

Experimentelle Untersuchungen zur Photochemie und Phototoxikologie von Ketoprofen

Dissertation



zur Erlangung des akademischen Grades
doctor rerum naturalium (Dr. rer. nat.)

vorgelegt der

Mathematisch-Naturwissenschaftlich-Technischen Fakultät
(mathematisch-naturwissenschaftlicher Bereich)
der Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg

von

Frau Dipl.-Pharm. Antje Kathrin Radschuweit
geboren am 06.02.1974 in Arnstadt/Thüringen

Gutachter:

1. Prof. Dr. P. Nuhn
2. PD Dr. H.-H. Rüttinger
3. Prof. Dr. W. A. Wohlrab
4. Prof. Dr. K. Görlitzer

Halle (Saale), 24. April 2002

urn:nbn:de:gbv:3-000003385

[<http://nbn-resolving.de/urn/resolver.pl?urn=nbn%3Ade%3Agbv%3A3-000003385>]

Teilergebnisse aus dieser Arbeit wurden mit Genehmigung der Naturwissenschaftlichen Fakultät in folgenden Beiträgen vorab veröffentlicht:

Publikationen

Rüttinger, H.-H.; **A. Radschuweit**: Determination of peroxides by capillary zone electrophoresis with amperometric detection; *J. of Chromatogr. A* **868** (2000)127-134

Radschuweit, A.; Chr. Huschka and H.-H. Rüttinger: Formation of hydrogen peroxide during the UVA induced desintegration of ketoprofen; *Pharmazie* **51** (2000) 782-783

Radschuweit, A.; H.-H. Rüttinger, P. Nuhn, W. Wohlrab and Chr. Huschka: UV Induces Formation of Hydrogen Peroxide Based on the Photochemistry of Ketoprofen; *Photochem. Photobiol.* **73** (2001) 119-127

Radschuweit, A.; H.-H. Rüttinger, P. Nuhn: Capillary zone electrophoresis with electrochemical detection – a simple and effective method to analyze oxygen-consuming and peroxide-forming processes; *J. of Chromatogr. A* **937** (2001) 127-134

Huschka, C.; **A. Radschuweit**, H.-H. Rüttinger, J. Wohlrab: Ketoprofen-enthaltende Arzneiformulierungen zur Anwendung für die Photodynamische Therapie; Patentanmeldung in Vorbereitung (2002)

Beiträge zu wissenschaftlichen Veranstaltungen und Tagungen

Rüttinger H.-H., **A. Radschuweit** Bestimmung von Peroxiden mittels CZE-electrochemischer Detektion; Elach 4 Warnemünde 1999

Radschuweit, A.: In vitro Untersuchungen zum Mechanismus der Photosensibilisierung am Beispiel von Ketoprofen; 36. Kolloquium Experimentelle Dermatologie, Halle 1999

Radschuweit, A.; H.-H. Rüttinger, Chr. Huschka and: W. Wohlrab

In vitro evaluation of the photosensitizer Ketoprofen; XXVII. Annual Meeting of the Arbeitsgemeinschaft Dermatologische Forschung (ADF), Wien 2000

Arch Dermatol Res; 292 (2000)

A. Radschuweit, H.-H. Rüttinger, Chr. Huschka

Formation of Hydrogen Peroxide and HPODE during the UV-induced desintegration of the Ketoprofen; Second European Graduate Student Meeting 2000, Frankfurt/Main 2000

Arch. Pharm. Pharm. Med. Chem. 333 Suppl. (2000)

Chr. Huschka, **A. Radschuweit,** H.-H. Rüttinger, P. Nuhn, and W. Wohlrab:

In vitro investigations of the photosensitizer Ketoprofen; 3rd World Meeting on Pharmaceutics Biopharmaceutics Pharmaceutical Technology, Berlin 2000

A. Radschuweit, H.-H. Rüttinger, P. Nuhn: Capillary Electrophoresis with Electrochemical Detection, a Powerful Tool for the Direct Determination of Different Peroxides: Investigation of Ketoprofen Induced Photoperoxidation; Jahrestagung der DPhG, Münster 2000

Arch. Pharm. Pharm. Med. Chem. 333 Suppl. 2 (2000)

Rüttinger, H.-H.; M. Lampe, **A. Radschuweit:** Analytische Erfassung von enzymkatalysierten Oxidationsprozessen durch Kapillarzonenoelektrophorese mit elektrochemischer Detektion;

Elach 5 Freiburg 2001

Radschuweit, A.; C. Huschka, H.-H. Rüttinger, W. Wohlrab and P. Nuhn: Investigations of the photochemical properties of a ketoprofen-gel; Jahrestagung der DPhG, Halle 2001

Arch. Pharm. Pharm. Med. Chem. **334** (2001) 16

Huschka, C.; **A. Radschuweit,** H.-H. Rüttinger, P. Nuhn and W. Wohlrab: Response of skin after topical ketoprofen application and sunlight exposure; Jahrestagung der DPhG, Halle 2001

Arch. Pharm. Pharm. Med. Chem. **334** (2001) 27

Huschka, C; **A. Radschuweit,** H.-H. Rüttinger, P. Nuhn, and W. Wohlrab: Untersuchungen zur topischen Therapie ketoprofenhaltiger Formulierungen;

Z. Hautkr. **76** (2001) 13-14

1	PROBLEM- UND ZIELSTELLUNG	1
2	THEORETISCHER TEIL	3
2.1	REAKTIVE SAUERSTOFFSPEZIES	4
2.1.1	<i>Prinzipien der Sauerstoffaktivierung</i>	4
2.1.2	<i>Bildung und Reaktivität des Superoxid-Anions</i>	5
2.1.3	<i>Bildung und Reaktivität von Wasserstoffperoxid</i>	6
2.1.4	<i>Bildung und Reaktivität von Hydroxyl-Radikalen</i>	6
2.1.5	<i>Bildung und Reaktivität von Singulett-Sauerstoff</i>	7
2.2	PHOTODYNAMISCHE REAKTIONSMCHANISMEN	8
2.3	KETOPROFEN	9
2.3.1	<i>Photochemische Eigenschaften von Ketoprofen</i>	11
3	ANALYTISCHE METHODENENTWICKLUNG	15
3.1	KAPILLARZONENELEKTROPHORESE	15
3.1.1	<i>Allgemeines</i>	15
3.1.2	<i>Kapillarelektrophorese mit UV-Detektion</i>	16
3.1.3	<i>Kapillarelektrophorese mit elektrochemischer Detektion</i>	17
3.1.4	<i>Mizellare Elektrokinetische Chromatographie</i>	18
3.1.4.1	<i>Allgemeines</i>	18
3.1.4.2	<i>Separation der Ketoprofen-Photoprodukte mit Hilfe der mizellaren elektrokinetischen Chromatographie</i>	20
3.1.4.3	<i>Ergebnisse und Diskussion</i>	20
3.2	ENTWICKLUNG EINER ANALYSEN METHODE ZUR SIMULTANEN BESTIMMUNG VON H ₂ O ₂ , KETOPROFEN UND DER KETOPROFEN-PHOTOPRODUKTE	20
3.2.1	<i>Chromatographische Trennung von Ketoprofen und der Ketoprofen-Photoprodukte</i>	21
3.2.2	<i>Chemiluminometrische Detektion</i>	21
3.2.3	<i>HPLC/UV/CL ein Analysenverfahren zur simultanen Bestimmung von H₂O₂, Ketoprofen und der Ketoprofen-Photoprodukte</i>	22
3.3	FOX-II-TEST	25
3.4	ZUSAMMENFASSUNG	25
3.5	ENTWICKLUNG EINES ANALYSENSYSTEMS ZUR BESTIMMUNG SAUERSTOFF-VERBRAUCHENDER UND PEROXID-BILDENDER PROZESSE	27
3.5.1	<i>Zielstellung</i>	27
3.5.1.1	<i>Aufbau der Injektionsvorrichtung</i>	27
3.5.1.2	<i>Allgemeine Injektionsprozedur</i>	28
3.5.1.3	<i>Stabilität des Injektionsvorgangs und der Elektrodenresponse</i>	29
3.5.2	<i>Einsatz der CE-ED als in-vitro-Testsystem für die Bestimmung der IC₅₀ neu synthetisierter Lipoxygenase-Inhibitoren</i>	31
3.5.3	<i>Vergleichende Bestimmung der IC₅₀-Werte ausgewählter Lipoxygenase-Inhibitoren mit verschiedenen analytischen Methoden</i>	31
3.5.3.1	<i>Versuchsdurchführung</i>	31
3.5.4	<i>Ergebnisse und Diskussion</i>	32

3.5.5 Zusammenfassung.....	33
----------------------------	----

4 UNTERSUCHUNGEN ZUM PHOTOCHEMISCHEN VERHALTEN WÄBRIGER KETOPROFEN-LÖSUNGEN 34

4.1 SCREENING DER PHOTOCHEMISCHEN STABILITÄT TOPISCH ANGEWANDTER NSAR VOM ARYLPROPION- UND ARYLESSIGSÄURETYP	34
4.1.1 Allgemeines.....	34
4.1.2 Versuchsdurchführung.....	34
4.1.3 Ergebnisse und Diskussion.....	35
4.2 PHOTOCHEMISCHE UNTERSUCHUNGEN ZUM UV-INDUZIERTEN ZERFALL VON KETOPROFEN IN WÄBRIGEN LÖSUNGEN.....	36
4.2.1 Versuchsdurchführung.....	36
4.2.2 Ergebnisse und Diskussion.....	36
4.3 PHOTOCHEMISCHE UNTERSUCHUNGEN LINOLSÄURE-HALTIGER WÄBRIGER KETOPROFEN-LÖSUNGEN.....	38
4.3.1 Versuchsdurchführung.....	38
4.3.2 Ergebnisse und Diskussion.....	38
4.4 EINFLUß DER KETOPROFEN-PHOTOPRODUKTE AUF DIE LINOLSÄURE-PEROXIDATION UNTER UVA-BESTRAHLUNG.....	40
4.4.1 Versuchsdurchführung.....	41
4.4.2 Ergebnisse und Diskussion.....	41
4.5 KETOPROFEN-SENSIBILISIERTE PEROXIDATION VON LINOLSÄURE UNTER DEM AUSSCHLUß DER KETOPROFEN-PHOTOPRODUKTE	42
4.5.1 Allgemeines.....	42
4.5.2 Versuchsdurchführung.....	42
4.5.3 Ergebnisse und Diskussion.....	43
4.5.4 Zusammenfassung.....	44
4.6 PHOTOINDUZIERTER KETOPROFEN-ABBAU UND LINOLSÄURE-PEROXIDATION UNTER DEM EINFLUß VON NATÜRLICHEM SONNENLICHT	44
4.6.1 Versuchsdurchführung.....	44
4.6.2 Ergebnisse und Diskussion.....	45
4.7 PHOTOCHEMISCHE UNTERSUCHUNGEN ALKOHOLISCHER KETOPROFEN-LÖSUNGEN.....	47
4.7.1 Vorüberlegungen	47
4.7.2 Versuchsdurchführung.....	47
4.7.3 Ergebnisse und Diskussion.....	47
4.8 PHOTOCHEMISCHE UNTERSUCHUNGEN IN DIGLYME-HALTIGEN WÄBRIGEN KETOPROFEN-LÖSUNGEN.....	50
4.8.1 Vorüberlegungen	50
4.8.2 Versuchsdurchführung.....	51
4.8.3 Ergebnisse und Diskussion.....	51
4.8.4 Zusammenfassung.....	52
4.9 PHOTOCHEMISCHE UNTERSUCHUNGEN MIT EINEM HANDELSÜBLICHEN 2,5 %-IGEN KETOPROFEN-GEL	53
4.9.1 Motivation.....	53
4.9.2 Rheologische Untersuchungen zum Verhalten verdünnter Ketoprofen-Gel-Proben unter dem Einfluß von UVA-Strahlung	53

4.9.2.1	Vorüberlegung	53
4.9.2.2	Versuchsdurchführung	53
4.9.2.3	Ergebnisse und Diskussion	54
4.9.3	<i>Bestimmung der Eindringtiefe von UVA-Strahlung in kommerziell verfügbarem Ketoprofen-Gel</i> ..	57
4.9.3.1	Vorüberlegung	57
4.9.3.2	Versuchsdurchführung	57
4.9.3.3	Ergebnisse und Diskussion	58
4.9.4	<i>Zerlegung des Ketoprofen-Gels in einzelne Schichten</i>	59
4.9.4.1	Versuchsdurchführung	59
4.9.4.2	Ergebnisse und Diskussion	60
4.9.5	<i>Untersuchungen zum UVA-induzierten Ketoprofen-Zerfall in einem handelsüblichen 2,5 %-igen Ketoprofen-Gel</i>	60
4.9.5.1	Versuchsdurchführung	60
4.9.5.2	Ergebnisse und Diskussion	61
4.10	PENETRATIONSUNTERSUCHUNGEN AN HUMANER HAUT	62
4.10.1	<i>Allgemeines</i>	62
4.10.2	<i>Diffusionszelle nach Franz</i>	62
4.10.3	<i>Vergleichende Penetrationsuntersuchungen zur Bestimmung der Wirkstoffverfügbarkeit topisch applizierten Ketopropens unter dem Einfluß von UVA-Licht in humaner exzidierte Haut</i>	63
4.10.3.1	Versuchsdurchführung	64
4.10.4	<i>Ergebnisse und Diskussion</i>	65
4.10.5	<i>Zusammenfassung</i>	69

5 TOXIKOLOGISCHE UNTERSUCHUNGEN 70

5.1	CHARAKTERISIERUNG DES PROLIFERATIONSVERHALTENS KETOPROFEN-BEHANDELTEN HUMANER KERATINOZYTEN UNTER DEM EINFLUSS VON UVA- UND UVB-STRahlung.....	70
5.1.1	<i>Bestimmung der Lebendzellanzahl und der DNA-Syntheseleistung humaner Keratinozyten unter dem Einfluß von Ketoprofen</i>	71
5.1.1.1	Theoretische Grundlagen	71
5.1.1.2	Versuchsdurchführung	71
5.1.1.3	Ergebnisse und Diskussion	72
5.1.2	<i>Bestimmung des intrazellulären Gesamtperoxidgehaltes mit Hilfe des DHR-Tests</i>	74
5.1.2.1	Vorüberlegung	74
5.1.2.2	Ergebnisse und Diskussion	74
5.1.3	<i>Untersuchungen zum Einfluß der Ketoprofen-Photoprodukte auf humane Keratinozyten unter Ausschluß von UV-Licht</i>	75
5.1.3.1	Versuchsdurchführung	76
5.1.3.2	Ergebnisse und Diskussion	76
5.1.4	<i>Untersuchung der Wirkung der Ketoprofen-Photoprodukte auf humane Keratinozyten unter dem Einfluß von UV-Licht</i>	79
5.1.4.1	Vorüberlegungen	79
5.1.4.2	Versuchsdurchführung	79
5.1.5	<i>Ergebnisse und Diskussion</i>	80
5.2	VITALITÄTSUNTERSUCHUNGEN AN BEFRUCHTETEN, BEBRÜTETEN HÜHNEREIERN UNTER DEM EINFLUSS VON KETOPROFEN UND UVA-STRahlung	81
5.2.1	<i>Modellbeschreibung</i>	81

5.2.2	<i>Versuchsdurchführung</i>	82
5.2.3	<i>Ergebnisse und Diskussion</i>	82
5.2.4	<i>Zusammenfassung</i>	86

6 BEEINFLUSSUNG DES PHOTOINDUZIERTEN KETOPROFEN-ABBAUS IN WÄBRIGEN LÖSUNGEN DURCH DEN ZUSATZ AUSGEWÄHLTER UV-ABSORBER, ANTIOXIDANTIEN UND RADIKALFÄNGER..... 87

6.1	VORÜBERLEGUNG.....	87
6.2	UV-ABSORBER.....	88
6.2.1	<i>Vorüberlegungen</i>	88
6.2.2	<i>Versuchsdurchführung</i>	89
6.2.3	<i>Ergebnisse und Diskussion</i>	89
6.3	ANTIOXIDANTIEN.....	91
6.3.1	<i>Versuchsdurchführung</i>	92
6.3.2	<i>Ergebnisse und Diskussion</i>	92
6.4	STABILITÄT AUSGEWÄHLTER IN DER HAUT VORKOMMENDER WASSERLÖSLICHER ANTIOXIDANTIEN BZW. UV-ABSORBER UNTER DEM EINFLUß VON UVA-LICHT UND KETOPROFEN	93
6.4.1	<i>Vorüberlegungen</i>	93
6.4.2	<i>Versuchsdurchführung</i>	94
6.4.3	<i>Ergebnisse und Diskussion</i>	94
6.5	ZUSAMMENFASSUNG.....	96

7 IN VITRO- UND IN VIVO-UNTERSUCHUNGEN DES PROTEKTIVEN POTENTIALS AUSGEWÄHLTER UV-ABSORBER UND ANTIOXIDANTIEN 97

7.1	UNTERSUCHUNGEN DES PROTEKTIVEN POTENTIALS AUSGEWÄHLTER UV-ABSORBER UND ANTIOXIDANTIEN AM IN VITRO-MODELL HUMANER KERATINOZYTEN	97
7.1.1	<i>Ergebnisse und Diskussion</i>	98
7.2	IN-VIVO-UNTERSUCHUNGEN DES PROTEKTIVEN POTENTIALS AUSGEWÄHLTER UV-ABSORBER UND ANTIOXIDANTIEN AN DER CHORIO-ALLANTOIS-MEMBRAN BEBRÜTETER HÜHNEREIER (HET-CAM-TEST).....	102
7.2.1	<i>Ergebnisse und Diskussion</i>	103
7.3	ZUSAMMENFASSUNG.....	104

8 PHOTODYNAMISCHE THERAPIE..... 105

8.1	THEORETISCHE GRUNDLAGEN.....	105
8.1.1	<i>Antiproliferative Eigenschaften UVA-bestrahlter Ketoprofen-Lösungen im Vergleich zum Antipsoriasisikum Dithranol und dem Photochemotherapeutikum 8-Methoxypsoralen</i>	105
8.1.1.1	<i>Vorüberlegungen</i>	105
8.1.1.2	<i>Versuchsdurchführung</i>	106

8.1.1.3	Ergebnisse und Diskussion	107
8.1.2	<i>Pilotversuch zur photodynamischen Therapie mit Ketoprofen beim Krankheitsbild einer aktinischen Keratose</i>	108
8.1.3	<i>Zusammenfassung</i>	108
9	ABSCHLUßDISKUSSION	110
10	MATERIALIEN UND METHODEN	112
10.1	ANALYTISCHE VERFAHREN.....	112
10.1.1	CE-UV.....	112
10.1.2	CE-ED.....	112
10.1.3	HPLC UV/Chemilumineszenz.....	113
10.1.4	FOX-Test	114
10.1.5	Bestimmung der CMC von SDS.....	114
10.1.6	Darstellung der Photoprodukte	115
10.1.6.1	Säulenchromatographische Reinigung der Photoprodukte.....	115
10.1.6.2	Identifizierung der Ketoprofen-Photoprodukte durch GC-MS.....	115
10.1.6.3	Dünnschichtchromatographische Bestimmung der Ketoprofen-Photoprodukte	116
10.1.7	Herstellung von reinen HPODE-Lösungen.....	116
10.1.8	Bestrahlung der KP-Lösungen.....	117
10.1.9	Viskositätsmessungen.....	118
10.2	ZELLKULTUR HUMANER KERATINOZYTEN.....	118
10.2.1	Kultivierung	118
10.2.2	Beschreibung der Noxenexposition	119
10.2.3	Bestimmung der Vitalität (Lebendzellanzahl)	120
10.2.4	Bestimmung der DNA-Syntheseleistung (³ [H]-Thymidin-Einbau).....	120
10.2.5	Bestimmung des intrazellulären Peroxid-Gehaltes (DHR-Test).....	121
10.2.6	Statistische Auswertung der Versuchsergebnisse am in vitro-Modell humaner Keratinozyten.....	121
10.3	PENETRATIONSUNTERSUCHUNGEN AN HUMANER HAUT EX VIVO.....	121
10.3.1	Präparation des biologischen Materials.....	121
10.3.2	Durchführung der Penetrationsuntersuchungen an humaner Haut (ex vivo).....	122
10.3.3	Aufarbeitung der penetrierten Haut.....	122
10.4	PUFFER- UND REAGENZIENZUSAMMENSETZUNG.....	123
10.4.1	DC-Sprühreagenzien.....	124
10.5	CHEMIKALIEN.....	125
10.6	GERÄTE UND HILFSMITTEL (ZELLKULTUR).....	127
11	ANHANG	128
12	LITERATURVERZEICHNIS	I

Abkürzungsverzeichnis

AK	Akzeptor
c	Konzentration
CC ₅₀	halbmaximale zytotoxische Konzentration
CE	Kapillaronenelektrophorese
CL	Chemilumineszenz
CMC	Kritische Mizellbildungskonzentration
COX	Cyclooxygenase
d	Durchmesser
DR	Dermis
DHR	Dihydrorhodamin
EB	3-Benzoyl-phenylethan
ED	elektrochemische Detektion
EOF	elektroosmotischer Fluß
EP	Epidermis
EtOH	Ethanol
FID	Flammenionisationsdetektor
FOX	ferrous oxidation in xylenol orange
HaCaT	human adult low Calcium high temperatur keratinozytes
HET-CAM	Hen's Egg Test-Chorioallantonic Membrane
HPODE	Hydroperoxyoctadecadiensäure
k	photochemische Aktivität
KP	Ketoprofen
KP-Phot 1	Ketoprofen-Photoproduktlösung (nach 1 J/cm ² UVA)
KP-Phot 6	Ketoprofen-Photoproduktlösung (nach 6 J/cm ² UVA)
KP=O	3-Benzoylphenyl-ethanon
KP 1, KP 2...	Photoprodukte des Ketoprofens
KP-OH	3-Benzoylphenylethanol
KP-OOH	3-Benzoylphenylethylhydroperoxid
IC ₅₀	halbmaximale Hemmkonzentration
i-Prop	Isopropanol
LH	Lipid
Lin	Linolsäure
LOX	Lipoxygenase
3-MBP	3-Methylbenzophenon
MDA	Malondialdehyd
MEKC	mizellare Elektrophoretographie
8-MOP	8-Methoxypsoralen
NSAR	nichtsteroidale Antirheumatika
PB	Phosphatpuffer

PBS	phosphat buffer saline
PDT	Photodynamische Therapie
PEN	Penetration
PUVA	polyungesättigte Fettsäure
ROS	reactive oxygen species
S	Sensitizer
SC	Stratum corneum
SDS	Natriumdodecylsulfat
SEV	Sekundärelektronenvervielfacher
t_{PEN}	Penetrationszeit
UV	ultraviolett

1 Problem- und Zielstellung

Die enorme Zunahme an Hautkrebskrankungen wird vielfach auf eine erhöhte Belastung mit Sonnenlicht, insbesondere UV-Licht, zurückgeführt [1, 2]. Die schädigende Wirkung des UVA-Anteils des Sonnenlichts wird hierbei nicht auf eine direkte Wechselwirkung der Strahlungsenergie mit den Biomolekülen, sondern auf die Aktivierung von Sauerstoff unter der Bildung reaktiver Sauerstoffspezies (ROS), zu denen u.a. Singulett-Sauerstoff ($^1\text{O}_2$), Hydroxyl-Radikale (OH^\cdot) und Superoxidanionen-Radikale ($\text{O}_2^{\cdot-}$) gezählt werden, zurückgeführt [3, 4]. Diese kurzlebigen, hochreaktiven Sauerstoffabkömmlinge sind im Gegensatz zu der relativ energiearmen UVA-Strahlung in der Lage, Radikalkettenreaktionen zu induzieren, welche in vivo zu strukturellen Veränderungen lebenswichtiger Biomoleküle (Fettsäuren, Membranen [5], Proteine [6], DNA [7]) führen können [8].

Aufgrund der äußerst geringen Lichtabsorption von molekularem Sauerstoff ($^3\text{O}_2$) im sichtbaren und ultravioletten Bereich werden ROS, insbesondere $^1\text{O}_2$, durch direkte Sonnenlichtbestrahlung nur in verschwindendem Maße gebildet. Erst durch die Anwesenheit geeigneter Sensibilisatoren, zu denen unter anderem verschiedene Arzneistoffe zählen, können photodynamische Reaktionen, bei welchen neben ROS auch radikalische Intermediate des Sensitizers auftreten, bereits durch den energieärmeren längerwelligen UVA- (320 – 400 nm) bzw. sichtbaren (400 – 800 nm) Anteil des Sonnenlichtes induziert werden.

Auch wenn derartige photodynamische Reaktionen häufig als Ursache unerwünschter photoallergischer oder phototoxischer Hautreaktionen verschiedener topisch, aber auch systemisch angewandter Arzneistoffe, angesehen werden [9, 10], stellen sie in der Medizin die Grundlage für die photodynamische Therapie bzw. Photochemotherapie bei der Behandlung unterschiedlicher Haut- (z.B. Psoriasis [11], Keratosen [12]) und Krebskrankungen dar [13 - 17].

Eine große Gruppe der im UVA-Bereich photochemisch aktiven Arzneistoffe sind die nicht-steroidalen Antirheumatika (NSAR) vom Arylpropion- und Arylessigsäuretyp [18 - 23]. Ketoprofen, ein seit 1995 in Deutschland für die topische Therapie zugelassenes NSAR, enthält neben der Arylpropionsäuregruppe als weiteres photochemisch aktives Strukturelement ein Benzophenon-Grundgerüst. Diese strukturellen Eigenschaften lassen eine im Vergleich zu anderen topisch eingesetzten NSAR (Diclofenac und Ibuprofen) deutlich erhöhte photochemische Instabilität bzw. Reaktivität erwarten.

Im Hinblick auf ein möglicherweise unter dem Einfluß von Sonnenlicht verändertes Wirksamkeits- und Nebenwirkungsspektrum topisch applizierter Ketoprofen-haltiger Arzneiformen, sollen mit der vorliegenden Arbeit grundlegende Fragestellungen in bezug auf

- die photochemische Stabilität eines handelsüblichen 2,5 %-igen Ketoprofen-Gels,
- den photochemisch induzierten Ketoprofen-Abbau in wäßrigen bzw. entsprechend der Gelrezeptur in wäßrig/alkoholischen Lösungen,
- die Wirkstoffverfügbarkeit in humaner Haut (ex vivo) unter dem Einfluß geringer UVA-Dosen,
- die toxikologischen Eigenschaften von Ketoprofen und seiner Photoprodukte unter dem Einfluß von UVA-Licht,

- den photoinduzierten Abbau essentieller Membranbestandteile sowie ausgewählter in der Haut vorkommender UV-Absorber und Antioxidantien unter dem Einfluß von Ketoprofen,
- mögliche Ansätze, die eine Reduktion bzw. eine Verhinderung des photoinduzierten Ketoprofen-Abbaus und hieraus resultierender Folgereaktionen in vitro und in vivo ermöglichen sowie
- den medizinischen Einsatz von Ketoprofen als Photosensitizer bei der photodynamischen Therapie

untersucht und diskutiert werden.

Zur Durchführung dieser Untersuchungen war es notwendig, verschiedene sich ergänzende Analysemethoden zu entwickeln (CE-ED) oder der gestellten Problematik anzupassen bzw. zu optimieren (HPLC/UV/CL, CE-UV, FOX-Test), die eine Bestimmung der während der photochemischen Reaktion gebildeten Peroxide, Ketoprofen-Photoprodukte und Ketoprofen sowie der untersuchten Antioxidantien und UV-Absorber ermöglichen.

2 Theoretischer Teil

Die Strahlenschutzkommission beobachtet in den letzten Jahrzehnten eine dramatische Erhöhung der durch ultraviolette Strahlen verursachten akuten und chronischen Hautschäden, insbesondere die Zunahme von Hautkrebserkrankungen [24, 25].

Als UV-Strahlung bezeichnet man elektromagnetische Strahlung im Wellenlängenbereich von 200 bis 400 nm. Zur Charakterisierung der spektralen Abhängigkeit photobiologischer Wirkungen hat sich eine Einteilung des UV-Lichtes in die Bereiche UVA (320 – 400 nm), UVB (280 – 320 nm) und UVC (200 – 280 nm) durchgesetzt.

Die natürliche Quelle des auf der Erde auftretenden UV-Lichtes ist die Sonne, deren Spektralbereich von kurzwelliger γ -Strahlung ($\lambda < 10$ nm) bis hin zu Radiowellen ($\lambda > 500$ μ m) reicht. Aufgrund der Filterwirkung der Atmosphäre, insbesondere der in der Stratosphäre vorhandenen Ozonschicht, gelangt nur elektromagnetische Strahlung mit einer Wellenlänge oberhalb von 290 nm auf die Erdoberfläche [26].

Trifft UV-Strahlung (UVA und UVB) auf die Körperoberfläche, wird diese in Abhängigkeit von ihrem Energiegehalt unterschiedlich stark von der Haut und ihren photosensiblen Bestandteilen (DNA, Proteine, Melanin, Porphyrine) absorbiert, was zur Abschwächung der Strahlung und somit zu einer begrenzten Eindringtiefe in die Haut führt. Allgemein nimmt die Eindringtiefe des UV-Lichtes mit zunehmendem Energiegehalt ab, so daß das kurzwellige, energiereiche UVB-Licht bis in die Epidermis, das langwellige, energieärmere UVA-Licht hingegen bis in dermales und teilweise subcutanes Gewebe eindringt [27].

Während der schädigende Einfluß von UVB-Strahlung aufgrund der direkten Wechselwirkung mit zellulären Bestandteilen (z. B. Bildung von Pyrimidindimeren) seit längerem bekannt ist, rückte die auf anderen Mechanismen beruhende Wirkung von UVA-Strahlung erst vor wenigen Jahren in den Mittelpunkt des wissenschaftlichen Interesses [28, 29].

Im Gegensatz zu UVB-Licht wird UVA-Licht, das den Hauptanteil (ca. 95 %) der auf der Erdoberfläche auftreffenden solaren UV-Strahlung ausmacht, von den meisten Biomolekülen nur sehr schwach absorbiert. Allerdings ist es in Gegenwart verschiedener endogener Photosensibilisatoren (Porphyrine [30], Flavine [31, 32]) in der Lage, die Bildung reaktiver Sauerstoffspezies zu induzieren. Die durch eine hohe Reaktivität gekennzeichneten, meist sehr kurzlebigen Sauerstoffabkömmlinge sind für ein breites Spektrum oxidativer Schäden zahlreicher Biomoleküle (DNA, Proteine, Kohlenhydrate, Lipide) verantwortlich [33, 34], woraus sich neben strukturellen (z.B. oxidative DNA-Basenmodifikation [35] Lipidperoxidation [36]) auch funktionelle (Inaktivierung von Enzymen bzw. Proteinen [37]) Änderungen der zellulären Bestandteile ergeben können. Während die Eindringtiefe des UVB-Lichtes in die Haut stark begrenzt ist, muß bei UVA-Strahlung mit derartigen Schäden auch in tieferen Hautschichten gerechnet werden.

Zahlreiche Umweltfaktoren, z.B. Ingredienzen von Kosmetika [38], Pflanzeninhaltsstoffe [39], Chemieschadstoffe, aber auch Arzneistoffe [40 - 43], können als exogene Photosensibilisatoren wirksam werden und führen zu einer gesteigerten Lichtempfindlichkeit der Haut, wodurch bereits bei einer physiologischen Lichtexposition pathologische Hautreaktionen auftreten können, deren klinisches Bild weitgehend der einer akuten Lichtschädigung (Erythem- und Blasenbildung)

entspricht. In Analogie zu den bereits erwähnten endogenen Photosensibilisatoren nimmt auch bei diesen photosensibilisierten Hautreaktionen die Bildung reaktiver Sauerstoffspezies (ROS) eine zentrale Rolle ein.

2.1 Reaktive Sauerstoffspezies

Der Begriff reaktive Sauerstoffspezies (ROS) ist ein häufig in der Biologie und Medizin benutzter Sammelbegriff und umfaßt verschiedene radikalische ($O_2^{\cdot-}$ [Superoxidanionenradikal], OH^{\cdot} [Hydroxylradikal], RO^{\cdot} [Alkoxyradikal], RO_2^{\cdot} [Peroxyradikal]) und nicht-radikalische Sauerstoffabkömmlinge (H_2O_2 [Wasserstoffperoxid], O_3 [Ozon], 1O_2 [Singulett-Sauerstoff], $HOCl$ (hypochlorige Säure) und $ONOO^-$ [Peroxynitrit]) [35].

Neben der endogenen Bildung durch physiologische und pathophysiologische Stoffwechselprozesse (z.B. mitochondriale oxidative Phosphorylierung [44] Phagozytose [45]) können ROS in exzessiven Mengen auch unter dem Einfluß von Sonnenlicht durch eine Photosensibilisator-vermittelte Aktivierung atmosphärischen Sauerstoffs auf bzw. in der Haut gebildet werden, auf die im folgenden näher eingegangen werden soll.

2.1.1 Prinzipien der Sauerstoffaktivierung

Molekularer Sauerstoff ist unter Normalbedingungen ein reaktionsträges Gas, das Moleküle der lebenden und nichtlebenden Umwelt nur sehr langsam oxidieren kann. Wie die Elektronenverteilung

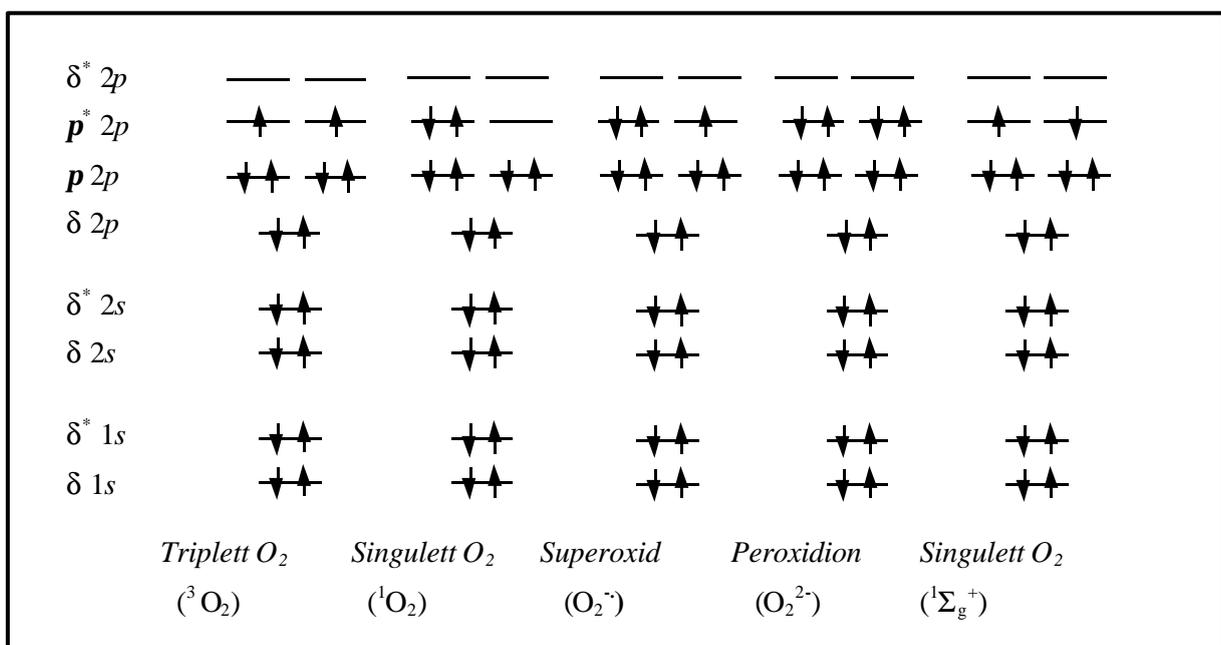


Abb. 1 Bindungszustände im Sauerstoffmolekül [46]

des Sauerstoffmoleküls zeigt (Abb. 1), ist das höchste besetzte Molekülorbital entsprechend der Hundschen Regel mit zwei einzelnen Elektronen gleichen Spins besetzt, so daß Sauerstoff im Grundzustand ein Biradikal darstellt und als Triplett-Sauerstoff (${}^3\text{O}_2$ oder ${}^3\Sigma_g^-$) bezeichnet wird.

Um Triplett-Sauerstoff in den angeregten, reaktiven Zustand überführen zu können, muß ein Wechsel der Elektronenkonfiguration in der 2p-Schale stattfinden. Dies kann chemisch bzw. enzymatisch durch die Aufnahme eines oder mehrerer zusätzlicher Elektronen in das antibindende π^* -Molekülorbital (Bildung von O_2^- , O_2^{2-}) oder physikalisch durch Energieübertragung in Form von Photonen (Bildung von ${}^1\text{O}_2$) erfolgen.

2.1.2 Bildung und Reaktivität des Superoxid-Anions

Das Superoxid-Anionenradikal (O_2^-) ist ein Vertreter der radikalischen Sauerstoffspezies und wird durch die Aufnahme eines zusätzlichen Elektrons in das antibindende $2\pi^*$ -Molekülorbital des Triplett-Sauerstoffs gebildet. Diese Ein-Elektronen-Reduktion kann bei enzymatischen (Xanthinoxidase-System), chemischen (Verbrennen von Kalium), aber auch bei verschiedenen photosensibilisierten Reaktionen (photochemischer Zerfall von Arzneistoffen) beobachtet werden.

In Abhängigkeit vom pH-Wert können Superoxid-Anionenradikale sowohl Oxidations- als auch Reduktionsmittel sein. O_2^- hat einen pKa-Wert von 4,7 [47], so daß es bei einem physiologischen pH-Wert von 7,4 hauptsächlich als $\text{O}_2^{\cdot-}$ vorliegt. In dieser Form stellt es ein Reduktionsmittel bzw. einen Elektronen-Donator dar und ist beispielsweise in der Lage, dreiwertiges Eisen in die zweiwertige Form (s. Abb. 2) zu überführen. Ein weiteres Beispiel für die reduzierenden Eigenschaften von $\text{O}_2^{\cdot-}$ -Radikalen ist die als Haber-Weiss-Reaktion [48] bezeichnete Reduktion von H_2O_2 durch $\text{O}_2^{\cdot-}$ -Radikale. Bei dieser Reaktion werden neben Hydroxyl-Ionen auch hochreaktive Hydroxyl-Radikale freigesetzt. Da die Geschwindigkeitskonstante der spontanen Dismutationsreaktion der $\text{O}_2^{\cdot-}$ -Radikale bei einem physiologischen pH-Wert von 7,4 ca. zehnfach höher ist als die der direkten Reaktion von $\text{O}_2^{\cdot-}$ und H_2O_2 , läuft die Haber-Weiss-Reaktion unter physiologischen Bedingungen praktisch jedoch nicht ab [46].

Im sauren Milieu, z.B. in unmittelbarer Nähe von Phospholipid-Membranen, wird das $\text{O}_2^{\cdot-}$ -Radikal in seine protonierte Form, das Hydroperoxyradikal (HO_2^{\cdot}), überführt [49]. Da das Oxidationspotential des Hydroperoxyradikals um mehr als 1 V höher als das des Superoxid-Anions ist, kann es unter diesen Bedingungen H-Atome verschiedener Moleküle (PUFA, Ascorbinsäure, Tocopherol) abstrahieren und deren Oxidation initiieren [47]. Insgesamt wird dem $\text{O}_2^{\cdot-}$ -Radikal jedoch nur eine geringe Reaktivität zugeschrieben, die eine direkte Interaktion mit DNA, Lipiden oder Aminosäuren nur in einem minimalen Umfang zuläßt. Dennoch nimmt das $\text{O}_2^{\cdot-}$ -Radikal als Vorstufe für verschiedene ROS bzw. als Reaktionspartner verschiedener ROS-bildender Reaktionen eine zentrale Rolle bei der Entstehung von ROS ein.

2.1.3 Bildung und Reaktivität von Wasserstoffperoxid

Wasserstoffperoxid (H_2O_2), ein Vertreter der nichtradikalischen Sauerstoffspezies, kann allgemein als Dismutationsprodukt von Superoxid-Anionradikalen bzw. als erstes stabiles Produkt der monovalenten und divalenten Sauerstoffreduktion angesehen werden.

Unter physiologischen Bedingungen wird es vorrangig in den Peroxisomen als Endprodukt verschiedener Enzymreaktionen gebildet [50]. Es stellt ein starkes Zellgift dar, dessen Toxizität hauptsächlich auf die durch physiologische Reduktionsmittel (Fe^{2+} , Cu^+) katalysierte Fenton-Reaktion (s. Abb. 2 [51]) und die damit verbundene Bildung von hochreaktiven Hydroxyl-Radikalen (OH^\cdot) zurückzuführen ist. Bezüglich seiner oxidierenden bzw. reduzierenden Eigenschaften besitzt es jedoch nur eine geringe Aktivität, so daß nur ein kleiner Teil der H_2O_2 -vermittelten Schäden auf einer direkten Reaktion beruht. In Abwesenheit von Übergangsmetallen und H_2O_2 -abbauenden Enzymen (Katalase, Glutathionperoxidase) ist es relativ stabil und kann so in der Zelle längere Strecken durch Diffusion zurücklegen. Aufgrund seiner guten Membrangängigkeit [52] ist es weiterhin in der Lage, aus dem extrazellulären Raum (z.B. Hautoberfläche) in die Zelle einzudringen.

2.1.4 Bildung und Reaktivität von Hydroxyl-Radikalen

Die Bildung von Hydroxyl-Radikalen (OH^\cdot) durch eine metallkatalysierte monovalente H_2O_2 -Reduktion, in der Literatur meist als Fenton-Reaktion (s. Abb. 2) bezeichnet, stellt eine der Schlüsselreaktionen der Sauerstofftoxizität dar.

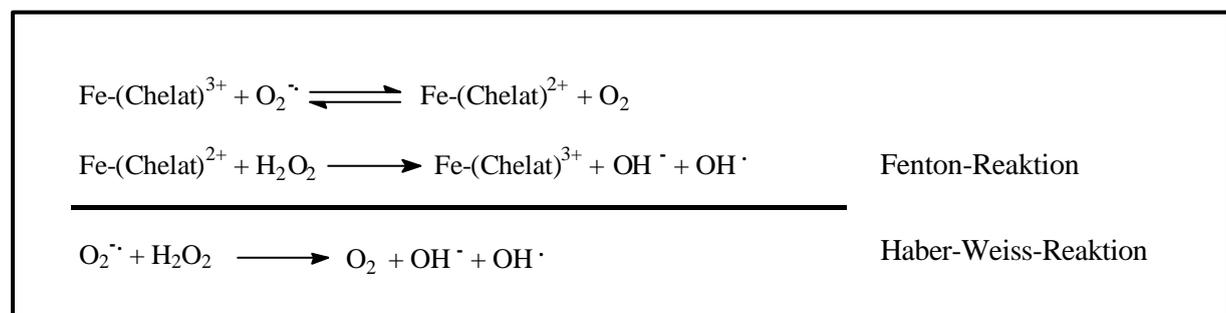


Abb. 2 Die Haber-Weiss-Reaktion als Summe der $\text{O}_2^{\cdot -}$ -vermittelten Fe^{3+} -Reduktion und der Fenton-Reaktion; Bildung von Hydroxyl-Radikalen im Ergebnis der Fenton- bzw. Haber-Weiss-Reaktion

Durch ihr hohes Redoxpotential von ungefähr +2 V reagieren Hydroxyl-Radikale im biologischen System unspezifisch mit fast jeder Art von Molekülen bzw. Molekülstrukturen [53]. Die meist nur diffusionslimitierten Reaktionen von Hydroxyl-Radikalen mit Biomolekülen besitzen eine Reaktionskonstante von 10^8 bis $10^{10} \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$. Da die Halbwertszeit von Hydroxyl-Radikalen nur 10^{-10} Sekunden beträgt [54], liegt der Ort ihrer Reaktion sehr nah an dem ihrer Erzeugung. In der Literatur bezeichnet man Reaktionen, an denen Hydroxyl-Radikale beteiligt sind, deshalb auch als

„Chemie der reaktiven Stelle“ („site-specific“ reactivity [55]). Aufgrund ihrer hohen Reaktivität sind Hydroxyl-Radikale in der Lage, direkt mit DNA- und Membranmolekülen zu reagieren. Typische DNA-Schäden, die sich auf eine Reaktionsbeteiligung von Hydroxyl-Radikalen zurückführen lassen, sind Einzel- und Doppelstrangbrüche, Modifikationen der DNA-Basen, DNA-Protein-Quervernetzungen sowie Fragmentierungen des Zucker-Phosphat-Gerüsts [56]. Beispiele für biologische und pathobiologische Prozesse, bei denen eine Beteiligung von Hydroxyl-Radikalen vermutet wird, sind unter anderem Entzündungen, Alterungsprozesse, Alzheimer, Reperfusionsschäden und Krebserkrankungen [57 - 60].

2.1.5 Bildung und Reaktivität von Singulett-Sauerstoff

Singulett-Sauerstoff ($^1\text{O}_2$) stellt die physikalisch angeregte Form des Sauerstoffmoleküls dar. Generell existiert der Singulett-Sauerstoff in zwei energetisch unterschiedlichen Formen der im Vergleich zum Triplett-Sauerstoff um 92 kJ/mol energiereicheren $^1D_g \text{O}_2$ - und der um 155 kJ/mol energiereicheren $^1\Sigma_g^+$ - Form. Beide Singulett-Sauerstoff-Typen unterscheiden sich in ihrer Elektronenkonfiguration dadurch, daß im energieärmeren Zustand ein π^* -Molekülorbital von zwei entgegengesetzt gerichteten π^* -Elektronen als Paar, im energiereicheren $^1\Sigma_g^+$ - Zustand jedoch beide π^* -Molekülorbitale mit je einem π^* -Elektron besetzt werden [s. Abb. 1]. Da der energiereichere Singulett-Sauerstoff ($^1\Sigma_g^+$) sehr kurzlebig ($< 10^{-9}$ s) ist und sich unter Freisetzung von Energie hauptsächlich in den langlebigen (ca. 10^{-4} s) und infolgedessen chemisch wirksameren energieärmeren Singulett-Sauerstoff ($^1D_g \text{O}_2$) umwandelt, wird letzterem unter biologischem Aspekt die größere Bedeutung zugeschrieben [61].

Aufgrund der äußerst geringen Lichtabsorption von Triplett-Sauerstoff im UV/VIS-Bereich entsteht Singulett-Sauerstoff durch direkte Bestrahlung mit Sonnenlicht nur in vernachlässigbaren Mengen [62]. Erst unter Beteiligung eines geeigneten Sensibilisators, wie z.B. Methylenblau [63], Rose-Bengale [64] aber auch verschiedener Arzneistoffe (z.B. Antibiotika [65], Antidepressiva [66], Antidiabetika [67]), kann Sauerstoff bereits unter dem Einfluß von Tageslicht in den angeregten Singulettzustand überführt werden. Hierbei dient der Sensibilisator S als Transfermolekül zur Energieübertragung, das durch die Aufnahme von Photonen des Sonnenlichts in den angeregten, äußerst kurzlebigen Singulettzustand $^1S^*$ überführt wird (s. Abb. 3). Eine Möglichkeit der Deaktivierung dieses Singulett-Moleküls ist die rasche Umwandlung in ein angeregtes Triplett-Molekül $^3S^*$. Dieser Prozeß erfolgt durch den Übergang des angeregten Elektrons auf ein niedrigeres Energie-Niveau unter Spinumkehr und wird als intersystem-crossing (isc) bezeichnet. Unter Erhaltung der Spinsymmetrie wird Triplett-Sauerstoff durch einen direkten Elektronenaustausch zwischen dem angeregten Triplett-Molekül des Sensibilisators $^3S^*$ und $^3\text{O}_2$ in die physikalisch angeregte Form ($^1\text{O}_2$) überführt, wobei der Sensibilisator in seinen Singulett-Ausgangszustand zurückkehrt.

Singulett-Sauerstoff stellt ein sehr wirkungsvolles Oxidationsmittel dar, das im Gegensatz zu Triplett-Sauerstoff in der Lage ist, sich direkt an Doppelbindungssysteme zu addieren [68], was unter physiologischen Bedingungen zu oxidativen Veränderungen essentieller Biomoleküle (Membranen, DNA, Proteine) führt.

2.2 Photodynamische Reaktionsmechanismen

Nach dem zugrundeliegenden Reaktionsmechanismus lassen sich alle photodynamischen Oxidationsreaktionen in zwei Kategorien einordnen, die als Typ-I- bzw. Typ-II-Mechanismus bezeichnet werden. Ein Typ-I-Mechanismus, der die Wechselwirkung des angeregten Sensibilisators im Triplettzustand mit dem zu oxidierenden Substrat beinhaltet, ist dabei durch einen Elektronen- bzw. Protonenübergang gekennzeichnet, wogegen ein Typ-II-Mechanismus im wesentlichen auf einem Energietransfer zwischen dem Sensibilisatormolekül im angeregten Triplettzustand und Sauerstoff im Grundzustand ($^3\text{O}_2$) beruht (s. Abb. 3) [69, 70].

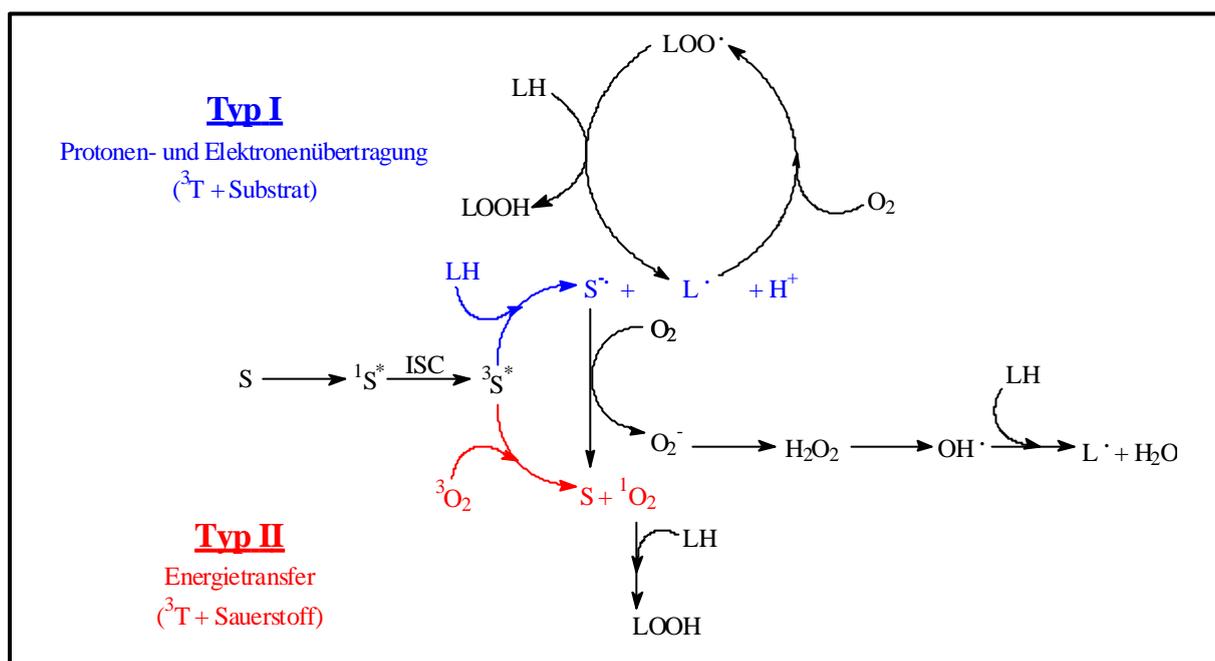


Abb. 3 Typ-I- und Typ-II Mechanismus einer photodynamischen Fettsäure-Peroxydation nach *Girotti* [71]

Unabhängig vom Reaktionsmechanismus beginnt jede photodynamische Oxidationsreaktion mit einer Aktivierung des Photosensibilisators. Dabei wird der Sensibilisator aus seinem Grundzustand ^0S durch die Aufnahme von Lichtenergie in Form von Photonen in den angeregten, äußerst kurzlebigen Singulett-Zustand $^1\text{S}^*$ überführt. Die Rückkehr in seinen Grundzustand ist auf verschiedene Weise möglich und erfolgt meist durch die Umwandlung der Elektronenenergie in Wärmeenergie (internal conversion) oder die Emission von Licht (Fluoreszenz). Der angeregte Singulettzustand des Sensibilisators kann jedoch auch durch strahlungslose Spinumkehr (intersystem crossing) in den etwas energieärmeren Triplettzustand ($^3\text{S}^*$) übergehen [72].

In Abhängigkeit von den Reaktionsbedingungen und den Eigenschaften des relativ langlebigen Triplettzustands des Photosensibilisators $^3\text{S}^*$ erfolgt der weitere Reaktionsverlauf nach einem Typ-I- bzw. Typ-II-Mechanismus.

Bei einem Typ-I-Mechanismus, abstrahiert das angeregte Sensibilisator-Molekül $^3\text{S}^*$ ein H-Atom oder ein Elektron von einem Substratmolekül. Im Falle einer polyungesättigten Fettsäure (PUFA), wie z.B.

Linolsäure, wird bei dieser Reaktion ein trans-allylständiges Wasserstoffatom unter der Bildung eines Fettsäurealkylradikals ($L\cdot$) abstrahiert (Initiation der Fettsäureperoxidation), wobei der Sensibilisator nach einem Deprotonierungsschritt als Anionenradikal ($S\cdot^-$) vorliegt. In einem Folgeschritt lagert sich an das aus dieser Reaktion hervorgehende Lipidalkylradikal ($L\cdot$) molekularer Sauerstoff (3O_2) unter der Bildung eines Peroxylradikals ($LOO\cdot$) an, das sich seinerseits durch eine weitere H-Abstraktion von einem anderen Fettsäure-Molekül zum Lipidhydroperoxid (LOOH) stabilisiert und so die Propagation der Fettsäureperoxidation einleitet [73].

Eine Regenerierung des Sensibilisator-Moleküls kann auch durch die direkte Übertragung eines Elektrons des Sensibilisator-Anionenradikals ($S\cdot^-$) auf molekularen Sauerstoff erfolgen. Die aus dieser Reaktion hervorgehenden Superoxidanionenradikale ($O_2\cdot^-$) können, wie bereits unter Kap. 2.1.3 beschrieben, zu H_2O_2 dismutieren bzw. über verschiedene Folgereaktionen (Haber-Weiss-Reaktion, Fenton-Reaktion) die Bildung der hochreaktiven OH-Radikale induzieren (vgl. Kap. 2.1.4).

Im Gegensatz zum Typ-I-Mechanismus überträgt der angeregte Sensibilisator $^3S^*$ in einer Typ-II-Photooxidation seine Energie direkt auf 3O_2 . Bei dieser Reaktion wird 3O_2 in seine physikalisch angeregte Form, den Singulett-Zustand 1O_2 , überführt (vgl. Kap. 2.1.5), wobei der Sensibilisator selbst in seinen Singulett-Ausgangszustand 0S zurückkehrt. Der aus dieser Reaktion hervorgehende Singulett-Sauerstoff ist seinerseits in der Lage, direkt mit ungesättigten Fettsäuren über eine Additionsreaktion zu reagieren, wobei ebenfalls Fettsäureperoxide gebildet werden.

Zur Aufklärung des Mechanismus photodynamischer Oxidationsreaktion werden in der Literatur mehrere Methoden beschrieben [49, 74 - 78] die auf dem Nachweis unterschiedlicher, in Abhängigkeit vom jeweiligen Mechanismus gebildeter Oxidationsprodukte beruhen.

2.3 Ketoprofen

Ketoprofen (2-[3-Benzoylphenyl]-propionsäure), ein nichtsteroidales Antirheumatikum (NSAR) vom Arylpropionsäuretyp, wurde 1967 von Farge, Messer und Montonnier synthetisiert. Seit 1973 wird es erfolgreich bei der systemischen Behandlung verschiedener degenerativer und entzündlicher rheumatischer Erkrankungen der Gelenke, der Wirbelsäule und der Weichteile eingesetzt. Zahlreiche Studien belegen, daß Ketoprofen eine mit anderen NSAR (Paracetamol [79], Acetylsalicylsäure [80, 81], Ibuprofen [82 - 84], Naproxen [84 - 86]) vergleichbare antipyretische, antiphlogistische und hinsichtlich seiner analgetischen Eigenschaften meist eine überlegene Wirksamkeit zeigt.

Der molekulare Wirkmechanismus des Ketoprofens ist vielfältig, wird jedoch hauptsächlich auf eine reversible Hemmung der Cyclooxygenase (COX) und die damit verbundene Hemmung der Prostaglandinsynthese [87] zurückgeführt. Als Arylpropionsäurederivat besitzt Ketoprofen ein Chiralitätszentrum und kann damit als R- und S-Form vorliegen. Untersuchungen zur analgetischen und antiphlogistischen Wirksamkeit der einzelnen Enantiomere ergaben, daß letztere ausschließlich auf die Hemmung der Prostaglandinsynthese durch das S-Enantiomer, erstere jedoch hauptsächlich auf die Präsenz des R-Enantiomers zurückzuführen ist [88].

Ketoprofen hat für die Belange der meisten Schmerzpatienten eine ideale Pharmakokinetik, die durch eine rasche und nahezu vollständige Resorption (die maximale Plasmakonzentration wird bereits 1 - 2 Stunden nach der Applikation erreicht), eine hohe Bioverfügbarkeit (mindestens 95% der oral applizierten Dosis), eine Plasmahalbwertszeit von ca. 1,5 h (eine exakte Anpassung der Therapie an ein individuelles Tages-Schmerzprofil ist möglich), eine hohe Affinität zum entzündeten Gewebe sowie eine ausgeprägte analgetische Wirkung mit schnellem Wirkeintritt und einer Wirkdauer von mindestens 8 h gekennzeichnet ist.

Dennoch besitzt Ketoprofen nach oraler, intramuskulärer bzw. rektaler Applikation wie die meisten Vertreter dieser Substanzklasse Nebenwirkungen (Ulzerationen, Ulkusblutungen, Nierenfunktionsstörungen), die auf die systemische Hemmung der COX zurückzuführen sind und auch durch eine optimale galenische Formulierung nur gering oder gar nicht reduziert werden können. Eine effektive Reduktion der genannten Nebenwirkungen ist somit nur durch eine Erniedrigung der systemischen Wirkstoffkonzentration möglich. Zahlreiche Studien belegen, daß bei der topischen Applikation eines 2,5 %-igen Ketoprofen-Gels die Plasma-Konzentration nur 1/150-tel der Plasmakonzentration nach oraler Anwendung beträgt [89], und so Nebenwirkungen, die auf der systemischen COX-Hemmung basieren, auf ein Minimum reduziert bzw. ausgeschlossen werden können [90]. Aufgrund seiner hohen Affinität zum entzündeten Gewebe und der günstigen Resorptions- und Penetrationseigenschaften in humaner Haut [91, 92] reichert sich Ketoprofen etwa 100-fach stärker im entzündeten Gewebe als im Plasma an [93]. Zahlreiche Plazebo-kontrollierte [94, 95] sowie vergleichende klinische Studien, u.a. mit Ibuprofen- [96], Diclofenac- [97], Piroxicam- [97] bzw. Etofenamat-Gel [98], belegen eine vergleichbare und teilweise überlegene Wirksamkeit des Gels. Hinsichtlich seines Nebenwirkungsspektrums erwies sich das 2,5 %-ige Ketoprofen-Gel sowohl in klinischen Studien als auch in einer bundesweit durchgeführten Anwendungsbeobachtung [99] als sehr gut verträglich. Dennoch belegen zahlreiche Publikationen [100 - 110], daß Ketoprofen - wie auch andere Arylpropionsäure- und Benzophenonderivate [111 - 114] - unter dem Einfluß von Sonnenlicht zu einem gehäuften Auftreten phototoxischer und teilweise photoallergischer Hautreaktionen führt, die auf seine photosensibilisierenden bzw. photochemischen Eigenschaften zurückzuführen sind.

2.3.1 Photochemische Eigenschaften von Ketoprofen

Ketoprofen enthält abweichend von anderen Strukturabkömmlingen der Arylpropionsäure wie z.B. Ibuprofen, als weiteres Strukturelement ein Benzophenongrundgerüst. Da seine chromophoren Eigenschaften im wesentlichen durch dieses bestimmt werden, ist sein Absorptionsspektrum, ähnlich wie das des Benzophenons, durch ein Absorptionsmaximum bei 260 nm und durch einen schwach ausgeprägten, für seine Wirkung als UVA- und UVB-Sensibilisator jedoch entscheidenden Absorptionsbereich von 290 bis 360 nm charakterisiert (s. Abb. 4).

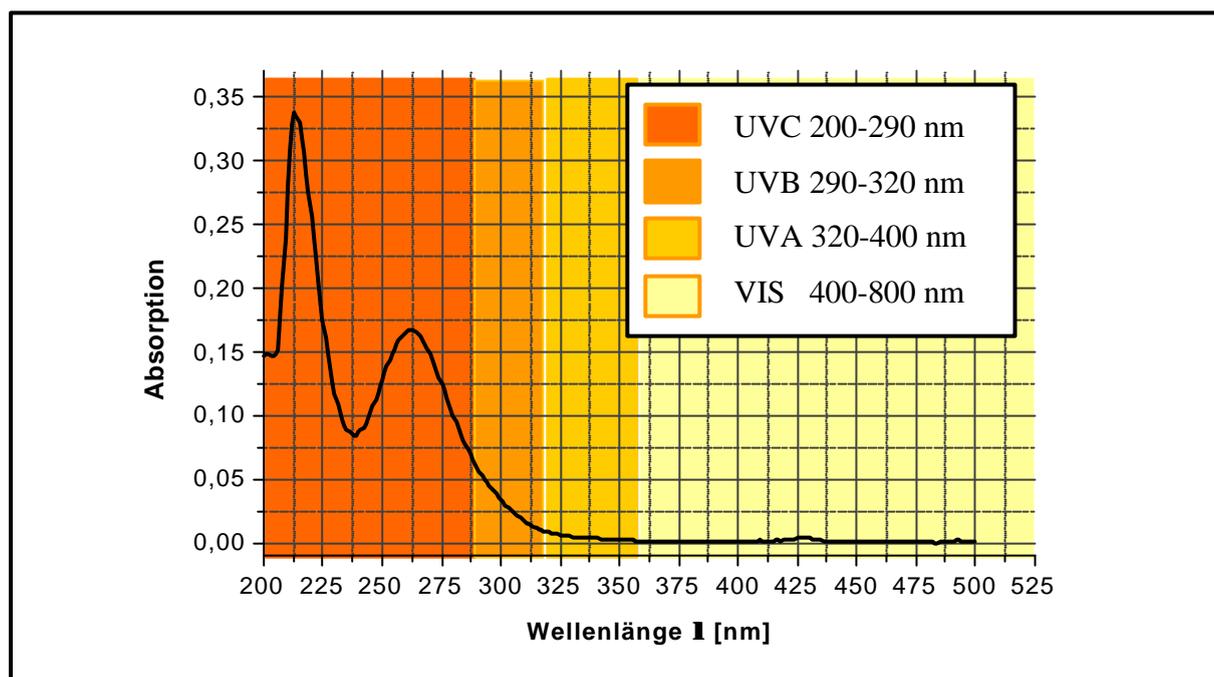


Abb. 4 UV-VIS Absorptions-Spektrum von Ketoprofen

Aufgrund seiner geringen Absorption im UVA- und UVB-Bereich und des ebenfalls relativ geringen UV-Anteils des Sonnenlichtes auf der Erdoberfläche (UVA 3,9 % und UVB 0,4 %) liegt die Vermutung nahe, daß Ketoprofen unter dem Einfluß von Sonnenlicht photochemisch stabil ist. Praktisch weist Ketoprofen jedoch deutliche Instabilitäten auf, die zum einen auf die mit einer Quantenausbeute von 75 Prozent [115] sehr effektiv ablaufende photochemische Zersetzung des Arzneistoffs und zum anderen auf die geringe Aktivierungsenergie [116, 117], die zur Überführung von Ketoprofen in den Triplettzustand notwendig ist, zurückgeführt werden können.

Aus zahlreichen Untersuchungen zur Photochemie wäßriger Ketoprofen-Lösungen geht hervor, daß der stark von den Reaktionsbedingungen (pH-Wert, Eigenschaften des Mediums) abhängige UV-induzierte Ketoprofen-Zerfall über verschiedene radikalische Zwischenstufen (vgl. Abb. 50, Kap. 6), die mit Hilfe von Laser-Flash-Photolyse-Untersuchungen detektiert wurden, zur Bildung von insgesamt neun Photoprodukten führt (s. Abb. 5).

Hierbei wird das dissoziierte Ketoprofen (I) [vgl. Abb. 50, Kap.6] (pK_a Ketoprofen $\approx 4,6$ [118]) durch die Absorption von Photonen in den angeregten Triplettzustand $^3KP^*$ überführt, aus welchem sich durch

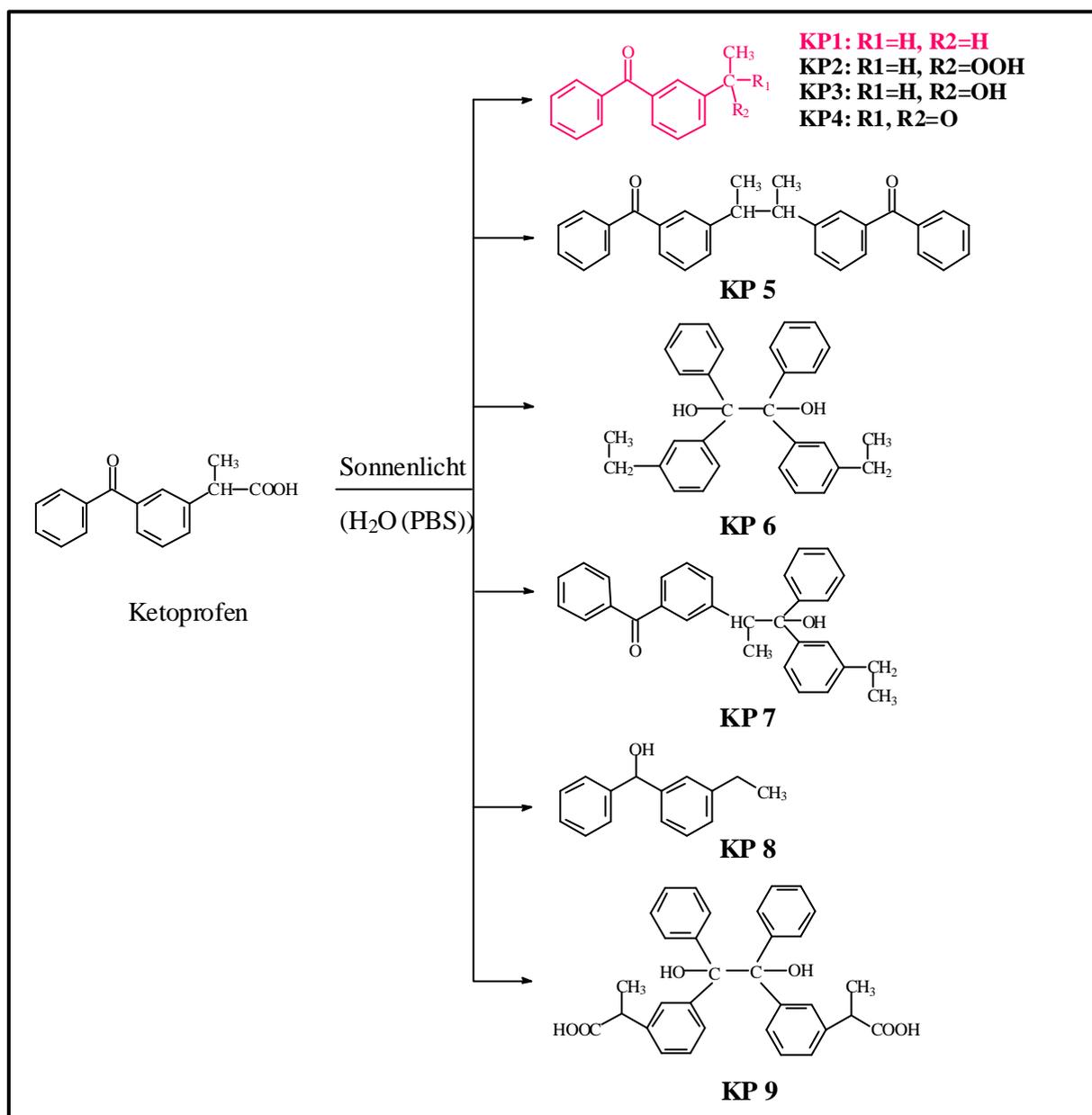


Abb. 5 Photochemischer Abbau von Ketoprofen [123]

einen intramolekularen Elektronentransfer das Ketoprofen-Biradikalanion (II) mit einem Absorptionsmaximum von $\lambda_{\max} = 570$ nm bildet. Die sich anschließende schnelle Decarboxylierung erfolgt mit einer Zeitkonstanten von 120 ns unter der Bildung des Ketylbiradikals (III) ($pK_a \approx 7,6$), das bei einem physiologischen pH-Wert von 7,4 im Gleichgewicht mit seiner protonierten Form (IV) steht [119, 120]. Aufgrund seiner Lebensdauer von 4 μ s ist dieses in der Lage, mit Sauerstoff unter der Bildung von $O_2^{\cdot -}$ zu reagieren, deren spontane Dismutationsreaktion zur Freisetzung von H_2O_2 führt, dessen Existenz in UV-exponierten Ketoprofen-Lösungen im Rahmen der vorliegenden Arbeit erstmals definitiv nachgewiesen werden konnte [121, 122].

Aus IV bildet sich durch eine intramolekulare Protonenverschiebung 3-Ethylbenzophenon (V bzw. KP1) oder durch eine Elektronenübertragung auf 3O_2 der Transient VI, dessen Reaktion mit Sauerstoff oder $O_2^{\cdot -}$ die Bildung der Sauerstoff-haltigen Photoprodukte KP2, KP3 und KP4 erklärt [123, 124]. Alternativ dazu kann der Transient VI unter der Bildung von KP5 dimerisieren. Im

Gegensatz hierzu wird die Bildung der Photoprodukte KP6, KP7 und KP8 auf verschiedene Reaktionen eines korrespondierenden Ketylradikals, das bei weiterer Bestrahlung aus KP1 hervorgeht, mit sich selbst (KP6), mit dem Transient VI (KP7) bzw. mit einem Proton (KP8) zurückgeführt. Die Entstehung von KP9 konnte hingegen nur in rein methanolischen Lösungen nachgewiesen werden und basiert auf einer reinen Benzophenon-Photochemie der undissoziierten Säure. In alkalisch-methanolischen Untersuchungslösungen, in denen Ketoprofen vollständig dissoziiert vorliegt, reagiert es hingegen hauptsächlich zu KP6.

Neben dem gewählten Lösungsmittel (vgl. Tab. 1) wird die Verteilung der Ketoprofen-Photoprodukte in starkem Maße von der initialen Ketoprofen-Dosis und der Bestrahlungszeit bestimmt, so daß bei Initialkonzentrationen über 10^{-4} mol/l neben den bereits genannten Photoprodukten KP1 bis KP4 die dimeren Photoprodukte KP5, KP6 und KP7 gebildet werden [123].

Lösungsmittel	Durch HPLC separierte Ketoprofen-Photoprodukte in %								
	KP1	KP2	KP3	KP4	KP5	KP6	KP7	KP8	KP9
PBS	29	0	3,1	2,6	3,2	4,3	6,3	<1	8,3
MeOH	<1	-	-	-	-	<1	-	-	86
MeOH/NaOH	4	-	-	<1	-	83	-	-	-

Tab. 1 Ketoprofen-Photoprodukt-Verteilung in Abhängigkeit vom Lösungsmittel [123]

Im Hinblick auf die Bildung reaktiver Sauerstoffspezies konnte von De la Peña und Mitarbeitern [125] festgestellt werden, daß Ketoprofen zu den photochemisch aktiven Substanzen zählt, die in wäßrigen Lösungen über einen Typ-I-Mechanismus reagieren. Im Gegensatz hierzu wurde in Acetonitril, einem aprotischen Lösungsmittel, die Bildung von Singulett-Sauerstoff (Typ-II-Mechanismus) mit einer Quantenausbeute von 0,39 nachgewiesen [125]. Diese Beobachtung kann damit erklärt werden, daß der Triplettzustand des Ketoprofen-Anions im wäßrigen Medium mit ca. 250 ps zu kurzlebig ist, um mit Triplett-Sauerstoff in Reaktion treten zu können [119]. Die Photochemie des Ketoprofens in Acetonitril beruht hingegen auf einer Benzophenon-Photochemie [126], so daß die Bildung von Singulett-Sauerstoff möglich ist. Die aufgeführten Beispiele zeigen, daß der photoinduzierte Ketoprofen-Zerfall, insbesondere der zugrundeliegende photodynamische Reaktionsmechanismus und die Verteilung der Ketoprofen-Photoprodukte, in starkem Maße von den jeweiligen Reaktionsbedingungen (UV-Dosis, eingesetzte Lösungsmittel, pH-Wert, Ketoprofen-Konzentration) abhängt.

Zahlreiche Untersuchungen zum photochemischen Verhalten von Ketoprofen gegenüber verschiedenen Biomolekülen belegen übereinstimmend, daß Ketoprofen unter dem Einfluß von UV-Licht die Peroxidation ungesättigter Fettsäuren [127, 128], Zellmembranlyse (Hämolyse roter Blutkörperchen [127, 129 - 131]), Photoadditionen an Proteinstrukturen [132 - 134] sowie DNA-Schäden (Single-Strang-Brüche, Bildung von Pyrimidin-Dimeren [127, 135 - 137]) induziert. Daneben konnte die Phototoxizität von Ketoprofen auch an verschiedenen Zellkulturen (Hepatocyten, Fibroblasten) nachgewiesen werden [127].

Da unter dem Einfluß verschiedener Radikalfänger (Butylhydroxyanisol, Glutathion), $O_2^{\cdot-}$ -Fänger (Superoxiddismutase) und OH^{\cdot} -Fänger (Mannitol) ein deutlicher Rückgang der lichtinduzierten

Schäden beobachtet wurde [127, 129], vermutet man, daß der photoinduzierte Ketoprofen-Abbau auch im biologischen System hauptsächlich durch einen Typ-I-Mechanismus bestimmt wird. Kürzlich publizierte Ergebnisse von Lhiaubet et. al. [138] geben allerdings Hinweise darauf, daß der photoinduzierte Ketoprofen-Zerfall in einer hydrophoben Mikroumgebung, die z.B. bei der Bindung von Ketoprofen an DNA existiert, auch nach einer Typ-II-Reaktion erfolgt und somit die Freisetzung von Singulett-Sauerstoff möglich ist.

3 Analytische Methodenentwicklung

3.1 Kapillarelektrophorese

3.1.1 Allgemeines

Grundlage aller elektrophoretischen Trennmethode ist die bereits vor ca. 120 Jahren von Kohlrausch beschriebene physikalische Gesetzmäßigkeit, daß geladene Teilchen einer Lösung in Abhängigkeit von der Art und Anzahl ihrer Ladung und ihrer räumlichen Größe im elektrischen Feld mit verschiedenen Geschwindigkeiten wandern [139].

Ein bedeutender Fortschritt in der Leistungsfähigkeit elektrophoretischer Trennmethode konnte in den 80-iger Jahren durch die Einführung dünner transparenter Quarzkapillaren mit Innendurchmessern von 25 – 100 µm erreicht werden. Diese ermöglichten neben deutlich verbesserten Detektionsmöglichkeiten (online-Detektion) die Verwendung sehr hoher Feldstärken, woraus kurze Analysenzeiten und hohe Trennleistungen resultierten.

Der prinzipielle Aufbau heute kommerziell verfügbarer Kapillarelektrophoreseapparate ist in Abb. 6 dargestellt. Eine dünne Quarzkapillare mit einem Innendurchmesser von 25 bis 100 µm überbrückt hierbei zwei Puffergefäße, zwischen denen eine Hochspannung von 10 – 30 kV angelegt wird. Dies führt in der Kapillare zur Ausbildung eines elektrischen Feldes, was die Migration der Probezone bewirkt. Der elektrophoretischen Wanderung ist immer ein mehr oder

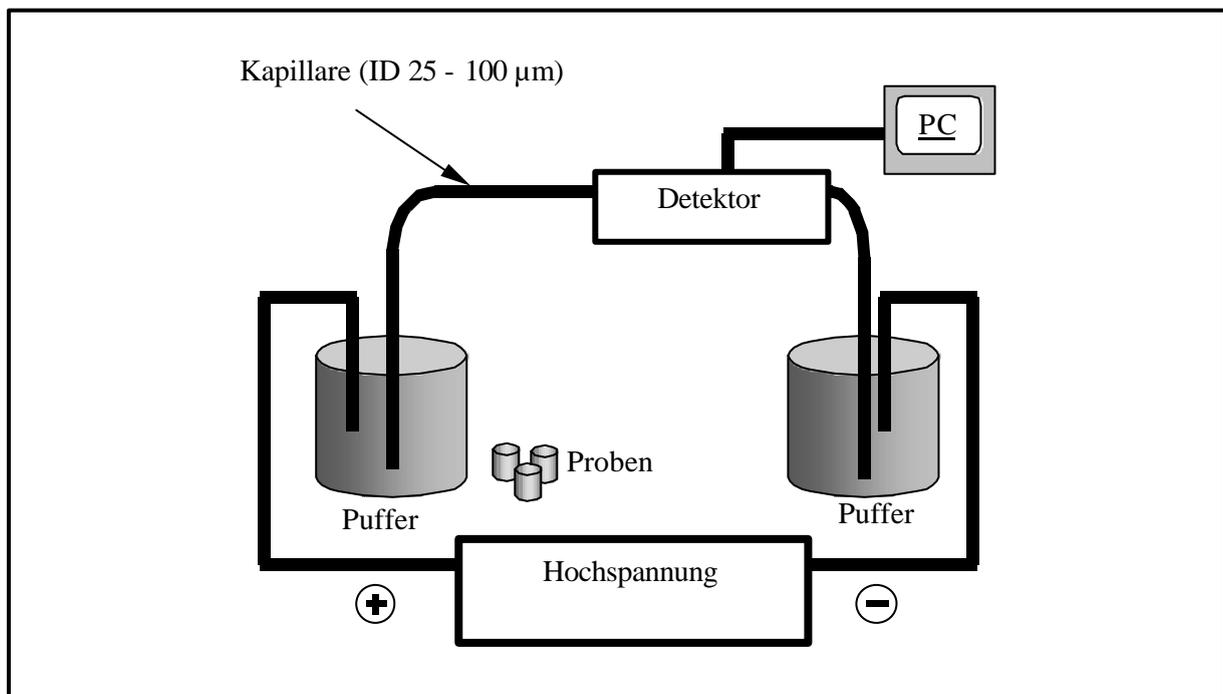


Abb. 6 Allgemeiner Aufbau einer Kapillarelektrophoreseapparatur

minder starker elektroosmotischer Fluß (EOF) überlagert, der die Wanderung des Puffers im elektrischen Feld darstellt. Dieser trägt aktiv zum Transport der Probenzonen in der Kapillare, jedoch nicht zu deren Trennung bei. Bei der CE werden nur geladene Moleküle aufgrund ihrer unterschiedlichen Wanderungsgeschwindigkeiten bzw. Mobilitäten im elektrischen Feld getrennt. Ungeladene Probenbestandteile werden hingegen mit dem EOF transportiert und können erst durch mizellare elektrokinetische Chromatographie (MEKC) getrennt werden (s. Kap. 3.1.4).

Die Probenaufgabe von wenigen Nanolitern (1 – 2 nl/Injektion) erfolgt bei der CE üblicherweise am anodischen Ende der Kapillare. Generell kann diese hydrostatisch (durch Heben oder Senken der entsprechenden Probengefäße), elektrokinetisch (durch kurzzeitiges Anlegen einer elektrischen Spannung während des Eintauchens in das Probengefäß), durch Druckinjektion oder mit Hilfe verschiedener Probensplitsysteme erfolgen.

Abgesehen von der Kopplung mit einem Massenspektrometer oder einem amperometrischen Detektor (Abb. 8) erfolgt die Detektion in der CE in den meisten Fällen (UV, Fluoreszenz) direkt in der Trennkapillare (on-column) durch ein am kathodischen Ende der Kapillare eingebranntes Detektionsfenster [140].

Aufgrund des geringen Injektionsvolumens ergibt sich für die CE rein rechnerisch eine extrem hohe Massensensitivität. Da für die optische Detektion in der CE jedoch nur die mittlere Weite des Kapillardurchmessers (25 – 100 µm) als durchleuchtete Schichtdicke zur Verfügung steht, liegt die Konzentrationsempfindlichkeit der CE maximal in den aus der HPLC gewohnten Bereichen. Dennoch besitzt die CE aufgrund ihrer deutlich höheren Trennstufenzahlen, sehr kurzen Analysenzeiten, geringen Probenvolumina (1 – 2 nl) und ihres erheblich geringeren materiellen Aufwands (Verzicht auf Lösungsmittel) für zahlreiche analytische Fragestellungen deutliche Vorteile gegenüber der HPLC.

3.1.2 Kapillarelektrophorese mit UV-Detektion

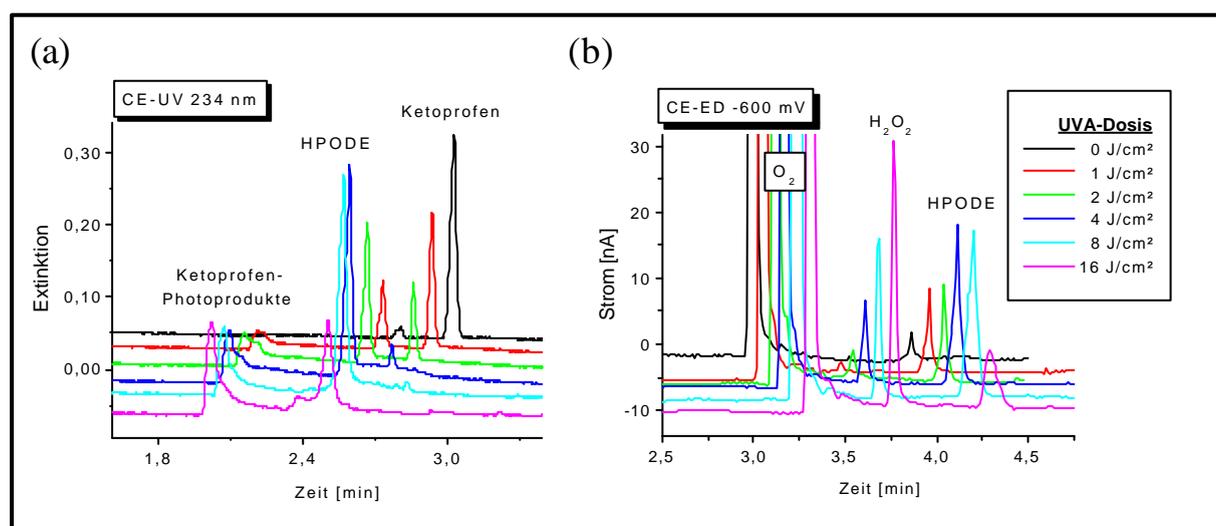


Abb. 7 Elektropherogramme UVA-bestrahlter Linolsäure-haltiger (1 mM) Ketoprofen-Lösungen (0,5 mM) (a) CE-UV ($\lambda = 234$ nm) und (b) CE-ED (-600 mV)

Eine Möglichkeit für die schnelle, unkomplizierte, simultane Detektion des Ketoprofens und des photochemisch gebildeten Linolsäureperoxids (HPODE) stellt die CE mit UV-Detektion (CE-UV) bei einer Wellenlänge von 234 nm dar.

Wie aus dem in Abb. 7 a dargestellten Elektropherogramm ersichtlich wird, ist die Trennung der ungeladenen Ketoprofen-Photoprodukte bei der Verwendung von 10 mM Borax-Lösung als Grundelektrolyt nicht möglich. Erst durch den Zusatz des Mizellbildners Natriumdodecylsulfat (SDS) in den Elektrophoresepuffer konnten auch diese problemlos separiert werden (s. Kap. 3.1.4.2). Im Gegensatz hierzu kann das photochemisch gebildete Wasserstoffperoxid aufgrund fehlender chromophorer Molekülstrukturen UV-photometrisch nicht erfaßt werden.

3.1.3 Kapillarelektrophorese mit elektrochemischer Detektion

Der prinzipielle Aufbau der bis zum heutigen Zeitpunkt kommerziell nicht verfügbaren Kapillarelektrophorese mit elektrochemischer Detektion (CE-ED) ist in Abb. 8 dargestellt [141]. Abweichend von dem in Abb. 6 gezeigten allgemeinen Aufbau einer CE-Apparatur erfolgt die Detektion der Probenmoleküle bei der CE-ED außerhalb der Trennkapillare. Hierbei werden die Probenmoleküle zum kathodischen Ende der Kapillare transportiert und auf der Oberfläche der Arbeitselektrode durch das dort angelegte Potential reduziert bzw. oxidiert. Der dabei fließende Strom dient als Meßsignal. Im Gegensatz zur CE-UV ermöglicht die CE-ED die direkte Bestimmung reduzierbarer bzw. oxidierbarer Substanzen unabhängig vom Vorhandensein chromophorer Gruppen und stellt so eine einfache Methode zur qualitativen und quantitativen Bestimmung verschiedener

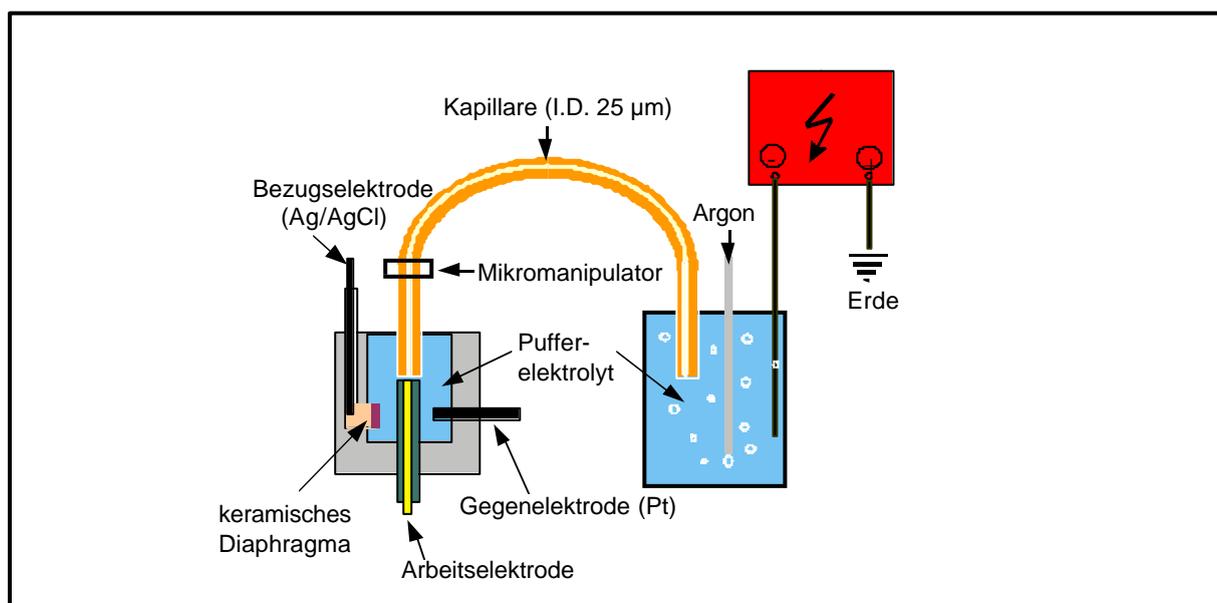


Abb. 8 Prinzipieller Aufbau einer Kapillarelektrophoreseapparatur mit elektrochemischer Detektion

Peroxide (H_2O_2 , HPODE) und Sauerstoff dar (s. Abb. 7 b). Weiterhin können durch den Zusatz von 1 mM β -Cyclodextrin im Elektrophoresepuffer die bei der enzymatischen bzw. photochemisch induzierten Linolsäure-Peroxidation gebildeten isomeren HPODE separiert werden [141].

Für die gestellte Problematik ist die Analytik des photochemisch gebildeten H_2O_2 und HPODE von besonderem Interesse. Bei den genannten Peroxiden handelt es sich um elektrochemisch leicht reduzierbare Strukturen, so daß ihre simultane Detektion bereits bei einem Potential von -600 mV möglich ist (Abb. 7 b). Da auch Sauerstoff unter diesen Analysenbedingungen elektrochemisch reduziert wird, ergibt sich beim Einsatz von luftgesättigten Elektrolytlösungen ein ständiger Stromfluß, der die Detektionssignale der anderen Analyten überlagert. Aus diesem Grund muß der Pufferelektrolyt bei der elektrochemischen Detektion von H_2O_2 und HPODE weitestgehend sauerstofffrei sein. In der Praxis konnte dies durch eine ständige Begasung des Anodengefäßes mit Argon (s. Abb. 8) realisiert werden. Nach dem Einschalten der Hochspannung wird der sauerstofffreie Grundelektrolyt durch den EOF an das kathodische Kapillarende transportiert, so daß die Arbeitselektrode während der Messung ständig von Sauerstoff freigespült wird.

Unter der Voraussetzung, daß während der Probeninjektion kein Sauerstoff aus der Umgebungsluft in die Kapillare eintritt, eröffnet die CE-ED die Möglichkeit der simultanen Bestimmung von Sauerstoff und verschiedenen Peroxiden oder anderen bei einem Potential von -600 mV reduzierbaren Strukturen. Um das Einsatzgebiet der CE-ED auch auf dem Gebiet kinetischer Untersuchungen verschiedener Sauerstoff-verbrauchender bzw. Peroxid-bildender Prozesse erweitern zu können, wurde unabhängig von der gestellten Ketoprofen-Problematik im Rahmen der vorliegenden Arbeit eine Injektionsvorrichtung entwickelt, die eine periodische sauerstofffreie Injektion der Untersuchungslösung zuläßt (s. Kap. 3.5).

Da es sich bei der elektrochemischen Detektion grundsätzlich um eine Oberflächenreaktion (Reduktion bzw. Oxidation des Analyten auf der Elektrodenoberfläche) handelt, kann die Absorption verschiedener Probenbestandteile im Laufe eines Meßtages zur Inaktivierung der Elektrodenoberfläche führen, woraus sich eine abnehmende Nachweisempfindlichkeit ergibt. Diese auch bei Mehrfachinjektionen (> 25 Injektionen) Linolsäure-haltiger sowie bestrahlter wäßriger Ketoprofen-Lösungen auftretende Inaktivierung der Elektrodenoberfläche konnte innerhalb eines Meßtages zum einen durch die Beschichtung der Elektrode mit Polyvinylalkohol oder durch den Austausch des Grundelektrolyten (10 mM Borax-Lösung) des Kathodengefäßes gegen eine 10 mM methanolische (50 %) Borax-Lösung verhindert werden.

3.1.4 Mizellare Elektrokinetische Chromatographie

3.1.4.1 Allgemeines

Die erstmals 1984 von Terabe et al. [142] beschriebene mizellare elektrokinetische Chromatographie (MEKC) ermöglicht auch in der CE die Auftrennung ungeladener Probenmoleküle.

Beim Zusatz von Detergenzien in den Elektrolyseepuffer kommt es nach dem Überschreiten der kritischen Mizellbildungskonzentration (CMC) zur Ausbildung von Mizellen. Diese besitzen im Inneren einen hydrophoben Charakter und sind je nach verwendetem Detergens nach außen hin positiv (z.B. Dodecyltrimethylammoniumbromid) oder negativ (z.B. Natriumdodecylsulfat) geladen. Aufgrund ihrer äußeren Ladung besitzen diese Mizellen im elektrischen Feld eine elektrophoretische

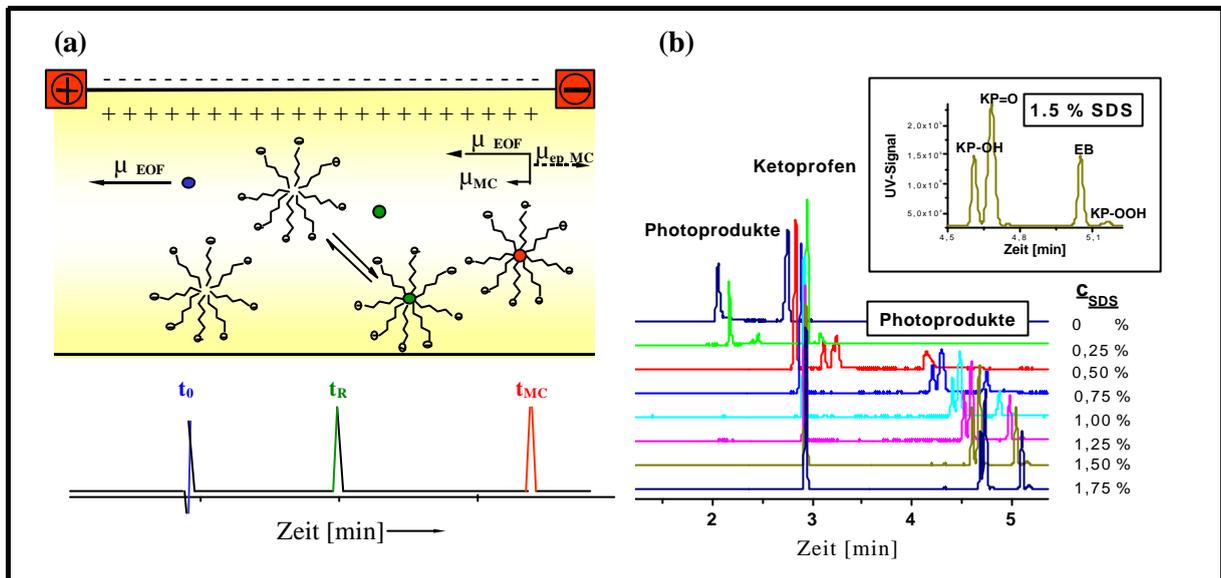


Abb. 9 (a) Schematische Darstellung der Trennung in der mizellaren elektrokinetischen Chromatographie [142] (b) Elektropherogramme UVA-bestrahlter (6 J/cm^2) $0,5 \text{ mM}$ Ketoprofen-Lösungen mit unterschiedlichen Zusätzen von SDS. Die Einfügung zeigt die Trennung der Ketoprofen-Photoprodukte bei der optimalen SDS-Konzentration von $1,5 \%$

Mobilität, die je nach dem Vorzeichen ihrer Ladung in Richtung Kathode (positiv geladene Mizellen) oder in Richtung Anode (negativ geladene Mizellen) gerichtet ist. Die effektive Beweglichkeit der Probensubstanzen sowie der Mizellen (μ_{MC}) ergibt sich analog zur CE aus der vektoriellen Summe der elektrophoretischen Wanderung der Mizelle ($\mu_{ep,MC}$) und der elektroosmotischen Geschwindigkeit (μ_{EOF}). Abb. 9 a zeigt eine vereinfachte Darstellung der MEKC unter Verwendung eines anionischen Tensids. Setzt man voraus, daß der Betrag der elektrophoretischen Mobilität der Mizellen ($\mu_{ep,MC}$) geringer ist als der kathodisch gerichtete EOF (μ_{EOF}), wandern die Mizellen mit der Mobilität (μ_{MC}) in Richtung Kathode und somit zum Detektor. Unter diesen Bedingungen werden stark polare (ungeladene) Moleküle, welche keine Wechselwirkungen mit den Mizellen eingehen, mit dem EOF transportiert und erreichen den Detektor mit der Totzeit t_0 . Stark hydrophobe Moleküle halten sich im Gegensatz hierzu vor allem im Mizellinneren auf und wandern mit deren Geschwindigkeit, so daß sie zum Zeitpunkt t_{MC} detektiert werden können. Moleküle die weder stark hydrophile noch stark hydrophobe Eigenschaften besitzen, verteilen sich entsprechend ihrer Hydrophobie zwischen der wäßrigen und lipophilen Phase (Mizellen) und erreichen so den Detektor zwischen t_0 und t_{MC} . Folglich beruht die Trennung ungeladener Probenmoleküle in der MEKC auf der Mobilität der meist negativ geladenen Mizellen und dem Transport der Probe außerhalb der Mizellen durch den EOF [139].

3.1.4.2 Separation der Ketoprofen-Photoprodukte mit Hilfe der mizellaren elektrokinetischen Chromatographie

Die experimentell bestimmte CMC von SDS (s. Kap.10.1.5) betrug unter den gegebenen Analysenbedingungen (23°C, 10 mM Boratlösung) 3,8 mM (0,132 %). Da für die Ausbildung von SDS-Mizellen das Überschreiten der CMC unbedingt notwendig ist, wurde die SDS-Konzentration des Grundelektrolyten (10 mM Boratlösung) in 0,25-Prozentschritten von 0,25 % auf 2 % gesteigert. Als Untersuchungslösung diente eine bestrahlte (UVA-Dosis = 1,5 J/cm²) 0,5 mM wäßrige Ketoprofen-Lösung (PB-Puffer pH 7,4), welche sich entsprechend der HPLC-Ergebnisse (s. Abb. 43 Kap. 5.1.3) aus 3-Benzoylphenylethanol (KP-OH), 3-Benzoylphenylethylhydroperoxid (KP-OOH), 3-Benzoylphenylethanon (KP=O) und 3-Benzoylphenylethan (EB) zusammensetzte.

3.1.4.3 Ergebnisse und Diskussion

Aus den Elektropherogrammen in Abb. 9 b wird deutlich, daß bereits ein Zusatz von 0,25 bis 0,5 % SDS zu merklichen Interaktionen zwischen den SDS-Mizellen und den nichtionischen Ketoprofen-Photoprodukten führt. Durch eine weitere kontinuierliche Erhöhung der SDS-Konzentration des Grundelektrolyten um jeweils 0,25 % nimmt die Auflösung der Peaks zu und erreicht bei einem 1,5 %-igen Zusatz mit der Basislinienauftrennung der Analyten ihr Maximum. Eine Erhöhung der SDS-Konzentration über 1,5 % hinaus führt wieder zu einer Verschlechterung der Peakauflösung.

Dieses in der MEKC häufig auftretende Erscheinungsbild ist auf die zunehmende Beeinflussung des EOF, der Viskosität und Ionenstärke des Trennpuffers durch eine Konzentrationserhöhung des zugesetzten Detergens zurückzuführen [139]. Mit der Optimierung des Trennpuffers sind daher oft sehr zeitaufwendige systematische Untersuchungen verbunden.

Dennoch erwies sich die MEKC im Rahmen der vorliegenden Arbeit als eine einfache, besonders für Vorversuche sehr gut geeignete, im Vergleich zur HPLC schnell durchführbare, stark kostensparende Analysenmethode, durch welche sich die Einsatzmöglichkeiten der CE auch auf dem Gebiet der Analytik nichtionischer Verbindungen und damit auch auf die Bestimmung der Ketoprofen-Photoprodukte erweitern läßt.

3.2 Entwicklung einer Analysenmethode zur simultanen Bestimmung von H₂O₂, Ketoprofen und der Ketoprofen-Photoprodukte

Aus der Literatur ist keine chromatographische Methode zur simultanen Bestimmung von H₂O₂, Ketoprofen und der im wäßrigen System als Hauptphotoprodukte auftretenden Verbindungen 3-Benzoylphenylethanol (KP-OH), 3-Benzoylphenylethylhydroperoxid (KP-OOH), 3-Benzoylphenyl-

ethanon (KP=O) und 3-Benzoylphenylethan (EB) bekannt. Für eine Abschätzung toxischer Effekte an verschiedenen in vitro- und in vivo-Test-Systemen ist die Kenntnis der UVA-Dosis-abhängigen Zusammensetzung der Photoprodukte jedoch unerlässlich. Aus diesem Grund war es notwendig, eine Analysenmethode zu entwickeln, die im Vergleich zur CE neben einer einwandfreien Ketoprofen- und H₂O₂-Analytik auch die qualitative und quantitative Bestimmung der einzelnen Photoprodukte ermöglicht. Da das der HPLC (High Performance Liquid Chromatography) zugrunde liegende Trennprinzip auf dem unterschiedlichen Verteilungsverhalten der Analyten zwischen einer festen, stationären und einer flüssigen, mobilen Phase beruht und unabhängig vom Vorhandensein geladener Molekülstrukturen ist, stellt die HPLC für diese Untersuchungen die Methode der Wahl dar. Um eine simultane Bestimmung des photochemisch gebildeten Wasserstoffperoxids realisieren zu können, wurde das mit einem UV-Detektor ausgerüstete HPLC-System (3.2.1) zusätzlich mit einem Chemilumineszenzdetektor kombiniert. Auf das entwickelte Analysenverfahren, insbesondere die Chemilumineszenzdetektion, soll im folgenden näher eingegangen werden.

3.2.1 Chromatographische Trennung von Ketoprofen und der Ketoprofen-Photoprodukte

Eine direkte chromatographische Trennung von Ketoprofen und seinen Photoprodukten konnte nach Abstimmung des Säulenmaterials und der mobilen Phase (AcN/H₂O/MeOH/H₃PO₄ (550/400/50/0,9 V/V)) auf einer Zorbax[®]CN-Säule, einer oberflächenmodifizierten RP18-Säule der Firma Bischoff realisiert werden. Da Ketoprofen und dessen Photoprodukte als gemeinsames chromophores Strukturelement ein Benzophenongrundgerüst besitzen ($\lambda_{\text{max}} = 257 \text{ nm}$), erfolgte die Detektion dieser Verbindungen bei einer Wellenlänge von 257 nm.

3.2.2 Chemiluminometrische Detektion

Als Lumineszenz bezeichnet man allgemein das Leuchten von Stoffen ohne gleichzeitige Temperaturerhöhung. Generell ist dieses Leuchten auf den Übergang eines angeregten Elektrons aus einem energetisch höheren in einen energetisch tieferen Zustand zurückzuführen. Stammt die zur Elektronenanregung benötigte Aktivierungsenergie E_A aus einer chemischen Reaktion, wird der Lumineszenzprozeß als Chemilumineszenz bezeichnet. Zur simultanen Bestimmung der photochemisch gebildeten Peroxide KP-OOH und H₂O₂ wurde im Rahmen der vorliegenden Arbeit die Luminol-Chemilumineszenz herangezogen. Diese basiert allgemein auf der Oxidation von Luminol (5-Amino-2,3-dihydro-1,4-phthalazindion) durch H₂O₂ oder andere Oxidationsmittel (z.B. KP-OOH) (Abb. 10) im alkalischen Milieu in Gegenwart geeigneter Katalysatoren, wie z.B. Microperoxidase (MPO).

Auch wenn der genaue Mechanismus der bereits 1928 von Albrecht [143] beschriebenen Luminolreaktion in wäßrigen Lösungen bis heute nicht vollständig geklärt ist, kann im Falle von H_2O_2 als Oxidationsmittel davon ausgegangen werden, daß als primäres Intermediat ein offenes Hydroperoxid gebildet wird. Durch eine intramolekulare nukleophile Addition reagiert dieses zum bizyklischen Endoperoxid, das in einem weiteren Reaktionsschritt spontan in Luminol und Sauerstoff

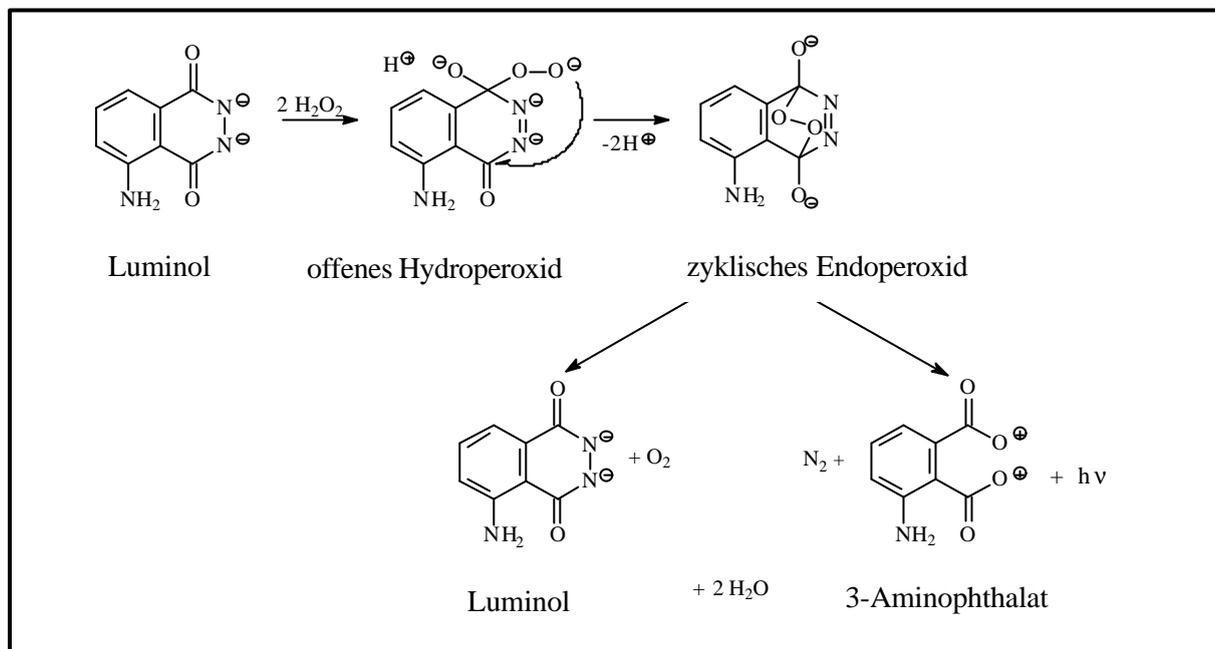


Abb. 10 Mechanismus der Luminol-Chemilumineszenz-Reaktion (nach Brolin & Wettermark [144])

ohne Lichtemission zerfällt. In einer Parallelreaktion (Reaktionswahrscheinlichkeit ca. 4%) zerfällt dieses zyklische Endoperoxid zu Stickstoff und dem elektronisch angeregten 3-Aminophthalat. Dieses kehrt unter Abgabe von Lichtquanten mit $\lambda = 425 \text{ nm}$ in den Grundzustand zurück und stellt die der chemiluminometrischen Detektion zugrundeliegende Lichtreaktion dar. Die Gesamtquantenausbeute der Luminol-Chemilumineszenz beträgt 0,015 [144].

3.2.3 HPLC/UV/CL ein Analysenverfahren zur simultanen Bestimmung von H_2O_2 , Ketoprofen und der Ketoprofen-Photoprodukte

Die Chemilumineszenz ist eine praktisch leicht durchführbare Detektionsmethode zur indirekten Bestimmung von Peroxiden. In Verbindung mit einer HPLC ermöglicht sie die qualitative und quantitative Bestimmung von Peroxiden unabhängig von deren elektrischem Ladungszustand und dem Vorhandensein chromophorer Molekülstrukturen. Der prinzipielle Aufbau einer HPLC mit UV und Chemilumineszenz-Detektion ist in Abb. 11 dargestellt.

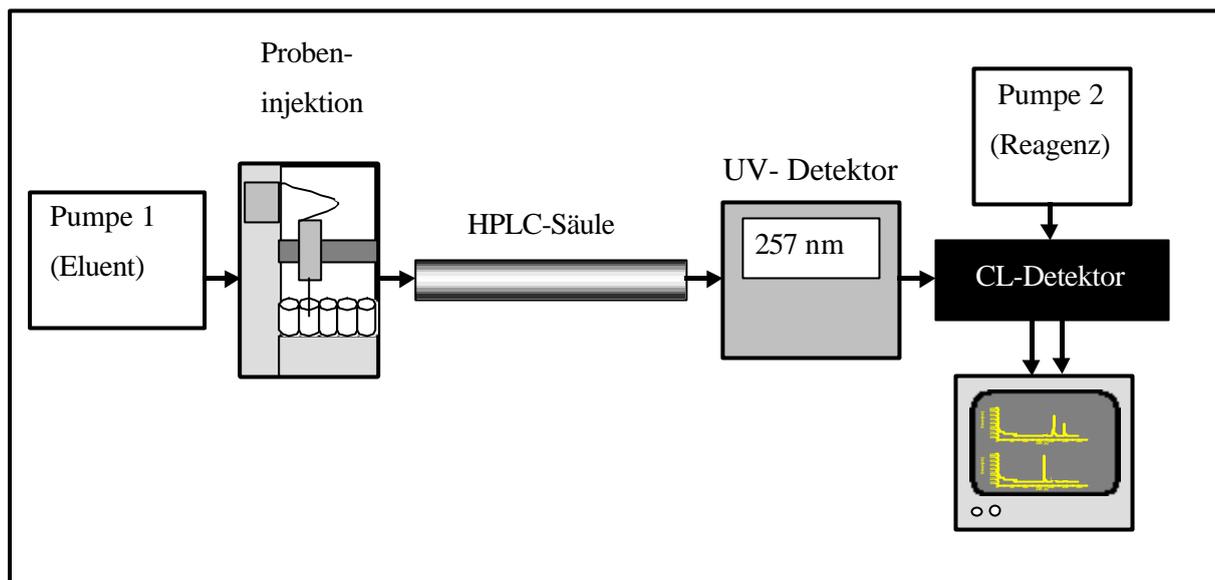


Abb. 11 Prinzipieller Aufbau der HPLC mit Chemilumineszenz-Detektion

Wie bereits unter 3.2.2 erwähnt, kann die Luminol-Chemilumineszenz-Reaktion nur im alkalischen Milieu ablaufen. In Abhängigkeit vom eingesetzten Katalysator liegt der optimale pH-Wert zwischen 9 und 11.

Der optimierte Eluent der chromatographischen Trennung des Ketoprofens und seiner Photoprodukte (Acetonitril/Wasser/Methanol/H₃PO₄ (550/400/50/0,9)) besitzt jedoch einen pH-Wert von 1, so daß eine chemiluminometrische Bestimmung in diesem Trennpuffer nicht möglich ist. Um diese dennoch realisieren zu können, wird der pH-Wert des gepufferten Luminol-Reagenzes, welches Luminol und den Katalysator enthält, so gewählt, daß sich bei der Zusammenführung des HPLC-Laufmittels und des Luminol-Reagenzes (Abb. 12) der für die Luminolreaktion erforderliche pH-Wert von 10 ergibt.

Da die Luminolreaktion und die damit verbundene Lichtemission nur in einem kurzen Zeitfenster von maximal 8 s abläuft, muß die Detektion unmittelbar nach der Reagenzdurchmischung erfolgen. Für eine maximale Ausnutzung dieser Lichtemission wurde die übliche spiralförmige Geometrie des Reaktionsraumes vor dem Einlaßfenster des Sekundärelektronenvervielfachers (SEV) gewählt (Abb. 12). Eine weitere Erhöhung der Lichtausbeute konnte durch das Anbringen eines Hohlspiegels gegenüber dem SEV-Einlaßfenster erreicht werden. Da jeder Fremdlichteinfall bei der Chemilumineszenz-Detektion zu einer Verminderung des Meßsignals führt, ist es unbedingt erforderlich, daß alle Bauelemente in einem lichtdicht schließenden Gehäuse untergebracht sind. Die praktische Anwendung dieser Methode bestätigte die in der Literatur [145] zitierten Vorteile der auf Luminolbasis beruhenden chemiluminometrischen Detektion, die sich besonders durch ihre einfache Durchführbarkeit, hohe Sensitivität, ein geringes Untergrundsignal und hohe Reagenzstabilität auszeichnet. Als nachteilig ist zu bewerten, daß bereits geringe Änderungen in der Zusammensetzung des HPLC-Eluenten starke Auswirkungen auf das Chemilumineszenzsignal haben. So stieg die Empfindlichkeit der Microperoxidase-katalysierten Luminolreaktion bei der Verwendung von frisch destillierten HPLC-reinen Acetonitrils als Laufmittelkomponente um den Faktor 100. Insgesamt erwies sich die Kombination der HPLC mit der Luminol-Chemilumineszenz (HPLC-CL) als eine

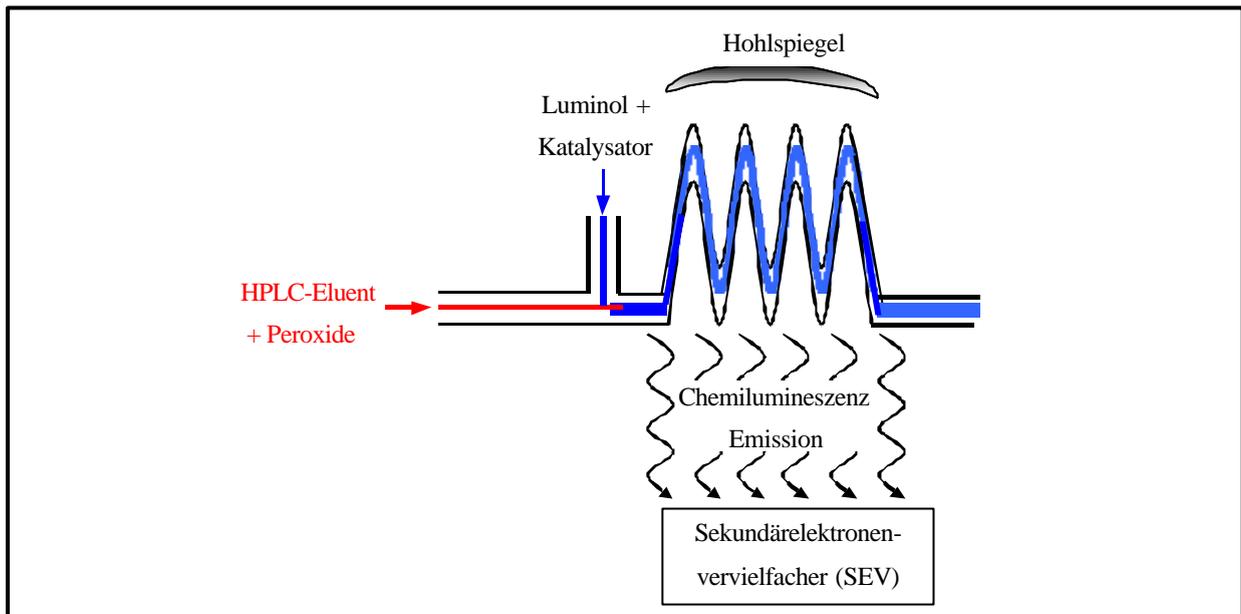


Abb. 12 Prinzipieller Aufbau der Lumineszenz-Durchflußzelle

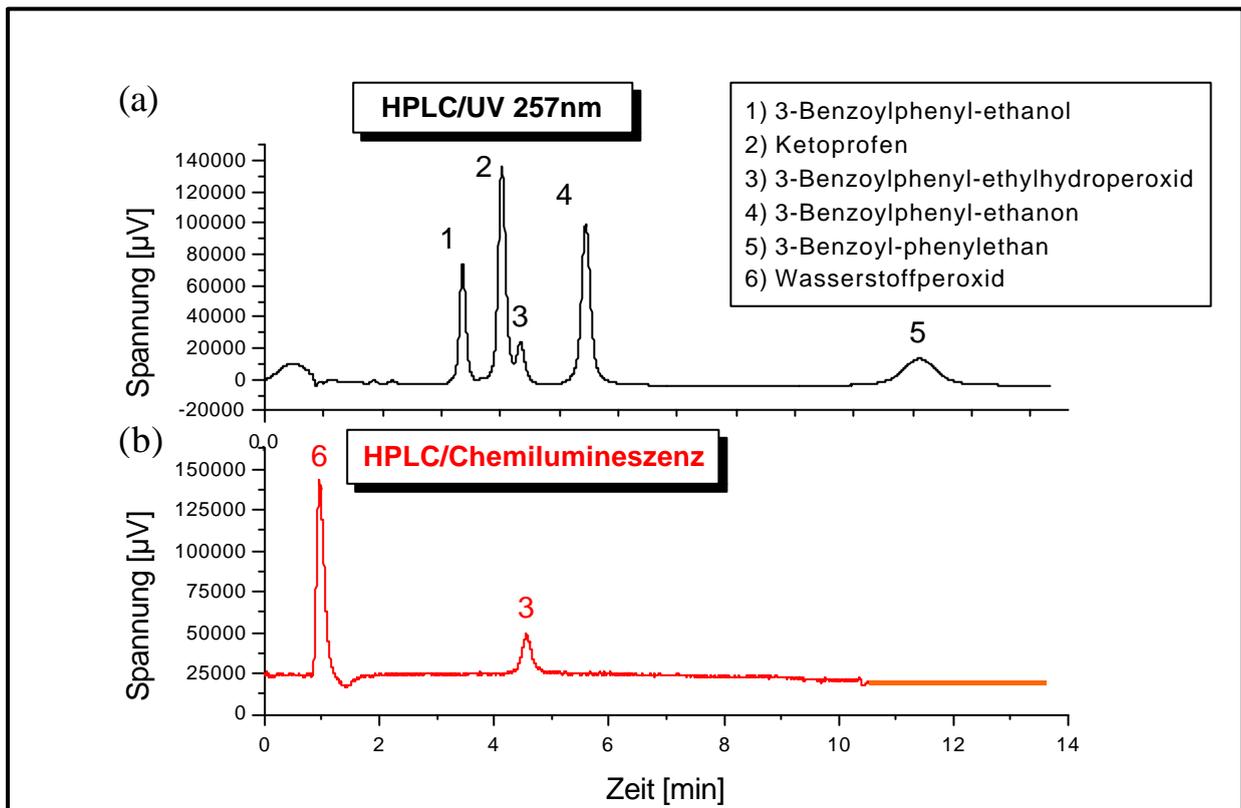


Abb. 13 Chromatogramm einer 1 mM Ketoprofen-Lösung nach einer UVA-Dosis von 1 J/cm^2 (a) UV-Detektion (257 nm) (b) Chemilumineszenz-Detektion

leistungsfähige und die CE im Rahmen der Aufgabenstellung ergänzende Analysenmethode.

Mit dieser Methode können sowohl Ketoprofen und dessen Photoprodukte als auch das beim photochemisch induzierten Abbau entstehende Wasserstoffperoxid simultan detektiert werden.

3.3 FOX-II-Test

Der FOX-Test (FOX = ferrous oxidation in xylenol orange) stellt ebenfalls eine indirekte photometrische Nachweismethode von Peroxiden dar. Er wurde erstmals von Gupta [146] sowie Michaels und Hunt [147] zur Gehaltsbestimmung von Wasserstoffperoxidlösungen bzw. zum

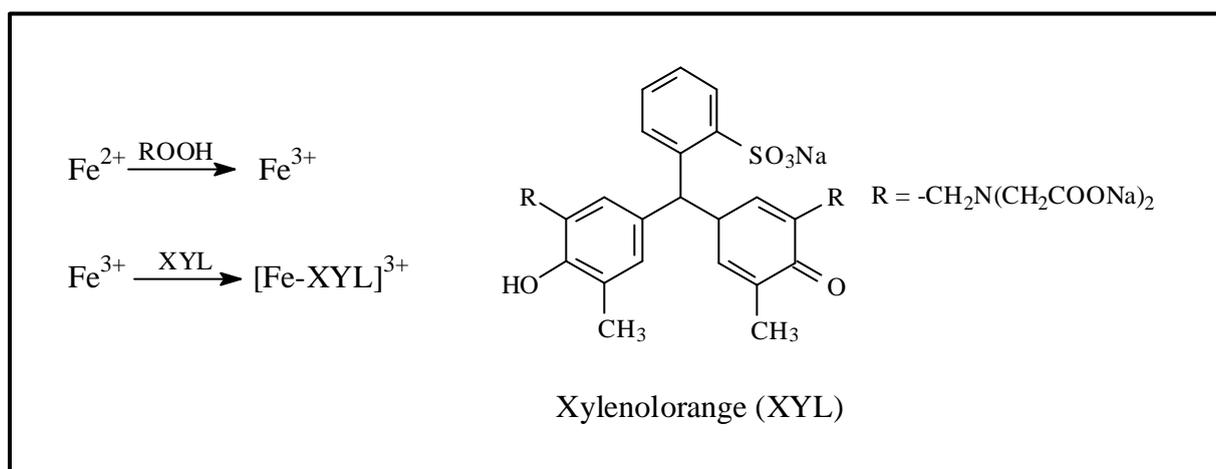


Abb. 14 Reaktionsmechanismus des FOX-Tests

Nachweis von Hydroperoxiden in bestrahlten Nukleinsäure- und DNA-Proben eingesetzt. Der FOX-Test beruht auf der Oxidation von Eisen-(II) zu Eisen-(III) in Gegenwart von Lipidhydroperoxiden, Wasserstoffperoxid oder anderen starken Oxidationsmitteln. Das Eisen-(III) bildet hierbei mit dem zugesetzten Xylenolorange einen braunroten Komplex, der bei einer Wellenlänge von 560 nm photometrisch vermessen wird.

Der FOX-Test zeichnet sich durch seine einfache Handhabung, einen geringen materiellen Aufwand und durch die Verwendung leicht zugänglicher Chemikalien aus. Dieser Test bietet die Möglichkeit, den Gesamtperoxidgehalt in UVA-bestrahlten Ketoprofen-Gel-Proben direkt ohne zusätzliche Extraktionsschritte zu bestimmen.

3.4 Zusammenfassung

Zusammenfassend kann festgestellt werden, daß mit den im Rahmen der vorliegenden Arbeit entwickelten (CE-ED) und optimierten (HPLC/UV/CL, CE-UV, FOX-Test) Analysenverfahren ein breites Spektrum verschiedener sich ergänzender Methoden für die qualitative und quantitative

Bestimmung des Ketoprofens, der Ketoprofen-Photoprodukte und der photochemisch gebildeten Peroxide (H_2O_2 und HPODE) zur Verfügung steht. Die beschriebenen, einander ergänzenden Analysemethoden erlauben detaillierte Aussagen zum photochemischen Reaktionsverhalten von Ketoprofen. Sie ermöglichen im einzelnen:

- eine schnelle und direkte Analytik wässriger KP-Lösungen hinsichtlich der Wirkstoffstabilität (CE-UV) und der UV-induzierten H_2O_2 -Bildung (CE-ED) ohne weitere Identifizierung der einzelnen Photoprodukte,
- eine direkte Analytik wässriger KP-Lösungen bzgl. der UVA-Dosis-abhängigen Photoproduktverteilung (HPLC/UV, MEKC), der Entstehung von Wasserstoffperoxid und 3-Benzoylphenylethylhydroperoxid (HPLC/CL),
- die summarische Erfassung des Gesamtperoxidgehaltes UVA-exponierter Ketoprofen-Gel-Proben (FOX-Test) und
- die Separation der isomeren Hydroperoxide der Linolsäure (CE-ED mit Cyclodextrinen).

3.5 Entwicklung eines Analysensystems zur Bestimmung Sauerstoffverbrauchender und Peroxid-bildender Prozesse

3.5.1 Zielstellung

Zahlreiche enzymatische und chemische Prozesse, darunter auch verschiedene photodynamische Reaktionen, wie z.B. der UV-induzierte Ketoprofen-Abbau, verlaufen unter Verbrauch von Sauerstoff und Bildung verschiedener Peroxide, wie z.B. Wasserstoffperoxid. Da eine Bestimmung von Sauerstoff und Wasserstoffperoxid aufgrund des Fehlens chromophorer Gruppen mit einfachen klassischen Detektionsmethoden (UV, Fluoreszenz) nicht möglich ist, beschränkt man sich bei der Bestimmung kinetischer Parameter derartiger Reaktionen meist auf die Bestimmung des Sauerstoffverbrauchs, z.B. mit Hilfe einer Clark-Elektrode.

Eine einfach durchführbare Detektionsmethode für die simultane Bestimmung verschiedener Peroxide (z.B. H_2O_2 , HPODE) wurde mit der in Kap. 3.1.3 vorgestellten CE-ED entwickelt. Wenn man diese Methode um ein Injektionssystem erweitert, das einen Austausch des ubiquitär vorkommenden mit dem im Reaktionsraum vorhandenen Sauerstoff verhindert, besteht darüberhinaus die Möglichkeit, zugleich auch den Verlauf des Sauerstoffgehaltes in der Lösung zu verfolgen.

Der Aufbau des entwickelten Injektionssystems ist im nachfolgenden Abschnitt dargestellt. Im Rahmen der vorliegenden Arbeit wurde die vorgestellte Apparatur am Beispiel der Lipoxygenase-katalysierten Linolsäure-Peroxidation und des photoinduzierten Ketoprofen-Abbaus erprobt (Abb. 16) und als Testsystem zur Bestimmung der IC_{50} verschiedener am Institut synthetisierter Lipoxygenase-Inhibitoren eingesetzt [148].

3.5.1.1 Aufbau der Injektionsvorrichtung

Der prinzipielle Aufbau der entwickelten Injektionsvorrichtung ist in Abb. 15 dargestellt. Sie besteht aus zwei separaten Kunststoffgefäßen (je $25 \times 25 \times 60 \text{ mm}^3$), dem Anoden-Gefäß mit dem sauerstofffreien Grundelektrolyten und der Reaktionskammer ($V = 2,231 \text{ cm}^3$), welche die sauerstoffhaltige Reaktionsmischung enthält. Ist die Reaktionskammer mit der entsprechenden Substrat- bzw. Untersuchungslösung gefüllt, wird diese durch einen Teflonstopfen verschlossen. Eine schmale Bohrung ($d = 1 \text{ mm}$) im Stopfen ermöglicht im Falle von enzymatisch katalysierten Reaktionen eine bläschenfreie Injektion des Enzyms, ohne daß sich die Sauerstoffkonzentration in der Reaktionskammer ändert. Für die homogene Vermischung der Substrat- und Enzymlösung wird die Reaktionslösung in der Reaktionskammer während der gesamten Meßzeit mit einem Magneten gerührt.

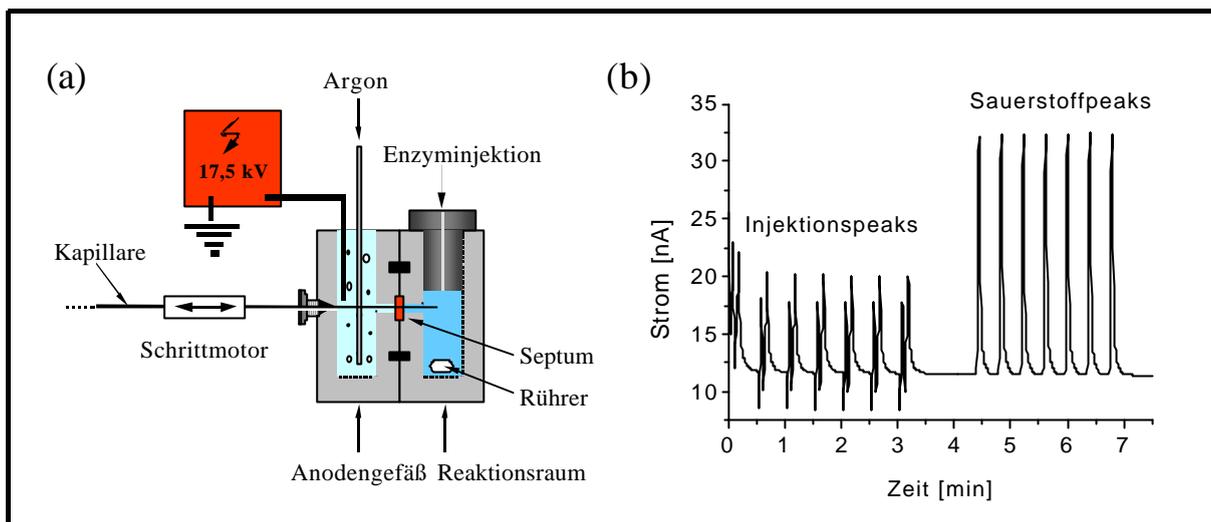


Abb. 15 (a) Prinzipieller Aufbau der Injektionsvorrichtung, (b) Reproduzierbarkeit des Detektionssignals

Um eine Probeninjektion innerhalb dieser Injektionsvorrichtung realisieren zu können, sind beide Zellen über eine dünne Bohrung ($d = 0,5 \text{ mm}$) miteinander verbunden. Durch den Einsatz eines dichtschießenden Septums ($d = 9 \text{ mm}$) zwischen den angrenzenden Außenflächen der Zellen wird ein unkontrollierter Stoffaustausch zwischen beiden Gefäßen verhindert. Da das Anodengefäß direkt mit der Hochspannungsquelle verbunden ist, ist es unbedingt notwendig, die gesamte Injektionsvorrichtung sorgfältig zu isolieren. Dies wurde realisiert, indem die gesamte Injektionsvorrichtung auf einer Isolierplatte aufgeklebt wurde. Der Mindestabstand aller metallischen Bauteile (Schrittmotor, Rührer) zur Hochspannungsquelle beträgt 10 cm . Zur Verhinderung elektrischer Überschläge ist die gesamte Apparatur in einem Kunststoffgehäuse ($30 \times 30 \times 50 \text{ cm}^3$) untergebracht. Für eine Temperierung des Reaktionsraumes befindet sich im Innenraum des Gehäuses ein elektrischer Heizer (100 W) mit einem Ventilator. Mit Hilfe eines Fuji PYZ-4 Controller kann die Innentemperatur des Reaktionsraumes in einem Temperaturbereich von 28 bis $40 \text{ }^\circ\text{C}$ auf $\pm 0,1 \text{ K}$ vorgegeben und konstant gehalten werden.

3.5.1.2 Allgemeine Injektionsprozedur

Bei der Probeninjektion durchstößt die Kapillare ausgehend vom Anodengefäß durch eine Schrittmotor-gesteuerte Vorwärtsbewegung das Septum und dringt in den Reaktionsraum ein. Dort werden durch Anlegen eines kurzen Spannungsimpulses (1 s , $17,5 \text{ kV}$) (variabel einstellbar) einige Nanoliter der Probenlösung elektrokinetisch injiziert. Die probenbeladene Kapillare wird anschließend automatisch in das Anodengefäß zurückgeführt. Unmittelbar nachdem sich das Kapillarende wieder im Anodengefäß befindet, wird an das System für eine bestimmte einstellbare Zeit eine Hochspannung von $17,5 \text{ kV}$ angelegt. Das führt in der Kapillare zur Ausbildung eines elektrischen Feldes, wodurch die Probenzone in der Kapillare transportiert wird. Diese Prozedur kann so oft wiederholt werden, bis der Injektionspeak der letzten Injektion vom Sauerstoffpeak der ersten Injektion noch getrennt wird.

Damit ermöglicht dieser Injektionsmodus eine automatische Probeninjektion im Abstand von wenigen Sekunden, was seinen Einsatz besonders bei schnell ablaufenden Reaktionen prädestiniert. Bei der simultanen Bestimmung von Sauerstoff und HPODE bei der Lipoxygenase-katalysierten Linolsäure-Peroxidation können so unter optimierten Reaktionsbedingungen beim Einsatz einer 45 cm langen Kapillare (I.D. = 25 μm) vier Proben während einer Reaktionszeit von 80 Sekunden injiziert werden (s. Abb. 16). Nach einer Analysenzeit von 5 bis 6 Minuten kann dieser Injektionsmodus wiederholt

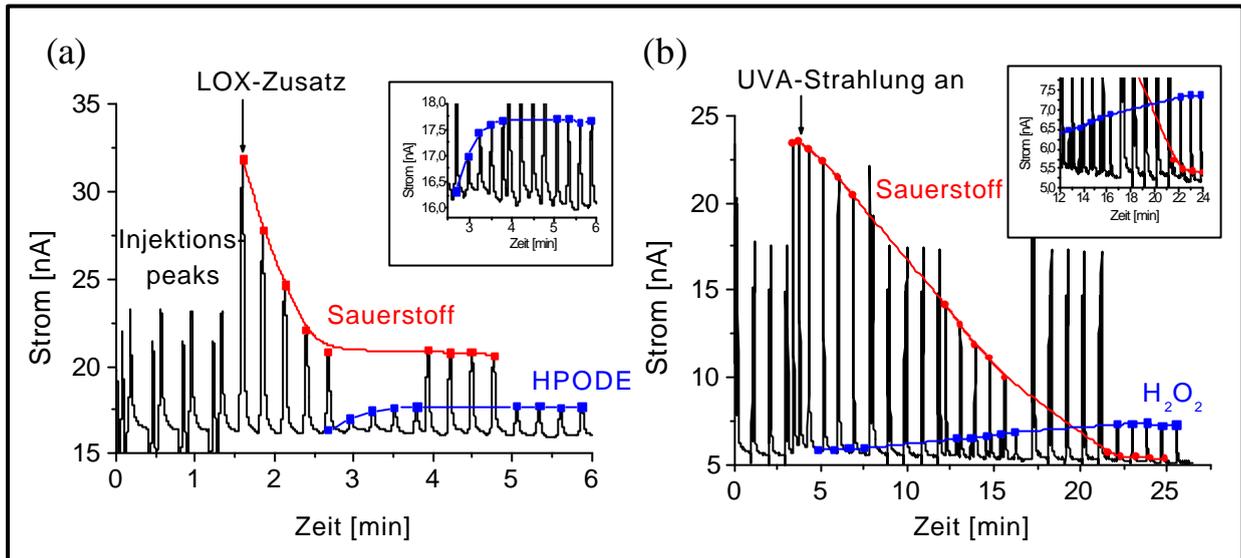


Abb. 16 Beispielelektropherogramme für die simultane Bestimmung (a) des O₂-Verbrauchs und der HPODE-Bildung bei der Lipoxygenase-katalysierten Linolsäure-Peroxidation und (b) des O₂-Verbrauchs und der H₂O₂-Bildung bei dem UVA-induzierten Ketoprofen-Abbau

werden, so daß der zeitliche Verlauf der zu untersuchenden Reaktion prinzipiell über einen beliebigen Zeitraum verfolgt werden kann. Eine weitere Variation des Injektionsmodus besteht darin, die Probeninjektion erst nach der erfolgten Detektion aller Analyten des vorhergehenden Laufs fortzusetzen. Dies hat den Vorteil, daß eine Überlagerung einzelner Peaks aus verschiedenen Injektionen grundsätzlich ausgeschlossen werden kann. Da dieser Injektionsmodus eine erhebliche Verlängerung der Analysenzeit mit sich bringt, wird er vorrangig bei langsam ablaufenden Reaktionen eingesetzt.

3.5.1.3 Stabilität des Injektionsvorgangs und der Elektrodenresponse

Eine grundsätzliche Voraussetzung für alle Analysenmethoden ist die Reproduzierbarkeit des Meßsignals. Diese wird in der vorgestellten Methode hauptsächlich durch die Konstanz des Injektionsvorganges und die Inaktivierung der Elektrodenoberfläche infolge von Adsorptionsvorgängen verschiedener Probenbestandteile bestimmt. Zur Abschätzung der praktisch

erreichbaren Reproduzierbarkeit des elektrochemischen Signals wurden O_2 , H_2O_2 und HPODE in verschiedenen Modellgemischen bestimmt.

Aus früheren Untersuchungen war bekannt, daß die Anwesenheit von Linolsäure in den Probelösungen zur Inaktivierung der Elektrodenoberfläche im Laufe eines Meßtages führt. Dies konnte durch den Einsatz einer 50 %-igen methanolischen 10 mM Boratlösung im Kathodengefäß vermieden werden, was auch bei den aktuellen Messungen angewandt wurde. Für die statistische Absicherung des Injektionsvorgangs und der Meßmethode wurden verschiedene Modellgemische (10 mM Boratlösung, 6×10^{-4} M H_2O_2 und $2,5 \times 10^{-4}$ M HPODE) hergestellt und mehrfach ($n = 42$) injiziert. Die Auswertung des Meßsignals erfolgte vergleichend über die Bestimmung der Peakfläche (AUC) bzw. der Peakhöhe (h). Abb. 15 b zeigt die hohe Reproduzierbarkeit des Meßsignals, die bei der Bestimmung des Sauerstoffgehaltes (ca. 8 mM) einer 10 mM Boratlösung erreicht werden kann. Die relative Standardabweichung der Peakhöhe beträgt 0,7 %, die der Peakfläche 0,9 %. Im Vergleich hierzu wurde bei der Injektion der H_2O_2 - bzw. HPODE-haltigen Untersuchungslösungen eine größere Varianz der ermittelten Peakflächen und Peakhöhen des H_2O_2 - und HPODE-Signals festgestellt. Diese Differenzen scheinen vor allem auf das kleinere Signal-Rausch-Verhältnis der im Vergleich zum Sauerstoff (ca. 8 mM) in einer geringeren Konzentration vorliegenden Analyten H_2O_2 (6×10^{-4} M) und HPODE ($2,5 \times 10^{-4}$ M) zurückzuführen zu sein. Weiterhin führt die dichte Sequenz der Injektionen der

	Analyten		Mittelwert	SD	rel. SD
Peak- Fläche (AUC)	10 mM Borax	O_2	697,77	6,28	0,90
	6×10^{-4} M H_2O_2	O_2	723,23	16,75	2,32
		H_2O_2	488,06	16,13	3,30
	$2,5 \times 10^{-4}$ M HPODE	O_2	537,07	16,05	2,99
		HPODE	271,01	10,00	3,69
	Peak- Höhe (h)	10 mM Borax	O_2	208,80	1,44
6×10^{-4} M H_2O_2		O_2	183,01	2,64	1,44
		H_2O_2	148,98	2,23	1,50
$2,5 \times 10^{-4}$ M HPODE		O_2	186,18	2,32	1,25
		HPODE	72,60	1,98	2,73

Tab. 2 Statistische Auswertung der Meßsignale ($n = 42$)

Analysenlösungen, die neben Sauerstoff noch andere elektrochemisch detektierbare Analyten wie z.B. HPODE und H_2O_2 enthalten, zu Überlappungen im Anfangs- und Endbereich aufeinanderfolgender Peaks, die als weitere Ursache für eine im Vergleich zu den reinen 10 mM Borat-Lösungen erhöhte Standardabweichung der Analyten Sauerstoff, H_2O_2 und HPODE in Betracht kommen. Allgemein scheint die Peakhöhe eine höhere Reproduzierbarkeit als die Peakfläche zu besitzen, wobei die relative Standardabweichung in beiden Fällen kleiner als 4 % ist.

3.5.2 Einsatz der CE-ED als in-vitro-Testsystem für die Bestimmung der IC_{50} neu synthetisierter Lipoxygenase-Inhibitoren

Lipoxygenasen (LOX) gehören zu der Familie der Dioxygenasen und katalysieren regiospezifische Umsetzungen von Fettsäuren mit einem (1Z,4Z)-Pentadiensystem und molekularem Sauerstoff unter der Bildung von Hydroperoxyfettsäuren.

Im menschlichen Organismus sind neben verschiedenen Cyclooxygenasen (COX1, COX2) die Lipoxygenasen (5-LOX, 12-LOX, 15-LOX) maßgeblich an der oxidativen Metabolisierung der Arachidonsäure beteiligt. Die hierbei entstehenden Hydroperoxy-eicosatetraen-Säuren (HPETE) stellen Intermediate in der Biosynthese einer Reihe biologisch hochaktiver Substanzen, den Hydroxy-eicosatetraensäuren (HETE) dar.

Für die Bestimmung der halbmaximalen Hemmkonzentration (IC_{50}) neu synthetisierter Lipoxygenase-Inhibitoren hat sich neben der chromatographischen Bestimmung der Leukotriene in den letzten Jahren im Institut die Bestimmung des Sauerstoffverbrauchs der Lipoxygenase-katalysierten Oxidation von Linolsäure mit Hilfe einer Clark-Elektrode [149] durchgesetzt.

Die nachfolgenden vergleichenden Untersuchungen zeigen, daß die CE-ED in Verbindung mit der vorgestellten Injektionsvorrichtung eine vorteilhafte Alternative zur bisher eingesetzten Clark-Elektrode bei der Testung neuer Lipoxygenase-Inhibitoren darstellt.

3.5.3 Vergleichende Bestimmung der IC_{50} -Werte ausgewählter Lipoxygenase-Inhibitoren mit verschiedenen analytischen Methoden

3.5.3.1 Versuchsdurchführung

Um die mit dem neuen System erhaltenen halbmaximalen Hemmwerte (IC_{50}) mit den bereits bekannten durch die Bestimmung des Sauerstoffverbrauchs mit Hilfe der Clark-Elektrode erhaltenen Werten ausgewählter Lipoxygenase-Inhibitoren vergleichen zu können, wurden die in diesen Untersuchungen gewählten Enzym- und Substratparameter

- | | |
|-------------------------|---------------------------------------|
| • Puffer | Boratpuffer nach Sørensen pH 8,5 |
| • Inkubationstemperatur | 35 °C |
| • Enzym | 2×10^{-8} mol/l Lipoxygenase |
| • Substrat | 2×10^{-4} mol/l Linolsäure |

auch bei der Verwendung der CE-ED als Meßsystem beibehalten. Da die untersuchten Lipoxygenase-Inhibitoren nur eine stark begrenzte Löslichkeit im wäßrigen Medium besitzen, wurden die Verdünnungsreihen der Hemmsubstanzen grundsätzlich in DMF hergestellt und während eines

Meßtages lichtgeschützt bei Raumtemperatur aufbewahrt, wohingegen die verwendeten Enzym- und Substratlösungen zusätzlich in Eis gelagert wurden.

Für die Bestimmung der IC_{50} -Werte unter Zuhilfenahme der CE-ED wurde die Reaktionskammer der Injektionsvorrichtung zunächst mit dem vorinkubierten, luftsauerstoffgesättigten Boratpuffer gefüllt und zur Vermeidung eines ungewollten Sauerstoffaustauschs mit einem Plastikstopfen (mit drei Injektionsöffnungen) verschlossen. Durch eine dieser Öffnungen erfolgte anschließend eine Injektion von 11 μ l Enzymlösung, so daß die Enzymkonzentration im Reaktionsraum 2×10^{-8} mol/l betrug. Nachdem 10 μ l der frisch hergestellten Inhibitorlösung in die Reaktionskammer durch eine zweite Injektionsöffnung des Stopfens injiziert wurden, begann die übliche dreiminütige Inkubation des Enzyms mit der Hemmsubstanz. Während der Inkubationszeit wurde der erste Injektionszyklus von drei Injektionen im Abstand von 25 s zur Bestimmung der Sauerstoff-Konzentration (= Ausgangswert) gestartet und 10 Sekunden nach der dritten Injektion gestoppt. Nach Abschluß der Inkubationszeit wurde die Reaktion durch den Zusatz der Substratlösung gestartet, wobei der zweite Injektionszyklus (vier Injektionen im Abstand von 25 Sekunden) zur Bestimmung des Sauerstoff- und HPODE-Gehaltes aufgrund der manuellen Injektion der Substratlösung und Zuschaltung der Hochspannung mit einer Verzögerung von 8 Sekunden begann.

Die Inhibition wurde durch den Vergleich der Reaktionsgeschwindigkeiten der gehemmten und ungehemmten Reaktion nach dem Tangenten-Verfahren ermittelt. Durch eine nichtlineare Regression der erhaltenen Datenpunkte erfolgte die Bestimmung der IC_{50} -Werte.

3.5.4 Ergebnisse und Diskussion

Beim Vergleich der in Tab. 3 dargestellten IC_{50} -Werte beider Testsysteme wird deutlich, daß die sowohl über den Sauerstoffverbrauch als auch über die Produktbildungsrate erhaltenen Hemmwerte der CE-ED mit den mit einer Clark-Elektrode über den Sauerstoff-Verbrauch gemessenen Werten im wesentlichen vergleichbar sind.

Getestete Substanz	Halbmaximale Hemmkonzentration (IC_{50})		
	O_2 -Verbrauch [mol/l] (Clark-Elektrode)	O_2 -Verbrauch [mol/l] (CE-ED)	HPODE-Bildung [mol/l] (CE-ED)
LOX-Inhibitor 1	$1,7 \cdot 10^{-7}$	$2,36 \cdot 10^{-7}$	$3,75 \cdot 10^{-7}$
LOX-Inhibitor 2	$1,1 \cdot 10^{-7}$	$5,69 \cdot 10^{-7}$	$4,75 \cdot 10^{-7}$
LOX-Inhibitor 3	$1,4 \cdot 10^{-6}$	$1,42 \cdot 10^{-6}$	$1,7 \cdot 10^{-6}$
LOX-Inhibitor 4	$4,2 \cdot 10^{-8}$	$2,11 \cdot 10^{-8}$	$4,75 \cdot 10^{-8}$
LOX-Inhibitor 5	$1,9 \cdot 10^{-6}$	$1,6 \cdot 10^{-6}$	$5,6 \cdot 10^{-7}$

Tab. 3 Vergleich der mit einer Clark-Elektrode bzw. CE-ED bestimmten IC_{50} -Werte ausgewählter LOX-Inhibitoren (Strukturformeln der LOX-Inhibitoren s. Anhang Tab 1)

Der Einsatz der CE-ED in Kombination mit der im Rahmen der vorliegenden Arbeit entwickelten Injektionsvorrichtung stellt somit ein alternatives Testsystem zur Bestimmung der IC_{50} -Werte neuer Lipoxygenase-Inhibitoren dar, wobei durch den Einsatz der CE-ED die simultane Bestimmung des Sauerstoffverbrauchs und der HPODE-Bildung ermöglicht wird. Dies hat den Vorteil, daß mögliche Fehlinterpretationen eines Sauerstoffverbrauchs, der in keinem Zusammenhang mit der Peroxidation der Linolsäure steht, wie z.B. die Oxidation der Hemmsubstanz oder auch der Zerfall der Hemmsubstanz oder gebildeter Peroxide unter der Freisetzung von Sauerstoff, erkannt werden können. Weiterhin ermöglicht der Einsatz von 1 mM β -Cyclodextrin im Elektrophoresepuffer die Auftrennung der bei der enzymatischen Oxidation gebildeten isomeren Fettsäurehydroperoxide 9-HPODE und 13-HPODE, wodurch neben der Bestimmung der halbmaximalen Hemmkonzentration auch Aussagen zur Selektivität des gehemmten Enzyms und somit Rückschlüsse auf den der Hemmung zugrunde liegenden Reaktionsmechanismus getroffen werden können. Diesbezüglich konnten bei den bisher getesteten Hemmsubstanzen keine Veränderungen im Isomerenverhältnis (9-HPODE/13-HPODE 5/95 [150, 151]) des ungehemmten Enzyms im Vergleich zum gehemmten Enzym nachgewiesen werden.

3.5.5 Zusammenfassung

Die CE-ED stellt eine einfache Methode zur Bestimmung leicht reduzierbarer Verbindungen, wie z.B. verschiedener Peroxide (Wasserstoffperoxid, HPODE), dar. Mit der vorgestellten Injektionsvorrichtung können Proben periodisch aus einem Reaktionsansatz in die Trennkapillare injiziert werden, ohne mit der Gasatmosphäre (Luft) in Berührung zu kommen. Dies hat den Vorteil, daß neben den Peroxiden auch der in den Proben gelöste, elektrochemisch leicht reduzierbare Sauerstoff schnell, präzise und mit einem sehr geringen instrumentellen Aufwand bestimmt werden kann.

Im Rahmen der vorliegenden Arbeit wurde die Apparatur erfolgreich als Testsystem zur Bestimmung der IC_{50} -Werte neu synthetisierter LOX-Inhibitoren eingesetzt. Ausgehend von den vorgestellten Ergebnissen und Voruntersuchungen ergeben sich zahlreiche weitere Anwendungsmöglichkeiten für die beschriebene Apparatur, insbesondere für die Analyse der Kinetik von Peroxid- und Sauerstoffbildenden bzw. -verbrauchenden Prozessen [148]. Im Rahmen der vorliegenden Arbeit konnten mit dieser Anlage Sauerstoffverbrauch und H_2O_2 -Bildung beim photochemischen Zerfall von Ketoprofen simultan verfolgt werden (s. Abb. 16). Da der Schwerpunkt dieser Arbeit jedoch auf anderen Themen lag, wurde das Potential dieser Methode hier nicht ausgeschöpft und bleibt künftigen Untersuchungen vorbehalten.

4 Untersuchungen zum photochemischen Verhalten wäßriger Ketoprofen-Lösungen

4.1 Screening der photochemischen Stabilität topisch angewandter NSAR vom Arylpropion- und Arylessigsäuretyp

4.1.1 Allgemeines

Die meisten NSAR vom Arylpropionsäure- und Arylessigsäure-Typ sind photochemisch aktiv und weisen bereits in der Gegenwart von UVA-Strahlung deutliche Instabilitäten auf. Besonders bei topisch angewandten NSAR muß diese Eigenschaft aufgrund einer möglichen UVA-Exposition der behandelten Hautareale durch Sonnenlicht berücksichtigt werden. Aus diesem Grund wurden für die nachfolgenden Untersuchungen die in Deutschland für eine topische Therapie zugelassenen NSAR Ketoprofen, Diclofenac und Ibuprofen ausgewählt und einem allgemeinen Screening unter folgenden Gesichtspunkten unterzogen:

- Wirkstoffstabilität der wäßrigen Arzneistofflösungen gegenüber UVA-Licht,
- photosensibilisierendes Potential gegenüber ungesättigten Fettsäuren (Linolsäure) und
- Wasserstoffperoxid-bildendes Potential unter dem Einfluß von UVA-Licht.

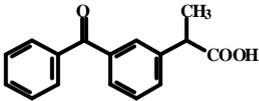
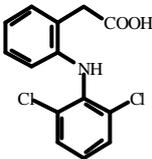
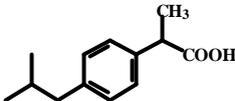
4.1.2 Versuchsdurchführung

Die Bestimmung der Wirkstoffstabilität und des H_2O_2 -bildenden Potentials erfolgte mit 1 mM wäßrigen Phosphat-gepufferten (pH 7,4) Arzneistofflösungen. Um eine mögliche photosensibilisierte Peroxidation ungesättigter Molekülstrukturen nachweisen zu können, wurde diesen Arzneistofflösungen in einem weiteren Versuch als Empfängermolekül für oxidative Schäden Linolsäure zugesetzt, so daß die Endkonzentration der Linolsäure 1 mM betrug. Anschließend wurden alle Proben mit verschiedenen UVA-Dosen (0; 3; 6; 12 und 18 J/cm²) bestrahlt und analysiert.

Die simultane Bestimmung von Ketoprofen und HPODE erfolgte mit Hilfe der CE-UV bei einer Wellenlänge von 234 nm, H_2O_2 (und HPODE) wurden elektrochemisch (CE-ED) bei einem Potential von -600 mV bestimmt.

4.1.3 Ergebnisse und Diskussion

Aus den schematisch dargestellten Ergebnissen in Tab. 4 wird deutlich, daß die photochemische Stabilität der untersuchten NSAR in der Reihenfolge Ibuprofen > Diclofenac > Ketoprofen abnimmt (Anhang Abb. 2). Da Ibuprofen auch nach einer UVA-Dosis von 18 J/cm² keinen nachweisbaren strukturellen Veränderungen unterliegt, kann davon ausgegangen werden, daß Ibuprofen unter den gegebenen Versuchsbedingungen photochemisch stabil ist. Ein anderes Verhalten zeigten die Diclofenac- und Ketoprofen-haltigen Untersuchungslösungen. Während die Diclofenac-Konzentration nach einer UVA-Dosis von 18 J/cm² auf 76,5 Prozent ihrer Ausgangskonzentration sank, konnte in

	Ketoprofen	Diclofenac	Ibuprofen
Struktur			
Photostabilität	sehr gering	relativ stabil	stabil
Linolsäure-Peroxidation	+++	-	-
H ₂ O ₂ -Bildung	+++	-	-

Tab. 4 Photochemisches Verhalten verschiedener NSAR (+++ stark, - nicht nachweisbar)

den Ketoprofen-haltigen Proben bereits nach einer UVA-Dosis von 6 J/cm² kein Ketoprofen mehr nachgewiesen werden. Weiterhin war der photoinduzierte Diclofenac- und Ketoprofen-Zerfall von einer sichtbaren Veränderung der Untersuchungslösung begleitet. Während die bestrahlten 1 mM Diclofenac-Lösungen eine hellgelbe Färbung aufwiesen, trat bei den Ketoprofen-haltigen Untersuchungslösungen in Abhängigkeit von der eingestrahlenen UVA-Dosis eine milchig weiße Trübung auf.

Betrachtet man die photosensibilisierte Linolsäure-Peroxidation in Abhängigkeit von der eingesetzten NSAR-Konzentration (Anhang Abb. 2), so kann man feststellen, daß eine erhöhte UVA-induzierte Linolsäure-Peroxidation im Vergleich zur wirkstofffreien Kontrolle nur bei Präsenz von Ketoprofen auftrat. Besonders hervorzuheben ist in diesem Zusammenhang, daß in den UVA-exponierten Ketoprofen-haltigen Untersuchungslösungen in Abhängigkeit von der eingesetzten UVA-Dosis neben HPODE erhebliche Mengen H₂O₂ entstehen. Da auch bei dem ergänzend durchgeführten Screening einiger systemisch angewandter Strukturabkömmlinge (Benoxaprofen, Indoprofen und Biphenylessigsäure) weder eine Arzneistoff-sensibilisierte Linolsäure-Peroxidation noch die Bildung von H₂O₂ nachgewiesen werden konnte, nimmt Ketoprofen innerhalb der untersuchten NSAR vom Arylpropion- und Arylessigsäure-Typ eine Sonderstellung ein.

4.2 Photochemische Untersuchungen zum UV-induzierten Zerfall von Ketoprofen in wäßrigen Lösungen

4.2.1 Versuchsdurchführung

Für die UV-Bestrahlung wurden 10 ml einer 0,5 mM Ketoprofen-Lösung in Planschliffgläser mit einem Innendurchmesser von 5,1 cm überführt und unter ständigem Rühren mit verschiedenen UVA- bzw. UVB-Dosen bestrahlt. Die Probenentnahme von je 0,5 ml erfolgte nach einer UVA-Dosis von 0; 1; 2; 4; 6; 8; 10; 12 und 14 J/cm² bzw. nach einer UVB-Dosis von 0; 100; 200; 400; 600; 800; 1000; 1200 und 1400 mJ/cm². Zur Bestimmung des Ketoprofen-Gehaltes der bestrahlten Lösungen diente die CE-UV bei 257 nm, zur Bestimmung der H₂O₂-Konzentration die CE-ED bei einem Potential von -600 mV.

4.2.2 Ergebnisse und Diskussion

Ziel der vorliegenden Untersuchungen war es, den UV-induzierten Ketoprofen-Abbau und die hieraus resultierende Bildung von H₂O₂ in einer 0,5 mM wäßrigen Ketoprofen-Lösung (pH 7,4) in Abhängigkeit von der eingestrahnten UV-Dosis darzustellen. Um einen vollständigen photochemischen Umsatz des Ketoprofens zu realisieren und die photoinduzierte Bildung von H₂O₂ auch über den vollständigen photochemischen Ketoprofen-Zerfall hinaus verfolgen zu können, wurden für diese Untersuchungen im Vergleich zu den üblicherweise eingesetzten UV-Dosisbereichen (UVA-Dosen bis 8 mJ/cm² bzw. UVB bis 120 mJ/cm²) auch höhere UV-Dosen (UVA bis 14 J/cm² bzw. UVB bis 1,4 J/cm²) eingesetzt.

Betrachtet man den in Abb. 17 a dargestellten Verlauf des photochemisch induzierten Ketoprofen-Abbaus in Abhängigkeit von der eingestrahnten UVB-Dosis, so kann man feststellen, daß die Ketoprofen-Konzentration mit zunehmender UVB-Dosis einem annähernd exponentiellen Abfall folgt. Bereits nach einer UVB-Dosis von 1 J/cm² konnte in den bestrahlten Lösungen kein Ketoprofen mehr nachgewiesen werden. Im Gegensatz hierzu läßt der parallel bestimmte H₂O₂-Gehalt (Abb. 17 b) einen nahezu linearen Zusammenhang zwischen eingestrahelter UVB-Dosis und entstandenem H₂O₂ im UVB-Dosisbereich von 0 bis 1,4 J/cm² erkennen, wobei oberhalb einer UVB-Dosis von 1 J/cm² eine leichte Zunahme des Anstieges beobachtet werden konnte. Der absolute H₂O₂-Gehalt betrug nach der maximalen UVB-Dosis von 1,6 J/cm² 0,11 mMol.

Unter dem Einfluß von UVA-Licht folgt der photochemisch induzierte Ketoprofen-Abbau ebenfalls einem näherungsweise exponentiellen Verlauf (Abb. 18 a). Der vollständige Ketoprofen-Abbau wird jedoch erst bei einer UVA-Dosis von 4 J/cm² erreicht. Dieses Ergebnis korrespondiert mit der im Vergleich zum längerwelligen, energieärmeren UVA-Bereich (320 – 360 nm) deutlich höheren

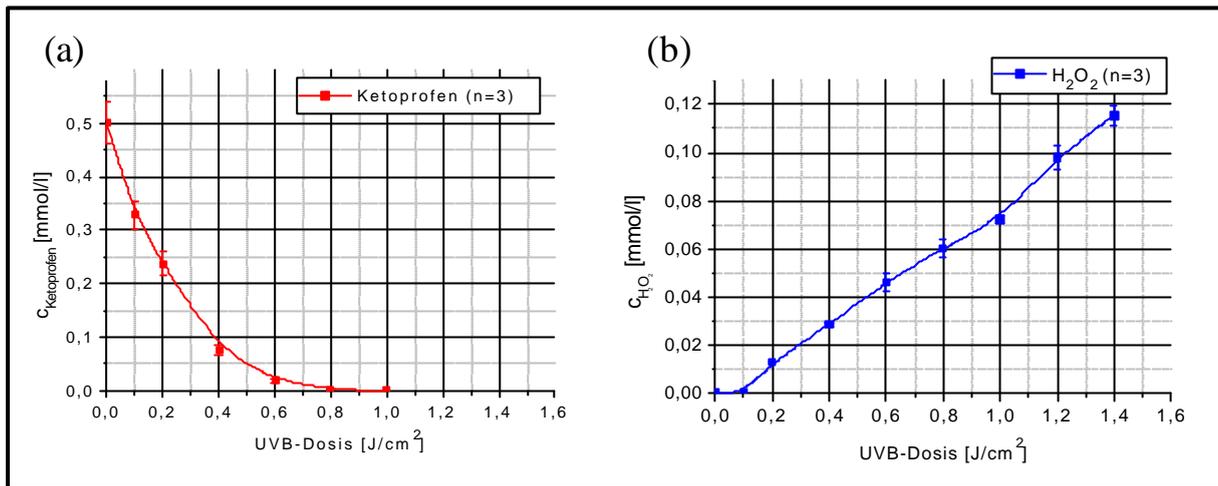


Abb. 17 (a) UVB-induzierter Ketoprofen-Abbau und (b) Bildung von Wasserstoffperoxid

Absorption des Ketoprofens im kürzerwelligen, energiereicheren UVB-Bereich (290 – 320 nm) (vgl. Abb. 4).

Auch beim UVA-Dosis-abhängigen Verlauf der H₂O₂-Bildung zeigen sich Gemeinsamkeiten und Unterschiede zu den UVB-bestrahlten Proben. So steigt auch bei diesen Untersuchungen die H₂O₂-Konzentration mit zunehmender Strahlungsdosis über den gesamten Dosisbereich an (Abb. 18 b). Im Gegensatz zu den UVB-bestrahlten Proben verringert sich die zunächst starke Zunahme des H₂O₂-Gehaltes ab einer UVA-Strahlungsdosis von 4 J/cm² wieder, um oberhalb einer UVA-Dosis von 8 J/cm² in einen nahezu linearen Anstieg überzugehen. Bei der maximalen UVA-Dosis von 14 J/cm² wurden 0,22 mMol Wasserstoffperoxid im Reaktionsgemisch detektiert.

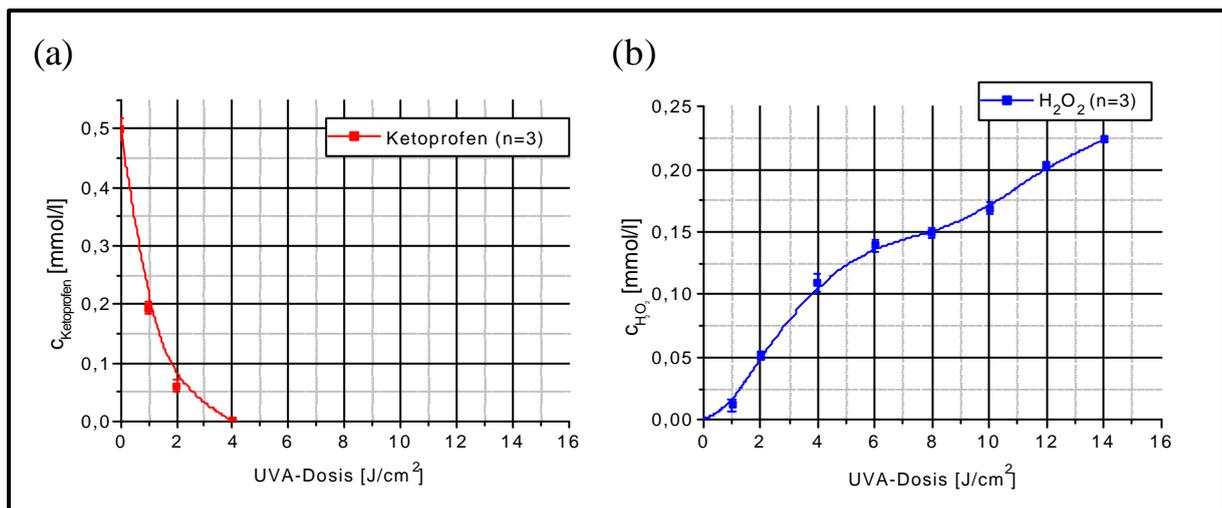


Abb. 18 (a) UVA-induzierter Ketoprofen-Abbau und (b) Bildung von Wasserstoffperoxid

Bemerkenswert erscheint der Umstand, daß sowohl die unter UVB beobachtete leichte Erhöhung des Anstieges als auch die unter UVA beobachtete Verringerung der H₂O₂-Bildung mit der jeweiligen Strahlungsdosis des vollständigen Ketoprofen-Abbaus zusammenfällt. Da eine weitere UV-Exposition der Lösungen, die nach einer UVB-Dosis von 0,8 J/cm² und einer UVA-Dosis von 4 J/cm² nur noch Photoprodukte, aber kein Ketoprofen mehr enthalten, zu einer weiteren Erhöhung des H₂O₂-Gehaltes

in den Untersuchungslösungen führt, liegt der Schluß nahe, daß H_2O_2 nicht nur während des photochemischen Zerfalls von Ketoprofen, sondern auch durch dessen Photoprodukten erzeugt wird. Ausgehend von den durch Bosca publizierten Unterschieden der photosensibilisierenden Eigenschaften der einzelnen Ketoprofen-Photoprodukte gegenüber der Peroxidation von Linolsäure [18] ist anzunehmen, daß die Ketoprofen-Photoprodukte auch die photochemisch induzierte H_2O_2 -Bildung unterschiedlich stark sensibilisieren. Der besonders bei den UVA-bestrahlten Proben auffällige nicht lineare Verlauf der H_2O_2 -Zunahme könnte somit auf die Unterschiede in der Zusammensetzung der Ketoprofen-Photoprodukt-Lösung (Anhang Abb. 1) zurückzuführen sein, die sich bei unterschiedlichen UVA-Dosen ergeben.

4.3 Photochemische Untersuchungen Linolsäure-haltiger wäßriger Ketoprofen-Lösungen

4.3.1 Versuchsdurchführung

Für diese Untersuchungen wurden als Stammlösungen eine 2 mM Linolsäure-Lösung und eine 1 mM Ketoprofen-Lösung verwendet. Beide Lösungen wurden 5 min mit Ultraschall behandelt und anschließend zu gleichen Teilen vereinigt, so daß die Endkonzentration der Linolsäure im Testsystem 1 mM und die des Ketoprofens 0,5 mM betrug. Für die UV-Bestrahlung (s. Kap. 10.1.8) wurden je 10 ml dieser Untersuchungslösung in Planschliffgläser mit einem Innendurchmesser von 5,1 cm überführt. Die Probenentnahme von 0,5 ml erfolgte nach einer UVA-Dosis von 0; 1; 2; 3; 4; 6 und 8 J/cm². Die photochemisch induzierte Bildung von HPODE und der Abbau des Arzneistoffes wurden simultan mit der CE-UV bei einer Wellenlänge von 234 nm verfolgt.

4.3.2 Ergebnisse und Diskussion

Ziel der Untersuchungen war festzustellen, in welchem Ausmaß die UVA-induzierte Peroxidation der Linolsäure durch die Präsenz von 0,5 mM Ketoprofen beeinflusst wird. Aus Abb. 19 b wird deutlich, daß die Linolsäure-Peroxidation durch die Anwesenheit von Ketoprofen stark sensibilisiert wird. Betrachtet man den HPODE-Gehalt der Ketoprofen-freien Kontrollösungen in Abhängigkeit von der eingestrahlten UVA-Dosis, so erkennt man einen nahezu linearen Zusammenhang zwischen beiden Größen. Im Gegensatz hierzu zeigen die Ketoprofen-haltigen Proben ein grundsätzlich anderes Verhalten. Der zunächst lineare, jedoch deutlich steilere Anstieg im UVA-Dosisbereich von 0 bis 2 J/cm² verringert sich bei weiterer Bestrahlung. Oberhalb von etwa 4 J/cm² sinkt der HPODE-Gehalt

im Reaktionsgemisch wieder ab und nähert sich bei einer UVA-Dosis von 8 J/cm^2 dem HPODE-Gehalt der reinen Linolsäure-Lösung an.

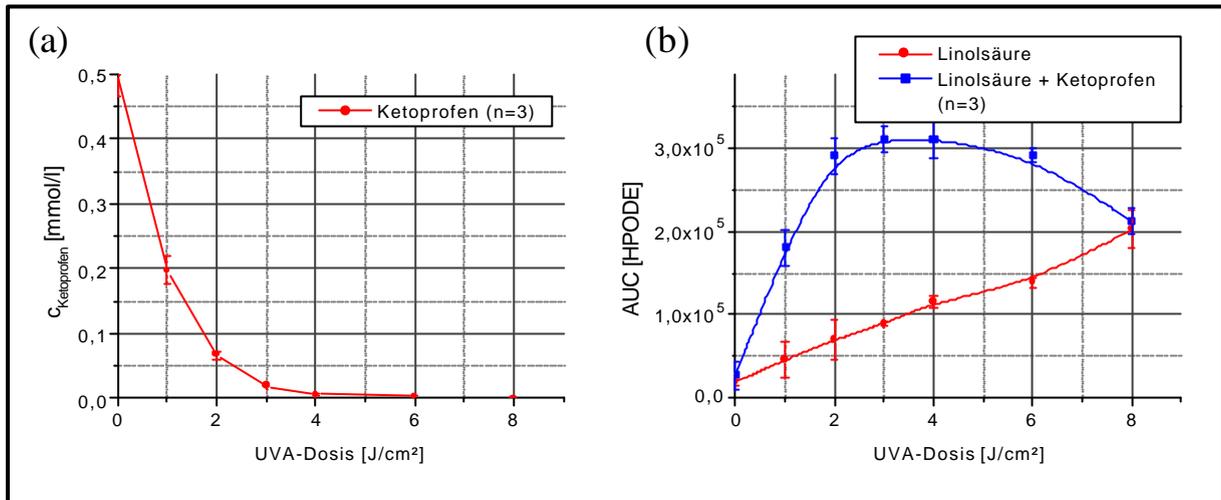


Abb. 19 (a) UVA-induzierter Abbau von Ketoprofen im Phosphat-gepufferten wäßrigen Medium (pH 7,4) (b) Einfluß von Ketoprofen auf die UVA-induzierte Peroxidation von Linolsäure

Dieser zunächst unerwartete UVA-Dosis-abhängige Verlauf der photochemisch induzierten HPODE-Entstehung läßt sich wie folgt erklären: Aus der Literatur ist bekannt, daß das peroxidbildende Potential der Ketoprofen-Photoprodukte generell geringer ist als das des Ketoprofens [18]. Weiterhin handelt es sich bei den gebildeten Ketoprofen-Photoprodukten um nicht mehr dissoziationsfähige lipophile Strukturen, die unter den gegebenen Versuchsbedingungen (wäßriger Phosphatpuffer pH 7,4) „ausfallen“ bzw. emulgieren und somit photochemisch nicht mehr voll wirksam sein können. Geht man davon aus, daß nach einer UVA-Dosis von 4 J/cm^2 kein Ketoprofen mehr in der Lösung vorhanden ist (Abb. 19 a), so sollte es in diesem Dosisbereich aufgrund der im Vergleich zu Ketoprofen geringeren photochemischen Aktivitäten (k_1 bis k_4 , vgl. Abb. 20) der einzelnen Photoprodukte zu einer Reduktion der HPODE-Bildung kommen. Der Anstieg der entsprechenden

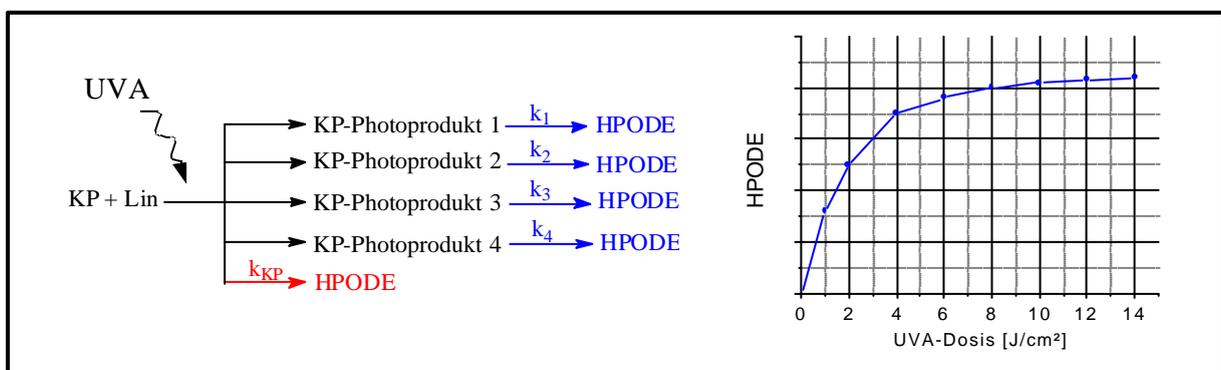


Abb. 20 Schematische Darstellung der Ketoprofen-induzierten HPODE-Bildung unter Ausschluß von HPODE-abbauenden Prozessen

Kurve in Abb. 19 b müßte sich daher verringern, aufgrund der photosensibilisierenden Wirkung der Photoprodukte sowie der Autoxidation der Linolsäure aber immer deutlich größer als Null bleiben (Abb. 20). Während sich die Verringerung des Anstiegs auch im Experiment bestätigt (s. Abb. 19 b), beobachtet man ab einer UVA-Dosis von 4 J/cm^2 überraschenderweise eine Abnahme der HPODE-Konzentration, also im Gegensatz zur obigen Überlegung einen negativen Anstieg. Offenbar überwiegen nach der vollständigen photochemischen Zersetzung des Ketoprofens HPODE-abbauende Reaktionen, die vermutlich auf die Wirkung der Photoprodukte zurückzuführen sind. In diesem Falle würde das immer noch gebildete HPODE in zunehmendem Maße zerstört werden, was im Falle von $\sum k_x < \sum k_{xa}$ ($x = 1, 2, 3, 4$; vgl. Abb. 20 und Abb. 21) letztlich zur Abnahme des Gesamt-HPODE-Gehaltes führt.

Der experimentell beobachtete Verlauf der Linolsäure-Peroxidation in wässrigen Ketoprofen-Lösungen (Abb. 19a) ließe sich somit aus einer Überlagerung der in den Abb. 20 und Abb. 21 dargestellten theoretischen Kurven erklären.

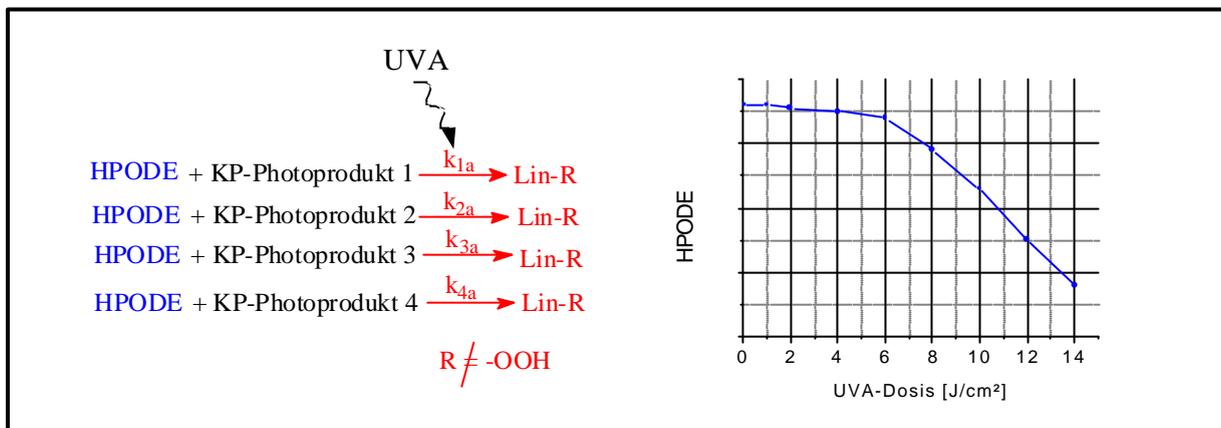


Abb. 21 Schematische Darstellung des UVA-induzierten HPODE-Abbaus durch die gebildeten Ketoprofen-Photoprodukte unter Ausschluß HPODE-bildender Prozesse

Um die vorgestellte Hypothese experimentell belegen zu können, wurden weitere Untersuchungen durchgeführt, bei denen zum einen der Einfluß der Ketoprofen-Photoprodukte auf das bereits gebildete HPODE unter verschiedenen UVA-Dosen und zum anderen der Einfluß der Ketoprofen-Photoprodukte auf die photochemisch induzierte Linolsäure-Peroxidation untersucht wurden.

4.4 Einfluß der Ketoprofen-Photoprodukte auf die Linolsäure-Peroxidation unter UVA-Bestrahlung

Gegenstand der nachfolgenden Untersuchungen ist die Frage, ob und in welchem Ausmaß ein Abbau von bereits vorhandenem HPODE durch die photochemisch gebildeten Ketoprofen-Photoprodukte in Abhängigkeit von der eingestrahelten UVA-Dosis erfolgt.

4.4.1 Versuchsdurchführung

Da sich die Zusammensetzung der Ketoprofen-Photoprodukte in Abhängigkeit von der eingestrahlten UVA-Dosis stark ändert (s. Anhang Abb. 1), wurden bei diesen Untersuchungen sowohl mit 1 J/cm^2 (KP-Phot 1) als auch mit 6 J/cm^2 (KP-Phot 6) bestrahlte 1 mM wässrige Ketoprofen-Lösungen als Ketoprofen-Photoprodukt-Lösung eingesetzt. Diese Lösungen wurden mit einer frisch hergestellten, Linolsäure-freien HPODE-Lösung (s. Kap. 10.1.7) im Verhältnis 1:1 (V/V) gemischt, so daß die Endkonzentration der „Photoprodukte“ und des HPODE $0,5\text{ mM}$ betrug. Anschließend wurden die so erhaltenen Untersuchungslösungen mit verschiedenen UVA-Dosen ($0; 1; 2; 3; 4; 6; 8; \text{ und } 16\text{ J/cm}^2$) bestrahlt und zur Bestimmung des HPODE-Gehaltes der CE-UV (234 nm) zugeführt. Alle Untersuchungen erfolgten im Vergleich zu einer Photoprodukt-freien HPODE-Lösung gleicher Konzentration.

Um eine Reduktion des HPODE-Gehaltes durch direkte Interaktionen, d.h. ohne UV-Licht, zwischen den Ketoprofen-Photoprodukten und HPODE ausschließen zu können, wurden die Photoprodukt-Lösungen mit der HPODE-Lösung jeweils 1:1 gemischt und unter Ausschluß von UVA-Licht über einen Zeitraum von $7,5\text{ h}$ alle 20 min bei 234 nm analysiert.

4.4.2 Ergebnisse und Diskussion

Aus den in Abb. 22 a dargestellten Meßergebnissen geht hervor, daß die Gegenwart der Ketoprofen-Photoprodukte unter Ausschluß von UVA-Licht über einen Zeitraum von $7,5\text{ h}$ keine wesentliche Veränderung des HPODE-Gehaltes der Untersuchungslösung zur Folge hat. Dagegen kommt es mit

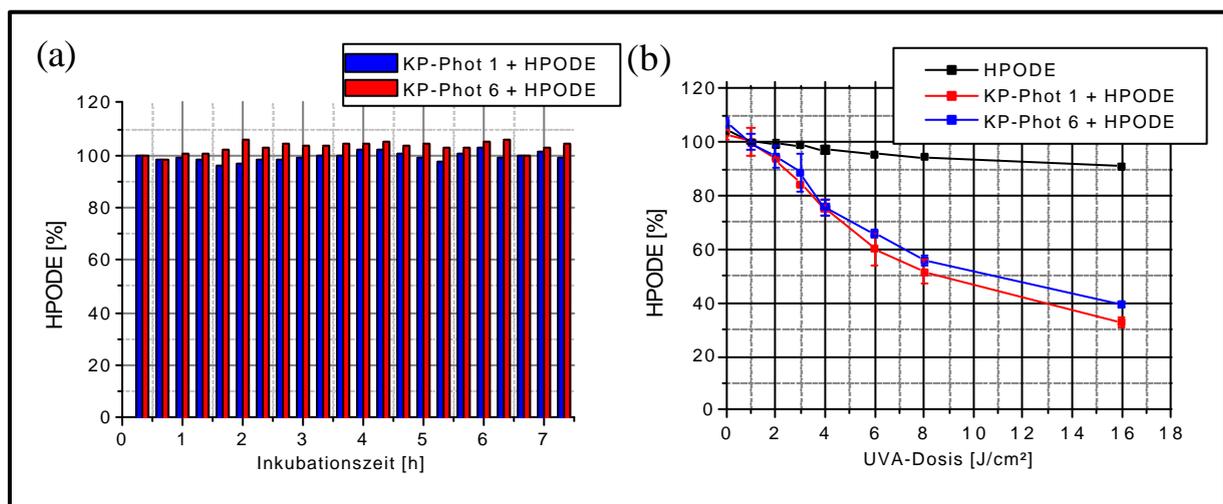


Abb. 22 HPODE-Gehalt einer Ketoprofen-Photoprodukt-haltigen HPODE-Lösung (a) unter Ausschluß von UVA-Licht in Abhängigkeit von der Inkubationszeit und (b) unter dem Einfluß von UVA-Licht ($n = 3$)

zunehmender UVA-Dosis unabhängig von der eingesetzten Photoprodukt-Lösung zu einer immer stärkeren Reduktion des HPODE-Gehaltes. Bei der maximal eingesetzten Dosis von 16 J/cm² konnten im Reaktionsgemisch vorliegt, läßt sich damit anhand der o.g. Hypothese die beobachtete Abnahme des nur noch 33 % (KP-Phot 1) bzw. 39 % (KP-Phot 6) der Ausgangskonzentration nachgewiesen werden. Im Vergleich hierzu sank der HPODE-Gehalt der Photoprodukt-freien bestrahlten Kontrolle nach einer UVA-Dosis von 16 J/cm² nur geringfügig auf 91 % der HPODE-Ausgangskonzentration. Die vorgestellten Meßergebnisse belegen, daß die Ketoprofen-Photoprodukte bei UVA-Bestrahlung nicht nur die Linolsäure-Peroxidation, sondern auch den Abbau von HPODE sensibilisieren. Unter der gegebenen Voraussetzung, daß auch nach einer UVA-Dosis von 4 J/cm² genügend Linolsäure HPODE-Gehaltes bestrahlter 1 mM Ketoprofen-haltiger Linolsäure-Lösungen oberhalb von 4J/cm² erklären. Da die ermittelte HPODE-Konzentration die Summe von Bildungs- und Abbaureaktionen darstellt, können aus diesen Messungen allerdings keine Aussagen zum Verlauf der Einzelreaktionen abgeleitet werden.

4.5 Ketoprofen-sensibilisierte Peroxidation von Linolsäure unter dem Ausschluß der Ketoprofen-Photoprodukte

4.5.1 Allgemeines

Wenn die Ketoprofen-Photoprodukte unter dem Einfluß von UVA-Strahlung entsprechend der unter 4.4.2 beschriebenen Versuchsergebnisse tatsächlich aktiv an der Reduktion des HPODE-Gehaltes beteiligt sind, sollte diese durch eine kontinuierliche Entfernung der Ketoprofen-Photoprodukte aus dem Reaktionsgemisch verringert werden können.

Eine Möglichkeit für die praktische Umsetzung derartiger Untersuchungen stellt die Anwendung eines 2-Phasensystems dar, das aus einer hydrophilen und lipophilen Phase besteht. Die Auswahl des lipophilen Lösungsmittels (Dichlorethan) erfolgte so, daß die hydrophile Phase die obere Phase darstellt, so daß eine ungehinderte UVA-Bestrahlung der wäßrigen Ketoprofen-haltigen Untersuchungslösung möglich war.

4.5.2 Versuchsdurchführung

Damit Ketoprofen (0,5 mM) und Linolsäure (1 mM) möglichst vollständig in der der Strahlungsquelle zugewandten oberen wäßrigen Phase verbleiben, wurde als obere Phase, abweichend von den bisherigen Untersuchungen, 0,1 N NaOH eingesetzt. Für die untere Phase erwies sich Dichlorethan aufgrund der im Vergleich zu Wasser höheren Dichte, Lipophilie und seiner chemischen Stabilität gegenüber UVA-Licht als besonders geeignet.

Für die Untersuchungen wurden je 20 ml der Untersuchungslösung (0,5 mM KP, 1 mM Lin und 0,5 mM KP + 1 mM Lin) mit 20 ml Dichlorethan versetzt. Die Probenentnahme von 0,5 ml der wässrigen Phase erfolgte jeweils nach den verschiedenen UVA-Dosen (0; 1; 2; 3; 4; 6; 8 und 16 J/cm²). Alle Untersuchungen im 2-Phasensystem wurden im direkten Vergleich zu den reinen alkalischen Untersuchungslösungen (0,1 N NaOH) durchgeführt. Die simultane Bestimmung des Ketoprofen- und HPODE-Gehaltes erfolgte mit Hilfe der CE-UV bei einer Wellenlänge von 234 nm.

4.5.3 Ergebnisse und Diskussion

Der Vergleich der in Abb. 23 a dargestellten UVA-Dosis-abhängigen Verläufe des photochemisch induzierten Ketoprofen-Abbaus macht deutlich, daß dieser unabhängig von der gewählten Versuchsanordnung (1-Phasensystem/2-Phasensystem) ist.

Im Gegensatz hierzu ergeben sich für die photochemisch induzierte Peroxidation der Linolsäure in Gegenwart von 0,5 mM Ketoprofen deutliche Unterschiede (Abb. 23 b). Betrachtet man den Verlauf des gebildeten HPODE im 2-Phasensystem, so kann man über den gesamten UV-Dosisbereich von 0 bis 16 J/cm² eine kontinuierliche Zunahme des HPODE-Gehaltes in Abhängigkeit von der

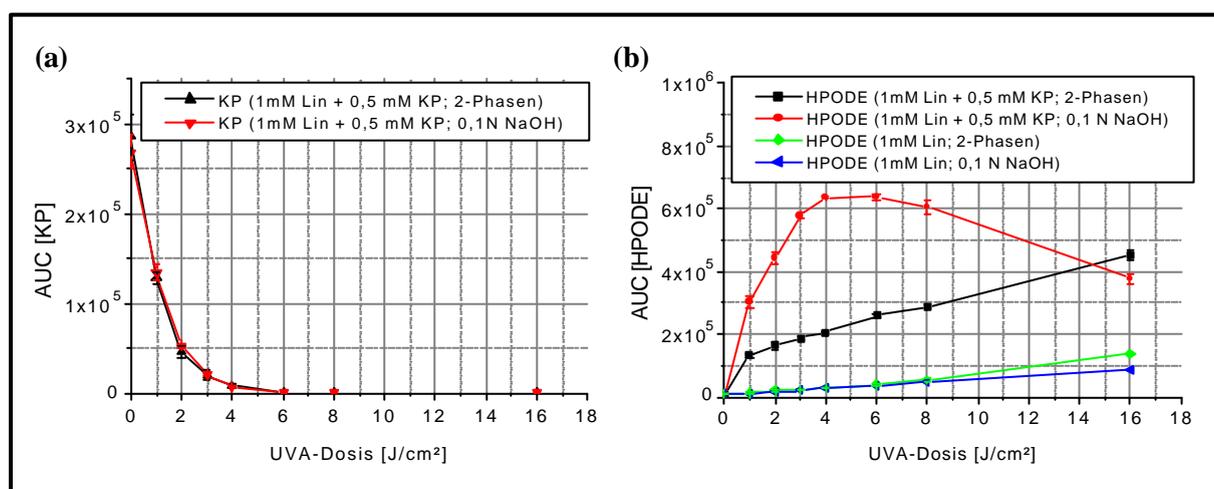


Abb. 23 Verlauf des photoinduzierten (a) Ketoprofen-Abbaus und (b) der Linolsäure-Peroxidation in Abhängigkeit von den Versuchsbedingungen (s. Text)

eingestrahlten UVA-Dosis feststellen. Hingegen ergab sich bei der Verwendung von 0,1 N NaOH (1-Phasensystem) der bereits beim Einsatz von PB-Puffer (pH 7,4) als Lösungsmittel erhaltene charakteristische Verlauf des HPODE-Gehaltes in Abhängigkeit von der eingestrahlten UVA-Dosis (vgl. Abb. 19 b). Im Gegensatz zum 1-Phasensystem konnten in der wässrigen Untersuchungslösung des 2-Phasenversuches keine Ketoprofen-Photoprodukte nachgewiesen werden. Es liegt daher der Schluß nahe, daß die Abnahme des HPODE-Gehaltes ursächlich durch die Präsenz der Photoprodukte bestimmt wird. Allerdings führt die Ketoprofen-sensibilisierte Linolsäure-Peroxidation im 2-Phasensystem bei UVA-Dosen unterhalb von 16 J/cm² zu deutlich geringeren HPODE-Konzentrationen als

im 1-Phasensystem. Als Ursache kann die unterschiedliche Verteilung der Photoprodukte angesehen werden, die sich im 2-Phasensystem in der nichtwäßrigen Phase anreichern und dadurch in der Linolsäure-haltigen wäßrigen Phase in verminderter Konzentration vorliegen. Bosca et al. [18] konnten bereits zeigen, daß die Ketoprofen-Photoprodukte in der Lage sind, die UVA-induzierte Linolsäure-Peroxidation zu sensibilisieren. Dabei nimmt das peroxidbildende Potential der hauptsächlich in wäßrigen Lösungen auftretenden Photoprodukte in der Reihenfolge $[EB] > [KP-OOH] = [KP=O] > [KP-OH]$ ab, wobei Ketoprofen als „Muttersubstanz“ in diesem Zusammenhang das höchste peroxidbildende Potential besitzt.

4.5.4 Zusammenfassung

Aus den vorliegenden Untersuchungsdaten wird deutlich, daß die HPODE-Konzentration in Ketoprofen-haltigen UVA-bestrahlten Lösungen von zwei gegenläufigen Prozessen, der photoinduzierten Peroxidation von Linolsäure und dem ebenfalls photoinduzierten HPODE-Abbau durch die photochemisch gebildeten Ketoprofen-Photoprodukte, bestimmt wird. Bezieht man in diese Betrachtungen die UVA-Dosis-abhängigen Konzentrationen der einzelnen Ketoprofen-Photoprodukte (s. Anhang Abb. 1) mit ein, so kann man feststellen, daß die Linolsäure-Peroxidation oberhalb einer UVA-Dosis von 4 J/cm^2 hauptsächlich durch die Ketoprofen-Photoprodukte KP-OH und KP=O bestimmt wird, die im Vergleich zu Ketoprofen, EB und KP-OOH nur ein geringes HPODE-bildendes Potential besitzen. Die hieraus resultierende verminderte Linolsäure-Peroxidation wird gleichzeitig von dem erstmals im Rahmen dieser Arbeit nachgewiesenen photoinduzierten Abbau des HPODE durch die entstandenen Ketoprofen-Photoprodukte überlagert, der relativ unabhängig von der Zusammensetzung des Photoprodukt-Gemisches ist (s. Abb. 22 b). Es ist anzunehmen, daß die HPODE-abbauenden Reaktionen mit zunehmender UVA-Dosis die mit dem Ketoprofen-Abbau schwächer werdenden HPODE-bildenden Prozesse überwiegen, was letztlich zu der beobachteten Reduktion des HPODE-Gehaltes von UVA-bestrahlten Ketoprofen-haltigen Linolsäure-Lösungen oberhalb von 4 J/cm^2 (s. Abb. 19 b) führt.

4.6 Photoinduzierter Ketoprofen-Abbau und Linolsäure-Peroxidation unter dem Einfluß von natürlichem Sonnenlicht

4.6.1 Versuchsdurchführung

Die bisherigen Untersuchungen wurden aus Gründen der Reproduzierbarkeit der Strahlungsdosis unabhängig von den Witterungsverhältnissen mit künstlichen UV-Strahlungsquellen durchgeführt. Da

eine UVA-Exposition Ketoprofen-behandelter Hautareale durch Sonnenlicht wahrscheinlicher als durch künstliche UVA-Quellen (z.B. in Solarien) ist, wurde im folgenden die Frage untersucht, welche Relevanz natürliches Sonnenlicht für den photochemisch induzierten Zerfall von Ketoprofen und die Bildung von Linolsäure-Peroxid besitzt. Abweichend von den unter Kap. 4.2.1 und 4.3.1 beschriebenen Versuchsdurchführungen erfolgte die Bestrahlung der Untersuchungslösungen außerhalb der Bestrahlungskammer im Freien, an einem schattenfreien Platz unter direkt einfallendem Sonnenlicht. Zur Bestimmung der eingestrahnten UVA-Dosis diente der sonst in der Bestrahlungskammer eingesetzte UVA-Sensor. Eine Probenentnahme von 0,5 ml erfolgte nach UVA-Dosen von 0; 0,5; 1; 1,5; 2; 3; 4; 6 und 8 J/cm².

Zum direkten Vergleich wurden in einem Parallelversuch die gleichen Untersuchungslösungen in der Bestrahlungskammer künstlichem UVA-Licht ausgesetzt. Die Probenentnahme von 0,5 ml erfolgte ebenfalls nach UVA-Dosen von 0; 0,5; 1; 1,5; 2; 3; 4; 6 und 8 J/cm².

Da die Sonneneinstrahlung aufgrund aufkommender Bewölkung schwankte, wurde bei jeder UVA-Dosis die Bestrahlungsdauer festgehalten. Alle Untersuchungen wurden zwischen 11.00 und 13.00 Uhr MESZ an zwei aufeinanderfolgenden Tagen (01.08. - 02.08.2001) bei leicht bewölktem, sonnigem Wetter durchgeführt. Die Bestimmung des Ketoprofen- und HPODE-Gehaltes erfolgte bei 234 nm unter Einsatz der CE-UV.

4.6.2 Ergebnisse und Diskussion

Aus dem im Anhang Abb. 4 dargestellten UVA-Dosis/Bestrahlungszeit-Diagramm geht hervor, daß die pro Zeiteinheit auf der Erdoberfläche auftreffende UVA-Strahlung der Sonne an einem sonnigen, wolkenfreien Sommertag (Tag 1) annähernd mit der pro Zeiteinheit abgestrahlten UVA-Dosis der Bestrahlungskammer übereinstimmte. Das heißt, die in der vorliegenden Arbeit häufig eingesetzte UVA-Dosis von 8 J/cm² entspricht unter diesen Bedingungen einem 25- bis 30-minütigen Aufenthalt in der Sonne, so daß die Ergebnisse der vorgestellten Untersuchungen für den mitteleuropäischen Raum als praxisrelevant angesehen werden können.

Vergleicht man den Ketoprofen-Abbau einer 0,5 mM wäßrigen Lösung bei reiner UVA- bzw. Sonnenlichtexposition (Abb. 24 a), so kann man feststellen, daß der Ketoprofen-Abbau bei Sonnenlicht-Exposition nur geringfügig langsamer als unter künstlichem UVA-Licht erfolgt. Weiterhin tritt auch bei Sonnenlicht-Bestrahlung der in Kap. 4.3 ausführlich beschriebene, charakteristische Verlauf der Ketoprofen-sensibilisierten Linolsäure-Peroxidation auf. Allerdings ergeben sich unter dem Einfluß von natürlichem Sonnenlicht zum Teil erheblich höhere Werte des HPODE-Gehaltes als bei der gleichen UVA-Dosis in der Bestrahlungskammer. Dieser Unterschied konnte sowohl in den Ketoprofen-haltigen als auch in den Ketoprofen-freien Lösungen nachgewiesen werden. Als Ursache dieses Effektes kommen vor allem Auswirkungen der anderen Spektralbereiche des Sonnenlichtes in Betracht. Beispielsweise bewirkt der infrarote Anteil des Sonnenlichtes eine deutlich stärkere Aufheizung der Untersuchungslösungen als bei Bestrahlung in der UV-Kammer. Da

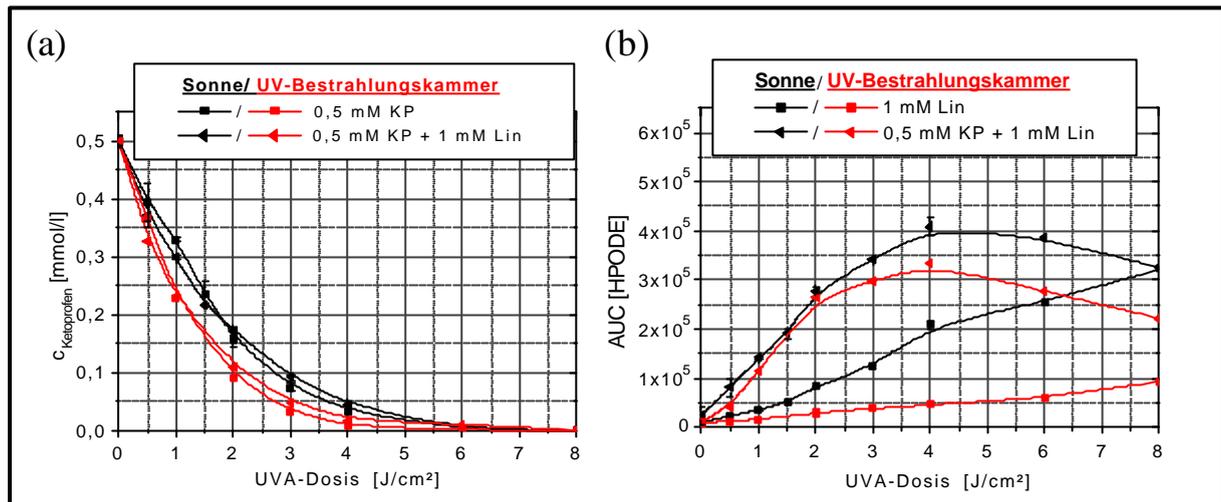


Abb. 24 Ketoprofen-Abbau (a) und Linolsäure-Peroxidation (b) unter dem Einfluß von Sonnenlicht bzw. künstlichem UVA-Licht

oxidative Veränderungen ungesättigter Molekülstrukturen und so auch die Peroxidation von Linolsäure durch eine Erhöhung der Temperatur des Reaktionsmediums beschleunigt werden, kann die beobachtete Temperaturerhöhung der Untersuchungslösungen als Ursache für den deutlichen Anstieg des HPODE-Gehaltes der Sonnenlicht-exponierten Lösungen angesehen werden. Detaillierte Untersuchungen dieser Zusammenhänge würden den Rahmen der vorliegenden Arbeit sprengen und müssen daher zukünftigen Forschungen vorbehalten bleiben.

4.7 Photochemische Untersuchungen alkoholischer Ketoprofen-Lösungen

4.7.1 Vorüberlegungen

Der Verlauf photochemischer Reaktionen wird stark vom pH-Wert und dem eingesetzten Lösungsmittel beeinflusst (s. Kap. 2.3.1). Entsprechend der auf der Packungsbeilage deklarierten Zusammensetzung des in Deutschland handelsüblichen 2,5 %-igen Ketoprofen-Gels setzt sich ein Gramm dieser Arzneiformulierung aus 25 mg Ketoprofen, Ethanol (96 %), Isopropanol, Carbomer, Ammoniak-Lösung (10 %) und gereinigtem Wasser zusammen. Die flüssige Phase des Gels besteht somit im wesentlichen aus Wasser und einer Ethanol-Isopropanol-Mischung.

Aus der Literatur [70] ist bekannt, daß kurzkettige Alkohole unter radikalbildenden Bedingungen als Reduktionsmittel wirken. Ziel der nachfolgend beschriebenen Arbeiten war es daher, den Einfluß der in der Rezeptur verwendeten Alkohole auf den UVA-induzierten Ketoprofen-Zerfall, insbesondere die photoinduzierte Bildung von H_2O_2 und die Bildung und Verteilung der Ketoprofen-Photoprodukte, zu untersuchen.

4.7.2 Versuchsdurchführung

Alle Untersuchungen wurden mit einer wäßrigen 10 mM Ketoprofen-Stammlösung (PB-Puffer, pH 7,4) durchgeführt. Ein Milliliter dieser Lösung wurde so mit dem zu untersuchenden Lösungsmittel (Ethanol (96 %), Isopropanol (99,7 %) bzw. Lösungsmittelgemisch Ethanol/Isopropanol und Wasser in einem Maßkolben auf 10 ml ergänzt, daß der Gehalt des jeweiligen Lösungsmittels in den Untersuchungslösungen von 0 auf 70 % in 10 %-Schritten erhöht wurde. Die erhaltenen Proben wurden in Planschliffgläser überführt und mit einer UVA-Dosis von $6 J/cm^2$ bestrahlt. Die Bestimmung des Ketoprofens und der Ketoprofen-Photoprodukte erfolgte mittels HPLC-UV bei einer Wellenlänge von 257 nm, die Bestimmung des Peroxidgehaltes summarisch mit Hilfe des FOX-II-Testes.

4.7.3 Ergebnisse und Diskussion

Aus den in Abb. 25 und Abb. 26 graphisch dargestellten Untersuchungsergebnissen wird deutlich, daß die Gegenwart eines kurzkettigen Alkohols bzw. eines Alkoholgemisches in der UVA-bestrahlten wäßrigen Ketoprofen-Lösung zu einer deutlichen Zunahme der photoinduzierten Peroxidbildung und zu einer veränderten Zusammensetzung des Ketoprofen-Photoproduktgemisches führt. Die

beobachteten Effekte sind hierbei unabhängig von der Art (Ethanol, Isopropanol) bzw. Zusammensetzung (Ethanol/Isopropanol) des verwendeten Alkohols. Bei allen Untersuchungen konnte einheitlich festgestellt werden, daß eine Erhöhung des Alkoholgehaltes auf 40 % (V/V) unter den gegebenen Versuchsbedingungen zu einer Steigerung des H_2O_2 -Gehaltes auf den 9 bis 9,5-fachen Wert im Vergleich zur alkoholfreien Probe führt. In diesem Konzentrationsbereich ergab sich bei

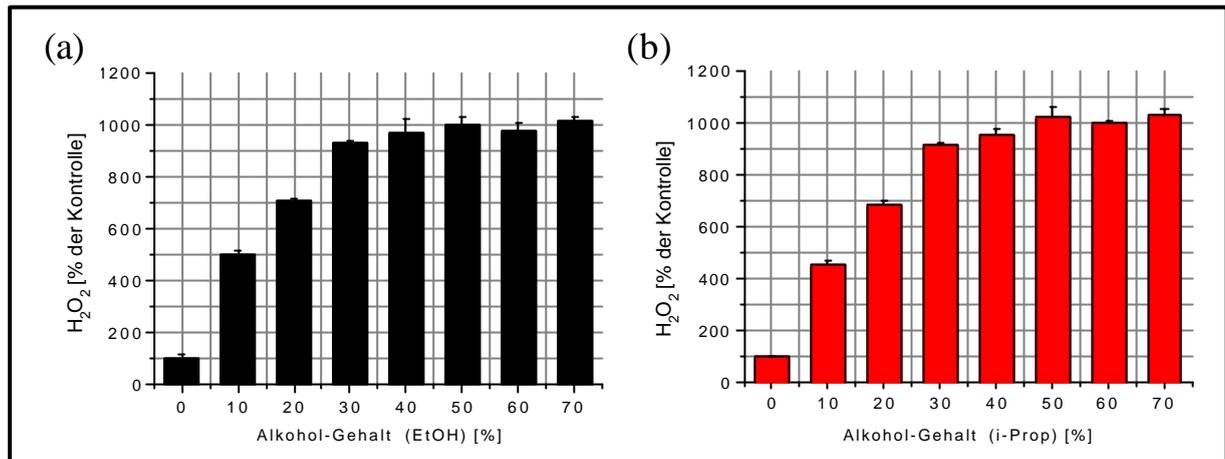


Abb. 25 Photoinduzierte H_2O_2 -Bildung in wässrig-alkoholischen 1 mM Ketoprofen-Lösungen nach einer UVA-Dosis von 6 J/cm^2 in Abhängigkeit vom (a) Ethanol- und (b) Isopropanol-Gehalt relativ zur alkoholfreien Probe (= 100%)

allen Telexperimenten ein nahezu linearer Zusammenhang zwischen eingesetzter Alkoholkonzentration und gebildetem H_2O_2 . Im Gegensatz hierzu blieb der H_2O_2 -Gehalt oberhalb einer Alkoholkonzentration von 40 % unabhängig vom Alkoholgehalt nahezu konstant.

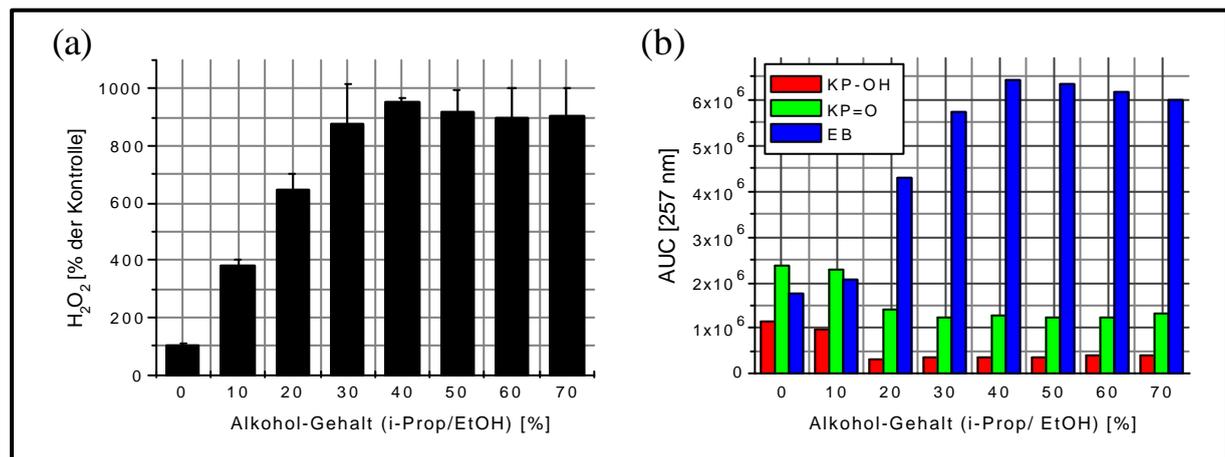


Abb. 26 Photoinduzierte (a) H_2O_2 -Bildung relativ zur alkoholfreien Probe (= 100%) und (b) Photoprodukt-Verteilung in wässrig-alkoholischen (Ethanol/Isopropanol-Gemisch) 1 mM Ketoprofen-Lösungen in Abhängigkeit vom Alkoholgehalt nach einer UVA-Dosis von 6 J/cm^2

Ein ähnliches Verhalten konnte bei der Betrachtung der Ketoprofen-Photoprodukt-Verteilung in den entsprechenden Proben festgestellt werden. Aus Abb. 26 b wird deutlich, daß die Verteilung der Ketoprofen-Photoprodukte bis zu einem Alkoholgehalt von 40 % ebenfalls starken Veränderungen unterliegt und oberhalb dieser Konzentration etwa konstant bleibt. Hierbei ist die Zusammensetzung des Ketoprofen-Photoproduktgemisches im Vergleich zur alkoholfreien Kontrolle im wesentlichen durch eine starke Erhöhung des EB-Gehaltes und eine sichtbare Verringerung der Konzentration der Sauerstoff-haltigen Ketoprofen-Photoprodukte KP-OH und KP=O gekennzeichnet.

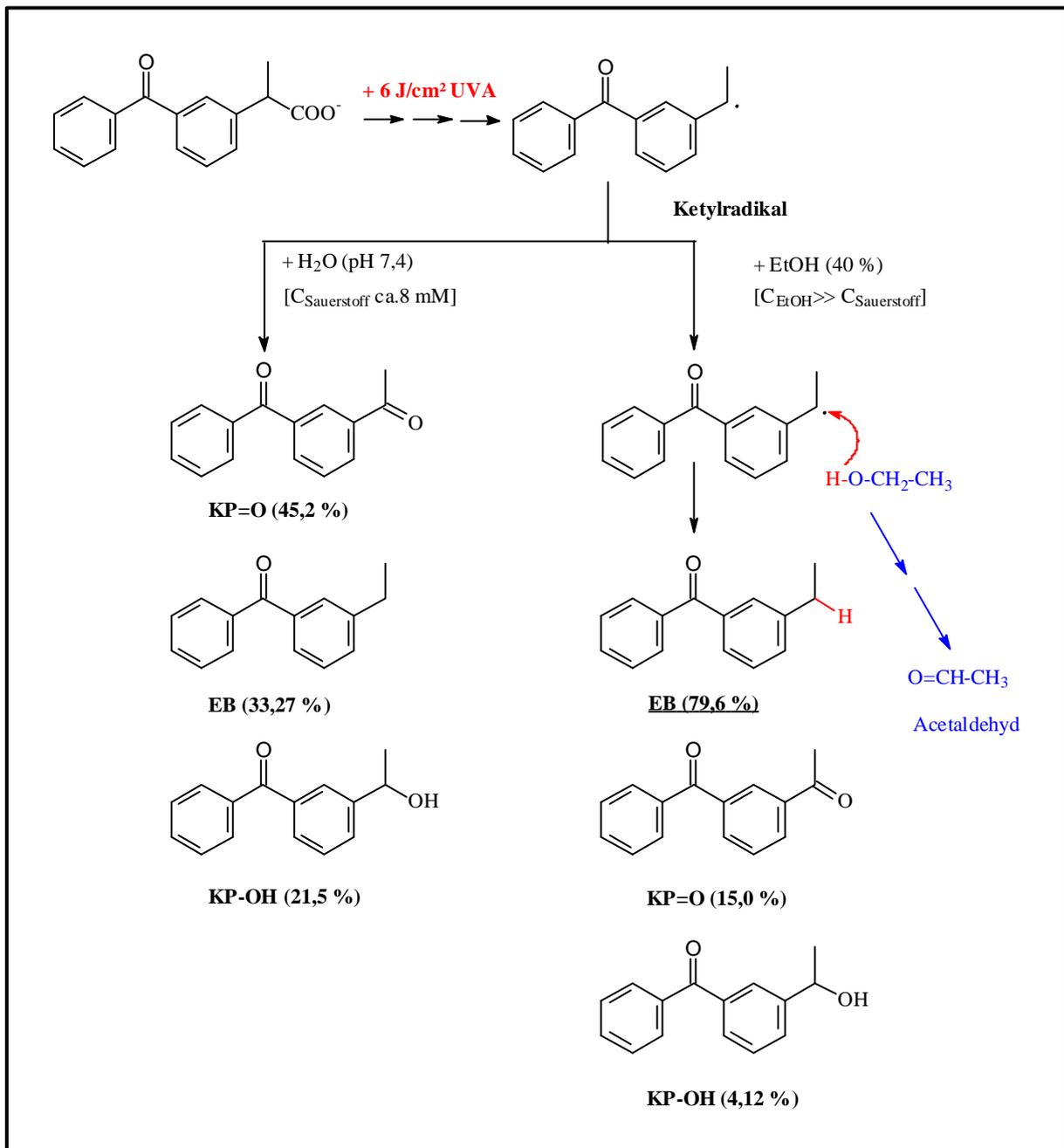


Abb. 27 Postulierter Mechanismus (Prozentangaben: experimentell bestimmter Anteil der jeweiligen Verbindung relativ zum Gesamtgehalt der Photoprodukte)

Die vorliegenden Ergebnisse lassen die Annahme zu, daß die Stabilisierung des aus der photoinduzierten Decarboxylierung des Ketoprofens hervorgehenden Ketylradikals (s. Abb. 50) in rein wäßrigen Lösungen primär durch die Anlagerung von Sauerstoff unter Bildung der sauerstoffhaltigen Ketoprofen-Photoprodukte KP-OOH, KP=O und KP-OH erfolgt. 3-Ethylbenzophenon (EB), das durch die Aufnahme eines Wasserstoffatoms aus dem gebildeten Ketylradikal hervorgeht, wird unter diesen Reaktionsbedingungen im Vergleich zu den alkoholischen Lösungen in deutlich geringeren Konzentrationen gebildet. Geht man davon aus, daß eine alkoholische Gruppe unter den gegebenen Reaktionsbedingungen als Wasserstoff-Donator und somit als Reduktionsäquivalent während des photoinduzierten Ketoprofen-Abbaus zur Verfügung steht, ist es naheliegend, daß der beobachtete überdurchschnittlich starke Anstieg des EB-Gehaltes in den bestrahlten alkoholischen Ketoprofen-Lösungen auf eine erhöhte Stabilisierung des Ketylradikals über die Abstraktion eines Wasserstoffatoms einer alkoholischen Gruppe zum Ethylbenzophenon nach dem in Abb. 27 postulierten Mechanismus zurückzuführen ist. Da sowohl der in der Untersuchungslösung gelöste Sauerstoff (ca. 8 mM) als auch das vom Alkohol leicht abstrahierbare H-Atom um die gleiche Bindungsstelle des Ketylradikals konkurrieren, verschiebt sich die Zusammensetzung der Ketoprofen-Photoprodukte mit zunehmender Alkohol-Konzentration zur Seite des 3-Ethylbenzophenons. Die hieraus resultierende Veränderung der Photoprodukt-Zusammensetzung wird vor allem im Alkohol-Konzentrationsbereich bis 40 % sichtbar. Oberhalb dieser Konzentration bleibt die Zusammensetzung der Photoprodukte nahezu konstant. Dies kann darauf zurückgeführt werden, daß der Alkohol bzw. die Reduktionsäquivalente bei einer Alkohol-Konzentration von 40 % im Vergleich zum gelösten Sauerstoff im 1000-fachen Überschuß vorliegen und so die Anlagerung von Sauerstoff an das Ketylradikal und die damit verbundene Bildung der Sauerstoff-haltigen Ketoprofen-Photoprodukte nur noch eine untergeordnete Rolle spielt. Die mittels GC-FID nachgewiesene Bildung von Acetaldehyd (s. Anhang Abb. 3) kann als Bestätigung des postulierten Mechanismus angesehen werden.

Ob die beobachtete deutliche Erhöhung der H₂O₂-Bildung bis zu einer Alkohol-Konzentration von 40 % ebenfalls auf einer direkten Beteiligung der alkoholischen Hydroxyl-Gruppen am photoinduzierten Ketoprofen-Abbau basiert oder nur aus der besseren Löslichkeit der Ketoprofen-Photoprodukte in den alkoholischen Untersuchungslösungen und der damit verbundenen Erhöhung der Lichtintensität aufgrund des Ausbleibens von Lichtstreuungseffekten resultiert, war Gegenstand der nachfolgend dargestellten Untersuchungen mit Diglyme-haltigen wäßrigen Ketoprofen-Lösungen.

4.8 Photochemische Untersuchungen in Diglyme-haltigen wäßrigen Ketoprofen-Lösungen

4.8.1 Vorüberlegungen

Diglyme (Diethylenglycoldimethylether [(CH₃OCH₂CH₂)₂O]) stellt ein organisches Lösungsmittel dar, das hinsichtlich seiner lösungsvermittelnden Eigenschaften den kurzkettigen Alkoholen sehr

ähnlich ist. Es ist eine farblose, mit Wasser in jedem Verhältnis mischbare und im UV/VIS-Bereich nicht absorbierende Flüssigkeit.

Im Gegensatz zu den verwendeten Alkoholen besitzt Diglyme keine leicht oxidierbaren funktionellen Gruppen. Folglich kann es im Gegensatz zu den untersuchten Alkoholen während des photochemisch induzierten Ketoprofen-Zerfalls nicht so leicht als Reduktionsäquivalent fungieren. Sollte die alkoholische Gruppe des Ethanol bzw. Isopropanols verantwortlich sein für die extreme Zunahme des H_2O_2 -Gehaltes in den untersuchten Proben, müßte die beobachtete Zunahme des H_2O_2 -Gehaltes durch die Substitution des Alkohols durch Diglyme nivelliert werden können. Dementsprechend sollte die bestimmte H_2O_2 -Konzentration in den Proben im wesentlichen unabhängig von der eingesetzten Diglyme-Konzentration sein.

4.8.2 Versuchsdurchführung

Wie in Kap. 4.7.2 wurden auch bei diesen Untersuchungen 1 mM Ketoprofen-haltige Untersuchungslösungen hergestellt, deren Diglyme-Gehalt in 10 %-Schritten von 0 bis 70 % variierte. Um den Einfluß der zugesetzten Lösungsvermittler Ethanol und Diglyme auf die photoinduzierte H_2O_2 -Entstehung direkt vergleichen zu können, wurde in einem weiteren Versuch der H_2O_2 -Gehalt einer jeweils 50 %-igen ethanolschen und Diglyme-haltigen 1 mM Ketoprofen-Lösung nach einer UVA-Exposition von 0; 4 und 8 J/cm² im Vergleich zur lösungsmittelfreien Kontrolle bestimmt.

In Abhängigkeit von der eingesetzten Diglyme-Konzentration werden bereits in reinen Diglyme-haltigen wäßrigen Lösungen unter dem Einfluß von UVA-Licht erhebliche Mengen „Diglyme-Peroxide“ (s. Anhang Abb. 5) freigesetzt, die in der vorliegenden Arbeit jedoch nicht näher untersucht wurden. Da eine Unterscheidung der Diglyme-Peroxide von H_2O_2 mit Hilfe des in den vorangegangenen Untersuchungen eingesetzten FOX-II-Tests nicht möglich ist, kam bei diesen Arbeiten eine spezifische Bestimmungsmethode für H_2O_2 , die in Kap. 3.1.3 beschriebene CE-ED, zum Einsatz.

4.8.3 Ergebnisse und Diskussion

Aus Abb. 28 a wird deutlich, daß der Zusatz von Diglyme über den gesamten Konzentrationsbereich nur zu einer geringfügigen Erhöhung der photoinduzierten H_2O_2 -Bildung auf den 2- bis 2,3-fachen Wert einer 1 mM Lösungsmittel-freien Ketoprofen-Lösung führt. Auch der direkte Vergleich der in einer rein wäßrigen, einer 50 %-igen ethanolschen bzw. Diglyme-haltigen 1 mM Ketoprofen-Lösung gebildeten H_2O_2 -Mengen zeigt, daß die photoinduzierte H_2O_2 -Bildung in starkem Maße von der Art des Lösungsmittels bestimmt wird (Abb. 28 b). So stieg der H_2O_2 -Gehalt einer 50 %-igen ethanolschen Ketoprofen-Lösung auf das 12- (4 J/cm²) bzw. 25-fache (8 J/cm²) im Vergleich zu der rein wäßrigen Ketoprofen-Lösung an. Im Gegensatz hierzu erhöhte sich der H_2O_2 -Gehalt der Diglyme-

haltigen Untersuchungslösungen bei beiden UVA-Dosen nur auf etwa den dreifachen Wert der wäßrigen Probe. Da sowohl in den ethanolischen als auch Diglyme-haltigen Untersuchungslösungen keine sichtbare bzw. meßbare Trübung nach der UVA-Exposition auftrat, ist davon auszugehen, daß beide Lösungsmittel unter den gegebenen Versuchsbedingungen in gleichem Maße als Lösungsvermittler der Ketoprofen-Photoprodukte wirksam sind. Folglich kann eine verminderte H_2O_2 -Bildung in den Diglyme-haltigen Untersuchungslösungen aufgrund von Lichtstreuungseffekten ausgeschlossen werden. Da Diglyme im Gegensatz zu Ethanol keine leicht oxidierbaren Gruppen besitzt, ist anzunehmen, daß die alkoholische Gruppe als funktioneller Strukturunterschied beider Lösungsmittel die primäre Ursache für die beobachteten Veränderungen der Photoprodukt-Zusammensetzungen und die erhöhte H_2O_2 -Bildung darstellt.

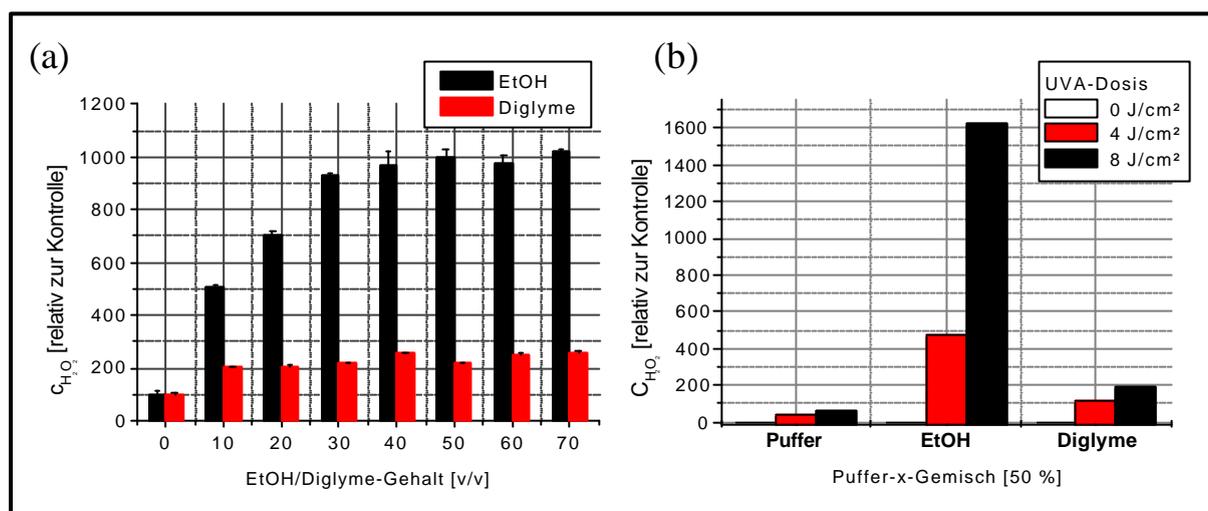


Abb. 28 Photoinduzierte H_2O_2 -Bildung in ethanolischen- und Diglyme-haltigen wäßrigen Ketoprofen-Lösungen (a) in Abhängigkeit vom Lösungsmittelgehalt bei einer UVA-Dosis von 6 J/cm^2 (b) in Abhängigkeit von der UVA-Dosis und dem Lösungsmittel

4.8.4 Zusammenfassung

Aus den vorliegenden Untersuchungsdaten geht hervor, daß sowohl die UVA-induzierte Bildung von Wasserstoffperoxid als auch die Bildung der Ketoprofen-Photoprodukte in wäßrigen Ketoprofen-Lösungen in starkem Maße von der Gegenwart kurzkettiger Alkohole beeinflusst wird.

Folglich sollte bei der Herstellung topisch angewandter Ketoprofen-haltiger Arzneiformen für eine Minimierung möglicher UVA-induzierter, auf der Bildung von Wasserstoffperoxid beruhender zytotoxischer Reaktionen auf den Zusatz von Alkoholen oder anderen Reduktionsäquivalenten nach Möglichkeit verzichtet werden.

Im Gegensatz hierzu ist zu erwarten, daß ein 40 %-iger Alkoholzusatz bei der photodynamischen Therapie verschiedener hyperproliferativer Haut- und Schleimhauterkrankungen aufgrund der 10-fach höheren H_2O_2 -Bildung zu einer deutlichen Erhöhung der antiproliferierenden Effekte und somit zu einer erhöhten Wirksamkeit führt.

4.9 Photochemische Untersuchungen mit einem handelsüblichen 2,5 %-igen Ketoprofen-Gel

4.9.1 Motivation

Die bisher beschriebenen photochemischen Untersuchungen wurden in wäßrigen Ketoprofen-Lösungen durchgeführt. Da für die topische Therapie verschiedener rheumatischer Erkrankungen der Wirkstoff in Form eines 2,5 %-igen Gels appliziert wird, lag die Frage nahe, ob und in welchem Ausmaß die beobachteten photochemischen Reaktionen auch in dem handelsüblichen Ketoprofen-Gel auftreten.

4.9.2 Rheologische Untersuchungen zum Verhalten verdünnter Ketoprofen-Gel-Proben unter dem Einfluß von UVA-Strahlung

4.9.2.1 Vorüberlegung

Bei der praktischen Durchführung photochemischer Untersuchungen mit dem handelsüblichen Ketoprofen-Gel kam es zu starken Veränderungen der Gelkonsistenz, so daß das Gel bereits nach geringen UVA-Dosen nicht mehr rührbar war. In welchem Zusammenhang die beobachteten Änderungen der rheologischen Gel-Eigenschaften mit dem photochemisch induzierten Ketoprofen-Abbau stehen, ist Gegenstand der nachfolgend beschriebenen Untersuchungen.

4.9.2.2 Versuchsdurchführung

Als Untersuchungsgegenstand dienten je 50 ml einer 1/10 (V/V) Verdünnung des kommerziell verfügbaren Ketoprofen-Gels sowie eines Plazebo-Gels. Die Verdünnung des Gels erfolgte mit einer wäßrig-alkoholischen Lösung, deren Zusammensetzung der in der Firmenrezeptur genutzten flüssigen Gelphase (vertrauliche Information) entsprach. Um eine möglichst adäquate Konsistenz des Plazebo-Gels im Vergleich zur wirkstoffhaltigen Probe zu erreichen, wurden diesem zur Substitution des Ketoprofens als saure Komponente 20 µl konzentrierte Essigsäure zugesetzt.

Alle Proben wurden in Planschliffgläser mit einem Innendurchmesser von 5,1 cm überführt und unter ständigem Rühren verschiedenen UVA-Dosen (0; 1; 2; 3; 4; 6; 8; 10; 12; 16 sowie 20 J/cm²) ausgesetzt.

Die Bestimmung der Viskosität wurde mit einem Rotationsviskosimeter MCR 300 (PAAR Physica, Graz, Österreich) unter Benutzung eines Kegel-Platte-Meßsystem CP50-1 durchgeführt. Die Messungen erfolgten unter Drehmomentvorgabe (CSS-Messung, controlled shear stress) im Bereich von 1-1000 μNm , was einem Schubspannungsbereich von ca. 0,03 -30 Pa entspricht. Die Viskosität der Proben wurde unter Zuhilfenahme der Gerätesoftware aus der angelegten Schubspannung und der sich einstellenden Scherrate (etwa $10^{-4} - 1 \text{ s}^{-1}$) berechnet.

Für die Bestimmung des Ketoprofen-Gehaltes wurden die Gel-Proben mit Hilfe der CE-UV bei einer Wellenlänge von 257 nm analysiert. Zur Verhinderung einer Übersteuerung des UV-Signals war eine zusätzliche Verdünnung der Proben mit Phosphatpuffer pH 7,4 (1/10 (V/V)) notwendig.

Um den Einfluß der nachgewiesenen UVA-induzierten pH-Wert-Verschiebungen auf die Viskosität des Gels simulieren zu können, wurde in einem weiteren Versuch der pH-Wert der verdünnten Plazebo-Gel-Proben im Bereich von 6,51 bis 5,04 durch unterschiedliche Essigsäure-Zusätze variiert und anschließend die Viskosität der Proben bestimmt. Die pH-Wert-Bestimmung der Proben erfolgte mit einem pH-Meter (pH 523, WTW Weilheim, Deutschland).

4.9.2.3 Ergebnisse und Diskussion

Aus Abb. 29 a wird deutlich, daß eine UVA-Bestrahlung des verdünnten Ketoprofen-Gels grundsätzlich eine Viskositätszunahme zur Folge hat. Besonders deutlich wird dies bei niedrigen Schubspannungen, bei denen sich die Viskositäten, insbesondere der mit 4 bis 12 J/cm^2 bestrahlten Proben, um mehrere Zehnerpotenzen unterscheiden. Im Gegensatz hierzu sind die gemessenen Viskositätsdifferenzen bei UVA-Dosen oberhalb von 12 J/cm^2 vergleichsweise gering.

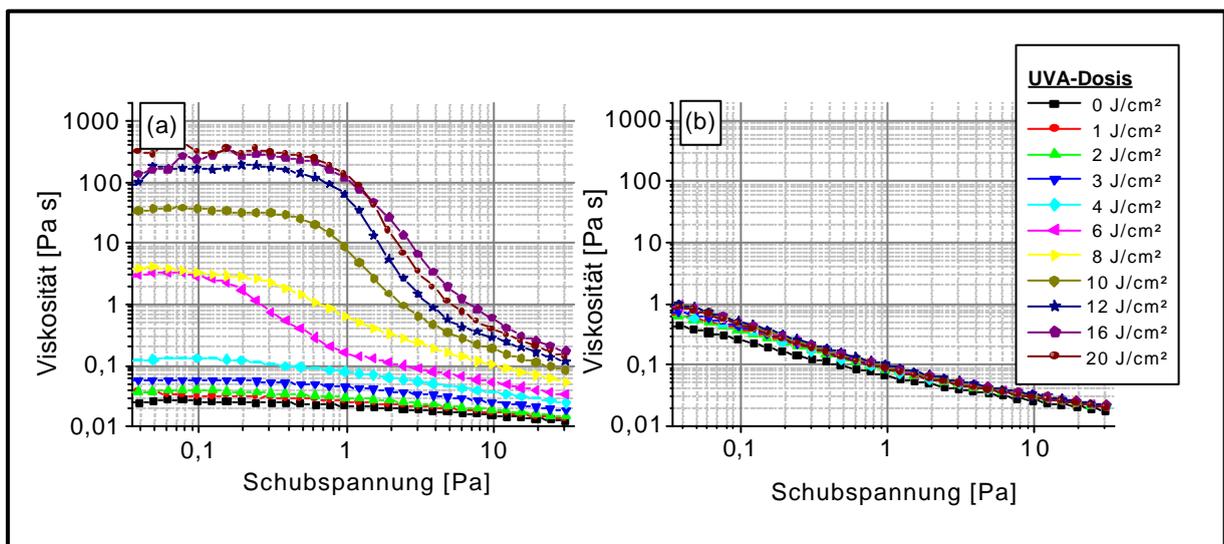


Abb. 29 Vergleich der Viskositäten von verdünnten UVA-bestrahlten (a) Ketoprofen-Gel - bzw. (b) Plazebo-Gel-Proben in Abhängigkeit von der Schubspannung

Generell nimmt die Viskosität der untersuchten Proben mit zunehmender Scherbelastung (Schubspannung) ab. Besonders stark ist die Abnahme bei den hochviskosen Proben ausgeprägt, so daß die Viskositäten aller bestrahlten Proben bei der maximalen verwendeten Schubspannung von 30 Pa in einem Bereich von 0,0123 bis 0,17 Pa s liegen. Der Viskositätsverlauf der hochviskosen Proben ist charakteristisch für Stoffe, deren rheologisches Verhalten durch das Vorhandensein innerer Strukturen bestimmt wird, die bei hoher Scherbelastung zerstört werden (Strukturviskosität) [152]. Dagegen zeigt das gleichartig behandelte Plazebo-Gel im gesamten Schubspannungsbereich nur eine geringfügige Erhöhung der Viskosität, die kaum von der eingestrahlten UVA-Dosis abhängt (Abb. 29 b). Vergleicht man die in Abb. 30 a dargestellte Abhängigkeit der Viskosität von der eingestrahlten UVA-Dosis bei einer bestimmten Schubspannung (hier 1,0 Pa) mit dem zugehörigen Verlauf des pH-Wertes der bestrahlten Ketoprofen- bzw. Plazebo-Gel-Lösungen (Abb. 30 b), zeigen sich deutliche Parallelen, die einen Rückschluß auf die zugrundeliegenden Mechanismen der Viskositäts-erhöhung zulassen. Aus Abb. 30 b geht deutlich hervor, daß der pH-Wert der bestrahlten Ketoprofen-Gel-Lösungen im Gegensatz zu den Plazebo-Gel-Lösungen mit zunehmender Bestrahlungsdosis bis zu einer UVA-Dosis von etwa 12 J/cm² steigt und dann näherungsweise

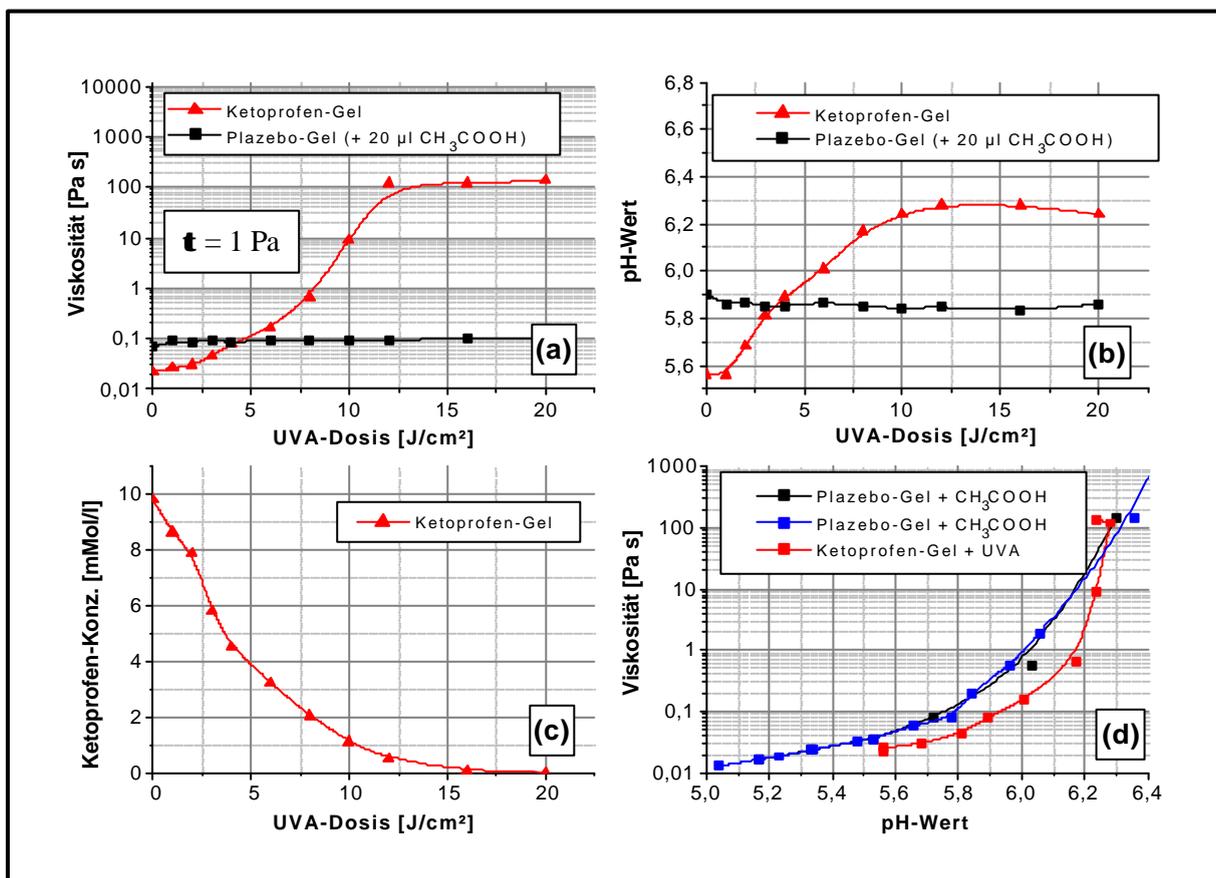


Abb. 30 Photochemische Untersuchungen eines Ketoprofen-Gels: UVA-induzierte (a) Viskositätszunahme, (b) pH-Wert-Änderung, (c) Zerfall von Ketoprofen, (d) pH-abhängige Viskositätszunahme eines 1/10 verdünnten Ketoprofen- $\frac{3}{4}$ bzw. Plazebo-Gels ($\frac{3}{4}$ $\frac{3}{4}$)

konstant bleibt. Gleichzeitig nimmt die Ketoprofen-Konzentration dieser Proben mit zunehmender UVA-Dosis ab (s. Abb. 30 c), wobei der Wirkstoff bei der „kritischen“ UVA-Dosis von 12 J/cm^2 nur noch in geringen Mengen nachweisbar ist. Ausgehend von dem in Abb. 50 dargestellten Reaktionsmechanismus des photoinduzierten Ketoprofen-Abbaus liegt die Vermutung nahe, daß die UVA-Dosis-abhängige Erhöhung des pH-Wertes aus einer zunehmenden Decarboxylierung des Ketoprofens im Gel resultiert. Für die beobachteten Viskositätsänderungen des bestrahlten Ketoprofen-Gels bietet sich daher die folgende Erklärung an:

Die Viskosität einer Gelzubereitung hängt hauptsächlich von den physikochemischen Eigenschaften des verwendeten Gelbildners ab. Bei dem im handelsüblichen Ketoprofen-Gel verwendete Gelbildner Carbomer handelt es sich um einen Vertreter der Polyacrylsäuren. Im präsolvatisierten Zustand ist es ein stark in sich verknäueltes Molekül (Abb. 31 a) und besitzt nur eine begrenzte Verdickungswirkung. Um hohe Viskositäten zu erreichen, muß das Molekül entknäueln (Abb. 31 b) werden. In der Praxis geschieht dies durch die Hydratation des Moleküls in Wasser und anschließende Neutralisation durch den Zusatz von anorganischen Basen oder niedermolekularen Aminen. Die bei der Neutralisation der Polyacrylsäure mit Ammoniak (Originalrezeptur des Gels) stattfindende Salzbildung ($-\text{COO}^- \text{NH}_4^+$) erzeugt entlang der Grundkette des Moleküls negative Ladungen, deren gegenseitige Abstoßung zum entknäueln des Moleküls in eine langgestreckte Struktur führt. Diese sehr schnell verlaufende Reaktion bedingt eine sofortige Verdickung des Gels. Da es sich hierbei um einen reversiblen Prozeß handelt, bewirkt ein Säurezusatz eine Abnahme der Viskosität.

Ketoprofen stellt als Vertreter der Arylpropionsäurederivate ebenfalls eine Säure dar, d.h. das Einarbeiten des Wirkstoffs in die Gelgrundlage (Carbomer, H_2O , Ammoniak) ist mit einem Säurezusatz gleichzusetzen, der über die zunehmende Verknäuelung des Polymers eine Reduktion der Viskosität des Gels bewirkt. Wird die zugesetzte Säure (Ketoprofen) durch die UVA-induzierte Decarboxylierung zerstört, entspricht dies einem Neutralisationsvorgang, der wie oben beschrieben

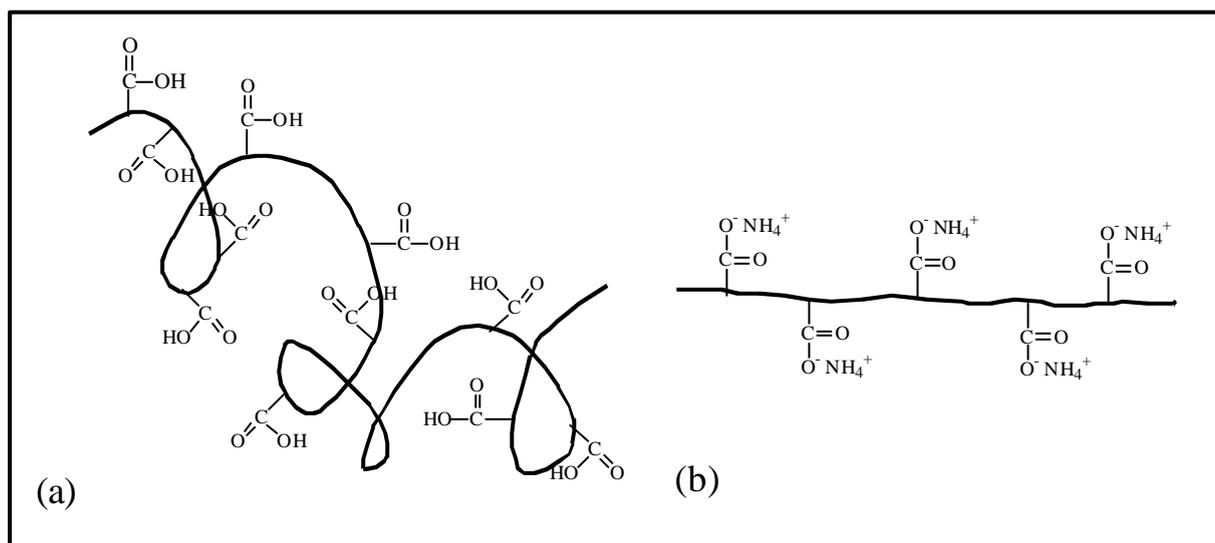


Abb. 31 Schematische Darstellung eines Carbopol^P-Moleküls (a) im verknäuelten und (b) im entknäuelten Zustand [153]

eine Viskositätssteigerung nach sich zieht. Die photoinduzierte Decarboxylierung des Ketoprofens und die dadurch bedingte pH-Wert-Verschiebung von 5,56 auf 6,24 (s. Abb. 29 b) können damit als Ursache der beobachteten starken Viskositätsänderung angesehen werden. Diese Vermutung wird durch die rheologischen Meßergebnisse des mit unterschiedlichen Essigsäurezusätzen behandelten Placebo-Gels bestätigt (Abb. 30 d). Das angesäuerte Placebo-Gel zeigt im untersuchten Bereich eine qualitativ und quantitativ ähnliche pH-Abhängigkeit der Viskosität wie das bestrahlte Ketoprofen-Gel. Darüberhinaus sind weitere photochemisch induzierte Mechanismen denkbar, die zur beobachteten Viskositätssteigerung des Ketoprofen-Gels beitragen können. Als Beispiel sei an dieser Stelle die photochemisch induzierte radikalische Quervernetzung der Polyacrylsäuremoleküle genannt. Aufgrund der geforderten Monomerenfreiheit medizinisch genutzter Polyacrylate ist eine photochemisch induzierte radikalische Polymerisation von Acrylsäuremonomeren, entsprechend der aus der Literatur bekannten Ketoprofen vermittelten photochemischen Polymerisation von Acrylamid [154], im handelsüblichen Ketoprofen-Gel jedoch auszuschließen.

4.9.3 Bestimmung der Eindringtiefe von UVA-Strahlung in kommerziell verfügbarem Ketoprofen-Gel

4.9.3.1 Vorüberlegung

Das handelsübliche 2,5 %-ige Ketoprofen-Gel zählt zu den halbfesten, wäßrigen Arzneiformen. In Analogie zu den UVA-bestrahlten rein wäßrigen Ketoprofen-Lösungen führen die photochemisch gebildeten lipophilen, nicht mehr dissoziationsfähigen Ketoprofen-Photoprodukte auch im Gel zur Emulsionsbildung. Basierend auf der sich hieraus ergebenden visuell erkennbaren Eintrübung konnte durch densitometrische Messungen ein erster Eindruck der UVA-induzierten Veränderungen des Gels erhalten werden.

Da die halbfeste Konsistenz des Gels ein Sedimentieren der Ketoprofen-Photoprodukte verhindert, stellt die Bestimmung des räumlichen Ausmaßes der Geltrübung neben dem Nachweis eines vorliegenden photoinduzierten Wirkstoffabbaus eine einfache Methode zur Ermittlung der Eindringtiefe von UVA-Strahlung in eine Ketoprofen-Gelschicht dar.

4.9.3.2 Versuchsdurchführung

Zur Vermeidung möglicher Fehlinterpretationen aufgrund von Geltrübungen, die durch eine Verdunstung des im Gel befindlichen Alkohols und teilweises Eintrocknen des Gels hervorgerufen werden, wurden die nachfolgenden Untersuchungen in einer allseitig UV-durchlässigen, luftdicht verschlossenen Quarzküvette (Schichtdicke = 1 cm) durchgeführt. Um einen direkten Vergleich von UVA-bestrahltem und unbestrahltem Ketoprofen-Gel innerhalb der Küvette zu ermöglichen, wurde

diese vor Versuchsbeginn so mit schwarzem Isolierband abgeklebt, daß das Licht nur durch den linken Seitenbereich einer Küvettenfläche eindringen konnte. Anschließend wurde die so präparierte Küvette unter Ausschluß von Sonnen- und UV-Licht randvoll mit dem kommerziell verfügbaren 2,5 %-igen Ketoprofen-Gel gefüllt, luftdicht verschlossen und verschiedenen UVA-Dosen (0; 2; 4; 6; 8; 10; 12; 14; 16 J/cm²) ausgesetzt. Zur Bestimmung der photoinduzierten Veränderungen des Gels wurde die Küvette nach jeder Bestrahlungsdosis eingescannt. Die anschließende Auswertung des Bildes erfolgte densitometrisch durch die Bestimmung der Graustufen des eingescannten Bildes.

4.9.3.3 Ergebnisse und Diskussion

Betrachtet man die Ergebnisse der densitometrischen Messungen (rechtes Diagramm in Abb. 32) der links im Bild dargestellten Küvetten, so ist deutlich zu erkennen, daß sich die Trübung des Gels mit zunehmender UVA-Dosis in größere Tiefen erstreckt. Oberhalb einer UVA-Dosis von 10 J/cm² blieben die optischen Veränderungen des Gels jedoch weitgehend konstant, so daß davon ausgegangen werden kann, daß der photoinduzierte Ketoprofen-Abbau und folglich auch die Eindringtiefe der UVA-Strahlung im Gel auf eine Tiefe von etwa 5 bis 6 mm begrenzt sind. Im Gegensatz hierzu konnten im abgeklebten Küvettenbereich (rechte Küvettenhälfte) keine visuell erkennbaren Veränderungen des Gels festgestellt werden.

Inwieweit die visuell erkennbaren optischen Veränderungen des Gels mit dem photoinduzierten Abbau von Ketoprofen und der Bildung von H₂O₂ korrespondieren, war Gegenstand der nachfolgend beschriebenen Untersuchungen.

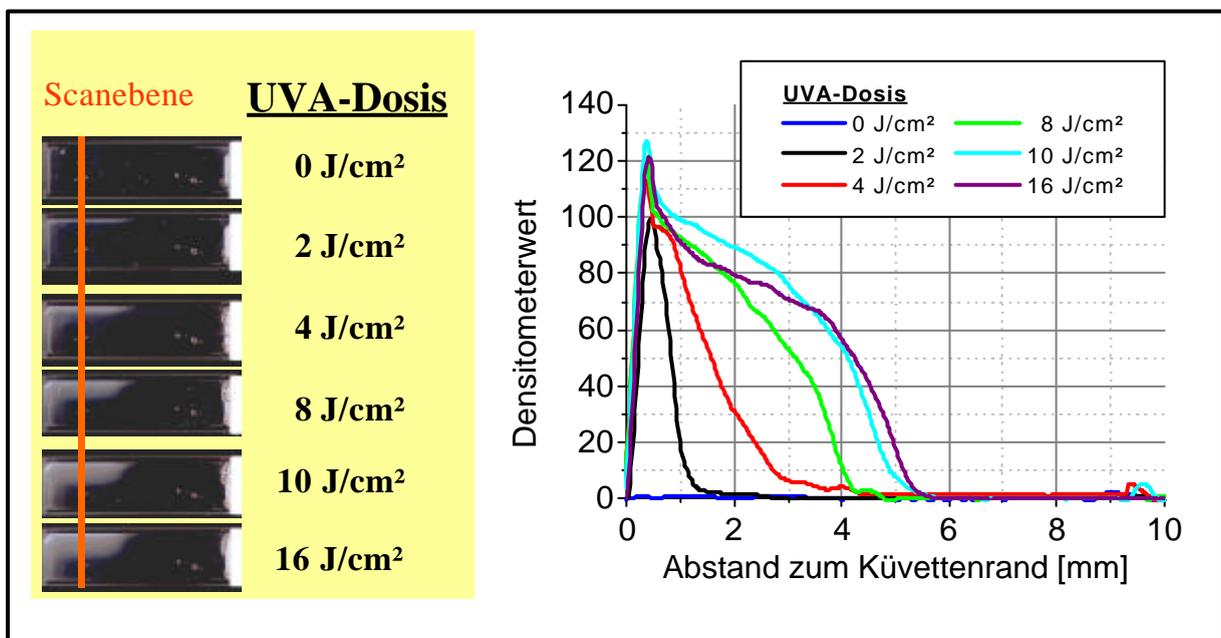


Abb. 32 Bestimmung der Eindringtiefe von UVA-Licht in Ketoprofen-Gel

4.9.4 Zerlegung des Ketoprofen-Gels in einzelne Schichten

4.9.4.1 Versuchsdurchführung

Um die Abhängigkeit des Ketoprofen- bzw. H_2O_2 -Gehaltes des bestrahlten Gels von der Schichttiefe bestimmen zu können, war es notwendig, das Gel reproduzierbar in einzelne, möglichst dünne Schichten zu zerlegen. Aus diesem Grund wurde die in Abb. 33 dargestellte Apparatur entwickelt, die hauptsächlich aus einer Mikrometerschraube, dem Bestrahlungsgefäß mit Kappe und einem Wischer besteht.

Für die Überprüfung der Reproduzierbarkeit der Herstellung einzelner Gelschnitte wurde das aus schwarzem PVC bestehende Bestrahlungsgefäß (Innendurchmesser = 11,6 mm, Höhe = 15 mm) luftblasenfrei mit Gel gefüllt. Das „überstehende“ Gel wurde mit einem rasierklingenbestückten Wischer vorsichtig entfernt, so daß eine gleichmäßig glatte Oberfläche entstand. Anschließend wurde das Bestrahlungsgefäß in die Schnittapparatur überführt und das Gel nach entsprechender Verstellung der μm -Schraube in einzelne Schichten ($5 \times 400 \mu\text{m}$ und $5 \times 250 \mu\text{m}$) zerlegt. Zur statistischen Absicherung wurde diese Prozedur fünfmal wiederholt. Für die Bestimmung des Ketoprofen-Gehaltes wurden die Gelschnitte in je $750 \mu\text{l}$ Methanol gelöst. Anschließend wurden $50 \mu\text{l}$ dieser methanolischen Untersuchungslösungen mit $200 \mu\text{l}$ einer 10 mM Boratlösung verdünnt und mit Hilfe der CE-UV bei einer Wellenlänge von 257 nm analysiert.

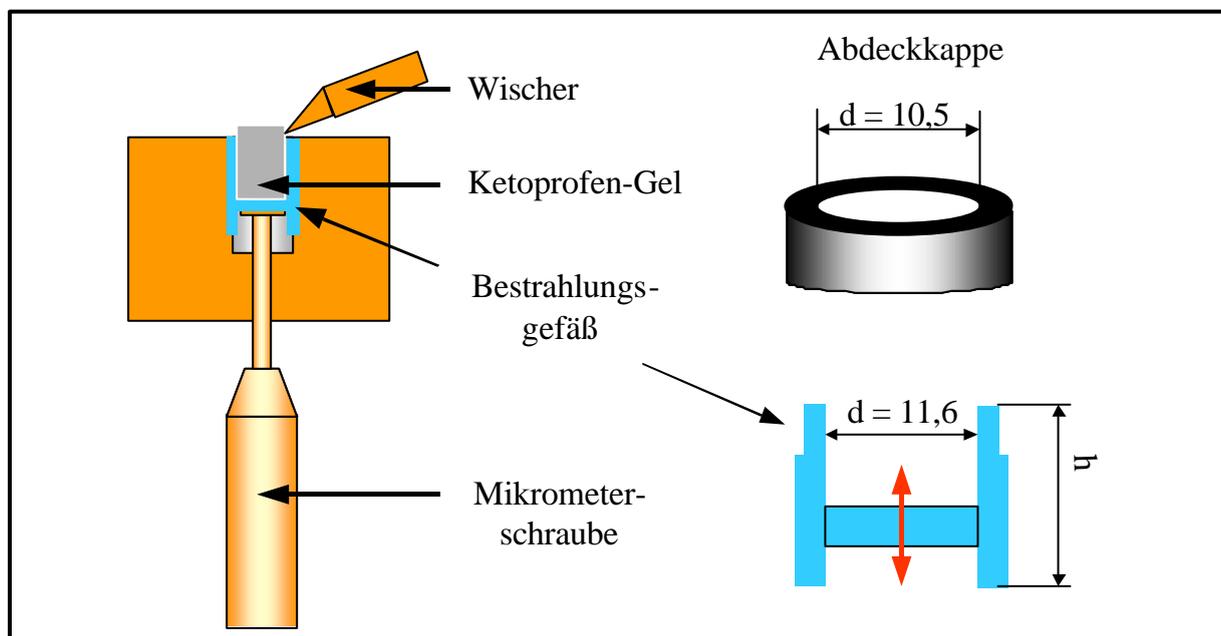


Abb. 33 Apparatur zum Schneiden eines Gels

4.9.4.2 Ergebnisse und Diskussion

Bezieht man die ermittelte Fläche des Ketoprofen-Peaks auf die jeweilige Schichtdicke, erhält man direkt miteinander vergleichbare, relative Konzentrationsangaben (Abb. 34). Dabei traten keine signifikanten Unterschiede der Mittelwerte und Streuungen zwischen den beiden eingesetzten Schnittstärken auf. Die statistische Auswertung (Abb. 34) belegt, daß mit der vorgestellten Apparatur eine reproduzierbare Herstellung einzelner Gel-Schnitte möglich ist.

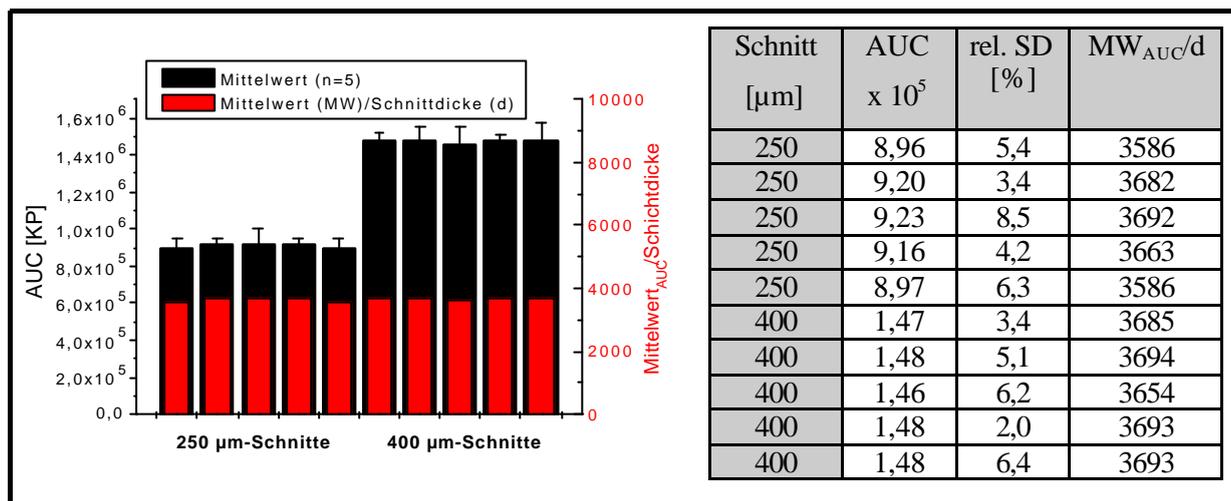


Abb. 34 Statistische Daten zur Ketoprofen-Bestimmung in verschiedenen Gel-Schnitten (n = 5)

4.9.5 Untersuchungen zum UVA-induzierten Ketoprofen-Zerfall in einem handelsüblichen 2,5 %-igen Ketoprofen-Gel

4.9.5.1 Versuchsdurchführung

Das Bestrahlungsgefäß wurde in Analogie zu der unter 4.9.4.1 beschriebenen Versuchsdurchführung so mit Ketoprofen-Gel gefüllt, daß eine gleichmäßige Bestrahlungsoberfläche entstand.

Da das Gel nach der Bestrahlung eine sehr zähe Konsistenz besitzt und dazu neigt, am Gefäßrand haften zu bleiben, erwies es sich als günstig, dem Bestrahlungsgefäß während der UVA-Exposition eine im Innendurchmesser nur minimal kleinere schwarze PVC-Kappe (d = 10,5 mm) aufzustecken. Durch den hieraus resultierenden 450 µm breiten unbestrahlten Gelrand konnte der Gelkörper auch nach der Bestrahlung problemlos aus dem Bestrahlungsgefäß herausgeschoben und zerlegt werden. Um ein zusätzliches Eintrocknen des Gels während der Bestrahlung durch Verdunstungseffekte weitgehend ausschließen zu können, wurde das Bestrahlungsgefäß während der gesamten Bestrahlungszeit mit einer UV-durchlässigen Quarzplatte abgedeckt. Unmittelbar nach der UVA-

Exposition von 8 J/cm^2 wurde die PVC-Abdeckkappe entfernt und das Bestrahlungsgefäß in die Schnittapparatur überführt. Nach entsprechender Verstellung der μm -Schraube wurde die bestrahlte Probe in einzelne Schichten ($2 \times 400\ \mu\text{m}$ und $18 \times 250\ \mu\text{m}$) zerlegt.

Anschließend wurden die Gelschnitte in der bereits beschriebenen Weise in $750\ \mu\text{l}$ Methanol gelöst und zur Bestimmung des Ketoprofen-Gehaltes (CE-UV $257\ \text{nm}$) mit einer $10\ \text{mM}$ Boratlösung im Verhältnis $1:4$ verdünnt. Die Bestimmung des Gesamtperoxidgehaltes (H_2O_2 , KP-OOH) erfolgte indirekt mit Hilfe des FOX-Testes.

4.9.5.2 Ergebnisse und Diskussion

Die Ergebnisse der Ketoprofen- bzw. Peroxidbestimmung in Abhängigkeit von der Schichttiefe sind in Abb. 35 dargestellt.

Erwartungsgemäß nimmt der Gesamtperoxidgehalt der einzelnen Gelschichten (schwarzer Graph) mit zunehmender Schichttiefe kontinuierlich ab. Die maximale Peroxidkonzentration tritt demzufolge in der obersten Gelschicht auf und beträgt ca. $4,5\ \text{mM}$.

Der parallel hierzu bestimmte Ketoprofen-Gehalt sinkt in der obersten $400\ \mu\text{m}$ dicken Gel-Schicht auf durchschnittlich die Hälfte der Ausgangskonzentration. Wie man Abb. 35 entnehmen kann, ist Ketoprofen erst in einer Schichttiefe von ungefähr drei Millimetern vollständig verfügbar. Bedenkt man, daß bei der topischen Applikation eines Rheuma-Gels dieses nicht millimeterdick, sondern dünn

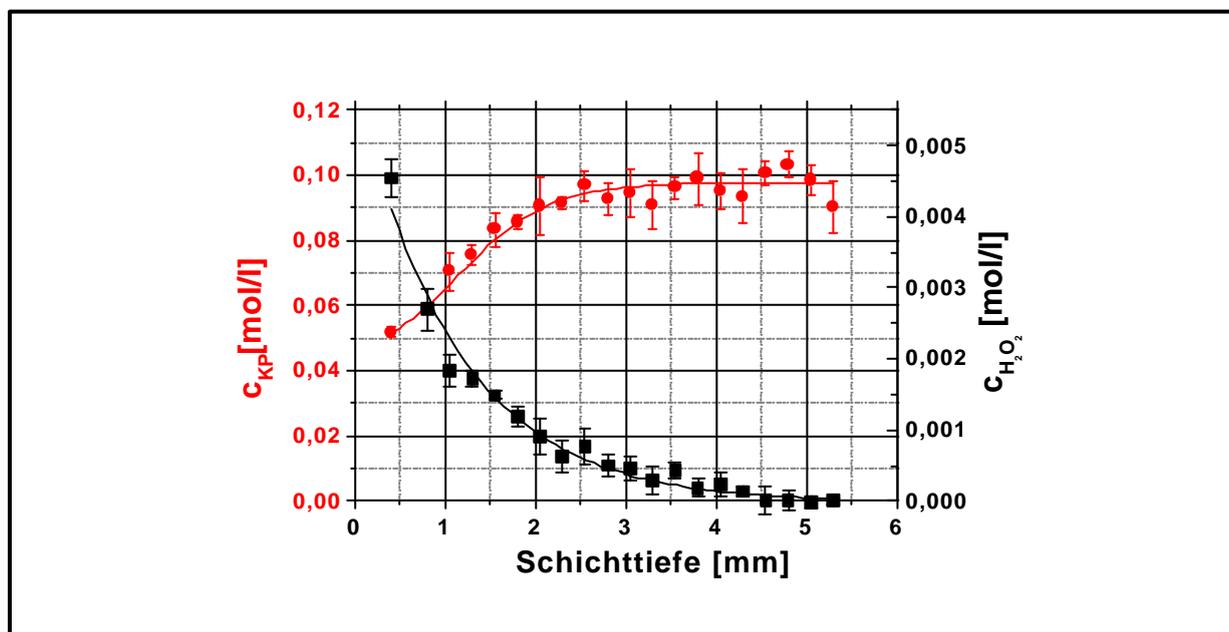


Abb. 35 Ketoprofen-Abbau und H_2O_2 -Entstehung in einem UVA-exponierten ($8\ \text{J/cm}^2$) Gel in Abhängigkeit von der Schichttiefe

aufgetragen und in die Haut einmassiert wird, so daß letztlich ein Gelfilm von einigen zehn Mikrometern entsteht, ergibt sich zwangsläufig die Frage, welche Auswirkungen geringe UVA-Dosen (8 J/cm^2) für die Wirkstoffverfügbarkeit in der Haut und letzten Endes auch für die antirheumatische Wirksamkeit der Arzneiformulierung besitzen. Unter diesem Gesichtspunkt wurden die nachfolgend beschriebenen Penetrationsuntersuchungen an humaner exzidierte Haut durchgeführt.

4.10 Penetrationsuntersuchungen an humaner Haut

4.10.1 Allgemeines

Penetrationsuntersuchungen an humaner exzidierte Haut werden allgemein zu den in vitro Modellversuchen gezählt. Generell geht man davon aus, daß die eingesetzte Haut im Hinblick auf passive Transportvorgänge vollständig funktionstüchtig ist. Somit können mit diesem in vitro-Modell grundsätzliche Aussagen zum Penetrationsverhalten topisch applizierter Wirkstoffe in humaner Haut bzw. deren Lokalisation und Anreicherung in verschiedenen Hautschichten nach erfolgter Penetration gewonnen werden.

Besonders bei Wirkstoffen, deren Wirksamkeit (Freisetzung der Wirkform aus einem Prodrug) bzw. Unwirksamkeit (photochemische Instabilität eines Wirkstoffs) auf strukturellen Veränderungen des Arzneistoffmoleküls in oder auf der Haut beruht, kann mit dieser Untersuchungsmethode das chemische Verhalten direkt am oder im Applikationsorgan nachgebildet und das sich hieraus ergebende Nutzen-Risiko-Verhältnis besser abgeschätzt werden.

4.10.2 Diffusionszelle nach Franz

Für die Charakterisierung des Penetrationsverhaltens von Ketoprofen und dessen Photoprodukten aus einem handelsüblichen 2,5 %-igen Ketoprofen-Gel in humaner exzidierte Haut (ex vivo) wurde als Penetrationsmodell die Diffusionszelle nach Franz gewählt. Der prinzipielle Aufbau der Diffusionszelle ist in Abb. 36 dargestellt.

Die Diffusionszelle nach Franz zählt zu den Einkammersystemen und besteht aus einem doppelwandigen, temperierbaren Glasmantelgefäß, in dessen Innenraum ($V = 20 \text{ cm}^3$) die Akzeptorflüssigkeit (isotonischer Phosphatpuffer pH 7,4) im direkten Kontakt zur dermalen Seite der frisch präparierten Haut ($A = 3,14 \text{ cm}^2$) steht, welche durch eine Metallklammer mechanisch stabilisiert auf einer Gaze liegt. Für die Einhaltung möglichst konstanter Hydratationsbedingungen wird die Zelle während des gesamten Untersuchungszeitraumes mit einer Quarzglasabdeckung versehen. Um einen möglichen Fremdlichteinfall aus der Umgebung auszuschließen, wurde die

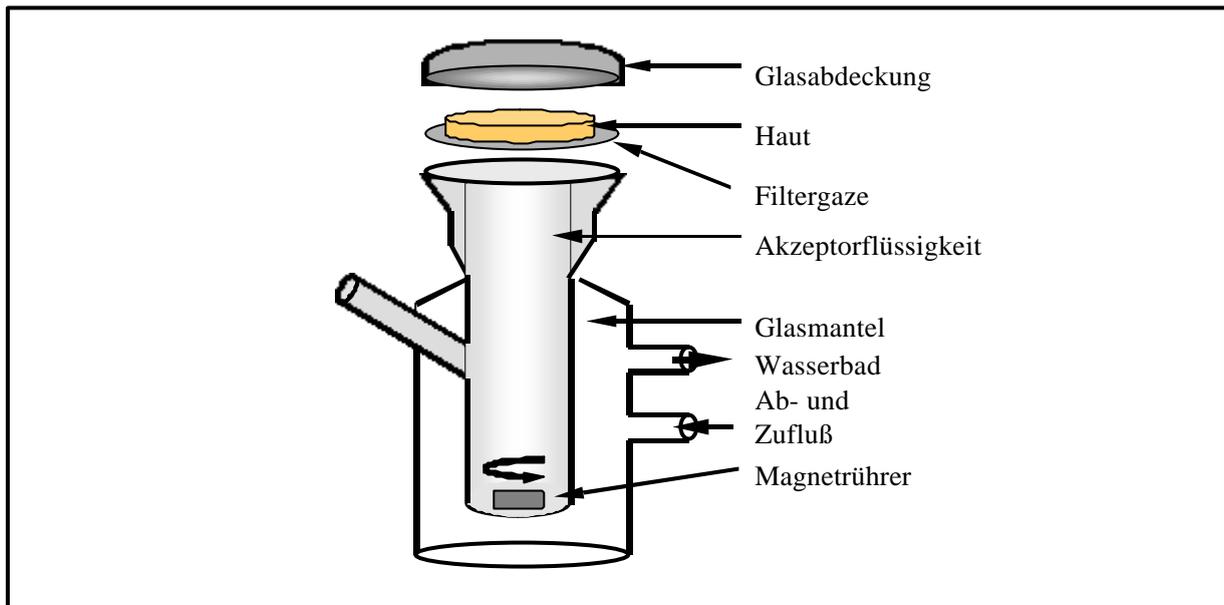


Abb. 36 Schematischer Aufbau der Diffusionszelle nach Franz

Kammer bei den photochemischen Untersuchungen zusätzlich in Aluminiumfolie eingehüllt. Eine homogene Verteilung des penetrierten Wirkstoffs in der Akzeptorflüssigkeit konnte durch ständiges Rühren des Akzeptormediums gewährleistet werden.

4.10.3 Vergleichende Penetrationsuntersuchungen zur Bestimmung der Wirkstoffverfügbarkeit topisch applizierten Ketoprofens unter dem Einfluß von UVA-Licht in humaner exzidierte Haut

Aus den in Kapitel 4.9.5 beschriebenen Untersuchungsdaten wird deutlich, daß der Wirkstoffgehalt des handelsüblichen 2,5 %-igen Ketoprofen-Gels infolge einer UVA-Bestrahlung (8 J/cm^2) in der obersten $400 \mu\text{m}$ -dicken Schicht auf etwa 50 % seiner Ausgangskonzentration sinkt. Ziel der im folgenden beschriebenen Untersuchungen war es zu klären:

- ob und in welchem Ausmaß mit einer derartigen photochemisch induzierten Wirkstoffreduktion auch in einer Ketoprofen-behandelten UVA-exponierten Haut im Vergleich zur unbestrahlten Haut zu rechnen ist,
- welche Ketoprofen-Photoprodukte auf bzw. in der Haut gebildet werden,
- welche Penetrationseigenschaften diese in humaner Haut besitzen und
- inwieweit und bis in welche Tiefe ein UVA-induzierter Ketoprofen-Abbau auch in der Ketoprofen-behandelten Haut nachweisbar ist.

Im Hinblick auf die praktische Anwendung eines Rheuma-Gels wurden die nachfolgenden Penetrationsuntersuchungen auf zwei Grenzfälle beschränkt (Abb. 37).

Der erste Fall (PEN 2) basiert auf der Annahme, daß der Patient sich ungeachtet der Anwendungshinweise des Herstellers unmittelbar nach der Gel-Applikation direktem Sonnenlicht aussetzt. Im Versuch wurde die exzidierte Haut daher sofort nach der Gel-Applikation mit einer UVA-Dosis von 8 J/cm^2 bestrahlt und anschließend für 30 bzw. 300 Minuten penetriert.

Im Gegensatz hierzu soll der zweite Fall (PEN 3) die Vorgehensweise eines auf die Anwendungshinweise des Herstellers achtenden Patienten darstellen, welcher den direkten Sonnenkontakt 30 bzw. 300 Minuten nach der Gel-Applikation meidet und sich erst dann einer Sonnenexposition aussetzt. Experimentell wurde dieser Fall (PEN 3) so nachgestellt, daß die UVA-Exposition (8 J/cm^2) der Ketoprofen-behandelten Haut erst nach einer Penetrationszeit von 30 bzw. 300 min erfolgte.

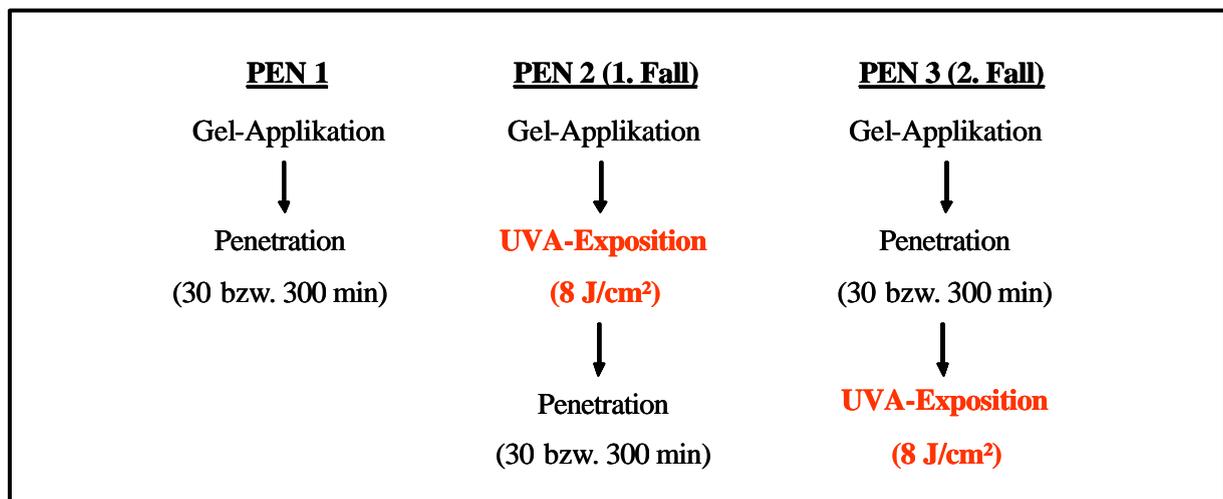


Abb. 37 Allgemeines Versuchsschema der Penetrationsuntersuchungen an humaner exzidierte Haut

4.10.3.1 Versuchsdurchführung

Zirka 30 min vor Versuchsbeginn wurden die Franz'schen Diffusionszellen mit dem Akzeptormedium (Phosphatpuffer pH 7,4) gefüllt und auf $32 \text{ }^\circ\text{C}$ temperiert. Nachdem die frisch aufgetaute Haut (10.3.1) durch vorsichtiges Abtupfen mit einem Watteträger vollständig vom Gefrierwasser befreit war, wurden ca. 20 mg des handelsüblichen Ketoprofen-Gels auf der gesamten Epidermisoberfläche ($d = 2 \text{ cm}$) gleichmäßig verteilt.

Für die Bestimmung der Ketoprofen-Konzentration der einzelnen Hautschichten einer unbestrahlten Kontrolle (PEN1) wurde die präparierte Haut unmittelbar nach der Gel-Applikation unter Ausschluß von Licht in der Diffusionszelle fixiert und für 30 bzw. 300 min penetriert.

Im zweiten Teil der Untersuchungen (PEN 2 und PEN 3) wurden die präparierten Häute unter sonst gleichen Versuchsbedingungen einer zusätzlichen UVA-Dosis von 8 J/cm^2 ausgesetzt, wobei die UVA-Exposition der Ketoprofen-behandelten Haut im Teilversuch PEN 2 unmittelbar nach der Gel-Applikation, im Teilversuch PEN 3 hingegen erst nach einer Penetrationsdauer von 30 bzw. 300 min erfolgte. Um ein Eintrocknen der Hautpräparate während der UV-Exposition zu vermeiden, wurden diese während der Bestrahlung mit einer Quarzplatte abgedeckt.

Unmittelbar nach Ablauf der Penetrations- (PEN 1 und PEN 2) bzw. Bestrahlungszeit (PEN 3) wurde der Formulierungsrückstand von der Hautoberfläche vorsichtig mit einem Watteträger entfernt und die Hautpräparate entsprechend Kap. 10.3.3 aufgearbeitet und analysiert.

4.10.4 Ergebnisse und Diskussion

Betrachtet man die logarithmische Auftragung der in den einzelnen Hautschichten bestimmten Ketoprofen-Konzentrationen (Abb. 38 a), so kann man feststellen, daß eine UVA-Exposition der Ketoprofen-behandelten Haut unabhängig vom Bestrahlungszeitpunkt in allen untersuchten Hautschichten (mit Ausnahme der obersten Stratum-Corneum-Schicht SC1) zu einer erheblichen Verringerung des Wirkstoffgehaltes im Vergleich zur unbestrahlten Haut führt. Stellt man den gleichen Sachverhalt linear und relativ zur unbestrahlten Kontrolle dar (Abb. 38 b), wird deutlich, daß der Ketoprofen-Gehalt in den einzelnen Hautschichten auf durchschnittlich 10 bis 20 % der unbestrahlten Kontrolle sinkt. Bemerkenswert erscheint, daß die Ketoprofen-Verteilungsprofile in den untersuchten Hautschichten der bestrahlten Hautpräparate (PEN 2 und PEN 3) trotz der unterschiedlichen Bestrahlungszeitpunkte sowohl nach einer Penetrationszeit von 30 als auch 300 min (s. Anhang Abb. 6) einen sehr ähnlichen Verlauf aufweisen. Daraus folgt, daß auch bereits in die Haut penetriertes Ketoprofen unter dem Einfluß geringer UVA-Dosen (8 J/cm^2) photochemisch zersetzt wird.

Im Gegensatz hierzu unterscheiden sich die Ketoprofen-Konzentrationen der Akzeptormedien der bestrahlten Hautpräparate PEN 2 und PEN 3 deutlich voneinander. Während der Ketoprofen-Gehalt der Akzeptormedien der vor der Penetration bestrahlten Hautpräparate (PEN 2) auf 0 ($t_{\text{pen}} = 30 \text{ min}$) bzw. 15 % ($t_{\text{pen}} = 300 \text{ min}$) der unbestrahlten Kontrolle (PEN 1) sinkt, liegt die Ketoprofen-Konzentration der Akzeptormedien der nach der Penetration bestrahlten Hautproben (PEN 3) im Größenbereich der unbestrahlten Kontrolle (PEN 1). Als Ursache für diese deutlichen Konzentrationsdifferenzen kann die begrenzte Eindringtiefe von UVA-Licht in die Haut angesehen werden.

Entsprechend der unter 4.9.5 beschriebenen Untersuchungen ist davon auszugehen, daß der photochemisch induzierte Ketoprofen-Abbau im applizierten, handelsüblichen Ketoprofen-Gel nach einer UVA-Dosis von 8 J/cm^2 auf maximal 5 bis 6 mm begrenzt ist, wobei der Ketoprofen-Gehalt bereits in der obersten $400 \mu\text{m}$ dicken Schicht durchschnittlich auf die Hälfte seiner Ausgangskonzentration sinkt. Nimmt man an, daß die Ketoprofen-Konzentration der obersten, mit dem aufgetragenen Gel im unmittelbaren Kontakt stehenden Hautschicht SC 1 der für die Penetration

maßgebenden Ausgangskonzentration des Ketoprofens entspricht, ist diese im Vergleich zur unbestrahlten Kontrolle (PEN 1) nach einer UVA-Exposition von 8 J/cm^2 auf mindestens¹ 40 bis 50 % bzw. ausgehend von SC 2 auf 13 bis 17 % reduziert. Da die Penetration des Ketoprofens einem passiven Transportmechanismus und somit einem Konzentrationsgradienten folgt, wirkt sich die photochemische Reduktion der Ausgangskonzentration auf den gesamten Penetrationsvorgang aus und

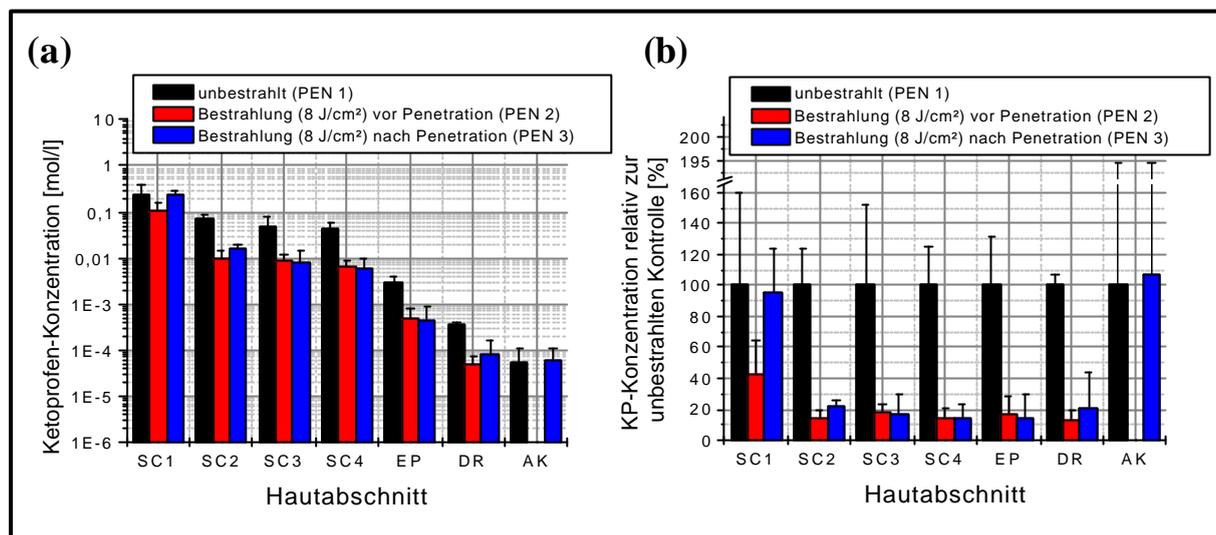


Abb. 38 Ketoprofen-Verteilung einer vor und nach einer 30-minütigen Penetration bestrahlten Haut im (a) direkten und (b) relativen Vergleich zur unbestrahlten Kontrolle

führt in allen Hautschichten einschließlich der Akzeptorflüssigkeit zu einer Verminderung der Wirkstoffkonzentration. Aufgrund der nachgewiesenen Reduktion der Akzeptor-Ketoprofen-Konzentration auf 0 ($t_{pen.} = 30 \text{ min}$) bzw. 15 % ($t_{pen.} = 300 \text{ min}$) im Vergleich zur unbestrahlten Kontrolle muß die antirheumatische Wirksamkeit des unmittelbar nach der Gel-Applikation bestrahlten Ketoprofen-Gels ernsthaft in Frage gestellt werden.

Erfolgt die Bestrahlung der Ketoprofen-behandelten Haut erst nach der Wirkstoff-Penetration, stehen für den eigentlichen Penetrationsvorgang 100 % des applizierten Wirkstoffs zur Verfügung, so daß das Verteilungsprofil des Wirkstoffs bis zum Zeitpunkt der Bestrahlung der unbestrahlten Kontrolle entspricht. Die Verminderung des Ketoprofen-Gehaltes der nach der Penetration bestrahlten Hautproben (PEN 3) ist somit proportional zur Eindringtiefe des Lichtes in die Haut. Folglich bleibt

¹ Aus den vorliegenden Untersuchungsdaten wird deutlich, daß in der obersten Hautschicht SC1 der bestrahlten, insbesondere der nach der Penetration bestrahlten, Hautproben trotz eines photochemisch induzierten Ketoprofen-Abbaus signifikant höhere Ketoprofen-Konzentrationen nachweisbar sind, als in der unbestrahlten Kontrolle. Diese zunächst widersprüchlichen Ergebnisse basieren wahrscheinlich auf einer unvollständigen Entfernung des Formulierungsrückstandes der bestrahlten Hautpräparate. Eine mögliche Ursache hierfür ist, daß das Gel während der Bestrahlung zunehmend eintrocknet. Die sonst übliche vor der Aufarbeitung der Haut durchgeführte vollständige Entfernung des nach der Bestrahlung als eingetrockneter Polyacrylat-Film vorliegenden Formulierungsrückstandes kann aufgrund seiner stark haftenden Eigenschaften durch vorsichtiges Abwischen mit einem Watteträger nicht mehr erreicht werden. Der Formulierungsrückstand wird somit erst innerhalb der ersten fünf Tesafilmabrisse (= SC 1) entfernt, woraus sich eine scheinbare Aufkonzentrierung der nachzuweisenden Analyten in der obersten Stratum-corneum-Schicht SC 1 ergibt. Aus Gründen der Vollständigkeit wurden die erhaltenen SC 1-Werte in den Graphiken zwar mit angegeben, blieben bei der vergleichenden Interpretation der Ergebnisse jedoch unberücksichtigt.

die Ketoprofen-Konzentration tieferliegender Hautschichten, die aufgrund der begrenzten Eindringtiefe des UVA-Lichtes von der Strahlung nicht erreicht werden, unverändert. Der photochemische Umsatz des penetrierten Ketoprofens nimmt somit mit zunehmender Schichttiefe ab, so daß die Ketoprofen-Konzentrationen des Akzeptors der nach der Penetration bestrahlten Hautproben (PEN 3) im Bereich der unbestrahlten Kontrolle liegen (Abb. 38). Demzufolge kann bei einer UVA-Exposition der Ketoprofen-behandelten Haut 30 bzw. 300 min nach der Applikation des Wirkstoffs zunächst mit einem der unbestrahlten Kontrolle entsprechenden Wirkungseintritt gerechnet werden. Die Verteilungsprofile der gebildeten Ketoprofen-Photoprodukte KP-OH, KP=O und EB in den beiden Teilversuchen PEN 2 und PEN 3 (Abb. 39) zeigen, daß die Photoprodukte unabhängig vom Zeitpunkt der Bestrahlung in allen Hautschichten vertreten sind. Demzufolge sind die Photoprodukte einerseits in der Lage, von der Hautoberfläche in tiefere Hautschichten zu penetrieren und können andererseits unter dem Einfluß von UVA-Licht auch aus dem bereits in die Haut penetrierten Ketoprofen gebildet werden. Da es sich bei den gebildeten Photoprodukten hauptsächlich um lipophile Strukturen handelt, ist nicht auszuschließen, daß diese in den lipophilen Bereichen des Stratum corneum akkumulieren und so auch über den Behandlungszeitraum hinaus als potentielle Photosensitizer zur Sensibilisierung verschiedener oxidativer Veränderungen lebenswichtiger Biostrukturen (PUVA, Proteine, Membranen, DNA) in der Haut beitragen.

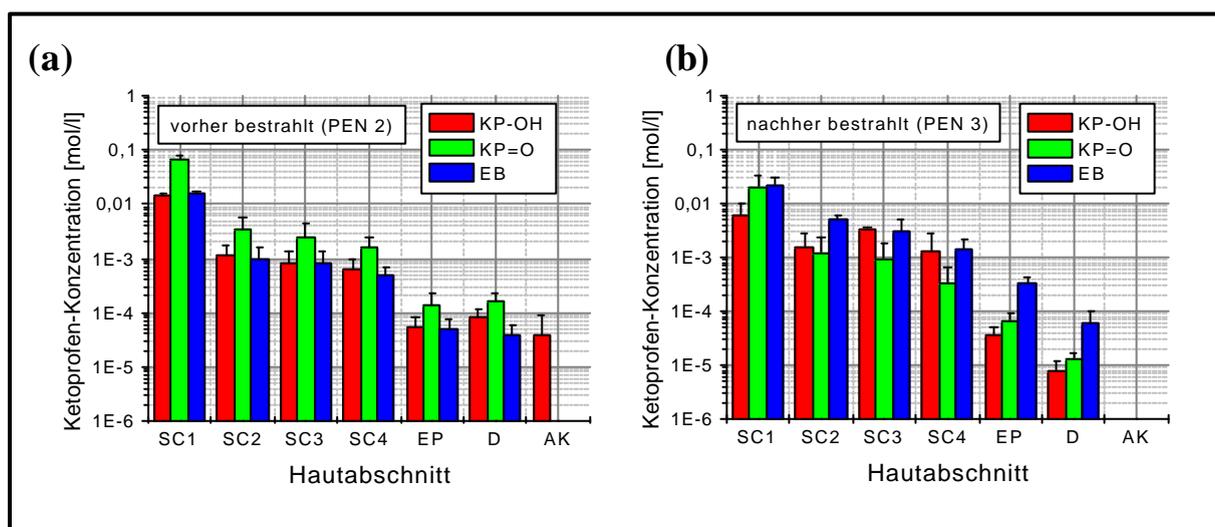


Abb. 39 Vergleich der Ketoprofen-Photoprodukt-Verteilung in humaner exzidiierter Haut bei unterschiedlichen Bestrahlungszeitpunkten. UVA-Exposition der Hautpräparate (a) vor und (b) nach der Penetration (30 min)

Vergleicht man die relativen Anteile der in die Haut penetrierten bzw. dort gebildeten Ketoprofen-Photoprodukte der oberen drei Hautschichten (Stratum corneum, Epidermis, Dermis) (Gesamtgehalt = 100 %, Tab. 5), ergeben sich in der prozentualen Verteilung der einzelnen Photoprodukte (KP-OH, KP=O, EB) deutliche Unterschiede in Abhängigkeit vom Bestrahlungszeitpunkt. Besonders hervorzuheben ist in diesem Zusammenhang die Verschiebung des Photoproduktspektrums in den nach der Penetration bestrahlten Präparaten (PEN 3) zugunsten des 3-Ethylbenzophenons.

Penetrationsdauer [min]	KP-OH [%]	KP=O [%]	EB [%]
30 min (vorher bestrahlt - PEN 2)	16	68	16
30 min (nachher bestrahlt – PEN 3)	18	32	50
300 min (vorher bestrahlt – PEN 2)	14	68	18
300 min (nachher bestrahlt – PEN 3)	26	20	54

Tab. 5 Prozentuale Anteile der Ketoprofen-Photoprodukte KP-OH, KP=O und EB in Abhängigkeit (Gesamtgehalt = 100 %) vom Zeitpunkt der Bestrahlung

Dieses zunächst unerwartete Ergebnis kann damit erklärt werden, daß die Haut, insbesondere die für diese Untersuchungen genutzte exzidierte Haut, durch die schnelle Sauerstoff-verbrauchende photochemische Zersetzung des Ketoprofens temporär an Sauerstoff verarmt, so daß der weitere photoinduzierte Ketoprofen-Abbau unter anaeroben Reaktionsbedingungen mit der bevorzugten Bildung von 3-Ethylbenzophenon verläuft.

Da 3-Ethylbenzophenon sowohl unter aeroben als auch anaeroben Bedingungen aus dem UVA-induzierten Ketoprofen-Abbau hervorgeht, stellt es einen guten „Indikator“ für die Bestimmung der UVA-induzierten Abbaureaktionen des in der Haut eingelagerten Ketoprofens dar.

Betrachtet man diesbezüglich das Verteilungsprofil des in der Haut gebildeten 3-Ethylbenzophenons (s. Abb. 39 b), kann man feststellen, daß unter dem Einfluß geringer UVA-Dosen (8 J/cm²) in einer mit Ketoprofen-Gel behandelten Haut mit photochemischen Reaktionen bis in die oberen Schichten der Dermis gerechnet werden muß. Gleichzeitig wird durch den in tieferen Hautschichten stattfindenden Ketoprofen-Abbau die Barrierefunktion des Stratum Corneum für die dabei entstehenden Ketoprofen-Photoprodukte umgangen. Demzufolge können durch den UVA-induzierten Abbau des bereits in die Haut penetrierten Ketoprofens, unabhängig vom Penetrationsvermögen der einzelnen Photoprodukte, auch in tieferliegenden Hautschichten der Epidermis und Dermis Photoprodukt-Konzentrationen von 10⁻⁴ bis 10⁻⁵ mol/l erreicht werden. In diesem Konzentrationsbereich wurden durch die nachgewiesenen Photoprodukte am in vitro-Modell humaner Keratinozyten bereits erhebliche zytotoxische Reaktionen (vgl. Kap. 5.1.3) ausgelöst, die durch eine signifikante Reduktion der Lebendzellzahl und DNA-Syntheseleistung charakterisiert sind.

Folglich muß bei der topischen Anwendung eines Ketoprofen-Gels neben den häufig in der Literatur zitierten photoinduzierten Lichtreaktionen nach einer UVA- bzw. Sonnenexposition auch mit Hautreaktionen gerechnet werden, die auf der Zytotoxizität der gebildeten Ketoprofen-Photoprodukte beruhen.

4.10.5 Zusammenfassung

Aus den vorliegenden Untersuchungsdaten geht hervor, daß das handelsübliche 2,5 %-ige Ketoprofen-Gel bereits unter dem Einfluß geringer UVA-Dosen (0 - 12 J/cm²) deutliche Instabilitäten aufweist. Diese sind gekennzeichnet durch:

- eine starke Viskositätszunahme des Gels,
- eine Erhöhung des pH-Wertes,
- eine optisch sichtbare Eintrübung,
- einen deutlichen Wirkstoffverlust sowie
- die Bildung erheblicher Mengen H₂O₂.

Die ergänzend zu diesen Untersuchungen durchgeführten Penetrationsuntersuchungen an humaner exzidierter Haut (ex vivo) belegen weiterhin, daß

- topisch appliziertes Ketoprofen unter dem Einfluß geringer UVA-Dosen (8 J/cm²) sowohl auf der Haut als auch in der Haut deutliche Instabilitäten besitzt,
- der Wirkstoffgehalt der oberen Hautschichten (SC2, SC3, SC4, EP und DR) einer UVA-exponierten Ketoprofen-Gel-behandelten Haut unabhängig vom Bestrahlungszeitpunkt auf durchschnittlich 13 % ($t_{\text{Pen}} = 30 \text{ min}$) bzw. 17 % ($t_{\text{Pen}} = 300 \text{ min}$) im Vergleich zur unbestrahlten Kontrolle sinkt (s. Abb. 38, Anhang Abb. 6) und
- die aus dem photochemischen Zerfall hervorgehenden, im Zellversuch als zytotoxisch charakterisierten Ketoprofen-Photoprodukte KP-OH, KP=O und EB (s. 5.1.3) sowohl in die Haut penetrieren als auch in der Haut gebildet werden können.

Da sowohl der Wirkstoffgehalt als auch die physikochemischen Eigenschaften der Arzneizubereitung unter dem Einfluß von UVA-Licht erheblichen Veränderungen unterliegen, muß die antirheumatische Wirksamkeit des Gels bei einer UVA-Exposition der behandelten Körperpartien (z.B. durch Sonnenlicht) kritisch hinterfragt werden.

Zur Sicherstellung der antirheumatischen Wirksamkeit der handelsüblichen Arzneiform und zur Vermeidung photochemisch induzierter Nebenwirkungen sollte demzufolge die topische Behandlung mit Ketoprofen-haltigen Arzneiformen grundsätzlich und im gesamten Behandlungszeitraum unter Ausschluß von UVA-Licht und somit auch Sonnenlicht erfolgen.

5 Toxikologische Untersuchungen

Ketoprofen zerfällt unter dem Einfluß von UVA-Licht über verschiedene radikalische Zwischenstufen zu einer Reihe von Photoprodukten und induziert die Bildung von Wasserstoffperoxid. Im wäßrigen Modellsystem werden hierbei sowohl die Peroxidation essentieller Membranbestandteile (Linolsäure) (s. Kap. 4.3) als auch der Abbau endogener Antioxidantien (Harnsäure, Glutathion) (s. Kap. 6.4) sensibilisiert. Ob und in welchem Maße dieses komplexe Reaktionsgefüge die Funktionalität lebender Systeme beeinflusst, war Gegenstand der nachfolgend beschriebenen Untersuchungen.

Ausgehend von den unter Kapitel 4.2 vorgestellten Meßergebnissen wurden toxikologische Untersuchungen am in vitro-Modell humaner Keratinozyten sowie in vivo an befruchteten, bebrüteten Hühnereiern (Hen's Egg Test) durchgeführt.

5.1 Charakterisierung des Proliferationsverhaltens Ketoprofen-behandelter humaner Keratinozyten unter dem Einfluß von UVA- und UVB-Strahlung

Keratinozyten bilden mit einem Zellanteil von 90 % die Hauptzellpopulation der Epidermis [155]. Das durch eine starke Proliferationsrate gekennzeichnete Epithelgewebe ist aufgrund seiner äußeren Lage verschiedenen Umwelteinflüssen wie z.B. Sonnenlicht am stärksten ausgesetzt. Gleichzeitig stellt es den Applikationsort topisch angewandter Arzneiformen dar. Im Hinblick auf eine topische Therapie mit Ketoprofen-haltigen Präparaten ergibt sich angesichts der beschriebenen Meßergebnisse die Frage, ob und in welchem Ausmaß die Vitalität humaner Keratinozyten bei einer gleichzeitigen UVA-Exposition durch Sonnenlicht oder künstliches UVA/B-Licht (Benutzung von Solarien) negativ beeinflusst wird.

Für die Bestimmung photo- bzw. zytotoxischer Eigenschaften topisch angewandter Arznei- und Hilfsstoffe stehen in der Dermatologie zahlreiche Möglichkeiten zur Verfügung, die auf der Erfassung des Proliferationsverhaltens der Zellen basieren [156]. Beispielhaft seien an dieser Stelle die Bestimmung der Zellzahl, der DNA-Syntheseleistung durch den Einbau und Nachweis verschiedener Basenanaloge (z.B. 5-Brom-2'-desoxyuridin) oder radioaktiv markierter Nukleoside (z.B. $^3\text{[H]}$ -Thymidin), Zellzyklus-assoziiierter Markerproteine (PCNA, Ki-67-Antigen) oder verschiedener Enzymaktivitäten (z.B. Lactatdehydrogenase) sowie das Anfärben der DNA durch fluoreszierende Farbstoffe (Propidiumiodid, Ethidiumbromid) genannt.

Im Rahmen der vorliegenden Arbeit wurden für die Bewertung antiproliferativer Effekte die Bestimmung der Lebendzellanzahl sowie der DNA-Syntheseleistung durch den Einbau von $^3\text{[H]}$ -Thymidin herangezogen.

5.1.1 Bestimmung der Lebendzellanzahl und der DNA-Syntheseleistung humaner Keratinozyten unter dem Einfluß von Ketoprofen

5.1.1.1 Theoretische Grundlagen

Die Bestimmung der Lebendzellanzahl basiert auf der Auszählung der lebenden, adhärent wachsenden Keratinozyten nach Noxenexposition im Vergleich zu nicht exponierten Zellen (= 100 %). Da das Auszählen der lebenden Zellen nicht auf dem Nachweis zellzyklusspezifischer Stoffwechselfvorgänge bzw. -intermediate beruht, können mit dieser Methode nur Aussagen zur Toxizität eines Xenobiotikums gegenüber der gesamten Zellpopulation getroffen werden.

Im Gegensatz hierzu handelt es sich bei der Bestimmung der DNA-Syntheserate um einen spezifischen Toxizitätstest, bei welchem ausschließlich die während der Noxenexposition in der S-Phase (Synthese-Phase des Zellzyklus) befindlichen Zellen erfaßt werden. Da die Zunahme des DNA-Gehaltes direkt mit der Zunahme der Zellzahl korreliert, stellt die Bestimmung der DNA-Syntheserate einen aussagekräftigen Proliferationsmarker dar.

Eine klassische Methode zur Bestimmung der DNA-Syntheserate verschiedener Zelltypen ist der Einbau von ^3H -Thymidin in frisch synthetisierte DNA. Das Prinzip dieser Methode basiert auf der szintillatorischen Erfassung des anstelle von natürlichem Thymidin inkorporierten radioaktiv markierten ^3H -Thymidins.

Durch die Kombination beider Methoden können so neben der allgemeinen Bestimmung der Photo- bzw. Zytotoxizität eines Xenobiotikums Rückschlüsse auf die noxeninduzierte Inhibition der Zellteilung geschlossen werden.

5.1.1.2 Versuchsdurchführung

Da jeder vom normalen Zellkulturmedium bzw. Puffer abweichende Zusatz (Lösungsmittel, Arzneistoffe, Hilfsstoffe) zu einer Beeinflussung des Proliferationsverhaltens der Zellen führen kann, wurden im Vorfeld der photochemischen Untersuchungen alle zugesetzten Verbindungen einzeln gegen eine unbehandelte Kontrolle (PBS-Puffer) getestet. Bei diesen Untersuchungen wurden die Zellen unter Ausschluß von Licht mit einer Phosphat-gepufferten Ketoprofen-Lösung (Konzentrationsbereich 0,01–500 μM , pH-Wert 7,4) versetzt und anschließend 24; 48 und 72 Stunden inkubiert.

Für die Untersuchungen der UV-induzierten antiproliferativ wirkenden Effekte wurden die Zellen unter sonst gleichen Bedingungen unmittelbar nach Ketoprofen-Zusatz einer UVA-Dosis von 1; 8 und 16 J/cm^2 bzw. einer UVB-Dosis von 120 und 200 mJ/cm^2 ausgesetzt. Die Bestimmung von Zellzahl (s. 10.2.3) und DNA-Syntheseleistung (s. 10.2.4) erfolgte bei allen Untersuchungen im Vergleich zur unbehandelten, unbestrahlten Kontrolle (= 100 %). Um die Ketoprofen-sensibilisierte Schädigung der Zellen durch UV-Strahlung nachzuweisen, wurden die Unterschiede in der Zellzahl und im

^3H -Thymidin-Einbau zwischen der unbehandelten, bestrahlten Kontrolle und den Ketoprofen-behandelten, bestrahlten Keratinozyten bei allen Untersuchungen auf Signifikanz ($p < 0,05$) geprüft (s. Kap. 10.2.6). Signifikante Unterschiede sind in den Abbildungen mit einem Stern (*) markiert.

5.1.1.3 Ergebnisse und Diskussion

Die Resultate der Bestimmung der Lebendzellanzahl und der DNA-Syntheseleistung (Abb. 40) bestätigen die in der Literatur aufgeführte toxikologische Unbedenklichkeit Ketoprofen-haltiger Präparate [157]. So konnte unter Ausschluß von UVA- bzw. UVB-Licht im untersuchten Konzentrationsbereich (0,01 – 500 μM) über einen Untersuchungszeitraum von 24, 48 und 72 Stunden keine signifikante Abnahme der Lebendzellanzahl (Abb. 40a) und der DNA-Syntheseleistung (Abb. 40 b) der Keratinozyten gegenüber der unbehandelten Kontrolle festgestellt werden. Daher kann im verwendeten in-vitro-Testsystem humaner Keratinozyten auch bei sehr hohen Ketoprofen-Konzentrationen von einer guten Akzeptanz des Wirkstoffs ausgegangen werden.

UV-exponierte Ketoprofen-behandelte Keratinozyten zeigen im Gegensatz hierzu ein grundsätzlich anderes Verhalten. Bereits bei geringen UVA- (1 und 8 J/cm^2) bzw. UVB-Dosen (200 mJ/cm^2 , Anhang Abb. 8) zeigt sich eine deutliche Proliferationshemmung der Zellen, die sich in

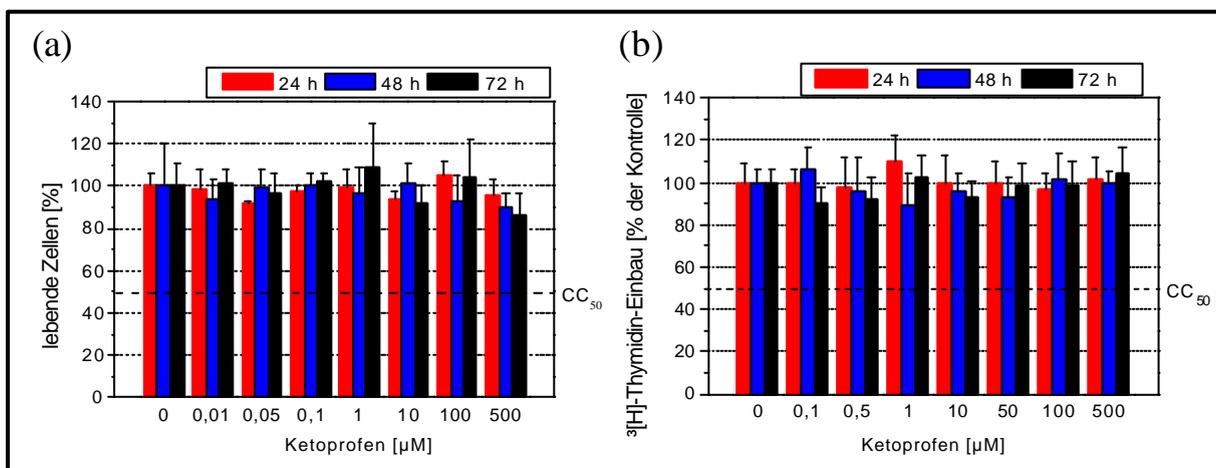


Abb. 40 Bestimmung (a) der Vitalität und (b) der DNA-Syntheseleistung humaner Keratinozyten unter dem Einfluß von Ketoprofen 24, 48 und 72 h nach Wirkstoff-Applikation (n = 12)

einer reduzierten Lebendzellanzahl und einer verminderten DNA-Syntheseleistung äußert. Aus den dargestellten Ketoprofen-Konzentration-abhängigen Verläufen der Lebendzellanzahl und des ^3H -Thymidin-Einbaus (Abb. 41) geht hervor, daß das Ausmaß der Zellschädigung sowohl von der Ketoprofen-Konzentration als auch von der eingestrahelten UVA-Dosis bestimmt wird.

Eine signifikante Verringerung der Lebendzellanzahl auf durchschnittlich 75 % der unbehandelten Kontrolle bei den mit 1 J/cm^2 bestrahlten Keratinozyten (UVA) konnte erst bei einer Ketoprofen-Konzentration von 100 μM nachgewiesen werden. Die Lebendzellanzahl der mit 8 J/cm^2 bzw.

16 J/cm² UVA bestrahlten Keratinozyten sank dagegen bereits bei einer Ketoprofen-Konzentration von 1 bzw. 0,1 µM signifikant auf 75 bzw. 77 % der unbehandelten Kontrolle. In ähnlicher Weise nimmt auch die DNA-Syntheseleistung der Zellen bei gleicher Ketoprofen-Konzentration mit zunehmender UVA-Exposition deutlich ab. Vergleicht man die aus Abb. 41 abgeschätzten CC₅₀-Werte der Lebendzellanzahl (CC_{50 (1J/cm²)} ≈ 1000 µM, CC_{50 (8J/cm²)} ≈ 100 µM, CC_{50 (16J/cm²)} ≈ 10 µM) mit denen des ³[H]-Thymidin-Einbaus (CC_{50 (1 J/cm²)} ≈ 500 µM, CC_{50 (8 J/cm²)} ≈ 50 µM, CC_{50 (16 J/cm²)} ≈ 0,1 µM), so

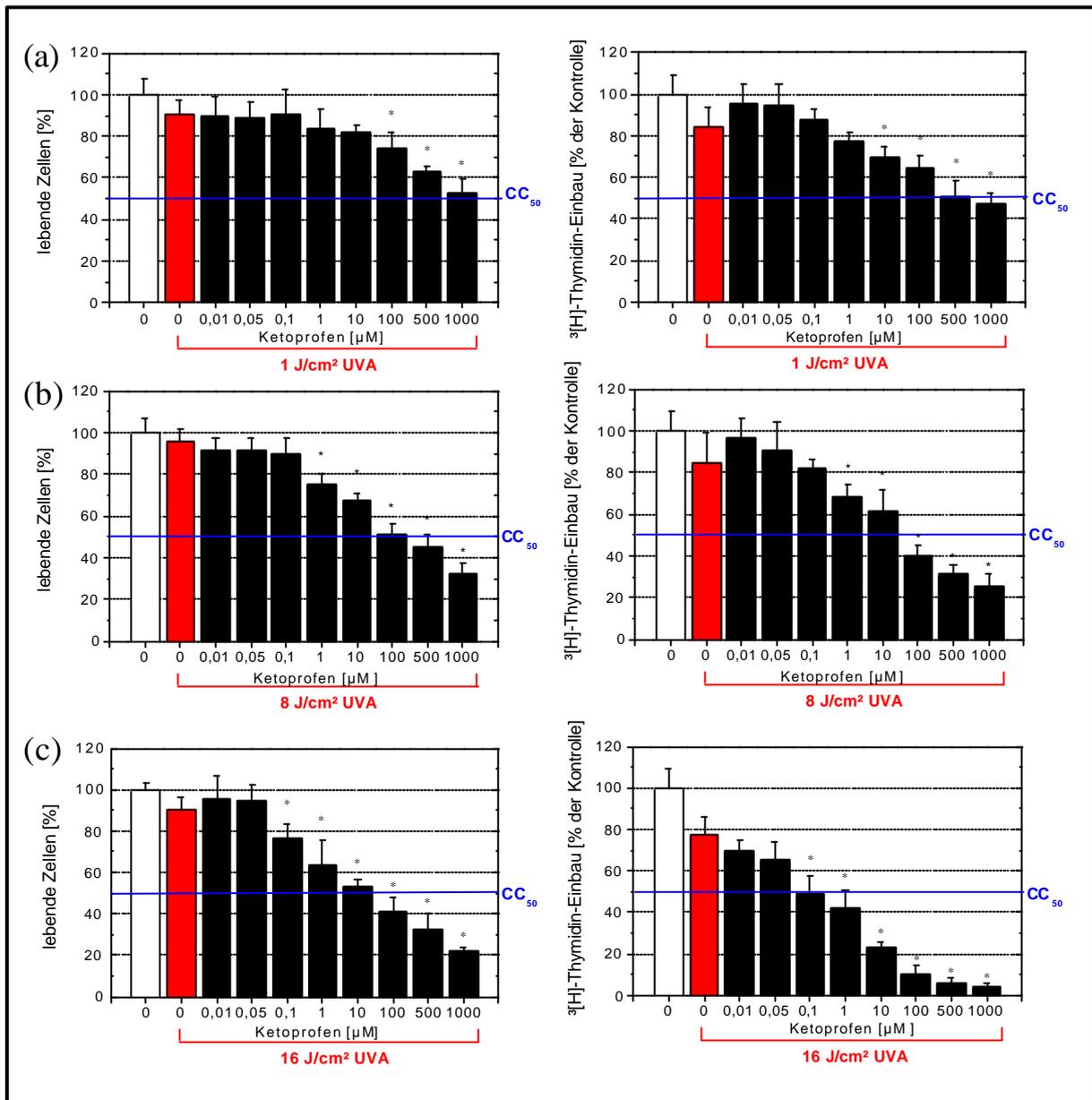


Abb. 41 Bestimmung (a) der Vitalität und (b) der DNA-Syntheseleistung Ketoprofen-behandelter Keratinozyten nach einer UVA-Dosis von 1, 8 bzw. 16 J/cm² (n = 6; * signifikant für p < 0,05)

wird deutlich, daß die in der S-Phase des Zellzyklus befindlichen Zellen wesentlich sensibler auf den UVA-induzierten Ketoprofen-Abbau reagieren als die Zellpopulation insgesamt. Ein ähnliches Verhalten konnte auch bei den UVB-exponierten Zellen beobachtet werden (s. Anhang Abb. 8).

5.1.2 Bestimmung des intrazellulären Gesamtperoxidgehaltes mit Hilfe des DHR-Tests

5.1.2.1 Vorüberlegung

Die Ergebnisse der photochemischen Untersuchungen wässriger Ketoprofen-Lösungen (s. Kap. 4) legen die Vermutung nahe, daß der UV-induzierte Zerfall von Ketoprofen auch zu einer Erhöhung des intrazellulären Peroxidspiegels führt. Da der direkte Peroxidnachweis im zellulären System mit einem sehr hohen instrumentellen Aufwand verbunden ist, greift man im Labormaßstab üblicherweise auf indirekte Bestimmungsmethoden zurück. Diese basieren in der Regel auf der Bildung eines Fluoreszenzfarbstoffes aus der reduzierten Leukoform durch eine irreversible Oxidationsreaktion durch die im Zellumen vorhandenen Peroxide bzw. starken Oxidationsmittel. Die Messung des Fluoreszenzsignals erlaubt Aussagen zum Gesamtperoxidgehalt der Zelle. Eine Differenzierung verschiedener Peroxide, wie z.B. HPODE oder H_2O_2 , ist mit diesen Methoden generell nicht möglich. Der intrazelluläre Peroxidgehalt der untersuchten Zellen wurde mit Hilfe des DHR-Tests (Dihydrorhodamin) bestimmt [158]. Bei diesem Test wird den Zellen vor Versuchsbeginn das nicht fluoreszierende Dihydrorhodamin zugesetzt, das durch Oxidationsmittel, die während der UV-Exposition in den Zellen gebildet werden, zum rot fluoreszierenden Rhodamin 123 oxidiert wird.

5.1.2.2 Ergebnisse und Diskussion

Die Bestimmung des intrazellulären Peroxidgehaltes der Ketoprofen-behandelten Keratinozyten erfolgte im Konzentrationsbereich von 0,01 – 1000 μM unmittelbar nach der UV-Exposition. Aus den vorliegenden Untersuchungsergebnissen (Abb. 42) wird deutlich, daß der intrazelluläre

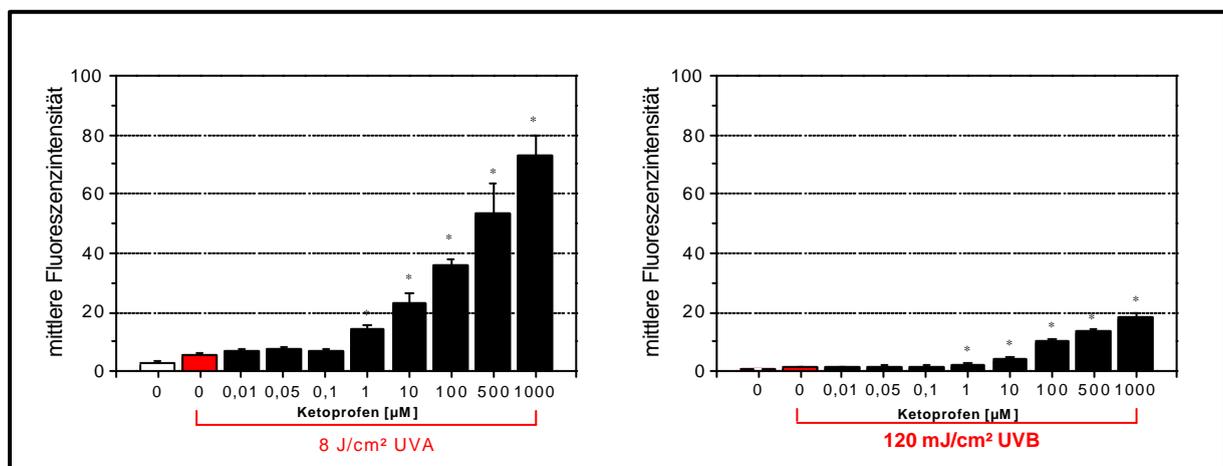


Abb. 42 Bestimmung des intrazellulären Peroxidgehaltes Ketoprofen-behandelter humaner Keratinozyten nach (a) UVA- (8 J/cm²) und (b) UVB-Exposition (120 mJ/cm²) (n = 12; * signifikant für p < 0,05)

Gesamtperoxidgehalt in Abhängigkeit von der eingesetzten Ketoprofen-Konzentration sowohl bei den UVA- als auch bei den UVB-bestrahlten Keratinozyten drastisch ansteigt. Die applizierte UVA-Dosis von 8 J/cm² induziert dabei deutlich höhere absolute Peroxidmengen in den Zellen als die verwendete UVB-Dosis von 120 mJ/cm². Betrachtet man den gleichen Sachverhalt im Vergleich zur unbehandelten, bestrahlten Kontrolle (s. Anhang Abb. 9), so kann man feststellen, daß sich die relative Zunahme des Peroxidgehaltes bei den UVA- und UVB-bestrahlten Zellen nicht unterscheidet. Insgesamt stieg der intrazelluläre Gesamtperoxidgehalt bei einer Ketoprofen-Konzentration von 1000 µM auf den ca. 25-fachen Wert im Vergleich zur unbehandelten, bestrahlten Kontrolle an.

Eine signifikante Erhöhung des intrazellulären Peroxidgehaltes gegenüber der unbehandelten, bestrahlten Kontrolle trat bei den UVA-bestrahlten Keratinozyten bereits bei einer Ketoprofen-Konzentration von 1 µM auf. Bei den UVB-bestrahlten Keratinozyten konnte dieser Effekt erst bei einer Ketoprofen-Konzentration von 100 µM nachgewiesen werden.

Neben seinen oxidierenden Eigenschaften kann Wasserstoffperoxid durch eine monovalente Reduktion, z.B. durch Aufnahme eines Elektrons nach einer Fe²⁺-katalysierten Fenton-Reaktion (s. Abb. 2), eine Quelle der hochreaktiven, im biologischen System unspezifisch reagierenden und zytotoxisch wirksamen Hydroxyl-Radikale darstellen. Es liegt daher nahe, den im Vergleich zu UVB deutlich stärkeren Einfluß einer UVA-Bestrahlung auf das Proliferationsverhalten der Zellen (s. Abb. 41) auf die erhöhte photoinduzierte Bildung von Wasserstoffperoxid (s. Abb. 42) zurückzuführen. Diese Überlegungen werden durch die Arbeiten von Nickel [159] bestätigt, in denen gezeigt wurde, daß das Proliferationsverhalten humaner Keratinozyten durch die Anwesenheit von erheblich Wasserstoffperoxid beeinflusst wird. So führt die Gegenwart von 100 µM Wasserstoffperoxid nach einer Inkubationszeit von einer Stunde zu einer durchschnittlich 70 %-igen Reduktion der Lebendzellanzahl sowie einer nahezu 50 %-igen Reduktion der DNA-Syntheseleistung.

5.1.3 Untersuchungen zum Einfluß der Ketoprofen-Photoprodukte auf humane Keratinozyten unter Ausschluß von UV-Licht

Aus den in Kap. 5.1 dargestellten Untersuchungsergebnissen geht hervor, daß das Proliferationsverhalten Ketoprofen-behandelter HaCaT-Zellen durch eine zusätzliche UV-Exposition negativ beeinflusst wird. Gegenstand der nachfolgenden Untersuchungen war die Frage, ob und in welchem Ausmaß die während des photochemisch induzierten Ketoprofen-Zerfalls gebildeten Ketoprofen-Photoprodukte auch unter dem Ausschluß von UVA-Licht zytotoxische Effekte hervorrufen.

5.1.3.1 Versuchsdurchführung

Die hauptsächlich im wäßrigen Milieu gebildeten Ketoprofen-Photoprodukte KP-OH, KP-OOH, KP=O und EB sind kommerziell nicht erhältlich und konnten in reiner Form nicht in experimentell nutzbaren Mengen gewonnen werden, so daß eine individuelle Bestimmung des zytotoxischen Potentials der einzelnen Photoprodukte nicht möglich war. Um dieses dennoch abschätzen zu können, wurden die Zellen bei diesen Untersuchungen mit UVA-bestrahlten 0,5 mM Ketoprofen-Lösungen inkubiert, die die Photoprodukte in unterschiedlichen Anteilen enthielten.

Damit der Einfluß möglichst aller im wäßrigen System gebildeter Ketoprofen-Photoprodukte, auch des nur bei sehr geringen UVA-Dosen ($1 - 2 \text{ J/cm}^2$) intermediär auftretenden KP-OOH berücksichtigt werden konnte, wurde für diese Untersuchungen - in Anlehnung an die in Anhang Abb. 1 dargestellten UVA-Dosis abhängigen Ketoprofen-Photoprodukt-Zusammensetzungen - eine mit unterschiedlichen UVA-Dosen (1 J/cm^2 bzw. 6 J/cm^2) bestrahlte 0,5 mM wäßrige Ketoprofen-Lösung (KP-Phot 1, KP-Phot 6) genutzt. Die quantitative Bestimmung der prozentualen Zusammensetzung (s. Abb. 43) der Untersuchungslösungen KP-PHOT 1 und KP-PHOT 6 erfolgte entsprechend Kap. 3.2.1 mit Hilfe der HPLC bei einer Wellenlänge von 257 nm (Ketoprofen und Ketoprofen-Photoprodukte) bzw. mit Hilfe der Chemilumineszenz-Detektion (H_2O_2). Die Ergebnisse sind in Abb. 43 angegeben.

Untersuchungs- lösung	$\text{C}_{\text{H}_2\text{O}_2}$ [mol/l]	KP-OH [%]	KP [%]	KP-OOH [%]	KP=O [%]	EB [%]
KP-Phot 1	$9,37 \times 10^{-6}$	3,7	51,6	5,4	7,3	32,0
KP-Phot 6	$4,30 \times 10^{-5}$	15,5	0,3	0	43,4	40,8

Abb. 43 H_2O_2 -Konzentration und prozentuale Zusammensetzung der UVA-bestrahlten 0,5 mM Ketoprofen-Lösungen (Gesamtgehalt = 100 %)

Zur Untersuchung der antiproliferativen Effekte wurden den HaCaT-Zellen unter Ausschluß von UVA-Licht die Untersuchungslösungen in einem Konzentrationsbereich von $0,1 - 500 \mu\text{M}$, bezogen auf die ursprüngliche Ketoprofen-Konzentration, zugesetzt. Die Bestimmung der Zellzahl und der DNA-Syntheserate erfolgte entsprechend Kap. 10.2.3 und 10.2.4 nach einer Inkubationszeit von 24, 48 und 72 Stunden.

Weiterhin wurden analoge Untersuchungen mit dem kommerziell verfügbaren 3-Methylbenzophenon (3-MBP), einem Strukturanalogen des photochemisch gebildeten 3-Ethylbenzophenons, durchgeführt.

5.1.3.2 Ergebnisse und Diskussion

Die in Abb. 44 dargestellten Untersuchungsergebnisse belegen, daß auch unter dem Ausschluß von Licht die Exposition der Keratinozyten gegenüber verschiedenen Ketoprofen-Photoprodukt-Lösungen (KP-Phot 1, KP-Phot 6, 3-MBP) mit zunehmender Konzentration zu einer signifikanten Abnahme der Lebendzellanzahl und DNA-Syntheseleistung im Vergleich zur unbehandelten Kontrolle (100 %)

führt. Da die Präsenz UV-induzierter reaktiver Sauerstoffspezies, wie z.B. Superoxidationen-Radikale oder anderer Radikale (KP), aufgrund ihrer geringen Halbwertszeit unter den gegebenen Versuchsbedingungen auszuschließen ist, muß davon ausgegangen werden, daß die während des photochemischen Zerfalls von Ketoprofen gebildeten Photoprodukte zytotoxische Eigenschaften besitzen.

Aus den Ergebnissen des $^3\text{[H]}$ -Thymidin-Einbaus geht deutlich hervor, daß das zytotoxische Potential der untersuchten Photoprodukt-Lösungen in der Reihenfolge KP-Phot 1, KP-Phot 6 und 3-MBP abnimmt. Eine signifikante Abnahme der Lebendzellanzahl bzw. DNA-Syntheseleistung nach einer Inkubationszeit von 24 h konnte bereits nach dem Zusatz von 10 μM KP-Phot 1, 100 μM KP-Phot 6 und 50 μM 3-MBP (Lebendzellanzahl) bzw. nach einem Zusatz von 0,5 μM KP-Phot 1, 1 μM KP-Phot 6 und 50 μM 3-MBP (DNA-Syntheseleistung) im Vergleich zur unbehandelten Kontrolle bestimmt werden. Bezieht man in diese Betrachtungen die Zusammensetzung der Ketoprofen-Photoprodukt-Mischungen (Abb. 43) mit ein, so kann man feststellen, daß der Gesamtanteil der Photoprodukte der Ketoprofen-Photoprodukt-Lösung KP-Phot 1 nur etwa die Hälfte (48 %) der mit 6 J/cm^2 bestrahlten Ketoprofen-Lösung KP-Phot 6 (99,7 %) beträgt. Dennoch resultierten aus der Applikation von KP-Phot 1 signifikant höhere toxische Effekte. Betrachtet man die qualitative Zusammensetzung beider Untersuchungslösungen, so zeigt sich, daß KP-Phot 1 neben KP-OH, KP=O und EB im Vergleich zu KP-Phot 6 zusätzlich KP (51,6 %) und KP-OOH (5,4 %) enthält. Da Ketoprofen unter Ausschluß von Licht keine zytotoxischen Eigenschaften besitzt (s. Abb. 40), und durch eine Erhöhung der Konzentration von KP-OH, KP=O und EB in KP-PHOT 6 keine im Vergleich zu KP-Phot 1 erhöhten toxischen Reaktionen im Zellsystem nachweisbar sind, ist es naheliegend, daß das von KP-Phot 1 ausgehende hohe zytotoxische Potential, welches durch eine Reduktion der Lebendzellanzahl bei der Applikation einer 500 μM Photoprodukt-Lösung in Abhängigkeit von der Inkubationszeit auf 68 bis 42 % und durch eine nahezu 100 %-ige Hemmung der DNA-Syntheseleistung gekennzeichnet ist, auf die Präsenz des in KP-PHOT 1 vorliegenden KP-OOH zurückzuführen ist.

Obgleich der zytotoxische Charakter von KP-Phot 1 im wesentlichen durch KP-OOH hervorgerufen wird, besitzen auch die restlichen Ketoprofen-Photoprodukte (KP-OH, KP=O und EB) zytotoxische Eigenschaften. Belegt wird dies durch die in Abb. 44 b und Abb. 44 c dargestellten Ergebnisse der mit KP-Phot 6 durchgeführten Untersuchungen. Ausgangspunkt dafür ist eine photochemisch vollständig umgesetzte 0,5 mM Ketoprofen-Lösung. Diese setzt sich im Vergleich zu KP-Phot 1 nur aus H_2O_2 und den drei Ketoprofen-Photoprodukten KP-OH, KP=O und EB zusammen. Antiproliferative Effekte, die auf den zytotoxischen Eigenschaften des KP-OOH beruhen, können somit von vornherein ausgeschlossen werden. Dennoch sinkt die Lebendzellanzahl der mit einer 500 μM Photoprodukt-Lösung KP-Phot 6 behandelten Zellen in Abhängigkeit von der Inkubationszeit auf 68 bis 60 % und die DNA-Syntheseleistung auf 30 bis 18 % im Vergleich zur unbehandelten Kontrolle. In welchem Ausmaß die einzelnen Photoprodukte bzw. H_2O_2 für die zytotoxischen Reaktionen des Zellsystems verantwortlich sind, konnte im Rahmen dieser Untersuchungen nicht näher bestimmt werden.

Aus den in Abb. 44 c dargestellten Ergebnissen wird deutlich, daß der alleinige Zusatz von 50 μM 3-MBP zu einer signifikanten Abnahme der Lebendzellanzahl und DNA-Syntheseleistung führt. Bei der maximal applizierten 3-MBP-Konzentration von 500 μM sank die Lebendzellanzahl in Abhängigkeit von der Inkubationszeit auf 71 bis 40 % und die DNA-Syntheseleistung auf 65 bis 36 %

im Vergleich zur unbehandelten Kontrolle. Berücksichtigt man, daß es sich bei der applizierten 3-MBP-Lösung im Gegensatz zu KP-PHOT 1 und KP-PHOT 6, die Photoproduktgemische mit einem EB-Anteil von 32 % (KP-PHOT 1) bzw. von 41 % (KP-PHOT 6) darstellen, um eine reine 3-MBP-

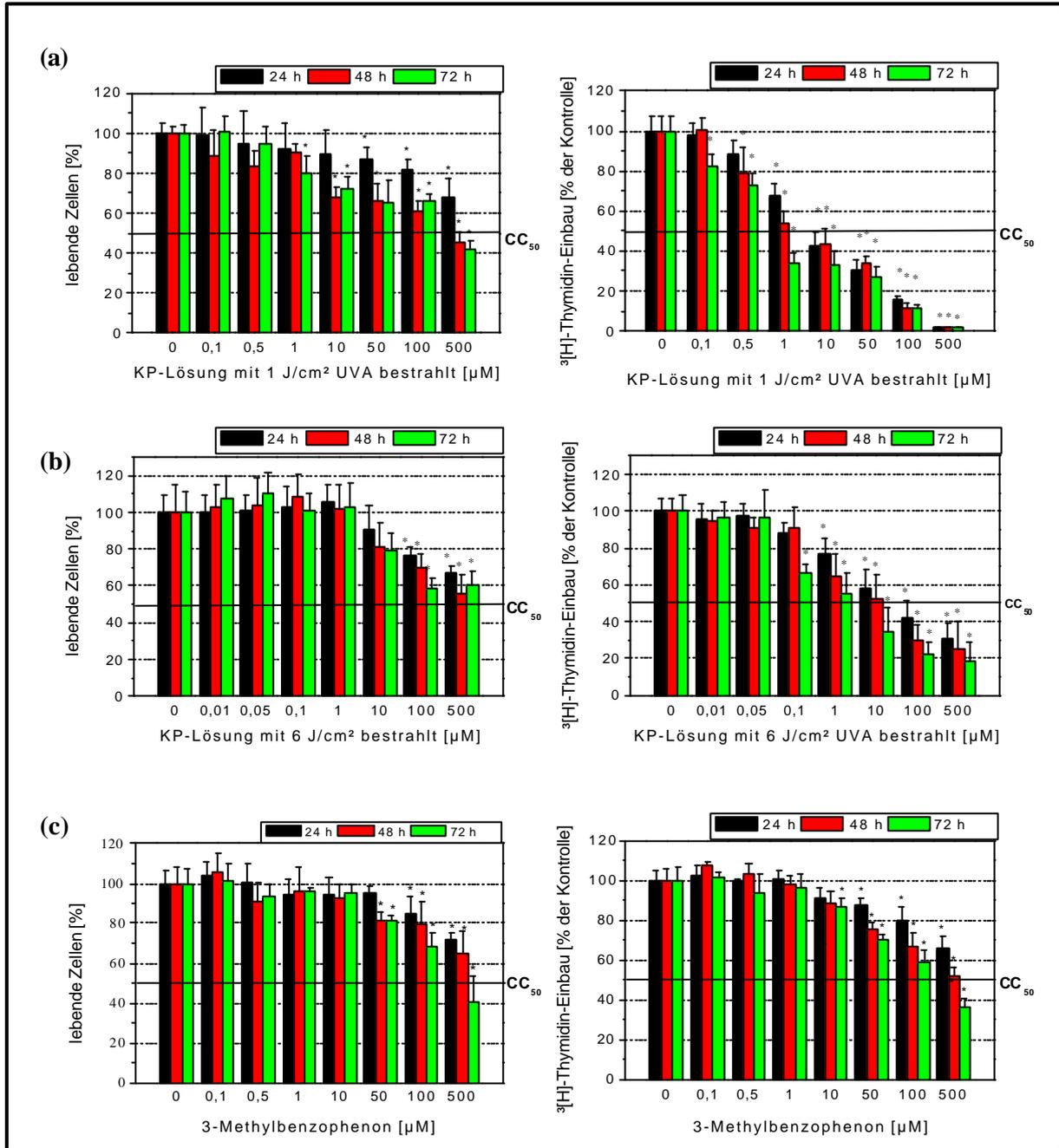


Abb. 44 Einfluß verschiedener Ketoprofen-Photoproduktmischungen auf humane Keratinozyten unter Ausschluß von UVA-Licht (a) 0,5 mM KP + 1J/cm² UVA (b) 0,5 mM KP + 6 J/cm² UVA sowie (c) 3-Methylbenzophenon; Methoden: Vitalfärbung und ³[H]-Thymidin-Einbau nach 24, 48 und 72 h (n = 6; * signifikant für p < 0,05)

Lösung handelt, so kann anhand der Untersuchungsdaten geschlußfolgert werden, daß 3-MBP von den untersuchten Photoproduktlösungen das geringste zytotoxische Potential besitzt.

Zusammenfassend kann festgestellt werden, daß die aus dem UVA-induzierten Ketoprofen-Abbau resultierenden Photoprodukte bzw. Photoproduktmischungen auch unter dem Ausschluß von UVA-Licht zu einer Schädigung des zellulären Systems beitragen und in Abhängigkeit von der eingesetzten Konzentration zu einer signifikanten Abnahme der Lebendzellanzahl und DNA-Syntheseleistung führen. Aufgrund der vorliegenden Ergebnisse ist davon auszugehen, daß in einer Ketoprofen-behandelten Haut auch nach Sonnen- bzw. UVA-Exposition Hautirritationen hervorgerufen werden können, die allein auf die Präsenz der zytotoxisch wirksamen Photoprodukte zurückzuführen sind.

5.1.4 Untersuchung der Wirkung der Ketoprofen-Photoprodukte auf humane Keratinozyten unter dem Einfluß von UV-Licht

5.1.4.1 Vorüberlegungen

Aus den durchgeführten Penetrationsstudien mit einem handelsüblichen 2,5 %-igen Ketoprofen-Gel geht hervor (s. 4.10), daß durch eine UVA-Exposition (8 J/cm²) der Ketoprofen-behandelten humanen Haut (ex vivo) in den oberen Hautschichten (Stratum corneum, Epidermis) Photoprodukt-Konzentrationen erreicht werden, bei denen am Zellsystem humaner Keratinozyten deutliche zytotoxische Reaktionen (s. Abb. 44) nachweisbar sind. Da die nachgewiesenen Photoprodukte KP-OH, KP=O und EB ebenfalls Strukturabkömmlinge des Benzophenons darstellen, liegt die Vermutung nahe, daß diese neben den nachgewiesenen zytotoxischen auch photosensibilisierende Eigenschaften besitzen. Eine zusätzliche UVA-Exposition der Photoprodukt-behandelten Zellen müßte in diesem Fall zu einer weiteren Schädigung der Zellen führen, was experimentell mit den folgenden Untersuchungen nachgewiesen werden sollte.

5.1.4.2 Versuchsdurchführung

Für die Untersuchungen wurden die Zellen unter Ausschluß von Licht für 24 h mit den unterschiedlich bestrahlten Ketoprofen-Lösungen KP-Phot 1 und KP-Phot 6 über einen Konzentrationsbereich von 0 bis 500 µM inkubiert und anschließend mit einer UVA-Dosis von 8 J/cm² bestrahlt. Die Bestimmung der Lebendzellanzahl und des ³[H]-Thymidin-Einbaus erfolgte 24 h nach Beginn der UVA-Exposition, d.h. 48 h nach der Applikation der bestrahlten Ketoprofen-Lösungen KP-Phot 1 und KP-Phot 6 entsprechend Kap. 5.1.3. Alle Untersuchungen wurden im Vergleich zur unbestrahlten, Photoprodukt-behandelten Kontrolle durchgeführt und einem Signifikanztest (s. Kap. 10.2.6) unterzogen.

5.1.5 Ergebnisse und Diskussion

Aus den vorliegenden Untersuchungsergebnissen (Abb. 45) wird deutlich, daß eine UVA-Exposition (8 J/cm²) der KP-Phot 1-behandelten Keratinozyten ab einer Konzentration von 10 µM zu einer signifikanten Reduktion der Lebendzellanzahl und ab einer Konzentration von 0,1 µM zu einer signifikanten Reduktion des ³[H]-Thymidin-Einbaus im Vergleich zur unbestrahlten, gleichbehandelten Kontrolle führt. Im Gegensatz hierzu konnten bei den KP-Phot 6-behandelten Keratinozyten nach einer UVA-Exposition von 8 J/cm² über den gesamten Konzentrationsbereich keine signifikante Reduktion der Lebendzellanzahl und nur bei der höchsten KP-Phot 6-Konzentration (500 µM) eine signifikante Abnahme der DNA-Syntheseleistung bestimmt werden. Da die applizierte

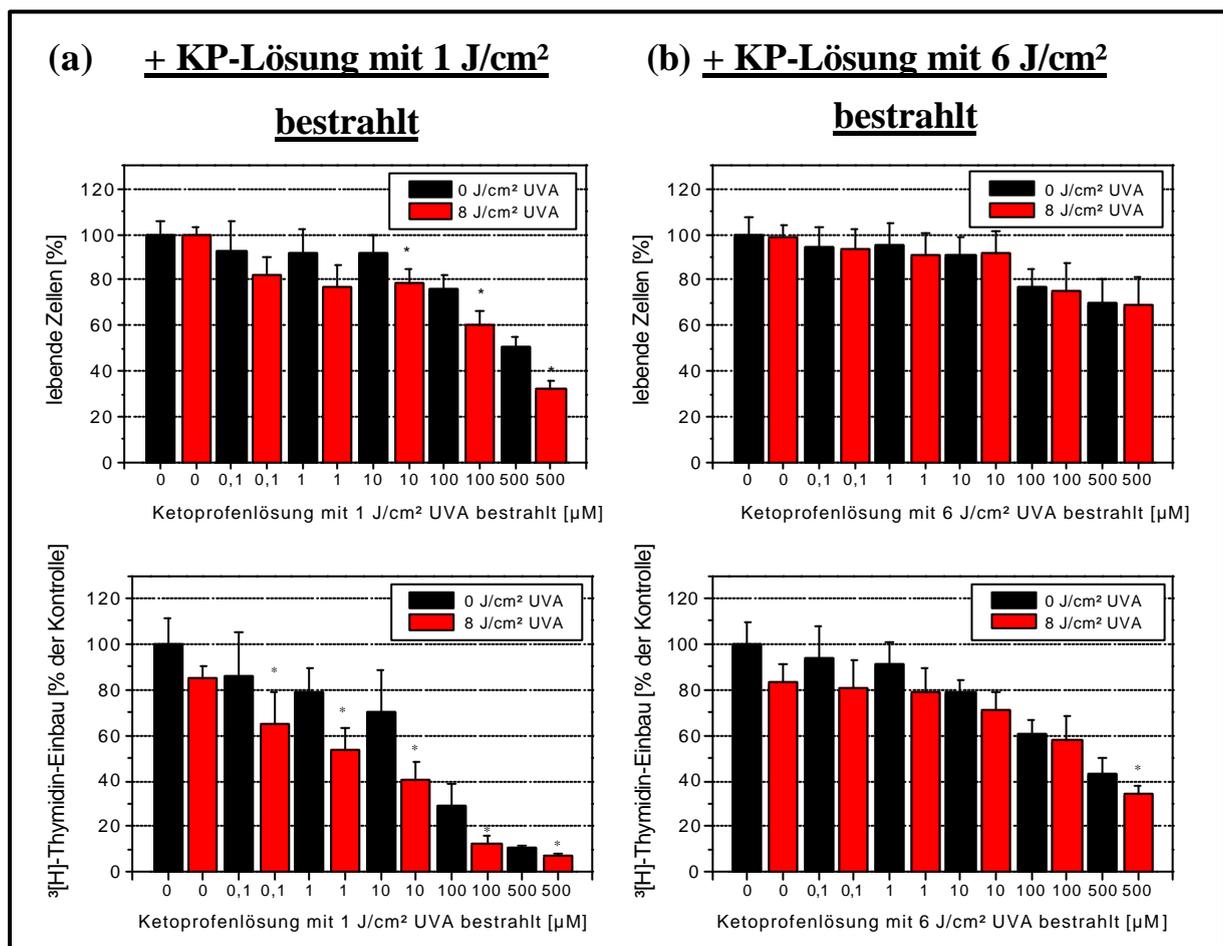


Abb. 45 Bestimmung der Lebendzellanzahl und des ³[H]-Thymidin-Einbaus: (a) KP-Phot 1- [Ketoprofen + 1 J/cm² UVA] und (b) KP-Phot 6- [Ketoprofen + 6 J/cm² UVA] behandelte humaner Keratinozyten nach einer UVA-Exposition von 8 J/cm² UVA (n = 12; * signifikant für p < 0,05)

KP-Phot 1-Lösung im Vergleich zu KP-Phot 6 neben den Ketoprofen-Photoprodukten erhebliche Mengen Ketoprofen beinhaltet, ist anzunehmen, daß die UVA-induzierte Schädigung der Zellen hauptsächlich auf den photoinduzierten Abbau des noch vorhandenen Ketoprofens zurückzuführen ist. Somit besitzen die Ketoprofen-Photoprodukte zwar eindeutig nachweisbare zytotoxische

Eigenschaften, wogegen photosensibilisierende Eigenschaften, die bei einer wiederholten UV-Exposition zu einer weiteren Schädigung der Zellen führen sollten, mit den vorgestellten Untersuchungen jedoch nicht nachgewiesen werden konnten.

5.2 Vitalitätsuntersuchungen an befruchteten, bebrüteten Hühnereiern unter dem Einfluß von Ketoprofen und UVA-Strahlung

5.2.1 Modellbeschreibung

Zur Bewertung des toxischen Potentials UV-bestrahlter wäßriger Ketoprofen-Lösungen wurden weitere Untersuchungen an der Chorio-Allantois-Membran bebrüteter Hühnereier durchgeführt. Dieses in der Literatur [160] als HET-CAM-Test (Hen's Egg Test – Chorioallantoric Membrane)

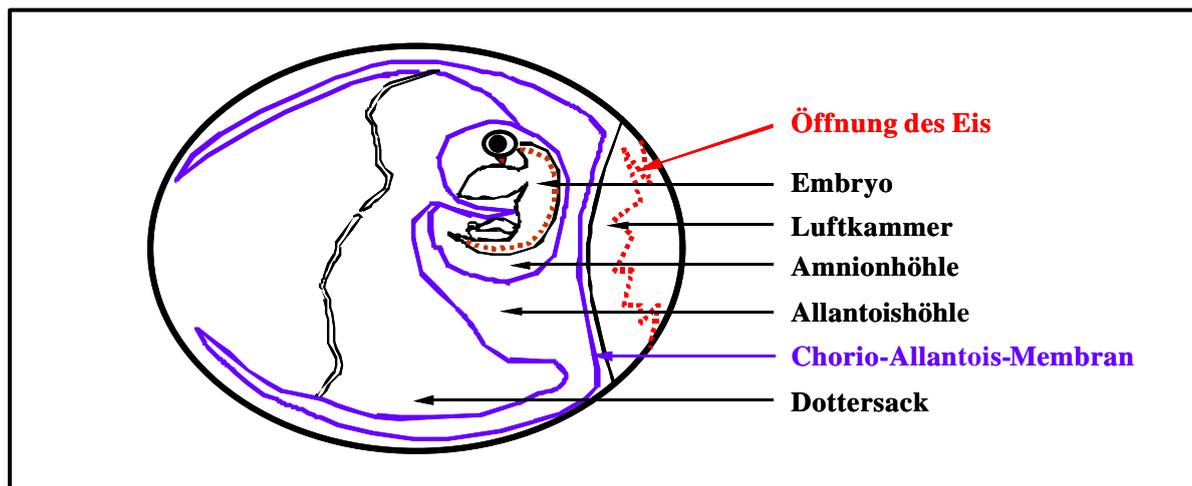


Abb. 46 Schematische Darstellung eines befruchteten Hühnereies

bezeichnete Testsystem stellt eine einfache, schnell durchführbare, kostengünstige und sehr empfindliche Methode für die Bewertung des toxischen Potentials verschiedener Xenobiotika in vivo dar. Für die Untersuchungen werden die Xenobiotika direkt auf die Chorio-Allantois-Membran bebrüteter Hühnereier appliziert. Das Auftreten von Membranverfärbungen (Membrandiscoloration) oder Veränderungen im Gefäßnetz (Hämorrhagie) als unmittelbare Reaktion 10 min nach Noxenexposition bzw. die Beurteilung der Letalität der Embryonen 24 h nach Noxenexposition im Vergleich zur unbehandelten Kontrolle stellt die Grundlage dieser Technik dar.

5.2.2 Versuchsdurchführung

Die bebrüteten Hühnereier wurden vom Tag 1 bis zum Tag 7 der Versuchsreihe im Zwölf-Stunden-Rhythmus um 180 ° gedreht und bei 37,5 °C im Brutschrank inkubiert. 24 Stunden vor Öffnung der Eier wurden diese nicht mehr gewendet. Am Tag 8 erfolgte die Freilegung der Chorio-Allantois-Membran durch Entfernung der Schale auf der Seite der Luftkammer. Anschließend wurden die geöffneten Eier mit Aluminiumfolie abgedeckt und für weitere 24 Stunden im Brutschrank bei 37,5 °C gelagert.

Am Tag 9 der Versuchsreihe wurden je 250 µl der entsprechenden Untersuchungslösungen direkt auf die Chorio-Allantois-Membran der 24 h nach der Präparation vollständig funktionstüchtigen Eier (vgl. Abb. 49 a, b) appliziert. Für die Bewertung einer UV-induzierten Toxizität der Ketoprofen-behandelten Hühnereier war es zunächst notwendig, die Beeinflussung der Vitalität durch die applizierten Einzelsubstanzen bzw. UV-Dosen zu bestimmen. In Anlehnung an die toxikologischen Untersuchungen am in vitro-Modell humaner Keratinozyten (s. Kap. 5.1) wurden für diese Studie folgende Untersuchungslösungen eingesetzt:

- PBS - Puffer pH 7,4 (Lösungsmittel für Ketoprofen – Kontrolle),
- Ketoprofen-Lösungen (10 µM, 100 µM und 100 mM – KP),
- bestrahlte (1 und 6 J/cm² UVA) 100 µM Ketoprofen-Lösungen (KP-Phot).

Die Bestimmung photochemisch induzierter Schäden erfolgte in einem Parallelversuch, bei welchem die Ketoprofen-behandelten Eier zusätzlich mit einer UVA-Dosis von 8 J/cm² bzw. einer UVB-Dosis von 250 mJ/cm² bestrahlt wurden. Die anschließende Bewertung der Toxizität wurde für alle Versuche nach folgenden Kriterien durchgeführt:

- Verfärbung der Membran (Membrandiscoloration; vgl. Abb. 49 c) – 10 min nach Noxenexposition,
- Veränderungen der Gefäße (Hämorrhagie; vgl. Abb. 49 d) – 10 min nach Noxenexposition und
- Letalität der Embryonen (vgl. Abb. 49 e, f) - 24 h nach Noxenexposition.

5.2.3 Ergebnisse und Diskussion

Die Ergebnisse der toxikologischen Untersuchungen der applizierten Einzelsubstanzen bzw. Ketoprofen-Photoproduktmischungen unter Ausschluß von UV-Licht sind in Abb. 47 dargestellt. Aus diesen wird deutlich, daß sowohl der für alle Untersuchungen als Lösungsmittel eingesetzte PBS-Puffer (pH 7,4) als auch 10 und 100 µM Ketoprofen-Lösungen unter Ausschluß von Licht vom vitalen System sehr gut akzeptiert werden und keine toxischen Reaktionen hervorrufen. Auch die im handelsüblichen 2,5 %-igen Gel verwendete Ketoprofen-Konzentration von 100 mM verursachte

Kriterium	Maß der Schädigung	Kontrolle	10 µM KP	100 µM KP	100 mM KP	KP-Phot 1 100 µM	KP-Phot 6 100 µM
Hämorrhagie	keine	12	11	12	12	12	10
	leichte	0	1	0	0	0	2
	mittlere	0	0	0	0	0	2
	schwere	0	0	0	0	0	0
Membranverfärbung	keine	12	11	12	12	12	9
	leichte	0	1	0	0	0	3
	mittlere	0	0	0	0	0	0
	schwere	0	0	0	0	0	0
Letalität (nach 24 h)	vital	12	11	12	5	6	12
	letal	0	1	0	7	6	0

Abb. 47 Bewertung der Toxizität nach Einzelnoxen-Exposition unter Ausschluß von UV-Licht

10 min nach der Applikation keine sichtbaren toxischen Veränderungen des Gefäßsystems (Hämorrhagien, Membrandiscoloration). Erst nach einer Inkubationszeit von 24 h zeigten sich deutliche toxische Reaktionen, die sich in einem Absterben von sieben der zwölf behandelten Embryonen widerspiegelte.

Ein ähnliches Verhalten konnte bei den KP-Phot 1-behandelten Eiern festgestellt werden. In Analogie zu den am in vitro-Modell humaner Keratinozyten durchgeführten toxikologischen Untersuchungen (s. Kap. 5.1.3) sind die toxischen Effekte bei den KP-Phot 1-behandelten Eiern deutlich stärker ausgeprägt als bei dem entsprechenden, mit KP-Phot 6 behandelten Kollektiv. Zwar zeigten die mit KP-Phot 6 behandelten Hühnerembryonen 10 min nach Applikation der Untersuchungslösungen im Vergleich zur unbehandelten Kontrolle eine geringe Erhöhung der hämorrhagischen Ereignisse und Membranverfärbungen, eine erhöhte Letalität der Embryonen nach einem weiteren Inkubationszeitraum von 24 h konnte jedoch nicht festgestellt werden. Im Gegensatz hierzu traten bei den KP-Phot 1 behandelten Embryonen nach einer Inkubationszeit von 10 min weder Hämorrhagien noch Membranverfärbungen auf. Dennoch reduzierte sich die Lebendzahl des Kollektivs 24 h nach der Applikation der Untersuchungslösung KP-PHOT 1 um 50 Prozent auf sechs vitale und sechs letale Embryonen. Es ist naheliegend, daß die deutlichen Differenzen der toxischen Eigenschaften der untersuchten Ketoprofen-Photoprodukt-Lösungen KP-Phot 1 und KP-Phot 6 entsprechend der in Kap. 5.1.3 ausführlich beschriebenen Versuchsergebnisse auf die Gegenwart des offenbar stark toxisch wirksamen, intermediär auftretenden KP-OOH zurückzuführen sind. Vergleicht man die für die Bestimmung der Toxizität herangezogenen Parameter Hämorrhagie, Membrandiscoloration und Letalität der bestrahlten (s. Abb. 48) und unbestrahlten (s. Abb. 47) Kontrolle, so kann man feststellen, daß die UV-Exposition der Hühnerembryonen (8 J/cm² UVA bzw. 250 mJ/cm² UVB) zu einer deutlichen Erhöhung der hämorrhagischen Ereignisse und zu sichtbaren Membranverfärbungen im Vergleich zur unbestrahlten Kontrolle führt. Trotz der stark erhöhten UV-induzierten Sofortreaktionen resultierte auch bei diesem Kollektiv 24 h nach UV-Exposition keine erhöhte Letalität. Folglich werden durch die UV-Exposition der unbehandelten Embryonen im vitalen System toxische Noxen

gesetzt, die zwar zu sichtbaren Schädigungen des Gefäßsystems unmittelbar nach der Noxenexposition, jedoch nicht zum Absterben des Embryos führen. Aufgrund der nahezu unveränderten Vitalität der UV-bestrahlten Embryonen 24 h nach der Bestrahlung liegt der Schluß nahe, daß es sich bei den induzierten UV-Schäden hauptsächlich um reversible, vom vitalen Embryo tolerierbare bzw. reparable Strahlungsschäden handelt.

Kriterium	Maß der Schädigung	Kontrolle UVA	Kontrolle UVB	100 µM KP UVA	100 µM KP UVB	100 mM KP UVA
Hämorrhagie	keine	9	1	7	2	-*
	leichte	0	8	0	2	-*
	mittlere	1	3	2	2	-*
	schwere	2	1	3	6	-*
Membranverfärbung	keine	4	2	1	2	-*
	leichte	5	6	3	1	-*
	mittlere	4	3	2	3	-*
	schwere	1	1	4	6	-*
Letalität (nach 24 h)	vital	10	11	7	6	0
	letal	2	1	5	6	12*

Abb. 48 Bewertung der Toxizität nach Ketoprofen-Behandlung und UV-Exposition (*letal unmittelbar nach UVA-Exposition)

Im Gegensatz hierzu führte die UV-Exposition der Ketoprofen-behandelten Embryonen (100 µM Ketoprofen) im Vergleich zur bestrahlten Kontrolle neben stärker ausgeprägten Hämorrhagien und Membrandiscolorationen zu einem vermehrten Absterben der Embryonen innerhalb der folgenden 24 h. Im einzelnen erhöhte sich die Anzahl der letalen Embryonen im Vergleich zur bestrahlten Kontrolle unter dem Einfluß von UVA-Licht (8 J/cm²) von zwei auf fünf bzw. unter dem Einfluß von UVB-Licht (120 mJ/cm²) von eins auf sechs. Die deutlich erhöhte Letalität kann als Beleg dafür angesehen werden, daß die UV-induzierten Strahlungsschäden der Ketoprofen-behandelten Embryonen einen irreversiblen, nicht mehr tolerierbaren bzw. reparablen Charakter besitzen. Das hohe phototoxische Potential des Antirheumatikums Ketoprofen wird weiterhin durch das sofortige Absterben der mit einer 100 mM Ketoprofen-Lösung behandelten Embryonen unmittelbar nach einer UVA-Exposition verdeutlicht.

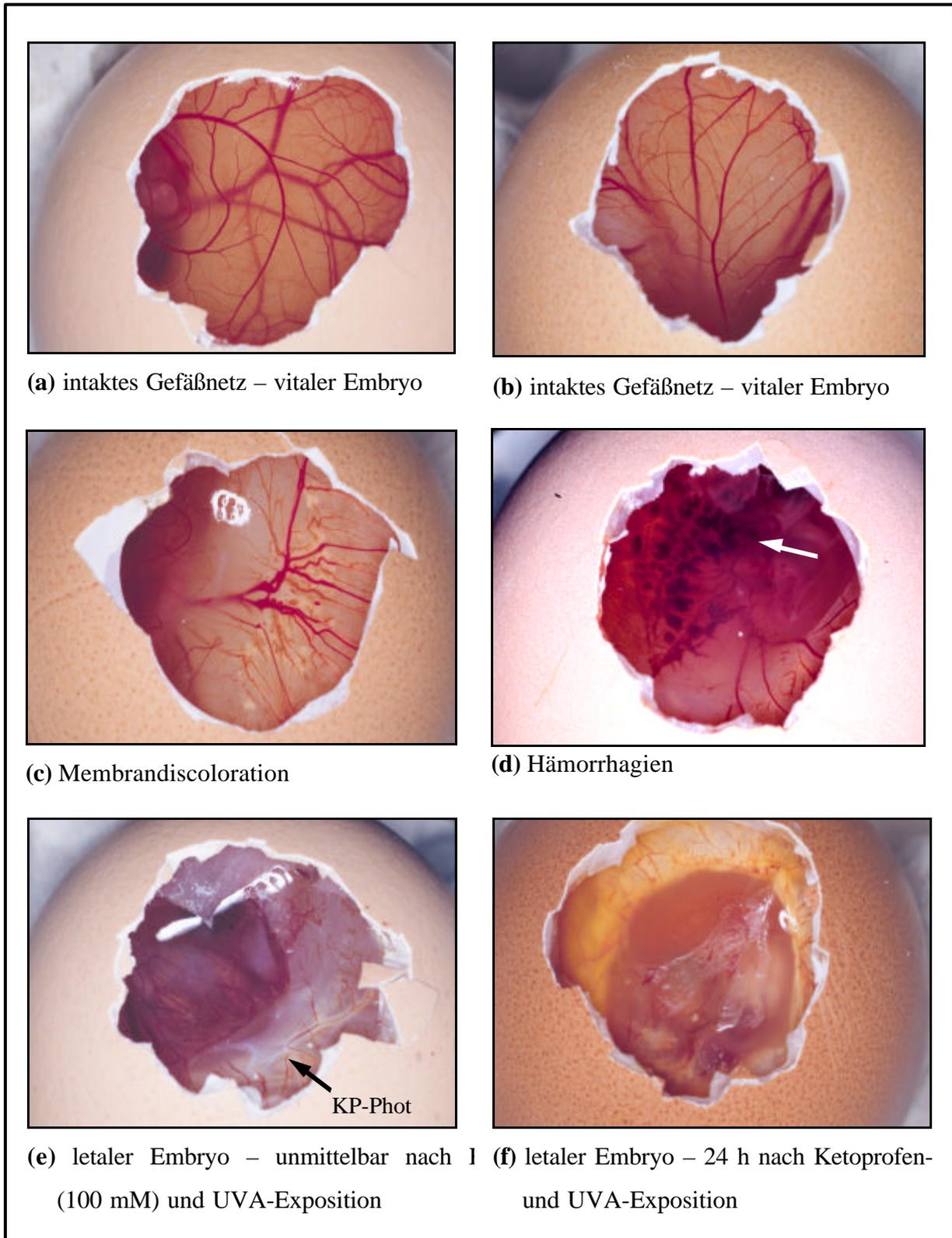


Abb. 49 Beispielhafte Darstellung der einzelnen Bewertungsparameter nach Noxenexposition

5.2.4 Zusammenfassung

Die vorliegenden Ergebnisse der durchgeführten toxikologischen Untersuchungen am in vitro-Zellsystem humaner Keratinozyten belegen, daß:

- Ketoprofen unter Ausschluß von UV-Licht im untersuchten Konzentrationsbereich von 0,01 bis 500 μM gut verträglich und toxikologisch unbedenklich ist,
- Ketoprofen unter dem Einfluß geringer UVA- und UVB-Dosen phototoxische Eigenschaften besitzt, die in Abhängigkeit von der eingesetzten Ketoprofen-Konzentration zu einer signifikanten Verringerung der Lebendzellanzahl und DNA-Syntheseleistung sowie einer drastischen Erhöhung des intrazellulären Peroxidspiegels führen,
- die aus dem photochemischen Zerfall hervorgehenden Ketoprofen-Photoprodukte, insbesondere das intermediär auftretende KP-OOH, zytotoxische Eigenschaften besitzen, die sich in einer signifikanten Reduktion der Vitalität und DNA-Syntheseleistung auch unter dem Ausschluß von UV-Licht widerspiegeln.

In Analogie zu diesen Ergebnissen konnte auch in vivo (HET-CAM-Test) nachgewiesen werden, daß

- Ketoprofen (100 μM) unter Ausschluß von UV-Licht gut verträglich und toxikologisch unbedenklich ist,
- Ketoprofen unter dem Einfluß geringer UVA- und UVB-Dosen phototoxische Eigenschaften besitzt, die neben einer Erhöhung UV-induzierter Gefäßveränderungen (Hämorrhagie, Membrandiscoloration) zu einer deutlichen Reduktion der Anzahl vitaler Embryonen führt und
- die nach UVA-Bestrahlung (6 J/cm²) einer 100 μM Ketoprofen-Lösung entstandene Ketoprofen-Photoprodukt-Lösung (KP-Phot 6) unter dem Ausschluß von UVA-Licht keine toxischen Eigenschaften besitzt, wogegen die nach einer UVA-Dosis von 1 J/cm² entstandene Ketoprofen-Photoprodukt-Lösung (KP-Phot 1) zum Absterben der Hälfte der behandelten Embryonen führt.

6 Beeinflussung des photoinduzierten Ketoprofen-Abbaus in wässrigen Lösungen durch den Zusatz ausgewählter UV-Absorber, Antioxidantien und Radikalfänger

6.1 Vorüberlegung

Wie in der vorliegenden Arbeit nachgewiesen werden konnte (s. Kap. 5), führen die aus dem photochemischen Ketoprofen-Zerfall hervorgehenden Photoprodukte und reaktiven Intermediate im Zellversuch an humanen Keratinozyten (HaCaT), der Hauptpopulation der Epidermis, zum Absterben

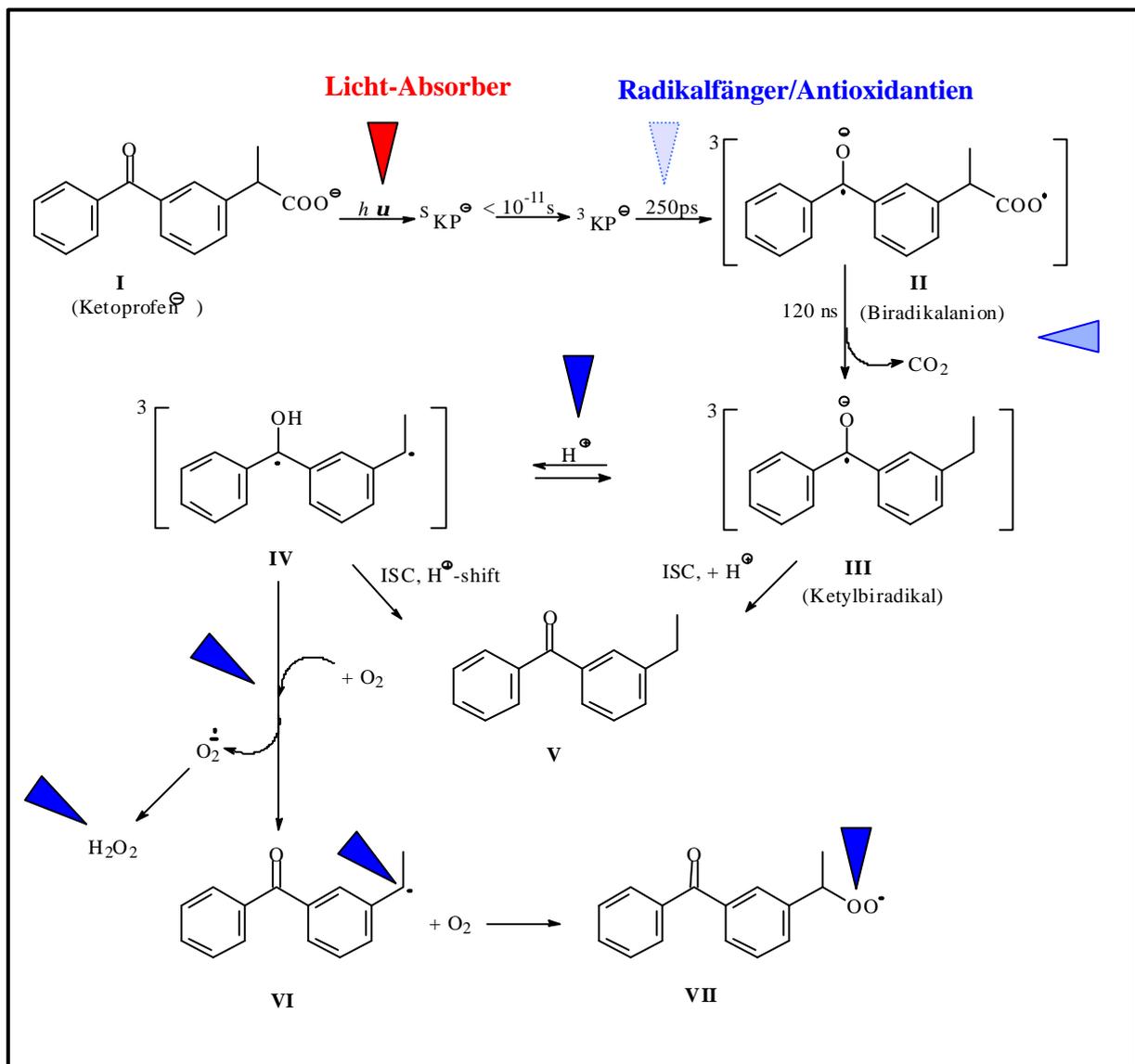


Abb. 50 Mögliche Angriffspunkte von UV-Absorbern (▲) sowie Radikalfängern/Antioxidantien (▲) im photochemischen Abbau von Ketoprofen

der Zellen bzw. bei den durchgeführten in vivo-Untersuchungen (HET-CAM) zum Absterben der Hühnerembryonen. Ausgehend von diesen Ergebnissen muß Ketoprofen unter Einfluß von UVA-Licht als phototoxisch bzw. zytotoxisch eingestuft werden. Demgegenüber konnte unter Ausschluß von UVA-Licht weder ein Wirkstoffabbau (bzw. eine optische Veränderung des Ketoprofen-Gels) noch ein Verlust der Vitalität der untersuchten HaCaT-Zellen bzw. Embryonen nachgewiesen werden.

Es ist naheliegend, daß der Zusatz von Lichtabsorbern, insbesondere von UVA-Absorbern, eine Möglichkeit darstellen könnte, sowohl einen Wirksamkeitsverlust des Arzneistoffs aufgrund seines photochemisch bedingten Abbaus als auch die daraus resultierenden Veränderungen lebenswichtiger Molekülstrukturen (PUVA, DNA, Proteine) zu reduzieren. Da ein vollständiges Abfangen der UV-Strahlung im Ketoprofen-Gel unter Beachtung der zugelassenen Höchstkonzentrationen der UV-Absorber unwahrscheinlich erscheint, ist es notwendig, bereits induzierte photochemische Reaktionen durch den Zusatz von Radikalfängern abubrechen bzw. stark oxidierend wirkende Intermediate (z.B. O_2^- ; H_2O_2) mit Hilfe von Antioxidantien zu reduzieren und damit unschädlich zu machen. Eine Übersicht der möglichen Angriffspunkte von Lichtabsorbern, Radikalfängern und Reduktionsmitteln im postulierten photochemischen Reaktionsmechanismus des Ketoprofens ist in Abb. 50 dargestellt.

Bei der Auswahl der eingesetzten Stoffe wurde aus praxisrelevanten Gründen nur auf Substanzen zurückgegriffen, die bereits als Hilfsstoffe für dermale Zubereitungen bzw. im Falle des N-Acetylcysteins als Wirkstoff im humanen Bereich zugelassen sind. Auch die eingesetzte Konzentration dieser Hilfsstoffe wurde so gewählt, daß die maximal zugelassene Dosis nicht wesentlich überschritten wurde.

6.2 UV-Absorber

Unter UV-Absorbern versteht man Substanzen, die elektromagnetische Strahlung in einem bestimmten Wellenlängenbereich absorbieren und potentiell schädigende Energie in Form von Wärme- oder Fluoreszenzstrahlung abführen. Je nach absorbiertem Wellenlängenbereich unterscheidet man UVA- (Absorptionsbereich 320 – 400 nm), UVB- (Absorptionsbereich 280 – 320 nm) und Breitbandfilter, die sowohl im UVA als auch UVB-Bereich wirksam sind.

6.2.1 Vorüberlegungen

Beim Einsatz eines UV-Filters steht für die photochemische Reaktion des Ketoprofens nur noch ein Teil der eingestrahnten Lichtenergie zur Verfügung, so daß der photochemische Zerfall und die hieraus resultierenden Folgereaktionen mit steigender UV-Filter-Konzentration zunehmend gehemmt werden. Bei der Auswahl der Filtersubstanz wurde eine möglichst homogene stabile Verteilung in der Formulierung angestrebt. Da es sich bei dem handelsüblichen Ketoprofen-Gel um eine halbfeste

wäßrige Arzneizubereitung handelt, kann eine homogene Verteilung am einfachsten durch den Einsatz wasserlöslicher UV-Filter erreicht werden. Da die meisten Filtersubstanzen lipidlösliche Verbindungen darstellen, beschränkte sich die Auswahl jedoch nur auf den wasserlöslichen UVA-Absorber Uvinul[®] MS 40 und den teilweise auch im kurzwelligen UVA-Bereich absorbierenden wasserlöslichen UVB-Filter Uvinul[®] P 25 (s. Tab. 7).

6.2.2 Versuchsdurchführung

Als Untersuchungslösung für die Bestimmung der Effektivität der eingesetzten UV-Absorber Uvinul[®] MS 40 und Uvinul[®] P 25 bezüglich der Reduktion des photochemisch induzierten Ketoprofen-Abbaus und der damit verbundenen H₂O₂-Bildung dienten 0,025 %-ige wäßrige phosphatgepufferte (pH = 7,4) Ketoprofen-Lösungen. Die zu untersuchenden UV-Absorber wurden in fünf verschiedenen Konzentrationen (0,01 %, 0,025 %, 0,05 %, 0,075 % und 0,1 %) zugesetzt, so daß - bezogen auf das handelsübliche 2,5 %-ige Ketoprofen-Gel - der Massenanteil des UV-Absorbers maximal 10 % entsprach. Auf eine höhere Dosierung der UV-Absorber wurde aufgrund der deklarierten Höchstkonzentration für eine dermale Anwendung von 5 % Uvinul[®] MS 40 und 10 % Uvinul[®] P 25 [161] verzichtet.

Weiterhin wurde die Beeinflussung der photoinduzierten Linolsäure-Peroxidation in wäßrigen Ketoprofen-Lösungen durch die ausgewählten UV-Absorber untersucht. Als Probenlösung diente eine 0,5 mM wäßrige Ketoprofen-Lösung, der ein UV-Absorber (0 mMol; 0,25 mMol; 0,5 mMol; 1 mMol) und Linolsäure (1 mmol) zugesetzt wurde.

Für die UVA-Exposition wurden die frisch hergestellten Proben in Planschliffgläser (d = 5,1 cm) überführt und unter ständigem Rühren mit verschiedenen UVA-Dosen (0; 1; 2; 4; 6; 8; 10; 12 und 16 J/cm²) bestrahlt. Die anschließende Bestimmung des Ketoprofen-, H₂O₂- und HPODE-Gehaltes erfolgte mittels CE-UV ($\lambda = 234$ nm) bzw. CE-ED.

6.2.3 Ergebnisse und Diskussion

Aus den in Tab. 7 graphisch dargestellten Untersuchungsergebnissen geht hervor, daß durch den Zusatz des UVA-Absorbers UVINUL[®] MS 40 in den bestrahlten Ketoprofen-haltigen Untersuchungslösungen eine deutliche Hemmung des photoinduzierten Ketoprofen-Abbaus und der photoinduzierten H₂O₂- bzw. HPODE-Bildung erreicht werden kann. Der parallel hierzu getestete, auch im kurzwelligen UVA-Bereich (320 bis 350 nm) und somit im Absorptionsbereich des Ketoprofens gut absorbierende UVB-Absorber

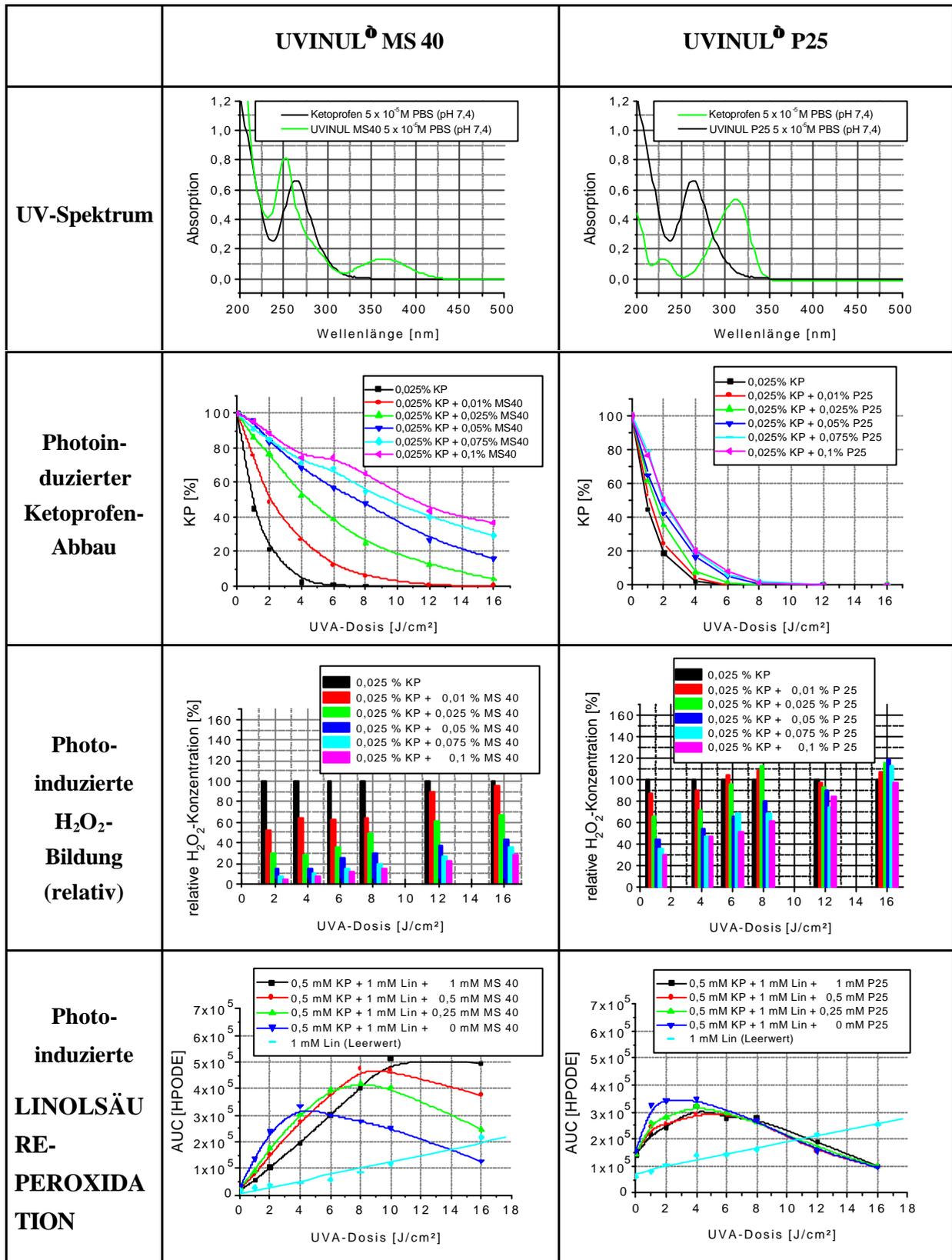


Abb. 51 UV-Spektren, Einfluß von Uvinul[®] MS 40 und Uvinul[®] P 25 auf den UVA-induzierten Ketoprofen-Abbau, die Ketoprofen-sensibilisierte Bildung von Wasserstoffperoxid und die Peroxidation von Linolsäure

Uvinul® P 25 besitzt dagegen nur einen geringen Einfluß auf die oben genannten photoinduzierten Reaktionen. So resultierte aus dem Zusatz von 0,05 % Uvinul® MS 40 eine 50 %-ige Abnahme des UVA-induzierten Ketoprofen-Abbaus nach 8 J/cm². Im Gegensatz hierzu konnte in den Proben mit der maximal zulässigen Uvinul® P 25-Konzentration von 0,1 % bei dieser UVA-Dosis kein Ketoprofen mehr nachgewiesen werden. Gleichmaßen wurden die photoinduzierte H₂O₂-Generation und die Peroxidation von Linolsäure in Gegenwart von Uvinul® P 25 nur gering beeinflusst. Bei Verwendung der deklarierten Maximalkonzentration von Uvinul® MS 40 sank die photoinduzierte H₂O₂-Bildung auf ein Drittel der UV-Absorber-freien, bestrahlten (8 J/cm² UVA) Kontrolle, beim Einsatz von Uvinul® P 25 hingegen nur auf 60 %. Betrachtet man den Verlauf der photoinduzierten Linolsäure-Peroxidation (Abb. 51 Zeile 4), so gewinnt man zunächst den Eindruck, daß die Anwesenheit der UV-Absorber die Peroxidation der Linolsäure in den bestrahlten Proben fördert. Dieser Effekt tritt bei den Uvinul® MS 40 enthaltenden Proben in einem größeren UVA-Dosisbereich auf und ist deutlich stärker ausgeprägt als bei den entsprechenden mit Uvinul®-P 25 versetzten Proben.

Bezieht man in diese Betrachtungen jedoch den Verlauf des photochemisch induzierten Ketoprofen-Abbaus (Abb. 51 Zeile 2) ein, wird deutlich, daß die Bildung der Ketoprofen-Photoprodukte mit Uvinul®-MS 40 aufgrund des signifikant verringerten Ketoprofen-Abbaus stark reduziert sein muß. Da die Gegenwart der Ketoprofen-Photoprodukte unter dem Einfluß von UVA-Licht zu einem photosensibilisierten Abbau des HPODE führt (s. Kapitel 4.4), liegt der Schluß nahe, daß die höheren Linolsäureperoxid-Konzentrationen nicht auf eine erhöhte Peroxidbildung, sondern vielmehr auf den verringerten Abbau des entstandenen HPODE durch die in geringerer Menge vorliegenden Ketoprofen-Photoprodukte zurückzuführen sind. In gleicher Weise erklärt sich auch der beobachtete Unterschied der HPODE zwischen den Uvinul® P 25 und den Uvinul® MS 40 enthaltenden Probelösungen.

Es ist daher nicht auszuschließen, daß die Hemmung der Linolsäure-Peroxidation unter dem Einfluß von Uvinul® MS 40 ebenfalls größer als unter dem Zusatz gleicher Mengen Uvinul® P 25 ist. Die technologische Umsetzung der Einarbeitung des UV-Absorbers in das handelsübliche Ketoprofen-Gel und die Entwicklung einer galenischen Formulierung, bei welcher die Absorptionseigenschaften von Uvinul® MS 40 möglicherweise durch einen direkten Einschluß des Wirkstoffs in einer Art „Absorberphase“ noch effektiver ausgenutzt werden können, muß Gegenstand nachfolgender technologischer Arbeiten bleiben.

6.3 Antioxidantien

Antioxidantien sind chemische Verbindungen, die bereits in geringer Konzentration in der Lage sind, die oxidative Zersetzung von oxidationsempfindlichen Strukturen zu verhindern oder zu verzögern. Bei diesem Vorgang werden sie aufgrund ihres niedrigeren Redoxpotentials und ihrer Funktion als Wasserstoffdonatoren leichter oxidiert als die zu schützende Substanz. Weiterhin können sie auf bereits oxidierte Strukturen reduzierend wirken (z.B. Regeneration von Vitamin E durch Vitamin C [162]).

Der Einsatz von Antioxidantien sollte demzufolge eine Verminderung der photochemischen induzierten Linolsäure-Peroxidation und H_2O_2 -Bildung bewirken, wohingegen der photochemisch induzierte Ketoprofen-Abbau durch eine antioxidative Wirkung nicht beeinflusst werden kann.

Die theoretisch denkbare Möglichkeit, den über mehrere radikalische Zwischenstufen verlaufenden Ketoprofen-Zerfall durch den Einsatz von Radikalfängern bzw. Antioxidantien in den entscheidenden Reaktionsschritten (Bildung von II und III; s. Abb. 50) reduzieren zu können, muß aufgrund der sehr kurzen Reaktionszeiten (250 ps - 120 ns) der einzelnen radikalischen Intermediate als äußerst gering bzw. unmöglich (die betreffenden Dreiecke sind in Abb. 50 gestreift dargestellt) eingeschätzt werden. Ein effektiver Eingriff in den photochemischen Ketoprofen-Abbau wäre damit erst ab der Stufe des Ketoprofen-Biradikal-Anions (Struktur III) möglich, woraus eine Verminderung peroxidbildender Prozesse resultieren würde.

6.3.1 Versuchsdurchführung

Da die Löslichkeit des zugesetzten Radikalfängers bzw. Antioxidans für dessen Wirksamkeit von entscheidender Bedeutung ist, beschränkten sich diese Versuche auf Tocopherol (*wasserlöslicheres Derivat), Sorbinsäure-Na, Ascorbinsäure und N-Acetylcystein.

	$C_{\text{Antioxidans}}$	$C_{\text{Ketoprofen}}$	Zulassung als
Tocopherol*	0,01; 0,05; 0,1%	1 mM	Antioxidans
Sorbinsäure	0,9 ; 1,8 mM	1 mM	Konservierungsmittel
Ascorbinsäure	1; 5; 10 mM	1 mM	Antioxidans
N-Acetylcystein	1; 5; 10 mM	1 mM	Wirkstoff

Tab. 6 Versuchsschema

Für die nachfolgenden Untersuchungen wurden 1 mM wäßrigen Ketoprofen-Lösungen die in Tab. 6 aufgeführten Antioxidantien in den entsprechenden Konzentrationen zugesetzt. Anschließend wurden 10 ml der frisch hergestellten Probenlösung in Planschliffgläser überführt und unter ständigem Rühren mit verschiedenen UVA-Dosen (0; 1; 2; 3; 4; 6 bzw. 8 J/cm²) bestrahlt. Die Bestimmung des Ketoprofen-Gehaltes erfolgte mit Hilfe der CE-UV bei 257 nm, die des gebildeten H_2O_2 elektrochemisch (- 600 mV) mit Hilfe der CE-ED und der HPLC-CL.

6.3.2 Ergebnisse und Diskussion

Aus den in Tab. 7 dargestellten Ergebnissen geht hervor, daß von den untersuchten Antioxidantien nur Ascorbinsäure einen merklichen Einfluß auf den photochemisch induzierten Abbau des Ketoprofens besitzt. Betrachtet man in diesem Zusammenhang das UV-Spektrum der Ascorbinsäure, so liegt der

Schluß nahe, daß die Reduktion des photoinduzierten Ketoprofen-Abbaus nicht auf antioxidative Eigenschaften, sondern auf Absorptionseffekte der Ascorbinsäure im UVA-Bereich (ähnlich wie bei UVINUL® MS 40) zurückzuführen ist.

In Bezug auf eine mögliche Verminderung der photoinduzierten Wasserstoffperoxid-Bildung erwiesen sich Ascorbinsäure und N-Acetylcystein als potente Reduktionsmittel. Lagen diese Antioxidantien im zehnfachen Überschuß zur eingesetzten Ketoprofen-Konzentration vor, konnte auch bei UVA-Bestrahlungsdosen von 16 J/cm² kein H₂O₂ im Reaktionsgemisch mehr nachgewiesen werden. Aufgrund der nachgewiesenen reduktiven Eigenschaften von Ascorbinsäure und N-Acetylcystein wurden diese Antioxidantien auch in den weiteren Untersuchungen (s. Kap. 7) berücksichtigt.

	photochemischer Ketoprofen- Abbau	photochemische H ₂ O ₂ - Generation
Tocopherol	unbeeinflusst	minimal reduziert
Sorbinsäure	unbeeinflusst	minimal reduziert
Ascorbinsäure	reduziert	aufgehoben (10 mM)
N-Acetylcystein	gering reduziert	aufgehoben (10 mM)

Tab. 7 Einfluß verschiedener Radikalfänger bzw. Antioxidantien auf photochemische Reaktionen des Ketoprofens

6.4 Stabilität ausgewählter in der Haut vorkommender wasserlöslicher Antioxidantien bzw. UV-Absorber unter dem Einfluß von UVA-Licht und Ketoprofen

6.4.1 Vorüberlegungen

Um oxidativen Veränderungen essentieller Biostrukturen durch ROS entgegenzuwirken, besitzt die Haut neben verschiedenen Schutzmechanismen gegenüber UV-Strahlung (Hautpigmentierung) bzw. UV-Schäden (Apoptose [= programmierter Zelltod], DNA-Reparatursysteme) ein breites Netzwerk enzymatischer (z.B. Superoxiddismutasen, Katalasen) und nichtenzymatischer (z.B. Glutathion, Harnsäure, Tocopherol) antioxidativ wirkender Systeme [163 - 165].

Wird die Kapazität dieses Abwehrsystems durch Einwirkung exzessiver Mengen von ROS überlastet, kann dies zur Modifikation lebenswichtiger Biostrukturen (Proteine, DNA, Membranen) führen, was zu einem Wechsel der Signaltransduktion, der Genexpression, des Zellwachstums, der Zelldifferenzierung und somit auch in der möglichen Entstehung verschiedener Krebsleiden führen kann.

Gegenstand der nachfolgenden Untersuchungen war daher die Frage, ob und in welchem Ausmaß mit einer photochemisch induzierten Reduktion der in humaner Haut natürlich vorkommenden Antioxidantien Glutathion und Harnsäure und der im Schweiß enthaltenen, als UV-Absorber wirkenden Urocansäure in einem Ketoprofen-haltigen wäßrigen System zu rechnen ist. Ascorbinsäure, ein in der humanen Haut in hohen Konzentrationen vorliegendes, jedoch mit der Nahrung zugeführtes Vitamin, stellt das Hauptantioxidans in wasserlöslichen bzw. wäßrigen Gewebephasen dar [162]. Zusätzlich nimmt es eine Schlüsselrolle bei der Regeneration des fettlöslichen Antioxidans α -Tocopherol ein [165]. Aufgrund seiner zentralen Stellung bei dem nichtenzymatischen antioxidativen Abwehrmechanismus der Haut wurde es in die nachfolgenden Untersuchungen einbezogen.

6.4.2 Versuchsdurchführung

Für die Untersuchungen wurde die Ketoprofen-Konzentration in einer wäßrigen (PB-Puffer pH 7,4) 1 mM Antioxidantien- bzw. UV-Absorberlösung von 0 auf 10 mM (0; 0,01; 0,1; 1 und 10 mmol) erhöht. 10 ml dieser Untersuchungslösungen wurden in Planschliffgläser ($d = 5,1$ cm) überführt und mit einer UVA-Dosis von 0; 1; 2; 4; 6 bzw. 8 J/cm² bestrahlt.

Die Bestimmung der einzelnen Substanzen erfolgte mit Hilfe der CE-UV bei der Wellenlänge des jeweiligen Absorptionsmaximums (Glutathion $\lambda_{\max} = 212$ nm, Harnsäure $\lambda_{\max} = 293$ nm, Urocansäure $\lambda_{\max} = 276$ nm, Ascorbinsäure $\lambda_{\max} = 268$ nm). Alle Untersuchungen wurden im Vergleich zur unbestrahlten Kontrolle (= 100%) durchgeführt.

Um sicherstellen zu können, daß die untersuchten Antioxidantien bzw. UV-Absorber in wäßriger Lösung keinen oxidativen Veränderungen durch den im Wasser gelösten Sauerstoff unterliegen, wurde in einem Vorversuch die Konzentration einer bei Zimmertemperatur und unter Ausschluß von UVA-Licht gelagerten 10^{-4} bzw. 10^{-3} M wäßrigen Lösung des entsprechenden Antioxidans bzw. UV-Absorbers alle 20 min über einen Zeitraum von 9 h bestimmt.

6.4.3 Ergebnisse und Diskussion

Aus Abb. 52 geht hervor, daß eine Ketoprofen-freie 1 mM Ascorbinsäurelösung unter dem Einfluß von UVA-Licht deutlich höhere Instabilitäten als die entsprechenden Glutathion-, Harnsäure- bzw. Urocansäurelösungen aufweist. Ascorbinsäure zerfällt jedoch auch ohne UVA-Bestrahlung, wie die Ergebnisse der o.g. Voruntersuchungen (s. Anhang Abb. 10) belegen. Folglich stellt die im Vergleich zu den anderen Substanzen deutlich stärker ausgeprägte Reduktion des Ascorbinsäure-Gehaltes (auf ca. 63 % der Ausgangskonzentration bei 8 J/cm²) die Summe von UVA- und Sauerstoff-induzierten Zerfalls- bzw. Oxidationsreaktionen dar. Die beobachtete Verminderung des Glutathion-, Harnsäure- und Urocansäure-Gehaltes um ca. 10 % nach einer UVA-Dosis von 8 J/cm² in Ketoprofen-freien

Lösungen sollte dagegen im wesentlichen auf eine photochemisch induzierte Reaktion zurückzuführen sein, da diese Stoffe in Abwesenheit von UVA-Licht stabil sind. Im Gegensatz zu diesem relativ einheitlichen Verhalten ergaben sich bei UVA-Bestrahlung in Gegenwart von Ketoprofen deutliche Unterschiede der drei Lösungen. Die in Abb. 52 dargestellten Konzentrationsverläufe zeigen, daß bereits bei Ketoprofen-Konzentrationen von 0,1 mM unter dem Einfluß von UVA-Licht eine deutliche Konzentrationsabnahme der drei Antioxidantien auftritt. Im Gegensatz hierzu verringerte sich die Urocansäure-Konzentration auch bei einem 10 mM Ketoprofen-Zusatz nur minimal im Vergleich zur bestrahlten Ketoprofen-freien Probe. Diese Stabilitätsunterschiede lassen sich damit erklären, daß die als Reduktionsmittel wirkenden Antioxidantien neben dem photoinduzierten Abbau hauptsächlich durch das photochemisch gebildete H_2O_2 verbraucht werden, wohingegen der UV-Absorber Urocansäure gegenüber derartigen Oxidationsprozessen weitgehend inert ist.

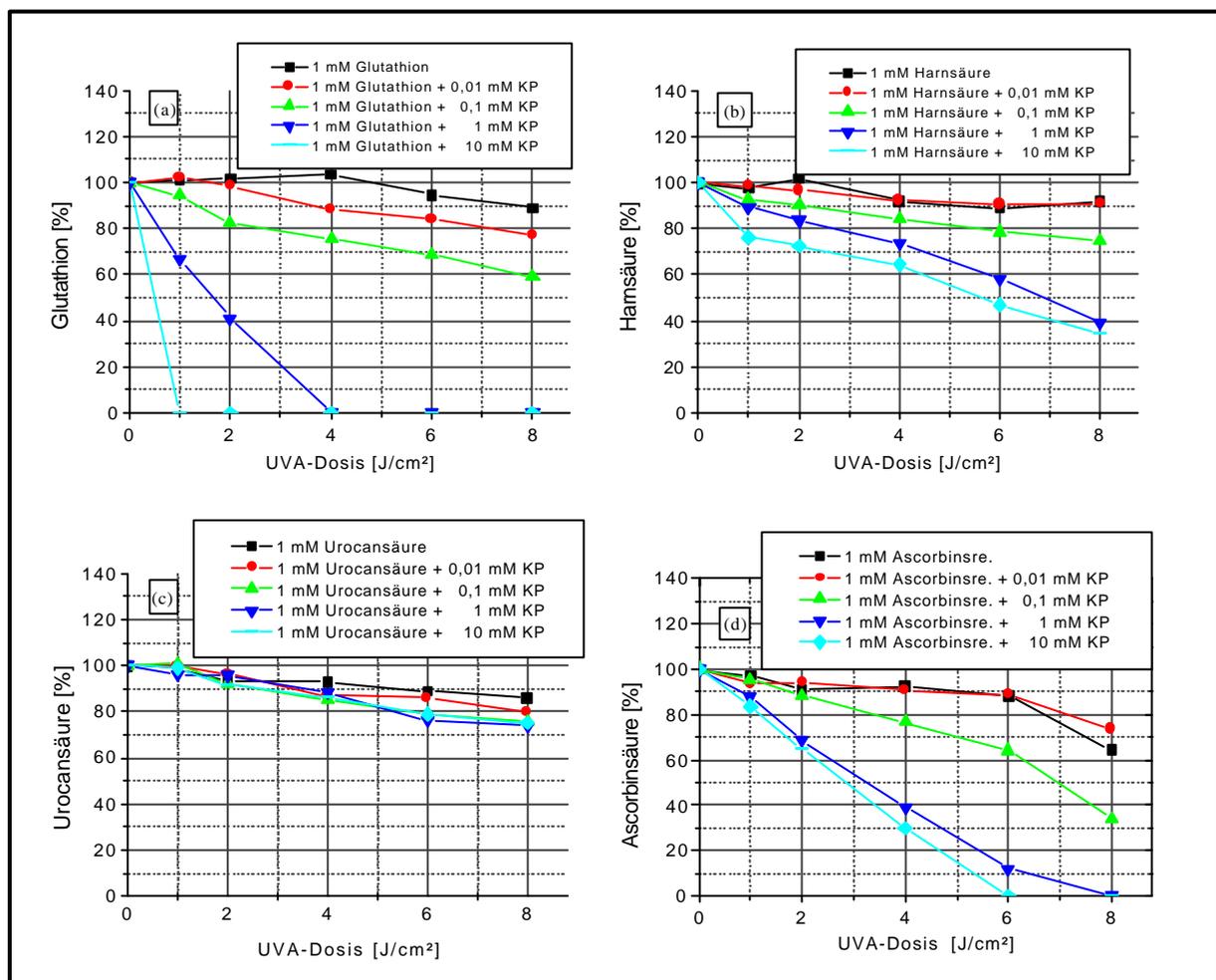


Abb. 52 Photoinduzierter Abbau ausgewählter, in der Haut vorkommender wasserlöslicher Antioxidantien und UV-Absorber: (a) Glutathion, (b) Harnsäure (c) Urocansäure und (d) Ascorbinsäure

Die Ergebnisse dieser Messungen legen den Schluß nahe, daß die Konzentration der ausgewählten Antioxidantien auch in humaner Ketoprofen-behandelter Haut durch UVA-Bestrahlung erheblich

reduziert wird. Der Nachweis dieser Vermutung muß jedoch späteren Untersuchungen vorbehalten bleiben.

6.5 Zusammenfassung

Aus den vorliegenden Untersuchungsergebnissen geht hervor, daß eine effektive Verringerung des UVA-induzierten Ketoprofen-Abbaus und der sich hieraus ergebenden Folgereaktionen (H_2O_2 - und HPODE-Bildung) nur durch eine verminderte Lichtintensität und somit durch den Einsatz von UVA-Absorbern erzielt werden kann.

Der Einsatz des UVA-Absorbers Uvinul[®] MS 40 führt bei der zugelassenen Höchstkonzentration von 5 % zu einer deutlichen Reduktion des UVA-induzierten Ketoprofen-Abbaus. Nach einer UVA-Dosis von 8 J/cm^2 beträgt der Ketoprofen-Gehalt noch 70 % der Ausgangskonzentration, gleichzeitig sinkt die photochemisch induzierte H_2O_2 -Generation auf 12 % im Vergleich zur Uvinul[®] MS 40-freien Kontrolle.

Der Einsatz von Radikalfängern und Antioxidantien hat erwartungsgemäß keinen Einfluß auf den photochemisch induzierten Ketoprofen-Abbau. Dagegen wird durch den Zusatz von Ascorbinsäure und N-Acetylcystein der Gehalt von Wasserstoffperoxid in den Untersuchungslösungen signifikant reduziert. Liegen diese Reduktionsmittel im zehnfachen Überschuß zur eingesetzten Ketoprofen-Konzentration vor, konnte in den Untersuchungslösungen auch bei sehr hohen UVA-Dosen (16 J/cm^2) kein H_2O_2 detektiert werden. Da die Wirksamkeit eines Antioxidans grundsätzlich auf dessen Oxidation beruht, überrascht es nicht, daß auch die in der humanen Haut vorkommenden Antioxidantien Glutathion, Harnsäure und Ascorbinsäure unter dem Einfluß von UVA-Licht in Ketoprofen-haltigen wäßrigen Lösungen in Abhängigkeit von der eingesetzten Ketoprofen-Konzentration unterschiedlich stark verbraucht werden. Folglich muß bei der UVA-Exposition einer Ketoprofen-behandelten Haut nicht nur mit photoinduzierten zytotoxischen Hautreaktionen, sondern auch mit einem erheblichen Verlust der in der Haut vorkommenden wasserlöslichen Antioxidantien und einer damit verbundenen erheblichen Beeinträchtigung des natürlichen nichtenzymatischen antioxidativen Abwehrsystems der Haut gerechnet werden.

7 In vitro- und in vivo-Untersuchungen des protektiven Potentials ausgewählter UV-Absorber und Antioxidantien

Aus den in Kap. 6 vorgestellten Untersuchungen geht hervor, daß der photochemisch induzierte Ketoprofen-Abbau und die hieraus resultierende H_2O_2 -Freisetzung in wäßrigen Ketoprofen-Lösungen durch den Zusatz von UVINUL[®] MS 40 reduziert und das gebildete H_2O_2 durch den Einsatz eines zehnfachen Überschusses verschiedener Antioxidantien vollständig eliminiert werden kann.

Ob und welchem Ausmaß diese Verbindungen auch im lebenden System (HaCaT-Zellen, Hühnerembryonen) protektive Eigenschaften besitzen, ist Gegenstand der nachfolgend vorgestellten Untersuchungen.

7.1 Untersuchungen des protektiven Potentials ausgewählter UV-Absorber und Antioxidantien am in vitro-Modell humaner Keratinozyten

Um die Wirksamkeit der ausgewählten UV-Absorber (UVINUL[®] P 25 und UVINUL[®] MS 40) und Antioxidantien (Ascorbinsäure und N-Acetylcystein) in Abhängigkeit von der eingesetzten Ketoprofen-Konzentration (0,1; 1; 100 und 1000 μM) im Zellsystem prüfen zu können, wurden diese Phosphat-gepufferten Ketoprofen-Lösungen zugesetzt, so daß ihre Endkonzentration im Zellsystem 1 mM betrug. Unmittelbar nach der Applikation der Untersuchungslösungen wurden die Zellen mit einer UVA-Dosis von 8 J/cm² bestrahlt und anschließend für 24 h unter Ausschluß von Licht inkubiert. Für die Charakterisierung des Proliferationsverhaltens der UVA-exponierten Zellen dienten die Bestimmung der Lebendzellanzahl (s. Kap. 10.2.3) und die Bestimmung der DNA-Syntheseleistung (s. Kap. 10.2.4). Ergänzend zu diesen Untersuchungen wurde unmittelbar nach UV-Exposition der intrazelluläre Peroxidgehalt der Keratinozyten mit Hilfe des DHR-Tests (s. Kap. 10.2.5) bestimmt.

Um einen möglichen synergistischen Effekt bei gleichzeitiger Gabe eines UV-Absorbers und eines Antioxidans feststellen zu können, wurde den applizierten Ketoprofen-Lösungen bei weiteren Untersuchungen ein Gemisch von UVINUL[®] P 25 oder UVINUL[®] MS 40 mit Ascorbinsäure bzw. N-Acetylcystein zugesetzt, wobei die Endkonzentration des UV-Absorbers und des Antioxidans im Zellsystem jeweils 1 mM betrug. Alle Meßergebnisse wurden auf die unbestrahlte unbehandelte Kontrolle (= 100 %) bezogen. Um die postulierte Wirksamkeit der zugesetzten Antioxidantien und UV-Absorber belegen zu können, wurden die Unterschiede zwischen den Ketoprofen-haltigen bestrahlten Proben mit und ohne Antioxidans bzw. UV-Absorber mit Hilfe eines statistischen Tests (s. Kap. 10.2.6) auf Signifikanz ($p < 0,05$) geprüft.

7.1.1 Ergebnisse und Diskussion

Ausgehend von den unter 6.2.3 dargestellten Ergebnissen sollte der Einsatz eines UV-Absorbers zu einem verminderten photochemisch induzierten Ketoprofen-Abbau und damit auch zu einer verminderten Bildung von zytotoxisch wirksamen Ketoprofen-Photoprodukten und Wasserstoffperoxid führen.

Da die Menge der photochemisch gebildeten Photoprodukte bzw. H_2O_2 mit zunehmender Ketoprofen-Dosis ansteigt, ist anzunehmen, daß die Protektion des Zellsystems bei der Applikation einer konstanten UV-Absorbermenge (1 mM) mit zunehmender Ketoprofen-Konzentration abnimmt. Das heißt, mit zunehmender Ketoprofen-Konzentration verringern sich die Unterschiede im Proliferationsverhalten (Vitalität, $^3[H]$ -Thymidin-Einbau) zwischen den bestrahlten Ketoprofenhaltigen Proben mit und ohne UV-Absorber und sind bei einer genügend hohen, z.B. äquimolaren Ketoprofen-Konzentration, trotz der Präsenz des UV-Absorbers praktisch nicht mehr nachweisbar.

Betrachtet man den Peroxidgehalt der UVA-exponierten Ketoprofen-behandelten Zellen (Abb. 53 c), so kann man feststellen, daß der Zusatz von 1 mM UVINUL[®] MS 40 über den untersuchten Ketoprofen-Konzentrationsbereich zu einer signifikanten Abnahme des intrazellulären Peroxidgehaltes führt. Im Gegensatz hierzu steigt der intrazelluläre Peroxidgehalt beim Zusatz von UVINUL[®] P 25 unabhängig von der gewählten Ketoprofen-Konzentration überproportional auf einen etwa konstanten Wert an. Da weder die UVA-Exposition einer rein wäßrigen noch einer Ketoprofenhaltigen 1 mM UVINUL[®] P 25-Lösung zu einer nachweisbaren Peroxidbildung führt, ist anzunehmen, daß die scheinbar hohen intrazellulären Peroxidlevel aus einer Kreuzreaktion zwischen dem konstant zugesetzten (1 mM) UVINUL[®] P 25 und dem Nachweisreagenz Dihydrorhodamin nach UVA-Exposition resultieren. Untermuert wird diese Vermutung durch die UVINUL[®] P 25-konzentrationsabhängige Zunahme des intrazellulären Peroxidgehaltes UVINUL[®] P 25-behandelter UVA-bestrahlter Keratinozyten (Anhang Abb. 12).

Aus den Ergebnissen der Vitalitätsuntersuchungen (Abb. 53 a) wird deutlich, daß der Zusatz beider UV-Absorber eine Protektion der Zellen gegenüber der UVA-induzierten Zerfallsreaktion des Ketoprofens bewirkt. Der direkte Vergleich der untersuchten UV-Absorber zeigt, daß der Zusatz von 1 mM UVINUL[®] MS 40 bzw. 1 mM UVINUL[®] P 25 bis zu einer Ketoprofen-Konzentration von $100\ \mu\text{M}$ bzw. $1000\ \mu\text{M}$ einen signifikanten Anstieg der Lebendzellanzahl im Vergleich zu den Ketoprofen-behandelten bestrahlten Zellen zur Folge hatte.

Im Gegensatz hierzu konnte eine signifikante Steigerung der DNA-Syntheseleistung (bezogen auf die Ketoprofen-behandelten bestrahlten Zellen) in Gegenwart von UVINUL[®] MS 40 nur bei einer Ketoprofen-Konzentration von $0,1\ \mu\text{M}$, in der Gegenwart von UVINUL[®] P 25 bis zu einer Ketoprofen-Konzentration von $1\ \mu\text{M}$ nachgewiesen werden. Somit führt der alleinige Zusatz der untersuchten UV-Absorber UVINUL[®] MS 40 und UVINUL[®] P 25 zwar zu einer deutlichen Vitalitätszunahme der gesamten Zellpopulation, eine befriedigende Protektion der in der S-Phase des Zellzyklus befindlichen Zellen konnte jedoch nur in einem geringen Ausmaß nachgewiesen werden. Die in Abb. 54 gezeigten Ergebnisse belegen, daß sich der intrazelluläre Gesamtperoxidgehalt durch den Einsatz von Ascorbinsäure und N-Acetylcystein verringert. Es liegt die Vermutung nahe, daß die

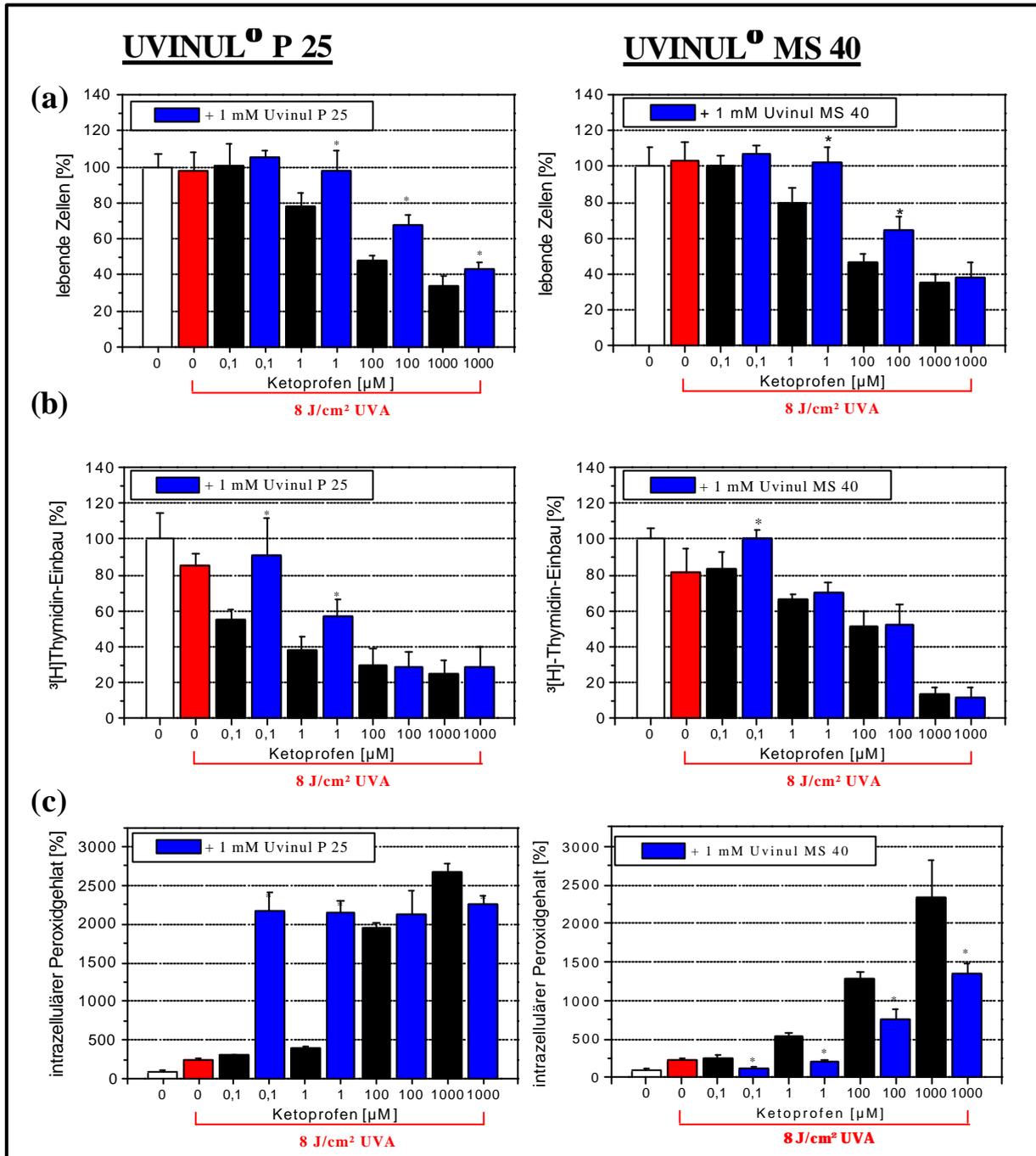


Abb. 53 (a) Lebendzellanzahl (b) DNA-Syntheseleistung und (c) intrazellulärer Peroxidgehalt humaner Keratinozyten nach UVA-Bestrahlung (8 J/cm^2) unter Einfluß von Ketoprofen und gleichzeitiger Applikation von 1 mM UVINUL[®] MS 40 bzw. UVINUL[®] P 25 ($n = 8$), bezogen auf die unbehandelte Kontrolle (= 100 %)

während des photochemischen Ketoprofen-Abbaus gebildeten zytotoxisch wirksamen Peroxide bzw. Oxidationsmittel reduziert und somit unschädlich gemacht werden. Von einem verzögerten Ketoprofen-Abbau und der damit verbundenen Photoproduktbildung kann beim Einsatz von Antioxidantien primär nicht ausgegangen werden (vgl. Kap. 6.3). Unabhängig vom applizierten

Antioxidans erstreckt sich die Abnahme des intrazellulären Peroxidgehaltes über den gesamten Ketoprofen-Konzentrationsbereich von 0 bis 1000 μM .

Vergleicht man den Konzentrations-abhängigen Verlauf der intrazellulären Peroxidgehalte der mit Antioxidantien bzw. UVINUL[®] MS 40 behandelten Keratinozyten, so kann man feststellen, daß der Zusatz von 1 mM N-Acetylcystein zu einer nahezu identischen Reduktion des intrazellulären

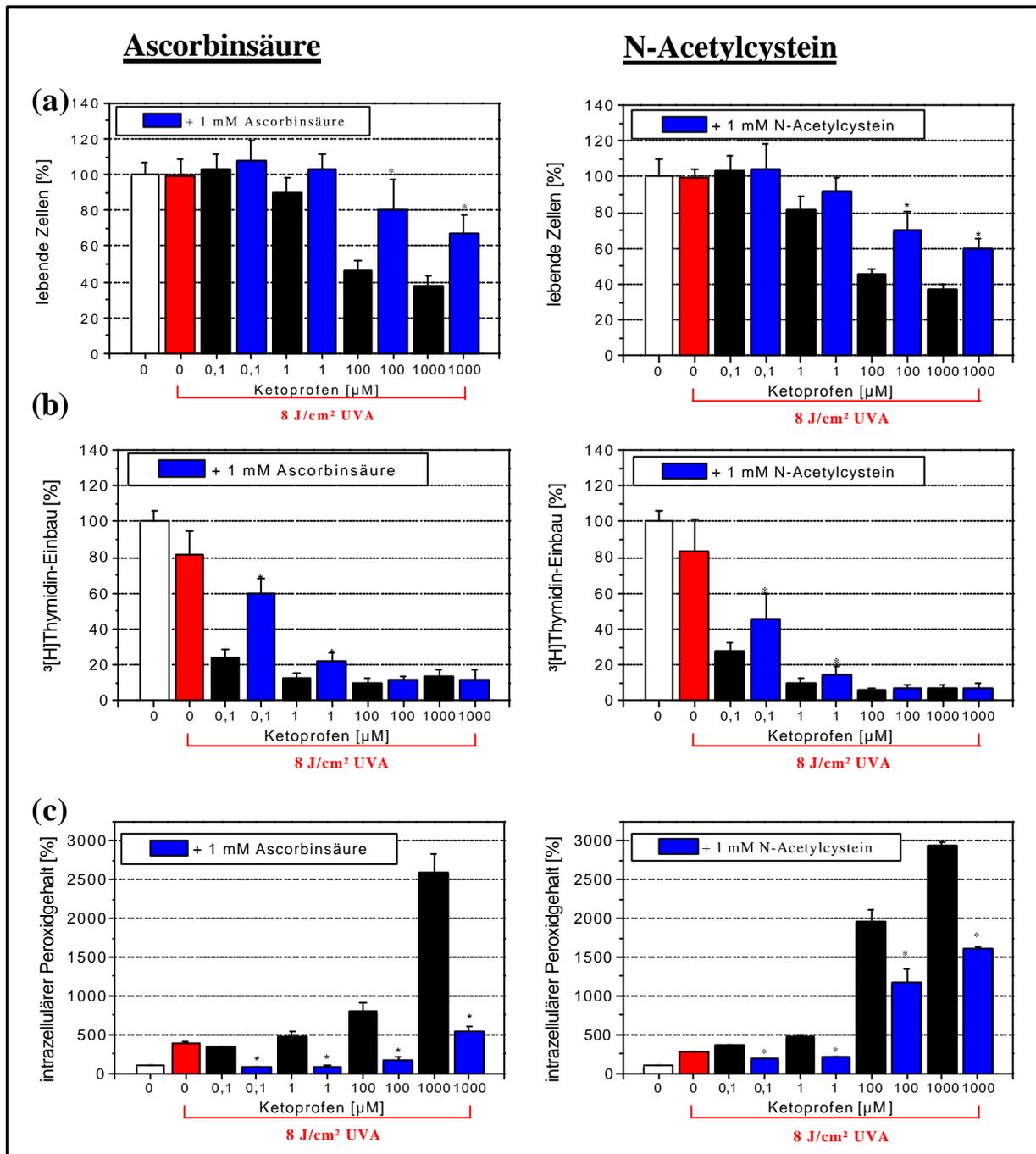


Abb. 54 (a) Lebendzellanzahl (b) DNA-Syntheseleistung und (c) intrazellulärer Peroxidgehalt humaner Keratinozyten nach UVA-Bestrahlung (8 J/cm²) unter dem Einfluß von Ketoprofen und gleichzeitiger Applikation von 1 mM Ascorbinsäure bzw. N-Acetylcystein (n = 8), bezogen auf die unbehandelte Kontrolle (= 100 %)

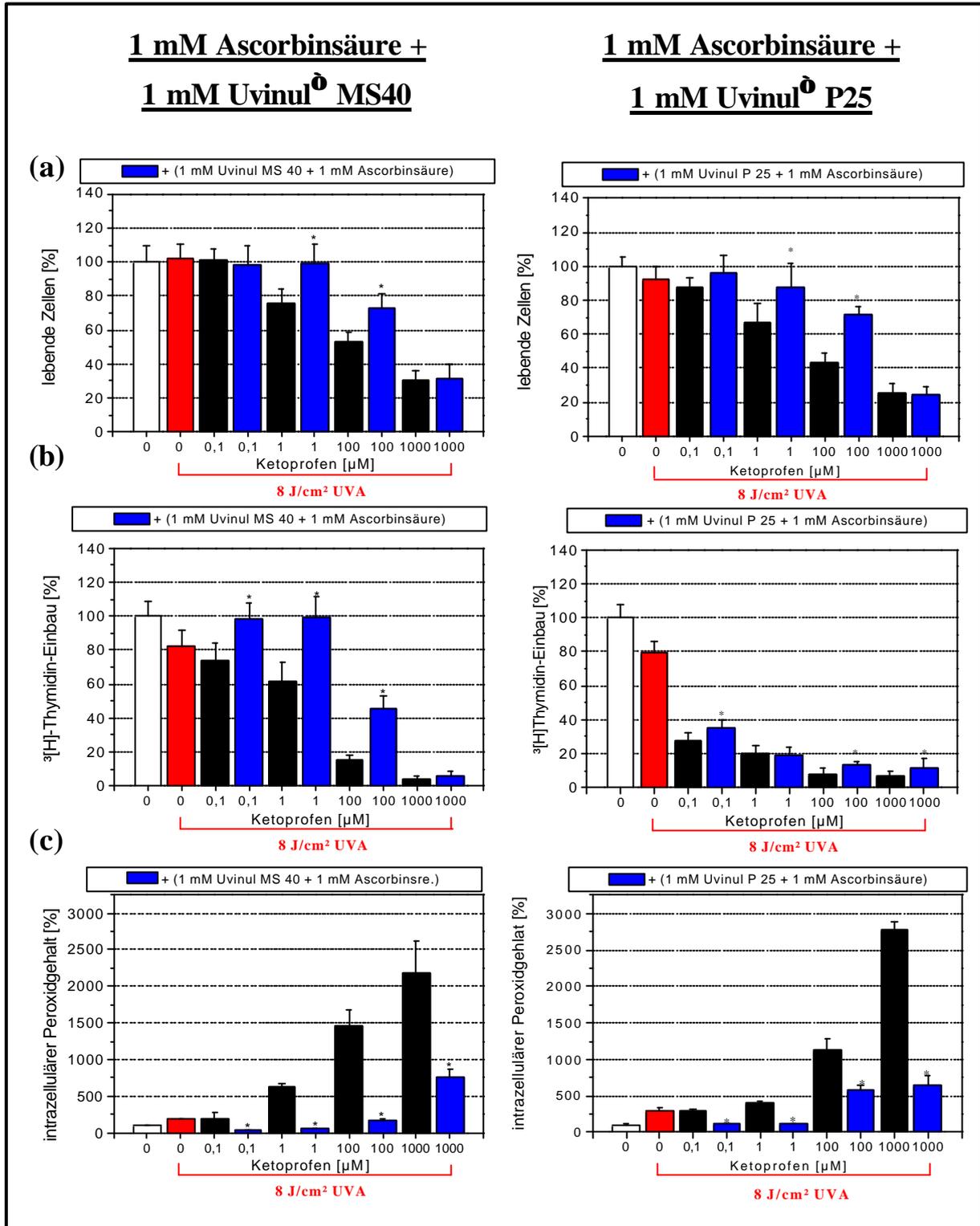


Abb. 55 (a) Lebendzellanzahl (b) DNA-Syntheseleistung und (c) intrazellulärer Peroxidgehalt humaner Keratinozyten nach UVA-Bestrahlung (8 J/cm²) unter dem Einfluß von Ketoprofen und der kombinierten Applikation von 1 mM Ascorbinsäure und 1 mM UVINUL[®] MS 40 bzw. 1 mM Ascorbinsäure und UVINUL[®] P 25 (n = 8), bezogen auf die unbehandelte Kontrolle (= 100 %)

Peroxidgehaltes führt. Eine deutlich stärkere Abnahme des Peroxidgehaltes konnte durch den Zusatz von 1 mM Ascorbinsäure erreicht werden. Selbst bei einer Ketoprofen-Konzentration von 1 μ M sank der intrazelluläre Peroxidgehalt hierbei unter die intrazelluläre Peroxidkonzentration der unbestrahlten unbehandelten Kontrolle. Bei einer Ketoprofen-Konzentration von 100 μ M entspricht dieser der bestrahlten unbehandelten Kontrolle. Erst bei der äquimolaren Applikation von Ketoprofen und Ascorbinsäure (1000 μ M) konnte ein signifikanter Anstieg des Peroxidgehaltes auf den 1,4-fachen Wert im Vergleich zur Ketoprofen-freien bestrahlten Kontrolle gemessen werden. Im Vergleich zu den Ketoprofen-behandelten Ascorbinsäure-freien Zellen entspricht dies 1/400 der durchschnittlichen intrazellulären Peroxidkonzentration.

Aus den Ergebnissen der Vitalitätsuntersuchungen in Abb. 54 a geht hervor, daß der Zusatz von 1 mM Ascorbinsäure bzw. N-Acetylcystein im Gegensatz zu den untersuchten UV-Absorbern auch bei hohen Ketoprofen-Konzentrationen (1000 μ M) zu einer signifikanten Erhöhung der Lebendzellanzahl beim Einsatz von Ascorbinsäure um durchschnittlich 81 % und beim Einsatz von N-Acetylcystein um durchschnittlich 63 % im Vergleich zur antioxidantienfreien Probe führt. Trotz der deutlichen Reduktion der intrazellulären Peroxidkonzentration trat auch bei diesen Untersuchungen eine Protektion der proliferierenden Keratinozyten nur bis zu einer Ketoprofen-Konzentration von 1 μ M auf. Erst mit der kombinierten Gabe eines UV-Absorbers und Antioxidans konnte auch oberhalb einer Ketoprofen-Konzentration von 1 μ M eine signifikante Steigerung der DNA-Syntheseleistung im Vergleich zu den Ketoprofen-behandelten bestrahlten Zellen erreicht werden (s. Abb. 55). Als besonders günstig erwies sich hierbei die Kombination mit Ascorbinsäure. Weitere, zunächst vermutete synergistische Effekte der kombiniert zugesetzten UV-Absorber (UVINUL[®] P 25 und UVINUL[®] MS 40) und Antioxidantien (Ascorbinsäure und N-Acetylcystein) im Hinblick auf eine weitere Erhöhung der Lebendzellanzahl konnten im Vergleich zu den applizierten Einzelsubstanzen jedoch nicht nachgewiesen werden. Überraschenderweise besaßen die einzeln applizierten Antioxidantien diesbezüglich das höchste protektive Potential und bewirkten auch bei einer Ketoprofen-Konzentration von 1000 μ M eine signifikante Zunahme der Lebendzellanzahl im Vergleich zu den Ketoprofen-behandelten bestrahlten Keratinozyten.

7.2 In-vivo-Untersuchungen des protektiven Potentials ausgewählter UV-Absorber und Antioxidantien an der Chorio-Allantois-Membran bebrüteter Hühnereier (HET-CAM-Test)

Um die Wirksamkeit der am in vitro-Modell humaner Keratinozyten getesteten UV-Absorber (UVINUL[®] P 25 und UVINUL[®] MS 40) und Antioxidantien (Ascorbinsäure und N-Acetylcystein) auch in vivo belegen zu können, wurden analoge Untersuchungen an der Chorio-Allantois-Membran bebrüteter Hühnereier durchgeführt. Als Untersuchungslösungen dienten 100 μ M wäßrige Ketoprofen-Lösungen (in PBS), denen die Substanzen entsprechend Abb. 56 zugesetzt wurden. Die

Präparation der Eier und die Bewertung der photochemischen Toxizität erfolgte in Analogie zu Kap. 5.2.2.

7.2.1 Ergebnisse und Diskussion

Eine UVA-Exposition der mit einer 100 μM wässrigen Ketoprofen-Lösung behandelten Embryonen führte innerhalb von 24 h zum Absterben von fünf der zwölf Embryonen (Abb. 56).

Zusatz von :	UVA-Dosis [J/cm ²]	KP [μM]	Letalität nach 24 h	
			vital	letal
-	0	0	11	1
-	8	0	10	2
-	8	100	7	5
200 μM MS 40	8	100	10	2
200 μM P 25	8	100	6	6
1 mM Vit C	8	100	9	3
1 mM NAC	8	100	8	4
1 mM Vit C + 200 μM MS 40	8	100	9	3
1 mM NAC + 200 μM MS 40	8	100	9	3
1 mM Vit C + 200 μM P 25	8	100	9	3
1 mM NAC + 200 μM P 25	8	100	3	9

Abb. 56 Ergebnisse der HET-CAM-Experimente (in vivo)

Allgemein hat die Anwesenheit von Ascorbinsäure, N-Acetylcystein und UVINUL[®] MS 40 eine Reduktion der Anzahl der letalen Embryonen zur Folge. Als besonders wirksam erwiesen sich hierbei der UVA-Absorber UVINUL[®] MS 40, bei dessen Zugabe die Anzahl der vitalen Embryonen von sieben auf zehn anstieg, und das Antioxidans Ascorbinsäure (neun vitale Embryonen). Allerdings konnte durch die kombinierte Gabe von UVINUL[®] MS 40 und den Antioxidantien N-Acetylcystein bzw. Ascorbinsäure auch bei diesen Untersuchungen keine weitere Erhöhung der Vitalitätsrate erreicht werden. In Übereinstimmung mit den Ergebnissen von Kap. 6.2.3 besitzt der UV-Absorber UVINUL[®] P 25 in vivo keinerlei protektive Eigenschaften, wobei die kombinierte Anwendung von UVINUL[®] P 25 und N-Acetylcystein überraschenderweise sogar zu einem weiteren Anstieg der letalen Ereignisse im Vergleich zur Ketoprofen-behandelten UVA-bestrahlten Kontrolle führt. Der nachgewiesene UVA-induzierte Zerfall von UVINUL[®] P 25 stellt eine mögliche Erklärung für die Unwirksamkeit bzw. in Kombination mit N-Acetylcystein für die deutliche Erhöhung der letalen Ereignisse dar. Weitergehende Untersuchungen dieser Teilergebnisse waren im Rahmen der vorliegenden Arbeit nicht vorgesehen.

Während sich das protektive Potential des Antioxidans N-Acetylcystein am in vitro-Modell humaner Keratinozyten bezüglich der bestimmten Lebendzellanzahl und DNA-Syntheseleistung nur unwesentlich von Ascorbinsäure (s. Abb. 54 a und b) unterscheidet, zeigte es bei den durchgeführten in vivo-Untersuchungen etwas geringere protektive Eigenschaften. In Kombination mit UVINUL[®] MS 40 bzw. Ascorbinsäure ergibt sich sowohl für N-Acetylcystein als auch UVINUL[®] P 25 eine deutliche Verringerung der Toxizität (neun vitale Embryonen), die offensichtlich allein auf die Anwesenheit von UVINUL[®] MS 40 bzw. Ascorbinsäure zurückzuführen ist.

Aus den vorgestellten Ergebnissen geht hervor, daß durch den Zusatz von UVINUL[®] MS 40 und/oder Ascorbinsäure auch unter in vivo-Bedingungen eine deutliche Verringerung der phototoxischen Reaktionen wäßriger Ketoprofen-Lösungen erreicht werden kann.

7.3 Zusammenfassung

Die Ergebnisse der toxikologischen Untersuchungen am in vitro-Modell humaner Keratinozyten und in vivo an der Chorio-Allantois-Membran bebrüteter Hühnereier belegen, daß sowohl durch den Zusatz von Antioxidantien als auch von UV-Absorbern eine deutliche Reduktion der UVA-induzierten Schäden Ketoprofen-behandelter humaner Keratinozyten und Hühnerembryonen erreicht werden kann.

Als besonders wirksam erwiesen sich in beiden Modellen der UVA-Absorber UVINUL[®] MS 40 und das Antioxidans Ascorbinsäure. Da die Wirkung von UV-Absorbern und Antioxidantien auf zwei verschiedenen Mechanismen beruht - der Verminderung der wirksamen Lichtenergie und damit der Hemmung des UVA-induzierten Ketoprofen-Abbaus einerseits und dem Abfangen reaktiver Zwischenstufen bzw. der Reduktion der photochemisch entstehenden Peroxide (H₂O₂, HPODE, KP-OOH) andererseits - wäre ein synergistischer Effekt bei der gleichzeitigen Gabe dieser Substanzen denkbar. Dieser konnte in den durchgeführten Untersuchungen jedoch nicht nachgewiesen werden.

Folglich wäre zur Vermeidung möglicher UVA-induzierter zytotoxischer Hautschäden bei der topischen Therapie mit Ketoprofen-haltigen Arzneiformen die gleichzeitige Gabe der dermatologisch unbedenklichen und, im Vergleich zu den häufig vom Benzophenon abstammenden UV-Absorbern, ein deutlich geringeres allergenes Potential besitzende Ascorbinsäure ausreichend.

Bedenkt man jedoch, daß durch die gleichzeitige Applikation von Ascorbinsäure der UVA-induzierte Abbau des Wirkstoffs kaum verhindert wird, sollte im Hinblick auf die Sicherstellung der antirheumatischen Wirksamkeit Ketoprofen-haltiger Präparate dem Einsatz von UV-Absorbern der Vorrang gegeben werden. Zudem müßte die derzeitige Arzneiformulierung, die ein 2,5 %-iges Polyacrylat-Gel darstellt, beim Einsatz von Ascorbinsäure als Hilfsstoff aufgrund ihrer in wäßriger Lösung bestehenden Instabilität [166] grundlegend verändert werden. Im Gegensatz hierzu konnten in den durchgeführten Untersuchungen sowohl im wäßrigen Milieu als auch unter dem Einfluß von UVA-Licht keine Instabilitäten des UV-Absorbers UVINUL[®] MS40 festgestellt werden.

8 Photodynamische Therapie

8.1 Theoretische Grundlagen

Die Photodynamische Therapie (PDT) ist eine vielversprechende Behandlungsmethode verschiedener Hauterkrankungen, die auf eine erhöhte Proliferationsrate der Hautzellen zurückzuführen sind. Als Beispiele seien an dieser Stelle die aktinische Keratose, das Basalzellkarzinom und die Psoriasis genannt [17, 167]. Auch bei der Behandlung von Lungen-, Nacken-, Kopf- Hals- und Blasenkarzinomen gewinnt die PDT zunehmend an Bedeutung [168].

Das Prinzip der PDT beruht allgemein auf der Aktivierung exogen applizierter (z.B. Psoralene) oder endogen gebildeter Photosensitizer (z.B. Porphyrine) durch sichtbares (PDT mit δ -Aminolävulinsäure) oder UVA-Licht (PUVA-Therapie = Psoralen + UVA-Licht). Die dabei entstehenden reaktiven Sauerstoffspezies ($^1\text{O}_2$, OH^\cdot ; $\text{O}_2^{\cdot-}$), radikalischen Zwischenstufen des Photosensitizers oder auch Photoadditionsprodukte mit essentiellen Zellbestandteilen rufen in den Zellen irreparable Schäden (cross linking, DNA-Strangbrüche, oxidative Veränderungen von DNA-Basen, Aminosäuren, Proteinen, Fettsäuren u.a.) hervor, die letztlich zur Hemmung des Zellwachstums oder zum Zelltod führen.

8.1.1 Antiproliferative Eigenschaften UVA-bestrahlter Ketoprofen-Lösungen im Vergleich zum Antipsoriatikum Dithranol und dem Photochemotherapeutikum 8-Methoxypsoralen

8.1.1.1 Vorüberlegungen

Psoriasis ist eine chronische, durch charakteristisch schuppene Herde gekennzeichnete, exanthemische Krankheit mit ererbtem Prädispositionsfaktor, die durch epidermale Hyperproliferation unbekannter Ursache bedingt ist [155]. Dementsprechend ist die derzeitige Psoriasis-Therapie keine kausale, sondern eine symptomatische Therapieform, deren Ziel die Kontrolle und die Remission der Krankheitssymptome mit einem Minimum von akuten und langzeitlichen Nebenwirkungen ist.

Dithranol, ein Anthracenderivat, stellt ein wirksames Lokalthapeutikum der Psoriasis dar. Als Ursache für die antimetabolische Wirksamkeit des Arzneistoffs wird, obwohl der genaue Wirkmechanismus unbekannt ist, neben der Bildung reaktiver Sauerstoffspezies (ROS), die während der Autoxidation des Arzneistoffs gebildet werden ($^1\text{O}_2$ und $\text{O}_2^{\cdot-}$) [169], die Hemmung verschiedener Schlüsselenzyme des Zellstoffwechsels, insbesondere der Zellatmung und der DNA-Synthese [170, 171], angenommen.

Ein weiterer Vertreter der Antipsoriatika ist 8-Methoxypsoralen (8-MOP). Strukturell gesehen handelt es sich bei diesem Arzneistoff um ein Furocumarin-Derivat, das aufgrund seiner planaren Struktur in der Lage ist, in die DNA zu interkalieren. Wird diese anschließend mit langwelligem UVA-Licht (320–400 nm) bestrahlt, geht 8-MOP ($\lambda_{\text{max}} = 330 - 360 \text{ nm}$) eine kovalente Bindung mit den Pyrimidinbasen der DNA ein, was zunächst zur Bildung von Monoaddukten (4',5'-Cyclobutan-Monoaddukt), bei weiterer UVA-Exposition jedoch zur Quervernetzung (cross-linking) der einzelnen DNA-Stränge über die 3-4-Position des Psoralens mit den Pyrimidinbasen des entgegengesetzten DNA-Stranges (3',4'-Cyclobutan-Monoaddukt) führt [172]. Neben der direkten lichtinduzierten Photoaddition des 8-MOP an die DNA wird die antimitotische Wirksamkeit des 8-MOP auch auf die Photoaddition an Proteine und Enzyme sowie auf die Sauerstoff-abhängige Bildung von ROS zurückgeführt, die die Ursache für oxidative Veränderungen der DNA, verschiedener Enzyme, zellulärer Proteine, Zellmembranbestandteile und Rezeptormoleküle sind [173].

Die vorgestellten Ergebnisse der toxikologischen Untersuchungen Ketoprofen-haltiger wäßriger Lösungen am in vitro-Modell humaner Keratinozyten (Kap. 5.1) belegen, daß das NSAR Ketoprofen unter dem Einfluß geringer UVA-Dosen ebenfalls starke antiproliferative Eigenschaften besitzt. Inwieweit diese mit denen der bereits genannten Antipsoriatika Dithranol und 8-MOP vergleichbar sind, soll mit dem folgenden Experiment am in vitro-Modell humaner Keratinozyten untersucht werden.

8.1.1.2 Versuchsdurchführung

8-MOP ist im wäßrigen Milieu praktisch unlöslich. Aus diesem Grund wurden alle Untersuchungssubstanzen zunächst in reinem Ethanol gelöst und soweit mit PBS-Puffer verdünnt, daß die Alkoholkonzentration im Zellsystem kleiner als 0,2 % war. Die maximale im wäßrigen System in Lösung bleibende 8-MOP Konzentration betrug unter diesen Versuchsbedingungen 1 μM . Aus Gründen der Vergleichbarkeit wurden auch Dithranol und Ketoprofen nur als 1 μM wäßrige Lösung den Keratinozyten zugesetzt. Unmittelbar nach der Wirkstoffapplikation wurden die Zellen mit einer UVA-Dosis von 8 J/cm^2 bestrahlt. Die Ermittlung der proliferationshemmenden Eigenschaften der applizierten Wirkstoffe vor und nach UVA-Exposition erfolgte in Analogie zu Kap. 5.1 über die Bestimmung der Lebendzellanzahl (s. Kap. 10.2.3) und der DNA-Syntheseleistung (s. Kap. 10.2.4) im Vergleich zur unbehandelten, unbestrahlten Kontrolle (= 100 %).

Zur Bestimmung der UVA-sensibilisierten Schädigung der Zellen wurden die aus der UVA-Exposition der Zellen resultierende Reduktion der Zellzahl und des $^3\text{[H]}$ -Thymidin-Einbaus zwischen der unbehandelten bestrahlten Kontrolle und den behandelten bestrahlten Zellen mit Hilfe eines statistischen Tests (s. Kap. 10.2.6) auf Signifikanz ($p < 0,05$) geprüft. Signifikante Unterschiede sind in den Abbildungen mit einem Stern (*) markiert.

8.1.1.3 Ergebnisse und Diskussion

Da die antiproliferative Wirksamkeit von Dithranol keine Photoaktivierung des Wirkstoffs erfordert, überrascht es nicht, daß sowohl die Lebendzellanzahl als auch die DNA-Syntheseleistung der mit 1 μ M Dithranol behandelten Keratinozyten bereits vor der UVA-Exposition im Vergleich zur unbehandelten Kontrolle (s. Abb. 57 a und b) deutlich reduziert sind. Betrachtet man den gleichen Sachverhalt bei den 8-MOP- bzw. Ketoprofen-behandelten Keratinozyten, so kann man feststellen, daß die Lebendzellanzahl unbeeinflusst, die DNA-Syntheseleistung der 8-MOP-behandelten Zellen hingegen bereits vor der UVA-Exposition im Vergleich zur unbehandelten Kontrolle auf durchschnittlich 32 % reduziert ist.

Somit besitzt Ketoprofen unter Ausschluß von UVA-Licht innerhalb der untersuchten Substanzen das geringste zytotoxische Potential, was im Hinblick auf unerwünschte Nebenwirkungen der PDT als positiv zu werten ist.

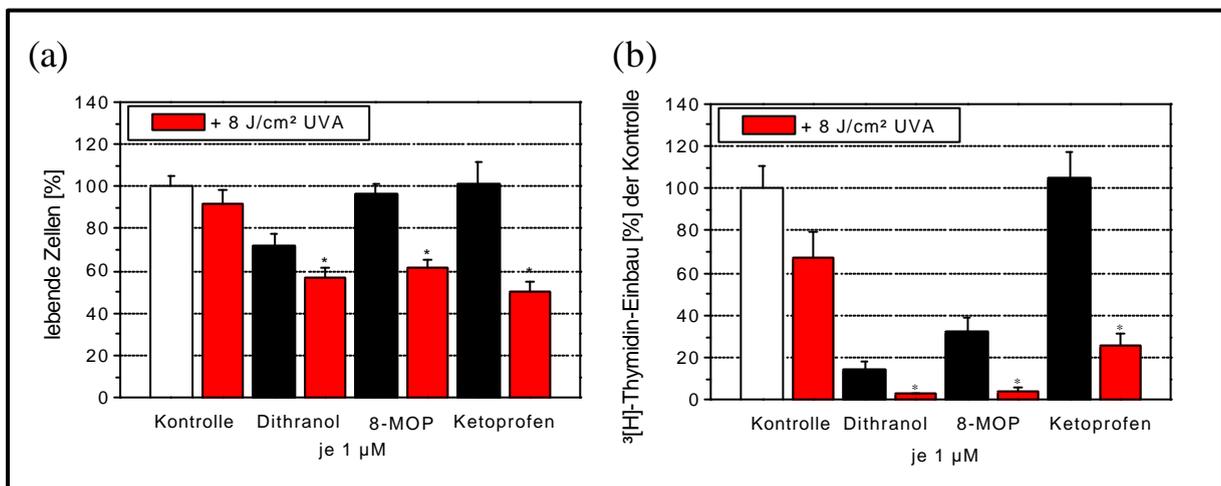


Abb. 57 Bestimmung der Vitalität und der DNA-Syntheseleistung humaner Keratinozyten 24 h nach UVA-Bestrahlung (8 J/cm 2). Einfluß von je 1 μ M Dithranol, 8-Methoxypsoralen (8-MOP) und Ketoprofen; (* p < 0,05 signifikanter Unterschied behandelter Zellen im Vergleich zur bestrahlten Kontrolle; n = 12)

Die Ergebnisse der toxikologischen Untersuchungen nach UVA-Exposition zeigen, daß sich die photoinduzierten antiproliferativen Eigenschaften der photoaktiven Wirkstoffe 8-MOP und Ketoprofen bezüglich der Lebendzellanzahl nur unwesentlich voneinander unterscheiden. Im Gegensatz dazu ist die Hemmung der DNA-Syntheseleistung der Ketoprofen-behandelten Keratinozyten im Vergleich zu den 8-MOP-behandelten Zellen zwar deutlich geringer, jedoch immer noch so stark ausgeprägt (durchschnittliche Reduktion der DNA-Syntheseleistung auf 26 %), daß bei der PDT hyperproliferativer Hauterkrankungen mit Ketoprofen-haltigen Präparaten ein Therapieerfolg zu erwarten ist.

8.1.2 Pilotversuch zur photodynamischen Therapie mit Ketoprofen beim Krankheitsbild einer aktinischen Keratose

Die Versuchsergebnisse der durchgeführten photochemischen Untersuchungen am in vitro-Modell humaner Keratinozyten und an der Chorio-Allantois-Membran bebrüteter Hühnereier (HET-CAM-Test) belegen, daß Ketoprofen unter dem Einfluß geringer UVA-Dosen im lebenden System zytotoxische Reaktionen auslöst, die zu einer verminderten Proliferation der Hautzellen bzw. zum Absterben der Embryonen führen. Ausgehend von den unter 8.1.1.3 erhaltenen Ergebnissen sind die am in vitro-Modell humaner Keratinozyten nachgewiesenen UVA-induzierten antiproliferativen Eigenschaften mit denen des Dithranols und des bei der photodynamischen Therapie eingesetzten 8-MOP vergleichbar. Aus diesem Grund wurde Ketoprofen im Rahmen eines Heilungsversuches bei Patienten mit aktinischen Keratosen für die PDT klinisch angewandt.

Die lichtinduzierte (aktinische), meist auf eine chronische UV-Schädigung der Haut zurückzuführende Hyperkeratose tritt vor allem auf stark Licht-exponierten Hautarealen (Gesichtshaut, insbesondere Stirn, Glatze, Nasenrücken) auf. Aufgrund der fakultativen Transformation zu malignen Tumoren (20 % der aktinischen Keratosen entarten zu Plattenepithelkarzinomen, und 60 % der Plattenepithelkarzinome der Haut entwickeln sich auf aktinischen Keratosen [174]) wird die aktinische Keratose zu den Präkanzerosen gezählt.

Zur Abschätzung der an drei Patienten im Rahmen eines Heilungsversuches einer aktinischen Keratose in Kombination mit einem 2,5 %-igen Ketoprofen-Gel anzuwendenden UVA-Dosis wurde in einem Selbstversuch die minimale Erythemdosis für UVA-Licht an einem unbelichteten Areal mit und ohne einstündige Ketoprofen-Vorbehandlung bestimmt. Dabei zeigte sich eine um zwei Stufen erhöhte UV-Empfindlichkeit nach Ketoprofen-Anwendung.

Vor Versuchsbeginn wurde den Patienten ein 2,5 %-iges Ketoprofen-Gel offen auf die läsionalen Hautareale appliziert. Eine Stunde nach der Gel-Applikation wurden die Läsionen mit Mullplatten gereinigt und anschließend mit 1 J/cm^2 UVA-Licht bestrahlt. Nach wenigen Stunden zeigten sich eine deutliche Rötung und leichte entzündliche Infiltrationen, die variabel über ein bis vier Tage anhielten. Bereits 14 Tage nach der Behandlung war der Heilungsprozeß abgeschlossen und die aktinische Keratose bei keinem der behandelten Patienten klinisch mehr nachweisbar.

8.1.3 Zusammenfassung

Die UVA-induzierten antiproliferativen Eigenschaften Ketoprofen-haltiger Arzneizubereitungen können bei der topischen Therapie antirheumatischer Erkrankungen zu unerwünschten Hautreaktionen führen. Medizinisch kann dieses Verhalten jedoch vorteilhaft im Rahmen einer photodynamischen Therapie zur Behandlung hyperproliferativer Hauterkrankungen ausgenutzt werden. In einem nicht repräsentativen Pilotversuch (drei Patienten) konnte diese Vermutung am Krankheitsbild der aktinischen Keratose eindrucksvoll bestätigt werden. Am in vitro-Modell humaner Keratinozyten zeigte Ketoprofen vergleichbare antiproliferative Eigenschaften wie das Antipsoriaticum Dithranol

und das Photochemotherapeutikum 8-MOP. Ausgehend davon erscheint die photodynamische Ketoprofen-Therapie weiterer Erkrankungen, die üblicherweise mit diesen Arzneien behandelt werden, überaus erfolgversprechend. Dabei bietet Ketoprofen folgende Vorteile gegenüber den genannten Wirkstoffen:

- ein günstigeres Lösungsverhalten für die technologische Herstellung einer Arzneiformulierung,
- eine höhere Stabilität gegenüber Oxidationsprozessen,
- eine zusätzliche antiphlogistische Wirkung,
- keine Hautverfärbungen,
- Photoaktivierung nur durch UV-Strahlung, dadurch weitgehende Reduzierung von möglichen Tageslicht-induzierten Nebenwirkungen sowie
- ein geringerer Preis des Wirkstoffs.

Vor einem kommerziellen Einsatz sind jedoch noch umfangreiche klinische Studien erforderlich.

9 Abschlußdiskussion

Ketoprofen, ein nichtsteroidales Antirheumatikum, wird seit einigen Jahren erfolgreich zur systemischen und topischen Behandlung rheumatischer Erkrankungen angewandt. Strukturell gesehen handelt es sich um einen Vertreter der Arylpropionsäurederivate, wobei Ketoprofen abweichend von anderen Strukturabkömmlingen, wie z.B. Ibuprofen, als weiteres Strukturelement ein Benzophenon-Grundgerüst enthält. Da beide Grundstrukturen photosensibilisierende Eigenschaften besitzen, überrascht es nicht, daß Ketoprofen zu den photochemisch aktiven Arzneistoffen zählt. Unter dem Einfluß von Licht, insbesondere UVA-Licht und somit auch Sonnenlicht, zerfällt Ketoprofen im wäßrigen Milieu über mehrere radikalische Zwischenstufen zu einem Gemisch verschiedener Photoprodukte. Im Unterschied zu anderen topisch angewandten NSAR (Ibuprofen, Diclofenac) findet diese Reaktion bereits bei sehr geringen UVA-Dosen statt und ist mit der Bildung erheblicher Mengen H_2O_2 verbunden. Mit Hilfe der in der vorliegenden Arbeit entwickelten CE-ED konnte dieser Vorgang erstmals eindeutig nachgewiesen werden.

Weiterführende photochemische Untersuchungen mit einem 2,5 %-igen Ketoprofen-Gel ergaben, daß der Wirkstoffgehalt nach einer UVA-Exposition von $8 J/cm^2$ in der obersten $400 \mu m$ dicken Schicht auf durchschnittlich 50 % sinkt. Der Gesamtperoxidgehalt erreicht unter diesen Bedingungen 4,5 mM. Darüberhinaus äußert sich die offenkundige Lichtinstabilität des Gels in einer Erhöhung des pH-Wertes, einer starken Viskositätszunahme und einer durch das Ausfallen der lipophilen Ketoprofen-Photoprodukte entstehenden sichtbaren Trübung.

Die mit Hilfe von etablierten *in vitro*- und *in vivo*-Modellen durchgeführten toxikologischen Untersuchungen belegen, daß Ketoprofen unter dem Einfluß geringer UVA-Dosen ($8 J/cm^2$) deutliche toxische Reaktionen hervorruft. In Abhängigkeit von der eingesetzten Ketoprofen-Konzentration führte eine UVA-Exposition Ketoprofen-behandelter humaner Keratinozyten (*in vitro*) neben einer drastischen Erhöhung des intrazellulären Peroxidspiegels zu einer signifikanten Reduktion der Lebendzellanzahl und DNA-Syntheseleistung. Analog hierzu konnte *in vivo* (HET-CAM) ein erhöhtes Absterben der Ketoprofen-behandelten Hühnerembryonen nach UVA-Bestrahlung nachgewiesen werden. Bemerkenswert erscheint in diesem Zusammenhang, daß die Ketoprofen-Photoprodukte auch unter Ausschluß von UV-Licht in beiden Testsystemen toxische Reaktionen hervorriefen, die zu einer verringerten Proliferation der Keratinozyten bzw. zu einem erhöhten Absterben der Hühnerembryonen führten.

Die Ergebnisse der mit einem handelsüblichen 2,5 %-igen Ketoprofen-Gel durchgeführten Penetrationsuntersuchungen an humaner exzidierte Haut (*ex vivo*) belegen, daß sowohl auf die Hautoberfläche appliziertes als auch bereits in die Haut penetriertes Ketoprofen unter dem Einfluß geringer UVA-Dosen ($8 J/cm^2$) photochemisch zersetzt wird. Aufgrund der nachgewiesenen deutlichen Abnahme des in den oberen Hautschichten (Stratum corneum, Epidermis, Dermis) bestimmten Ketoprofen-Gehaltes auf einen Bruchteil (durchschnittlich 15 %) der unbestrahlten Kontrolle, der Bildung der im Zellversuch als zytotoxisch charakterisierten Ketoprofen-Photoprodukte KP-OH, KP=O und EB sowie der in wäßrigen Lösungen bestimmten photosensibilisierten Zersetzung von Linolsäure und verschiedener in der Haut vorkommender Antioxidantien, sollte bei der topischen Therapie rheumatischer Erkrankungen mit Ketoprofen-haltigen Arzneiformen ein Kontakt der

behandelten Hautflächen mit künstlichen (Besuch von Solarien) bzw. natürlichen UV-Strahlungsquellen (Sonnenlicht) grundsätzlich und über den gesamten Behandlungszeitraum ausgeschlossen werden.

Da in der Praxis eine UV-Exposition der behandelten Körperpartien, insbesondere von Armen und Beinen, durch Sonnenlicht nicht auszuschließen ist, wurden im Rahmen der vorliegenden Arbeit erste Untersuchungen zur Wirksamkeit verschiedener im humanen Bereich als Wirk- bzw. Hilfsstoffe zugelassener UV-Absorber und Antioxidantien bzw. Reduktionsmittel zur Hemmung des photoinduzierten Ketoprofen-Abbaus und der Verminderung der H_2O_2 -Bildung in wäßrigen Lösungen durchgeführt.

Diese ergaben, daß der photoinduzierte Ketoprofen-Abbau effektiv nur durch den Einsatz von UV-Absorbern reduziert werden kann. Als besonders wirksam erwies sich hierbei der UVA-Absorber Uvinul[®] MS 40. Daneben konnte eine deutliche Reduktion der photoinduzierten toxischen Effekte in vitro und in vivo mit der Applikation verschiedener Antioxidantien, insbesondere von Ascorbinsäure, erreicht werden. Im Gegensatz zum Einsatz eines UVA-Absorbers ist die Wirksamkeit der Ascorbinsäure primär auf ihre Reduktionswirkung und die damit verbundene Verringerung des photochemisch gebildeten H_2O_2 zurückzuführen. Von einem verminderten Ketoprofen-Abbau kann dabei zunächst nicht ausgegangen werden, so daß im Hinblick auf die Entwicklung eines photostabilen Ketoprofen-Präparates dem Einsatz von UV-Absorbern grundsätzlich der Vorrang gegeben werden sollte.

Die beobachteten photochemischen Eigenschaften Ketoprofen-haltiger Arzneizubereitungen, die bei der topischen Therapie antirheumatischer Erkrankungen zu unerwünschten Hautreaktionen führen können und daher auf diesem Indikationsgebiet möglichst vermieden werden sollten, bilden zugleich die Grundlage für eine völlig neue Indikation Ketoprofen-haltiger Arzneiformen. Die starken antiproliferativen Eigenschaften lassen sich bei der photodynamischen Therapie gezielt zur Behandlung von Erkrankungen nutzen, die durch ein erhöhtes Zellwachstum gekennzeichnet sind.

Eindrucksvoll konnte dies im Rahmen eines nicht repräsentativen Pilotversuches (drei Probanden) am Krankheitsbild der aktinischen Keratose bestätigt werden. Am in vitro-Modell humaner Keratinozyten zeigte Ketoprofen zudem vergleichbare antiproliferative Eigenschaften wie das Antipsoriatikum Dithranol und das Photochemotherapeutikum 8-Methoxy-psoralen. Daher kann man annehmen, daß die photodynamische Therapie mit Ketoprofen-haltigen Arzneiformen auch bei weiteren Erkrankungen, die üblicherweise mit diesen Arzneistoffe behandelt werden, erfolgreich anwendbar ist. Aufgrund der damit verbundenen Vorteile sollten diesbezügliche Untersuchungen (insbesondere klinische Studien) schnell und umfassend durchgeführt werden.

10 Materialien und Methoden

10.1 Analytische Verfahren

10.1.1 CE-UV

Die simultane Bestimmung des Ketoprofen-Gehaltes und des photochemisch gebildeten Linolsäureperoxids wurde mit Hilfe eines „Capillary Electrophoresis Systems“ der Firma Dionex (Sunnyvale, CA USA) bei einer Wellenlänge von 234 nm durchgeführt. Als Trennkapillare diente eine 50/45 cm lange Fused-silica-Kapillare (I.D. 50 μm) von Supelco (Deisenhofen, Deutschland). Für alle kapillarelektrophoretischen Untersuchungen wurde, sofern nicht anders angegeben, als Grundelektrolyt eine wäßrige 10 mM Boraxlösung eingesetzt. Die Signalaufzeichnung und Integration der Peakflächen erfolgte mit der Gerätesoftware BORWIN 2.1. (Jasco, Groß-Umstadt).

10.1.2 CE-ED

Unter Verwendung der in der Arbeitsgruppe entwickelten Kapillarelektrophorese mit elektrochemischer Detektion (CE-ED) (s. Abb. 58) konnte sowohl Wasserstoffperoxid als auch Linolsäure-Peroxid (HPODE) simultan bestimmt werden. Als Trennkapillare diente eine 40 cm lange Fused-silica-Kapillare (I.D. 25 μm) von Supelco (Deisenhofen, Deutschland). Das Ende der Kapillare wurde in einem Mikromanipulator von Carl Zeiss (Jena, Deutschland) fixiert, so daß es problemlos auf die in Glas eingeschmolzene Gold-Mikroelektrode ($d = 90 \mu\text{m}$) eingestellt werden kann. Der elektrochemische Detektor ist mit einer Platin-Gegenelektrode und einer Ag/AgCl Referenzelektrode ausgestattet.

Ein Operationsverstärker vom Typ CA 3140 von Harris (RS Components, Mörfelden, Deutschland) dient als Potentiostat. Der Detektionsstrom wird in einen nachfolgenden Strom-Spannungs-Wandler (OPA 110 von Burr-Brown; Filderstadt, Deutschland) eingespeist, wobei sich eine Verstärkung von 1 V/ μA ergab. Für die Bereitstellung der positiven oder negativen Hochspannung wird ein Hochspannungsgerät von F.u.G. (Rosenheim, Deutschland) Typ HCN 7E-35000 genutzt.

Ein Spannungs-Frequenz-Konverter VFC 110 von Burr-Brown wurde für die Datenaufnahme durch einen Mikrocontroller MC68HC11A8 von Motorola (MCT Paul & Scherer, Berlin, Deutschland) benutzt. Die Datenaufzeichnung erfolgte mit Hilfe eines Personalcomputers über ein RS232-Interface.

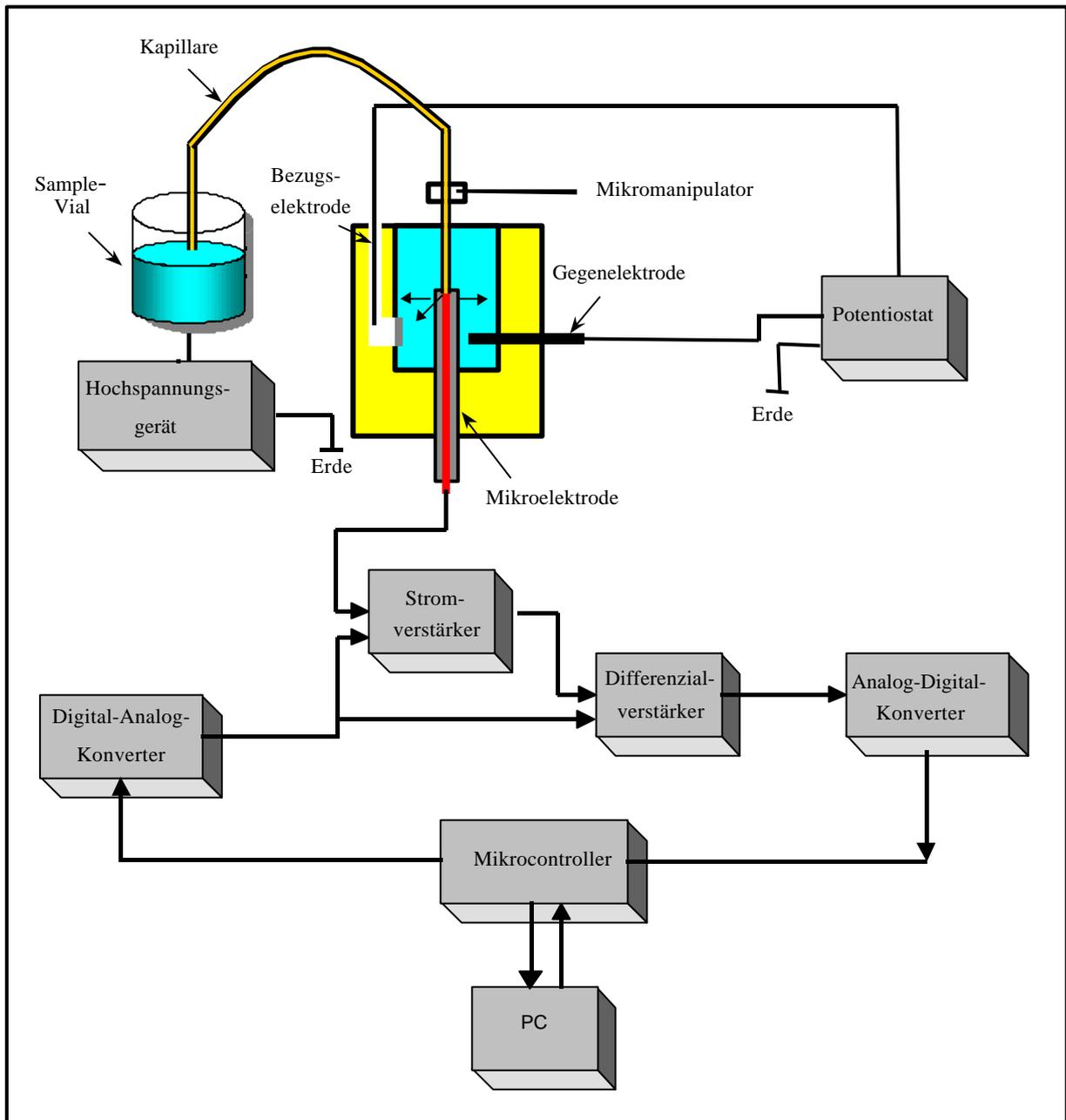


Abb. 58 Allgemeiner Schaltplan der Kapillarelektrophorese mit elektrochemischer Detektion (CE-ED)

10.1.3 HPLC UV/Chemilumineszenz

Das HPLC-System für die UV-photometrische Bestimmung der bestrahlten wässrigen Ketoprofen-Lösungen besteht aus einer Jasco-Pu-980 Intelligent HPLC Pump (Jasco, Groß Umstadt), einer Zorbax[®]CN Säule (Bischoff, Leonberg), einem Jasco UV-975 Intelligent UV/VIS-Detektor (Jasco, Groß-Umstadt) und einem Jasco 851-AS Intelligent Autosampler (Jasco, Groß-Umstadt) zur automatischen Probennahme.

Für die Bestimmung von Peroxiden (H_2O_2 , KP-OOH) wurde das HPLC-System zusätzlich mit einem Chemilumineszenzdetektor kombiniert, wobei das Luminolreagenz mit Hilfe einer KNAUER HPLC PUMP 64 kontinuierlich zugeführt wurde. Die Signalaufzeichnung und Integration der Peakflächen erfolgten mit Hilfe der Gerätesoftware BORWIN 2.1. (Jasco, Groß-Umstadt).

10.1.4 FOX-Test

Der FOX-Test (FOX = ferrous oxidation in xylenol orange) stellt eine einfache, schnell durchführbare, indirekte photometrische Nachweismethode verschiedener Peroxide (H_2O_2 , HPODE, KP-OOH) dar. Zur Herstellung der Reagenzlösung wurde die Stammlösung (s. Kap. 10.4) mit einer methanolischen BHT-Lösung (4 mM) im Verhältnis 1/10 verdünnt. Für die Bestimmung des Peroxid-Gehaltes wurden 2 ml der frisch bereiteten Reagenzlösung mit 20 μl Probenlösung versetzt. Nach einer Reaktionszeit von 20 Minuten wurde die Extinktion bei 560 nm gegen einen entsprechenden Blindwert gemessen. Als Referenzproben dienten frisch hergestellte wäßrige H_2O_2 -Proben.

Methode	Analyt	Linearer Bereich [mol/l]	Korrelationskoeffizient
CE-UV	KP	$1 \times 10^{-6} - 1 \times 10^{-3}$	0,999
	HPODE	$2 \times 10^{-6} - 5 \times 10^{-3}$	0,999
CE-ED	H_2O_2	$5 \times 10^{-6} - 2,5 \times 10^{-3}$	0,997
	HPODE	$5 \times 10^{-6} - 5 \times 10^{-3}$	0,994
FOX-II	H_2O_2	$5 \times 10^{-6} - 5 \times 10^{-4}$	0,999
HPLC-UV	KP	$5 \times 10^{-7} - 1 \times 10^{-3}$	0,999
HPLC-CL	H_2O_2	$5 \times 10^{-6} - 5 \times 10^{-4}$	0,996

Tab. 8 Parameter der eingesetzten analytischen Methoden

10.1.5 Bestimmung der CMC von SDS

Die Ermittlung der kritischen Mizellbildungskonzentration von SDS im Grundelektrolyten (10 mM Borax-Lösung) erfolgte über die Bestimmung der Leitfähigkeit. Als Eichproben dienten 16 verschiedene SDS-Lösungen (0; 0,0125; 0,025; 0,03125; 0,05; 0,0625; 0,075; 0,1; 0,125; 0,25; 0,5; 0,75; 1; 1,25; 1,5; 2 %). Die Bestimmung der Leitfähigkeit erfolgte unter Benutzung der unter Kap. 3.1.3 beschriebenen CE-ED-Apparatur. Hierfür wurden die Eichproben einzeln in die Kapillare ($l = 45 \text{ cm}$; I.D. = 25 μm) injiziert, an das Meßsystem eine Hochspannung von 17,5 kV angelegt und mit Hilfe eines Vielfachmessers der Stromfluß in der SDS-gefüllten Kapillare bestimmt. Die Bestimmung der CMC erfolgte graphisch nach dem Tangentenverfahren durch das Auftragen der Stromstärke gegen die SDS-Konzentration.

10.1.6 Darstellung der Photoprodukte

Da die synthetische Darstellung von 3-substituierten Benzophenonderivaten nur mit Hilfe von mehrstufigen und sehr zeitaufwendigen Synthesewegen möglich ist, wurde für die Darstellung der Ketoprofen-Photoprodukte die photochemische Zersetzung des Ketoprofens im präparativen Maßstab durchgeführt.

Hierfür wurde ein Gramm Ketoprofen in 100 ml einer 1N NaOH-Lösung gelöst. Die klare, alkalische KP-Lösung wurde in eine Kristallisierschale mit einem Durchmesser von 10 cm überführt und unter ständigem Rühren einer UVA-Dosis von 5 J/cm^2 ausgesetzt. Die milchig trübe Photoprodukt-Lösung wurde dreimal mit 100 ml Diethylether extrahiert. Die nach der Extraktion zurückgebliebene klare, noch Ketoprofen enthaltende wäßrige Lösung wurde mit einer weiteren UVA-Dosis von 5 J/cm^2 bestrahlt und dreimal mit 100 ml Diethylether extrahiert. Dieser Arbeitszyklus wurde so lange wiederholt, bis nach der Bestrahlung keine Trübung des Reaktionsgemisches mehr erkennbar war. Nach ca. zehn Arbeitszyklen konnte von einer weitgehend vollständigen Umsetzung des eingewogenen Ketoprofens ausgegangen werden. Anschließend wurden alle Extrakte vereinigt und am Rotationsverdampfer bis zur Trockne eingedampft.

Die dünnschichtchromatographische Trennung (s. Kap 10.1.6.3) der erhaltenen schwach gelben öligen Flüssigkeit ergab, daß es sich bei der Photoproduktmischung hauptsächlich um ein Gemisch von vier Ketoprofen-Photoprodukten (KP-OH, KP-OOH, KP=O und EB) handelt.

10.1.6.1 Säulenchromatographische Reinigung der Photoprodukte

Das photochemisch synthetisierte Gemisch der Ketoprofen-Photoprodukte wurde in Anlehnung an die Arbeiten von Costanzo [129] säulenchromatographisch in fünf Fraktionen separiert. Als Trennsäule diente eine 1 m lange, mit Kieselgel (Si 60) gefüllte Trennsäule mit einem Innendurchmesser von 45 mm. Als Elutionsmittel wurde Cyclohexan/Essigester 70/30 (V/V) verwendet.

10.1.6.2 Identifizierung der Ketoprofen-Photoprodukte durch GC-MS

Die einzelnen Fraktionen wurden als methanolische Lösung der GC-MS zugeführt. Über die Bestimmung des Molpeaks konnte gezeigt werden, daß es sich bei den separierten Fraktionen um photochemisch nicht umgesetztes Ketoprofen (KP), 3-Benzoylphenylethanol (KP-OH), 3-Benzoylphenylethanon (KP=O) und 3-Benzoylphenylethan (EB) handelt. Ein Nachweis des 3-Benzoylphenylethylhydroperoxid (KP-OOH) war aufgrund seiner geringen Stabilität mit Hilfe der GC-MS nicht möglich.

Gerät:	HP 5890 II (GC/MS)
Autosampler:	HP 7673
Detektor:	HP 5971 A (MS)
Ionisierung:	EI 70 eV
Kapillarsäule:	BPX 5: 25 m x 0.22 mm (I.D.) x 0,25 µm
Injektionsvolumen:	1 µl
Injektionsart:	splitless
Injektionstemperatur:	50 °C
Temperaturprogramm:	1 min 50 °C → + 20 K/min → 320°C (15 min)
Trägergas:	Helium 5.0
Flußrate:	7 psi

10.1.6.3 Dünnschichtchromatographische Bestimmung der Ketoprofen-Photoprodukte

Die dünnschichtchromatographische Trennung der Ketoprofen-Photoprodukte erfolgte in Anlehnung an die Arbeiten von Costanzo et al. [129] unter den nachfolgenden Bedingungen:

Schicht:	Kieselgel Si 60
Laufmittel:	Cyclohexan/Essigester 80/20 (V/V)
Detektion:	256 nm

Da sich 3-Benzoylphenylethylhydroperoxid (KP-OOH) in seiner Struktur durch das Vorhandensein einer Hydroperoxidstruktur grundsätzlich von den der anderen Ketoprofen-Photoprodukte (KP-OH, KP=O, EB) unterscheidet, konnte es durch die Anwendung des Peroxid-sensiblen TMPD-Sprühreagenzes (N,N,N',N'-Tetramethyl-p-phenyldiamin) (s. Kap. 10.4.1) nach der dünnschichtchromatographischen Trennung eindeutig identifiziert werden.

10.1.7 Herstellung von reinen HPODE-Lösungen

Zur Herstellung einer reinen, Linolsäure-freien HPODE-Lösung wurden 41 mg (147 µmol) Linolsäure in 1 ml 1N NaOH gelöst und mit einer 10 mM Boratlösung auf 20 ml ergänzt. Dieser Lösung wurde unter permanentem Rühren solange eine Lipoxygenase-Lösung (c = 1,425 mg/ml) in 100 µl-Schritten zugeführt, bis sich die Extinktion bei 234 nm nicht mehr änderte. Anschließend wurde die vollständig oxidierte Linolsäure-Lösung dreimal mit 30 ml Essigester sauer (pH 2) extrahiert. Nach dem Zusammenführen der Extrakte wurde die Lösung am Rotationsverdampfer bis zur Trockne eingedampft und anschließend in 2 ml Essigester aufgenommen. Der Nachweis, daß die erhaltene HPODE-Stammlösung keine Linolsäure mehr enthält, erfolgte mit Hilfe der DC (Schicht:

Kieselgel Si 60; Laufmittel: Cyclohexan/Essigester 80/20 (v/v); Sprühreagenz: Kupfersulfat-Lösung [s. Kap. 10.4.1]).

10.1.8 Bestrahlung der KP-Lösungen

Alle Proben wurden für die Bestrahlung in Planschliffgläser mit einem Innendurchmesser von 5,1 cm überführt und unter ständigem Rühren (Variomag[®] Electronicrührer Poly 15) verschiedenen UVA- bzw. UVB-Dosen ausgesetzt.

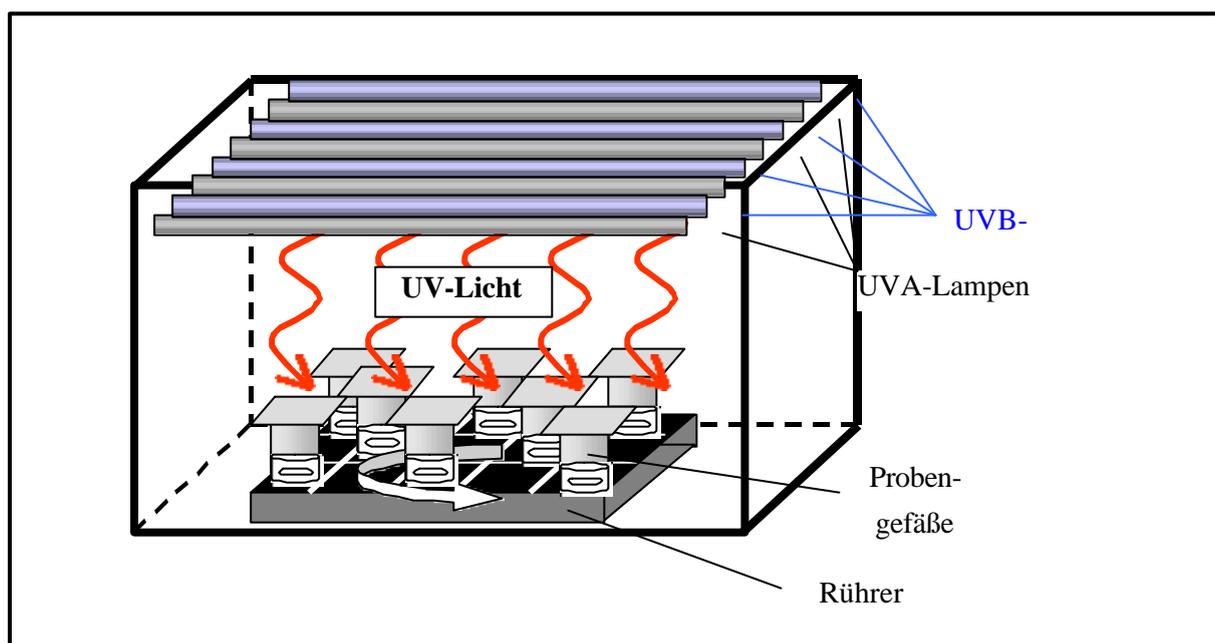


Abb. 59 UV-Bestrahlungskammer

Die Bestrahlung erfolgte mit CLEO Performance R UVA-Leuchtstoffröhren mit einem Emissionsspektrum von 305 nm bis 420 nm bzw. mit CLEO Performance TL UVB-Leuchtstoffröhren mit einem Emissionsspektrum von 280 nm bis 350 nm (Veith Import-Export, Westerau, Deutschland). Für die Bestimmung der UV-Dosen wurde ein UVA- bzw. ein UVB-Sensor (Kühnast Strahlungstechnik; Wächtersbach, Deutschland) eingesetzt.

Um eine Verdunstung des Lösungsmittels während der Bestrahlung zu vermeiden, wurden alle Probengefäße während der Bestrahlung mit Quarzplatten abgedeckt. Der Abstand zwischen den UV-Lampen und der bestrahlten Probenlösung betrug bei allen Untersuchungen 18 cm.

10.1.9 Viskositätsmessungen

Die Bestimmung der Viskosität wurde mit einem Rotationsviskosimeter MCR 300 (PAAR Physica) unter Verwendung eines Kegel-Platte-Systems (CP50-1) bei 20 °C durchgeführt. Für die Messungen wurden 600 µl der Untersuchungslösung in die Mitte der temperierten Platte pipettiert und während der automatischen Positionierung des Rotors in Meßstellung durch geringfügiges Drehen des Rotors auf der gesamten Plattenoberfläche gleichmäßig verteilt. Die Kontrolle der Spaltfüllung erfolgte visuell.

Die anschließende Messung erfolgte vollautomatisch unter Vorgabe des Drehmoments. Dieses wurde mit einer Anzahl von 31 Meßpunkten (10 je Dekade) von 1 - 1000 µNm gesteigert, wobei eine Meßpunktdauer von 10 s gewählt wurde (3 s zur Einregelung und 6 s Meßwertaufnahme) was einer Mittelwertbildung aus 3000 Einzelwerten entspricht. Gerätesteuerung und Auswertung der erhaltenen Meßreihen erfolgten mit der Geräte-Software US200 V.2.21.

10.2 Zellkultur humaner Keratinozyten

Als in vitro-Modell für humane proliferierende Keratinozyten diente die spontan transformierte, nicht tumorigene permanente Zelllinie [175] vom HaCaT-Stamm (human adult low Calcium high temperatur keratinocytes). Die Zellen dieser Zelllinie stammen ursprünglich aus der Peripherie eines malignen Melanoms von der oberen Rückenhaut eines 62-jährigen Mannes. Aufgrund der hohen Immortalität (mehr als 140 Passagen), genetischen Stabilität und ihrer weitgehend erhaltenen epidermalen Differenzierungskapazität eignet sich diese Zelllinie besonders für Studien zum Proliferations- und Differenzierungsverhalten humaner Keratinozyten.

Die HaCaT-Keratinozyten sind in ihren Eigenschaften den nativen humanen Keratinozyten sehr ähnlich. Sie stellen ein etabliertes in vitro-Testsystem zur Bestimmung zytotoxischer Eigenschaften exogener Noxen (z.B. topisch applizierte Arzneistoffe, UV-Strahlung, Umweltgifte) dar, wodurch erste Hinweise auf mögliche zytotoxische Reaktionen in vivo erhalten werden können.

10.2.1 Kultivierung

Die Kultivierung der HaCaT-Keratinozyten erfolgte in serumfreien Medium (SFM) unter Zusatz von Rinderhypophysenextrakt (25 µg/ml) und rekombinierter epidermaler Wachstumsfaktoren (rEGF) (0,1 – 0,2 ng/ml) bei 36,6 °C, 98 % Luftfeuchtigkeit und 5 % CO₂ (pH 7,2 – 7,4). Die Calcium-Konzentration des Mediums betrug 0,09 mM. Nach einer Kulturdauer von sieben Tagen (Zelleinsaat = 1 Million Zellen/20 ml) wurde das Medium aus den Kulturflaschen abgegossen und die Zellen mit PBS-Puffer gewaschen. Die Ablösung der adhären am Gefäßboden haftenden Zellen

erfolgte durch eine zehnmünütige Inkubation der Zellen in einer 0,05 %-igen Trypsinlösung. Nachdem die Zellen sichtbar vom Gefäßboden gelöst waren, wurde das Kulturgefäß zur Inaktivierung des Trypsins mit 1 - 2 ml Medium gespült. Anschließend wurde die entstandene Zellsuspension in ein Reagenzglas überführt und durch mehrmaliges vorsichtiges Turbulieren mit einer Pipette für die Bestimmung der Zellzahl weitestgehend homogenisiert. Diese erfolgte nach dem Zusatz von 400 µl Thyrode-Eosinlösung (Vitalfärbung) zu 100 µl der Zellsuspension in einer Fuchs-Rosenthal-Kammer unter einem Lichtmikroskop.

Anschließend wurde das restliche Zellsuspensat für fünf Minuten bei 1500 U/min zentrifugiert und das erhaltene Zellpellet so mit Kulturmedium versetzt, daß eine Zellsuspension von einer Million Zellen/ml Medium entstand. Diese definierte Zellsuspension diente neben der Einsaat in Greiner-Plaste-Kulturplatten mit 96 Wells (5000 Zellen/ml) als Ausgangsmedium für die Stammhaltung (1 Million Zellen/20 ml SFM). Um eine gute Reproduzierbarkeit der Ergebnisse zu erreichen, wurden für alle Untersuchungen grundsätzlich nur Zellen der 35. bis 46. Passage genutzt.

10.2.2 Beschreibung der Noxenexposition

Die bei den beschriebenen Untersuchungen eingesetzten Substanzen (KP, KP-Photoprodukte, 3-MBP, NAC usw.) bzw. Substanzgemische (KP + Antioxidantien; KP + UV-Absorber) wurden den Zellen grundsätzlich in isotonischem PBS-Puffer zugesetzt.

Am 3. Tag nach Einsaat der Zellen in 96-er Greiner-Plaste-Kulturplatten wurden 20 µl der Untersuchungslösungen in das Zellmedium (200 µl/Well) zu den Zellen appliziert. Nach einer Weiterkultivierung der behandelten Zellen über 24, 48 bzw. 72 h erfolgte die Bestimmung der Lebendzellanzahl und des ³[H]-Thymidin-Einbaus im Vergleich zur PBS-Puffer-behandelten Kontrolle (= unbehandelte Kontrolle).

Für die photochemischen Untersuchungen wurden die Zellen unmittelbar nach der Applikation der einzelnen Untersuchungslösungen zusätzlich mit verschiedenen UV-Dosen bestrahlt. Um mögliche photosensibilisierte oder auch UV-absorbierende Reaktionen der im Kulturmedium enthaltenen Ingredienzien ausschließen zu können, wurde das Kulturmedium bei allen Untersuchungen, die eine zusätzliche UV-Exposition der Zellen beinhalteten, unmittelbar vor der Bestrahlung nach zweimaligem Waschen der Zellen mit PBS-Puffer durch die Untersuchungslösungen ersetzt. Je nach Versuchsansatz wurden die Zellen anschließend in den geöffneten Mikrotiterplatten von oben mit einer UVA-Dosis von 1, 8 bzw. 16 J/cm² oder mit einer UVB-Dosis von 120 bzw. 240 mJ/cm² bestrahlt. Alle unbestrahlten Kontrollen wurden während des Bestrahlungsvorganges mit Aluminiumfolie abgedeckt. Nach UV-Exposition wurden die Zellen zweimal mit PBS-Puffer gewaschen und anschließend mit frischem Kulturmedium versetzt. Die Bestimmung der Vitalität (Lebendzellanzahl) und der DNA-Syntheseleistung (³[H]-Thymidin-Einbau) erfolgte 24 h nach UV-Exposition im Vergleich zur unbehandelten bestrahlten Kontrolle. Im Gegensatz hierzu wurde der intrazelluläre Peroxid-Gehalt (DHR-Test) grundsätzlich unmittelbar nach UV-Exposition im Vergleich zur unbehandelten bestrahlten Kontrolle ermittelt.

10.2.3 Bestimmung der Vitalität (Lebendzellanzahl)

Die Bestimmung der Lebendzellanzahl erfolgte nach dem in der Literatur häufig zitierten Kristall-Violett-Assay [176]. Für diese Untersuchungen wurden proliferierende Keratinozyten in 96-er Mikrotiterplatten über einen Zeitraum von 24, 48 und 72 Stunden nach Noxenexposition (z.B. Ketoprofen-Zusatz, UV-Strahlung,) inkubiert. Nach der Inkubation wurde das Medium von den Mikrotiterplatten der kultivierten Zellen sorgfältig abgeschüttet, so daß nur noch die lebenden, am Wellboden adhärent wachsenden Keratinozyten in der Titerplatte zurückblieben. Die Fixierung bzw. Denaturierung der lebenden Zellen erfolgte durch den Zusatz von Methanol (200 µl/well). Nach einer Einwirkzeit von 15 Minuten wurde das überstehende Methanol abgegossen und durch mehrmaliges Waschen restlos von den fixierten Zellen entfernt. Zur Anfärbung der adhärennten Zellen (Proteinfärbung) wurden diese mit einer 0,1 %-igen ethanolischen Kristallviolett-Lösung (100 µl/Well) versetzt und für zehn Minuten inkubiert. Anschließend wurde der überschüssige Farbstoff durch gründliches Waschen mit Wasser (4 x) entfernt. Nach dem Trocknen der Platten wurde der von den Zellen zurückgehaltene Farbstoff mit einer 0,1 molaren ethanolischen Trinatriumcitrat-Lösung (100 µl/Well) aus den Zellen eluiert und die Extinktion der Farbstofflösung bei 540 nm in einem Mikrotiterplattenreader bestimmt.

10.2.4 Bestimmung der DNA-Syntheseleistung (³[H]-Thymidin-Einbau)

Für die Untersuchungen wurden die Zellen in 96-Well Greiner-Plastekultur-Platten kultiviert. Die Zugabe der Untersuchungslösungen bzw. des reinen Lösungsmittelgemisches (20 µl je 200 µl Zellsuspension) erfolgte am 3. Tag nach der Zelleinsaat. Die Bestimmung der DNA-Syntheseleistung wurde je nach Versuchsansatz 24 bzw. 24, 48 und 72 Stunden nach Noxenexposition durchgeführt. Hierfür wurden den Zellen eine Stunde vor Ablauf der Versuchsdauer 20 µl des radioaktiv markierten ³[H]-Thymidins (0,5 µCi/ml pro Well; spezifische Aktivität 60,3 Ci/mmol) zugesetzt. Das überschüssige ³[H]-Thymidin wurde nach einer einstündigen Einwirkzeit restlos von den Zellen durch Absaugen am Harvester entfernt. Die Ernte der Zellen wurde ebenfalls mit Hilfe des Zellharvesters durchgeführt. Zum Ablösen der adhärent am Gefäßboden wachsenden Zellen wurden diese mit einer 0,05 %-igen Trypsin-Lösung versetzt und über einen Zeitraum von 20 Minuten im Brutschrank (36,6 °C) inkubiert. Nach der vollständigen Zellernte (lichtmikroskopisch kontrolliert) befanden sich die losen Zellen in den Filterblättchen des Harvesters, die anschließend in Szintillationsmeßgefäße überführt, bis zur Trockne aufbewahrt und nach Zugabe des Flüssigkeitsszintillationscocktails im Flüssigkeitsszintillationszähler vermessen wurden.

10.2.5 Bestimmung des intrazellulären Peroxid-Gehaltes (DHR-Test)

Für die Bestimmung des intrazellulären Peroxid-Gehaltes wurden die konfluenten Keratinozyten vor Versuchsbeginn unter Ausschluß von Licht für 45 Minuten in 96-Well Greiner-Plastekultur-Platten mit einer 5 µM DHR-Lösung (Dehydrorhodamin) im Brutschrank inkubiert. Zur vollständigen Entfernung des überschüssigen, im extrazellulären Raum befindlichen DHR wurden die Zellen zweimal mit sterilem PBS-Puffer (pH 7,4) gewaschen.

Die Bestimmung des während der Noxenexposition durch Oxidationsprozesse in den Zellen gebildeten fluoreszierenden Rhodamins erfolgte unmittelbar nach der Noxenexposition durch die Messung des Fluoreszenzsignals bei einer Wellenlänge von 535 nm (Emission) und einer Anregungswellenlänge von 485 nm (Extinktion) in einem Mikroplatten-Fluoreszenzreader.

10.2.6 Statistische Auswertung der Versuchsergebnisse am in vitro-Modell humaner Keratinozyten

Die Ergebnisse der in vitro-Untersuchungen an humanen Keratinozyten resultieren aus Zwölf- bzw. Sechsfachbestimmungen und sind als Mittelwerte mit der Standardabweichung angegeben. Zur Prüfung auf signifikante Differenzen kam ausgehend von einer nicht normalverteilten Grundgesamtheit der parameterfreie Kruskal-Wallis Test (One Way Analysis of Variance on Ranks) zum Einsatz, der die analogen Hypothesen der Varianzanalyse verteilungsunabhängig prüft.

Unterschiede zwischen den einzelnen Mittelwerten wurden durch paarweise Vergleiche nach dem Student-Newman-Keuls-Verfahren bestimmt. Die statistische Prüfung wurde mit der Software STATISTICA für Windows [StatSoft, Inc., 1997, Tulsa, USA] durchgeführt. Unterschiede wurden als statistisch signifikant bewertet, wenn die Irrtumswahrscheinlichkeit $p \leq 0,05$ betrug [177].

10.3 Penetrationsuntersuchungen an humaner Haut ex vivo

10.3.1 Präparation des biologischen Materials

Die verwendeten Häute stammten von Mammareduktionsplastiken. Die Aufarbeitung des Untersuchungsmaterials erfolgte zwei bis vier Stunden nach der Operation. Vor der mechanischen Entfernung des subkutanen Fettgewebes wurde die Haut zunächst mit einer isotonischen NaCl-Lösung gesäubert. Für die Anfertigung gleichgroßer Hautstücke wurde die Haut mit Hilfe eines Locheisens in kreisrunde Stücke mit einem Durchmesser von 2 cm segmentiert. Die so erhaltenen Hautpräparate

wurden einzeln in Aluminiumfolie verpackt und bei -20 °C für maximal drei Monate im Tiefkühlschrank gelagert. Das Alter der Probandinnen lag zwischen 17 und 53 Jahren.

10.3.2 Durchführung der Penetrationsuntersuchungen an humaner Haut (ex vivo)

Etwa 30 min vor Versuchsbeginn wurden die Franz'schen Diffusionszellen mit dem Akzeptormedium (Phosphatpuffer pH 7,4) gefüllt und auf 32 °C temperiert. Nachdem die frisch aufgetaute Haut durch einen Watteträger vom Gefrierwasser befreit war, wurden ca. 20 mg des Ketoprofen-Gels homogen auf der gesamten Epidermisoberfläche ($d = 2\text{ cm}$) aufgetragen. Je nach Versuchsvorgabe (vgl. Kap. 4.10.3) wurde die präparierte Haut vor (PEN 2) bzw. unmittelbar nach einer Penetrationszeit von 30 bzw. 300 min (PEN 3) einer UVA-Dosis von 8 J/cm^2 ausgesetzt. Um ein Austrocknen der Arzneiformulierung und des Hautpräparates während der UVA-Bestrahlung zu vermeiden, wurden die präparierten Häute während der gesamten Bestrahlungszeit (ca. 15 min) mit einer Quarzplatte ($90 \times 90 \times 2\text{ mm}^3$) abgedeckt.

Unmittelbar nach der Gel-Applikation (PEN1, PEN3) bzw. UVA-Exposition (PEN2) wurden die Hautpräparate in der Diffusionszelle fixiert und für 30 bzw. 300 Minuten penetriert. Nach erfolgter Penetration wurden die Hautpräparate der Franz'schen Diffusionszelle entnommen und der Formulierungsrückstand vorsichtig mit Watteträgern entfernt. Die Aufarbeitung der penetrierten Haut erfolgte in der nachstehend beschriebenen Art und Weise.

10.3.3 Aufarbeitung der penetrierten Haut

Für die weitere Aufarbeitung wurden die penetrierten Hautpräparate mit Stecknadeln an der Peripherie einer mit Aluminiumfolie bespannten Polystyrolunterlage fixiert. Die vollständige Entfernung des Stratum corneum erfolgte durch 20 Tesafilmabrisse unter Zuhilfenahme einer Lochschablone mit einem Durchmesser von 1,6 cm. Anschließend wurden pro Haut je drei Stanzbiopsien ($d = 0,6\text{ cm}$)

Hautschicht	Schnitt-Bezeichnung	Schnitt-Poolung pro Haut
Stratum corneum (SC)	SC 1, 2, 3, 4	je 5 Tesafilmabrisse
Epidermis (EP)	EP	(4 Schnitte a $20\text{ }\mu\text{m}$) x 3
Dermis (D)	DR 1	(6 Schnitte a $20\text{ }\mu\text{m}$) x 3
	DR 2	(10 Schnitte a $40\text{ }\mu\text{m}$) x 3
	DR 3	(10 Schnitte a $40\text{ }\mu\text{m}$) x 3
	DR 4	(10 Schnitte a $40\text{ }\mu\text{m}$) x 3

Tab. 9 Aufarbeitungsschema der penetrierten Hautpräparate

entnommen, die zur Anfertigung von Horizontalschnitten entsprechend Tab. 9 (4 x 20 µm - Epidermis, 6 x 20 µm und 30 x 40 µm - Dermis) an einem Gefriermikrotom dienen. Für die Quantifizierung der Proben wurden die Horizontalschnitte der drei Stanzbiopsien einer Haut nach Tab. 9 gepoolt, mit 2 ml Methanol versetzt, 30 min geschüttelt und anschließend chromatographisch bei einer Wellenlänge von 257 nm analysiert.

10.4 Puffer- und Reagenzienzusammensetzung

<u>Phosphat-Puffer pH 7,4 (PB)</u>	0,20 g	KH ₂ PO ₄	
	1,44 g	Na ₂ HPO ₄ x 2 H ₂ O	
	<hr/>		
	Aqua _{dest.}	ad	1000 ml

<u>PBS-Puffer pH 7,4 (PBS)</u>	4,00 g	NaCl	
	0,20 g	KH ₂ PO ₄	
	1,44 g	Na ₂ HPO ₄ x 2 H ₂ O	
	<hr/>		
Aqua _{dest.}	ad	1000 ml	

<u>Luminol-Reagenz</u>	1,43 g	Na ₂ CO ₃	
	0,42 g	NaHCO ₃	
	2,00 mg	Luminol	
	1,00 mg	Microperoxidase	
	<hr/>		
Aqua _{dest.}	ad	500 ml	

<u>FOX-II-Reagenz (Stammlösung)</u>	98,0 mg	Ammoniumeisen-(II)-sulfat	
	14,0 ml	H ₂ SO ₄ (175 g/l)	
	6,1 mg	Xylenolorange	
	<hr/>		
Aqua _{dest.}	ad	100 ml	

<u>0,1 M Trisodiumcitrat-Lösung</u>	14,5 g	Natriumcitrat	
	250 ml	Ethanol	
	250 ml	Aqua _{dest.}	

10.4.1 DC-Sprühreagenzien

TMPD-Reagenz

In der Dünnschichtchromatographie wurde für die Detektion von Peroxiden TMPD-Lösung als Sprühreagenz genutzt.

Methanol	50 ml
H ₂ O	49 ml
Essigsäure	1 ml
N,N,N',N'-Tetramethyl-p-phenyldiamin	1 g

Nach dem Besprühen wird die Platte 5 min bei 80 °C entwickelt. Peroxide bzw. starke Oxidationsmittel erscheinen als violette Flecken auf weißem Untergrund.

Kupfer-(II)-sulfat-Lösung

Die Detektion der Linolsäure (und des Linolsäure-Peroxides) erfolgte unspezifisch durch die Einlagerung von Kupfer-Ionen in lipophile Molekülstrukturen mit einer Kupfer-(II)-sulfat-Lösung.

CuSO ₄		4,0 g
H ₃ PO ₄		5,0 ml
Methanol		2,0 ml
Aqua _{dest.}	ad	50,0 ml

Nach dem Besprühen wird die Platte 10 min bei 110 - 120 °C entwickelt. Die lipophilen Strukturen erscheinen als braune Flecken auf weißem Untergrund.

10.5 Chemikalien

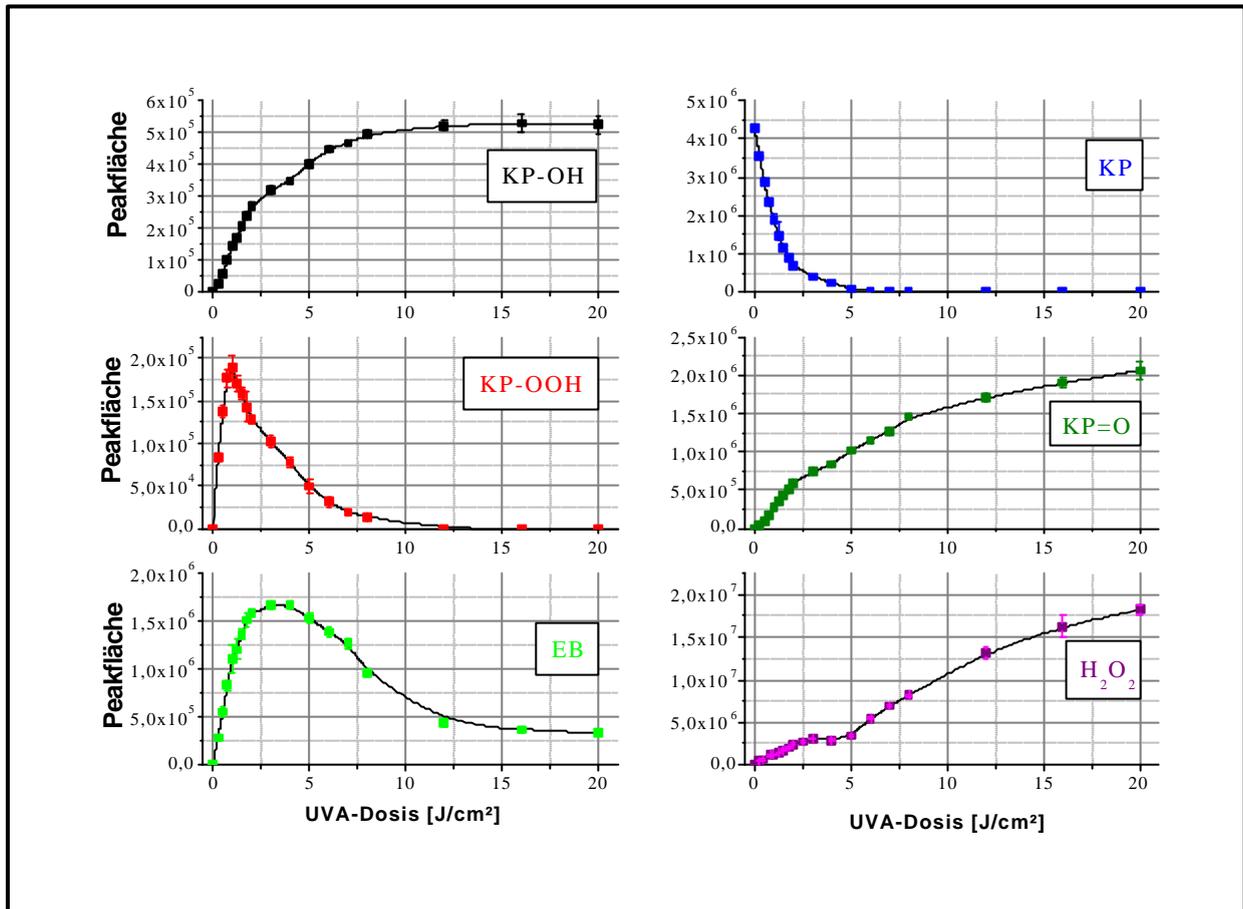
Acetonitril	Fluka Chemie AG (Neu-Ulm, Deutschland)
Ammoniumeisen-(II)-sulfat	Fluka Chemie AG (Neu-Ulm, Deutschland)
Argon 5.0	Messer Griesheim GmbH (Leipzig, Deutschland)
Ascorbinsäure	Merck Eurolab GmbH (Darmstadt, Deutschland)
Benoxaprofen	Sigma (Deisenhofen, Deutschland)
β -Cyclodextrin	Fluka Chemie AG (Neu-Ulm, Deutschland)
Biphenylessigsäure	Sigma (Deisenhofen, Deutschland)
Calciumchlorid	Eurolab GmbH (Darmstadt, Deutschland)
Cyclohexan	Fluka Chemie AG (Neu-Ulm, Deutschland)
Diclofenac	Sigma (Deisenhofen, Deutschland)
Diethylether	Merck Eurolab GmbH (Darmstadt, Deutschland)
Diglyme	Fluka Chemie AG (Neu-Ulm, Deutschland)
Dihydrorhodamin	Sigma (Deisenhofen, Deutschland)
Dimethylformamid	Fluka Chemie AG (Neu-Ulm, Deutschland)
Dinatriumhydrogenphosphat	Fluka Chemie AG (Neu-Ulm, Deutschland)
Dinatriumcarbonat	Fluka Chemie AG (Neu-Ulm, Deutschland)
Dinatriumhydrogenphosphat	Fluka Chemie AG (Neu-Ulm, Deutschland)
Di-Natriumtetraborat (Borax)	Merck Eurolab GmbH (Darmstadt, Deutschland)
Eosin gelblich	Sigma (Deisenhofen, Deutschland)
Essigsäureethylester	Merck Eurolab GmbH (Darmstadt, Deutschland)
Essigsäure	Merck Eurolab GmbH (Darmstadt, Deutschland)
Ethanol	Fisher Scientific U.K. (Köln, Deutschland)
Flüssigkeitsszintillationscocktail	Ultima Gold Canberra Packard GmbH, (Dreieich, Deutschland)
Glucose	Merck Eurolab GmbH (Darmstadt, Deutschland)
Glucoseoxidase	Sigma (Deisenhofen, Deutschland)
Glutathion	Sigma (Deisenhofen, Deutschland)
Harnsäure	Fluka Chemie AG (Neu-Ulm, Deutschland)
Helium 5.0	Messer Griesheim GmbH (Leipzig, Deutschland)
Ibuprofen	Sigma (Deisenhofen, Deutschland)
Indoprofen	Sigma (Deisenhofen, Deutschland)
Isopropanol	Fisher Scientific U.K. (Köln, Deutschland)
Kaliumdihydrogenphosphat	Fluka Chemie AG (Neu-Ulm, Deutschland)
Kaliumchlorid	Serva Feinbiochemie (Heidelberg, Deutschland)
Ketoprofen (razemisches)	Bayer (Leverkusen, Deutschland)
Ketoprofen-Gel	Kreussler (Wiesbaden, Deutschland)
Kieselgel Si60	Merck Eurolab GmbH (Darmstadt, Deutschland)
Kristallviolett	Merck Eurolab GmbH (Darmstadt, Deutschland)

Kupfer-II-sulfat	Merck Eurolab GmbH (Darmstadt, Deutschland)
Linolsäure	Sigma (Deisenhofen, Deutschland)
Lipoxygenase	Sigma (Deisenhofen, Deutschland)
Luminol	Serva (Heidelberg, Deutschland)
Magnesiumchlorid	Merck Eurolab GmbH (Darmstadt, Deutschland)
Methanol	Fisher Scientific U.K. (Köln, Deutschland)
3-Methylbenzophenon	Sigma (Deisenhofen, Deutschland)
Microperoxidase (MP11)	Sigma (Deisenhofen, Deutschland)
N-Acetylcystein	Sigma (Deisenhofen, Deutschland)
Natrimucarbonat	Merck Eurolab GmbH (Darmstadt, Deutschland)
Natriumchlorid	Merck Eurolab GmbH (Darmstadt, Deutschland)
Natriumdodecylsulfat	Fluka Chemie AG (Neu-Ulm, Deutschland)
Natriumhydrogencarbonat	Fluka Chemie AG (Neu-Ulm, Deutschland)
N,N,N',N'-tetramethyl-p-phenyl-diamin	Sigma (Deisenhofen, Deutschland)
n-Hexan	Fluka Chemie AG (Neu-Ulm, Deutschland)
Phosphorsäure	Merck Eurolab GmbH (Darmstadt, Deutschland)
Schwefelsäure	Merck Eurolab GmbH (Darmstadt, Deutschland)
Serumfreies Medium (inklusive rEGF + BPE)	Gibco BRL Life Technologies GmbH, (Eggenstein, Deutschland)
Silberchlorid	Fluka Chemie AG (Neu-Ulm, Deutschland)
Sorbinsäure	Merck Eurolab GmbH (Darmstadt, Deutschland)
Tesafilm	Beiersdorf AG, (Hamburg, Deutschland)
³ [H]-Thymidin 60,3 Ci/mmol	American Radiolabeled Chemicals Inc, (St. Louis, USA)
Tocopherol (wasserlöslicheres Derivat)	RAPS GmbH & Co. KG (Kulmbach, Deutschland)
Trinatriumcitrat	Fluka Chemie AG (Neu-Ulm, Deutschland)
Trypsin	Gibco Life Technologies GmbH, (Eggenstein, Deutschland)
Urocansäure (URS)	Sigma (Deisenhofen, Deutschland)
UVINUL [®] MS 40	BASF (Ludwigshafen, Deutschland)
UVINUL [®] P 25	BASF (Ludwigshafen, Deutschland)
Xylenolorange	Merck Eurolab GmbH (Darmstadt, Deutschland)

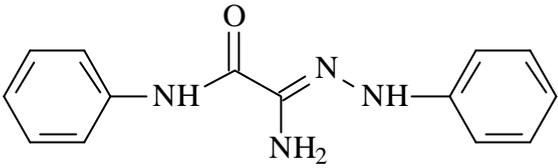
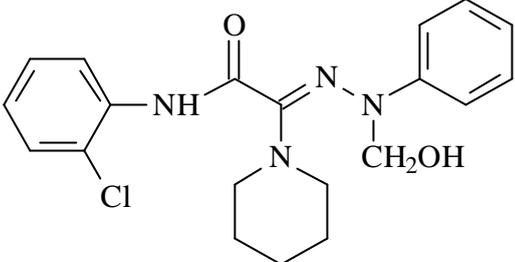
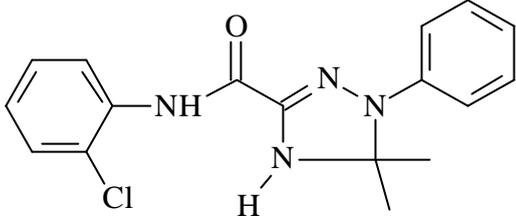
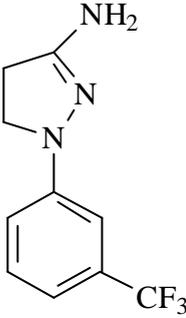
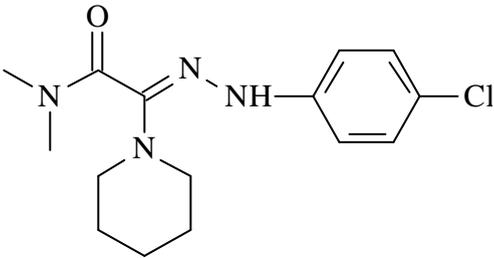
10.6 Geräte und Hilfsmittel (Zellkultur)

Absorptionsreader	Labsystems, iEMS, Merlin, (Bornheim-Hersel, Deutschland)
Durchlichtmikroskop	Zetopan, Reichert AG (Wien, Österreich)
Biopsiestanzen	Stiefel Laboratorium GmbH (Offenbach, Deutschland)
Brutschrank Vitromat Typ sbs-11,	Mytron (Heiligenstadt, Deutschland)
Cell-Harvester und Vakuum-Controller, IH-110	INOTECH (Wohlen, Schweiz)
Flüssigkeitsszintillationszähler Wallac 1410	Berthold (Berlin, Deutschland)
Franz-Diffusionszelle	Crown Glass Company (Sommerville, USA)
Fuchs-Rosenthal-Zählkammer	Faust GmbH (Halle, Deutschland)
Gefriermikrotom Mikrotom-Modell 1206	Frigomobil Reichert-Jung (Heidelberg, Deutschland)
Gewebe-Kulturflaschen und –Kulturplatten	Greiner GmbH (Frickenhausen, Deutschland)
HaCaT-Keratinocyten	Deutsches Krebsforschungsinstitut (Heidelberg Deutschland)
Laminarbox	VEB Elektromat (Dresden, DDR)
Lichtmikroskop Olympus CK2-TR,	Olympus Optical Co. (Japan)
Szintillationsmeßgefäße	Canberra Packard GmbH, (Dreieich, Deutschland)

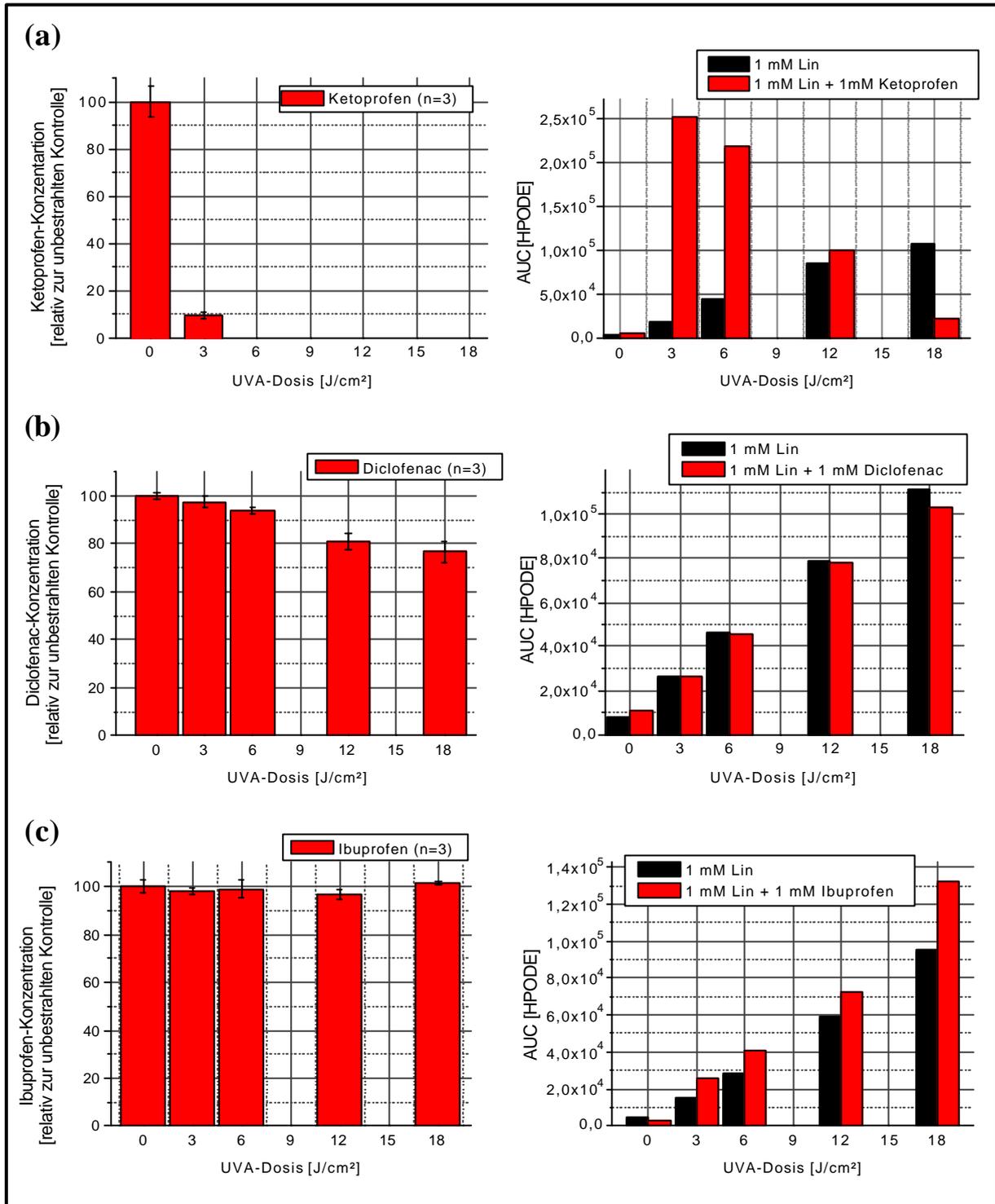
11 Anhang



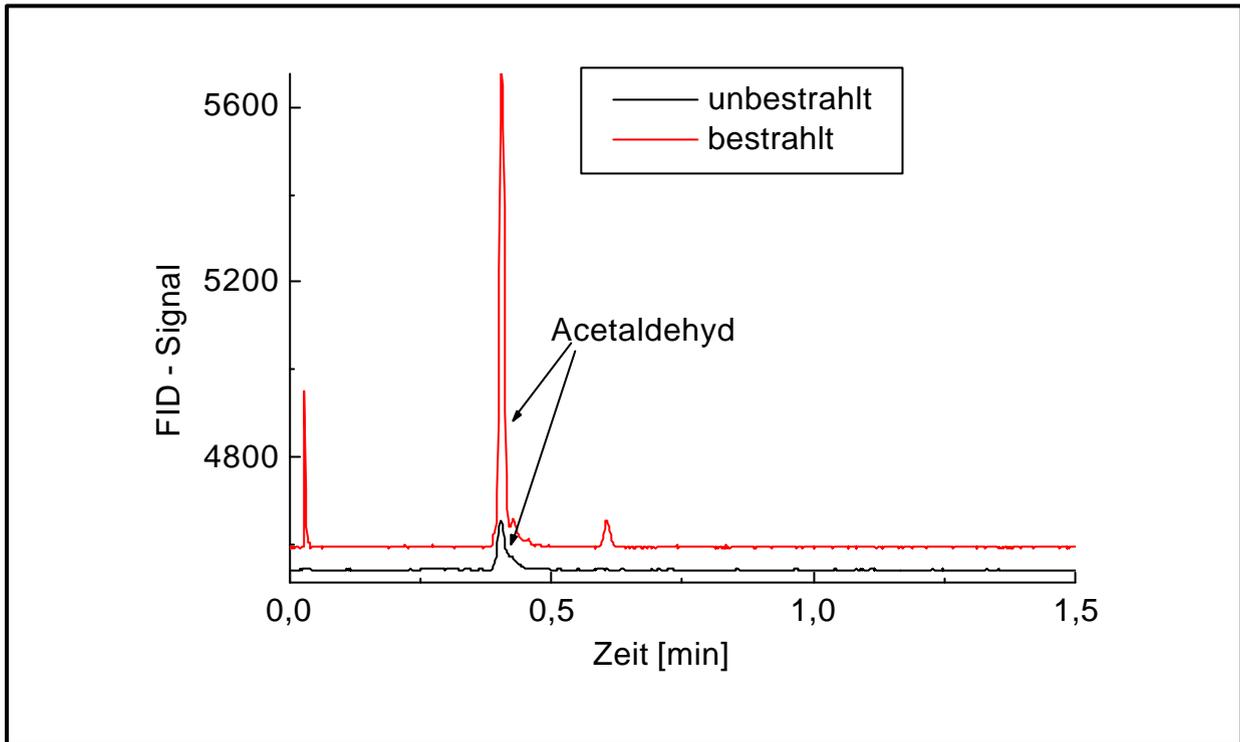
Anhang Abb. 1 Verteilung von Ketoprofen, H₂O₂ und den einzelnen Ketoprofen-Photoprodukten einer 0,5 mM Ketoprofen-Lösung (PB-Puffer, pH 7,4) in Abhängigkeit von der eingestrahnten UVA-Dosis (n = 3)

LOX-Inhibitor 1	
LOX-Inhibitor 2	
LOX-Inhibitor 3	
LOX-Inhibitor 4	
LOX-Inhibitor 5	

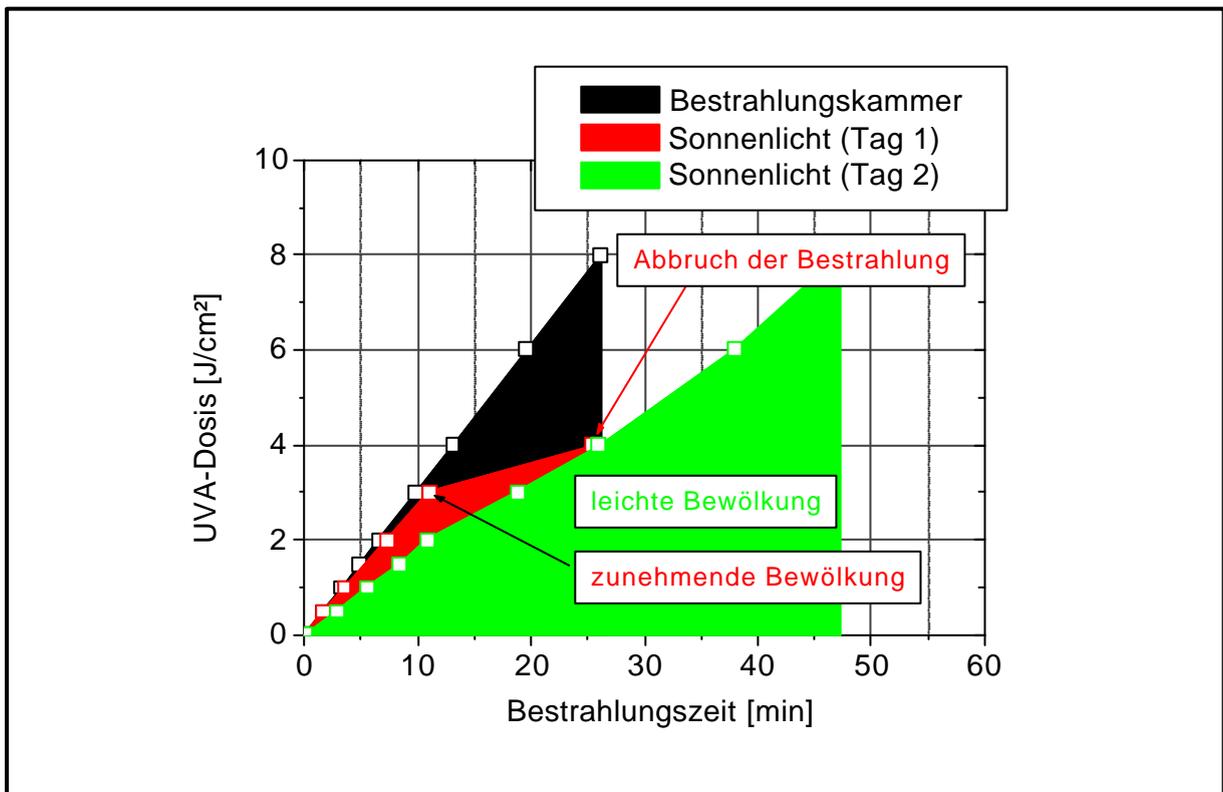
Anhang Tab 1 Strukturformeln der untersuchten LOX-Inhibitoren



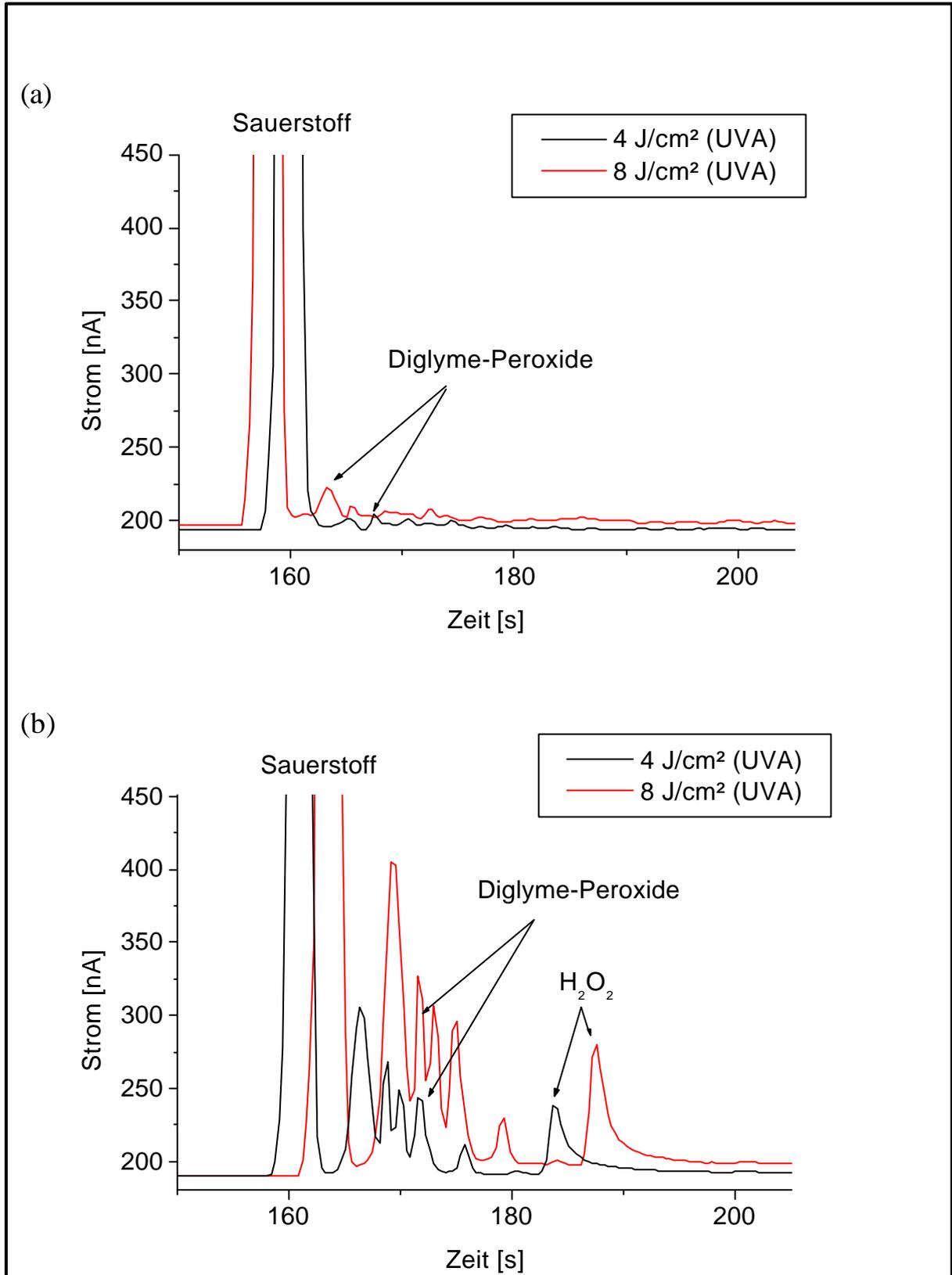
Anhang Abb. 2 Photochemisches Verhalten (Photostabilität und Linolsäure-Peroxidation) topisch angewandter NSAR (a) Ketoprofen, (b) Diclofenac und (c) Ibuprofen



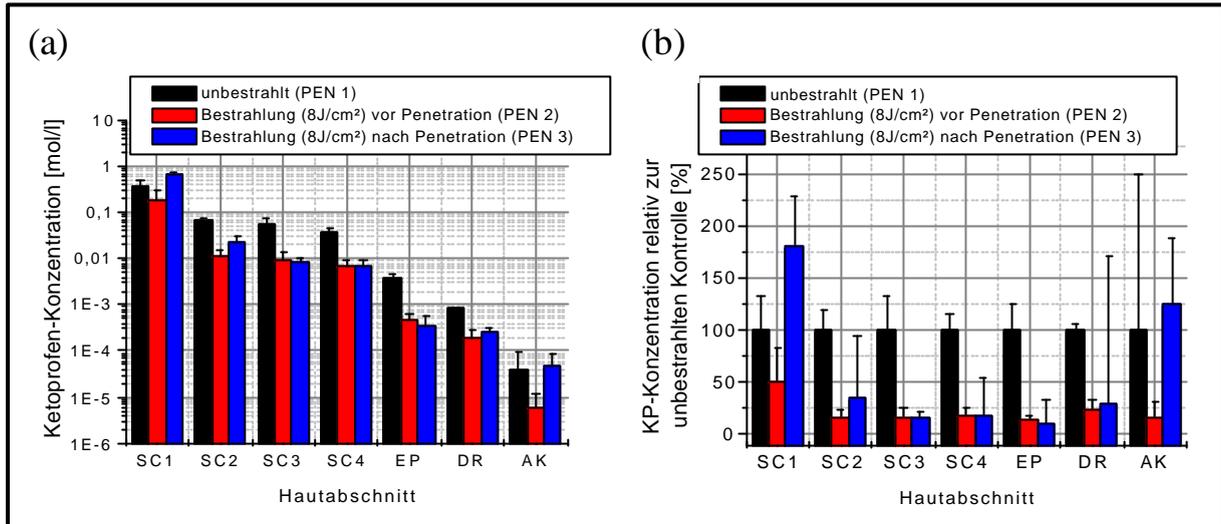
Anhang Abb. 3 Chromatogramm (GC-FID) einer ethanolischen (40 % V/V) 100 mM Ketoprofen-Lösung vor und nach UVA-Bestrahlung (8 J/cm²)



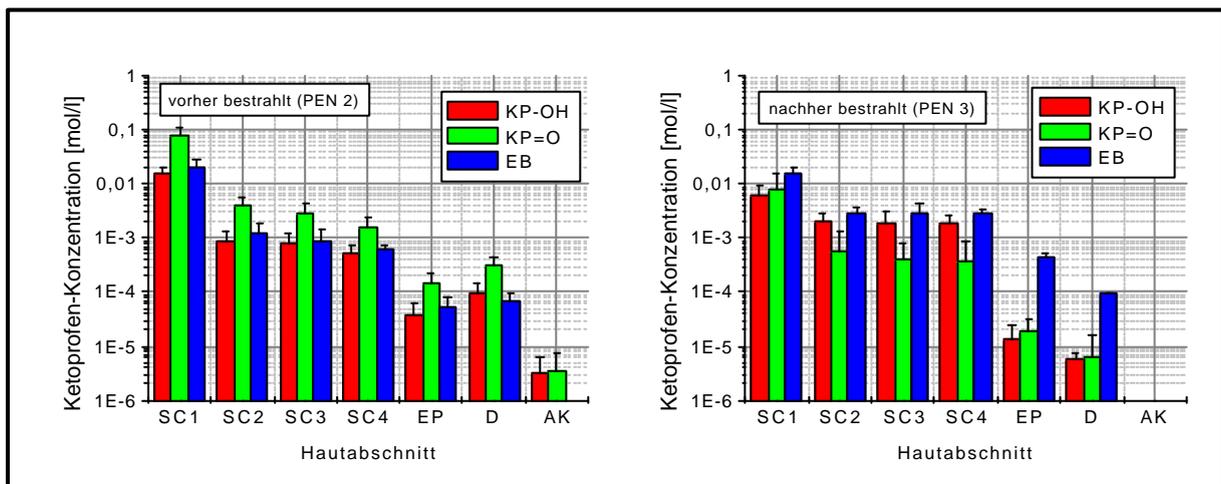
Anhang Abb. 4 UVA-Dosis/Bestrahlungszeit-Diagramm von natürlichem Sonnen- und künstlichem UVA-Licht



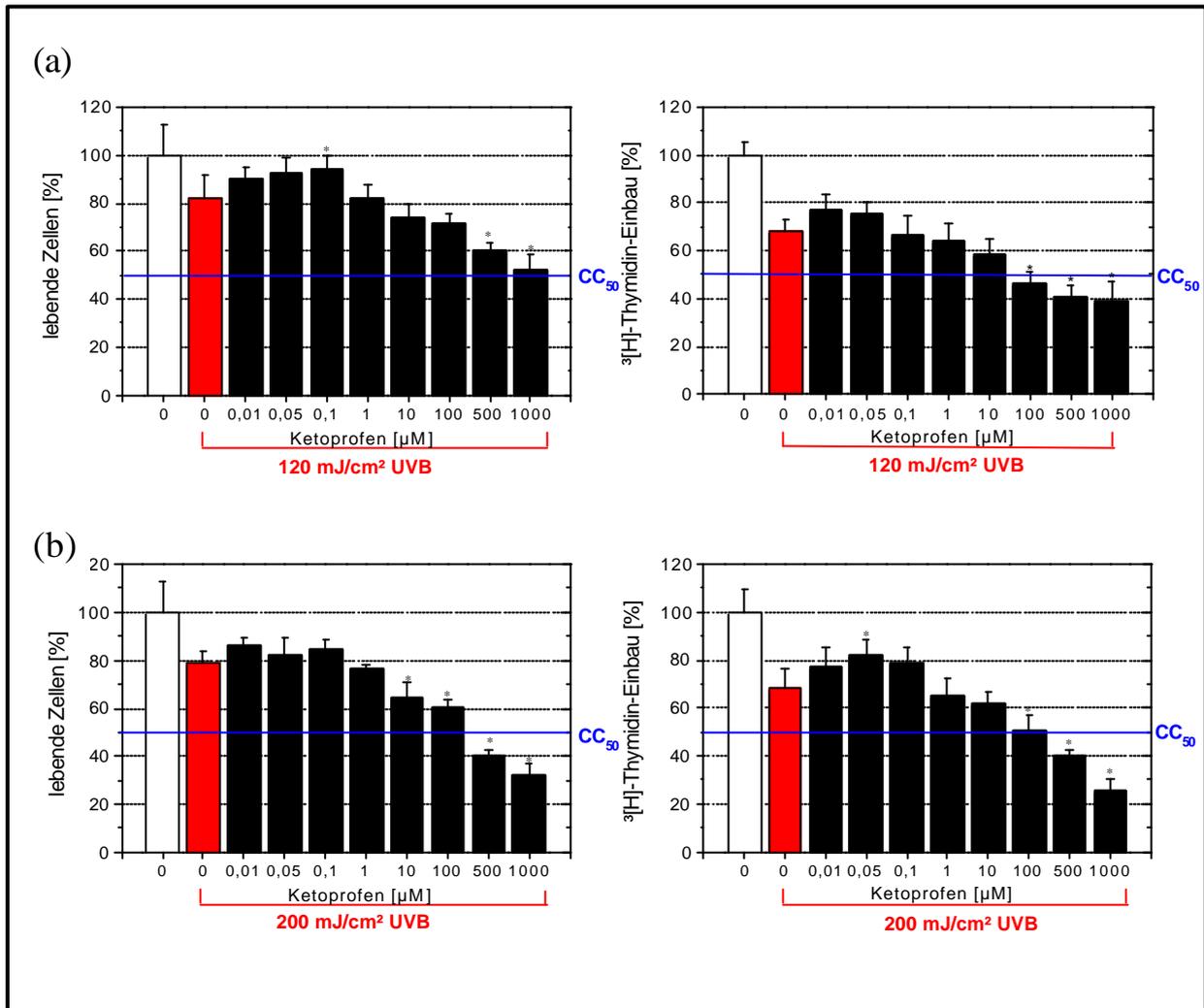
Anhang Abb. 5 Elektropherogramm einer UVA-bestrahlten (a) Ketoprofen-freien und (b) Ketoprofen-haltigen (1 mM) 50 %-igen Diglyme-Lösung



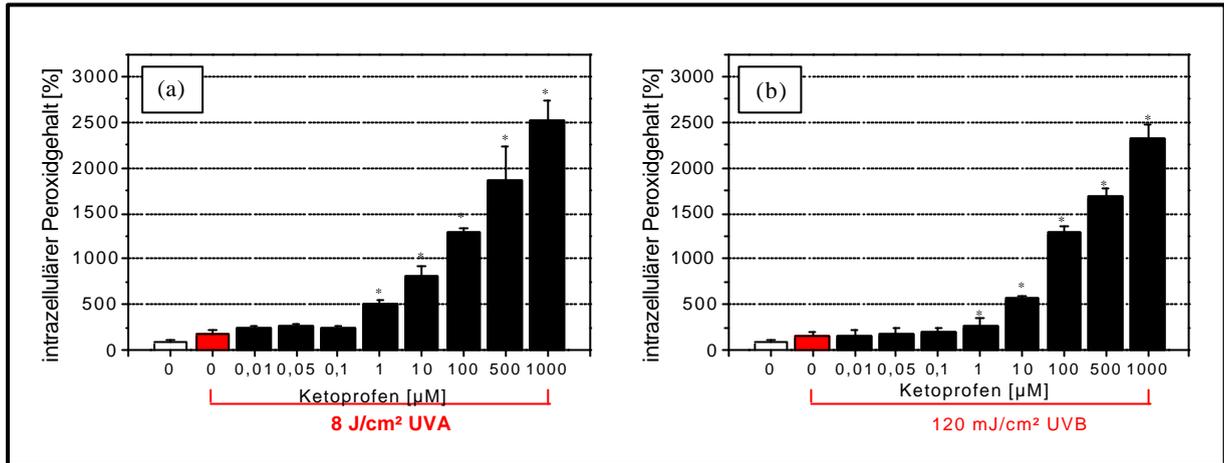
Anhang Abb. 6 Ketoprofen-Verteilung in einer vor bzw. nach einer 300-minütigen Penetration UVA-bestrahlten Haut im (a) direkten und (b) relativen Vergleich zur unbestrahlten Kontrolle



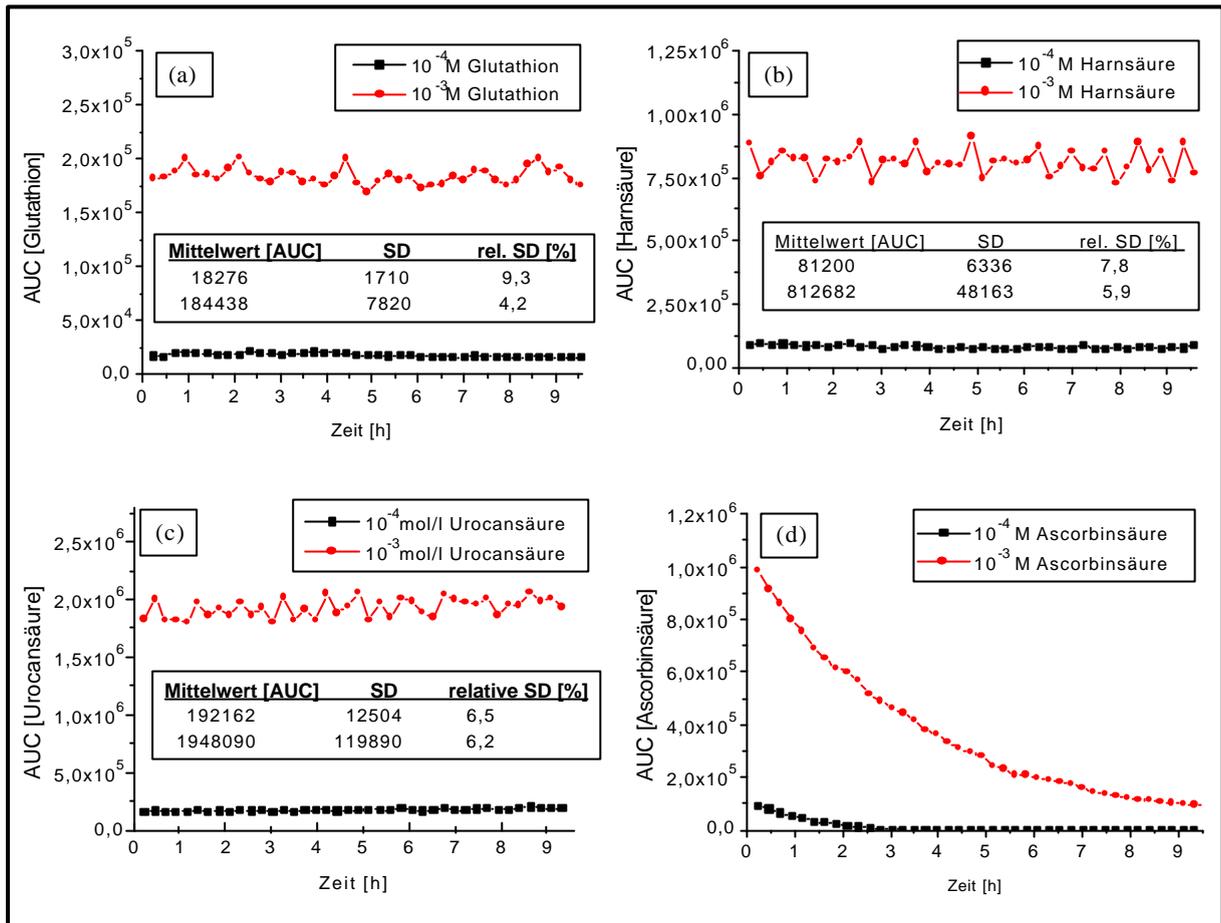
Anhang Abb. 7 Vergleich der Ketoprofen-Photoprodukt-Verteilung in humaner exzidierter Haut bei unterschiedlichen Bestrahlungszeitpunkten. UVA-Exposition der Hautpräparate (a) vor und (b) nach der Penetration (300 min)



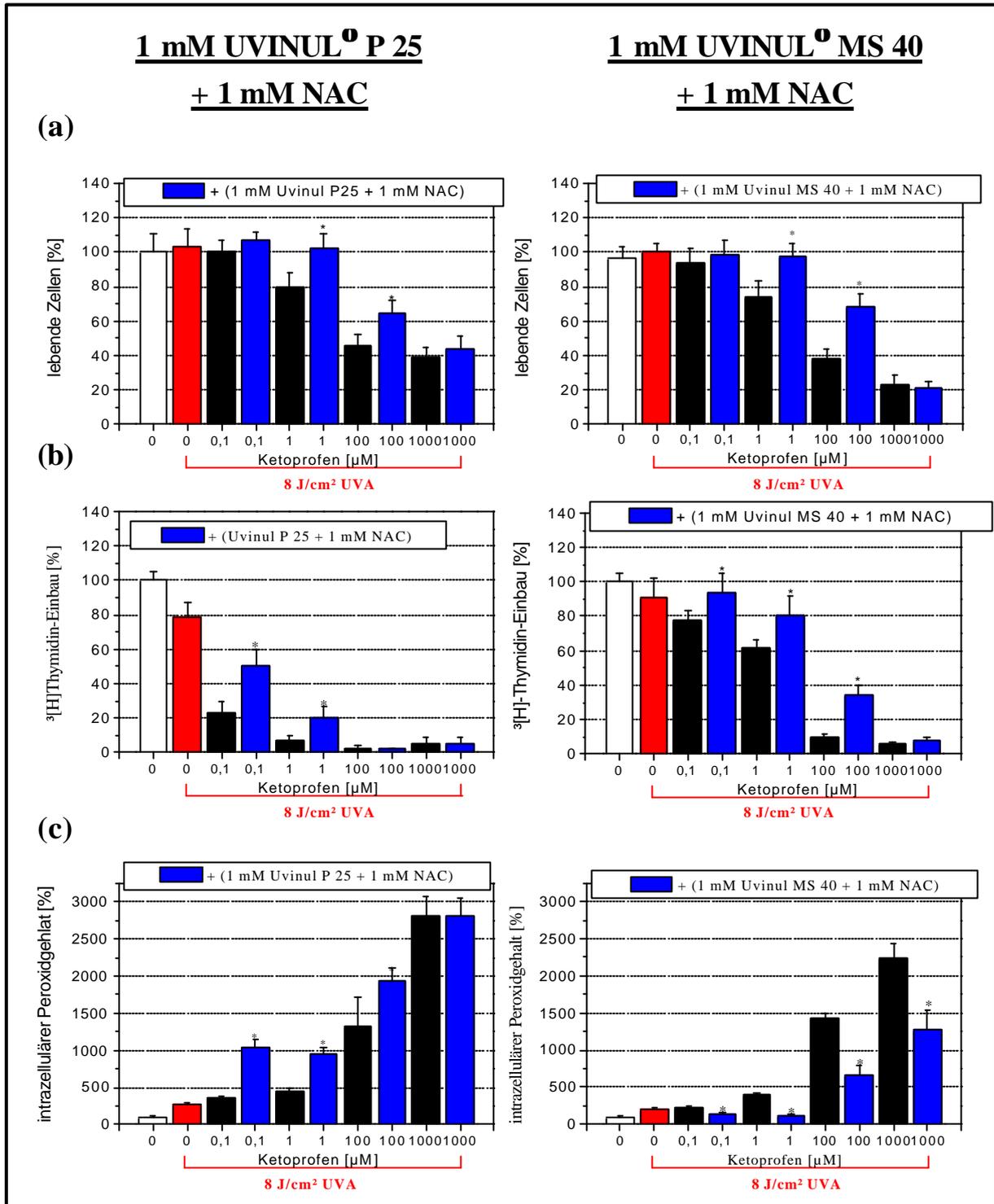
Anhang Abb. 8 Bestimmung der Vitalität und des ^3H -Thymidin-Einbaus Ketoprofen-behandelter humaner Keratinozyten 24 h nach einer UVB-Dosis von (a) 120 mJ/cm² und (b) 200 mJ/cm², bezogen auf die unbehandelte Kontrolle (= 100 %) [* $p < 0,05$ Ketoprofen behandelte Zellen im Vergleich zur bestrahlten Kontrolle; n = 12]



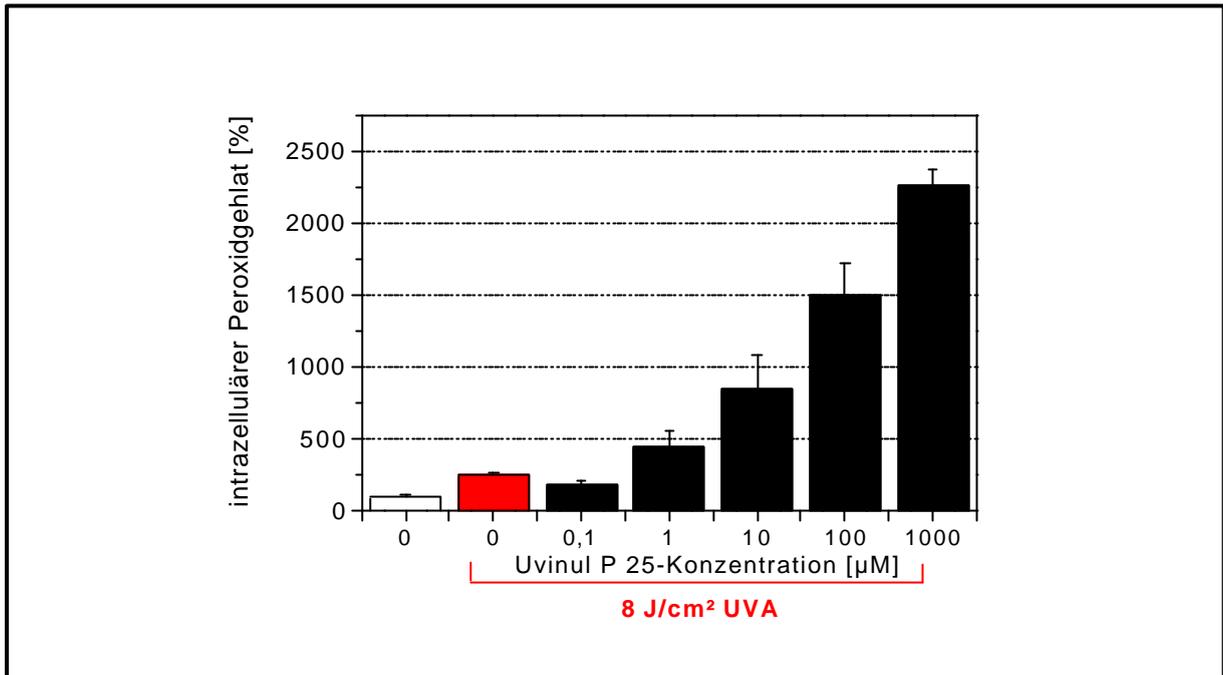
Anhang Abb. 9 Relativer intrazellulärer Peroxidgehalt Ketoprofen-behandelnder humaner Keratinozyten (a) nach UVA- (8 J/cm²) und (b) nach UVB-Bestrahlung (120 mJ/cm²) (* $p < 0,05$ Ketoprofen behandelte Zellen im Vergleich zur bestrahlten Kontrolle; n = 12)



Anhang Abb. 10 Stabilität wäßriger 10^{-4} M bzw. 10^{-3} M Lösungen von (a) Glutathion, (b) Harnsäure, (c) Urocansäure und (d) Ascorbinsäure über einen Zeitraum von 9 h unter Ausschluß von Licht



Anhang Abb. 11 (a) Lebendzellanzahl (b) DNA-Syntheseleistung und (c) intrazellulärer Peroxidgehalt humaner Keratinozyten nach UVA-Bestrahlung (8 J/cm²) unter dem Einfluß von Ketoprofen und der kombinierten Applikation von 1 mM N-Acetylcystein und 1 mM UVINUL[®] MS 40 bzw. 1 mM N-Acetylcystein und UVINUL[®] P 25 (n = 8), bezogen auf die unbehandelte Kontrolle (= 100 %)



Anhang Abb. 12 Relativer intrazellulärer Peroxidgehalt UVINUL[®] P 25-behandelter humaner Keratinozyten (n = 12)

12 Literaturverzeichnis

- 1 De Gruijl, F.R.: Skin cancer and solar UV radiation; *The European Journal of Cancer / A.- Oxford* **35** (1999) 2003-2009
- 2 Madronich, S. and F.R. De Gruijl: Skin cancer and UV radiation; *Nature (London)* **366** (1993) 23
- 3 Tedesco, A.C.; L. Martinez, S. Gonzalez: Photochemistry and photobiology of actinic erythema: defensive and reparative cutaneous mechanisms; *Braz. J. Med. Biol. Res.* **30** (1997) 561-575
- 4 Cunningham, M.L.; N.I. Krinsky, S.M. Giovanazzi and M.J. Peak: Superoxide anion is generated from cellular metabolites by solar radiation and its components; *J. Free Rad. Biol. Med.* **1** (1985) 381-385
- 5 Skoog, M.L.; K. Ollinger, M. Skogh: Microfluorometry using fluorescein diacetate reflects the integrity of the plasma membrane in UVA-irradiated cultured skin fibroblasts; *Photodermatol. Photoimmunol. Photomed.* **13** (1997) 37-42
- 6 Dean, R.T.; F.U. Shanlin, R. Stocker and M.J. Davies: Biochemistry and pathology of radical-mediated protein oxidation; *Biochem. J.* **324** (1997) 1-18
- 7 Loft, S.; H.E. Poulsen: Cancer risk and oxidative DNA damage in man; *J. Mol. Med.* **74** (1996) 297-312
- 8 Danno, K.; T. Horio, M. Takigawa, S. Imamura: Role of oxygen intermediates in UV-induced epidermal cell injury; *J. Invest. Dermatol.* **83** (1984) 166-168
- 9 Marguery, M.C.: Photodermatoses medicamenteuses; *Rev. Prat.* **50** (2000) 1315-1349
- 10 Bouyssou-Gauthier M.-L.; C. Bédane, S. Boulinguez, J.-M. Bonnetblanc: Photosensitivity with Sulfasalazopyridine Hypersensitivity Syndrome; *Dermatology* **198** (1999) 388-390
- 11 Karrer, S.; C. Eholzer, G. Ackermann, M. Landthaler, R.-M. Szeimies: Phototherapy of Psoriasis: Comparative Experience of Different Phototherapeutic Approaches; *Dermatology* **202** (2001) 108-115
- 12 Markham, T. and P. Collins: Topical 5-aminolaevulinic acid photodynamic therapy for extensive scalp actinic keratoses; *Br. J. Dermatol.* **145** (2001) 502-504

13. Hürlimann, A.F.; G. Hänggi, R.G. Panizzon: Photodynamic Therapy of Superficial Basal Cell Carcinomas Using Topical 5-Aminolevulinic Acid in a Nanocolloid Lotion; *Dermatology* **197** (1998) 248–254
- 14 Kuebler, A.C.; M. Scheer; J.E. Zoeller: Photodynamic therapy of head and neck cancer; *Onkologie* **24** (2001) 230-237
- 15 De Rosa Fernanda, S.; M. Bentley, L.B. Vitoria: Photodynamic therapy of skin cancers: Sensitizers, clinical studies and future directives; *Pharm. Res.* **17** (2000)1447-1455
- 16 Ell, C.; R. Baumgartner, L. Gossner, K. Häußinger, H. Iro, D. Jocham, R.-M. Szeimies: Photodynamische Therapie; *Dt. Ärztebl.* **97** (2000) 3337-3343
- 17 Colussi, V.C.; D.K. Feyes, H. Mukhtar: Perspectives of Photodynamic Therapy for Skin Diseases; *Skin. Pharmacol. Appl. Skin Physiol.* **11** (1998) 336-346
- 18 Bosca, F.; M.A. Miranda: Photosensitizing drugs containing the benzophenone chromophore; *J. Photochem. Photobiol. B* **43** (1998) 1-26
- 19 De Guidi, G.; L.L. Costanzo, L. Laura; G. Condorelli, S. Guiffrida, P. Miano, S. Sortino, A. Velardita : Molecular mechanism of drug photosensitization. X. Membrane photodamage sensitized by fenbufen; *Gazz. Chim. Ital.* **126** (1996) 719-724
- 20 Becker, L.; B. Eberlein-König and B. Przybilla: Phototoxicity of Non-steroidal Anti-inflammatory Drugs: In vitro Studies with Visible Light; *Acta Derm. Venerol. (Stockh)* **76** (1996) 337-340
- 21 Condorelli, G., G. De Guidi, S. Guiffrida and L.L. Costanzo: Photosensitizing action of nonsteroidal antiinflammatory drugs on cell membranes and design of protective systems; *Coord. Chem. Rev.* **125** (1993) 115-128
- 22 Ophaswongse, S. and H. Maibach: Topical nonsteroidal antiinflammatory drugs: allergic and photoallergic contact dermatitis and phototoxicity; *Contact Dermatitis* **29** (1993), 57-64
- 23 Ljunggren, B.: Propionic acid-derived non-steroidal antiinflammatory drugs are phototoxic in vitro; *Photodermatology* **2** (1985) 3-9
- 24 *Schutz des Menschen vor solarer Strahlung*; Information der Strahlenschutzkommission Nr.4 (1998)

-
- 25 *Schutz des Menschen vor den Gefahren der UV-Strahlung in Solarien*; Stellungnahme der Strahlenschutzkommission (2001)
- 26 Heymann E: *Haut, Haar und Kosmetik. Eine chemische Wechselwirkung*; S. Hirzel Verlag Stuttgart (1994)
- 27 Raab,W.: *Lichtfibel : Sonne - Bräunung - Pigmentstörungen*; Fischer-Verlag Stuttgart (1990)
- 28 Ravanat, J.-L.: T. Douki, J. Cadet: Direct and indirect effects of UV radiation on DNA and its components; *J. Photochem. Photobiol. B* **63** (2001) 88-102
- 29 Runger, T.M.; B. Epe and K. Möller: Processing of Directly and Indirectly Ultraviolet-Induced DNA Damage in Human Cells; *Rec. Res. Cancer Res.* **139** (1995) 31-42
30. Afonso, S. G.; R. Enriquez-de-Salamanca, A.M. Batlle: The photodynamic and non-photodynamic actions of porphyrins; *Braz. J. Med. Biol. Res.* **32** (1999) 255-266
- 31 Minami, H.; K. Sato, T. Maeda, H. Taguchi, K. Yoshikawa, H. Kosaka, T. Shiga and T. Tsuji: Hypoxia Potentiates Ultraviolet A-Induced Riboflavin Cytotoxicity; *J. Invest. Dermatol.* **113** (1999) 77-81
- 32 Sato, K.; H. Taguchi, T. Maeda, H. Minami, Y. Asada, Y. Watanabe, K. Yoshikawa: The primary cytotoxicity in ultraviolet-a-irradiated riboflavin solution is derived from hydrogen peroxide; *J. Invest. Dermatol.* **105** (1995) 608-612
- 33 Schmitz, S.; C. Garbe, K. Jimbow, A. Wulff, H. Daniels, J. Eberle and C.E. Orfanos: Photodynamic Action of Ultraviolet A: Induction of Cellular Hydroperoxides; *Recent Results Cancer Res.* **139** (1995) 43-55
- 34 Stary, A.; C. Robert, A. Sarasin: Deleterious effects of ultraviolet A radiation in human cells; *Mutation Res.* **383** (1997) 1-8
- 35 Wiseman, H.; B. Halliwell: Damage to DNA by reactive oxygen and nitrogen species: role in inflammatory disease and progression to cancer; *Biochem. J.* **313** (1996) 17-29
- 36 Gaboriau F.; G.N. Demoulin, I. Tirache, P. Morliere: Involvement of singlet oxygen in ultraviolet A-induced lipid peroxidation in cultured human skin fibroblasts; *Arch. Derm. Res.* **287** (1995) 338-340

-
- 37 Ryter, S.W.; R.M. Tyrrell: Singlet molecular oxygen ($^1\text{O}_2$): A possible effector of eukaryotic gene expression; *Free Rad. Biol. Med.* **24** (1998) 1520-1534
- 38 Schauder, S.: Phototoxic and photoallergic reactions; *Dtsch. Apoth. Ztg.* **132** (1992) 1123-1128
- 39 Bernd, A.; S. Simon, A.R. Bosca, S. Kippenberger, J.D. Alperi, J. Miquel, J.F.V. Garcia, D.P. Mira, R. Kaufmann: Phototoxic effects of Hypericum extract in cultures of human keratinocytes compared with those of psoralen; *Photochem. Photobiol.* **69** (1999) 218-221
- 40 Kamide, R.: Drug-induced photosensitivity – an update; *Photomed. Photobiol.* **21** (1999) 9-10
- 41 Vargas, F.; H. Mendez, J. Sequera, J. Rojas, G. Fraile, M. Velasquez: Phototoxicity induced by $^1\text{O}_2$ generation during the photodegradation of some diuretic drugs; *Toxic Subst. Mech.* **18** (1999) 53-65
- 42 Motten, A.G.; L.J. Martinez, N. Holt, R.H. Sik, K. Reszka, C.F. Chignell, H.H. Tonnesen, J.E. Roberts: Photophysical studies on antimalarial drugs; *Photochem. Photobiol.* **69** (1999) 282-287
- 43 Stern, R.S.: Photocarcinogenicity of drugs; *Toxicol. Lett.* **102-103** (1998) 389-392
- 44 Chance B.; H. Sies, A. Boveris: Hydroperoxide metabolism in mammalian organs; *Physiol. Rev.* **59** (1979) 527-605
- 45 Babior, B.M.; R.C. Woodman: Chronic granulomatous disease; *Semin. Hematol.* **27** (1990) 247-259 (1990)
- 46 Elstner, E. F.: *Der Sauerstoff: Biochemie, Biologie, Medizin; Mannheim; BI-Wiss-Verl. Wien* (1990)
- 47 Lee-Ruff, E.: The organic chemistry of superoxide; *Chem. Soc. Rev.* **6**, (1977) 195-214
- 48 Koppenol, W.H.: The Haber-Weiss cycle - 70 years later; *Redox Report* **6** (2001) 229-234
- 49 Paillous, N.; S. Fery-Forgues: Interest of photochemical methods for induction of lipid peroxidation; *Biochemie* **76** (1994) 355-368
- 50 Chance B.; H. Sies, A. Boveris: Hydroperoxide metabolism in mammalian organs; *Physiol. Rev.* **59** (1979) 527-605

-
- 51 Liochev, S.I.: The mechanism of "Fenton-like" reactions and their importance for biological systems. A biologist's view; *Met. Ions Biol. Syst.* **36** (1999) 1-39
- 52 Dreher, D; A.F. Junod: Differential effects of superoxide, hydrogen peroxide, and hydroxyl radical on intracellular calcium in human endothelial cells; *J. Cell Physiol.* **162** (1995) 147-153
- 53 Gutteridge, J.: Biological origin of free radicals, and mechanisms of antioxidant protection; *Chemo. Biol. Int.* **91** (1994) 133-140
- 54 Acworth, I.N.; M.B. Bogdanov, D.R. McCabe and M. Flint Beal: Estimation of Hydroxyl Free Radical Levels in Vivo on Liquid Chromatography with Electrochemical Detection; *Methods Enzymol.* **300** (1999) 297-313
- 55 Girotti, A.W., J.P. Thomas: Superoxide- and hydrogen peroxide-dependent lipid peroxidation in intact and triton-dispersed erythrocyte membrane; *Biochem. Biophys. Acta* **118** (1984) 474-480
- 56 Halliwell, B.; O. Aruoma: DNA damage by oxygen-derived species. Its mechanism and measurement in mammalian systems; *FEBS* **281** (1991) 9-19
- 57 Davies, K. J.: Oxidative stress: the paradox of aerobic life; *Biochem. Soc. Symp.* (1995) 611-631
- 58 Wright; R.M.; J.L. McManaman, J.E. Repine: Alcohol-induced breast cancer: A proposed mechanism; *Free-Rad. Biol. Med.* **26** (1999) 348-354
- 59 Kawai, Y.; E. Kubota, E. Okabe: Reactive oxygen species participation in experimentally induced arthritis of the temporomandibular joint in rats; *J. dent. Res.* **79** (2000) 1489-1495
- 60 Hayn, M.; K. Kremser, N. Singewald, N. Cairns, M.Nemethova, B. Lubec, G. Lubec: Evidence against the involvement of reactive oxygen species in the pathogenesis of neuronal death in Down's syndrome and Alzheimer's disease; *Life Sci.* **59** (1996) 537-44
- 61 Davies, M.J.; R.J.W. Truscott: Photo-oxidation of proteins and ist role in cataractogenesis; *J. Photochem. Photobiol. B* **63** (2001) 114-125
- 62 Holleman, A.F.; E. Wiberg: *Lehrbuch der Anorganischen Chemie*; de Gruyter Berlin (1985)
- 63 Kamat, J.P.; T.P. Devasagayam: Methylene blue plus light-induced lipid peroxidation in rat liver microsomes: inhibition by nicotinamide (vitamin B3) and other antioxidants; *Chem. Biol. Interact.* **99** (1996) 1-16

- 64 Schafer, M.; C. Schmitz, R. Facius, G. Horneck, B. Milow, K.H. Funken, J. Ortner: Systematic study of parameters influencing the action of Rose Bengal with visible light on bacterial cells: comparison between the biological effect and singlet-oxygen production; *Photochem. Photobiol.* **71** (2000) 514-523
- 65 Spratt, T.E.; S.S. Schultz, D.E. Levy, D. Chen, G. Schluter, G.M. Williams: Different mechanisms for the photoinduced production of oxidative DNA damage by fluoroquinolones differing in photostability; *Chem. Res. Toxicol.* **12** (1999) 809-815
- 66 Viola, G.; G. Miolo, D. Vedaldi, F. Dall'Acqua: In vitro studies of the phototoxic potential of the antidepressant drugs amitriptyline and imipramine; *Farmaco* **55** (2000) 211-218
- 67 Vargas, F.; H. Mendez, E. Tropper, M. Velazquez, G. Fraile: Studies on the in vitro phototoxicity of the antidiabetes drug glipezide; *In. vitr. mol. toxicol.* **13** (2000) 17-24
- 68 Girotti, A.W.: Photosensitized oxidation of membrane lipids: reaction pathways, cytotoxic effects, and cytoprotective mechanism; *J. Photochem. Photobiol.* **63** (2000) 103-113
- 69 Foote, C.S.: Definition of type I and type II photosensitized oxidation; *Photochem. Photobiol.* **54** (1991) 659
- 70 Tønnesen, H.H.: Photostability of Drugs and Drug formulations; Taylor & Francis (1996)
- 71 Girotti, A.W.: Photosensitized oxidation of cholesterol in biological systems: reaction pathways, cytotoxic effects and defense mechanism; *J. Photochem. Photobiol. B* **13** (1992) 105-118
- 72 Rücker, G.; M. Neugebauer, G.G. Willems: *Instrumentelle pharmazeutische Analytik*; WVG Stuttgart (2001)
- 73 Girotti, A.W.: Lipid hydroperoxide generation, turnover, and effector action in biological systems; *J. Lipid Res.* **39** (1998) 1529-1542
- 74 Korytowski, W.; A.W. Girotti: Singlet oxygen adducts of cholesterol: Photogeneration and reductive turnover in membrane systems; *Photochem. Photobiol.* **70** (1999) 484-489
- 75 Girotti A.W.; W. Korytowski: Cholesterol as a singlet oxygen detector in biological systems; *Meth. Enzymol.* **319** (2000), 85-10

-
- 76 Ingelman-Sundberg, M.; H. Kaur, Y. Terelius, J.O. Persson, B. Halliwell: Hydroxylation of salicylate by microsomal fractions and cytochrome P-450. Lack of production of 2,3-dihydroxybenzoate unless hydroxyl radical formation is permitted; *Biochem. J.* **276** (1991) 753-757
- 77 Kalyanaraman, B.; S. Ramanujam, R.J. Singh, J. Joseph, J.B. Feix: Formation of 2,5-Dihydroxybenzoic Acid during the Reaction between $^1\text{O}_2$ and Salicylic Acid: Analysis by ESR Oximetry and HPLC with Electrochemical Detection; *J. Am. Chem. Soc.* **115** (1993) 4007-4012
- 78 Frankel, E.N.: Chemistry of free radical and singlet oxidation of lipids; *Prog. Lipid Res.* **23** (1985) 197-221
- 79 Dahöf, C.G.H.; L.D. Jacobs: Ketoprofen, Paracetamol and placebo in the treatment of episodic tension-type headache; *Ceph.* **16** (1996) 117-123
- 80 Cooper, S.A.; S.B. Gelb, B.M. Cavaliere: An analgesic relative potency assay comparing Ketoprofen and Aspirin in postoperative dental pain; *Adv. Ther.* **6** (1984) 410-418
- 81 Sunshine, A.; I. Zigelboim, E. Laske: A double-blind, parallel comparison of Ketoprofen, Aspirin, and placebo in patients with postpartum pain; *J. Clin. Pharmacol.* **26** (1986) 706-711
- 82 Melisch, D.R.: Ketoprofen, Ibuprofen and placebo in the treatment of primary dysmenorrhoea: A double-blind crossover comparison; *J. Clin. Pharmacol.* **28** (1988) 29-33
- 83 Arnold, J. D.: Ketoprofen, Ibuprofen, and placebo in the relief of postoperative pain; *Adv. Ther.* **7** (1990) 264-275
- 84 Lange, R.; R. Lentz: Comparison of Ketoprofen, Ibuprofen and Naproxen sodium in the treatment of tension-type headache; *Drugs Exptl. Clin. Res.* **3** (1995) 89-96
- 85 Akerlund, M.; P. Strömberg: Comparison of Ketoprofen and Naproxen in the treatment of dysmenorrhoea with special regard to the time of onset of pain relief; *Curr. Med. Res. Opin.* **8** (1989) 485 – 490
- 86 Melisch, D.R.: Double-blind crossover comparison of Ketoprofen, Naproxen, and placebo in patients with primary dysmenorrhoea; *Clin. Pharmaceut.* **5** (1990) 398-409

- 87 Guyonnet, J.C.; L. Julou: Relationship between the inhibitory activity on (RCS) and Prostaglandins Synthesis and the anti-inflammatory activity of Ketoprofen and several other non-steroidal anti-inflammatory agents; *Rheumatol. Rehabil. Suppl* (1976) 11-14
- 88 Ghezzi, P.; G. Melillo, C. Meazza, S. Sacco, L. Pellegrini, C. Asti, S. Porzio, A. Marullo, V. Sabbatini, G. Caselli and R. Bertini: Differential contribution of R and S isomers in Ketoprofen anti-inflammatory activity: role of cytokine modulation; *J. Pharmacol. Exp. Therapeut.* **287** (1998) 969-974
- 89 Kreussler Pharma, Wiesbaden; Wissenschaftliche Basis-Information Gabrilen® Gel (1995)
- 90 Beilage zur Zeitschrift DMW; Deutsche Medizinische Wochenschrift **9** (1997) Heft 3-7
- 91 Rhee, G.J.; J.S. Woo, S.-J. Hwang, Y.W. Lee and C.H. Lee: Topical Oleo-Hydrogel Preparation of Ketoprofen with Enhanced Skin Permeability; *Drug Dev. Ind. Pharm.*: **25** (1999) 717-726
- 92 Cordero, J.A.; L. Alarcon, E. Escribano, R. Obach and J. Domenech: A Comparative Study of the Transdermal Penetration of a Series of Nonsteroidal Antiinflammatory Drugs; *J. Pharm. Sci.*: **86** (1997) 503-508
- 93 Ballerini, R.; A. Casini, M. Chinol, C. Manucci; L. Giaccai, M. Salvi: Study on the absorption of Ketoprofen topically administered in man: Comparison between tissue and plasma levels; *Int. J. Clin. Pharm. Res.* **VI** (1986) 69-72
- 94 Airaksinen, O.; J. Venalainen, T. Pietlainen: Ketoprofen 2,5 % gel versus placebo gel in the treatment of acute soft tissue injuries; *Int. J. Clin. Pharm Ther. Toxicol.* **11** (1993) 561-563
- 95 Noret, A.; V. Roty, N. Allington, P. Hauters, C. Zuinen, R. Poels: Ketoprofen Gel as topical treatment for sport injuries; *Act. Ther.* **13** (1987) 367-378
- 96 Pavlik, G.; F. Gyulai, I. Berkes, Z. Harmath, M. Kozlovsky, R. Link: Kontrollierte Studie von Ketoprofen Gel 2,5 % Economed zum Nachweis der therapeutischen Äquivalenz mit Referenz-Gel bei Sport- und Unfallverletzungen; (1993), persönliche Mitteilung
- 97 Patel, R.K.; P.F. Leswell: Comparison of Ketoprofen, Piroxicam, and Diclofenac Gels in the treatment of acute soft-tissue injury in general practice; *Clin. Ther.* **3** (1996) 495-507
- 98 Matucci-Cerinic, M.; A. Casini: Ketoprofen vs Etofenamate in a controlled double-blind study: Evidence of topical effectiveness in soft tissue rheumatic pain; *Int. J. Clin. Pharm. Res.* **VIII** (1988), 157-160

-
- 99 Otto, J.; W. Krause, I. Hammer, U. Boldt, K. Sommer: Ketoprofen-Gel bei Erkrankungen des Bewegungsapparates Ergebnisse einer bundesweiten Anwendungsbeobachtung; *Z. allg. Med.* **75** (1991) 789-795
- 100 Matsushita, T.; R. Kamide: Five cases of photocontact dermatitis due to topical ketoprofen: photopatch testing and cross-reaction study; *Photodermatol. Photoimmunol. Photomed* **17** (2001) 26-31
- 101 Offidani, A.; A. Cellini, P. Amerio, O. Simonetti, G. Bossi: A case of persistent light reaction phenomenon to ketoprofen?; *Eur. J. Dermatol.* **10** (2000) 153-154
- 102 Sugiura, M.; R. Hayakawa, Y. Kato, K. Sugiura, H. Ueda: 4 cases of photocontact dermatitis due to ketoprofen; *Contact-Dermatitis* **43** (2000) 16-19
- 103 Albes, B.; M.C. Marguery, H.P. Schwarze, F. Journe, F. Loche, J. Bazex: Prolonged photosensitivity following contact photoallergy to ketoprofen; *Dermatology* **201** (2000) 171-174
- 104 Bujan, J.J.; J.M. Morante, M. G. Guemes, J. Del-Pozo-Losada, E. F. Capdevila: Photoallergic contact dermatitis from piketoprofen; *Contact Dermatitis* **43** (2000) 315
- 105 Gracia Bara, M.T.; V. Matheu, A. Pérez Montero, M.P. Díaz Jara, M.I. Martínez Molero, L. Zapatero: Contact photodermatitis due to ketoprofen and piketoprofen; *Alergol. Immunol. Clin.* **14** (1999) 148-150
- 106 Baudot, S.; B. Milpied, C. Larousse: Kétoprofène gel et effets secondaires cutanés: bilan d'une enquête sur 337 notifications; *Thérapie* **53** (1998) 137-144
- 107 Le Coz, C. J.; A. Bottlaender, J.N. Scrivener, F. Santinelli, B.J. Cribier, E. Heid, E. M. Grosshans: Photocontact dermatitis from ketoprofen and tiaprofenic acid: cross-reactivity study in 12 consecutive patients; *Contact-Dermatitis* **38** (1998) 245-252
- 108 Horn, H.M.; F. Humphreys, R.D. Aldridge: Contact dermatitis and prolonged photosensitivity induced by ketoprofen and associated with sensitivity to benzophenone-3; *Contact-Dermatitis*: **38** (1998) 353-354
- 109 Mirande-Romero, A.; A. Ganzález-López, J.I. Esquivias, C. Bajo and M. García-Muñoz: Ketoprofen-induced connubial photodermatitis; *Contact Dermatitis* **37** (1997) 242

- 110 Mozzanica, N.; P.D. Pigatto: Contact and photocontact allergy to ketoprofen: clinical and experimental study; *Contact Dermatitis* **23** (1990) 336-340
- 111 Adamski, H.; L. Benkaflata, Y. Delval, I. Ollivier, S. Le Jean, G. Toubel, I. Le Hir-Garreau and J. Chevrant-Breton: Photodermatitis from non-steroidal anti-inflammatory drugs; *Contact Dermatitis* **38** (1998) 171-173
- 112 Leroy, D.; A. Domp martin, C. Szczurko, M. Michel, S. Louvet: Photodermatitis from ketoprofen with cross-reactivity to fenofibrate and benzophenones; *Photodermatol. Photoimmunol. Photomed.* **13** (1997) 93-97
- 113 Ophaswongse, S.; H. Maibach: Topical nonsteroidal antiinflammatory drugs: allergic and photoallergic contact dermatitis and phototoxicity; *Contact Dermatitis* **29** (1993) 57-64
- 114 Serrano, G.; J.M. Fortea, J.M. Latasa, F. Millan, C. Janes, F. Bosca, M.A. Miranda: Photosensitivity induced by fibric acid derivatives and its relation to photocontact dermatitis to ketoprofen; *J. Am. Acad. Dermatol.* **27** (1992) 204-208
- 115 Monti, S.; S. Sortino, G. De Guidi and G. Marconi: Supramolekular photochemistry of 2(3-benzoylphenyl)propionic acid (Ketoprofen): A study in the β -cyclodextrin cavity; *New J. Chem.* (1998) 599-604
- 116 Boscá, F.; M.L. Marín, M.A. Miranda: Photoreactivity of the Nonsteroidal Anti-inflammatory 2-Arylpropionic Acids with Photosensitizing Side Effects; *Photochem. Photobiol.* **74** (2001) 637-655
- 117 Lhiaubet, V.; F. Gutierrez, F. Penaud-Berruyer, E. Amouyal, J.-P. Daudey, R. Poteau, N. Chouini-Lalanne and N. Paillous: Spectroscopic and theoretical studies of the excited states of fenofibric acid and ketoprofen in relation with their photosensitizing properties; *New J. Chem.* **24** (2000) 403-410
- 118 Cordero, J.A.; L. Alarcon, E. Escribano, R. Obach and J.Domenech: A Comparative Study of the Transdermal Penetration of a Series of Nonsteroidal Antiinflammatory Drugs; *J. Pharm. Sci.* **86** (1997) 503-508
- 119 Monti, S.; S. Sortino, G. De Guidi and G. Marconi: Photochemistry of 2-(3-benzoylphenyl)propionic acid (Ketoprofen). Part I A picosecond and nanosecond time resolved study in aqueous solution; *J. Chem. Soc., Faraday Trans.* **93** (1997) 2269-2275

- 120 Martinez, L.J.; J.C. Scaiano: Transient Intermediates in the Laser Flash Photolysis of Ketoprofen in Aqueous Solution: Unusual Photochemistry for the Benzophenone Chromophore; *J. Am. Chem. Soc.* **119** (1997) 11066-11070
- 121 Radschuweit, A.; Chr. Huschka and H.-H. Rüttinger: Formation of hydrogen peroxide during the UVA induced desintegration of ketoprofen; *Pharmazie* **51** (2000) 782-783
- 122 Radschuweit, A.; H.-H. Rüttinger, P. Nuhn, W. Wohlrab and Chr. Huschka: UV Induces Formation of Hydrogen Peroxide Based on the Photochemistry of Ketoprofen; *Photochem. Photobiol.* **73** (2) (2001) 119-127
- 123 Bosca, F. and M.A. Miranda: Photosensitizing drugs containing the benzophenone chromophore; *J. Photochem. Photobiol. B* **43** (1998) 1-26
- 124 Bosca, F.; M.A. Miranda, Carganico, G. and D. Mauléon: Photochemical and photobiological properties of Ketoprofen associated with the Benzophenone chromophore; *Photochem. Photobiol.* **60** (1994) 96-101
- 125 De la Peña, D.; C. Marti, Nonell, S., Martinez, L.A., Miranda, M.A.: Time-resolved near infrared studies on singlet oxygen production by the photosensitizing 2-arylpropionic acids; *Photochem. Photobiol.* **69** (1997) 828-832
- 126 Cosa, G.; L.J. Martinez and J.C. Scaiano: Influence of solvent polarity and base concentration on the photochemistry of ketoprofen: independent singlet and triplet pathways; *Phys. Chem. Chem. Phys.* **1** (1999) 3533-3537
- 127 Bagheri, H.; V. Lhiaubet, J.L. Montastruc and N. Chouini-Lalanne: Photosensitivity to Ketoprofen Mechanism and Pharmacoepidemiological Data; *Drug Safety* **22** (2000) 339-349
- 128 Bosca, F.; G. Carganico, J.V. Castell, M.J. Gómez-Lechón, D. Hernandez, D. Mauleón, L.A. Martínez, M.A. Miranda: Evaluation of ketoprofen (R, S and R/S) phototoxicity by a battery of in vitro assays; *J. Photochem. Photobiol. B* **31** (1995) 133-138
- 129 Costanzo, L.L.; G. De Guidi, G. Condorelli, A. Cambria and M. Fama: Molecular mechanism of Drug Photosensitization-II. Photohemolysis sensitized by Ketoprofen; *Photochem. Photobiol.* **50** (1989) 359-365
- 130 Chignell, C.F.; R.H. Sik: Magnetic Field effects on the Photohemolysis of Human Erythrocytes by Ketoprofen and Protoporphyrin IX; *Photochem. Photobiol.* Vol. **62** (1995) 205-207

- 131 Eberlein-König, B.; F. Rueff, B. Przybilla: Interaction of ultraviolet-B-rich and ultraviolet-A-rich radiation in ketoprofen-induced photohemolysis; *Photosensitization. Photoimmunol. Photomed.* **12**, (1996) 109-113
- 132 Moser, J.; Z. Sarabia, H. Minter, W.W. Lovell and G.M.J. Beijersbergen van Henegouwen: Photobinding of Ketoprofen in vitro and ex vivo; *Photochem. Photobiol. B*: **58** (2000) 37-45
- 133 Festa, C.; N. Levi-Minzi and M. Zandomenighi: Photochemistry in biological Matrices: Binding site photoreactivity of Ketoprofen in serum albumins and chiral discrimination; *Gaz. Chim. Ital.* **126** (1996) 599-603
- 134 Chuang, V.T.G.; A. Kuniyasu, H. Nakayama, Y. Matsushita, S. Hirono and M. Otagiri: Helix 6 of subdomain III A of human serum albumin is the region primarily photolabeled by ketoprofen, an arylpropionic acid NSAID containing a benzophenone moiety; *Biochem. Biophys. M.* **1434** (1999) 18-30
- 135 Chouini-Lalanne, N.; M. Defais and N. Paillous: Nonsteroidal Antiinflammatory Drug-Photosensitized Formation of Pyrimidine Dimer in DNA; *Biochem. Pharmacol.* **55** (1998) 441-446
- 136 Marguery, M.C.; N. Chouini-Lalanne, J.C. Ader and N. Paillous: Comparison of the DNA Damage Photoinduced by Fenofibrate and Ketoprofen, Two Phototoxic Drugs of Parent Structure; *Photochem. Photobiol.* **68** (1998) 679-684
- 137 Castelli, F.; G. De Guidi, S. Giuffrida, P. Miano, S. Sortino: Molecular mechanism of photosensitization XIII: a combined differential calorimetry and DNA photosensitization study in non steroidal antiinflammatory drugs-DNA interaction; *Int. J. Pharmaceutics* **184** (1999), 21-33
- 138 Lhiaubet, V.; N. Paillous and N. Chouini-Lalanne: Comparison of DNA Damage Photoinduced by Ketoprofen, Fenofibric Acid and Benzophenone via Electron and Energy Transfer; *Photochem. Photobiol.* **74** (2001) 670-678
- 139 Engelhardt, H.; W. Beck, Th. Schmitt: *Kapillarelektrophorese Methoden und Möglichkeiten*, Friedr. Vieweg & Sohn Verlagsgesellschaft mbH, Braunschweig/Wiesbaden (1994)
- 140 Beale, S.C.: Capillary Electrophoresis; *Anal. Chem.* **70** (1998) 279R-300R
- 141 Rüttinger, H.-H.; A. Radschuweit: Determination of peroxides by capillary zone electrophoresis with amperometric detection; *J. Chromatogr.: A* **868** (2000) 127-134
- 142 Terabe, S.; K. Otsuka, K. Ichikawa, A. Tsuchiva, T. Ando; *Anal. Chem.* **56** (1984) 111

- 143 Albrecht, H.O: Über die Chemilumineszenz des Aminophthalsäurehydrazids; *Zeitschrift für physikalische Chemie*, 136 (1928) 321-330
- 144 Brolin, S.; G. Wettermark: *Bioluminescence Analysis*, VCH Weinheim (1992)
- 145 Janasek, D.: *Entwicklung neuer enzymatischer Sensorsysteme mit chemiluminometrischer Signaltransduktion*; Dissertation, Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg (1999)
- 146 Gupta, B. L.; Microdetermination Techniques for H₂O₂ in Irradiated Solutions; *Microchem. J.* **18** (1973) 363-374
- 147 Michaelis, H.W., J.W. Hunt: Determination of peroxides and hydroperoxides in irradiated solutions of nucleic acid constituents and DNA; *Anal. Biochem.* **87** (1978) 135-140
- 148 Radschuweit, A.; H.-H. Rüttinger, P. Nuhn: Capillary zone electrophoresis with electrochemical detection – a simple and effective method to analyze oxygen-consuming and peroxide-forming processes; *J. of Chromatogr. A* **937** (2001) 127-134
- 149 Köhler, Th.: *Beiträge zur Auffindung von Inhibitoren der Phospholipase –A₂*; Dissertation, Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg (1985)
- 150 Pourplanche, C.; V. Larreta-Garde, D. Thomas: Comparison of polarographic and chemical measurements of oxygen uptake in complex media: The example of lipoxygenase reaction; *Anal. Biochem.* **198** (1991)160-164
- 151 Pourplanche, C.; C. Lambert, M. Berjot, J. Marx, C. Chopard, A.J.P. Alix, V. Larreta-Garde: Conformational changes of lipoxygenase (LOX) in modified environments; *J. Biol. Chem.* **269** (1994) 31585-31591
- 152 Mezger, Th.: *Das Rheologie-Handbuch für Anwender von Rotations- und Oszillations-Rheometern*; Vincentz Verlag Hannover (2000)
- 153 BFGoodrich Chemical (Deutschland) GmbH, Carbopol® Wasserlösliche Polymere
- 154 Budac, D.; P. Wan: Photodecarboxylierung: mechanism and synthetic utility: *J. Photochem. Photobiol. A: Chem.*; **67** (1992) 167-172

- 155 Fritsch, P. *Dermatologie*: 3. Auflage; Springer-Verlag Berlin (1990)
- 156 Straface, E.; P.U. Giacomoni, W. Malorni: Cultured cells as a model system for the study of UV-induced cytotoxicity; *J. Photochem. Photobiol.* **63** (2001) 52-60
- 157 Flouvat, B.; A. Roux und B. Delhotel-Landes: Pharmakokinetik von Ketoprofen nach wiederholter perkutaner Applikation beim Menschen; *Arzneim.-Forsch./Drug Res.* **39** (1989) 812-815
- 158 Takano, J.I.; H. Koizumi, A. Ohkawara, N. Kamo, T. Ueda: Ultraviolet action spectra for peroxide generation in human and pig epidermal keratinocytes loaded with dihydrorhodamine 123; *Arch. Dermatol. Res.*; **287** (321-325)
- 159 Nickel, A.: Untersuchungen zum zytotoxischen und zytoprotektiven Potential ausgewählter Radikalfänger an humanen Keratinozyten; Dissertation, Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg (2001)
- 160 Neumann, N. J.; E. Hölzle, P. Lehmann, M. Rosenbruch, A. Klauic and G. Plewig: Photo hen's egg test: a model for phototoxicity; *Br. J. Dermatol.*: **136** (1997) 326-330
- 161 Schauder, S.; A. Schrader, H. Ippen: *Goettinger Liste 1994: Sonnenschutzkosmetik in Deutschland*; Blackwell Wissenschafts-Verl. Berlin (1994)
- 162 Buettner, G.R.: The Pecking Order of Free Radicals and Antioxidants: Lipid Peroxidation, α -Tocopherol, and Ascorbate; *Arch. Biochem. Biophys.* **300** (1993) 535-543
- 163 Heenen, M.; P.U. Giacomoni, P. Golstein: Individual variations in the correlation between erythema threshold, UV-induced DNA damage and sun-burn cell formation; *J. Photochem. Photobiol. B* **63** (2001) 84-87
- 164 Afaq, F.; H. Mukhtar: Effects of solar radiation on cutaneous detoxification pathways; *J. Photochem. Photobiol. B* **63** (2001) 61-69
- 165 Tan, D.X.; L.C. Manchester, R.J. Reiter, W.-B. Qi, M. Karbownik, J.R. Calvo: Significance of Melatonin in Antioxidative Defense System: Reactions and Products; *Biol. Signals Recept.* **9** (2000) 137-159
- 166 Gallarate, M.; M.E. Carlotti, M. Trotta, S. Bovo: On the stability of ascorbic acid in emulsified systems for topical and cosmetic use; *Int. J. Pharm.* **188** (1999) 233-241

-
- 167 Fritsch, C.; K. Lang; W. Neuse, T. Ruzicka, P. Lehmann: Photodynamic Diagnosis and Therapie in Dermatology; *Skin Pharmacol. Appl. Skin. Physiol.* **11** (1998) 358-373
- 168 Ackroyd, R.; C. Kelty, N. Brown and M. Reed: The History of Photodetection and Photodynamic Therapy; *Photochem. Photobiol.* **74** (2001) 656-669
- 169 Muller, K.: Antipsoriatic anthrones: Aspects of oxygen radical formation, challenges and prospects. *General Pharmacol.* **27** (1996) 1325-1335
- 170 Kemeny, L.; T. Ruzicka, O. Braun-Falco: Dithranol: A review of the mechanism of action in the treatment of psoriasis vulgaris; *Skin Pharmacol.* **3** (1990) 1-20
- 171 Drainas, D.; E. Papadimou, A. Monastrili, D. Tsambaos, H.F. Merk: Dose-Dependent inhibition of Ribonuclease P Activity by Anthralin; *Skin Pharmacol. Appl. Skin Physiol.* ; **13** (2000) 128-132
- 172 Merk, H.F.; D.R. Bickers: *Dermatopharmakologie und Dermatotherapie*; Blackwell Wissenschaft Berlin (1992)
- 173 Shephard, S.E. and R.G. Panizzon: Carcinogenic Risk of Bath PUVA in Comparison to Oral PUVA Therapy; *Dermatology* **199** (1999) 106-112
- 174 Steigleder, G.K.: *Therapie der Hautkrankheiten mit Hinweisen zur Differentialdiagnose*; Georg Thieme Verlag Stuttgart (1993)
- 175 Boukamp, P.; R.T. Petrusseksa; D. Breitkreutz, J. Hornung; A. Markham, N.E. Fusenig Normal keratinization in a spontaneously immortalised aneuploid human keratinocyte cell line *J. Cell. Biol.* **106** (1988) 761-771
- 176 Schröder, H., S. Warren, M.J. Bargetzi, S.V. Torti and F.M. Torti N-Acetyl-L-cysteine protects endothelial cells but not L929 tumor cells from tumor necrosis factor- α -mediated cytotoxicity; *Naunyn Schmiedebergs Arch. Pharmacol.* **347** (1993) 664-666
- 177 Weber, E.: *Grundriß der Biologischen Statistik. Anwendungen der mathematischen Statistik in Forschung, Lehre und Praxis*; Gustav Fischer Verlag Jena (1980)

Die vorliegende Dissertationsarbeit entstand am Institut für Pharmazeutische Chemie der Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg.

Herrn Prof. Dr. rer. nat. habil. Peter Nuhn möchte ich an dieser Stelle besonders für die Überlassung des interessanten Themas, seine ständige Diskussionsbereitschaft, die tatkräftige Unterstützung bei verschiedenen Fragestellungen während meiner Promotionszeit und sein stetiges Interesse am Fortgang der Arbeit danken.

Mein Dank gilt in besonderem Maße meinem Betreuer, Herrn Dr. rer. nat. habil. Hans-Hermann Rüttinger, für die in vielen Gesprächen und Diskussionen vermittelten Kenntnisse und Erfahrungen, die intensive Unterstützung bei der praktischen Umsetzung neuer Ideen und nicht zuletzt die mir gewährten Freiheiten bei der Bearbeitung der Aufgabenstellung.

Herrn Prof. Dr. med. Wolfgang Chr. Marsch, Direktor der Universitätsklinik und Poliklinik für Dermatologie und Venerologie danke ich für die fruchtbare Zusammenarbeit mit den Mitarbeitern seiner Klinik.

Mein besonderer Dank gilt in diesem Zusammenhang Herrn Prof. Dr. rer. nat. habil. Wolfgang A. Wohlrab, Leiter der Abteilung Experimentelle Dermatologie, für die großzügige Unterstützung bei der Bearbeitung der toxikologischen und dermatologischen Untersuchungen, die von besonderer Bedeutung für die Praxisrelevanz der Arbeit sind.

Bei Herrn Dr. rer. nat. Christoph Huschka und Frau Ursula Schramm möchte ich mich für die praktische Durchführung der Penetrationsstudien an humaner Haut und die toxikologischen Untersuchungen bedanken. Herrn Dr. Huschka sei darüberhinaus für die hilfreichen Diskussionen zu dermatologischen Fragestellungen gedankt.

Weiterhin möchte ich mich bei Herrn Priv.-Doz. Dr. med. Johannes Wohlrab für die Durchführung des klinischen Pilotversuches zum Einsatz von Ketoprofen bei der photodynamischen Therapie bedanken.

Sehr dankbar bin ich Herrn Dr. rer. nat. Ronald Eberl, Institut für Lebensmittel-Technik und Qualitätssicherung e.V. Köthen, für die Durchführung der Viskositätsmessung sowie die zahlreichen ausgiebigen Diskussionen zu allen Aspekten dieser Arbeit.

Für die gewissenhafte, exakte und schnelle Anfertigung verschiedener Geräte und Zubehörteile danke ich dem Leiter der feinmechanischen Werkstätten des Fachbereichs Pharmazie, Herrn Dieter Reese, und seinen Mitarbeitern.

Ein großes Dankeschön an meine wichtigsten Lektoren Dr. rer. nat. Ronald Eberl, Dr. rer. nat. Heinz Altmann, Dipl.-Pharm. Guntram Drutkowski und Dipl.-Pharm. Olaf Klietsch.

Einen herzlichen Dank richte ich weiterhin an alle hier nicht genannten Mitarbeiterinnen und Mitarbeiter des Fachbereiches Pharmazie der Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg sowie der Arbeitsgruppe "Experimentelle Dermatologie" der Universitätsklinik und Poliklinik für Dermatologie

und Venerologie, die durch ihre fachliche Hilfe und durch ihr freundschaftliches Engagement zum Gelingen dieser Arbeit beigetragen haben.

Mein besonderer Dank gilt meinen Eltern, die mich stets und in jeder Hinsicht unterstützten und so maßgeblich zum Gelingen der Arbeit beigetragen haben.

Lebenslauf

Persönliche Daten

Name: Antje Kathrin Radschuweit
Geburtsdatum: 06. Februar 1974
Geburtsort: Arnstadt
Familienstand: ledig

Schulbildung

1980 - 1990 Zehnklassige Allgemeinbildende Polytechnische Oberschule in Arnstadt
1990 – 1992 Staatliches Gymnasium in Arnstadt

Studium

1992 – 1996 Studium der Pharmazie an der Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg
09.1996 – 03.1997 Anfertigung einer Diplomarbeit an der Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg, Thema: Intestinale Sekretion von Talinolol über das P-Glykoprotein: Untersuchungen zur Relevanz der Talinolol/Verapamil-Interaktion in Ex-vivo- und In-vivo-Absorptions-Untersuchungen an der Ratte
04.1997 - 09.1997 Pharmaziepraktikantin in der Lilien-Apotheke in Halle
11.1997 Erteilung der Approbation als Apotheker
10.1997- wissenschaftlicher Mitarbeiter am Institut für Pharmazeutische Chemie der Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg

Erklärung

Hiermit versichere ich, daß ich die vorliegende Arbeit selbständig und ohne fremde Hilfe verfaßt, keine anderen als die von mir angegebenen Quellen und Hilfsmittel benutzt und die den benutzten Werken wörtlich oder inhaltlich entnommenen Stellen als solche kenntlich gemacht habe.
Die Dissertation wurde bisher an keiner anderen Universität oder Hochschule vorgelegt.

Antje Radschuweit

Halle (Saale), den 19.02.2002