

**Phototoxisches und photoallergisches Potential von
Arzneistoffen–Entwicklung einer in vitro
Screening-Methode**

Dissertation zur Erlangung des akademischen Grades des
Doktors der Naturwissenschaften (Dr. rer. nat.)

eingereicht im Fachbereich Biologie, Chemie, Pharmazie
der Freien Universität Berlin

vorgelegt von

Sven Schröder
aus Gütersloh

Januar 2007

1. Gutachter: Prof. Dr. Peter Surmann
2. Gutachter: Prof. Dr. Gerhard Scriba

Disputation am: 05.04.2007

Danksagung

Mein besonderer Dank gilt Herrn Prof. Dr. J.P. Surmann, für die Überlassung des interessanten Themas, für die ständige Diskussionsbereitschaft und dem mir gewährten Freiraum bei der Durchführung dieser Arbeit.

Ebenfalls bedanke ich mich bei Joanna Bestry für die gewissenhafte Durchsicht der Arbeit.

Mein ganz besonderer Dank gilt meinen Eltern für die Unterstützung während meiner gesamten Studienzeit. Bei meiner Freundin Kerstin möchte ich mich für die liebevolle, ständige Unterstützung und das entgegengebrachte Verständnis bedanken.

Abkürzungen	I
1 Einleitung und Zielstellung	1
2 Theoretischer Teil	3
2.1 Aufbau des analytischen Systems	3
2.1.2 Übersicht	3
2.1.3 Konstruktion der Säulenschaltung	4
2.1.4 Einsatz von Photoreaktoren in der Analytik	6
2.1.5 Konstruktion des Photoreaktors	6
2.1.6 Auswahl der Reaktionskapillare.....	7
2.2 Zusammensetzung des Sonnenlichtes und Auswahl der Strahlenquellen.....	7
2.3 Reaktive Sauerstoffspezies.....	8
2.4 Struktur der DNA	10
2.4.1 Oxidative Schädigung der DNA	10
2.5 Aufbau von Proteinen.....	13
2.5.1 Oxidative Schädigung der Peptide	13
2.5.2 Oxidative Schädigung von Tryptophan.....	13
2.6 Auswahl der Biomoleküle zum Screening auf phototoxische und photoallergische Reaktionen.....	15
2.7 Anregungs- und Desaktivierungsprozesse von Photosensibilisatoren	16
2.7.1 Wirkmechanismus der Photosensibilisatoren.....	16
2.8 Photoallergische Reaktionen der Haut	18
2.8.1 Photoirritationen der Haut.....	18
2.8.2 Phototoxische Reaktionen	18
2.9 Aktuelle Testmethoden für phototoxische und photogenotoxische Reaktionen.....	19
2.9.1 Aktuelle Testmethoden für photoallergische Reaktionen	20
3 Ergebnisse und Diskussion	21
3.1 Untersuchungen zur photochemischen Stabilität von Phenothiazinen und deren photochemische Reaktivität gegenüber Biomolekülen	21
3.1.1 Einführung.....	21
3.1.2 Einführung zu Chlorpromazin.....	22
3.1.3 Untersuchung der photochemischen Wechselwirkung von Chlorpromazin mit 5-Guanosinmonophosphat	23
3.1.4 Chromatographische Bedingungen bei den Untersuchungen von Phenothiazinen.....	24
3.1.5 Ergebnisse zu den Photostabilitätsuntersuchungen zu Chlorpromazin mit variablen Lichtquellen.....	24
3.1.6 Ergebnisse zur Untersuchung der Photostabilität bei unterschiedlichen pH-Werten ..	26
3.1.7 Identifizierung des Promazins und Chlorpromazinsulfoxids	27
3.1.8 Ergebnisse zur photochemischen Umsetzung von Chlorpromazin mit 5-Guanosinmonophosphat	28
3.1.9 Ergebnisse zur photochemischen Untersuchung von Promethazinhydrochlorid	32
3.1.10 Ergebnisse zur photochemischen Umsetzung von Promethazin mit Alanyltryptophan.....	34
3.1.11 Vergleich der photochemischen Stabilität von Phenothiazinen.....	38
3.1.12 Zusammenfassung	39

3.2 Untersuchungen zur photochemischen Stabilität von Hydrochlorothiazid und dessen photochemischer Reaktivität gegenüber Biomolekülen	41
3.2.1 Einführung.....	41
3.2.2 Photochemischer Abbau von Hydrochlorothiazid	41
3.2.3 Phototoxische Reaktionen von Hydrochlorothiazid.....	43
3.2.4 Chromatographische Bedingungen der Hydrochlorothiazid Untersuchungen.....	43
3.2.5 Ergebnisse der Photostabilitätsuntersuchungen von Hydrochlorothiazid.....	44
3.2.6 Photochemische Untersuchungen zu Hydrochlorothiazid und verschiedenen Biomolekülen	45
3.2.7 Ergebnisse zur photochemischen Umsetzung von Hydrochlorothiazid mit 5-Guanosinmonophosphat unter Variation des pH-Wertes.....	45
3.2.8 Ergebnisse zur photochemischen Umsetzung von Hydrochlorothiazid mit Tryptophan	47
3.2.9 Ergebnisse zur photochemischen Umsetzung von Hydrochlorothiazid mit Alanyltryptophan.....	50
3.2.10 Ergebnisse zur photochemischen Umsetzung von Hydrochlorothiazid mit Alanyltryptophan und 5-Guanosinmonophosphat	53
3.2.11 Ergebnisse zur photochemischen Umsetzung von Hydrochlorothiazid mit DNA-Einzelsträngen	54
3.2.12 Zusammenfassung.....	58
3.3 Untersuchungen zur photochemischen Stabilität von Ofloxacin und dessen photochemischer Reaktivität gegenüber Biomolekülen	60
3.3.1 Einführung.....	60
3.3.2 Chromatographische Bedingungen der Ofloxacin Untersuchungen.....	62
3.3.3 Ergebnisse der Photostabilitätsuntersuchungen von Ofloxacin	62
3.3.4 Ergebnisse der photochemischen Untersuchung von Ofloxacin in Gegenwart von 5-Guanosinmonophosphat	64
3.3.5 Ergebnisse der photochemischen Untersuchung von Ofloxacin in Gegenwart von Alanyltryptophan.....	66
3.3.6 Zusammenfassung.....	69
3.4 Untersuchungen zur photochemischen Stabilität von Mefloquin und dessen photochemischer Reaktivität gegenüber Biomolekülen	71
3.4.1 Einführung.....	71
3.4.2 Chromatographische Bedingungen der Mefloquin Untersuchungen	72
3.4.3 Ergebnisse zur photochemischen Untersuchung von Mefloquin mit Alanyltryptophan.....	72
3.4.4 Ergebnisse der photochemischen Untersuchungen von Mefloquin mit 5-GMP.....	75
3.4.5 Zusammenfassung.....	75
3.5 Untersuchungen zur photochemischen Stabilität von Tetracyclin und dessen photochemischer Reaktivität gegenüber Biomolekülen	77
3.5.1 Einführung.....	77
3.5.2 Chromatographische Bedingungen der Tetracyclin Untersuchungen.....	78
3.5.3 Ergebnisse der Photostabilitätsuntersuchungen von Tetracyclin	78

3.5.4	Ergebnisse der photochemischen Untersuchung von Tetracyclin in Gegenwart von 5-Guanosinmonophosphat	79
3.5.5	Ergebnisse zur photochemischen Untersuchung von Tetracyclin in Gegenwart von Alanyltryptophan.....	80
3.5.6	Zusammenfassung.....	82
3.6	Untersuchungen zur photochemischen Stabilität von Etodolac und dessen photochemischer Reaktivität gegenüber Biomolekülen	83
3.6.1	Einführung.....	83
3.6.2	Chromatographische Bedingungen der Etodolac Untersuchungen.....	83
3.6.3	Ergebnisse der Photostabilitätsuntersuchungen von Etodolac	84
3.6.4	Ergebnisse zur photochemischen Umsetzung von Etodolac mit 5-Guanosinmonophosphat	85
3.6.5	Ergebnisse der photochemischen Umsetzung von Etodolac mit Tryptophan.....	88
3.6.6	Ergebnisse der photochemischen Umsetzung von Etodolac mit Alanyltryptophan	90
3.6.7	Zusammenfassung.....	92
3.7	Untersuchungen zur photochemischen Stabilität von Nifedipin und dessen photochemischer Reaktivität gegenüber Biomolekülen	93
3.7.1	Einführung.....	93
3.7.2	Chromatographische Bedingungen der Nifedipin Untersuchungen.....	94
3.7.3	Ergebnisse der Photostabilitätsuntersuchungen von Nifedipin	95
3.7.4	Photochemische Umsetzung von Nifedipin mit 5-Guanosinmonophosphat.....	95
3.7.5	Ergebnisse zur photochemischen Umsetzung von Nifedipin mit Alanyltryptophan ...	98
3.7.6	Zusammenfassung.....	100
3.8	Einsatz von Protoporphyrinen in der Photodynamischen Therapie.....	102
3.8.1	Einführung.....	102
3.8.2	Chromatographische Bedingungen der Protoporphyrin Untersuchungen	103
3.8.3	Ergebnisse der Photostabilitätsuntersuchungen von Protoporphyrin (IX).....	104
3.8.4	Ergebnisse der photochemischen Umsetzung von Protoporphyrin (IX) mit DNA-Einzelsträngen	106
3.8.5	Zusammenfassung.....	112
3.9	Untersuchung des Photosensibilisators Eosin.....	113
3.9.1	Einführung.....	113
3.9.2	Chromatographische Bedingungen der Eosin Untersuchungen.....	113
3.9.3	Ergebnisse zur photochemischen Untersuchung von Eosin in Gegenwart von DNA	113
3.9.4	Photochemische Umsetzung von Eosin und DNA-Einzelsträngen.....	114
3.9.5	Zusammenfassung.....	119
4	Zusammenfassung/ Summary	120

5	Experimenteller Teil	124
5.1	Materialien und Geräte	124
5.2	Chemikalien	124
5.3	Chromatographisches System	125
5.4	Chromatographische Säulen.....	126
5.5	Säulenschaltung.....	126
5.6	Photoreaktor	126
5.7	Weitere Geräte und Verbrauchsmaterialien	127
5.8	Synthese des Chlorpromazinsulfoxids	127
5.9	Analytische Probelösungen und Puffer	127
5.10	Darstellung der Probelösungen	128
6	Anhang	132
7	Literaturverzeichnis	133

Abkürzungen

3T3 NRU PT	Neutral Red Uptake Photo Toxicity
5-ALA	5-Aminolävulinsäure
5`-GMP	5-Guanosinmonophosphat
ALATRP	Alanyltryptohan
ETO	Etodolac
COLIPA	European Cosmetic Toiletry and Perfumery Association
CPZ	Chlorpromazinhydrochlorid
CPS	Chlorpromazinsulfoxid
DNA	Desoxyribonukleinsäure
DNAa	Desoxyribonukleinsäure antisense Einzelstrang
DNAs	Desoxyribonukleinsäure sense Einzelstrang
EMEA	The European Agency for the Evaluation of Medicinal Products
ESR	Elektronenspinresonanz-Spektroskopie
GMPT	Guinea Pig Maximization Test
HC	Hydrochlorothiazid
HPLC	Hochleistungsflüssigkeitschromatographie
LLNA	Local Lymph Node Assay
ICH	International Conference on Harmonisation
mAU	Milli Absorption Units (Milliextinktion)
MEFLO	Mefloquinhydrochlorid
min	Minute
MNT	Mikronukleos-Test
NIF	Nifedipin
oB	ohne Belichtung
OECD	Organisation for Economic Cooperation and Development
OFL	Ofloxacin
P	Photoprodukt
PDT	Photodynamische Therapie
PMZ	Promethazinhydrochlorid
POR	Protoporphyrin IX
PZ	Promazinhydrochlorid
ROS	Reaktive Sauerstoffspezies

S	Sensitizer
s	Sekunde
Teflon	Polytetrafluorethylen
Tefzel	Ethylen-Tetrafluorethylen-Copolymer
TRP	Tryptophan
UV	ultraviolett
ZEBET	Zentralstelle zur Erfassung und Bewertung von Ersatz- und Ergänzungsmethoden zum Tierversuch