

2 Theoretischer Teil

2.1 Aufbau des analytischen Systems

2.1.2 Übersicht

Das analytische System besteht aus einer HPLC Anlage mit den üblichen Komponenten: Gradientenpumpe, UV-Detektor, Injektor und einem Computersystem zur Datenauswertung. Darüber hinaus wurde eine Säulenschaltung mit zwei 10 Port Schaltventilen und eine zweite isokratische Pumpe in das System integriert. Der Photoreaktor wurde vor der Säulenschaltung und damit vor dem chromatographischen System installiert (Abbildung 1). Die gestrichelte Linie zeigt die Fließrichtung der wässrigen Phase, die durchgezogene Linie die Fließrichtung der wässrig/ organischen Phase.

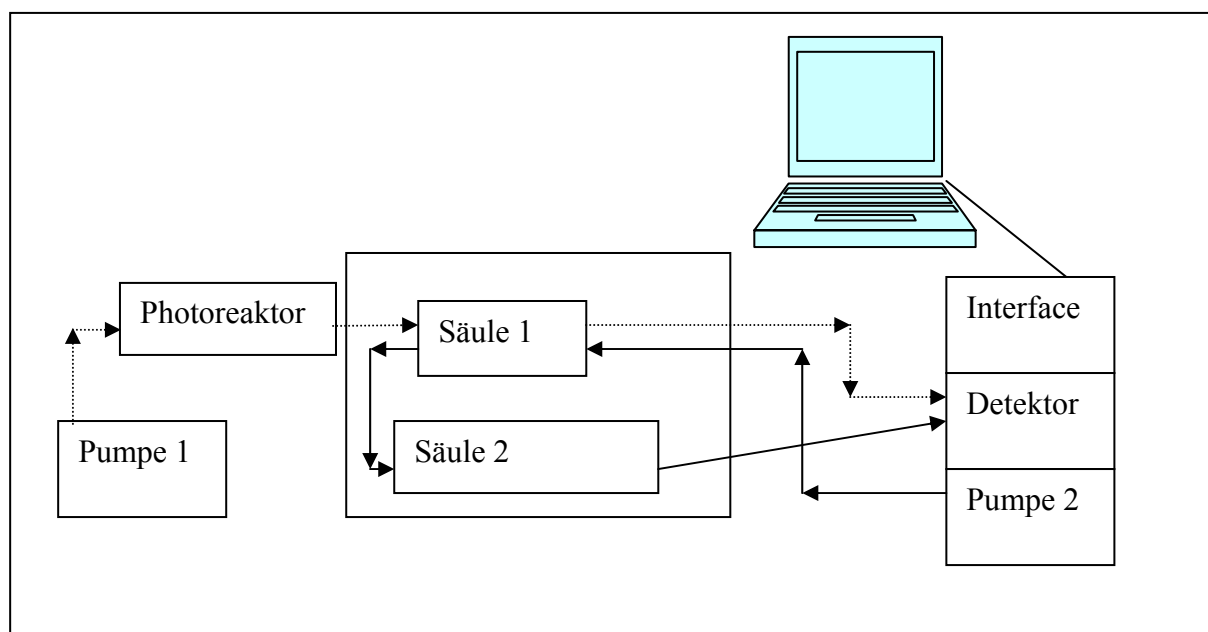


Abb. 1: Apparativer Aufbau des HPLC online Systems

Das Material der HPLC Säule sollte dabei eine Anreicherung der Arzneistoffe und Photoprodukte unter Verwendung von einer rein wässrigen mobilen Phase ermöglichen. Dabei sollte der Arzneistoff ausreichend lange auf der HPLC Säule zurückgehalten werden damit die zu untersuchende Lösung vollständig aus der Reaktionskapillare des Photoreaktors herausbefördert werden kann. Die chromatographische Auftrennung des Arzneistoffes und der Photoprodukte soll mit einem wässrig/ organischen Gradienten erfolgen. Aufgrund der beschriebenen Anforderungen wurden zwei Aqua Säulen der Firma Phenomenex eingesetzt.

2.1.3 Konstruktion der Säulenschaltung

Säulenschaltungen werden vielfältig in der HPLC Analytik eingesetzt. Hauptsächlich finden Säulenschaltungen bei vollautomatisierten HPLC online Methoden Anwendung. Diese Technik ermöglicht zum Beispiel die automatische Festphasenextraktion beim therapeutischen Drug Monitoring oder die Auftrennung von komplexen Probengemischen mit flexiblen mobilen und stationären Phasen.

In dem von uns entwickelten vollautomatischen HPLC System wurde die Säulenschaltung zur Kopplung des Photoreaktors mit dem chromatographischen System verwendet. Dadurch wurde auf der einen Seite die Bestrahlung von Arzneistoffen auch in Gegenwart von Biomolekülen in rein wässriger Phase und die anschließende chromatographische Auftrennung und Detektion der Photoprodukte mit einer organischen mobilen Phase ohne weitere Bearbeitung ermöglicht. In der Abbildung 2 ist der Schaltplan der Ventile in der Load Position dargestellt.

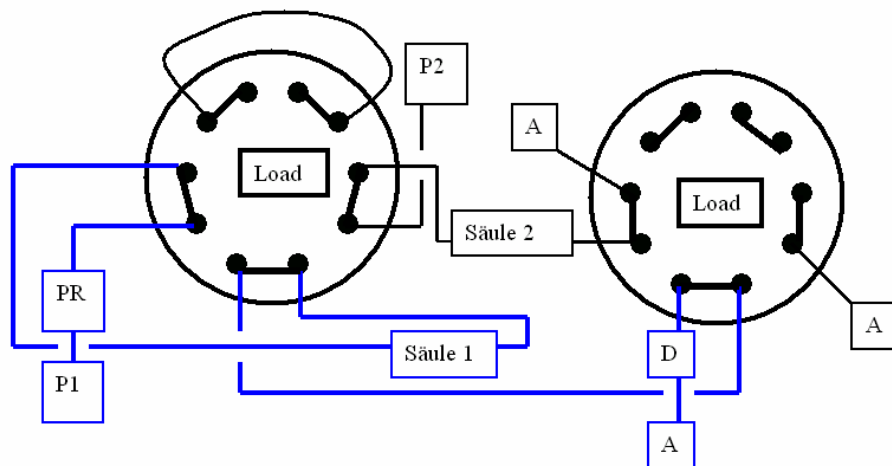


Abb. 2: Ventile der Säulenschaltung in der Load Position, P1: isokratische Pumpe 1, P2: Gradientenpumpe 2, PR: Photoreaktor, D: Detektor, A: Abfall

In der dargestellten Position wird die Probelösung über den Injektor in das System eingespritzt. Die Arzneistoffe und die Biomoleküle gelangen danach durch die wässrige mobile Phase der isokratischen Pumpe 1 in den Photoreaktor. Sind die zu untersuchenden Stoffe in dem Photoreaktor angelangt, so kann die Pumpe 1 gegebenenfalls für längere Bestrahlungszeiten angehalten werden. Nach der gewünschten Belichtungszeit wird das gesamte System zur Chromatographie gestartet. Der Arzneistoff, Biomoleküle und die

entstandenen Photoprodukte werden durch die Pumpe 1 zu der kurzen Säule 1 befördert. Von diesem Zeitpunkt an gibt es zwei verschiedene Wege zur weiteren Vorgehensweise. Die erste Variante kann angewendet werden, wenn der eingesetzte Arzneistoff und seine Photoprodukte über eine ausreichende Lipophilie verfügen. Dann können diese Stoffe auf der Säule 1 angereichert werden. Die polaren Stoffe wie die DNA-Base GMP können zwischenzeitlich über die Säule 1 chromatographiert und detektiert werden. Nachdem die polaren Bestandteile die Säule 1 passiert haben, können die Ventile der Säulenschaltung in die Injekt Position umgeschaltet werden.

Der zweite Weg kann angewendet werden, wenn der Arzneistoff und seine Photoprodukte sehr polar sind. Bedingt durch die hohe Polarität des Arzneistoffes kann dieser nicht mehr ausreichend lange auf der Säule 1 angereichert werden, dementsprechend werden die Ventile unverzüglich nach Verlassen des Photoreaktors und vor der Elution des Arzneistoffes über die Säule 1 in die Injekt Position geschaltet.

In dem Schema der Abbildung 3 stehen die Ventile in der Injekt Position. Die Pumpe 1 und der Photoreaktor sind nun, von dem weiteren Verlauf abgekoppelt und die mobile Phase gelangt nun nach Passieren des Photoreaktors, in den Abfall.

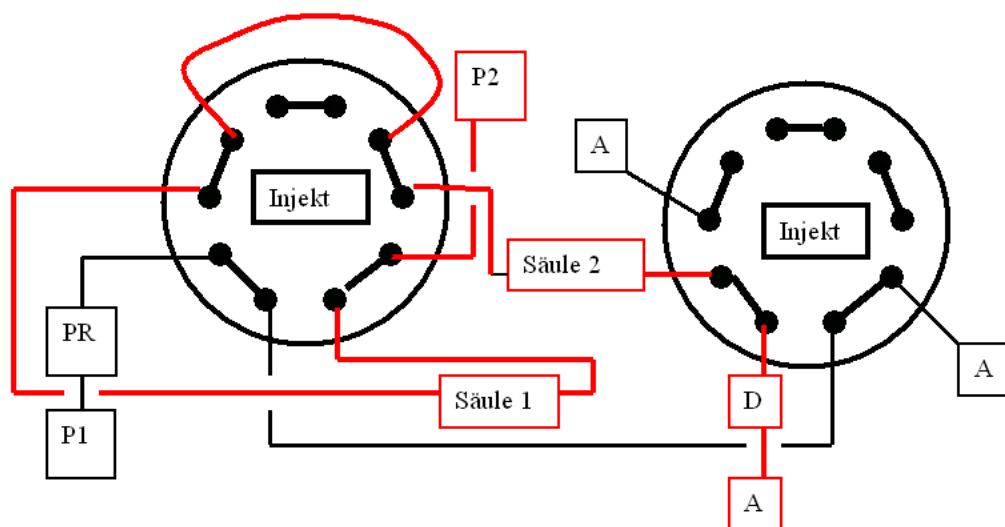


Abb. 3: Ventile der Säulenschaltung in der Injekt Position, P1: isokratische Pumpe 1, P2, Gradientenpumpe 2, PR: Photoreaktor, D: Detektor, A: Abfall

Mit der organischen mobilen Phase der Gradienten Pumpe 2 werden die angereicherten Moleküle im back flush modus von der Säule 1 hinuntergespült. Der Arzneistoff, Biomoleküle und die Photoprodukte gelangen zu der analytischen Säule 2. Hier werden die Stoffe chromatographisch aufgetrennt und detektiert. Nachdem alle Bestandteile

chromatographiert wurden, kann die Säulenschaltung wieder in die Load Position zurückgeschaltet werden und das chromatographische System kann reequilibriert werden.

2.1.4 Einsatz von Photoreaktoren in der Analytik

Photoreaktoren werden vielfältig in der Analytik eingesetzt, unter anderem zur Optimierung von analytischen Verfahren durch Erhöhung der Empfindlichkeit oder Selektivität der Methode.

Die online Benutzung eines Photoreaktors in Verbindung mit der HPLC wurde 1976 das erste Mal von Iwaoka und Tannebaum beschrieben (Iwaoka et al., 1976). In seiner Arbeit wurden N-Nitrosoverbindungen photochemisch zu Nitrit umgesetzt und bestimmt. Danach folgte die Arbeit von Twitchett (Twitchett et al., 1978), der Cannabinol in Körperflüssigkeiten mit großer Empfindlichkeit und hoher Selektivität bestimmte. Es folgten unzählige analytische Arbeiten unter Verwendung von Photoreaktoren, dabei kann der Photoreaktor entweder pre-column (Palar, Surmann, 2000; Schmidt, 2003) oder post-column (Brinkman et al., 1981; Kuhlmann et al., 1997) eingesetzt werden.

2.1.5 Konstruktion des Photoreaktors

Grundlage dieser Arbeit war der selbst konstruierte Photoreaktor von Palar (Palar, 2000). Der Photoreaktor wurde aus recht einfachen Komponenten zusammengesetzt (Skizze s. Seite 124). In einem Aluminiumrohr wurde der Niederdruckstrahler, der mit der gehäkelten Reaktionskapillare ummantelt war, im Zentrum positioniert. Das Aluminiumrohr wurde zusätzlich mit einer Spiegelfolie ausgekleidet um die Reflexion des Strahlers zu erhöhen. An beiden Enden der Aluminiumröhre befanden sich gewinkelte Kunststoffaufsätze, die das Heraustreten von UV-Strahlung verhindern sollten. Die Temperatur in der Röhre wurde durch einen Heizlüfter geregelt, der sich außerhalb von dem Reaktor befand. Zur Temperaturkontrolle wurde ein Temperaturfühler direkt über dem Niederdruckstrahler in der Mitte des Photoreaktors positioniert. Der beschriebene Photoreaktor mit einem UV-A Niederdruckstrahler wurde umfangreich in der Arbeit von Palar qualifiziert (Palar, Surmann, 2000).

2.1.6 Auswahl der Reaktionskapillaren

Mittlerweile werden Reaktionskapillaren aus den verschiedensten Materialien angeboten. Am häufigsten wurden bisher PTFE (Polytetra-fluor-ethylen, Teflon) Bestrahlungsschleifen eingesetzt (Scholten et al., 1980; Poulsen et al., 1986). PTFE-Kapillaren haben den Vorteil, dass sie inert gegenüber reaktiven Chemikalien sind und bei Temperaturen bis zu 250 °C eingesetzt werden können. Darüber hinaus verfügen PTFE-Kapillaren über effiziente Durchlässigkeit gegenüber UV-Strahlung, obwohl die Transmission von PTFE gegenüber UV Licht nicht sehr effizient ist. Vermutet wird ein diffuser Strahlungstransfer oder ein Strahlungstransfer durch Poren (Palar, Surmann, 2000). Der nicht zu verachtende Nachteil von Teflonkapillaren ist, dass sich unter Bestrahlung bei 254 nm Fluoridionen aus der Reaktionskapillare lösen (Matienzo et al. 1994; Noh et al. 2000). Nach einem gewissen Zeitraum können bei Teflonkapillaren Brüche auftreten. Eine wesentlich höhere mechanische Stabilität weisen Reaktionsschleifen aus ETFE (Copolymerisat aus Ethylen und Tetrafluorethylen, Tefzel) auf. Tefzelkapillaren sind hochdruckstabil bis zu 260 bar. Aufgrund dieser Eigenschaft können die Reaktionsschleifen auch vor der chromatographischen Säule (pre-column) verwendet werden.

Die Reaktionsschleifen aus Teflon und Tefzel können bedingt durch ihre hohe Flexibilität zu Luftmaschen verhäkelt werden. Das Verhäkeln der Kapillaren wirkt einer Peakverbreiterung entgegen (Poulsen et al., 1986).

Als Alternative können Reaktionsschleifen aus Quarz eingesetzt werden, die aber aufgrund der schlechten Flexibilität leicht zerbrechen können. Der Einsatz von Pyrex ist begrenzt, da Wellenlängen unter 320 nm gefiltert werden.

Aufgrund der beschriebenen Eigenschaften wurde die ETFE-Kapillaren für diese Arbeit ausgewählt.

2.2 Zusammensetzung des Sonnenlichtes und Auswahl der Strahlenquellen

Das Sonnenlicht setzt sich aus einem breiten Strahlungsspektrum zusammen. Es enthält sichtbares Licht, ultraviolette Strahlung und Infrarotstrahlung. Ein großer Anteil der emittierten Strahlung wird von der Ozonschicht der Stratosphäre absorbiert oder in den Weltraum reflektiert.

Die UV-Strahlung liegt im Wellenlängenbereich 200-400 nm und wird in UV-A (320-400 nm), UV-B (280-320 nm) und UV-C (200-280 nm) eingeteilt. Von der UV-Strahlung gelangt nur UV-A und UV-B Strahlung auf die Erdoberfläche. Die UV-B Strahlung wird zu 90% und

die UV-C Strahlung wird vollständig von der Ozonschicht absorbiert (Sandmann, 2001). Die UV-Strahlung macht dabei nur insgesamt 3% des gesamten Sonnenlichtes aus, das die Erdoberfläche erreicht. Durch die Zerstörung der Ozonschicht wird der Anteil an UV-Strahlung, der ungehindert die Erde erreicht, aber immer höher.

Mit zunehmender Wellenlänge dringt die Strahlung auch in tiefere Hautschichten vor. Die kurzwellige UV-B Strahlung wird bereits im Stratum corneum absorbiert. Die UV-Strahlung ist die wesentliche Ursache für die Entstehung von Hautkrebs und Hautalterung (Urbach, 1989; Henriksen et al., 1990). Auf der einen Seite ist die UV-B Strahlung für physiologische Reaktionen wie z.B. die Vitamin D Synthese essentiell, kann aber auf der anderen Seite die DNA direkt schädigen und als Spätfolge Hautkrebs verursachen. Die UV-A Strahlung hingegen erreicht auch die tieferen Hautschichten. Der UV-A Anteil fördert Photodermatosen, Photoallergien und Hautalterung. Aufgrund der beschriebenen Zusammenhänge wurden für diese Arbeit ein UV-A Niederdruckstrahler und eine Tageslichtlampe mit Vollspektrum verwendet.

2.3 Reaktive Sauerstoffspezies

Reaktive Sauerstoffspezies (ROS) entstehen auf verschiedener Weise. Unter anderem führt die Wechselwirkung von Photosensibilisatoren mit UV-Strahlung zu Bildung von ROS. Die ROS können aber auch durch Röntgenstrahlen, durch Übergangsmetall katalysierte Zersetzung von Peroxiden und während des normalen Sauerstoffmetabolismus der Atmungskette sowie bei Entzündungsprozessen entstehen. Ein gewisser Anteil an ROS im menschlichen Körper wird als normal angesehen, übersteigt die Konzentration der ROS aber diesen Anteil so spricht man von „oxidativem Stress“. Die Zellen können sich durch Antioxidantien wie Ascorbinsäure, Tocopherole, Flavonoide, Glutathion und enzymatische Systeme wie Katalasen, Peroxidasen und die Superoxid-Dismutasen schützen. Erst wenn diese Schutzsysteme überlastet sind, kann es zur oxidativen Schädigung der Zelle kommen. Die ROS können dann mit Biomolekülen wie DNA (Marnett, 2000), Proteinen (Dean, et al., 1997) oder Lipiden (Bose, et al., 1989) wechselwirken und diese schädigen.

Zu den ROS gehören radikalische wie: Superoxidradikalanionen $O_2^{\cdot-}$, Hydroxylradikale OH^{\cdot} , Alkoxyradikale RO^{\cdot} , Alkyldioxyradikale RO_2^{\cdot} und nicht radikalische Formen wie: Wasserstoffperoxid H_2O_2 , Singulett-Sauerstoff 1O_2 (Cadet et al., 1978).

Singulett-Sauerstoff ($^1\text{O}_2$)

Singulett-Sauerstoff kann durch photochemische oder chemische Anregung aus Triplett-Sauerstoff gebildet werden. Singulett-Sauerstoff zählt nicht zu den Radikalen, trotzdem besitzt es aufgrund der aufgehobenen Restriktion der Sauerstoffspins ein starkes Oxidationspotential. Der Singulett-Sauerstoff kann je nach Elektronenkonfiguration in zwei energetisch unterschiedlichen Formen vorliegen. Die Halbwertszeit von Singulett-Sauerstoff liegt bei 10^{-6} Sekunden. Die Entstehung von Singulett-Sauerstoff durch photochemische Reaktionen wurde von Epe (Epe, 1991) und Piette (Piette, 1991) beschrieben. Singulett-Sauerstoff spielt bei der Reaktion mit Biomolekülen eine große Rolle (Davies and Truscott, 2001). Das starke Oxidationspotential von Singulett-Sauerstoff führt zur oxidativen Schädigung von DNA (Ravanat et al., 2000).

Wasserstoffperoxid

Wasserstoffperoxid gehört zu den nicht radikalischen ROS und wird von Superoxidradikalen durch Oxidasen gebildet (Southorn and Powis, 1988). Wasserstoffperoxid ist selber nicht so schädlich, erst durch Umwandlung zu Hydroxylradikalen wird es reaktiv.

Superoxidradikal

Das Superoxidradikal wird durch Aufnahme eines Elektrons in das antibindende $2\pi^*$ -Molekülorbital des Triplett-Sauerstoffs gebildet. Endogen wird das Superoxidradikal entweder über die Atmungskette oder durch die Xanthinoxidase gebildet. Superoxidradikale stellen milde Oxidantien da, die nicht in der Lage sind DNA endogen oxidativ zu schädigen (Brawn and Fridovich, 1981).

Hydroxylradikal

Die Hydroxylradikale zeichnen sich durch ein starkes Oxidationspotential aus, sie sind sehr kurzlebig und reagieren unspezifisch mit fast allen Molekülen. Von den gesamten ROS sind die Hydroxylradikale die reaktivsten und reagieren mit Lipiden, Proteinen, Nucleinsäuren und Kohlenhydraten (Buxton et al., 1988). Dabei wird von dem Biomolekül ein Wasserstoffatom oder Elektron abstrahiert und aus dem Biomolekül entsteht ein Radikalkation. Hydroxylradikale entstehen z. B. durch die Fenton-Reaktion über die metallkatalysierte Reduktion von H_2O_2 .

2.4 Struktur der DNA

Die Desoxyribonukleinsäure DNA ist aus den Purin- und Pyrimidin- Nucleobasen zu Biopolymeren verknüpft. Die Polymere sind über Desoxyribosen und Phosphatgruppen miteinander verbunden. Zu den Pyrimidinbasen gehören Cytosin (C) und Thymin (T) und zu den Purinbasen Adenin (A) und Guanin (G). In der DNA ist die Basenpaarung nur zwischen Adenin und Thymin bzw. Cytosin und Guanin möglich. Im Einzelstrang können DNA und RNA in mehreren denkbaren Sekundär- und Tertiärstrukturen vorliegen.

2.4.1 Oxidative Schädigung der DNA

Die DNA und ihre Basen werden durch chemische oder photochemische Oxidationsmittel oxidativ geschädigt. Als Folge der oxidativen Schädigung wurden Einzel- und Doppelstrangbrüche (Epe et al., 1988) und Vernetzungen (cross-links) zwischen DNA-DNA oder DNA-Protein-Molekülen (Dizdaroglu, 1992) nachgewiesen. Aus vielen experimentellen Untersuchungen ergab sich, dass die Strangbrüche an ganz spezifischen Stellen der DNA auftreten. Besonders an guaninreichen Stellen wurden Brüche in DNA-Strängen gefunden. Zum anderen entstehen DNA-Strangbrüche am Zuckerrückgrat der DNA durch abstrahieren eines Wasserstoffatoms (Pogozelski et al., 1998).

Zum Großteil der DNA-Schädigung tragen hauptsächlich modifizierte DNA-Basen bei. Bisher sind über 100 verschiedene oxidative Modifikationen von DNA-Basen bekannt (Epe, 1995; Meunier et al., 1994), einige von ihnen sind in Abbildung 4 dargestellt.

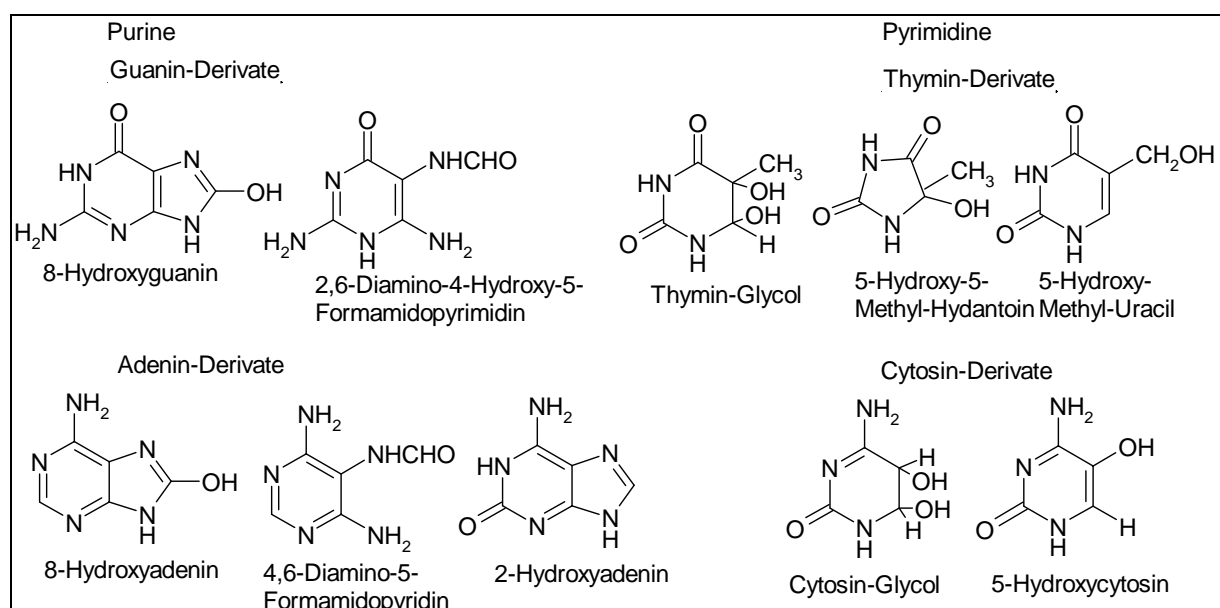


Abb. 4: Struktur der häufigsten vorkommenden oxidativ modifizierten DNA-Basen (Newcomb und Loeb, 1998)

Die Modifikation von Guanin durch ROS tritt am häufigsten auf, denn Guanin weist das niedrigste Oxidationspotential der vier Nucleobasen auf (Kittler et al., 1980). Das 7,8-dihydro-8-oxo-Guanin (auch als 8-oxo-Guanin oder 8-Hydroxyguanin bezeichnet) ist die am häufigsten auftretende Basenmodifikation (Epe, 1995; Loft et al., 1996). Das 8-oxo-Guanin entsteht zum einen durch die Reaktion mit OH Radikalen oder aber auch durch den Angriff von aktiviertem Sauerstoff (Halliwell et al., 1991).

Bei der Entstehung von 8-oxo-Guanosin kommt es im ersten Schritt zu einer Cycloaddition von Singulett-Sauerstoff an Guanin (Abbildung 5). Aus diesem Zwischenprodukt resultiert das Endoperoxid, welches unter Öffnung der Endoperoxid Ringstruktur zum 4-Hydroxy-8-oxoguanosin umgewandelt wird. Unter Einwirkung von zwei reduzierenden Äquivalenten und unter Wasserabspaltung entsteht im letzten Schritt das 8-oxo-Guanosin (Devasagayam et al., 1991).

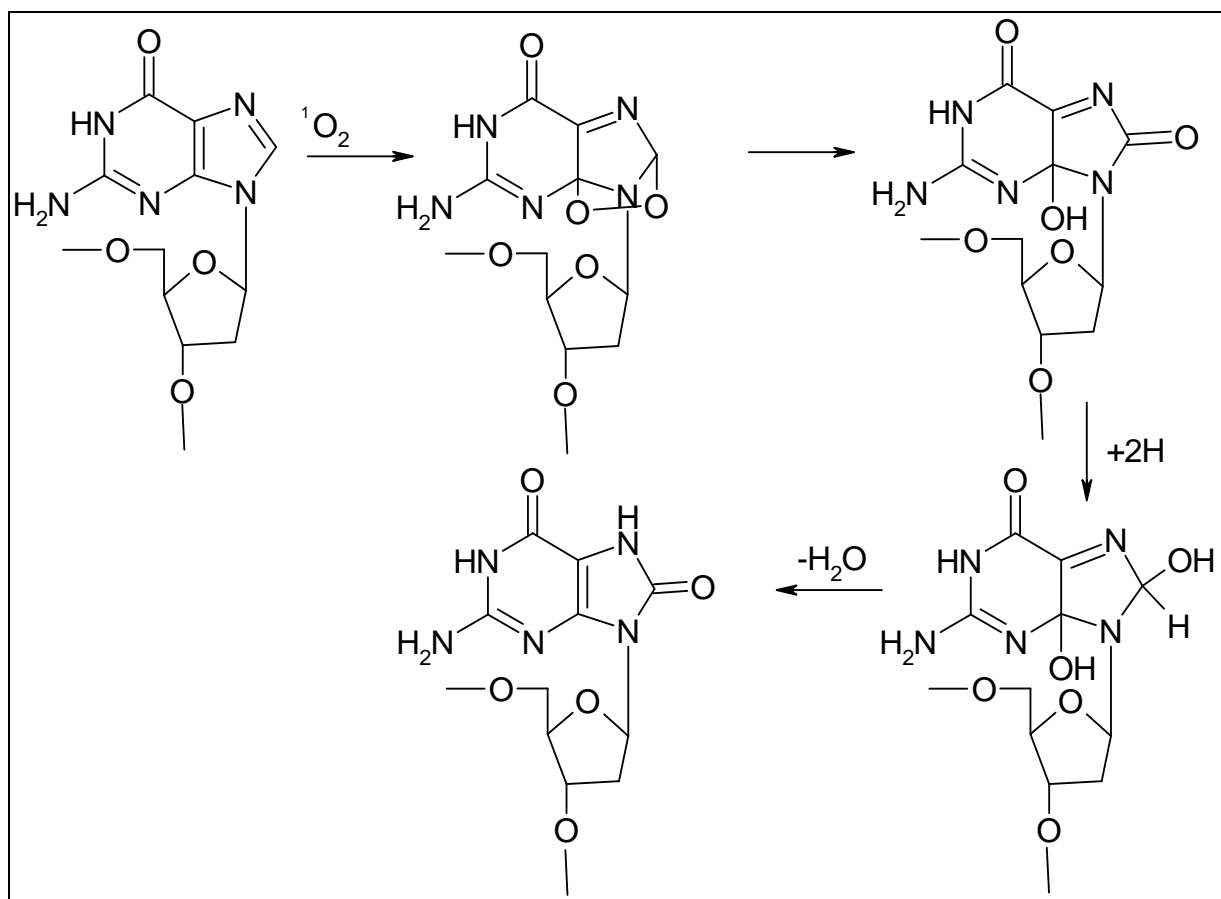


Abb. 5: Entwicklung des 8-oxo-Guanosins über die Endoperoxidbildung und Reduktion

Dagegen geht Boiteux (Boiteux et al., 1992) von einem Elektronentransfer von Guanin zum Singulett-Sauerstoff aus. Dabei entsteht das Superoxidradikal und das Guanosinradikalkation. Außerdem können die kationischen Radikalzentren entlang der DNA durch „electron

hopping“ zu Guanin wandern oder die Ladung im Guanosinradikalkation kann durch die Reaktion mit Wasser zum 8-oxo-Guanosin umgewandelt werden (Abbildung 6).

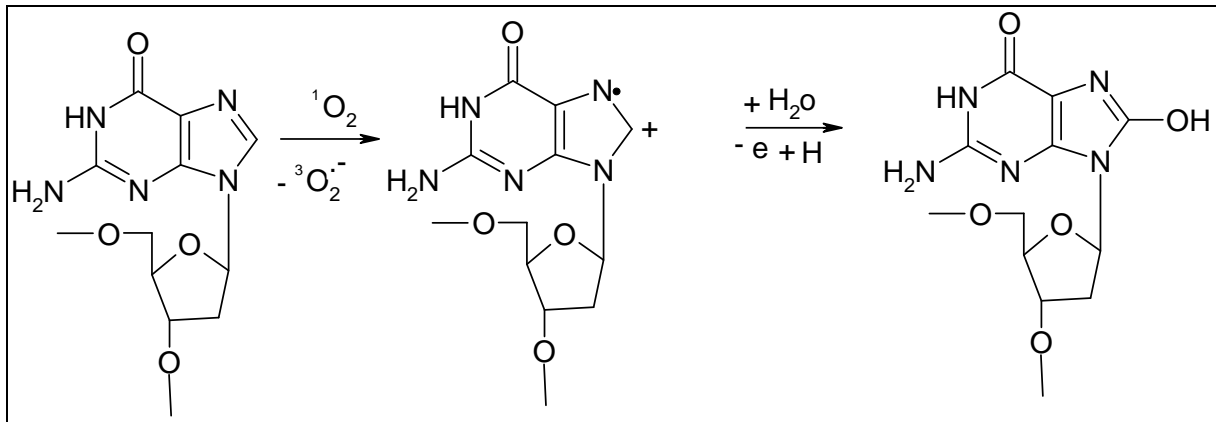


Abb. 6: Entstehung von 8-oxo-Guanosin durch Elektronentransfer

Bei einer erneuten Replikation der DNA bildet nun das 8-oxo-Guanin eine Basenpaarung mit Adenin (Shibutani et al., 1991; Kouchakdijan et al., 1991). Diese atypische Basenpaarung ist für die Mutagenität verantwortlich. Zusätzlich kann die Oxidation von Purinen zur Ringöffnung und damit zu Formamidopyrimidinen führen.

Die oxidativ umgewandelten DNA-Moleküle werden als Parameter für die oxidative Schädigung der DNA durch ROS identifiziert und quantifiziert. Der analytische Nachweis erfolgt über HPLC Messungen oder Gaschromatographische-Massenspektrometrie (Halliwell et al., 1992; Ravanat et al., 1995; Collins et al., 1996; Cadet et al., 2002).

Die heterocyclischen Basen in der DNA und RNA absorbieren Lichtstrahlung im Bereich von 260-280 nm. Die Strahlung in diesem Wellenlängenbereich bewirkt eine Anregung der DNA-Basen zum Singulett- und Triplett-Zustand. Dieser aktivierte Zustand der Basen führt zu einer Vielzahl von photochemischen Reaktionen. In der Regel reagieren die Basen mit benachbarten Molekülen im DNA-Strang. Die Pyrimidin Basen Thymin und Cytosin sind am häufigsten an solchen Reaktionen beteiligt. Bei Bestrahlung mit UV-C Licht im Bereich von 230-290 nm wurde die Entstehung der häufigsten Reaktionsprodukte entdeckt. Trokoso (Trokoso et al., 1965) fand zum ersten Mal Cyclobutanpyrimidindimere in UV-bestrahlter Säugerzellen-DNA. Cyclobutanpyrimidindimere entstehen durch die [2+2]-Cycloaddition der photochemisch reaktiven 5,6-Doppelbindung benachbarter Pyrimidinbasen. Zu ihnen zählen unter anderem Thymidindimere (Jenning et al., 1970), Thymidin/ Cytosindimere und Cytosindimere. In Gegenwart von langwelligem UV-A Licht absorbieren die DNA-Basen selber nur schwach. Die oxidative Modifizierung der Basen erfolgt vermutlich über endogene

Photosensibilisatoren wie Flavine und Porphyrine. Der dabei entstehende Singulett-Sauerstoff und das Superoxid führen zu der Oxidation von Guanin zu 8-Hydroxyguanin (Kvam et al., 1997).

2.5 Aufbau von Proteinen

Die Proteine im menschlichen Körper bestehen aus insgesamt 21 Aminosäuren, die durch Peptidbindungen zu Ketten miteinander verbunden und vernetzt sind. Als Hormone und Enzyme regeln sie wichtige Stoffwechselfvorgänge, auch als Bestandteil des Immunsystems spielen sie eine wichtige Rolle.

2.5.1 Oxidative Schädigung der Peptide

Die durch Oxidation hervorgerufenen Schädigungen von Proteinen umfassen einen weiten Bereich von möglichen Folgeschäden. Neben Photoallergien und Photosensibilisierung der Haut spielen oxidierte Aminosäuren auch bei Alterungsprozessen, Alzheimer, rheumatoider Arthritis und Carcinogenität eine wichtige Rolle (Berlett et al., 1997; Davies et al., 2001).

Durch Radikaleinwirkung werden Proteine zu modifizierten Aminosäuren umgewandelt. Dabei werden Aminosäuren abgespalten und es kommt zu Crosslinks und Zerstörung der Tertiärstruktur. Durch diese Reaktionen verlieren die Proteine ihre Funktion (Dean et al., 1997; Fu et al., 1998). Singulett-Sauerstoff reagiert schneller mit Proteinseitenketten als mit anderen zellulären Bestandteilen. Neben den Proteinen werden auch einzelne Aminosäuren angegriffen. Die Geschwindigkeit der Reaktion von Aminosäuren mit Singulett-Sauerstoff schwankt zwischen den einzelnen Aminosäuren erheblich. Bei physiologischen pH-Werten werden selektiv nur die Aminosäuren Tryptophan (Davies, 2004), Tyrosin (Jin et al., 1995), Methionin, Cystein und Histidin durch Singulett-Sauerstoff oxidiert. Die heterocyclischen Aminosäuren sind am meisten von der Oxidation betroffen, Phenol- und Aminogruppen können zusätzlich oxidiert werden. Durch Sekundärprozesse können weitere Schädigungen an anderen Aminosäuren hervorgerufen werden.

2.5.2 Oxidative Schädigung von Tryptophan

Tryptophan ist eine von drei Aminosäuren, die als Strukturbestandteil ein UV-chromophor enthält und Strahlung absorbieren kann, die länger als 280 nm ist. Die Aminosäure

Tryptophan ist besonders oxidationsempfindlich und kann selber als Photosensitizer agieren und das Superoxidradikal erzeugen (McCormick et al., 1978). Tryptophan ist aufgrund seiner fluoreszierenden Eigenschaften ein wichtiger Marker für die Proteinanalytik.

In der Abbildung 7 ist die Reaktion von Singulett-Sauerstoff mit freiem oder proteingebundenem Tryptophan dargestellt. Im nahen UV-Bereich zwischen 300-375 nm wird Tryptophan hauptsächlich in das N-formylkynurenin umgewandelt. Aus den Produkten N-formylkynurenin und Kynurenin kann ebenfalls unter Bestrahlung Singulett-Sauerstoff gebildet werden. Tryptophan reagiert dabei mit Singulett-Sauerstoff zu dem 3 α -Hydroperoxytryptophan als isolierbares Produkt. Vermutet wird, dass sich zwischen dem C2-C3 ein Ethandioxid ausbildet, aber auch die Entstehung eines Hydroperoxids wäre denkbar, der Beweis dafür ist aber bis heute ausgeblieben (Davies, 2004).

Als weitere Verbindungen entstehen das 3-Hydroxykynurenin, Anthranilsäure, Asparaginsäure, Kohlendioxid und Ammoniak.

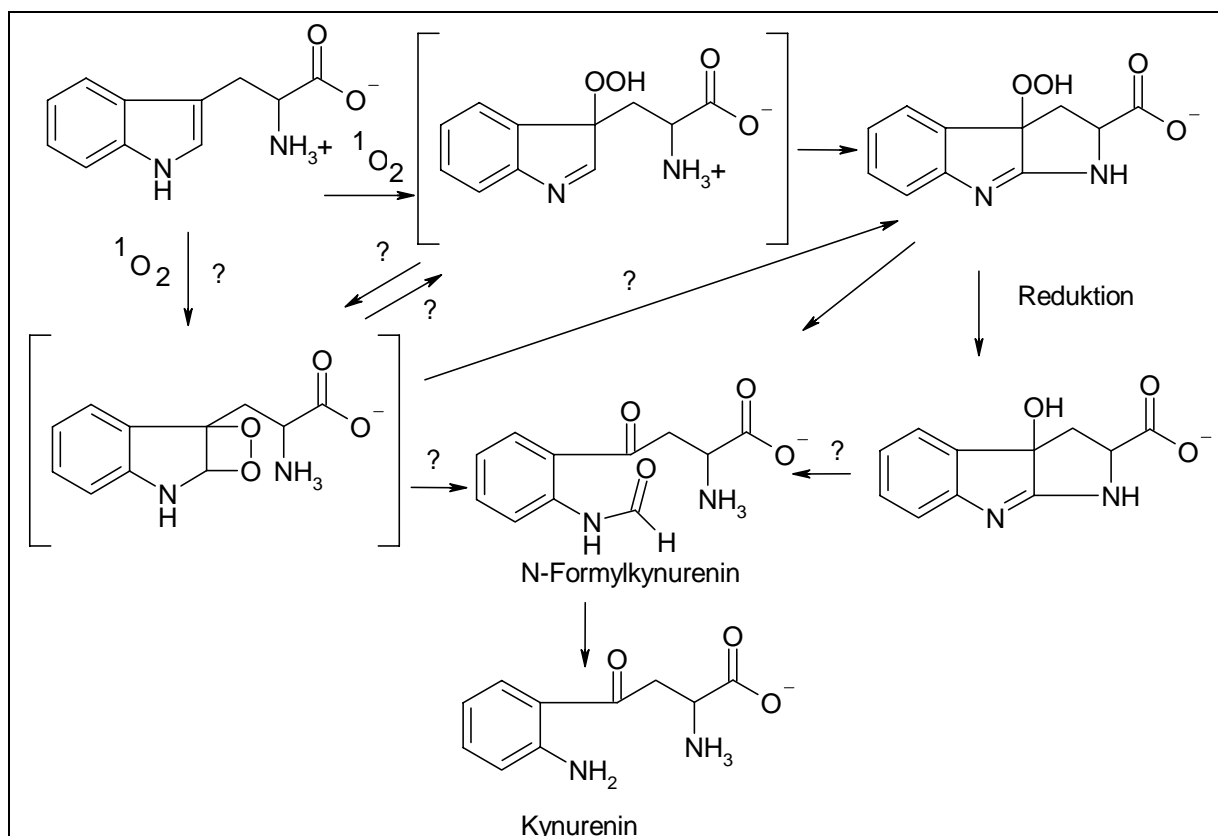


Abb. 7: Oxidative Umwandlung von Tryptophan zu Kynurenin

Radikale können zur Quervernetzung und Spaltung von Peptidbindungen führen. Dabei reagiert das Radikal mit dem Wasserstoffatom der α -Kohlenstoff-Atome. Durch die Abspaltung des Wasserstoffatoms entsteht ein Proteinradikal, das mit weiteren

Proteinradikalen reagieren kann und somit zur Quervernetzung von Proteinen führt. Auf der anderen Seite kann Sauerstoff mit dem α -Kohlenstoff-Radikal zu einer instabilen Peroxid-Zwischenstufe reagieren, die unter Abspaltung von einem Hydroperoxidradikal zum Imin führt. Durch hydrolytische Spaltung des Imins wird die Peptidbindung gespalten (Abbildung 8). Die entstandenen Proteine mit Carbonylfunktion können als Indikator für den intrazellulären Redoxstatus der Zellen herangezogen werden (Marnett et al., 2003).

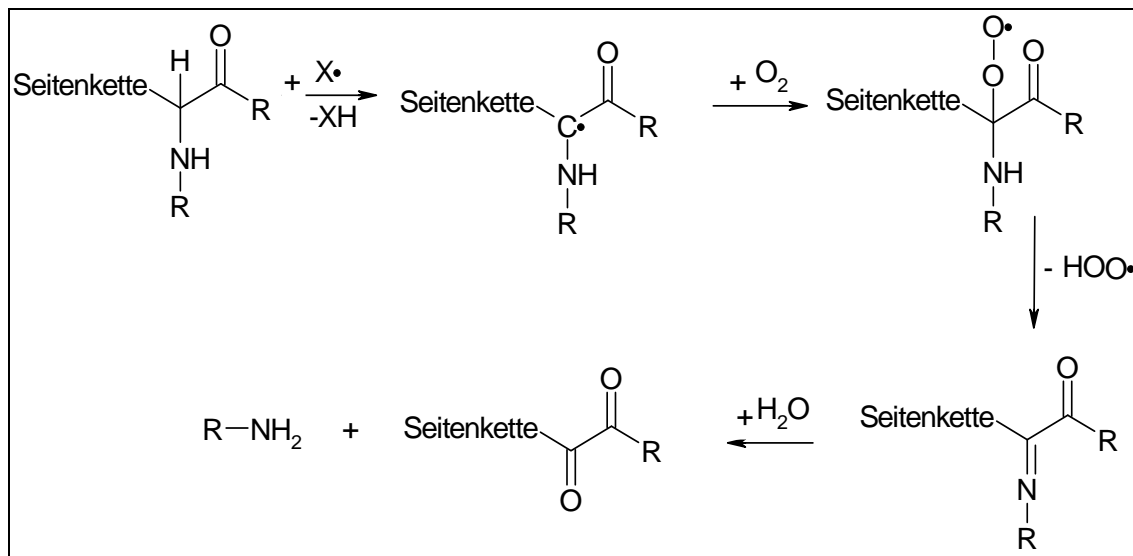


Abb. 8: Mechanismus der Spaltung von Peptidbindungen durch Radikale (Dean et al., 1997)

2.6 Auswahl der Biomoleküle zum Screening auf phototoxische und photoallergische Reaktionen

Als Modellsubstanz für das Screening von phototoxischen und photogenotoxischen Reaktionen in Gegenwart von Arzneistoffen wurde die DNA-Base GMP aufgrund der einleitend beschriebenen Eigenschaften dieses Moleküls ausgewählt. Außerdem wurden zwei DNA-sense und antisense Einzelstränge bestehend aus 44 Basen verwendet (Abbildung 9). Zum Screening auf photoallergenes Potential von Arzneistoffen, wurde die Aminosäure Tryptophan und das Dipeptid Alanyltryptophan als Modellsubstanz zur Testung verwendet.

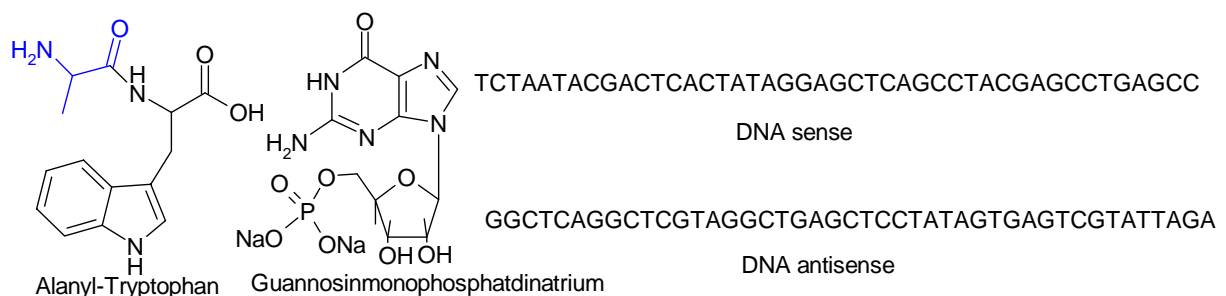


Abb. 9: Alanyl-Tryptophan, Guanosinmonophosphat DNA-sense, -antisense

2.7 Anregungs- und Desaktivierungsprozesse von Photosensibilisatoren

Die Absorption von UV- oder sichtbarem Licht führt zur Veränderung der Elektronenkonfiguration von Molekülen. Das Molekül geht in einen angeregten Zustand über. Zur Absorption von Licht kommt es nur, wenn das Molekül eine Absorptionsbande besitzt, die mit der eingestrahnten Lichtenergie überlappt (Grundgesetz von Grotthus und Draper). Durch die Absorption des Lichtes wird das Molekül vom Singulett-Grundzustand (S_0) in den angeregten Singulett-Zustand (1S_1) überführt. Der angeregte Singulett-Zustand ist sehr kurzlebig (10^{-9} bis 10^{-6} Sekunden), dennoch kann es aus diesem Zustand zu Photosensibilisierungsreaktionen kommen. Nach der Quantenspinumkehr entsteht der länger lebige Triplett-Zustand (10^{-3} Sekunden) aus dem die meisten Photosensibilisierungsreaktionen hervorgehen. Die durch Absorption aufgenommene Energie kann aber auch durch Fluoreszenz, Phosphoreszenz oder strahlungslose Deaktivierung abgegeben werden.

2.7.1 Wirkmechanismus der Photosensibilisatoren

Arzneistoffe können als Photosensitizer wirken und photoallergische und phototoxische Reaktionen hervorrufen (Miranda, 2001; Allen, 1993; Gould et al., 1995). Aber auch im Pflanzenreich sind viele photosensibilisierende Stoffe vorzufinden (Bowers, 1999; Schempp et al., 2002). Der Wirkungsmechanismus der Photosensibilisatoren, der für phototoxische und photoallergische Reaktionen verantwortlich ist, ist heute immer noch unzureichend bekannt. Das nachfolgende Schema (Abbildung 10) zeigt die Entstehung von phototoxischen und photoallergischen Reaktionen. Der Photosensibilisator S_0 geht durch Absorption von Licht in den ersten angeregten kurzlebigen Singulett-Zustand $^1S_1^*$ über. Durch Energieübertragung auf andere Moleküle geht das Energieniveau des Photosensibilisators entweder in den länger andauernden Triplett-Zustand oder direkt wieder in den Grundzustand über. Dabei kommt es in An- oder Abwesenheit von Sauerstoff zu Reaktionen mit Biomolekülen wie Proteinen, DNA und Lipiden. Die Reaktionen können in zwei verschiedene Typen unterteilt werden.

Bei der Typ I Reaktion reagiert der Triplett-Zustand, der über zwei ungepaarte Elektronen mit gleichgerichtetem Spin verfügt, mit DNA oder Proteinen unter Elektronentransfer oder H-Abstraktion (Wood et al., 1996). Dadurch entstehen die ROS wie Superoxidradikalanionen, Hydroperoxidradikale, Hydroxylradikale und Wasserstoffperoxid. Zu den Typ I Photosensibilisatoren gehören aromatische Ketone wie Benzophenon, Acetophenon (H-Abstraktion) oder elektronenarme Moleküle wie Menadion (Elektronentransfer).

Bei der Typ II Reaktion (Foote, 1991; Johnson, 1992) überträgt der Photosensibilisator die absorbierte Lichtenergie direkt auf molekularen Triplett-Sauerstoff. Dadurch entsteht der aktivierte Singulett-Sauerstoff, der über zwei ungepaarte Elektronen mit entgegengesetztem Spin verfügt. Diese Reaktion findet nur statt, wenn der energetische Triplett-Zustand des Photosensibilisators höher liegt als der Triplett-Zustand des Sauerstoffs. Der sehr reaktive Singulett-Sauerstoff reagiert oxidativ mit DNA und Proteinmolekülen.

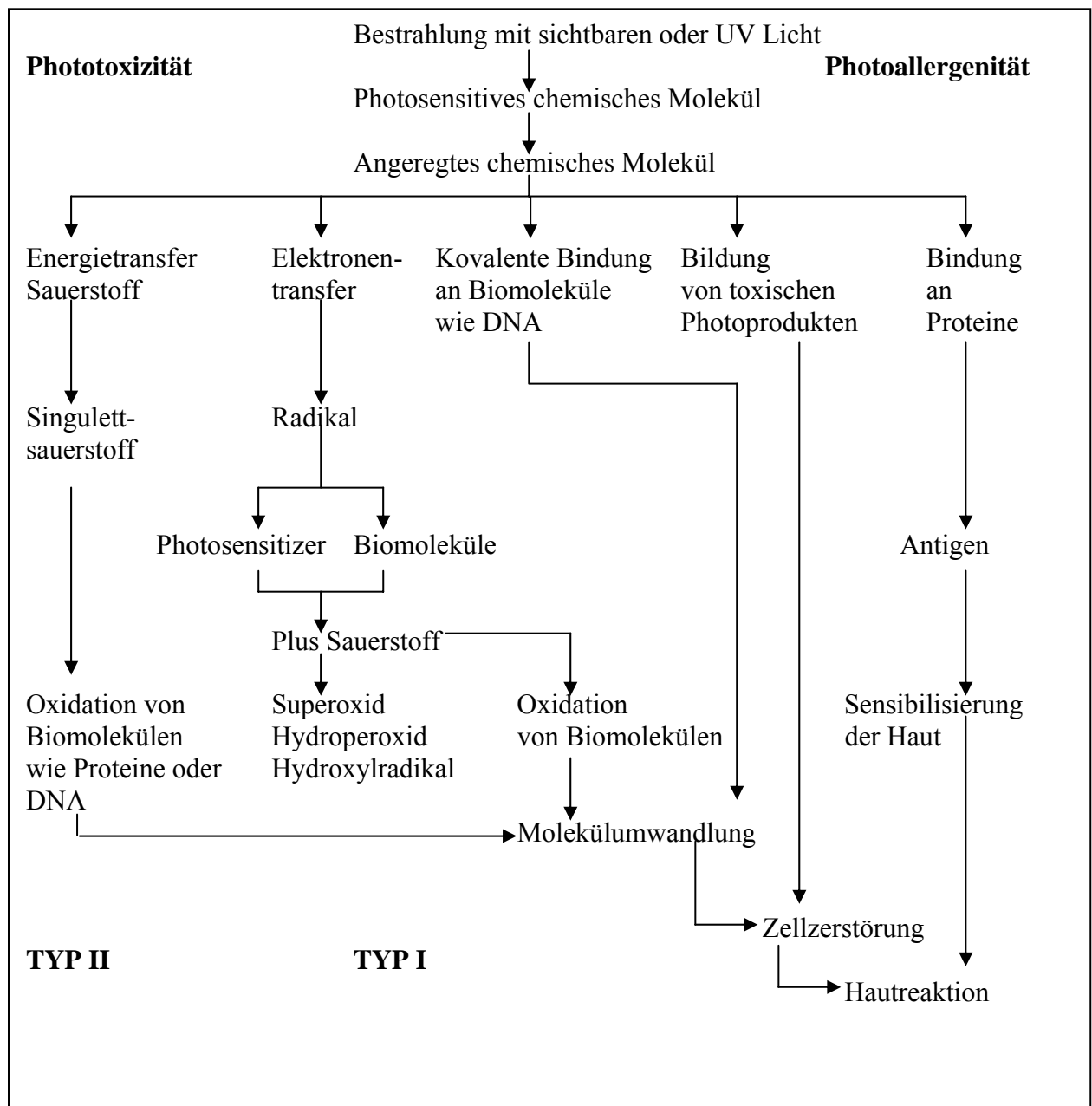


Abb. 10: Übersicht über die Reaktionsmechanismen von Photosensibilisatoren (Spielmann et al., 2000)

Wird der Photosensibilisator innerhalb der photochemischen Reaktion mit Biomolekülen stöchiometrisch unter der Ausbildung einer kovalenten Bindung verbraucht, spricht man von

nicht photodynamischen Reaktionen. Außerdem können aus dem Photosensibilisator durch Reaktion mit Wasser oder Sauerstoff Photomodifizierungen entstehen. In beiden Fällen können durch die resultierenden Reaktionsprodukte phototoxische Reaktionen entstehen (Spielmann et al., 2000).

Photoreaktionen der Haut werden in photoallergische und photoirritative Reaktionen zusammengefasst (Ippen, 1993). Dabei äußern sich diese Reaktionen als akute und chronische Dermatiden und treten mehrere Stunden bis wenige Tage nach Lichtexposition auf, dabei sind besonders die lichtexponierten Areale wie Gesicht, Hände und Dekolleté betroffen. (Pigatto et al., 1996).

2.8 Photoallergische Reaktionen der Haut

Bei der Photoallergie wird der Arzneistoff oder der Stoffwechselmetabolit in der Haut angereichert und durch UV Licht aktiviert. Die UV-Strahlung bewirkt die Bildung freier Radikale, so entsteht eine reaktionsfähige Verbindung, das sogenannte Prohaptene. Diese kurzlebigen reaktiven Zwischenprodukte können mit Proteinen eine kovalente Bindung zum Hapten-Protein-Komplex eingehen. Das entstehende Antigen löst im weiteren Verlauf nach immunologischer Sensibilisierung und erneuter Exposition eine allergische Spätreaktion aus. Photoirritative Substanzen bilden hingegen keinen immunogenen Hapten-Proteinkomplex aus.

2.8.1 Photoirritationen der Haut

Bei der Photoirritation werden zelluläre Bestandteile geschädigt, deshalb werden diese Reaktionen auch als phototoxische Reaktionen bezeichnet. Die Phototoxizität ist also ein Maß für die Photoirritation. Der Sonnenbrand gehört zu den photoirritativen Reaktionen und äußert sich in Erythemen und Ödem- und Blasenbildung. Substanzen die photoirritative Reaktionen hervorrufen, können diese Reaktion der Haut beschleunigen. Im Gegensatz zu der Photoallergie kann die photoirritative Reaktion schon bei Erstkontakt mit der Substanz auftreten. Die Schädigung der Haut und damit die Oxidation von Aminosäuren wird durch die ROS verursacht.

2.8.2 Phototoxische Reaktionen

Phototoxische Reaktionen der Haut sind von den photoallergischen Reaktionen abzugrenzen. Im Unterschied zu photoallergischen Reaktionen basieren phototoxische Reaktionen nicht auf

immunologischen Grundlagen (Lehmann, 2004). Phototoxizität wird als toxische Reaktion definiert, die nach erster Exposition der Haut mit bestimmten Chemikalien bei nachfolgender Lichtexposition entsteht. Unter dem Begriff Photogenotoxizität ist die schädigende Wirkung eines Photosensibilisators auf die DNA gemeint. Phototoxische Stoffe sind in der Regel auch photogenotoxisch.

2.9 Aktuelle Testmethoden für phototoxische und photogenotoxische Reaktionen

Zur Testung auf phototoxische und photogenotoxische Reaktionen stehen eine große Anzahl von Tierversuchen zur Verfügung. In der Vergangenheit wurde versucht, die Tierversuche durch in vitro-Methoden zu ersetzen, wodurch verschiedene Methoden hervorgegangen sind (Schwaab, et al., 2004).

Der in vitro-3T3-NRU-Phototoxizitätstest wurde von Spielmann zwischen 1992-1997 in einem gemeinsamen Projekt von EU/ COLIPA (European Cosmetic Toiletry and Perfumery Association) und der ZEBET (Zentralstelle zur Erfassung und Bewertung von Ersatz- und Ergänzungsmethoden zum Tierversuch) entwickelt und validiert (Spielmann et al., 1994; Anon, 1998; Spielmann et al., 1998). Der Test basiert auf Balb/c 3T3 Zellen. Die Zytotoxizität in dem 3T3-NRU Test wird ausgedrückt als konzentrationsabhängige Reduzierung der Aufnahme des Vitalfarbstoffs Neutralrot, 24 Stunden nach der Bestrahlung und Behandlung mit der Testchemikalie.

Der Comet Assay Test wurde das erste Mal durch Ostling und Johanson (Ostling, et al., 1984) beschrieben und von Singh (Singh et al., 1988) weiterentwickelt. Der Comet Assay Test ist eine in vitro Methode zur Prüfung von Chemikalien auf Photogenotoxizität. Die Einzelzellelektrophorese ermöglicht den Nachweis von DNA Schäden in einzelnen Zellen. Die Einzellsuspension wird in Agarose aufgenommen und auf einen Objektträger aufgetragen. Die Zellmembran der Zelle wird aufgelöst und zur Detektion der Einzelstrangbrüche wird die DNA alkalidenaturiert und anschließend wird eine Elektrophorese durchgeführt. Die Proben werden mit einem DNA Farbstoff angefärbt und mikroskopisch ausgewertet. Zellen die einen runden Zellkern aufweisen werden als Zellen ohne DNA Schaden eingeordnet. In den Zellen in denen die DNA geschädigt wurde, wandert die chromosomale DNA in Richtung der Anode.

Eine weitere Methode zum Nachweis von Photogenotoxizität ist der Mikronukleus-Test (MNT). Der photo-MNT wurde bisher von zwei Forschungsgruppen untersucht (Kersten et al., 1999, 2001; Snyder et al., 1999). Die ROS können zu Doppelstrangbrüchen führen und im

Verlauf der Reparatur der DNA dann zu Mutationen führen. Diese Chromosomenmutationen können dann mit dem Mikronukleos-Test nachgewiesen werden. In dem Test werden Lymphozyten mit dem Mitogen Phytohämagglutinin zum Wachstum stimuliert. Zum Nachweis der Mutation müssen sich die Zellen mindestens einmal teilen. Nach Anfärben mit Acridinorange werden die zweikernigen Zellen ausgewertet.

2.9.1 Aktuelle Testmethoden für photoallergische Reaktionen

Mit immunologischen Untersuchungen zu der Photoallergie wurde schon früh begonnen (Jung, 1977). Ein verlässliches Screening-Modell zur Testung von neuen Arzneistoffen auf Photoallergien steht heute noch nicht zur Verfügung. Die EMEA hat bis heute noch keine legislative Grundlage geschaffen. Das Testmodell sollte möglichst eine schnelle, zuverlässige und kostengünstige Testung ermöglichen.

Aktuelle Testsysteme basieren auf Tierversuchen. Untersucht werden epikutan applizierte Arzneimittel oder die direkte Wirkung der Substanz auf bestimmte Zellsuspensionen. Zurzeit stehen verschiedene in vivo Test Modelle zur Verfügung, diese untersuchen die Photoreaktionen nach epikutaner Applikation. Der Occluded Patch Test (Bühler, 1965) und der Guinea Pig Maximization Test GMPT (Magnusson et Klingman, 1969) werden mit Meerschweinchen durchgeführt. Beide Testmethoden sind mit erheblichem Aufwand verbunden. Für den Occluded Patch Test werden 10-20 Meerschweinchen über 40 Tage und bei dem GMPT 25 Meerschweinchen über 30 Tage benötigt. Darüber hinaus erfordert der Test aufwendige Applikationsmodalitäten. Die Auswertung erfolgt relativ unspezifisch anhand von Erythemen der Haut. Es ist einleuchtend, dass diese geforderten Versuchsbedingungen einen hohen personellen, zeitlichen und finanziellen Aufwand verursachen. Durch die Einführung des Local Lymph Node Assay (LLNA) durch Kimber (Kimber et al., 1989) wurde erstmals eine Testmethode entwickelt, die gezielt die Lymphknotenzellzahl bestimmt. Der OECD (Organisation for Economic Cooperation and Development) hat den LLNA Test 1992 in einer Richtlinie aufgenommen. Bei negativen Ergebnissen beim LLNA Test muss der GMPT zusätzlich durchgeführt werden.