dimethyl-Arginin          |
| AGAT              | Arginin-Glycin-Amidino-transferase       |
| AK                | Antikörper                               |
| AS                | Aminosäure                               |
| ARG               | Arginase                                 |
| ASL               | Argininsuccinat-Lyase                    |
| ASS               | Argininsuccinat-Synthetase               |
| BH <sub>4</sub>   | Tetrahydrobiopterin                      |
| CCP               | zyklisch citrulliniertes Peptid          |
| cGMP              | zyklisches Guanosinmonophosphat          |
| Ci                | Curie                                    |
| CIT               | Citrullin                                |
| cpm               | Counts per minute                        |
| DAB               | Deutsches Arzneimittelbuch               |
| DAC               | Deutscher Arzneimittel-Codex             |
| DR                | Dermis                                   |
| EP                | Epidermis                                |
| FAD               | Flavinadenosindinukleotid                |
| FDA               | U.S. Food and Drug Administration        |
| FMN               | Flavinmononukleotid                      |
| GLNase            | Glutaminase                              |
| GLN               | Glutamin                                 |
| GLU               | Glutamat                                 |
| h                 | hour (Stunde)                            |
| [ <sup>3</sup> H] | Tritium                                  |
| HCL               | Hydrochlorid                             |
| H <sub>2</sub> O  | Wasser                                   |
| HWZ               | Halbwertszeit                            |
| L-                | Levo-                                    |
| L-Arg             | L-Arginin                                |
| L-Cit             | L-Citrullin                              |
| LPS               | Lipopolysaccharide                       |
| MBP               | myelin basic protein                     |

## VERZEICHNIS DER ABKÜRZUNGEN UND SYMBOLE

---

|                              |  |
|------------------------------|--|
| mRNA                         | messenger Ribonukleinsäure                           |
| Na                           | Natrium  |
| NaCl                         | Natriumchlorid                                       |
| NADH                         | Nicotinamidadenindinukleotid                         |
| NADPH                        | Nicotinamidadenindinukleotidphosphat                 |
| NMF                          | natural moisturizing factor                          |
| NO                           | Stickstoffmonoxid                                    |
| NO <sub>3</sub> <sup>-</sup> | Nitrat   |
| NOS                          | Stickstoffmonoxid-Synthase                           |
| eNOS                         | endotheliale NOS                                     |
| iNOS                         | induzierbare NOS                                     |
| nNOS                         | neuronale NOS  |
| mtNOS                        | mitochondriale NOS                                   |
| NRF                          | Neues Rezeptur-Formularium                           |
| OAT                          | Ornithin-Aminotransferase                            |
| ODC                          | Ornithin-Decarboxylase                               |
| OCT                          | Ornithin-Transcarbamoylase                           |
| O/W                          | Öl-in-Wasser   |
| PA                           | Polyamine  |
| PAD                          | Protein-Arginyl-Desaminase                           |
| PDB                          | Protein Daten Bank                                   |
| PEG                          | Polyethylenglycol                                    |
| POPOP                        | 1,4-bis-2-(5-Phenylloxazolyl)-Benzen                 |
| PPO                          | 2,5-Diphenoloxazol                                   |
| RCSB                         | Research Collaboratory for Structural Bioinformatics |
| ROS                          | Reaktive Sauerstoffspezies                           |
| SC                           | Stratum corneum                                      |
| SR                           | Standardisierte Rezepturen                           |
| TEWL                         | Transepidermaler Wasserverlust                       |
| Urea                         | Harnstoff  |
| W/O                          | Wasser-in-Öl   |

## **1 EINLEITUNG**

### **1.1 Einführung in das Thema**

Das Interesse an neuen Wirkstoffen zur topischen Applikation ist groß und folglich Gegenstand der Forschung in der Dermatologie. Das Wissen um biologische Prozesse auf zellulärer und molekularer Ebene wächst stetig, ebenso das Verständnis für Transport- und Stoffwechselforgänge in der Haut. Die anatomische Struktur dieses hochaktiven Stoffwechselorgans ist Voraussetzung für dessen Barrierefunktion. Das lipophile Stratum corneum bildet die Hauptpermeabilitätsbarriere der Haut. Es besteht aus avitalen ziegelsteinartig geschichteten Korneozyten, welche in interzellulärem Lipidmörtel lagern (sog. bricks and mortar model) (Touitou, 2002; Trommer, 2012).

Vor Einführung neuer Therapeutika in die klinische Praxis sind präklinische Untersuchungen erforderlich. Dabei ist das Hautorgan durch die Möglichkeit epikutaner Applikation gegenüber anderen Organsystemen leichter zugänglich. Modellversuche mit humaner Haut ex vivo sind etabliert und ohne Belastung für den lebenden Organismus.

Die Effektivität der topischen Applikation hängt in erster Linie davon ab, inwieweit es gelingt, in der angestrebten Hautschicht ein ausreichendes Konzentrations-Zeit-Profil des Wirkstoffes zu erreichen. Dabei sind neben dessen Eigenschaften auch der Hautzustand und vor allem die eingesetzte galenische Grundlage maßgebend. Hier haben sich als klassische Vehikelsysteme amphiphile, hydrophile und lipophile Präparationen bewährt (Neubert et al., 2001; Wohlrab, 2001; Wolf, 2006a).

Die vorliegende Arbeit befasst sich mit der topischen Applikation der Aminosäure L-Citrullin unter in-vitro-Bedingungen. Citrullin wurde in den vergangenen Jahren in vielerlei Hinsicht untersucht, vor allem in Verbindung mit dem Stoffwechsel von Leber, Nieren und Intestinaltrakt (Curis et al., 2005; Cynober et al., 2010). In der dermatopharmazeutischen Forschung ist L-Citrullin bisher wenig repräsentiert, obwohl sich interessante experimentelle Ansätze für topische Effekte konstruieren lassen. In Abhängigkeit vom Kompartiment, in welchem sich die Substanz anreichert, sind unterschiedliche Wirkungen zu erwarten. Dies wären im avitalen Stratum corneum physikochemische Effekte in Zusammenhang mit der Hygroskopizität oder der Bildung eines Depots. In den Schichten der vitalen Epidermis könnte L-Citrullin den mitochondrialen und zytosolischen Metabolismus der Keratinozyten (Harnstoffzyklus) beeinflussen oder im Interstitium wirksam sein. Auch eine Penetration in die Dermis nach Überwindung der Basalmembran wäre vorstellbar.

Jüngere Arbeiten beschäftigten sich sehr ausführlich mit dem epidermalen Argininstoffwechsel. Arginin und Ornithin wurden bereits als vielversprechende Wirksubstanzen in Hinblick auf die topische Anwendung untersucht (Wohlrab, 2001; Höche, 2003).

Im zellulären Metabolismus wird L-Citrullin durch die NO-Synthase-Reaktion (NOS-Reaktion) in gleicher Menge wie NO aus L-Arginin synthetisiert. Heute weiß man, dass bei dieser Reaktion entstehendes NO Entzündungsreaktionen triggern kann (Siervo et al., 2011; Jabs, 2008; Bruch-Gerharz et al., 1998a, Bruch-Gerharz et al., 1998b). Andererseits wird beschrieben, dass Citrullin bei der Bewältigung von oxidativem Stress hoch effektiv - quasi als Antioxidans - wirksam ist (Abb. 1) (Akashi et al., 2001).

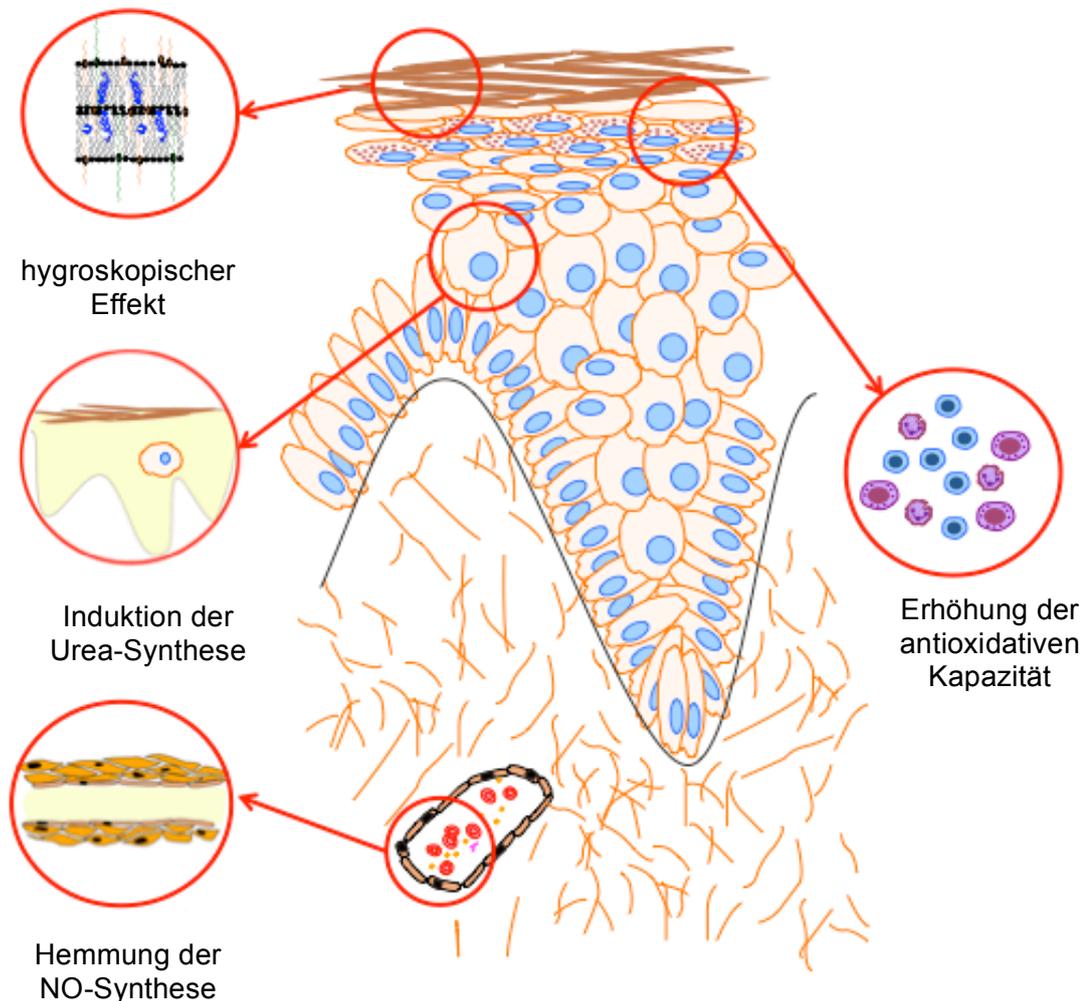


Abb. 1: Theoretische Effekte extern applizierten L-Citrullins in der Haut

Vorstellbar wäre, dass nach epikutaner Applikation in die Haut penetriertes L-Citrullin durch negative Feedback-Hemmung oder durch direkte antioxidative Wirkung Entzündungsprozesse modulieren kann. Dies könnte für die Behandlung entzündlicher Dermatosen ein neuer therapeutischer Ansatzpunkt sein. Weiterhin steht die

Verbesserung des natürlichen Feuchthaltefaktors (NMF) im Vordergrund, um die Hydratation des Stratum corneum zu erhöhen und den transepidermalen Wasserverlust (TEWL) einzuschränken (Abb. 1).

Die Citrullinierung epidermaler Strukturproteine wie Filaggrin und Keratin geschieht im Rahmen der Differenzierung von Keratinozyten zu Korneozyten (Ishida-Yamamoto et al., 2000; Ishigami et al., 2002; Löffler et al., 2007). Eine Steigerung dieser Reaktion durch extern zugeführtes L-Citrullin könnte eine qualitative Verbesserung des Zytoskeletts zur Folge haben.

Gegenstand dieser präklinischen Studie war deshalb die Frage, ob L-Citrullin nach epikutaner Applikation in die Haut penetrieren kann, wie sich Penetrationskinetik und -dynamik gestalten und ob es ein optimales Vehikelsystem gibt. Letztlich ist zu beantworten, ob weiterführende Studien mit L-Citrullin-haltigen Präparationen empfehlenswert sind.

## **1.2 L-Citrullin**

### **1.2.1 Biochemische und physikalische Eigenschaften von L-Citrullin**

Namensgebend für L-Citrullin ist die Wassermelone „*Citrullus vulgaris*“, deren Rinde größere Mengen dieser Substanz enthält und somit eine natürliche Quelle darstellt (Bieger und Neuer, 2011; Kaore et al., 2012; Rimando and Perkins-Veazie, 2005; Curis et al., 2005). Daraus konnte Citrullin erstmals in den 1930er Jahren isoliert werden (Moinard et al., 2008). Durch die antioxidativen Eigenschaften von Citrullin ist die Wassermelone in der Lage, oxidativem Stress auch unter schwierigen Umweltbedingungen zu widerstehen (Akashi et al., 2001; Cynober et al., 2010). Weiterhin ist es in gewissen Algenarten, wie „*Grateloupia vulgaris*“, in Gurke und Kürbis anzutreffen (Curis et al., 2005; Kaore et al., 2012).

L-Citrullin ist eine für den menschlichen Organismus nicht essentielle Aminosäure. Bis heute sind 22 proteinogene (essentielle), die der Körper selber nicht synthetisieren kann, und über 250 nicht-proteinogene Aminosäuren bekannt (Löffler et al., 2007).

Die Summenformel des L-Citrullins lautet  $C_6H_{13}N_3O_3$ . (Abb. 2). Es hat ein Molekulargewicht von 175,19 g/mol und ist wegen seiner polaren Seitenketten gut in Wasser löslich, dagegen kaum in Methanol und Ethanol. Damit handelt es sich um eine hydrophile Substanz. Der Schmelzpunkt liegt bei 214 °C. Bei Zimmertemperatur liegt L-Citrullin als weißer, kristalliner Feststoff vor (Curis et al., 2005).

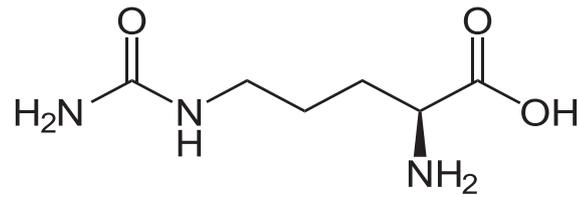


Abb. 2: Strukturformel des L-Citrullin (nach Bieger und Neuner, 2011)

### 1.2.2 Vorkommen von L-Citrullin im humanen Organismus

Im Jahre 1944 wurde erstmals das Vorkommen von freiem L-Citrullin im menschlichen Blutplasma beschrieben (Archibald, 1944).

Die metabolischen Prozesse in Darm, Leber und Niere sind für den Plasmaspiegel von L-Citrullin verantwortlich (Abb. 3). Die Enterozyten des Darms synthetisieren nach der Aufspaltung alimentärer Eiweiße Citrullin aus Arginin oder Glutamin. In den Hepatozyten erfolgt die de-novo-Synthese über den Harnstoffzyklus. Die Nieren verstoffwechseln Citrullin zu Arginin, welches über das Blut wieder als Substrat der Citrullinbildung in die Leber aufgenommen werden kann (Curis et al., 2005; Cynober et al., 2010; El-Hattab et al., 2012; Lighthart-Melis and Deutz, 2011).

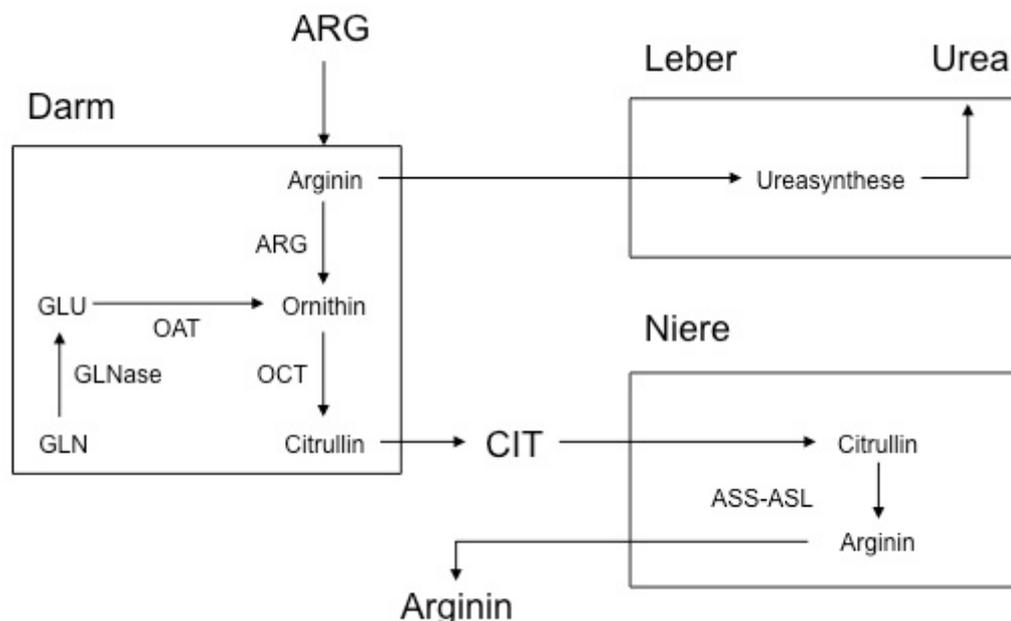


Abb. 3: Zusammenhang des Metabolismus von L-Citrullin (nach Cynober et al., 2010)

Im Blutplasma frei zirkulierende Aminosäuren gelangen über Transportsysteme in die Zellen der verschiedenen Organe und folglich auch in die Haut. Kationische

Aminosäuren wie Arginin, Lysin und Ornithin nutzen für die Überwindung von Plasmamembranen das sogenannte Y<sup>+</sup>-System (Closs et al., 2004). Ein spezifischer Transporter für L-Citrullin wird bisher nicht beschrieben. Dennoch ist bekannt, dass verschiedene Zelltypen Citrullin aufnehmen und abgeben (Curis et al., 2005). Für Keratinozyten wird als nutritive Aminosäure L-Arginin angenommen, aus der erst sekundär im zellulären Metabolismus Citrullin gebildet wird (Wohlrab, 2001; Höche, 2003).

### 1.3 L-Citrullin und keratinozytärer Metabolismus

Im Jahre 1953 konnte Leonardi erstmals L-Citrullin mit Hilfe der Papierchromatographie in humaner Epidermis isolieren (Holmes et al., 1968).

Aus biochemischer Sicht ist die Haut aufgrund ihrer Schutz- und Barrierefunktion sowie der permanenten Erneuerung der Epidermis ein besonders aktives Stoffwechselsystem.

#### 1.3.1 Arginin – Citrullin – Ornithin – Zyklus

Das Schema der Abbildung 4 zeigt in vereinfachter Form die Verknüpfung der Metabolisierung von Arginin, Ornithin und Citrullin.

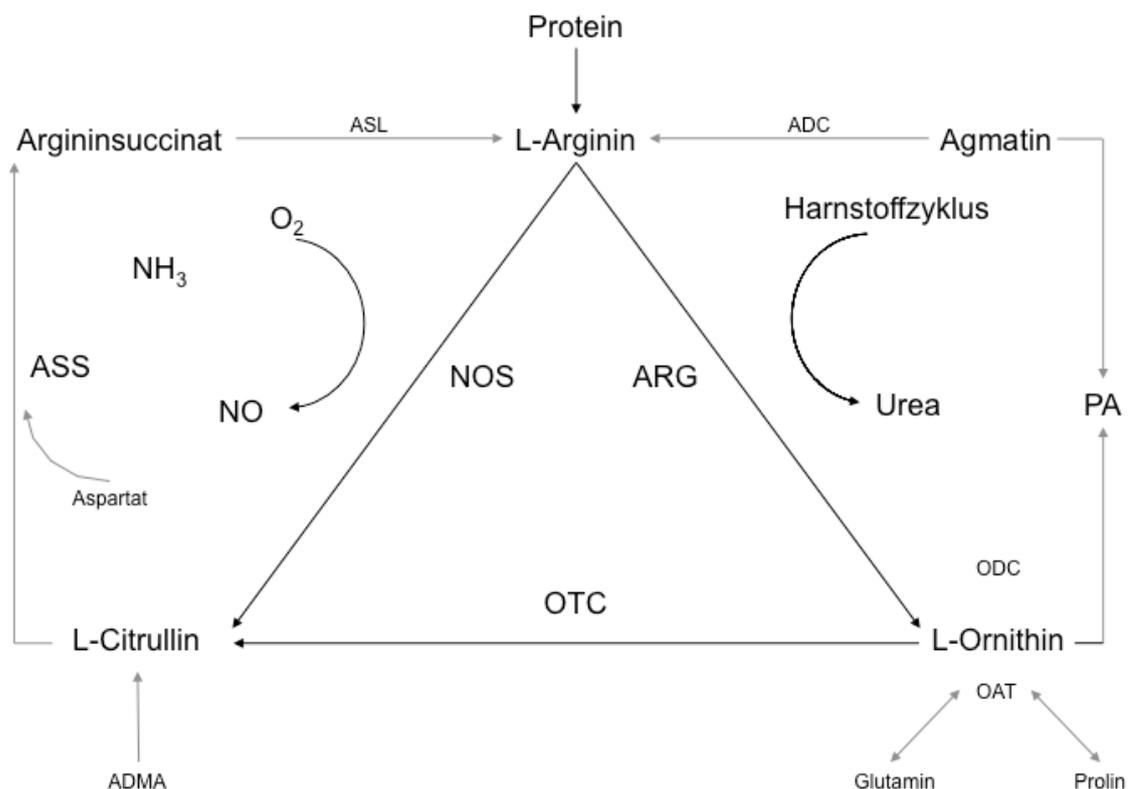


Abb. 4: Arginin-Citrullin-Ornithin-Zyklus (nach Bieger und Neuer, 2011)

Die rechte Seite dieses Reaktionsmodells beschreibt als sogenannte „Arginasereaktion“ den Abbau der Aminosäure L-Arginin zu Harnstoff und L-Ornithin und damit die Verbindung zum Harnstoffzyklus.

Die linke Seite veranschaulicht die Entstehung von L-Citrullin und Stickstoffmonoxid (NO) in der sogenannten „NO-Synthasereaktion“, die durch die NOS katalysiert wird. L-Citrullin und NO entstehen dabei in einer stöchiometrischen 1:1-Menge (Siervo et al., 2011; Bruch-Gerharz et al., 1998a). Das Recycling von L-Arginin aus L-Citrullin scheint in der Haut aufgrund anderer Enzymaktivitäten keine Bedeutung zu haben (Crouse and Rothberg, 1961). Der physiologische Ablauf des Arginin-Citrullin-Ornithin-Zyklus dient der Aufrechterhaltung der Barrierefunktion und der mikrovaskulären Perfusion (Wohlrab, 2001).

### **1.3.2 NO-Synthase und ihre Isoformen**

Im humanen Organismus existieren drei NOS-Isoformen, die endotheliale NOS (eNOS), die neuronale NOS (nNOS) sowie die induzierbare NOS (iNOS) (Bruch-Gerharz et al., 1998b; Maarsingh et al., 2006). In Diskussion steht die Existenz einer weiteren mitochondrialen mtNOS-Isoform (Bieger und Neuer, 2011; Siervo et al., 2011).

Im keratinozytären Metabolismus sind die eNOS- und iNOS-Isoformen bedeutsam. Letztere ist bei dermalen inflammatorischen Prozessen hochreguliert. Die calmodulinabhängige zytosolische iNOS ist außerdem in Makrophagen anzutreffen (Bruch-Gerharz et al., 1998a; Hobbs et al., 1999; Knowles and Moncada, 1994).

Grundsätzlich wird die iNOS in vielen Geweben des Körpers exprimiert und interagiert mit dem Immunsystem (Siervo et al., 2011; Baudouin and Tachon, 1996). Die iNOS-Synthese wird durch inflammatorische Immunstimuli, wie bakterielle Endotoxine und proinflammatorische Zytokine, induziert (Abb. 5) (Bruch-Gerharz et al., 1998a).

Für die Synthese von L-Citrullin und NO aus L-Arginin werden neben der NOS auch verschiedene Co-Faktoren wie molekularer Sauerstoff, Flavinadenosindinukleotid (FAD), Flavinmononukleotid (FMN), Tetrahydrobiopterin (BH<sub>4</sub>) und Ca<sup>2+</sup> (außer bei der iNOS) bzw. Calmodulin benötigt (Siervo et al., 2011; Knowles and Moncada, 1994; Ulhaq et al., 1999).

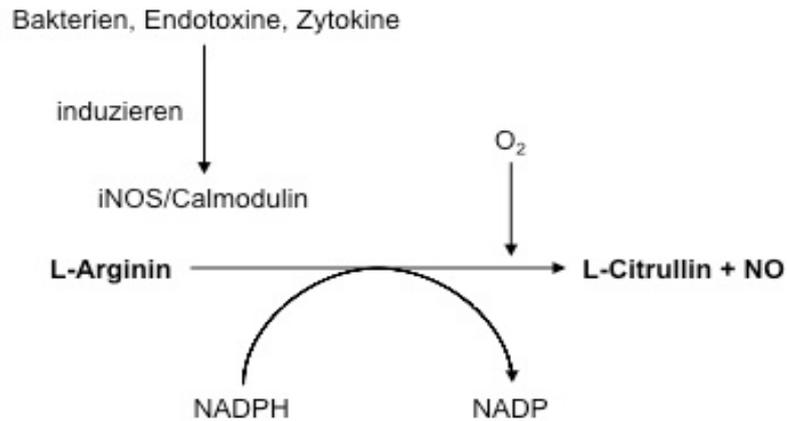


Abb. 5: Chemische Darstellung der NOS-Reaktion (nach Bruch-Gerharz et al., 1998b)

Die NOS konkurriert mit der Arginase um L-Arginin als Substrat (Abb. 4). Dabei ist die Affinität der NOS gegenüber der Arginase (ARG) zwar 1000-fach höher, die ARG andererseits 1000-fach schneller reagierend (Bieger und Neuer, 2011). Bei hohen ARG Konzentrationen wird L-Arginin bevorzugt zu L-Ornithin verstoffwechselt, die NO-Synthese hingegen gehemmt (Höche, 2003; Höche et al., 2004).

Tab. 1: Funktion der NOS-Isoformen (nach Bruch-Gerharz et al., 1998b)

|                            | e/n NOS   | iNOS   |
|----------------------------|---|--|
| Zelluläre Quellen der Haut | Keratinocyten, Endothelzellen<br>Melanozyten, Fibroblasten              | Keratinocyten,<br>Endothelzellen, Fibroblasten,<br>Langerhanszellen                                  |
| Signalinduzierung          | UV-Strahlen, "shear-Stress"   | bakt. Endotoxine, Zytokine<br>(z.B. IL8, IF $\gamma$ , TNF $\alpha$ , IL1 $\beta$ ),<br>Neuropeptide |
| Molekulare Ziele           | lösliche Guanylatcyclyase   | Schlüsselenzyme mitochondriale Atmungskette, Citratzyklus, RNA/DNA-Synthese, Zink-Finger-Proteine    |
| freigesetzte Menge         | niedrig im pmol/l Bereich   | hoch im nmol/l Bereich   |
| Funktion                   | Vasodilatation, neuronale Signale, lokaler Blutfluss, Erythementstehung | Immunregulation, Differenzierung, Immunantwort   |

### **1.3.3 Antioxidative Wirkung durch NOS-Inhibition und L-Citrullin**

Unter oxidativem Stress wird die Akkumulation reaktiver Sauerstoffverbindungen (ROS) über das physiologische Ausmaß hinaus verstanden. Diese sind imstande, Biomoleküle anzugreifen und zu schädigen (Löffler et al., 2007).

NO vermag als freies Radikal mit reaktiven Sauerstoffspezies, wie Superoxidanionen, zu reagieren. Die resultierenden NO-Verbindungen besitzen ebenfalls schädigendes Potenzial, als nitrosativer Stress bezeichnet (Siervo et al., 2011).

Physiologischerweise dient die iNOS der Immunabwehr. Durch entstandenes NO können Viren an ihrer Vermehrung gehindert, Bakterien geschädigt und Parasiten abgetötet werden. Kommt es zu einer unspezifischen Entzündungsreaktion, wird die NO-Synthese durch die iNOS gesteigert. Dieser nitrosative Stress ist u.a. durch erhöhte Citrullinkonzentrationen im Urin nachweisbar (Jabs, 2008).

Extern in derartige Entzündungsprozesse eingeschleustes L-Citrullin müsste über negative Feedback-Hemmung die NOS inhibieren (Hobbs et al., 1999; Ulhaq et al., 1999).

Studien mit Wassermelonen unter Wüstenbedingungen weisen auf ein antioxidatives Potenzial von L-Citrullin selbst hin. Extreme Trockenheit bedeutet für die Pflanzen oxidativen Stress, der vom Anstieg reaktiver Sauerstoffspezies begleitet wird. In der Studie konnte nachgewiesen werden, dass es unter dem Einfluss von reaktiven Sauerstoffspezies, wie Hydroxyl-Radikalen, zu einer Akkumulation von Citrullin kommt und DNA-Schäden nicht auftraten. Daher wurde postuliert, dass Citrullin schützend gegenüber oxidativem Stress wirkt (Akashi et al., 2001).

Wenn es durch externe Therapie gelänge, die pathogenen freien Radikale zu reduzieren, stünde ein neuer therapeutischer Ansatz zur Verfügung.

### **1.3.4 Citrullinierte Proteine**

L-Citrullin besitzt im Metabolismus eine Sonderstellung, da es nur bedeutsam für den Intermediärstoffwechsel ist, nicht aber für die Proteinbiosynthese (Bieger und Neuer, 2011). Es kann einerseits in freier Form oder andererseits über eine Peptidbindung als citrulliniertes Protein vorliegen (Curis et al., 2005). L-Citrullin ist nie primär in Proteine eingebaut, genau wie Ornithin (Rassow et al., 2008). Für nicht-proteinogene Aminosäuren existiert kein Codon für die Proteinsynthese. Zellulär synthetisierte Proteine können posttranslational modifiziert werden (Curis et al., 2005; Vincent et al.,

2005). In Keratinozyten werden für die architektonische Struktur der Epidermis wichtige Filamente und Matrixproteine produziert, insbesondere Keratine und Filaggrin. Sie bilden das Zytoskelett und sind am Ende der Ausreifung als komplexe Verbindungen im Stratum corneum zu finden (Löffler et al., 2007). Während der terminalen epidermalen Differenzierung werden - funktionell wichtig - Zytokeratin und Filaggrin citrulliniert. Eine Dysfunktion der Citrullinierung ist pathogenetisch bedeutsam (Ishida-Yamamoto et al., 2000; Ishigami et al., 2002).

### **1.3.5 L-Citrullin als Bestandteil des Natural Moisturizing Factor (NMF)**

Das Stratum corneum als äußerste Schicht der epidermalen Barriere grenzt den Organismus von schädlichen Umwelteinflüssen ab und verhindert den unkontrollierten transepidermalen Wasserverlust (TEWL). Die optimale Hydratation hängt von mehreren Faktoren ab:

- den interzellulären Lipiden als effektive Barriere für die Passage von Wasser;
- der Länge des Diffusionsweges als Faktor für den verzögerten transepidermalen Wasserverlust, da erst die einzelnen Layer des Stratum corneum überwunden werden müssen;
- dem natürlichen Feuchthaltefaktor NMF (Rawlings and Harding, 2004).

L-Citrullin ist Bestandteil des NMF, einer Gruppe von Substanzen, deren gemeinsame Hygroskopizität der Hydratation und Barrierefunktion der Haut dienen und den TEWL regulieren. Es entfallen 20 bis 30 % des Trockengewichtes vom Stratum corneum auf den NMF (Rawlings and Harding, 2004). Die einzelnen Bestandteile sowie die kleinen H<sub>2</sub>O-bindenden Moleküle befinden sich im Keratinozyten, aber auch im Interzellulärbereich (Wohlrab, 2001).

Dabei kommt L-Citrullin mit 5-7 % in ungefähr gleicher Menge wie Harnstoff vor (Tab. 2) (Ziegenmeyer, 1992). Topisch applizierter Harnstoff kann neben den positiven Effekten auch zu Irritationen der Haut mit Brennen, Rötung und Juckreiz führen (Wohlrab, 2001; Wohlrab et al., 2003). Möglicherweise stellt L-Citrullin eine attraktive Alternative zur Ureaapplikation dar.

Im Rahmen der Hautalterung und bei verschiedenen Hauterkrankungen führt die Verminderung des NMF zur reduzierten Wasserbindungskapazität. Dies lockert den Zellverband, führt zur Abschilferung der schützenden Hornschicht und bedeutet eine Verschlechterung der Barrierefunktion (Rawlings and Harding, 2004).

Tab. 2: Die Zusammensetzung des NMF der humanen Epidermis (Ziegenmeyer, 1992)

| Zusammensetzung   | % [m/m]    |
|---|------------|
| Aminosäuren (insgesamt)   | 32-42      |
| • Serin   | 9-13       |
| • <u>Citrullin</u>  | <u>5-7</u> |
| • Alanin  | 3-6        |
| • Threonin  | 2-4        |
| • Asparagin, Glycin, Histidin, Leucin, Lysin, Phenylalanin, Ornithin, Thyrosin, Valin, Glutamin- und Urocainsäure | 13-22      |
| 2-Pyrrolidon-5-carbonsäure  | 12         |
| Lactate   | 12         |
| Harnstoff   | 7          |
| Citrat, Formiat   | 0,5        |
| Anorganische Ionen ( Cl <sup>-</sup> , Na <sup>2+</sup> , K <sup>-</sup> )  | 18         |
| Ammoniumionen, Glucosamine, Kreatinin, Uronsäure  | 1,5        |
| nichtidentifizierte Substanzen  | 10         |

#### 1.4 Permeabilität der Haut

##### 1.4.1 Dermale Substanzaufnahme

Die Erläuterung folgender Begriffe ist für das Verständnis der Mechanismen nach epikutaner Wirkstoffapplikation in dieser Studie wichtig:

- Liberation: Freisetzung aus der galenischen Grundlage
- Penetration: Eindringen in Stratum corneum bzw. Epidermis
- Permeation: Durchdringung von Hautschichten bis an Blut- und Lymphgefäße (Neubert et al., 2001; Stüttgen und Schaefer, 1974)

Die Wirkstoffaufnahme in das Blut- oder Lymphsystem (Resorption) wird beim betrachteten ex-vivo-Modell vernachlässigt.

##### 1.4.2 Kutane Diffusionsrouten epikutan applizierter Wirkstoffe

Bei der Penetration und Permeation müssen die Substanzen die einzelnen Schichten der Haut überwinden, wobei das Stratum corneum mit Hydrolipidfilm die Hauptbarriere darstellt. Hier unterscheidet man den interzellulären, transzellulären, transfollikulären und transglandulären Penetrationsweg. Transglanduläre und transfollikuläre Routen

spielen nur eine untergeordnete Rolle. Beim Transport über den interzellulären oder transzellulären Weg wird für polare und unpolare Substanzen - also auch für Aminosäuren wie L-Citrullin - angenommen, dass sie überwiegend den interzellulären Weg per Diffusion über wassergefüllte Weichen bevorzugen. Die transzelluläre Barriere ist höher (Neubert et al., 2001; Stüttgen und Schaefer, 1974).

Im epidermalen Kompartiment steigt die Diffusionsgeschwindigkeit, da die vitale Epidermis mit einem Hydrogel vergleichbar ist (Neubert et al., 2001).

Bei der zellulären Aufnahme von Wirkstoffen muss die Plasmamembran überwunden werden. Hierbei vermitteln Transportersysteme (Löffler et al., 2007). Kationische Aminosäuren, wie Arginin, Lysin und Ornithin, nutzen das sogenannte Y<sup>+</sup>-System (Closs et al., 2004).

### **1.4.3 Stationäres Penetrationsmodell**

Kutane Modellvorstellungen vermitteln zwischen experimentellen Daten und sehr komplexen, oft noch nicht erforschten biologischen und physikochemisch-biopharmazeutischen Vorgängen. Sie helfen, Befunde zu interpretieren, auf in-vivo Bedingungen zu übertragen und das Transportverhalten epikutan applizierter Wirkstoffe aus einfach bestimmbareren Messdaten vorherzusagen. Das Modell der stationären Penetration geht davon aus, dass der Wirkstoff anfangs nur in der Formulierung gelöst vorkommt, seine Konzentration in der Biophase Haut dagegen Null ist und als konstanter Konzentrationsgradient über den gesamten Versuchszeitraum bestehen bleibt. Zufuhr aus einem unendlich großen Vehikelreservoir (infinite dose case) und Abtransport aus einem Akzeptor befinden sich im „steady state“ (Sink-Bedingungen). Weiterhin basiert das Modell ausschließlich auf Diffusionsvorgängen nach dem Fick'schen Diffusionsgesetz. Die Schichten der Haut werden als homogene Kompartimente betrachtet – das Stratum corneum als Lipidschicht und die Epidermis als Hydrogel (Anissimov et al., 2013; Neubert et al., 2001).

Beim Permeationsmodell in der Franz'schen Zelle wurde L-Citrullin in bekannter Dosis aufgetragen (finite dose case). Dies erlaubt, die detektierten Messwerte mit der applizierten Gesamtdosis zu vergleichen und ein Konzentrations-Zeit-Profil zu erstellen.

### 1.5 Penetrationsverhalten von L-Citrullin in Abhängigkeit vom Vehikelsystem

Für das hydrophile L-Citrullin wäre das lipophile Stratum corneum eine Penetrationsbarriere. Das verwendete Vehikelsystem kann maßgeblich an der Überwindung des Stratum corneum beteiligt sein (Anissimov et al., 2013). Die galenische Grundlage hat nicht nur die Funktion, den Wirkstoff in gleichmäßiger Verteilung zu halten, sondern auch seine Penetrationsfähigkeit zu verbessern. Letzteres geschieht, wenn die Eigenwirkung des Vehikelsystems die Penetrationsbedingungen verändert oder Wirkstoff und Grundlage gemeinsam in die Haut penetrieren (Neubert et al., 2001). Am Ende muss L-Citrullin aus der jeweiligen galenischen Grundlage liberiert werden.

Für die vorliegende Studie wurden drei Standardvehikelsysteme genutzt:

- **Wasserhaltige hydrophile Salbe DAB (O/W):** Vaseline und dickflüssige Paraffine stellen dabei die innere Lipidkomponente dar, welche von Wasser umgeben ist (Standardisierte Rezepturen NRF/SR, 2007; Wolf, 2006a). L-Citrullin als wasserlösliche Substanz befindet sich in der äußeren Phase und hat nach epikutaner Applikation einen kurzen Liberationsweg.
- **Wasserhaltige lipophile Wollwachsalkoholsalbe DAB (W/O):** Bei diesem ebenfalls biphasischen System besteht die äußere Komponente aus weißer Vaseline, Cetylstearylalkohol und Wollwachsalkoholen, in welche Wasser eingearbeitet werden kann (Standardisierte Rezepturen NRF/SR, 2007; Wolf, 2006a). Somit wird in der inneren Phase gelöstes L-Citrullin schwerer liberiert, da die äußere Lipidkomponente ein Penetrationshindernis darstellt, selbst wenn das W/O-System mit in das Stratum corneum penetriert sein sollte.
- **amphiphile Basiscreme DAC:** Diese stellt ein Übergangssystem zwischen O/W und W/O dar und nimmt somit eine Sonderstellung ein (Staubach und Lunter, 2014; Wolf, 2006b). Mit einer guten Liberation und Eigenpenetration ist zu rechnen.

**1.6 Zielstellung**

Inhalt dieser Arbeit ist die Untersuchung des Penetrationsverhaltens von L-Citrullin in die Haut. Dabei gilt es, folgende Fragen zu beantworten:

1. Zeigen sich Unterschiede der verschiedenen Vehikelsysteme im Diffusionsmodell?
2. Werden Unterschiede des Diffusionsmodells durch die Ergebnisse bestätigt?
3. Welche Effekte sind für die Zielkompartimente zu erwarten?
4. Welche Faktoren können die experimentellen Messergebnisse beeinflussen?

---

## 2 MATERIAL UND METHODIK

### 2.1 Material

#### 2.1.1 Chemikalien und Lösungen

|                                  |  |
|----------------------------------|--|
| Cryo-SFM (Gefriermedium)         | 33 ml SFM + 10 ml FKS + 7 ml DMSO  |
| L-Citrullin (L-Cit)              | Fluka Chemie AG, Buchs, Schweiz  |
| Ethanol (absolut $\geq 99,5\%$ ) | Carl Roth GmbH & Co.; Karlsruhe, Deutschland   |
| Isotonische Lösung               | Coulter-Immunotech-Diagnostics, Krefeld, Deutschland   |
| ISOTON II                        |  |
| NaCl                             | Merck KGaA, Darmstadt, Deutschland   |
| Soluene 350                      | Packard Bioscience R.V., Groningen, Niederlande  |
| Szintillatorflüssigkeit          | 4 g PPO [2,5-Diphenoloxazol] + 0,1 g POPOP [1,4-bis-2-(5-Phenylloxazolyl)-Benzen] ad 1.000 ml Toluol |
| Tritium [3H]                     | American Radiolabeled Chemicals Inc., St. Louis, USA   |

#### 2.1.2 Geräte und Zubehör

|                                   |  |
|-----------------------------------|--|
| Analysenwaage                     | Typ MC5 OCE, Sartorius AG, Göttingen, Deutschland    |
| Eppendorf-Gefäß (1,5 ml)          | Eppendorf-Netheler-Hinz-GmbH, Hamburg, Deutschland   |
| Falcon-Tubes                      | Becton Dickinson, San Jose, USA                      |
| Flüssigkeitsszintillatorzähler    | WALLAC-ADL-GmbH, Freiburg, Deutschland               |
| WinSpectral 1414                  |  |
| Gewebekulturflaschen- und schalen | 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 Mendingen, Sitz Freital, Deutschland   |
| Pipetten                          | Eppendorf-Netherler-Hinz GmbH, Hamburg, Deutschland  |

Präzisionswaagen:

Typ 870-13

G. Kern & Sohn, Albstadt, Deutschland

UMC 5

Sartorius AG, Göttingen, Deutschland

Szintilationsmessgeräte

Canberra-Packard GmbH, Dreieich,  
Deutschland

Thermostad B3-DC 1

Haake, Karlsruhe, Deutschland

Zentrifuge EC 5402

Eppendorf-Nettheler-Hinz GmbH,  
Hamburg, Deutschland

### **2.1.3 Software**

Software für ImageMaster VDS

Pharmacia Biotech, San Francisco,  
Kalifornien, USA

WinMDI 2.5

The Scripps Research Institute, La Jolla  
CA 92037, USA

1414 WinSpectral™ V1.3

Perkin Elmer Wallac, Feiburg,  
Deutschland

## **2.2 Methoden**

### **2.2.1 Herstellung der Vehikelsysteme**

Die Salbengrundlagen mit den unterschiedlichen Vehikelsystemen wurden von der Klinik-Apotheke der Martin-Luther-Universität Halle nach standardisierten Bedingungen hergestellt. Die Zubereitung erfolgte nach den entsprechenden Herstellungsvorschriften mit einer definierten Verwendbarkeit von mindestens drei Monaten nach dem Arzneimittelgesetz. Zuerst war es erforderlich, die L-Citrullinlösung mit dem radioaktiven Isotop Tritium zu markieren, welches eine spezifische Aktivität von 38 Ci/mol besitzt (1 µCi/mg Vehikel). Anschließend wurden 20 µl der [<sup>3</sup>H]-markierten-Lösung mit 20 mg Präparationsgrundlage homogen vermischt. Somit entstanden jeweils 10 %ige amphiphile, hydrophile und lipophile Vehikelsysteme.

Die L-Citrullin-haltigen Vehikelsysteme basieren auf folgender Rezeptur:

Tab. 3: Vehikelsysteme (Standardisierte Rezepturen (NRF/SR), 2007)

| Präparation | Vehikelsystem                             |
|-------------|---|
| hydrophil   | Wasserhaltige hydrophile Salbe (O/W)      |
| lipophil    | Wasserhaltige Wollwachsalkoholsalbe (W/O) |
| amphiphil   | Basiscreme DAC (O/W und W/O)              |

- **Wasserhaltige hydrophile Salbe DAB** (Standardisierte Rezepturen (NRF/SR), 2007).

- Hydrophile Salbe DAB 30,0 g
- Gereinigtes Wasser ad 100,0 g

Zusammensetzung Hydrophile Salbe DAB:

- Emulgierender Cetylstearylalkohol, Typ A 30,0 g
- Dickflüssiges Paraffin 35,0 g
- Weißes Vaseline 35,0 g

- **Wasserhaltige lipophile Wollwachsalkoholsalbe DAB** (Standardisierte Rezepturen (NRF/SR), 2007).

- Wollwachsalkoholsalbe DAB 50,0 g
- Gereinigtes Wasser ad 100,0 g

Zusammensetzung Wollwachsalkoholsalbe DAB:

- Cetarylstearylalkohol 0,5 g
- Wollwachsalkohole 6,0 g
- Weißes Vaseline ad 100,0 g

- **amphiphile Basiscreme DAC** (Standardisierte Rezepturen (NRF/SR), 2007).

- Glycerolmonostearat 60 4,0 g
- Cetylalkohol 6,0 g
- Mittelkettige Triglyceride 7,5 g
- Weißes Vaseline 25,5 g
- Macrogel-20-glycerolmonostearat 7,0 g
- Propylenglycol 10,0 g
- Gereinigtes Wasser 40,0 g

### **2.2.2 Gewinnung von Hautbiopsien und Aufbereitung**

Um theoretische Überlegungen hinsichtlich dermalen Penetrations- und Permeationsprozesse in die Praxis zu überführen, müssen zunächst ex-vivo-Experimente an menschlicher Haut durchgeführt werden. Die Verwendung von in-vitro-Modellen ist dafür geeignet.

Zur Gewinnung des Probenmaterials stand exzidierte überschüssige Haut aus Mammareduktionsplastiken dreier gesunder Probanden à drei Hautstücke zur Verfügung. Postoperativ erfolgte die Reinigung der Präparate mit Wattepad und physiologischer NaCl-Lösung. Anschließend wurden die Proben mechanisch von überschüssigem subkutanem Fettgewebe befreit, welches verworfen wurde. Aus jedem Hautstück wurden wiederum drei kreisrunde Proben mit 20 mm Durchmesser ausgestanzt (3,14 cm<sup>2</sup>), in Aluminiumfolie luftdicht verpackt und bei -20 °C für zwei bis drei Wochen tiefgekühlt gelagert. Für die Versuchsreihen konnten somit insgesamt 27 Proben zeitgerecht aufgetaut werden.

### **2.2.3 Penetrationsversuche an humaner Haut ex vivo mittels Franz'scher Diffusionszelle**

Aktuell stehen in der Forschung standardisierte, validierte Methoden für Penetrationsversuche in vitro zur Verfügung. Sie sind allgemein akzeptiert sowie anerkannt und liefern entscheidende Erkenntnisse zur Charakterisierung von Vehikelsystemen hinsichtlich Liberation und Penetration.

In der Dermatopharmazie hat sich eine definierte Applikationsdosis pro Fläche zur Detektion klinisch relevanter Dosierungen etabliert. Für halbfeste Zubereitungen gelten 2-5 mg/cm<sup>2</sup> und für flüssige Formulierungen 10 µl/cm<sup>2</sup> als günstig (OECD/OCDE, 2004). Für die vorliegende Arbeit wurde die definierte Menge von 20 mg Präparationsgrundlage auf eine Fläche 3,14 cm<sup>2</sup> aufgetragen und entspricht somit standardisierten Versuchsbedingungen.

Zur präklinischen Untersuchung der Penetration und Permeation L-Citrullin-haltiger Präparationen an humaner Haut ex-vivo kommt die Franz'schen Diffusionszelle zum Einsatz. Mit deren Hilfe ist die Erstellung eines Konzentrations-Zeit-Profiles in Abhängigkeit der unterschiedlichen Vehikelgrundlagen (hydrophile, amphiphile und lipophile Präparation) möglich. Somit können Aussagen über die Verteilung der Aminosäure in der Haut in Abhängigkeit von der Zeit getroffen werden. Bei diesem Modell des indirekten Wirkstoffnachweises gilt, dass unter ex-vivo-Bedingungen keine Wirkstoffmetabolisierung von L-Citrullin stattfindet (Neubert et al., 2001).

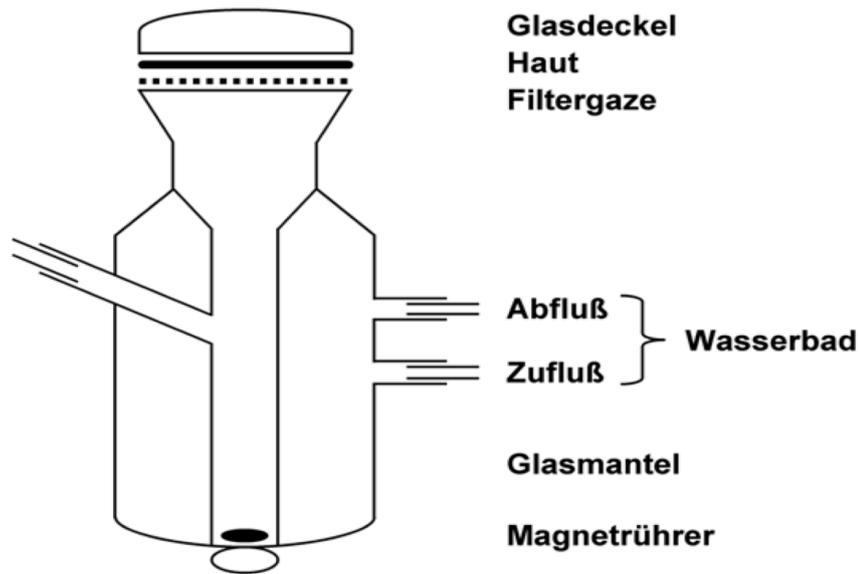


Abb. 6: Aufbau der Franz'schen Diffusionszelle (nach Franz, 1975)

Die Franz'sche Diffusionszelle besteht aus einem doppelwandigem Glaszylinder, dessen Innenraum die physiologische 0,9 %ige NaCl-Lösung enthält, als Akzeptor bezeichnet, welcher durch einen rotierenden Magneten in Bewegung gehalten wird. Dies simuliert den Flüssigkeitsstrom in Blut- und Lymphgefäßen der Subkutis. Der innere Glaszylinder wird von einem äußeren umgeben, der mit destilliertem Wasser gefüllt ist und der optimalen Temperierung im Bereich von 32 °C dient, analog der Hauttemperatur. Zur Versuchsdurchführung werden die bei Zimmertemperatur aufgetauten und mit Wattepad von Flüssigkeit befreiten Hautproben mit der jeweiligen radioaktiv markierten Präparationsgrundlage in definierter Menge von 10 % (20 mg Salbe) gleichmäßig bestrichen (finite Dose-Technik) und in die 32 °C vorgewärmte Diffusionszelle gebracht. Dabei liegt das Probenmaterial auf einer Gaze, welche es vom Akzeptor trennt. Zum Versuchszeitpunkt wurde die Hautprobe so in die Diffusionszelle eingespannt, dass das Probenmaterial der Membran auflag und somit direkt an das Akzeptormedium grenzt. Diese Membran ist durch einen Glas- und Metallring stabilisiert. Somit konnte auch die Permeation durch die Haut simuliert werden. Als Verdunstungsschutz dient eine Glasabdeckung. Pro Versuch mit lipophiler, hydrophiler und amphiphiler Vehikelgrundlage standen von jedem Probanden drei Hautproben zur Verfügung, d.h. jeweils neun Versuchsanordnungen für 30, 300 und 1000 Minuten in der Diffusionszelle, folglich ergaben sich insgesamt 27 Messreihen.

#### 2.2.4 Messung der L-Citrullin-Konzentration

Nachdem die Hautproben mit den jeweiligen Salbenpräparationen die entsprechende Versuchszeit in der Franz'schen Diffusionszelle absolviert hatten, erfolgte die Vorbereitung zur Messung der L-Citrullinkonzentration. Dazu musste die Hautprobe aus der Diffusionszelle entnommen und zunächst von der verbliebenen, nicht penetrierten Salbenpräparation (mittels eines Wattetupfers) befreit werden. Zur Erstellung eines Konzentrations-Zeit-Profiles wurden anschließend die einzelnen Hautschichten horizontal zur Epidermis nach folgender Reihenfolge abgetrennt:

- Nicht penetrierter Wirkstoff: Wattetupfer
- Stratum corneum: ca. 20 Klebestreifenabrisse
- Vitale Epidermis: 4-10 Schnitte mittels Gefriermikrotom à 20 µm
- Corium: 15 Schnitte mittels Gefriermikrotom à 80 µm + Reststumpf
- Permeierter Wirkstoff: Akzeptormedium

Für die Untersuchung des Stratum corneum konnten 20 Klebestreifenabrisse unter Verwendung einer kreisrunden Schablone, angefertigt werden. Der Durchmesser der Schablone betrug 16 mm. Somit stand für das Stratum corneum eine definierte Fläche von 2,0106 cm<sup>2</sup> zur Verfügung. Jeweils zwei der aufeinanderfolgenden Klebestreifenabrisse wurden dabei für die Messungen zusammengefasst.

Anschließend wurden aus jeder Probe drei kleinere Hautstanzen mit einem Durchmesser von 6 mm aus dem Zentrum entnommen. Diese wurden zur Untersuchung der vitalen Epidermis erneut bei -40 °C tiefgefroren und mittels Gefriermikrotom in 4-10 horizontale Proben à 20 µm geschnitten.

Zur Detektion der Konzentration im Corium erfolgten 15 Gefrierschnitte à 80 µm. Der Reststumpf konnte nach Verbringen in ein separates Röhrchen zusätzlich vermessen werden. Weiterhin stand die Akzeptorflüssigkeit zur Bestimmung des permeierten Anteils zur Verfügung.

Die entstandenen Schnittproben wurden jeweils in ein Szintillationsröhrchen gebracht und bei Zimmertemperatur für 12 Stunden in 0,2 ml Soluene-Lösung 350 inkubiert. Anschließend erfolgte die Zugabe von 1 ml Methanol zu jeder Probe. Für die weitere Messung im Liquid-Szintillations-Counter mussten weitere 2 ml Szintillatorflüssigkeit zu jeder Probe hinzugegeben werden. Die Messung fand computergesteuert statt. Dabei wurden die Proben gegen die Eigenszintillation der Szintillatorflüssigkeit gemessen und als count per minute (cpm) Wert angegeben. So konnte die spezifische Aktivität in

Bezug auf die Schnittfläche, -dicke und die molare Masse von L-Citrullin im Verhältnis zu der applizierten Wirkstoffmenge bestimmt werden. Neben der absoluten Konzentration in mmol/l konnte die detektierte Menge L-Citrullin als prozentualer Anteil der ursprünglich applizierten Gesamtmenge angegeben werden.

### **2.3 Biometrie**

Die Auswertung der Ergebnisse wurde unter Verwendung geeigneter biometrischer Kennzahlen graphisch visualisiert. Hierbei handelt es sich um eine rein deskriptive statistische Veranschaulichung. Aus diesen Graphiken lassen sich einfache Zusammenhänge in Abhängigkeit von der Zeit und dem Vehikelsystem ablesen. Aufgrund der naturgemäß kleinen Anzahl der Proben wurde auf ein biometrisches Testverfahren folgend OECD/OCDE-Guideline verzichtet. Die Ergebnisauflistung geschieht mittels Excel-Tabellen, aus denen die einzelnen Grafiken erstellt werden (OECD/OCDE, 2004).

### **3 ERGEBNISSE**

#### **3.1 Vorbetrachtung**

Grundsätzlich kann eine Probe nur einmal analysiert werden, da sie nach Auftrennung faktisch zerstört wurde. Im vorliegenden Modellversuch wird angenommen, dass die Hautproben jeweils adäquat sind, weil sie von gesunden Probanden weiblichen Geschlechts aus gleicher Region (Mammahaut) unter identischen Bedingungen entnommen und aufgearbeitet wurden. Diese Überlegungen rechtfertigen die vergleichende Betrachtung penetrierter Citrullinmengen in Abhängigkeit von der Applikationsdauer und im zeitlichen Verlauf – quasi dynamisch. Hierbei wurden vorwiegend prozentuale Anteile der ursprünglich aufgetragenen Präparationsmenge verglichen, teilweise auch absolute Konzentrationen in mmol/l.

#### **3.2 Penetrationsfähigkeit von L-Citrullin**

Nach topischer Applikation von L-Citrullin wurde in Abhängigkeit vom Vehikelsystem und der Einwirkungszeit die penetrierte Wirkstoffmenge radiochemisch detektiert. In Stratum corneum, Epidermis und Dermis waren maximal 14,9 % und minimal 0,01 % der applizierten Gesamtdosis messbar. Alle Vehikelsysteme waren in der Lage, eine gewisse L-Citrullin-Menge in die Haut zu verbringen. Von besonderem Interesse war die Detektion der wiedergefundenen L-Citrullinmenge in den oberen Schichten der Haut.

#### **3.3 L-Citrullin Konzentration in Abhängigkeit von der Applikationsdauer**

##### **3.3.1 Applikationsdauer 30 Minuten**

Im Stratum corneum fanden sich nach 30 min Applikationsdauer bereits erhebliche Mengen von L-Citrullin. Aus der amphiphilen Präparation penetrierten durchschnittlich 6 %, aus der hydrophilen 4,6 % und aus der lipophilen 2,5 % der aufgetragenen L-Citrullin-Dosis. Da diese Konzentrationen im zeitlichen Verlauf zumeist weiter anstiegen, kann von einer Depotbildung ausgegangen werden.

In den tieferen Schichten der vitalen Epidermis und in der Dermis waren nach 30 min ebenfalls Konzentrationen penetrierten Citrullins detektierbar, allerdings in deutlich geringerer Menge als im Stratum corneum. Sie betragen aus dem amphiphilen Vehikelsystem maximal 0,4 %, dem lipophilen 0,2 % und dem hydrophilen 0,1 %. Eine weitere Interpretation von Unterschieden zwischen Epidermis und Dermis ist aufgrund der geringen Messwerte mit hoher Streuung nicht möglich (Abb. 7).

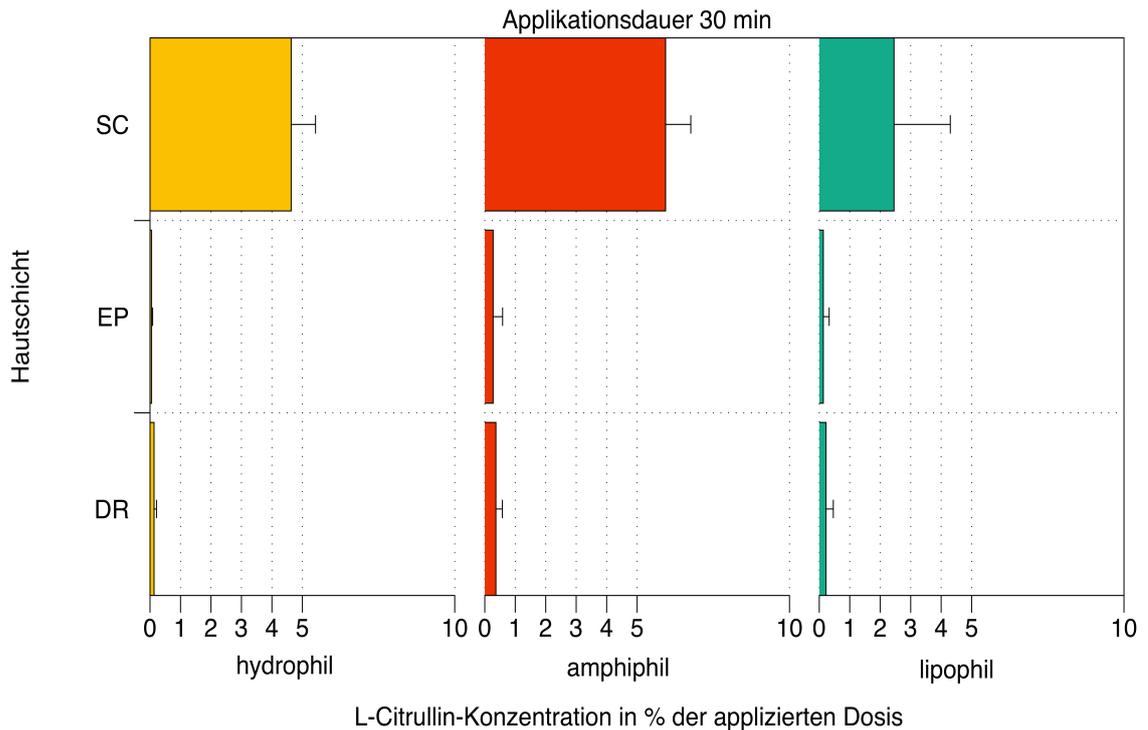


Abb. 7: L-Citrullin-Konzentration in % der applizierten Dosis in den einzelnen Kompartimenten nach 30 Minuten

### 3.3.2 Applikationsdauer 300 Minuten

Bei längerer Applikationsdauer der amphiphilen Präparation nimmt das Depot im Stratum corneum weiterhin zu und hat sich mit 11,4 % der applizierten Dosis gegenüber der kurzen Einwirkzeit nahezu verdoppelt. Das Depot nach hydrophilem Vehikelsystem ist auf 6 % angestiegen, was der Penetrationsrate aus amphiphiler Zubereitung nach 30 min entspricht. Das lipophile System zeigte wiederum die geringste Penetrationsrate, sie ist mit 1,8 % etwas geringer als nach 30 min (2,5 %).

In der Epidermis wurden mit 0,2 % (hydrophil), 0,1 % (amphiphil) bzw. 0,01 % (lipophil) nur sehr geringe Mengen der aufgetragenen L-Citrullinmenge detektiert.

Nachweisbare Effekte in der Dermis nach prolongierter Einwirkdauer sind vor allem für den hydrophilen Donator mit 0,8 % der applizierten Dosis zu beschreiben. Die Nachweisraten für die anderen beiden Präparationen waren mit 0,3 % amphiphil und 0,07 % lipophil deutlich geringer (Abb. 8).

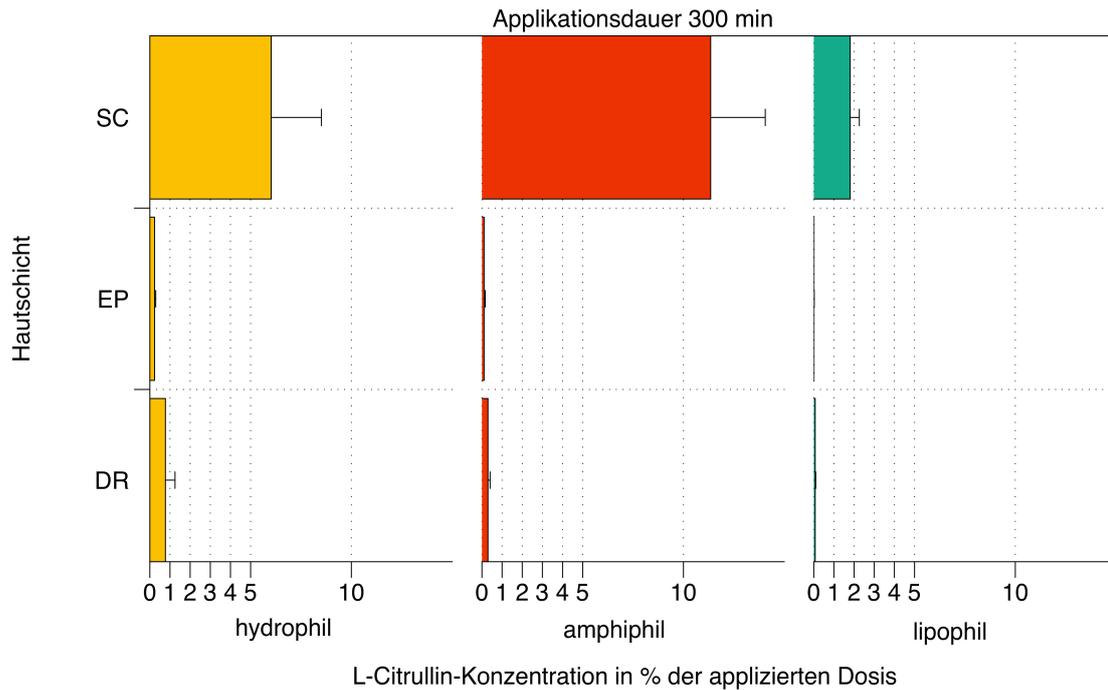


Abb. 8: L-Citrullin-Konzentration in % der applizierten Dosis in den einzelnen Kompartimenten nach 300 Minuten

### 3.3.3 Applikationsdauer 1000 Minuten

Die Depotbildung im Stratum corneum erhöhte sich nach maximaler Applikationsdauer weiter bzw. persistierte nach lipophiler Grundlage mit 1,9 % nahezu gegenüber der mittleren Wirkdauer. Die amphiphile Präparation erreichte mit durchschnittlich 14,9 % die maximal nachgewiesene Penetrationsrate überhaupt, gefolgt von der hydrophilen mit 10,4 %. Letzter Wert entspricht etwa dem amphiphilen Vehikelsystem nach 300 min (11,4 %).

Für die tieferen Hautschichten ergeben sich im Vergleich zur mittleren Einwirkdauer der Vehikelsysteme nach prolongierter Applikationszeit keine wesentlichen Veränderungen. Die Messwerte sind wieder für das hydrophile System mit 0,2 % in der Epidermis und 0,8 % in der Dermis am höchsten. Aus dem amphiphilen System penetrierten 0,05 % in die Epidermis und 0,4 % in die Dermis. Letztere befindet sich mit nahezu identischen Messwerten (0,3 - 0,4 %) im zeitlichen Verlauf in einem „steady state“. Aus der lipophilen Präparation ergaben sich durchschnittliche Penetrationswerte in die Dermis von 0,09 % und somit ähnlich wie nach 300 min Applikationsdauer.

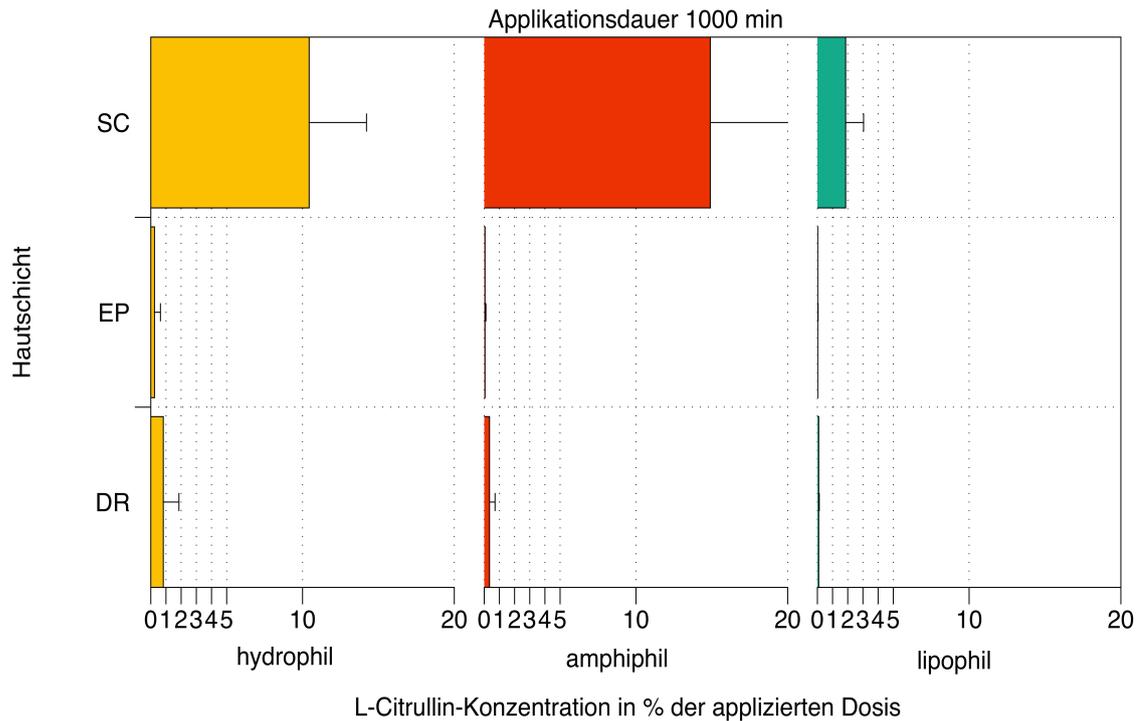


Abb. 9: L-Citrullin-Konzentration in % der applizierten Dosis in den einzelnen Kompartimenten nach 1000 Minuten

### 3.3.4 Permeationsrate von L-Citrullin

Die permeierte Wirkstoffmenge in den Akzeptor lag maximal bei 5,5 % aus der hydrophilen Grundlage nach 30 Minuten, gefolgt von der amphiphilen Präparation mit 4,6 % ebenfalls nach 30 Minuten. Die Permeation aus dem lipophilen Vehikelsystem fiel mit 0,3 % deutlich geringer aus, stieg jedoch nach 1000 min Applikationsdauer bis maximal 0,8 % an.

### 3.4 Penetrationsverhalten von L-Citrullin

Es wird die Verteilung von L-Citrullin in verschiedenen Schichthöhen der Haut bis in das mittlere Corium betrachtet. Die vitale Epidermis ist in 10 Mikrotomschnitten à 10 µm aufgetrennt worden. Die Grenze zur Dermis ist daher ab 200 µm Tiefe anzunehmen. Um den dynamischen Verlauf beschreiben zu können, erfolgt die Anordnung der Abbildungen sortiert nach dem jeweiligen Vehikelsystem. Die Verwendung unterschiedlicher Maßstäbe ist zu beachten. Dabei wird die absolute Citrullinkonzentrationen in mmol/l angegeben, um eine Vergleichbarkeit mit Werten aus der Literatur zu gewährleisten.

### **3.4.1 Penetration aus der amphiphilen Präparation**

Nach epikutaner Applikation des amphiphilen Vehikelsystems verteilt sich L-Citrullin überwiegend im oberen Drittel des Stratum corneum, was einer Penetrationstiefe von 7-8  $\mu\text{m}$  entspricht. Mit zunehmender Applikationsdauer breitet sich dieses Depot in Richtung Tiefe aus. Der maximale mittlere Messwert liegt nach 1000 min bei 8,3 mmol/l. Er steigt im zeitlichen Verlauf von 3,3 mmol/l (30 min) auf 6,8 mmol/l (300 min). Parallel zur Depotbildung im oberen Drittel des SC sind geringere Anteile in tiefere Hautschichten penetriert. Auch hier zeigt sich ein Verteilungsmuster zugunsten des oberen Bereichs der Epidermis. Die höchste mittlere Konzentration von 5,2 mmol/l ist bereits nach 30 min nachweisbar. Mit steigender Applikationsdauer werden mittlere Penetrationswerte von 2,1 mmol/l (300 min) und 1,0 mmol/l (1000 min) berechnet. Insgesamt nimmt mit zunehmender Schichttiefe die Citrullin-Konzentration in Richtung Dermis ab (Abb. 10).

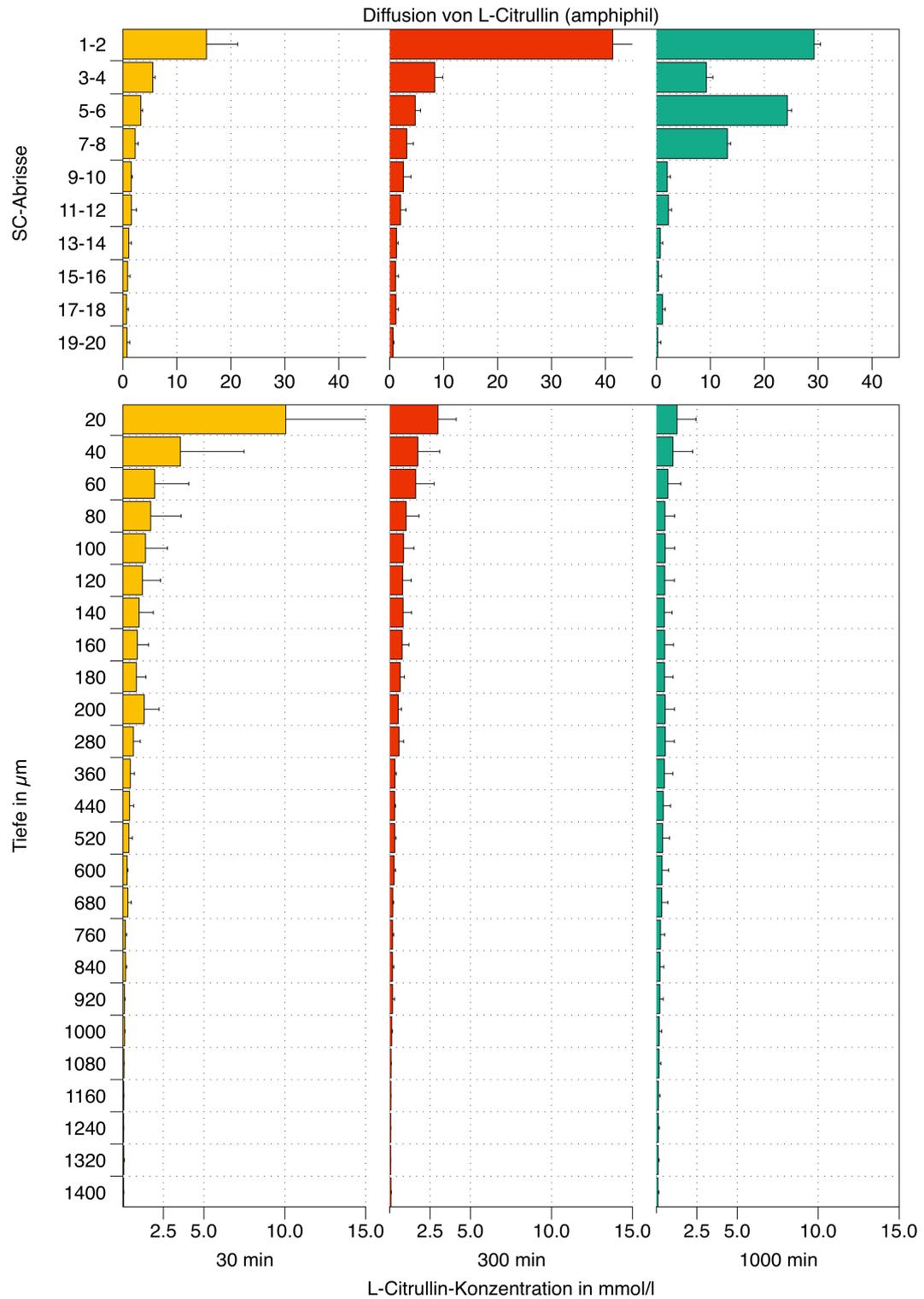


Abb. 10: L-Citrullinkonzentration in mmol/l in Abhängigkeit von der Tiefe nach amphiphilem Vehikelsystem

### 3.4.2 Penetration aus der hydrophilen Präparation

Die Penetrationsdynamik aus der hydrophilen Präparation in das SC ist mit der amphiphilen vergleichbar. Allerdings diffundieren geringere Mengen, ebenfalls im zeitlichen Verlauf ansteigend. Die durchschnittlichen Penetrationswerte liegen bei 2,7 mmol/l (30 min), 3,5 mmol/l (300 min) und maximal bei 6,2 mmol/l nach prolongierter Einwirkzeit von 1000 min. Das Verteilungsmuster im Stratum corneum bevorzugt ebenfalls das obere Schichtdrittel bis 6 µm Tiefe. Bei 1000 min Applikationsdauer akkumuliert L-Citrullin sogar bis in 12 µm Schichttiefe des SC, was mehr als der Hälfte seiner Dicke entspricht.

Es ist zu verzeichnen, dass aus dem hydrophilen Vehikelsystem wesentlich mehr Wirkstoff in die Epidermis verbracht wird als aus den anderen Grundlagen, insbesondere nach prolongierter Einwirkzeit. Die Durchschnittswerte betragen 1 mmol/l nach 30 min, 4,5 mmol/l nach 300 min und 4,7 mmol/l nach 1000 min. In der Epidermis sind durchweg höhere Citrullinkonzentrationen als in den unteren Schichten des SC nachweisbar. Mit zunehmender Schichttiefe sinkt die Citrullinkonzentration tendenziell. Die verstärkte Anreicherung im oberen Drittel der Epidermis ist mit der Depotbildung im Stratum corneum vergleichbar.

Unterhalb 200 µm lassen sich durchschnittliche L-Citrullinkonzentrationen von 0,1 mmol/l (30 min), 1 mmol/l (300 min) und 1,1 mmol/l (1000 min) detektieren. Bei längerer Einwirkzeit ab 300 Minuten sind dies die höchsten dermalen Konzentrationen überhaupt. Mit zunehmender Schichttiefe sinkt die Konzentration nachgewiesenen L-Citrullins. Eine Akkumulation im oberen dermalen Drittel ist ersichtlich.

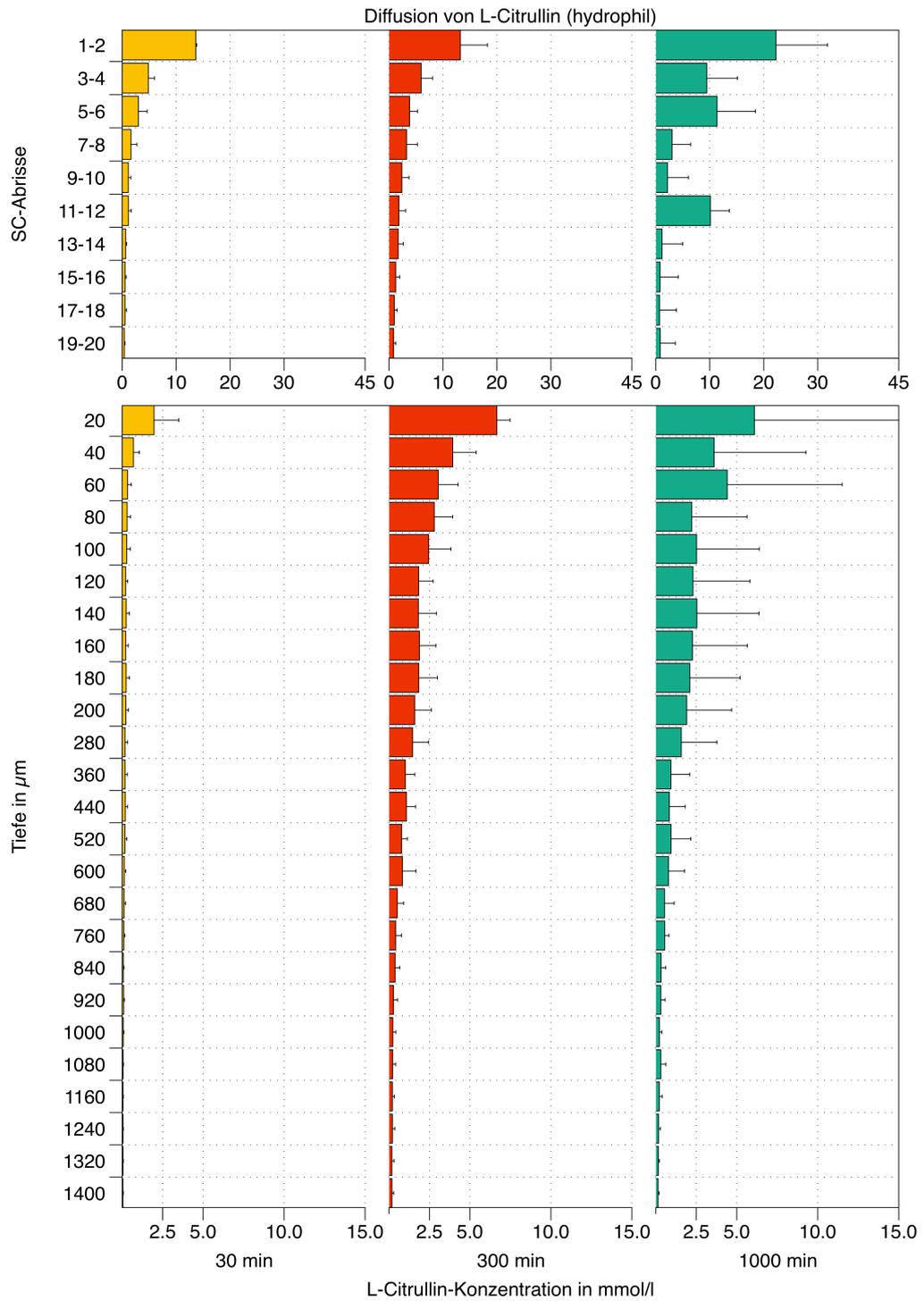


Abb. 11: L-Citrullin-Konzentration in mmol/l in Abhängigkeit von der Tiefe nach hydrophilem Vehikelsystem

### 3.4.3 Penetration aus der lipophilen Präparation

Die Penetration von L-Citrullin in das SC aus dem lipophilen Vehikelsystem ist am schlechtesten, was die mittleren gemessenen Konzentrationen ausdrücken – 1,4 mmol/l nach 30 min, 1,0 mmol/l nach 300 min und 1,1 mmol/l nach 1000 min. Dynamisch betrachtet steigt die nach 30 min penetrierte Wirkstoffkonzentration nach verlängerter epikutaner Applikation nicht mehr an. Auch hier ergibt sich eine Akkumulation im oberen Drittel des SC nahezu unverändert im zeitlichen Verlauf.

Bei der Betrachtung der Wirkstoffpenetration in die Epidermis bis 200 µm Tiefe zeigen sich durchschnittliche Citrullinkonzentrationen von 2,6 mmol/l (30 min), 0,3 mmol/l (300 min) und 0,5 mmol/l (1000 min), was den niedrigsten Penetrationswerten im Vergleich aller Donatorsysteme entspricht – abgesehen von der 30 minütigen Applikationszeit. Hier ähneln die Befunde der gemessene Citrullinmenge und das Verteilungsmuster der amphiphilen Präparation nach mittlerer Einwirkdauer. Es erfolgt eine Akkumulation im oberen Drittel der Epidermis und eine Abnahme der Konzentration mit zunehmendem Penetrationsweg in die Tiefe. Die Diffusionswerte in die Dermis sind im Vergleich der Vehikelsysteme am niedrigsten.

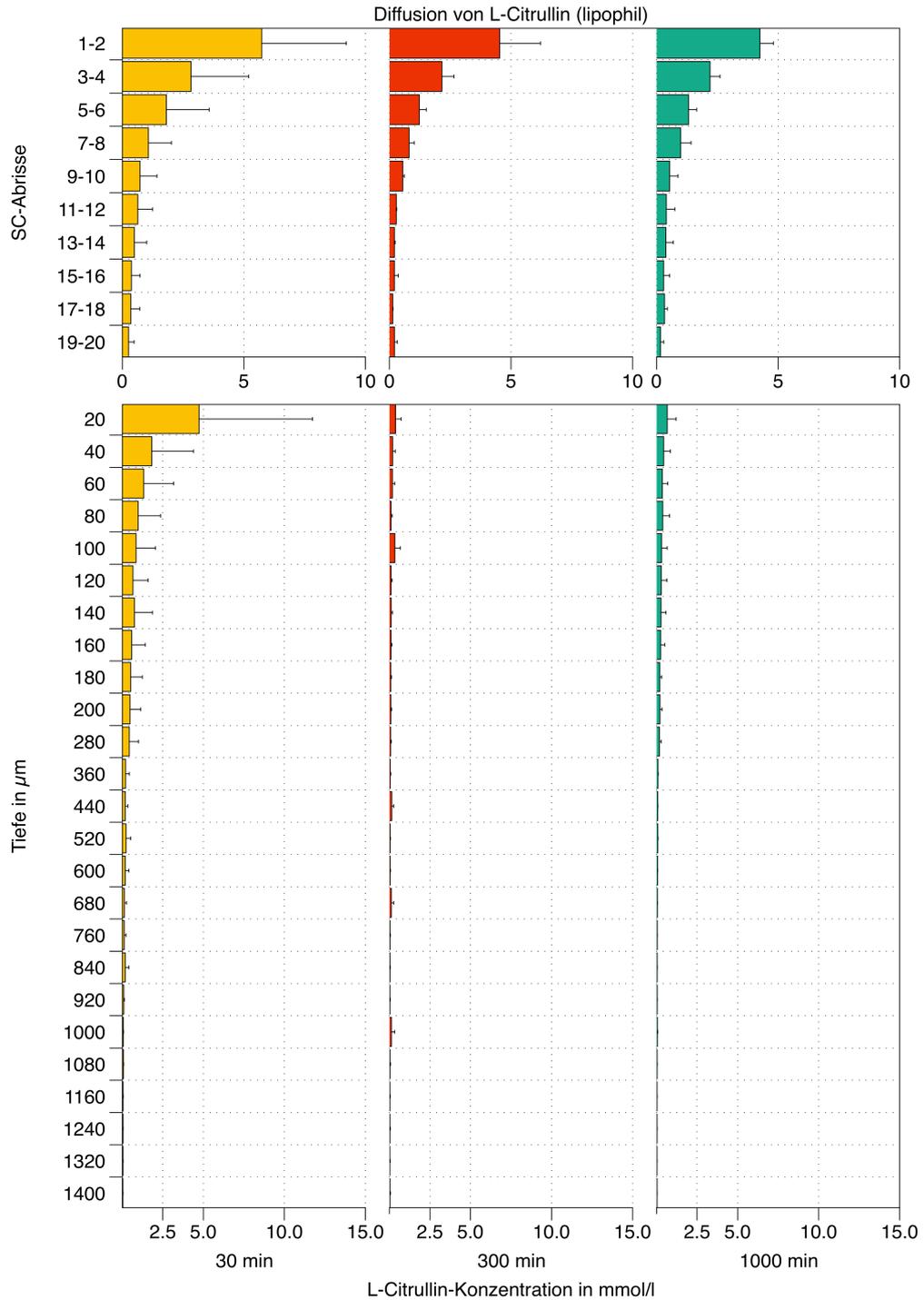


Abb. 12: L-Citrullin-Konzentration in mmol/l in Abhängigkeit von der Tiefe nach lipophilem Vehikelsystem

## **4 DISKUSSION**

### **4.1 Zeigen sich Unterschiede der verschiedenen Vehikelsysteme im Diffusionsmodell?**

Für die Penetration eines Wirkstoffes in die Haut ist ein komplexes Zusammenwirken vieler Faktoren verantwortlich. Trotz aller Modellvorstellungen und mathematischen Beschreibungen des Wirkstofftransports können nicht alle Einflussgrößen gleichzeitig betrachtet werden. Im Rahmen der präklinischen Studie zur Erforschung von L-Citrullin als potenziell neuem Wirkstoff gilt es, das Penetrationsverhalten in Abhängigkeit vom Vehikelsystem zu beurteilen. Um eine Beeinflussung durch andere Faktoren zu verhindern, sind folgende Konditionen konstant: Die Menge des in die Präparation eingearbeiteten L-Citrullins, die Hautproben und die Versuchsbedingungen in der Franz'schen Zelle unter Annahme idealer Diffusionsverhältnisse (steady state, Sink-Bedingungen) (Anissimov et al., 2006; Höche, 2003). Im Umkehrschluss sind demzufolge Unterschiede der gefundenen Penetrationsdaten dem jeweiligen Vehikelsystem zuzuschreiben, welches mit dem Wirkstoff und dem Stratum corneum durch komplexe physikochemische Prozesse interagiert. Somit müssen die galenischen Grundlagen genauer betrachtet werden, um unterschiedliche Befunde interpretieren zu können. Der Diffusionskoeffizient ist treibende Kraft und geschwindigkeitsbestimmend für den Wirkstofffluss aus der Formulierung über das Stratum corneum in die vitalen Schichten von Epidermis und Dermis (1. Fick'sches Diffusionsgesetz) (Anissimov et al., 2006).

Die Nomenklatur der Grundlagensysteme ist vielfältig und basiert teilweise noch auf alten Bezeichnungen des Deutschen Arzneimittelbuches (DAB 6) von 1924 (Wolf, 2006a). Die in der Dermatologie bevorzugte Systematik von Externagrundlagen nach dem Phasendreieck (Komponenten flüssig, fest und fett für verschiedenste Galeniken kombinierbar) variiert von der Einteilung bei Pharmazeuten. Letztere umfasst als Kriterien rheologische Eigenschaften (flüssig oder streichfähig), Polarität (hydrophil oder lipophil) sowie physikochemische Gesichtspunkte (einphasig oder mehrphasig). Aus der Komplexität der Bezeichnungen ist kein eindeutiger Rückschluss auf die Galenik und ihre Eigenschaften zu ziehen (Daniels, 2009). So gibt es lipophile Cremes und hydrophile Salben. Die Orientierung an der neuen Nomenklatur und den Definitionen des Europäischen Arzneibuchs kann zur besseren Verständlichkeit beitragen, insbesondere auch die parallele Aufführung der zusammenhängenden Phasen, „O“ für Öl (lipophil) und „W“ für Wasser (hydrophil) (Wolf, 2006a). Cremes sind damit mehrphasige Systeme aus wässriger, lipophiler und einer Emulgator-Gerüstbildner-Phase (Staubach und Lunter, 2014). Hierbei beschreibt O/W ein System mit äußerer hydrophiler und innerer lipophiler Phase, W/O entsprechend

entgegengesetzt (Jacobi et al., 2006). Polare Emulgatoren mit hydrophilen und lipophilen Gruppen wirken als Vermittler zwischen diesen beiden Phasen. Sie können Grenzflächenspannungen in Abhängigkeit vom Emulgator-Typ verändern, so dass neue Grenzflächen entstehen und für die Dispergierung der inneren in der äußeren Phase sorgen. Die äußere Phase wird als Dispersionsmittel oder geschlossene (kohärente) Phase bezeichnet. In ihr löst sich der Emulgator (Stüttgen und Schaefer, 1974).

Die in dieser Studie verwendeten Vehikelsysteme bestehen aus einer Kombination von Lipiden, Wasser und Emulgatoren. Somit sind sie halbfest und mehrphasig (Daniels, 2009). Es werden drei Präparationsgrundlagen verwendet, eine hydrophile, eine lipophile und eine amphiphile. Wie im Folgenden beschrieben wird, unterscheiden sich deren Wasser- und Lipidgehalt, was Einfluss auf die Eigenwirkung der Grundlage hat. Sie vermag die Wasserabgabe (TEWL) durch Okklusion, die Penetrationsbedingungen durch Hydratation sowie Barriere- und Depotfunktion des Stratum corneum zu beeinflussen (Neubert et al., 2001). Wassereinlagerung in das Stratum corneum bewirkt über die Auflockerung der kompakten Hornschicht eine Verbesserung der Penetration der meisten Wirkstoffe (Sparr et al., 2012; Ting et al., 2004).

Als hydrophiles System dient die wasserhaltige hydrophile Salbe DAB, eine Creme vom O/W-Typ. Der Wasseranteil der äußeren hydrophilen Phase beträgt 70 %. Die innere Lipidphase (30 %) enthält weißes Vaseline, Paraffin und emulgierenden Cetylstearylalkohol, also Bestandteile von hydrophoben Salben (Standardisierte Rezepturen (NRF/SR), 2007). Zu den besonderen Eigenschaften des O/W-Systems zählen die gute Abwaschbarkeit mit Wasser und eine weitere hohe Wasseraufnahmekapazität (Wolf, 2006a). Es ist das Standardvehikelsystem mit dem geringsten Lipidgehalt und dadurch der geringsten okklusiven Wirkung. Somit fällt die dadurch bewirkte Hydratation des Stratum corneum geringer aus als durch andere Grundlagen (Daniels, 2009).

Als lipophiles System wurde die wasserhaltige Wollwachsalkoholsalbe des DAB verwendet, eine Grundlage vom W/O-Typ. Die äußere, kohärente Phase ist lipophil. Enthalten sind Emulgatoren vom Wasser-in-Öl-Typ, wie z.B. Wollwachsalkohole (Wolf, 2006a). Die ursprüngliche Salbenrezeptur (Wollwachsalkoholsalbe DAB) wird im Verhältnis 1:1 mit Wasser verdünnt (Standardisierte Rezepturen (NRF/SR), 2007). Deshalb ist die wasserhaltige Wollwachsalkoholsalbe DAB eigentlich eine Creme, zu 50 % aus Wasser bestehend (Neubert et al., 2001). Dennoch ist der Lipidgehalt gegenüber den anderen Grundlagen am höchsten. Die fettenden Eigenschaften lipophiler Cremes bewirken eine mäßige Okklusion und vermindern den TEWL. Somit

---

wird weniger Wasser über die Hautoberfläche abgegeben und im Stratum corneum zurückgehalten. Die Strömungsrichtung für Wasser wird in Richtung Epidermis gelenkt (Wolf, 2006a). Die W/O-Grundlage erschwert den Transport gelöster hydrophiler Wirkstoffe, da die äußere lipophile Phase als zusätzliche Grenzschicht, eine Penetrationsbarriere analog dem Stratum corneum, zu überwinden ist. Außerdem entsteht ein größerer Diffusionsweg nach dem Fick'schen Diffusionsgesetz (Neubert et al., 2001). Der Nachteil erschwerter Liberation konnte nach den Ergebnissen dieser Studie nicht durch den Okklusionseffekt kompensiert werden, was die schlechtesten Penetrationsraten in das Stratum corneum für das lipophile Vehikelsystem belegen.

Als amphiphile Galenik wurde die Basiscreme DAC verwendet. Der Wasseranteil beträgt 40 %. Weitere Bestandteile sind Lipide (mittelkettige Triglyceride und weißes Vaseline) sowie Emulgatoren vom W/O und O/W-Typ. Amphiphile Cremes sind weder als O/W- noch als W/O-System zu charakterisieren und stellen dadurch eine Zwischenform dar (Wolf, 2006b). Wässrige, lipophile und Emulgator-Gerüstbildner-Phase durchdringen sich gegenseitig, liegen also bikohärent parallel vor bzw. bilden ein trikohärentes System (Staubach und Lunter, 2014; Teichmann, 2007; Wolf, 2006b). Diese galenische Grundlage kombiniert die okklusiven Eigenschaften des lipophilen Systems mit dem guten Liberationsvermögen der hydrophilen Präparation. Das erklärt die besten Penetrationswerte für das Stratum corneum.

Aus diesen Betrachtungen folgt, dass in Abhängigkeit von der galenischen Grundlage nicht nur die Menge des penetrierten Wirkstoffs, sondern auch eine Beeinflussung des Stratum corneum als erstem Kompartiment zu berücksichtigen ist. Die Ausgangsbedingungen für den Weitertransport von L-Citrullin in tiefere Kompartimente sind dadurch verschieden, von da an aber unabhängig vom Vehikelsystem und nur noch vom Wirkstoff und seinem Diffusionsgradienten bestimmt.

Ein Vehikelsystem wird für günstig befunden, wenn in einer vorgegebenen Zeitspanne möglichst viel Wirkstoff in das Zielkompartiment eingeschleust werden kann. Da sich eine hydrophile Substanz wie L-Citrullin im lipophilen Stratum corneum, welches nur 15 % Wasser enthält (Touitou, 2002), schlecht zu lösen vermag, wird eine Penetrationshilfe vom Vehikelsystem erwartet. Es sollte außerdem eine ausreichende Wirkstoffkonzentration über einen längeren Zeitraum (Wirkstoff-Zeit-Profil) vermitteln (Trommer, 2012).

Für die durchgeführten Modellversuche mit radioaktiv markiertem L-Citrullin in drei verschiedenen „Standardvehikelsystemen“ steht fest, dass der zu detektierende Wirkstoff zu Beginn nur in der Formulierung enthalten gewesen ist. Nach Ablauf der

Versuche in der Diffusionszelle ist L-Citrullin in alle Schichten der Haut und die Akzeptorflüssigkeit penetriert. Über einen Co-Transport der verwendeten Vehikelsysteme sind keine Aussagen möglich. Um dies präzise zu bestimmen, hätte es einer gleichzeitigen anderen Markierung und Detektion der galenischen Grundlage bedurft. Hauptsächlich interessierte jedoch die Frage, ob L-Citrullin in die Haut zu penetrieren vermag, um dort für physikochemische oder metabolische Prozesse verfügbar zu sein.

Die Diffusion einer hydrophilen Substanz verläuft im wässrigen Milieu am besten. Das Stratum corneum ist zwar als lipophiles Kompartiment aufzufassen, weist jedoch interzellulär (bricks and mortar model) auch wasserhaltige Diffusionswege auf (Touitou, 2002). Über diese als „wassergefüllte Weichen“ (Neubert et al., 2001) bezeichneten Penetrationswege verläuft die Verteilung von L-Citrullin im Stratum corneum. Das entspricht dem interzellulären Weg (Jacobi et al., 2006). Zusätzlich wird für Aminosäuren ein Penetrationsweg über polare Mikroporen beschrieben, allerdings weniger bedeutsam als der interzelluläre Weg (Jacobi et al., 2006; Sznitowska et al., 1998). Für die Bildung von Mikroporen richten sich die Hydrolipide des Stratum corneum um wasserhaltige Schichten so aus, dass die hydrophilen Kopfgruppen nach innen weisen und ein Porensystem mit vertikaler Ausrichtung entsteht, welches die Penetration hydrophiler Substanzen in die Tiefe erleichtert (Sznitowska et al., 1998).

Nach Überwindung des Stratum corneum stellen die tiefen Hautschichten Epidermis und Dermis wegen ihres hydrophilen Charakters eine geringere Penetrationsbarriere für L-Citrullin dar. Modellvorstellungen fassen diese Kompartimente als einheitliches homogenes Hydrogel auf, in welchem eine hydrophile Substanz gut diffundieren kann (Anissimov et al., 2013; Neubert et al., 2001). Tatsächlich ist das anatomische Korrelat in vivo nicht uniform, was verursacht wird durch die Vielzahl der darin enthaltenen Strukturen (Keratinocyten, interzelluläre Verbindungen und Zellzwischen-schichten, Basalmembran, Fibroblasten, Histozyten, kollagene und elastische Fasern, oberflächlicher und tiefer Gefäßplexus sowie Adnexstrukturen) (Neubert et al., 2001). Es ist anzunehmen, dass L-Citrullin bei der Penetration durch dieses Medium ebenfalls interzelluläre Wege bevorzugt, aber auch Zellmembranen über Transportersysteme passieren kann, wie für andere Aminosäuren beschrieben (Closs et al., 2004).

---

#### 4.2 Werden Unterschiede des Diffusionsmodells durch die Ergebnisse bestätigt?

In dieser Studie kann gezeigt werden, dass L-Citrullin nach epikutaner Applikation aus allen Vehikelsystemen in die Haut penetriert. Die höchsten Wirkstoffkonzentrationen sind im *Stratum corneum* gemessen worden, überwiegend im oberen Drittel. Das amphiphile Donatorsystem hebt sich von den anderen galenischen Grundlagen ab, da es in der Lage ist, die höchsten Konzentrationen im kürzesten Zeitraum von 30 Minuten dorthin zu verbringen. Das ist etwa ein Drittel mehr als beim hydrophilen und mehr als doppelt so viel wie beim lipophilen System. Die Anreicherung von L-Citrullin im Stratum corneum ist als Depotbildung zu interpretieren, aus welchem unter in-vivo-Bedingungen sowohl lokale Effekte als auch eine weitere kontinuierliche Wirkstoffabgabe an tiefere Schichten abzuleiten sind. Prolongierte Einwirkzeiten steigern mit Ausnahme der lipophilen Präparation dieses Depot im Stratum corneum. Die Leistungsfähigkeit des amphiphilen Systems ist gegenüber dem hydrophilen bis zu 50 % (mittlere Applikationsdauer) höher. Somit weisen die Ergebnisse dieser Studie das amphiphile Vehikelsystem für das Stratum corneum als am besten geeignet aus.

Nach kurzer Applikationszeit finden sich für die *Epidermis* höchste L-Citrullin-Konzentrationen aus dem amphiphilen Donatorsystem (Abb. 7, 10-12). Dass nach dieser Zeitspanne auch aus der lipophilen Präparation wesentlich mehr Citrullin als aus der hydrophilen detektiert wird, ist als falsch positiver Befund zu bewerten. Es ist unwahrscheinlich, dass die Präparation mit der niedrigsten Wirkstoffliberation in das Stratum corneum zeitgleich mehr Penetration in die Tiefe bewirkt als das hydrophile Vehikelsystem mit fast doppelter Citrullinliberation (Abb. 7). Erklärbar ist dieses Phänomen durch einen größeren Gehalt an Adnexstrukturen für die betroffenen Messreihen. Insgesamt ist das lipophile Vehikelsystem auch nach längerer epikutaner Positionierung den anderen Systemen unterlegen. Dies steht in Einklang mit den erwarteten schlechtesten Liberationsbedingungen für L-Citrullin.

Mit prolongierter Einwirkzeit gleicht sich die Leistungsfähigkeit des hydrophilen Vehikelsystems der des amphiphilen an und übertrifft diese nach 300 und 1000 Minuten Applikationszeit (nach 300 Minuten etwa doppelt, nach 1000 Minuten fast fünffach) (Abb. 9, 10). Das ist ein Indiz dafür, dass aufgrund der geringeren Okklusion der Hydratationseffekt im Stratum corneum verzögert ist, sich dann aber im zeitlichen Verlauf einstellt und die Penetration in die Epidermis fördert. Wegen des höheren Wassergehalts der hydrophilen Grundlage (70 % gegenüber 40 % in der amphiphilen Präparation) ergibt sich über den „solvent drag“-Mechanismus eine Permeationssteigerung durch das Stratum corneum. Darunter ist der Co-Transport des

hydrophilen L-Citrullins mit der wässrigen Vehikelgrundlage zu verstehen (Neubert et al., 2001). Das Konzentrations-Zeit-Profil in der Epidermis ist nach hydrophiler Grundlage konstant und damit für das epidermale Kompartiment optimal.

Für die *Dermis* ergibt sich insgesamt die niedrigste Nachweisrate von L-Citrullin. Die Rangfolge der Penetrationswerte in Abhängigkeit von der Zeit ist wie in der Epidermis: nach kurzer Applikationszeit ist das amphiphile, nach prolongierter Wirkzeit das hydrophile System überlegen. Das Konzentrations-Zeit-Profil ist für die hydrophile Präparation ab 300 Minuten am besten und über den weiteren Zeitverlauf stabil. Die falsch positiven Befunde des lipophilen Donators nach 30 Minuten setzten sich in das dermale Kompartiment fort. Insgesamt sind die Penetrationsraten für dieses System am niedrigsten.

Beim Vergleich der L-Citrullin-Konzentration in Abhängigkeit von der applizierten Dosis (Abb. 7-9) spricht der optische Eindruck für eine höhere Konzentration in der Dermis als in der Epidermis. In Wirklichkeit nimmt die L-Citrullin-Konzentration mit der Schichttiefe ab (Abb. 10-12). Der Unterschied ist methodisch bedingt und wird durch die verschiedene Dicke der Dermisstümpfe verursacht, die rechnerisch dem dermalen Kompartiment zugeordnet werden.

Für die *beiden tiefen Kompartimente* zeigt nach prolongierter Einwirkzeit das hydrophile Vehikelsystem die höchsten detektierten epidermalen und dermalen Citrullinkonzentrationen, bezogen auf den zeitlichen Verlauf von 300 bis 1000 Minuten in nahezu konstantem Bereich und Verteilungsmuster (Abb. 11). Das ist das beste Konzentrations-Zeit-Profil von allen verglichenen Systemen. Die vorliegenden Modellversuche lassen vermuten, dass das hydrophile Donatorsystem für tiefere Effekte am besten geeignet ist. Letztlich müssten weitere Studien darüber entscheiden, ob eine relativ rasche Wirkstoffanflutung (amphiphil) oder eine verzögerte, aber dafür lange persistierende Wirkstoffkonzentration (hydrophil) aus klinischer Sicht zu bevorzugen wäre.

Die gemessenen L-Citrullinkonzentrationen in der *wässrigen Akzeptorlösung* bestätigen die vorgestellten Befunde: Die höchsten Wirkstoffkonzentrationen finden sich vorwiegend nach der amphiphilen Präparation, die niedrigsten nach den Versuchsreihen mit lipophiler Präparation, jeweils als Beweis einer sehr guten oder extrem schlechten Liberation und Permeation. Epidermale und dermale Akkumulation von L-Citrullin nach prolongierter Applikationszeit aus hydrophilem O/W-System werden durch mittlere Akzeptorkonzentrationen bestätigt.

### **4.3 Welche Effekte sind für die Zielkompartimente zu erwarten?**

Die Auswahl des Vehikelsystems soll nicht nur das Ausmaß der Penetration bestimmen, sondern auch für eine Akkumulation des Wirkstoffs im angestrebten Zielkompartiment sorgen (optimales Konzentrations-Zeit-Profil). Diese über das Donatorsystem vermittelte Bioverfügbarkeit von L-Citrullin ist Gegenstand der Studie, wobei dessen Eigenwirkung für die folgende Diskussion vernachlässigt wird, abgesehen vom penetrationsverbessernden Potenzial für tiefere Kompartimente. Durch L-Citrullin sind im Stratum corneum Einflüsse auf die Hygroskopizität und architektonische Struktur vordergründig. In der Epidermis ist die Beeinflussung des keratinozytären Metabolismus mit sekundären Wirkungen bis in das Stratum corneum oder die Dermis zu diskutieren. Durch den Wirkstofftransport in die Dermis werden metabolische Prozesse im Gefäßendothel getriggert und Interaktionen mit Bestandteilen des Immunsystems sowie die systemische Verfügbarkeit über das Blut- und Lymphsystem vermittelt.

#### **4.3.1 Hygroskopischer Effekt**

Struktur und Funktion des Stratum corneum beeinflussen die Barrierefunktion der Haut, den Schutz des Organismus vor Austrocknung und Umwelteinflüssen. Dies geschieht durch Regulation von Wasseraufnahme und -abgabe (TEWL) (Rawlings and Harding, 2004; Sparr et al., 2012). Obwohl das Stratum corneum nur eine sehr dünne Membran ist (in Abhängigkeit von der Hautregion etwa 15 µm dick), verhindert es den Wasserverlust der hydratisierten vitalen Epidermis, selbst bei extrem trockener Atmosphäre (Ya-Xian et al., 1999). Die Morphologie des Stratum corneum ist durch das „bricks and mortar“-Modell zu beschreiben. Verhornte avitale Hautzellen (Korneozyten) sind in eine lamelläre Lipidmatrix eingebettet. Insgesamt enthält das Stratum corneum 70 % Proteine, 15 % Lipide und 15 % Wasser (Touitou, 2002). Proteine und Lipide werden von vitalen Keratinozyten gebildet. Die Lipide (hauptsächlich Ceramide, Cholesterin und Fettsäuren) gelangen in das extrazelluläre Kompartiment. Proteine verbleiben im Zytosol. Während der terminalen Differenzierung werden die Proteine, vor allem Filaggrin, durch Proteolyse gespalten und generieren damit den Aminosäureanteil des Natural Moisturizing Factor (NMF) (40 %) (Rawlings and Harding, 2004). Dabei kommt L-Citrullin mit 5-7 % in fast gleicher Menge wie Harnstoff vor (Ziegenmeyer, 1992). Die Bestandteile des NMF in den Korneozyten bedingen durch hygroskopische Effekte die Hydratation des Stratum corneum (Wohlrab, 2001). Elektronenmikroskopische Untersuchungen zeigen, dass die mittleren Layer des Stratum corneum mehr hydratisiert sind als tiefere und oberflächliche. Dies

äußert sich in einem größeren Zellvolumen. Diese Schicht reagiert auf wechselnde Luftfeuchtigkeit mit einem unterschiedlichen Schwellungszustand (Hydratisierung) der Korneozyten. Der Prozess der Exfoliation kann durch hydratisierte Korneozyten verzögert werden (Rawlings and Harding, 2004).

Da im Stratum corneum die höchste Bioverfügbarkeit von L-Citrullin erreicht worden ist, kann mit einer Verbesserung des NMF und entsprechenden Veränderungen der Hydratation gerechnet werden. Eine Korneometrie ist im Rahmen dieser Studie nicht durchgeführt worden, erscheint aber von Interesse bei zukünftigen Experimenten. Dies gilt insbesondere bei exsikkierten Hautzuständen (im Rahmen von Dermatosen und Hautalterung).

Ein anderer Weg, den NMF zu verbessern, ergibt sich durch eine Beeinflussung des keratinozytären Metabolismus, wenn dort mehr L-Citrullin bioverfügbar ist. Analog zu klinisch überprüften Befunden, wonach über extern zugeführtes L-Arginin die Harnstoffproduktion in den Keratinozyten gesteigert wurde (Wohlrab et al., 2003), wird für in die Epidermis penetriertes L-Citrullin ebenfalls diese Fähigkeit postuliert. Über negative Feedback-Hemmung der Stickstoffmonoxid-Synthase (NOS) kommt es zur erhöhten Metabolisierung von L-Arginin zu Ornithin über die Arginase-Reaktion (Abb. 4). Dabei entsteht Harnstoff, der mit der Differenzierung der Keratinozyten schließlich in das Stratum corneum gelangt. Irritativ-toxische Effekte, wie nach externer Urea-Applikation, dürften dabei nicht vorkommen. Vermutlich können von epikutan penetriertes L-Citrullin und endogen synthetisierter Harnstoff in synergistischem Zusammenwirken den NMF verbessern und die Hygroskopizität des Stratum corneum erhöhen.

Außerdem wird vermutet, dass extern appliziertes L-Citrullin über Argininsuccinat-Synthase (ASS) und Argininsuccinat-Lyase (ASL) zur Resynthese von L-Arginin führt und über diesen Weg mehr Substrat für die Harnstoffsynthese bereitsteht (Asgeirsson et al., 2011; Morris Jr., 2002). In der Haut scheint aufgrund einer inkompletten Enzymausstattung im Gegensatz zu anderen Organsystemen dieses Recycling von L-Arginin aus L-Citrullin nicht zu funktionieren, so dass die Theorie zu verwerfen ist (Crouse and Rothberg, 1961).

#### **4.3.2 Erhöhung der antioxidativen Kapazität**

Exogene Stressoren setzen unspezifische Entzündungsreize und induzieren über die Aktivierung der iNOS dauerhaft erhöhte NO-Konzentrationen (Bruch-Gerharz et al., 1998a). Eine unphysiologisch hohe Stickoxidbelastung wird als nitrosativer Stress

bezeichnet und führt durch eine Beeinträchtigung der mitochondrialen Atmungskette über anfallendes Superoxid zur Bildung toxischen Peroxidnitrits (Siervo et al., 2011; Jabs, 2008). Durch Peroxidnitrit wird die mitochondriale Atmung irreversibel gehemmt und die Mitochondrien generieren fortlaufend Superoxidradikale. Es resultiert eine Mitochondriopathie durch nitrosative und oxidative Belastung. Diese ist pathogenetisch bedeutsam und bewirkt vielfältige Symptome bei unterschiedlichen Hauterkrankungen wie chronische Entzündungen, Verhornungsstörungen, Induktion von Zytokinen, Gefäßproliferation, vermehrte Synthese von Adhäsionsmolekülen und Onkogenen (Jabs, 2008).

Die Aminosäuren des NMF stellen einen natürlichen Schutz gegen reaktive Sauerstoffspezies und Stickoxidradikale dar, somit auch L-Citrullin (Jabs, 2008). In der Literatur wird L-Citrullin als hochwirksamer Hydroxyl-Radikalfänger in den Blättern der Wassermelone aufgeführt. Unter den Extrembedingungen der Wüste können DNA-Schäden infolge von oxidativem Stress über eine Akkumulation von Citrullin reduziert werden (Akashi et al., 2001).

Da es gelungen ist, epikutan appliziertes L-Citrullin in die Haut zu verbringen, ist eine Unterbrechung pathogenetischer Prozesse vorstellbar. Über negative Feedback-Hemmung der NOS könnte die Neuentstehung von Stickoxid verringert werden (Hobbs et al., 1999; Ulhaq et al., 1999).

#### **4.3.3 Citrullinierte Proteine**

Citrullinierte Proteine der Haut entstehen im Rahmen der terminalen Differenzierung von Keratinozyten und sind mit der Schutzfunktion der Epidermis assoziiert (Stratum corneum, Haare, Nägel). Von den zahlreichen Keratinen ist besonders Keratin K1, im Stratum spinosum und granulosum synthetisiert, funktionell wichtig (Ishida-Yamamoto et al., 2000; Löffler et al., 2007).

Die Citrullinierung erfolgt als posttranslationale Modifikation zuvor zellulär synthetisierter Proteine, die Arginin enthalten (Curis et al., 2005; Kaore et al., 2013). Sie wird durch ein spezifisches Enzym, die Protein-Arginyl-Desaminase (PAD), katalysiert (Abb. 13) (Vincent et al., 2005).

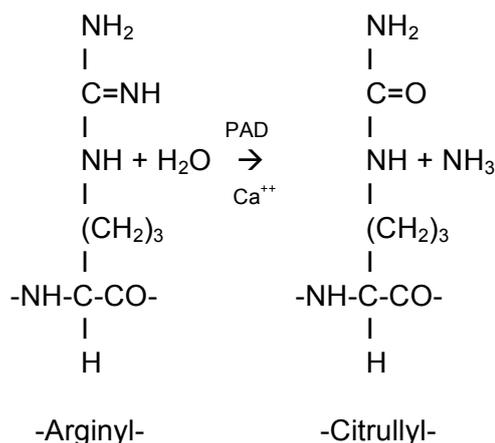


Abb. 13: Posttranslationale Modifikation von Proteinen (nach Vincent et al., 2005).

Die Citrullinierung geschieht durch Modifikation der Aminoäuresequenz, wobei nach Desaminierung aus Arginyl Citrullyl entsteht (Vincent et al., 2005). Dieser Vorgang ist unabhängig vom Vorkommen freien Citrullins (Curis et al., 2005).

Die pathogenetische Bedeutung citrullinierter Proteine resultiert aus deren Assoziation mit Autoimmunerkrankungen, z.B. Rheumatoider Arthritis (Anti-CCP-AK) oder Multipler Sklerose (MBP) (Curis et al., 2005; Girbal-Neuhauser et al., 1999; Vincent et al., 2005).

Die verminderte Citrullinierung von Keratin K1 in der Epidermis wird für Psoriasis-Plaques beschrieben. Gesunde Hautregionen sind davon nicht betroffen gewesen (Ishida-Yamamoto et al., 2000).

In der Literatur ist über die direkte Einflussnahme von L-Citrullin auf Citrullinierungsprozesse bisher nichts bekannt. Theoretische Vorstellungen für die Entwicklung diesbezüglich wirksamer Externa müssen nach gegenwärtiger Kenntnis der biochemischen Prozesse verworfen werden. Dennoch wären klinische Untersuchungen an Psoriasis-Haut interessant.

#### 4.3.4 Systemische Verfügbarkeit

Bevor neue pharmazeutische Wirkstoffe als Arzneimittel oder Kosmetikum praktische Anwendung finden, sind präklinische Versuche erforderlich. Der klinische Wirknachweis des theoretisch vermuteten Effektes steht in der Reihenfolge der Studien erst weit am Ende. Zunächst vermögen experimentelle ex-vivo-Studien ohne ethische Konflikte physikochemische und pharmakokinetische Fragen zu beantworten. In gewissen Grenzen können daraus auch Rückschlüsse auf klinische Effekte, Verträglichkeit und Toxizität gezogen werden.

Da L-Citrullin in den Schichten der Haut nicht nur als prozentuale Verteilung der insgesamt gemessenen Menge, sondern auch quantitativ in mmol/l erfasst worden ist, sind Vergleiche mit in-vivo-Befunden möglich.

Zur dermalen L-Citrullin-Konzentration finden sich in der Literatur kaum Angaben. Birnkammer ermittelt nach Tesaabbrissen für das Stratum corneum einen mittleren Wert von  $32,2 \pm 26,4$  nmol/cm<sup>2</sup> (Birnkammer, 1971).

Die physiologische Plasma-Konzentration von Citrullin wird mit 20-50 µmol/l angegeben (Curis et al., 2005). Damit steht dem Organismus Substrat für die de-novo-Synthese von Arginin, die 60 % des Gesamtbedarfs liefert, zur Verfügung. Frei zirkulierendes Arginin wird in hohem Maß von der Leber metabolisiert und damit anderen Organen, die es für die Regulation der Ureasynthese benötigen, entzogen. Über Citrullin wird dieses Problem gelöst, indem es als maskiertes Arginin aufgefasst wird. Die Leber ist nicht fähig, Citrullin aus dem portalen Kreislauf aufzunehmen (Cynober et al., 2010).

Nach epikutaner Applikation finden sich im Stratum corneum Konzentrationen zwischen 1000 und 8300 µmol/l. In die Epidermis penetrierten 250 bis 5200 µmol/l. In dermale Schichten mit potenziellem Anschluss an das Blut- und Lymphgefäßsystem gelangen immerhin 70 bis 1100 µmol/l. Selbst die minimal detektierten Konzentrationen von L-Citrullin aus der lipophilen Präparation überschreiten den mittleren Plasma-Wert und stellen die in dieser Studie eher als negativ bewerteten niedrigen Messwerte in einen anderen Kontext. Eine toxische Wirkung unphysiologisch hoher L-Citrullin-Konzentrationen kann zunächst nicht ausgeschlossen werden. Dagegen sprechen allerdings weitere Daten aus der Literatur. Schwedhelm und Mitarbeiter untersuchen in einer Studie die orale Aufnahme von L-Citrullin und L-Arginin. In Abhängigkeit von der oralen Dosis können maximale Plasmakonzentrationen von  $864 \pm 45$  µmol/l nachgewiesen werden. Dieser Wert ist etwa 30-fach höher als der Normwert gewesen, entspricht einer zirkulierenden systemischen Konzentration, verursacht jedoch keine negativen Effekte bei den Probanden (Schwedhelm et al., 2007).

Vergleichbare Arbeiten zu den Aminosäuren L-Arginin und L-Ornithin, die in metabolischem Zusammenhang zu L-Citrullin stehen, konnten ebenfalls keine zytotoxischen Effekte nachweisen (Wohlrab, 2001; Höche 2003). Somit werden die ermittelten Penetrationsraten von L-Citrullin nicht als potenziell riskant eingeschätzt.

#### **4.4 Welche Faktoren können die experimentellen Messergebnisse beeinflussen?**

##### **4.4.1 Franz'sche Diffusionszelle**

Für die Simulation der Vorgänge, die sich nach epikutaner Applikation von Externa an humaner Haut in vivo abspielen, sind für präklinische Studien Versuche an der Franz'schen Diffusionszelle etabliert (Franz, 1975; Neubert et al., 2001). Trotzdem ist die Franz'sche Zelle kein ideales System. In dem Maße, wie die zu untersuchende Substanz in den Akzeptor permeiert, sinkt der Diffusionsgradient, weil kein Abtransport der Akzeptorflüssigkeit stattfindet – andere Verhältnisse als in vivo mit kontinuierlicher, vaskulärer Perfusion. Die angenommenen Sink-Bedingungen bestehen in idealer Weise nur zu Beginn des Versuches.

##### **4.4.2 Kryokonservierte Hautproben**

Über die Aufbewahrungsmethoden von Hautproben gibt es in der Literatur kontroverse Meinungen. Swarbrick et al. beschreiben, dass die Kryokonservierung durch Auskristallisation der Wassermoleküle Zellen und die Interzellulärmatrix schädigt, woraus eine beschleunigte Permeation resultiert. Dies sei bei getrockneten und rehydrierten Proben nicht der Fall, da auch unter in-vivo-Bedingungen die Haut ohne Schädigung der Barriere starke Schwankungen von Feuchtigkeit oder Trockenheit zu tolerieren vermag (Swarbrick et al., 1984).

Franz dagegen hat die Permeabilität von unmittelbar nach Exzision und bis zu drei Monaten kryokonservierten Hautproben verglichen, dabei keine Unterschiede festgestellt und folglich die Übertragbarkeit des in-vitro-Modells auf in-vivo-Bedingungen für zulässig befunden (Franz, 1975).

Modellversuche zur Penetration mit tiefgefrorenen Hautproben ex vivo sind inzwischen gut etabliert (Franz, 1975; OECD/OCDE, 2004; Zhong et al., 2009), so dass auch die Ergebnisse der vorliegenden Studie Rückschlüsse auf das Hautorgan unter klinischen Bedingungen erlauben, zumal die Proben auch nur zwei bis drei Wochen kryokonserviert waren.

Außerdem vernachlässigt das Versuchsmodell eine potenzielle Verstoffwechselung des Wirkstoffes im Untersuchungszeitraum (Franz, 1975), obwohl die Zellsysteme nach Kryokonservierung noch längere Zeit vital sind (Neubert et al., 2001). Die Aktivität der Enzymsysteme ist nicht vollständig geklärt und daher schwierig einzuschätzen (Wohlrab, 2001). Die Haut unterliegt einer Vielzahl von Regulationsprozessen,

getriggert durch die Gewebepfusion, neuronale, hormonelle, enzymatische und viele andere Reize, die dem ex-vivo-Modell fehlen. Es ist denkbar, dass die Enzymsysteme der Zellen durch Einfrieren und Auftauen nach zwei bis drei Wochen Lagerungszeit eine Schädigung erfahren haben (Swarbrick et al., 1984). Für Untersuchungen zur Penetration eines Wirkstoffes, wie in der vorliegenden Studie geschehen, spielen metabolische Prozesse eine untergeordnete Rolle, so dass die Ergebnisse von dieser Diskussion nicht tangiert werden dürften.

#### **4.4.3 Zuordnung des Hautkompartiments**

Die Dicke des Stratum corneum beträgt nach Literaturangaben in Abhängigkeit von der Region 10-20  $\mu\text{m}$  (Frash and Barbero, 2003). Für Brusthaut entspricht dies einer Anzahl von  $13 \pm 4$  Layern nach Tesaabrissen (Ya-Xian et al., 1999). Für die vorliegenden Versuche an Mamma-Haut wird für das Stratum corneum eine Dicke von 20  $\mu\text{m}$  (20 Tesaabrisse) und für die Epidermis von bis zu 200  $\mu\text{m}$  (4-10 Mikrotomschnitte) definiert und histologisch abgesichert.

Die hier erhobenen Befunde höchster L-Citrullin-Akkumulation betreffen für alle Versuchsreihen das obere Drittel der Hautproben bis in 8  $\mu\text{m}$  Schichttiefe. Dem anatomischen Korrelat entspricht sicher das Stratum corneum.

Für den Übergangsbereich der dermo-epidermalen Zone ist aufgrund des anatomischen Profils der Papillarstruktur eine gewisse Unschärfe im Bereich von 200  $\mu\text{m}$  Schichttiefe zu diskutieren, weil hier Anteile von Epidermis und Dermis gemeinsam vorliegen können. Die detektierten Messwerte sind sehr gering und für die Interpretation der Ergebnisse dieser Studie von untergeordnetem Interesse. Im Vordergrund steht die Abschätzung von Konzentrations-Zeit-Profilen in Abhängigkeit vom Vehikelsystem. Das Penetrationsmodell betrachtet Epidermis und Dermis als einheitliches hydrophiles Kompartiment, wobei es hauptsächlich auf die Beschreibung von Tendenzen der Verteilung von L-Citrullin und weniger auf absolute Messwerte ankommt.

#### **4.4.4 Beschaffenheit von Hautproben gleichen Ursprungs**

Trotz gleicher Donatorregion aller Hautproben (Mammahaut von Reduktionsplastiken), ist der Gehalt an Talg-, Schweiß- und Duftdrüsen sowie Haarfollikeln variabel gewesen. Die epikutan applizierte Präparation kann über Adnexstrukturen unabhängig von Diffusionsvorgängen in tiefere Schichten gelangt sein. Bei der Untersuchung von

Schnitten mit vielen Ausführungsgängen lässt sich erheblich mehr L-Citrullin detektieren, was dann falsch positive Penetrationsraten vortäuscht.

#### **4.4.5 Applikationszeit**

Versuche in der Franz'schen Diffusionszelle erlauben ohne weiteres, eine Präparation auch über lange Zeiträume mit der Hautprobe in Kontakt zu halten. Die maximale Applikationsdauer beträgt in dieser Studie 1000 Minuten, das sind fast 17 Stunden Einwirkzeit. Dabei interessieren vorwiegend Daten zur Leistungsfähigkeit unterschiedlicher Vehikelsysteme im Rahmen einer präklinischen Studie. Weniger wichtig ist die Übertragbarkeit der Befunde auf klinische Bedingungen. Ungestörte Einwirkzeiten über 30 Minuten wären unter in-vivo-Verhältnissen bei lebenden Probanden – abgesehen von Okklusivverbänden auf kleinen Flächen – nicht praktikabel. Ein aufgetragenes Externum ist immer den Umwelteinflüssen ausgesetzt (mechanischen, thermischen oder chemischen), so dass der nicht in die Haut verbrachte Anteil dem Risiko rascher Entfernung unterliegt.

## 5 ZUSAMMENFASSUNG

L-Citrullin ist aus dermatopharmazeutischer Sicht eine interessante Substanz. Aufgrund ihrer physikochemischen Eigenschaften lässt sie sich gut in herkömmliche halb feste Standardvehikelsysteme einbringen. Die vorliegenden Untersuchungen am Franz'schen Diffusionsmodell weisen nach, dass L-Citrullin in unterschiedlichem Ausmaß aus allen Vehikelsystemen in die verschiedenen Schichten der Haut penetrieren kann.

Die höchsten Wirkstoffkonzentrationen werden im Stratum corneum gemessen, überwiegend im oberen Drittel. Sie sind im Vergleich zur Plasma-Citrullin-Konzentration etwa 200-fach höher. Die beste Penetrationskinetik ergibt sich für das amphiphile Donatorsystem, welches sowohl nach kurzer Applikationszeit (30 min) als auch nach prolongierter Einwirkung maximale L-Citrullin-Konzentrationen in das Stratum corneum transportiert. In geringerem Ausmaß ergeben sich ähnliche Effekte in absteigender Rangfolge sowohl für das hydrophile als auch für das lipophile Vehikelsystem. Da die Versuchsbedingungen konstant gewesen sind, lassen sich Unterschiede der Penetrationsdaten nur durch die Eigenwirkung der galenischen Grundlage erklären. Der Lipidanteil liegt in der O/W-Creme bei 30 %, der amphiphilen Creme bei 40 % und im W/O-System bei 50 %. Der okkludierende Effekt steigt mit zunehmendem Lipidgehalt (O/W < amphiphil < W/O) (Staubach und Lunter, 2014). Die Balance penetrationsfördernder (Okklusion) und liberationsbehindernder (Phasenlage und Penetrationsbarriere) Eigenschaften wechselt in Abhängigkeit von Lipid- und Wassergehalt und gerüstbildenden Emulgatoren. Am schlechtesten funktioniert das lipophile Donatorsystem. Der höchste Okklusionseffekt hat den Liberationsnachteil nicht kompensieren können. Das amphiphile Vehikelsystem kombiniert die okklusiven Eigenschaften der lipophilen mit dem guten Liberationsvermögen der hydrophilen Präparation, wodurch sich die höchste Leistungsfähigkeit erklärt.

Die Anreicherung von L-Citrullin im Stratum corneum ist als Depotbildung zu interpretieren, also eine über die Zeit ansteigende Wirkstoffkonzentration. Dieses lässt sowohl lokale Effekte als auch eine kontinuierliche Wirkstoffabgabe an tiefere Schichten erwarten. Die Depotbildung von L-Citrullin im Stratum corneum kann analog zur Okklusion über die erhöhte Hydratation einen penetrationsbeschleunigenden Effekt haben.

Das vorliegende Penetrationsmodell fasst Epidermis und Dermis aufgrund ihres hydrophilen Charakters als gemeinsames Kompartiment auf, in welchem eine hydrophile Substanz wie L-Citrullin gut diffundieren kann. Nach kurzer Applikationszeit

erweist sich das amphiphile Donatorsystem als führend. Nach prolongierter Einwirkzeit zeigt das hydrophile Vehikelsystem die höchsten detektierten epidermalen und dermalen L-Citrullinkonzentrationen mit konstantem Wirkstoff-Zeit-Profil über 300 bis 1000 Minuten und wird als leistungsfähiger für die tieferen Hautschichten bewertet. Der geringste Okklusionseffekt durch niedrigeren Lipidgehalt kann durch längere Einwirkzeit kompensiert werden. Zur Penetrationssteigerung durch Hydratation des Stratum corneum summiert sich eine Permeationssteigerung über den „solvent drag“-Mechanismus aufgrund des höheren Wassergehalts der hydrophilen Grundlage. Dies erklärt die Überlegenheit des hydrophilen Vehikelsystems nach längerer Applikationszeit und die höhere Bioverfügbarkeit von L-Citrullin.

Von einem optimalen Vehikelsystem wird erwartet, dass es möglichst viel Wirkstoff in das Zielkompartiment liberiert und eine ausreichende Wirkstoffkonzentration über einen längeren Zeitraum vermitteln kann. Die Ergebnisse dieser Studie weisen das amphiphile Vehikelsystem für das Stratum corneum als am besten geeignet aus. Für die vitalen Epidermisanteile ist das hydrophile System nach prolongierter Einwirkzeit überlegen gewesen. Am schlechtesten funktioniert das lipophile Donatorsystem, zumal es für hydrophile Arzneistoffe eine Liberationsbarriere bildet.

Letztlich müssten weitere Studien darüber entscheiden, ob eine relativ rasche Wirkstoffanflutung (amphiphil) oder eine verzögerte mit dafür lange persistierendem Wirkstoff-Zeit-Profil (hydrophil) aus klinischer Sicht zu bevorzugen wäre.

Als Effekte des in die Haut verbrachten L-Citrullins werden eine Verbesserung des Natural Moisturizing Factor und eine Steigerung der keratinozytären Harnstoffproduktion erwartet. Dies würde die Hygroskopizität des Stratum corneum verbessern und den transepidermalen Wasserverlust vermindern. Weiterhin wäre eine Verbesserung der antioxidativen Kapazität der Haut möglich. L-Citrullin vermag über eine Hemmung der Stickstoffmonoxid-Synthase nitrosativen Stress zu reduzieren. Außerdem ist es selbst ein potenzielles Antioxidans. Die aus nitrosativer und oxidativer Belastung resultierende Mitochondriopathie ist für die Pathogenese von Hauterkrankungen bedeutsam. Deren Beeinflussbarkeit über epikutan appliziertes L-Citrullin ermöglicht neue therapeutische Ansätze.

Aus der Bioverfügbarkeit epikutan applizierten L-Citrullins in Dermis, Epidermis und Stratum corneum ergeben sich Wirkansätze einer Lokaltherapie. Diese reichen von Pflge-therapie bis zum Einsatz bei manifesten Hautkrankheiten. Hier sind u.a. die Beeinflussung chronischer Entzündungen, Verhornungsstörungen, Zytokininduktion, Gefäßproliferation und Onkogensynthese vorstellbar.

**6 LITERATURVERZEICHNIS**

Akashi K, Miyake C, Yokota A (2001) Citrulline, a novel compatible solute in drought-tolerant wild watermelon leaves, is an efficient hydroxyl radical scavenger. *FEBS Lett.* 508:438-42

Anissimov YG, Jepps OG, Dancik Y, Roberts MS (2013) Mathematical and pharmacokinetic modelling of epidermal and dermal transport processes. *Advanced Drug Delivery Reviews* 65:169-90

Archibald RM (1944) Determination Of Citrulline And Allantoin And Demonstration Of Citrulline In Blood Plasma. *J. Biol. Chem.* 156:121-42

Asgeirsson T, Zhang S, Nunoo R, Mascarenas C, Dujovny N, Luchtefeld M, Cavey GS, Senagore A (2011) Citrulline: A potential immunomodulator in sepsis. *Surgery Volume* 150:744-51

Baudouin JE and Tachon P (1996) Constitutive Nitric Oxide Synthase Is Present in Normal Human Keratinocytes. *J Invest Dermatol.* 106:428-31

Bieger WP, Neuner A (2011) Der Arginin-Citrullin Zyklus. *Fachtext OM & Ernährung. Internationales Journal für orthomolekulare und verwandte Medizin.* 136:1-5

Birkammer FX (1971) Harnstoff und Citrullin in der Hornschicht gesunder menschlicher Haut Tiefenverteilung und Eluierbarkeit. *Promotionsarbeit.* S. 7-14, 59, 67, 93-105

Bruch-Gerharz D, Ruzicka T, Kolb-Bachofen V (1998a) Nitric oxide and its implications in skin homeostasis and disease – a review. *Arch Dermatol Res.* 290:643-51

Bruch-Gerharz D, Ruzicka T, Kolb-Bachofen V (1998b) Nitric Oxide in Human Skin: Current Status and Future Prospects. *J Invest Dermatol.* 110:1-7

Closs EI, Simon A, Vékony N, Rotmann A (2004) Plasma Membrane Transporters for Arginine. *J Nutr.* 134:2752S-9S

Crouse RG and Rothberg S (1961) Evaluation of the enzyme of the krebs-henseleit cycle in human epidermis. *J Invest Dermatol.* 36:287-92

Curis E, Nicolis L, Moinard C, Osowska S, Zerrouk N, Bénazeth S, Cynober L (2005) Almost all about citrulline in mammals. *Amino Acids.* 29:177-05

Cynober L, Moinard C, Bandt JP (2010) The 2009 ESPEN Sir David Cuthbertson. Citrulline: A new major signaling molecule or just another player in the pharmaconutrition game? *Clin Nutr.* 29:545-51

Daniels R (2009) Dermopharmazie: Die richtige Galenik für kranke Haut. *Pharmazeutische Zeitung online.* <http://www.pharmazeutische-zeitung.de/index.php?id=30020>. 28.12.2014. 24:1-7

El-Hattab AW, Hsu JW, Emrick LT, Wong LJ, Craigen WJ, Jahoor F, Scaglia F (2012) Restoration of impaired nitric oxide production in MELAS syndrome with citrulline and arginine supplementation. *Mol Genet Metab.* 105:607-14

Franz TJ (1975) Percutaneous Absorption. On The Relevance Of In Vitro Data. *J Invest Dermatol* 64:190-5

Frash HF, Barbero AM (2003) Steady-state flux and lag time in the stratum corneum lipid pathway: results from finite element models. *J Pharm Sci.* 92:2196-207

Girbal-Neuhauser E, Durieux JJ, Arnaud M, Dalbon P, Sebbag M, Vincent C, Simon M, Senshu T, Masson-Bessière C, Jolivet-Reynaud C, Jolivet M, Serre G (1999) The epitopes targeted by the rheumatoid arthritis-associated antifilaggrin autoantibodies are posttranslationally generated on various sites of (pro)filaggrin by deimination of arginine residues. *J Immunol.* 162:585-94

Höche F (2003) Präklinische Validierung von L-Ornithin HCL für die topische Applikation. Promotion. S.1, 8, 54

Höche F, Klapperstück T, Wohlrab J (2004) Effects of L-Ornithine on Metabolic Processes of the Urea Cycle in Human Keratinocytes. *Skin Pharmacol Physiol.* 17:283-8

Hobbs AJ, Higgs A, Moncada S (1999) Inhibition of nitric oxide synthase as a potential therapeutic target. *Annu Rev Pharmacol Toxicol.* 39:191-220

Holmes EJ, Bennington JL, Haber SL (1968) Citrulline-containing basal cell carcinomas. *Cancer.* 22:663-70

Ishida-Yamamoto A, Senshu T, Takahashi H, Akiyama K, Nomura K, Iizuka H (2000) Decreased deiminated keratin K1 in psoriatic hyperproliferative epidermis. *J Invest Dermatol.* 114:701-5

Ishigami A, Ohsawa T, Asaga H, Akiyama K, Kuramoto M, Maruyama N (2002) Human peptidylarginine deiminase typ II: molekular cloning, gene organization, and expression in human skin. *Arch Biochem Biophys.* 407:25-31

Jabs HU (2008) Entzündliche Hauterkrankungen durch oxidativen und nitrosativen Stress. *Ästhetische Dermatologie.* 3:28-36

Jacobi U, Tassopoulos CS, Lademann J (2006) Cutaneous distribution and localization of dyes affected by vehicles all with different lipophilicity. *Arch Dermatol Res.* 297:303-10

Kaore SN, Amane HS, Kaore NM (2013) Citrulline: pharmacological perspectives and its role as an emerging biomarker in future. *Fundam Clin Pharmacol.* 27:35-50

Knowles RG and Moncada S (1994) Nitric oxide synthases in mammals. *Biochem J.* 298:249-58

Lighthart-Melis GC and Deutz NEP (2011) Is glutamine still an important precursor of citrulline? *Am J Physiol Endocrinol Metab.* 301:E264-E6

Löffler G, Petriedes PE, Heinrich PC: *Biochemie und Pathobiochemie.* 8. Auflage. Springer Medizin Verlag, Heidelberg, 2007, S. 445-49, 509-11, 747-54

Maarsingh H, Leusink J, Zaagsma J, Meurs H (2006) Role of the L-citrulline/L-arginine cycle in iNANC nerve-mediated nitric oxide production and airway smooth muscle relaxation in allergic asthma. *Eur J Pharmacol.* 546:171-6

Moinard C, Nicolis I, Neveux N, Darquy S, Bénazeth S and Cynober L (2008) Dose-ranging effects of citrulline administration on plasma amino acids and hormonal patterns in healthy subjects: the Citrudose pharmacokinetic study. *Br J Nutr.* 99:855-62

Morris Jr. SM (2002) Regulation of Enzymes of the Urea Cycle and Arginine Metabolism. Department of Molecular Genetics and Biochemistry. *Annu Rev Nutr.* 22:87-105

Neubert R, Wohlrab W, Marsch W: *Dermatopharmazie: Vehikel – Wirkstoffe – Pharmakologie.* Wissenschaftliche Verlagsgesellschaft, Stuttgart, 2001, S. 3-11, 13-7, 75-87, 95-6, 139-48.

OECD/OCDE (2004) Guidance document for the conduct of skin absorption studies. [http://search.oecd.org/officialdocuments/displaydocumentpdf/?doclanguage=en&cote=env/jm/mono\(2004\)2](http://search.oecd.org/officialdocuments/displaydocumentpdf/?doclanguage=en&cote=env/jm/mono(2004)2). 30.12.2014. 28:1-31

Pharmazeutisches Laboratorium des Neuen Rezeptur-Formulariums: Standardisierte Rezepturen (NRF/SR). Formelsammlung für Ärzte. 4. Überarbeitete Auflage. Govi Verlag, 2007, S.169,173-174

Rassow J, Hauser K, Netzker R, Deutzmann R: *Biochemie Duale Reihe.* 2. Auflage. Georg Thieme Verlag KG, Stuttgart, 2006, S. 51, S. 60.

Rawlings AV and Harding CR (2004) Moisturization and skin barrier function. *Dermatol Ther.* 1:43-8

Rimando AM, Perkins-Veazie PM (2005) Determination of citrulline in watermelon rind. *J Chromatogr A.* 1078:196-200

Schwedhelm E, Maas R, Freese R, Jung D, Lukacs Z, Jambrecina A, Spickler W, Schulze F, Böger RH (2008) Pharmacokinetic and pharmacodynamic properties of oral L-citrulline and L-arginine: impact on nitric oxide metabolism. *Br J Clinical Pharmacol.* 65:51-9

Siervo M, Stephan BCM, Feelisch M, Bluck LJC (2011) Measurement of in vivo nitric oxide synthesis in humans using stable isotopic methods: a systemic review. *Free Radic Biol Med.* 51:795-804

Sparr E, Millecamps D, Isoir M, Burnier V, Larsson A, Cabane B (2012) Controlling the hydration of the skin through the application of occluding barrier creams. *J R Soc Interface*. 10:20120788. doi: 10.1098/rsif.2012.0788

Staubach P, Lunter DJ (2014) Basistherapie in der Dermatologie Geeignete Grundlagen, Möglichkeiten und Grenzen. *Hautarzt*. 65:63-72

Stüttgen G, Schaefer H: Funktionelle Dermatologie. Springer-Verlag, Berlin - Heidelberg - New York, 1974, S. 353-76, 384- 99

Swarbrick J, Lee G, Brom J (1982) Drug Permeation through Human Skin: I. Effect of Storage Conditions of Skin. *J Invest Dermatol*. 78:63-6

Sznitowska M, Janicki S, Williams AC (1998) Intracellular or intercellular localization of the polar pathway of penetration across stratum corneum. *J Pharm Sci*. 87:1109-14

Teichmann A, Heuschkel S, Jacobi U, Presse G, Neubert RHH, Sterry W, Lademann J (2007) Comparison of stratum corneum penetration and localization of a lipophilic model drug applied in an o/w microemulsion and an amphiphilic cream. *Eur J Pharm Biopharm*. 67:699-706

Ting WW, Vest CD, Sontheimer RD (2004) Review of traditional and novel modalities that enhance the permeability of local therapeutics across the stratum corneum. *Int J Dermatol*. 43:538-47

Touitou E (2002) Drug delivery across the skin. *Expert Opin Biol Ther*. 2:723-33

Trommer H (2012) Prälinik Halbfester Dermatika – State-Of-The-Art-Modellierung der Liberation und Penetration von Arzneistoffen. *Apothekenmagazin Pharmazeutische Wissenschaft*. S.8-14

Ulhaq S, Chinje EC, Naylor MA, Jaffar M, Stratford IJ, Threadgill MD (1999) Heterocyclic Analogues of L-Citrulline as Inhibitors of the Isoforms of Nitric Oxide Synthase (NOS) and Identification of N<sup>6</sup>-(4,5-Dihydrothiazol-2-yl)ornithine as a Potent Inhibitor. *Bioorg Med Chem*. 7:1787-96

Vincent C, Nogueira L, Clavel C, Sebbag M, Serre G (2005) Autoantibodies to citrullinated proteins: ACPA. *Autoimmunity*. 38:17-24

Wolf G (2006a) Salbengrundlagen Technologie Teil I. Die PTA in der Apotheke. 35:84-93

Wolf G (2006b) Salbengrundlagen Technologie Teil II. Die PTA in der Apotheke. 35:52-64

Wohlrab J: Der Einfluss von L-Arginin auf die Regulation der epidermalen Arginase. Habilitationsschrift. Shaker Verlag, Aachen, 2001, S.1-11, 34-7, 72-4, 89-91

Wohlrab J, Neubert RRH, Marsch WC: Trends in Dermatopharmacy. Trends in Clinical and Experimental Dermatology. Shaker Verlag, Aachen, 2003, S.1-18, 167

Ya-Xian Z, Suetake T, Tagami H (1999) Number of cell layers of the stratum corneum in normal skin - relationship to the anatomical location on the body, sex and physical parameters. Arch Dermatol Res. 291:555-9

Ziegenmeyer J: Biopharmazeutische Aspekte bei der Anwendung von Dermatika. In: Niedner R, Ziegenmeyer J (Hrsg) Dermatika: therapeutischer Einsatz, Pharmakologie und Pharmazie. Wissenschaftliche Verlagsgesellschaft, Stuttgart, 1992

Zhong W, Xing MMQ, Hui X, Maibach HI (2009) A stochastic model for transepidermal drug delivery. Skin Res Technol. 15:407-11

1. L-Citrullin und Stickstoffmonoxid (NO) entstehen im keratinozytären Stoffwechsel in der NO-Synthase-Reaktion in stöchiometrischer 1:1-Menge aus L-Arginin.
2. Durch extern appliziertes L-Citrullin kann über negative Feedback-Hemmung die NO-Synthase-Aktivität gebremst und somit die NO-Entstehung inhibiert und die Harnstoffproduktion gesteigert werden.
3. Die endogene Harnstoffsynthese verbessert in Synergismus mit L-Citrullin den natürlichen Feuchthaltefaktor (NMF) im Stratum corneum. Daraus resultieren eine Steigerung der Hygroskopizität und eine Verminderung des transepidermalen Wasserverlusts (TEWL).
4. Stickstoffmonoxid (NO) ist in physiologischer Konzentration an der Immunabwehr von Viren, Bakterien und Parasiten beteiligt. Bei unspezifischen Entzündungsreaktionen wird die NO-Synthese durch die induzierbare NO-Synthase (iNOS) gesteigert. Daraus resultiert nitrosativer und oxidativer Stress für die Zellen mit schädigenden Folgen, insbesondere eine Mitochondriopathie. L-Citrullin vermag als Antioxidans zu fungieren.
5. Zur Überprüfung des Penetrationsverhaltens von L-Citrullin im Rahmen einer präklinischen Studie werden ein hydrophiles, ein amphiphiles und ein lipophiles Standardvehikelsystem mit 10 %igem Wirkstoffgehalt in der Franz'schen Diffusionszelle über 30, 300 und 1000 Minuten getestet.
6. L-Citrullin vermag in unterschiedlichem Ausmaß aus allen Vehikelsystemen in die Schichten humaner Haut ex vivo zu penetrieren. Die höchsten Wirkstoffkonzentrationen werden im Stratum corneum gemessen, überwiegend im oberen Drittel. Das günstigste Konzentrations-Zeit-Profil von L-Citrullin ergibt sich nach der Applikation des amphiphilen Vehikelsystems.
7. Bei Verwendung von hydrophilen und amphiphilen Vehikelsystemen ist eine im zeitlichen Verlauf zunehmende Akkumulation von L-Citrullin im Stratum corneum zu verzeichnen. Das entspricht einer Depotbildung.

8. Im epidermal-dermalen Kompartiment konkurrieren amphiphiles und hydrophiles Donatorsystem als beste Grundlage. Nach kurzer Applikationszeit ist das amphiphile System überlegen. Bei prolongierter Einwirkdauer zeigt das hydrophile Vehikelsystem die höchsten detektierten L-Citrullin-Konzentrationen. Im zeitlichen Verlauf von 300 bis 1000 Minuten ergibt sich ein konstantes, maximales Wirkstoff-Zeit-Profil.
  
9. Bei konstanten Versuchsbedingungen sind Unterschiede der Penetrationsdaten nur durch die Eigenwirkung der galenischen Grundlage zu erklären: Die Balance penetrationsfördernder (Okklusion, Hydratation) und liberationsbehindernder (Phasenlage und Penetrationsbarriere) Eigenschaften wechselt in Abhängigkeit von Lipid- und Wassergehalt und gerüstbildenden Emulgatoren.
  
10. Aus der Bioverfügbarkeit epikutan applizierten L-Citrullins in Stratum corneum, Epidermis und Dermis ergeben sich Wirkansätze einer Lokaltherapie. Diese betreffen die Beeinflussung von Hautbarriere und TEWL, entzündliche Prozesse, Verhornungsstörungen, Zytokininduktion sowie Gefäßproliferation und könnten Gegenstand zukünftiger Studien sein.

**8           LEBENS LAUF**

Name:                   Helen Sterz (geb. Sauerbrey)

Geboren:               20.10.1986, in Halle /Saale

Anschrift:              Ferdinand-Lassalle-Straße 7, 04109 Leipzig

Familienstand:         ledig

**Schulische Ausbildung**

*08.1997 – 04.2006*    Elisabeth-Gymnasium Halle/Saale  
Reifezeugnis (Abitur)

*01.2003 – 08.2003*    High School Jahr Bayonne, NJ, USA

**Studium**

*10.2006 – 05.2008*    Zahnmedizin an der Universität  
Rostock

*06.2008 – 12.2014*    Humanmedizin an der Universität  
Leipzig

*09.2010 – 09.2011*    Erasmus Universität Brüssel

**Berufliche Weiterbildung**

*08.2013 – 07.2014*    Praktisches Jahr

*08.2013 – 12.2013*    Tertial Innere Medizin, St. Georg Krankenhaus, Leipzig

*12.2013 – 04.2014*    Tertial Chirurgie, Kliniken Leipziger Land, Borna

*04.2014 – 07.2014*    Wahltertial, Klinik und Poliklinik für Dermatologie, Venerologie  
und Allergologie des Universitätsklinikums Leipzig

*08.12.2014*  
Approbation als Ärztin

*seit 01.01.2015*  
Assistenzärztin in dem Fachbereich Dermatologie  
Universitätsklinikum Leipzig

Halle, im Januar 2015

---

**9 SELBSTSTÄNDIGKEITSERKLÄRUNG**

Ich, Helen Sterz, erkläre an Eides statt, dass ich die der Medizinischen Fakultät der Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg zur Promotionsprüfung eingereichte Arbeit mit dem Titel „Ex-vivo-Untersuchungen zur kutanen Bioverfügbarkeit von L-Citrullin nach epikutaner Applikation“ unter der Leitung von Prof. Dr. med. habil. Johannes Wohlrab selbst durchgeführt und bei der Abfassung der Arbeit keine anderen als die in der Dissertationsschrift aufgeführten Hilfsmittel benutzt habe.

---

**10 ERKLÄRUNG ÜBER FRÜHERE PROMOTIONSVERSUCHE**

Ich habe bisher an keiner in- oder ausländischen Universität ein Gesuch um Zulassung zur Promotion eingereicht, noch die vorliegende oder eine andere Arbeit als Dissertationsschrift vorgelegt.

---

**11 DANKSAGUNG**

Mein besonderer Dank gilt meinem akademischen Lehrer, Herrn Professor Dr. med. habil. Johannes Wohlrab, nicht nur für Überlassung des Themas, sondern auch für seine kompetente Hilfestellung und fachliche Anleitung sowie seine wertvollen Hinweise und Ratschläge bei der Erstellung der Arbeit. Nur durch die sehr individuelle Betreuung, insbesondere die kurzfristigen Terminabsprachen sowie die ständige Erreichbarkeit auch auf digitalem Wege war es überhaupt möglich, diese Dissertation trotz der besonderen Umstände termingerecht fertigzustellen.

Herrn Professor Dr. med. habil. Wolfgang Chr. Marsch, Direktor der Klinik und Poliklinik für Dermatologie und Venerologie der Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg, danke ich für die Möglichkeit der wissenschaftlichen Tätigkeit in seiner Klinik.

Zu Dank verpflichtet bin ich ebenso den Mitarbeitern des Labors der Universitätsklinik und Poliklinik für Dermatologie und Venerologie der Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg für ihre tatkräftige Unterstützung und Hilfsbereitschaft.

Meiner Familie danke ich für alle Unterstützung, Geduld und Liebe während der Erstellung dieser Arbeit.

---