



universität
wien

DIPLOMARBEIT

Titel der Diplomarbeit

„Präklinische Pharmakokinetik von
Anthrachinonderivaten“

verfasst von

Cornelia Oberndorfer

angestrebter akademischer Grad

Magistra der Pharmazie (Mag.pharm.)

Wien, 2014

Studienkennzahl lt. Studienblatt:

A 449

Studienrichtung lt. Studienblatt:

Diplomstudium Pharmazie UniStG

Betreut von:

ao. Univ.Prof. Mag.pharm. Dr.rer.nat. Martin Czejka



Ich erkläre ehrenwörtlich, dass ich die vorliegende Arbeit selbstständig und ohne fremde Hilfe verfasst, andere als die angegebenen Quellen nicht benutzt, die den benutzten Quellen entnommenen Stellen als solche kenntlich gemacht habe und dass diese Arbeit mit der vom Begutachter beurteilten Arbeit übereinstimmt.

Die Arbeit wurde bisher in gleicher oder ähnlicher Form keiner anderen Prüfungsbehörde vorgelegt und auch nicht veröffentlicht.

.....
Cornelia Oberndorfer

Wien, 12.03.2014

Danksagung

Die vorliegende Diplomarbeit wurde an der Division für klinische Pharmazie und Diagnostik an der Fakultät für Lebenswissenschaften der Universität Wien verfasst. Sie entstand im Rahmen eines Projektes zwischen SeaLife Pharma® Tulln und der Universität Wien, unter der Projektleitung von Herrn Professor Dr. Martin Czejka.

Daher möchte ich mich bei Herrn Professor Dr. Martin Czejka für die Bereitstellung des Themas und für die umfangreiche Unterstützung herzlich bedanken.

Vielen Dank auch an die nicht nur fachlich sehr gute Betreuung von Mag. Nairi Baroian, sondern auch für die Bereitschaft alle aufkommenden Fragen zu beantworten.

Außerdem möchte ich mich bei Dr. Alexander Pretsch und Dr. Michael Nagel von SeaLife Pharma® für die rege Diskussion und die Zurverfügungstellung der Testverbindungen bedanken.

Des Weiteren vielen Dank an Dr. Philipp Buchner und der gesamten Division.

Ein großes Dankeschön möchte ich meinem Freund Simon, meiner Familie und meinen Freunden aussprechen, die mich während des gesamten Studiums immer wieder motiviert und unterstützt haben.

INHALTSVERZEICHNIS

1.	Einleitung	1
1.1.	Entwicklung eines neuen Arzneistoffs	1
1.2.	Altersolanole und Anthrachinone	2
1.3.	Bedeutung der Proteinbindung eines Arzneistoffs	3
1.3.1.	Die Plasmaproteinbindung (PPB)	3
1.3.2.	Humanes Serum Albumin (HSA)	4
1.3.3.	Alpha ₁ -saures Glykoprotein (AGP)	4
1.4.	Möglichkeiten zur Auftrennung von Proteinen	5
1.4.1.	Ultrafiltration	5
1.4.2.	Elektrophorese	7
1.4.3.	Gleichgewichtsdialyse	7
1.4.4.	Dichtegradienten-Zentrifugation	7
1.5.	Vergleichsubstanzen	8
1.5.1.	Capecitabin	8
1.5.2.	Diosmin	9
1.5.3.	Doxorubicin	9
1.5.4.	Flavopiridol	10
1.5.5.	Linezolid	10
1.6.	Radikalmessung	11
1.6.1.	Entstehung von freien Radikalen	11
1.6.2.	Pathophysiologie von oxidativem Stress	11
1.6.3.	Schutz gegen die ROS	12
1.6.4.	Testsysteme	12
1.7.	In vivo Versuche	13

1.8.	Rationale	14
2.	Experimenteller Teil	15
2.1.	Chemikalien und Reagenzien	15
2.2.	Geräte und Verbrauchsmaterialien	16
2.3.	Software	18
2.4.	Vorbereitung allgemein	18
2.4.1.	Herstellen der Eluenten	18
2.4.2.	Herstellen verschiedener Lösungsmittel	19
2.4.3.	Herstellen der Waschflüssigkeiten	20
2.5.	Ultrafiltration	20
2.5.1.	Globuline	22
2.6.	Radikalmessung und Bestimmung der AOK	23
2.6.1.	FORT- Free Oxygen Radicals Testing	23
2.6.2.	FORD- Free Oxygen Radicals Defence	24
2.7.	TransilKits	25
2.7.1.	Zubereitung der Stammlösungen	25
2.7.2.	Versuchsdurchführung	26
2.8.	HPLC Analyse	27
2.8.1.	HPLC Anlagen	27
2.8.2.	HPLC Systeme	28
2.9.	In-vivo Proben	29
3.	Ergebnisse und Diskussion	30
3.1.	Ultrafiltration	30
3.1.1.	Chromatogramme	30
3.1.2.	Bindungsrate	33
3.2.	Globulinbindung	34
3.2.1.	Affinität der Bindung zu Globulin	38
3.3.	Bindung an Cholesterol	40
3.4.	TransilKits	40
3.5.	FORT- und FORD-Test	41

3.6.	In-vivo Proben	43
4.	Zusammenfassung	48
5.	Summary	50
6.	Conclusio	51
7.	Literatur	52
8.	Abbildungsverzeichnis	55
9.	Tabellenverzeichnis	57
10.	Anhang	58

1. Einleitung

1.1. Entwicklung eines neuen Arzneistoffs

Die Entwicklung eines Arzneistoffs ist mit viel Zeit und Kosten verbunden. Neue Verbindungen, egal ob chemisch-synthetisch, aus pflanzlichen bzw. tierischen Organismen isoliert oder biotechnologisch hergestellt, werden mit Hilfe von Screening-Verfahren bewertet. Aus mehreren Verbindungen kristallisiert sich ein erfolgversprechender Entwicklungskandidat, ein sogenannter „Lead-Compound“ heraus. In der präklinischen Phase bedient man sich zuerst an in-vitro Modellen, später wird die Substanz auch in-vivo verabreicht. In den Tierexperimenten sollen sicherheitspharmakologische, toxikologische und pharmakokinetische Fragen geklärt werden. Dann erst beginnt die Verabreichung am Menschen. [1]

Die SL-Substanzen, die in dieser Arbeit untersucht werden, sind völlig neue Verbindungen und haben Strukturähnlichkeit zu Anthrachinonen und Altersolanolen.

Ein Lead-Compound, auch als SL5 bekannt, bildete die Grundlage der Forschung.

Durch chemische Modifikation der funktionellen Gruppen in Position 1 und 4 und am linken Phenolring entstanden 13 weitere Verbindungen, die aus patentrechtlichen Gründen im Folgenden mit SL1- SL14 bezeichnet werden. In dieser Arbeit spielen aber hauptsächlich SL1, SL3, SL5, SL6, SL10, SL11 und SL13 eine Rolle. Sie alle zeichnen sich durch die gleiche Grundstruktur aus, siehe Abbildung 1.

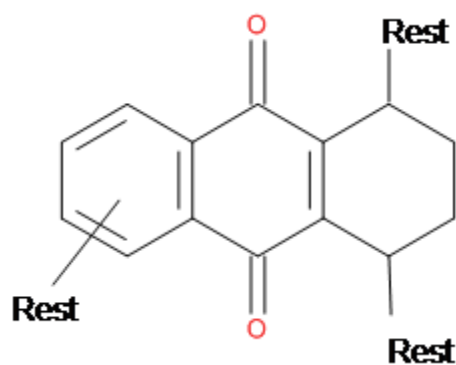


Abbildung 1: Grundstruktur der SL-Substanzen

Die SL-Substanzen wurden entwickelt, um der steigenden Gefahr durch Infektionskrankheiten, die weltweit die zweithäufigste Todesursache darstellen, entgegenzuwirken. Besonders gefährlich sind Keime, wie der MRSA (Methicillinresistenter *Staphylococcus aureus*), die es geschafft haben einen Mechanismus zu entwickeln, der zu einer Antibiotikaresistenz führt.

Die Anforderungen an die neuen Verbindungen liegen darin, nicht nur gegen multiresistente Bakterien zu wirken, sondern auch gegen Pilze, Viren und Krebszellen. Es konnte bereits eine Aktivität gegen gram-positive Bakterien, wie MRSA, *Staphylococcus epidermis*, *Streptococcus pneumoniae*, gram-negative Bakterien, darunter *Escherichia coli* und *Pseudomonas aeruginosa*, sowie respiratorische Viren festgestellt werden. [2]

1.2. Altersolanole und Anthrachinone

Die untersuchten Substanzen haben eine strukturelle Ähnlichkeit mit Anthrachinonen und Altersolanolen. Altersolanol A wurde erstmals 1969 aus dem Schimmelpilz *Alternaria solani* isoliert. Es konnte eine antimikrobielle Wirkung nachgewiesen werden, zusätzlich zu einer Erniedrigung der TNF α -aktivierten NF- κ B Transkription. [2] [3]

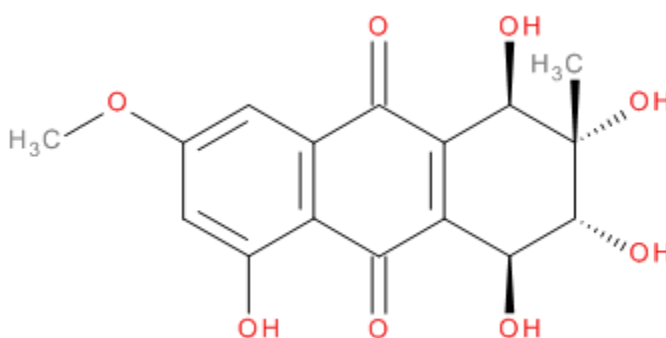


Abbildung 2: Altersolanol A [3]

Altersolanol B, C und E wirken ebenfalls antimikrobiell, für Altersolanol D, E und F war hier keine Aktivität erkennbar. Altersolanol D und E hemmen aber offenbar die Bildung des Biofilms in der Mundhöhle. Für Altersolanol P wurde eine Aktivität gegen *Streptococcus pneumonia*, *Bacillus subtilis*, *Haemophilus influenza*, *Escherichia Coli* etc. nachgewiesen. [2] [4]

Die zytotoxische Wirksamkeit von Anthrachinonen soll durch eine Interkalation im Doppelstrang der DNA zustande kommen. Das führt zu einem Fehler in der Transkription. Wichtig für die Wirkung der unterschiedlichen Derivate sind die entsprechenden Ringsubstituenten. [2]

1.3. Bedeutung der Proteinbindung eines Arzneistoffs

Es gibt kaum einen Arzneistoff, der nicht an Plasmaproteine bindet. Da dies auch Auswirkungen auf die Pharmakokinetik haben kann, ist es wichtig sich bereits in der Entwicklungsphase mit diesem Thema auseinander zu setzen.

1.3.1. Die Plasmaproteinbindung (PPB)

Das menschliche Plasma, das durch Abtrennen der festen Blutbestandteile gewonnen wird, dient zum Transport vieler kleiner Moleküle wie Salze, Lipide, Aminosäuren und Zucker. Die häufigsten Proteine im Serum sind Albumin, Immunglobuline, Transferrin, Haptoglobulin und Lipoproteine. Es wird geschätzt, dass es bis zu 10 000 verschiedene Plasmaproteine gibt. Fast alle Arzneistoffe weisen im Plasma eine reversible Bindung an Proteine, besonders Albumin, auf. Das Bindungsgleichgewicht stellt sich sehr rasch ein. Daher schwankt der gebundene Anteil im therapeutischen Bereich kaum und wirkt wie ein Depot. Dieses Verhalten beeinflusst die Pharmakokinetik des Arzneistoffs, weil der gebildete Komplex durch seine Größe nicht an den Wirkort gelangen, außerdem nicht biotransformiert oder eliminiert werden kann. Faktoren, die das Ausmaß der Bindung ändern können sind Verabreichungsform, Alter, H^+ -Konzentration und die Art der Bindung. [5] [6] [7]

Bei der Konkurrenz um die Bindung an Plasmaeiweiße gewinnt der Arzneistoff mit der größten Affinität. Dadurch erhöht sich der freie Anteil des Arzneistoffs im Plasma, der eine geringere Affinität besitzt. Durch das Ansteigen der Konzentration steigt auch dessen pharmakologische Wirksamkeit. Es kann aber nur dann zu bedeutsamen Wirkänderungen kommen, wenn eine sehr hohe PPB vorliegt. Vom Körper geht nämlich in diesem Fall eine Gegenregulation durch Beschleunigung der Metabolisierung oder Elimination aus. Probleme können hier bei starker Störung der Leber- und Nierenfunktion auftreten. Eine beeinträchtigte Nierenfunktion verlangsamt die renale Elimination. Bei hepatischen Erkrankungen wie Leberzirrhose wird weniger

Serumalbumin produziert, dadurch steigt wiederum der freie Arzneistoffanteil, der im Normalfall gebunden wäre. [7] [8]

Das heißt, wenn ein Arzneistoff zu 98% gebunden und zu 2% frei verfügbar wäre, würde bei einer Proteinstörung, bei der die Bindungsrate auf 96% abfällt, der freie Anteil auf 4% steigen. Somit würde es zu einer Verdopplung der pharmakologischen Konzentration kommen!

Wichtig ist die PPB vor allem beim therapeutischen drug monitoring, wenn ein Patient auf eine bestimmte Plasmakonzentration eingestellt werden muss und bei Anpassung der Dosierung in der Wirkstoffentwicklung. [6]

1.3.2. Humanes Serum Albumin (HSA)

Humanes Serum Albumin (HSA) ist ein Protein, das in der Leber synthetisiert und nur aus Aminosäuren aufgebaut wird. Es ist das häufigste Plasmaprotein im Menschen und kommt beim Gesunden durchschnittlich mit 42 g/l im Serum vor. Albumin ist fast vollständig für die Aufrechterhaltung des kolloidosmotischen Drucks zuständig und bindet in seiner Aufgabe als Transportprotein eine hohe Anzahl an Substanzen, wie z.B.: Hormone, Anionen, Fettsäuren und Arzneistoffe. Eine hohe Affinität haben die sauren Verbindungen Phenytoin und Salicylsäure, obwohl sowohl saure, als auch basische Substanzen binden können. [1] [9] [10]

Albuminwerte sind bei Dehydratation und nach Gabe von Anabolika erhöht. Zu einer Erniedrigung der Albuminkonzentration kommt es bei hepatischen Erkrankungen wie Hepatitis und Leberzirrhose, durch eine verminderte Eiweißproduktion. Außerdem können Mangelernährung, Malabsorption, Flüssigkeitsüberladung, sowie Proteinverlust durch Nieren, Magen, Schwangerschaft, Verbrennungen oder Blutungen Ursache für vermindertes HSA sein. [1]

1.3.3. Alpha₁-saures Glykoprotein (AGP)

Alpha₁-saures Glykoprotein, auch Orosomucoid genannt, ist ein wichtiges Akute-Phase-Protein, das bei Entzündungen, Tumoren, Infektionen oder Herzinfarkt vermehrt in der Leber synthetisiert wird. Die genaue biologische Funktion des Proteins ist nicht bekannt, es werden aber immunmodulatorische Effekte angenommen. AGP hat die Fähigkeit basische und neutrale lipophile Substanzen zu binden. Es können auch saure Verbindungen wie Phenobarbital gebunden werden, obwohl diese vermutlich eine

größere Affinität für Albumin haben. Die Polarität des Liganden und die Konformation des Proteins spielen hier ebenfalls eine Rolle.

AGP kann durch sein Ansteigen in der Akut-Phase zur Diagnostik und Prognose während der klinischen Therapie herangezogen werden. [11]

Ein Arzneistoff kann zusätzlich zur PPB auch an Gewebe binden. Targets sind hier Gewebeproteine und Membranphospholipide. Es besteht kein Zusammenhang zwischen Plasmaprotein- und Gewebebindung, daher kann auch nicht auf die jeweils andere Bindung rückgeschlossen werden. [6]

1.4. Möglichkeiten zur Auftrennung von Proteinen

Im Folgenden werden einige Methoden zur Bestimmung oder Quantifizierung von Proteinen beschrieben:

1.4.1. Ultrafiltration

Die Ultrafiltration ist ähnlich wie die Dialyse eine Methode zur Proteinauftrennung nach Größe. Die speziellen Membranen sind sehr empfindlich und bestehen aus einer engmaschigen oberen Schicht mit bestimmtem Porendurchmesser und einer dicken, permeablen Unterschicht. Es handelt sich um Polymere, die einen synthetischen oder natürlichen Ursprung haben. Entsprechend ihrer Porengrößen bilden sie eine hohe (200 kDa) oder eine niedrige (0,5 kDa) Abschlussgrenze.

Die Trennung kann durch Zentrifugation erfolgen, dafür verwendet man spezielle Einweggefäße z.B.: Ultrafiltrationsröhrchen oder –becher. Es ist möglich innerhalb kurzer Zeit auch geringe Volumen aufzukonzentrieren bzw. zu reinigen. Eine andere Möglichkeit wäre es die Proteine durch Anlegen von Druck aus Stickstoffflaschen oder, wenn sie oxidationsunempfindlich sind, diese mit gereinigter Pressluft durch die Membran zu drücken.

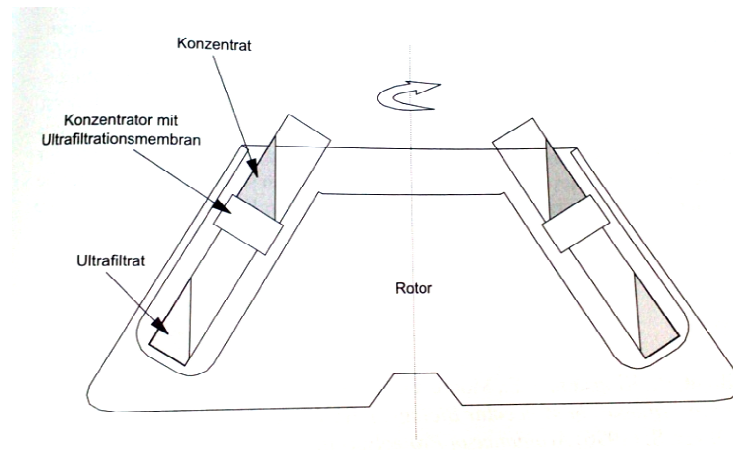


Abbildung 3: Skizze zur Ultrafiltration mit Zentrifugation [12]

Die Ultrafiltration gilt insgesamt als schonende Methode, hat aber den Nachteil, dass es durch die Membran zu einer partiellen Inaktivierung der Proteine kommen kann. Außerdem ist es möglich, dass Substanzen aus der Membran herausgelöst werden und z.B.: bei der HPLC Analyse stören. Mehrmaliges Waschen der Membran soll dies verhindern. Zu einem Problem kann auch werden, wenn die Proteine irreversibel an die Polymere binden und zum Ausbeuteverlust führen. Das kommt besonders oft bei hochkonzentrierten Lösungen vor. Es sollte auch darauf geachtet werden, dass die Membran nicht verstopft. Ein Magnetrührer kann in diesem Fall Abhilfe schaffen. Einsatz findet die Ultrafiltration nicht nur im Bereich der Konzentrierung, sondern kann auch für Umpufferung und Entsalzung verwendet werden. [12]

Es sind verschiedene Modelle im Handel erhältlich, Beispiele für die Ultrafiltration von kleinen Volumina sieht man in Abbildung 4, 5 und 16.

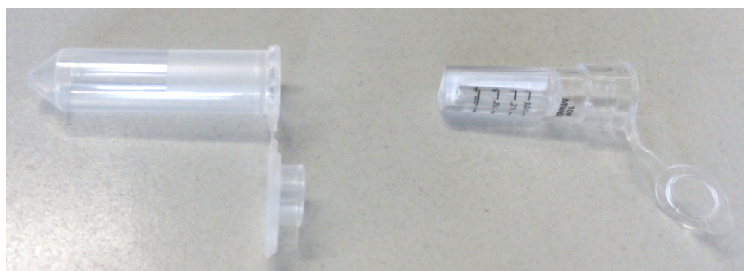


Abbildung 4: Vivaspin

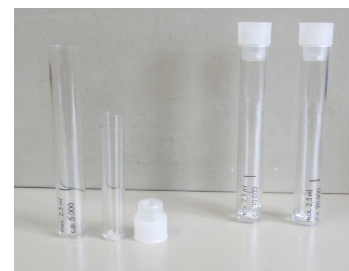


Abbildung 5: Centrisart®

1.4.2. Elektrophorese

Gelöste Proteine lassen sich in einem elektrischen Feld auf Grund ihrer Ladung auftrennen. Positive Ladung bewegt sich in Richtung der Kathode, negative Ladung zur Anode. Agarose oder Polyacrylamid bilden Gele mit Poren, die die Wanderung der Substanzen verlangsamen können. Es entstehen Banden deren Intensität proportional zur Konzentration ist. Sind die Proteine denaturiert, erfolgt die Auftrennung nach der Molekülmasse, bei nativen Proteinen spielt neben der Molekülmasse auch die Konformation und die Teilchenladung eine Rolle. Nach der Entfernung des elektrischen Felds erfolgt das Einfärben z.B.: mit Coomassie-Brillantblau. [12] [13]

1.4.3. Gleichgewichtsdialyse

Die Gleichgewichtsdialyse dient dazu, die Bindung eines Arzneistoffs an ein Makromolekül zu erfassen. Beide befinden sich in einem eigenen Kompartiment und sind durch eine semipermeable Membran getrennt. Die niedermolekulare Substanz kann die Dialysemembran passieren, das Makromolekül nicht. Mit der Gleichgewichtseinstellung, beschleunigt durch Bewegung, endet das Experiment. Im Kompartiment 1 befindet sich die Konzentration des freien Arzneistoffs, im Kompartiment 2 die Konzentration des freien und gebundenen Arzneistoffs. Für die exakte quantitative Analyse muss mit Radioaktivitätsbestimmung oder Messung der Atomabsorption gearbeitet werden.

Probleme treten auf, wenn es zu einer Inaktivierung des Makromoleküls, meist ein Protein, durch zu hohe Temperaturen kommt. Außerdem kann es durch osmotischen Druck zu Volumenveränderung in beiden Kompartimenten kommen. Auch die Konzentration des Makromoleküls kann sich verändern, diese sollte daher vor und nach der Gleichgewichtseinstellung bestimmt werden. [12]

1.4.4. Dichtegradienten-Zentrifugation

Diese Methode dient zur Auftrennung von Proteinen nach ihrer Größe bzw. ihrer Wanderungsgeschwindigkeit. Dazu wird in einem Zentrifugationsröhrchen eine Flüssigkeitssäule hergestellt. Die Dichte des Gradienten steigt zum Boden hin an, dies ist die Grundlage der quantitativen Auftrennung der verschiedenen Komponenten.

Die Probe, mit höherer Dichte als die Gradientenlösung, wird oben aufgetragen. Schwere Teilchen sinken gleich zu Boden, die anderen Bestandteile wandern langsamer.

Der Gradient kann linear oder exponentiell konvex nach Konzentration ansteigen und sollte während der Zentrifugation nicht pelletieren. Als Substanzen können Sucrose, Dextran oder Ficoll eingesetzt werden. Die Sucrose hat den Vorteil, dass sie klein, wasserlöslich, neutral geladen und auch während der Zentrifugation stabil ist. Aber sie hat auch eine hohe Osmolarität, ist daher ungeeignet für die Auftrennung von Zellen. Für DNA und RNA wird ein CsCl-Gradient verwendet. Nach der Zentrifugation müssen die Phasen vorsichtig voneinander getrennt werden: Man kann entweder mit einer peristaltischen Pumpe den Inhalt abpumpen oder bei Zentrifugationsröhrchen aus weichem Material den Boden aufstechen und die einzelnen Fraktionen abtropfen lassen. [12]

1.5. Vergleichsubstanzen

Es wurden bereits Versuche zur Bestimmung der Proteinbindung mit TransilKits durchgeführt. Dabei wurde die Bindung an humanes Serum Albumin, Plasmaproteinbindung, α 1-saures Glykoprotein, sowie die mikrosomale und intestinale Bindung untersucht. Um die durchgeführten Versuche zur Bestimmung der Proteinbindung besser bewerten zu können, wurden neben den SeaLife Substanzen SL1- SL13 fünf weitere, bereits bekannte und in der Praxis verwendete Verbindungen unter den gleichen Bedingungen untersucht.

1.5.1. Capecitabin

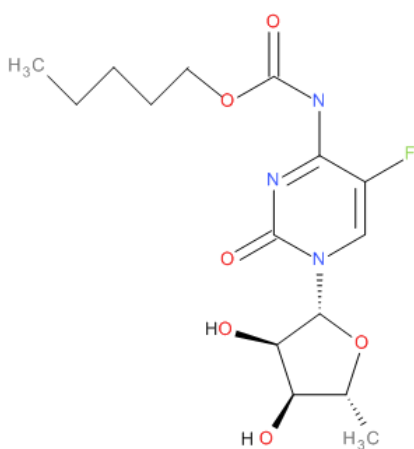


Abbildung 6: Capecitabin

IUPAC Name: Pentyl N-{1-[(2R,3R,4S,5R)-3,4-dihydroxy-5-methyloxolan-2-yl]-5-fluoro-2-oxo-1,2-dihydropyrimidin-4-yl} carbamate

Summenformel: C₁₅H₂₂FN₃O₆

Anwendungsgebiet: Zytostatikum

Proteinbindung: < 60% (hauptsächlich Albumin)

Capecitabin wurde wegen seiner relativ niedrigen Proteinbindung als Vergleichssubstanz gewählt. Das Prodrug findet Anwendung in der Therapie von metastasierendem Brustkrebs oder zur unterstützenden Therapie von Colonkarzinom. [14]

1.5.2. Diosmin

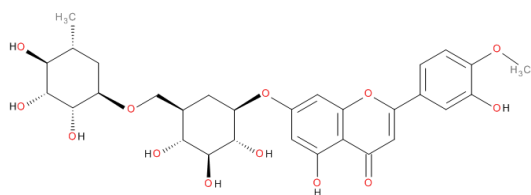


Abbildung 7: Diosmin

IUPAC Name: 5-hydroxy-2-(3-hydroxy-4-methoxyphenyl)-7-[(2S,3R,4S,5S,6R)-3,4,5-trihydroxy-6-[[[(2R,3R,4R,5R,6S)-3,4,5-trihydroxy-6-methyloxan-2-yl]oxy methyl] oxan-2-yl]oxychromen-4-one

Summenformel: C₂₈H₃₂O₁₅

Anwendungsgebiet: Antioxidans

Proteinbindung: 30% [15]

Die Strukturähnlichkeit zu den Anthrachinonderivaten erklärt den antioxidativen Effekt, daher wird Diosmin auch bei Venenerkrankungen eingesetzt. [16] [17]

1.5.3. Doxorubicin

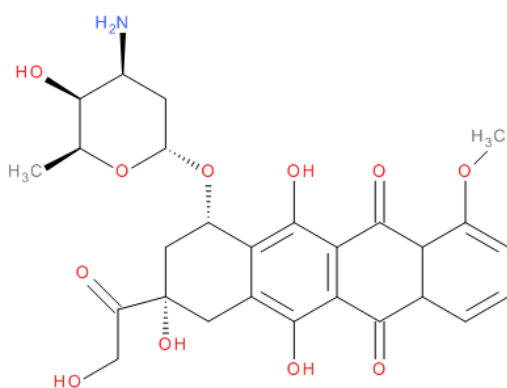


Abbildung 8: Doxorubicin

IUPAC Name: (8S,10S)-10-{{[(2R,4S,5S,6S)-4-amino-5-hydroxy-6-methyloxan-2-yl]oxy}}-6,8,11-trihydroxy-8-(2-hydroxyacetyl)-1-methoxy-5,7,8,9,10,12-hexahydrotetracene-5,12-dione

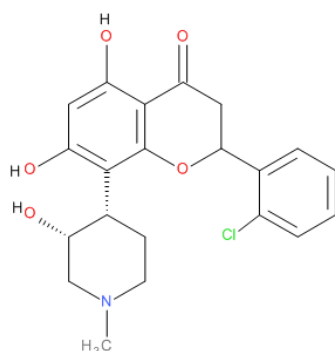
Summenformel: C₂₇H₂₉NO₁₁

Anwendungsgebiet: Zytostatikum

Proteinbindung: 74- 76%

Doxorubicin wurde durch die strukturelle Verwandtschaft zu den SeaLife Verbindungen ausgewählt. Es wird eingesetzt zur Bekämpfung von Brustkrebs, Ovarialkarzinom, Magenkrebs, bei Morbus Hodgkin etc. Negativ an dieser Substanz ist die Fähigkeit zur Superoxid-Radikalbildung, das kann kardiotoxische Nebenwirkungen zur Folge haben. [2] [18]

1.5.4. Flavopiridol



IUPAC Name: 2-(2-chlorophenyl)-5,7-dihydroxy-8-[(3S,4R)-3-hydroxy-1-methylpiperidin-4-yl]-4H-chromen-4-one

Summenformel: C₂₁H₂₀ClNO₅

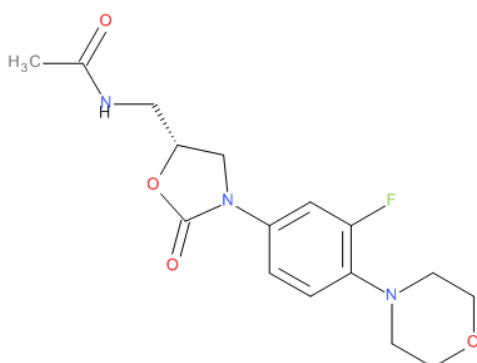
Anwendungsgebiet: Zytostatikum

Abbildung 9: Flavopiridol

Proteinbindung: 93-96% [19]

Wegen der Struktur-Ähnlichkeit zu den Anthrachinonen wurde Flavopiridol ausgewählt. Es hemmt die Cyclin-abhängige Kinase, was eine Apoptose in nicht-kleinen Lungenkrebszellen zur Folge hat. [20]

1.5.5. Linezolid



IUPAC Name: N-{[(5S)-3-[3-fluoro-4-(morpholin-4-yl)phenyl]-2-oxo-1,3-oxazolidin-5-yl]methyl}acetamide

Summenformel: C₁₆H₂₀FN₃O₄

Anwendungsgebiet: Antibiotikum

Proteinbindung: 31%

Abbildung 10: Linezolid

Linezolid hat eine sehr niedrige Proteinbindung und wirkt antibiotisch gegen *Staphylococcus aureus* und einige Streptokokken. [21]

1.6. Radikalmessung

Obwohl Sauerstoff lebenswichtig für den Menschen ist, können aus diesem freie Radikale entstehen, die für uns gefährlich werden können. Sie beschleunigen Alterungsprozesse und sind mitverantwortlich für die Entstehung von Krankheiten, indem sie wichtige Zellen wie DNA, RNA, Lipide oder Proteine angreifen. [22]

1.6.1. Entstehung von freien Radikalen

ROS (reactive oxygen species) sind definiert als Moleküle oder Molekülfragmente, die mindestens ein ungepaartes Elektron besitzen. Dieses einfache Elektron der Superoxidionen ist für den Grad der Reaktivität verantwortlich. $O_2^- \cdot$ entstehen durch metabolische Prozesse oder physikalische Irritation eines Sauerstoffaktivators. Man spricht von „primären ROS“, die durch weitere Interaktionen mit Molekülen „sekundäre ROS“ entweder direkt oder indirekt durch enzym- oder metall-katalysierte Prozesse generieren können. Auch durch die Zellatmung der Mitochondrien entstehen durch Ablauf der Oxidationskette freie Radikale. Erhöhte Radikalwerte wurden bei Einnahme von Hormonen (orale Kontrazeptive, Hormonersatztherapie) und Chemotherapie festgestellt. [23] [24] [25]

1.6.2. Pathophysiologie von oxidativem Stress

Ein Ungleichgewicht zwischen Radikalwerten und antioxidativer Defens nennt man oxidativen Stress. Unter einer hohen Konzentration von oxidativem Stress werden manche Zellen abgebaut oder nekrotisch. Unglücklicherweise führt eine Nekrose zu einer vermehrten Immunantwort und kann umliegendes Gewebe und Zellen zerstören. Eine weitere Inflammation ist evtl. auch bedeutend für die Entstehung von Autoimmunkrankheiten, wie Rheumatoide Arthritis und Lupus. Oxidativ-induzierte Nekrose spielt auch eine wichtige Rolle im Zusammenhang mit Herzinfarkt, Schlaganfall, Makuladegeneration und Ischämischer Kolitis. Außerdem scheint es einen Zusammenhang zwischen Radikalen und altersbedingten Krankheiten wie Parkinson, Alzheimer und Sarkopenie, also fortschreitendem Muskelabbau, zu geben. ROS sind

aber nicht nur schädlich für den Körper, in einer niedrigen Konzentration spielen sie eine wichtige Rolle bei der Immunabwehr oder in der Signaltransduktion. [22] [23]

1.6.3. Schutz gegen die ROS

Die Abwehr gegen radikal-induzierten oxidativen Stress beinhaltet Prävention, Reparaturmechanismen, sowie physikalische oder antioxidative Abwehr. Unter normalen Bedingungen ist das Gleichgewicht zwischen Radikalen und antioxidativer Kapazität (AOK) ausgeglichen, weil das wichtig für das Überleben und die Gesundheit des Organismus ist. [23]

Antioxidative Verbindungen werden als Radikalfänger bezeichnet, weil sie direkt mit dem oxidativen Agens reagieren und dieses ungefährlich machen. Vitamin E (α -Tocopherol) ist das häufigste membrangebundene Antioxidans, Vitamin C (Ascorbinsäure) ist die wichtigste wasserlösliche Verbindung. Weitere wasserlösliche Radikalfänger sind Harnsäure, Gluthation und Ceruloplasmin. Harnsäure, das Endprodukt im menschlichen Purin Metabolismus, ist zusätzlich noch ein Chelatbildner für Metalle. Durch das Binden von Eisen und Kupfer hemmt es oxidative Reaktionen, ohne selbst oxidiert zu werden. Eine wichtige Rolle bei der antioxidativen Abwehr spielen auch die fettlöslichen β -Carotine und Ubichinone. Der Körper kann zudem selbstständig antioxidative Enzyme herstellen z.B.: Superoxid-Dismutase. Dieses Enzym kann aus $O_2^{\cdot -} + O_2^{\cdot -} \rightarrow H_2O_2 + O_2$ herstellen. H_2O_2 kann dann mittels Glutathion-Peroxidase und Katalase zu Wasser und O_2 entgiftet werden. [22]

1.6.4. Testsysteme

Die direkte Messung der ROS ist wegen der oft geringen Konzentration und der kurzen Halbwertszeit nicht ganz einfach. Zwei direkte Messmethoden, die Chemolumineszenz und vor allem die EPR (electron paramagnetic resonance) Spektroskopie, sind zeit- sowie arbeitsaufwendig. Daher greift man meist auf eine indirekte Messung z.B.: über konjugierte Diene, Hydroperoxide, TBARS (thiobarbituric acid reactive substances), kurzkettiges Hydrocarbonat und oxidierte Nucleoside zurück. In dieser Arbeit wurde der FORT-Test (free oxygen radicals test) verwendet. Hier werden indirekt die Hydroperoxid Konzentrationen gemessen, indem Metalle als Katalysator für freie Radikale in einem sauren Milieu eingesetzt werden. Diese Radikale greifen das Chromogen N,N-diethyl-para-phenylendiam an und bewirken eine Farbveränderung.

Mittels FORM-Gerät wird die Absorption bei 505 nm gemessen. Das Ergebnis wird in zwei Einheiten angegeben: 1 FORT Unit entspricht 0,26 mmol/l H_2O_2 . Der Referenzwert liegt hier bei < 310 FORT U (oder bei < 2,35 mmol/l H_2O_2). [24] [26] [27]

Zur Erfassung der antioxidativen Kapazität gibt es zwei Optionen: Man kann radikalinduzierende Substanzen verwenden und ihren Effekt auf ein exogenes, oxidierbares Substrat erfassen. Beispiele dafür sind der TRAP-Test, ORAC-Test, DCFH-DA-Test und Phycoerythrin-Test. Die AOK kann dann durch die lag-Phase, die AUC oder durch die kinetische Hemmung ermittelt werden. Bei der zweiten Möglichkeit wird ein stabiles Radikal (kein ProOxidanz) mit der zur testenden Probe versetzt und der Verlust von Farbtintensität gemessen, wie beim TEAC-Test. [27] [28]

Für diese Arbeit wurde der FORD-Test verwendet, der als erster Soforttest auf diesem Gebiet gilt. In einer sauren Umgebung entsteht mittels Eisenlösung als Oxidationsmittel und dem ungefärbten Chromogen 4-Amino-N,N-diethylanilinsulfat ein stabiles, gefärbtes Radikalkation. Dieser Leerwert wird mittels FORM-Messgerät photometrisch bei 505 nm bestimmt. Nach Zugabe der Probe entfärbt sich das Radikalkation proportional zur AOK. Durch erneutes Vermessen bekommt man das Ergebnis in Bezug auf Trolox (= ein Zellerivat von Vitamin E mit starken antioxidativen Eigenschaften). Der Referenzwert für den Menschen liegt bei 1,07-1,53 mmol/l Trolox. [27]

1.7. In vivo Versuche

Ein wesentlicher Teil präklinischer Untersuchungen stellt die erstmalige Verabreichung einer Testsubstanz an einem kleinen Versuchstierkollektiv dar. Bis dato wurden die SL-Substanzen an 10 Ratten, 11 Meerschweinchen und 3 Mäuse angewendet. Diese Tierversuche liefern entscheidende Vorinformationen, können aber nie zu 100% auf den Menschen übertragen werden. Wichtig für solche Modelle ist natürlich auch die Verabreichungsart (peroral, intravenös,...) und die Dosierung. Hier sollte darauf geachtet werden, dass die Tiere nicht unnötig gequält werden. [1]

1.8. Rationale

Ziel der Diplomarbeit ist es, die SL Substanzen auf ihre Bindungsaffinität zu Organen, Globulinen und Cholesterol mit Hilfe der Methode der Ultrafiltration und den Transil Kits^{XL} zu untersuchen.

Außerdem sollte die Radikalbildung bzw. die antioxidative Kapazität der Substanzen in den Organen Herz, Leber, Niere und in Tierproben gemessen werden.

2. Experimenteller Teil

2.1. Chemikalien und Reagenzien

Tabelle 1: Analysierte Substanzen

Substanzen	Chargennummer	Herstellungsfirma
SL1, SL3, SL5, SL6, SL10, SL11, SL13		SeaLife Pharma®
Capecitabin	Lot No: RC09126135	Roche
Diosmin	Lot No: #SLBC3987V	Sigma-Aldrich
Doxorubicin	Chargennr.:40157001	Ebewe Pharma (Novartis)
Flavopiridol	F 3055	Sigma- Aldrich
Linezolid	Lot No: H620M4707V	Sigma-Aldrich

Tabelle 2: Verwendete Chemikalien und Reagenzien

Chemikalien	Typ	Herstellungsfirma
Acetonitril	LiChrosolv	Merck KG
Aqua bidestillata		Department für Pharmakognosie, Universität Wien
Cholesterol	Lot D9	Serva Feinbiochemica GmbH&Co
Dimethylsulfoxid	D8418 (100 ml)	Sigma-Aldrich
	D8418 (50ml)	Sigma-Aldrich
	M8, 180-2	Sigma-Aldrich
FORD Reagentien	R1= Chromogen	Callegari
	R2= Puffer	Callegari
FORT Reagentien	C1= Chromogen	Callegari
	S1= Hyperosmoarer Puffer	Callegari
	S2= Acetat Puffer pH 5,2	Callegari
	S3= Eisenlösung	Callegari
Globuline	Cohn fraction human	Sigma-Aldrich

KH ₂ PO ₄	99%	Sigma-Aldrich
Methanol		Merck KG
Phosphatpuffer pH-Wert 7,4	10 mmol NaHPO ₄ / H ₃ PO ₄	Sigma- Aldrich
Phosphorsäure 8,5%		Sigma- Aldrich

2.2. Geräte und Verbrauchsmaterialien

Tabelle 3: Verwendete Geräte und Materialien

Geräte und Materialien	Typ	Herstellungsfirma
Analysenwaage	Sartorius H110	Sartorius Mechatronics Austria GmbH
Caps (HPLC)	8-SC	CHROMACROL®
Decapper		Micronic
Edelstahlkugeln	D5, 250 g	IKA®-Werke GmbH & Co. KG
Einmal-Latexhandschuhe	Class 1, AQL 1,5	VWR International
Eppendorf Gefäße	Micro Tubes, Plastibrand, 1,5 ml	BRAND GmbH, Deutschland
Eppendorf Pipetten (verschiedene Größen)		Research Plus
Extraktionsgefäß	IKA Tube, 20ml Pat. Pend.	IKA®-Werke GmbH & Co. KG
Finnpipette	Digital 2-10ml	
FORM Messgerät	CR 3000	Callegari
Gewebehomogenisator	IKA Ultra Turrax®, Tube Drive Control	IKA®-Werke GmbH. & Co. KG
Kühlschrank		
Magnetrührer	MR 300 1 K	Heidolph Instruments GmbH & Co. KG
Mikroeinsätze		biolab

Mikropipetten	Eppendorf Research 2-20 μ l, 2-200 μ l, 10-100 μ l, 100-1000 μ l	Eppendorf A
Mini-Shaker	Vortex Mixer	VELP® SCIENTIFICA
Parafilm	Laboratory Film „M“	Bemis Company, Neenah
Pasteurpipette aus Glas	150 mm Gesamtlänge	Assistent, Deutschland
Pasteurpipette aus Glas	150 mm Gesamtlänge	VWR
Pasteurpipette aus Plastik	153 mm, LOT 09	Serobac HandelsgmbH
pH-Meter	ORION 2 STAR pH Benchtop	Thermo Scientific
Pipettensauger		
Pipettenspitzen	Universal blue Tipps, 50-1000 μ l	VWR® INTERNATIONAL
Pipettenspitzen	Universal yellow Tipps, 2-200 μ l	VWR® INTERNATIONAL
Pipettenspitzen	Finntip 63 for volume range 2-10 ml	Thermo Scientific®
Plate Shaker	Mix Mate PCB-11	Eppendorf
Reagenzgläser	100 x 16 mm	Assistent, Deutschland
Rinderleber		Lebensmittelhandel
Schweineherz		Lebensmittelhandel
Schweineleber		Lebensmittelhandel
Schweineniere		Lebensmittelhandel
Septum für Sampler Fläschchen (HPLC)	8-ST15	CHROMACROL® (biolab)
HPLC- Fläschchen		biolab
Sezierbesteck		Labor Siebert
Tiefkühlschrank	UF755G	Dometic
Transil® AGP Bindung Kit	Lot No: PSNR	Sovicell
Transil® HSA Bindung Kit	Lot No: DJCN	Sovicell
Transil® PPB Bindung Kit	Lot No: GHKU	Sovicell
Ultraschallbad	BANDELIN SONOREX RK 510	BANDELIN electronic GmbH Co. KG

Waage	Sartorius M-prove AY612	Sartorius Mechatronics Austria GmbH
Vials (HPLC)	p336	CHROMACROL®
Zentrifuge	Labofuge 400 FUNCTION Line	Heraeus Instruments GmbH
Zentrifuge (Küvetten)	Incomat, 6000/2, S.P.A.	Catellani

2.3. Software

Zur Interpretation und Auswertung der Ergebnisse wurden folgende Programme verwendet:

- Microsoft® Office Excel
- Microsoft® Office Word
- Transil Kits^{XL} Sovicell (Validierungs- und Anleitungsoftware)
- GraphPad Prism 5.0

2.4. Vorbereitung allgemein

Bevor mit der Analyse der Substanzen begonnen werden kann, müssen einige Vorkehrungen getroffen werden.

2.4.1. Herstellen der Eluenten

- **Eluent isokratisch 1 (iso1)**

Acetonitril und Wasser im Verhältnis 60:40 (V/V) mischen. Man beginnt damit 0,8g KH₂PO₄ (Aldrich) in 800 ml destilliertem Wasser zu lösen. Der Lösungsvorgang kann beschleunigt werden, wenn ein Magnetrührer eingesetzt wird. Dann mit dem pH-Meter durch langsames Zugeben von 8,5%iger Phosphorsäure auf pH 4,4 bringen. 1200 ml Acetonitril zugeben und für ca. 30 Minuten auf dem Ultraschallbad entgasen.

- **Eluent isokratisch 2 (iso2)**

Acetonitril und Wasser im Verhältnis 40:60 (V/V) mischen, auf pH 4,4 einstellen, 400 ml Acetonitril zugeben und auf dem Ultraschallbad entgasen. Die pH-Wert-Einstellung erfolgt auf gleicher Weise wie bei isokratisch 1.

- **Eluent für Capecitabin (CCB)**

Bei diesem Eluenten wird eine Mischung von Methanol und Wasser im gleichen Verhältnis 50:50 (V/V) zubereitet und entgast.

- **Eluent für Doxorubicin**

0,5g KH_2PO_4 in 500 ml destilliertem Wasser lösen. 250 ml Acetonitril und 250 ml Methanol zugeben und entgasen.

- **Eluent für Linezolid**

Na-Monoacetat in Wasser lösen, damit eine Konzentration von 0,5 g/ml entsteht. 750 ml destilliertes Wasser werden mit dieser Lösung mittels pH-Meter und Magnetrührer auf pH 4 eingestellt. Den Eluenten entgasen.



Abbildung 11: pH-Meter



Abbildung 12: Ultraschallbad

2.4.2. Herstellen verschiedener Lösungsmittel

- **PBS (Phosphate buffered saline) Puffer**

Eine Tablette „phosphat buffered tablet“ in 200 ml destilliertem Wasser lösen, danach gut durchschütteln.

- **Dimethylsulfoxid (DMSO)- Lösungen**

Es wurden DMSO-Lösungen in verschiedenen Konzentrationen verwendet: 5%, 32% und 60%

Dazu 100%-ige DMSO-Lösung im gewünschten Verhältnis mit PBS versetzen.

2.4.3. Herstellen der Waschflüssigkeiten

- **Waschflüssigkeit bei Proben mit Acetonitril:** 20 Teile H₂O mit 80 Teilen ACN versetzen
- **Waschflüssigkeit bei Proben mit Methanol:** 20 Teile H₂O mit 80 Teilen MeOH versetzen

2.5. Ultrafiltration

2 g des zerkleinerten Organs (Herz, Leber, Niere) werden gemeinsam mit 3 Metallkugeln in ein Ultraturraxgefäß gegeben. Mit fünf-prozentiger DMSO wird auf 10 g auffüllen und für 2 min bei 4000 U/min homogenisieren.



Abbildung 13: Ultraturraxgefäß

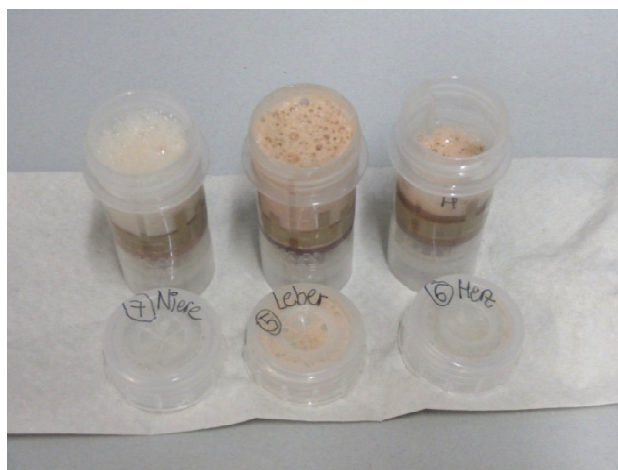


Abbildung 14: Gefäße mit Organen befüllt

SL in 32% DMSO lösen, damit eine Lösung von 1 g/ml bzw. 1000 µg/ml entsteht. 1000 µl dieser Stammlösung in das Homogenisat geben und für 1 min bei 4000 U/min durchmischen. Danach wird die erste Probe gezogen. 15 min und 30 min nach Zugabe der Stammlösung werden weitere Proben mit dem gleichen Volumen entnommen. Für die Ultrafiltration werden hauptsächlich die 15 min-Werte und als zugehörigen Standard eine verdünnte Stammlösung verwendet. Zirka 200 µl des Homogenisats werden in Eppendorfs zentrifugiert und 100 µl des Überstands entnommen.

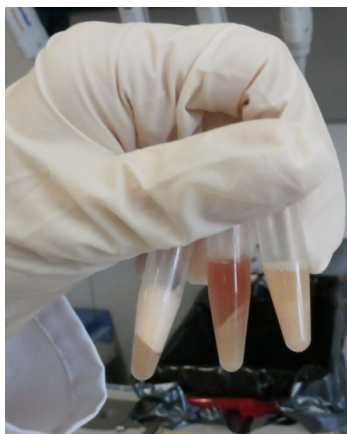


Abbildung 15: Homogenisat nach der Zentrifugation

Diese 100 μ l werden dann für die Ultrafiltration verwendet. Davor werden die Nanosep® zweimal mit 100 μ l PBS ausgewaschen und getrocknet. Dabei sollte darauf geachtet werden, dass die empfindliche Membran nicht austrocknet. 100 μ l des Überstands in die Nanosep® füllen.



Abbildung 16: Nanosep®

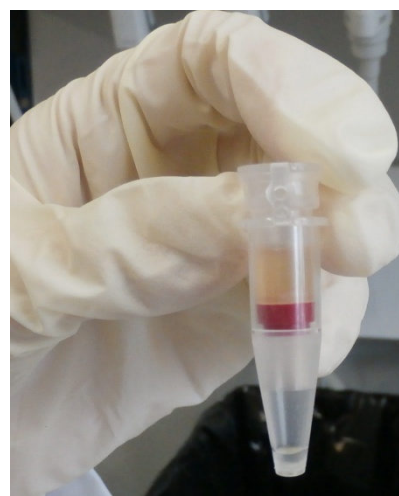


Abbildung 17: Befülltes Nanosep®

Für 30 min bei 12000 U/min zentrifugieren, bis der Überstand möglichst vollständig filtriert wurde. Das Filtrat wird dann 1:1 mit Acetonitril verdünnt, um die Proteine auszufällen. Diese Probe wird dann in Mikroeinsätze gefüllt und mittels HPLC analysiert.

2.5.1. Globuline

Globuline in PBS suspendieren, damit eine Konzentration von 4 mg/ml entsteht.



Abbildung 18: Globuline in PBS

Die Suspension wird in fünf verschiedenen Konzentrationen weiterverarbeitet, wie in Tabelle 4 dargestellt.

Tabelle 4: Pipettierschema Globuline

Konzentration	Stammlösung	Globuline	PBS
100 µg/ml	50 µl	450 µl	0 µl
50 µg/ml	25 µl	450 µl	25 µl
24 µg/ml	12 µl	450 µl	38 µl
10 µg/ml	5 µl	450 µl	45 µl
4 µg/ml	2 µl	450 µl	48 µl

Die Globulinmischungen werden in den gewaschenen Nanosep ultrafiltriert. Das Filtrat wird 1:1 mit Acetonitril versetzt und dann mit der HPLC bestimmt.

Die Ultrafiltration mit Cholesterol wird nach dem gleichen Schema wie die Globuline durchgeführt.

2.6. Radikalmessung und Bestimmung der AOK

Für diese Bestimmung von ROS und AOK wird wieder der 15-min-Wert der Organe (Herz, Leber, Niere) nach der Homogenisation im Ultraturraxgefäß verwendet. Vermessen werden die Proben dann mit dem FORM-Messgerät.



Abbildung 19: FORM-Messgerät

2.6.1. FORT- Free Oxygen Radicals Testing

Normalerweise wird für den FORT-Test menschliches Blut und ein Volumen von 20 μl verwendet. Da die SL Substanzen eine so geringe Radikalbildung aufweisen und die Ergebnisse außerhalb des Referenzbereichs liegen, wurde das verwendete Volumen auf 40 μl verdoppelt.



Abbildung 20: FORT-Test

40 µl des Homogenisats in das Eppendorf mit dem Reagenz FORT R2 geben und vortexen. Den Inhalt in die Küvette FORT R1 geben und schwenken. Die Küvette für eine Minute bei 35 000 U/min zentrifugieren. Danach wird die Küvette in das FORM-Messgerät eingesetzt und gemessen. Um das Ergebnis an das verwendete Volumen anzupassen, muss es anschließend halbiert werden.

2.6.2. FORD- Free Oxygen Radicals Defence

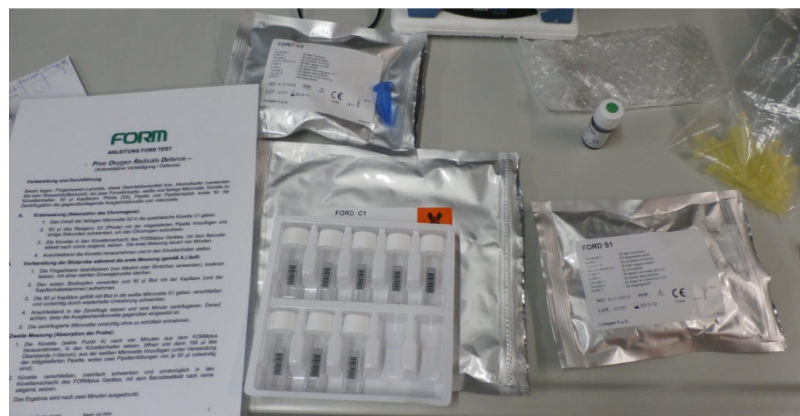


Abbildung 21: FORD Test

Für den FORD-Test wird normalerweise ein Blutvolumen von 50 µl verwendet, auch hier musste das Volumen wieder angepasst werden, nämlich auf 12,5 µl.

Für die Versuchsdurchführung wird das Reagenz S2 in eine Küvette C1 gegeben. Die Küvette verschließen und einige Sekunden schwenken, bis sich das Chromogen auflöst. Die Küvette in das Messgerät einsetzen.

In der Zwischenzeit können 12,5 µl des Homogenisats in das Eppendorf S1 pipettiert und der gesamte Inhalt gevortext werden. Eine Minute bei 3500 U/min zentrifugieren und 100 µl des Überstands in die bereits vermessene Küvette geben. Die Küvette wird ein zweites Mal in das Messgerät gestellt. Die erhaltenen Werte müssen wieder an das verwendete Volumen angepasst und mit 4 multipliziert werden.

2.7. Transil Kits^{XL}

Die Transil Kits^{XL} sind eine validierte Methode zur Bestimmung der Proteinbindungsrate. Es können PPB, HSA, AGP, sowie intestinale und mikrosomale Bindung bestimmt werden. In dieser Arbeit wurden PPB, HSA und AGP untersucht.

Die Plasmaproteine, Albumin oder α_1 -saures Glykoprotein liegen immobilisiert in Silikatkügelchen zusammen mit Phosphatpuffer pH 7,4 vor. Es gibt 8 verschiedene Wells, wobei das erste und das letzte als Referenzen dienen und nur mit Puffer gefüllt sind. So kann eine eventuell auftretende unspezifische Bindung aufgezeigt werden. Die Probenwells 1-6 enthalten Proteine in steigender Konzentration. In jedes Well pipettiert man eine bestimmte Arzneistoffmenge. Zur Quantifikation des ungebundenen Arzneistoffs wird die HPLC-Analyse verwendet.

2.7.1. Zubereitung der Stammlösungen

Für die Transil Kits^{XL} müssen 80 μ M Stammlösungen zubereitet werden. Um auf die entsprechende Konzentration zu kommen, wird die Einwaage der Substanz in DMSO gelöst. Zur Berechnung des gesuchten Volumens DMSO wird das Molekulargewicht (MG) herangezogen.

Capecitabin: MG 359,35 g/mol

1 μ mol.....359,34 μ g

80 μ mol....28 748 μ g

→ = 28,75 mg/1000ml = 2,87 mg/100ml = 1,44 mg/50ml DMSO 32%

Diosmin: MG 608,54 g/mol

1 μ mol.....608,54 μ g

80 μ mol....48 683 μ g

→ = 48,7 mg/1000ml = 4,87 mg/100ml = 2,44 mg/50ml DMSO 32%

Auf Grund ihrer Schwerlöslichkeit in 32%-iger DMSO wurde die Substanz in 32 Teilen DMSO 100% gelöst und PBS langsam zugegeben.

Flavopiridol: MG 401,84 g/mol

1 μ mol.....401,84 μ g

80 μ mol.... 32 147 μ g

→ = 32,15 mg/1000ml = 3,21 mg/100ml = 1,61 mg/50ml DMSO 32%

Linezolid: MG 337,35 g/mol

1 μ mol.....337,35 μ g

80 μ mol.... 26 988 μ g

→ = 26,99 mg/1000ml = 2,70 mg/100ml = 1,35 mg/50ml DMSO 32%

2.7.2. Versuchsdurchführung

Die zu untersuchenden Kits werden bei -20 °C gelagert. Vor der Analyse muss eine Versuchsreihe mit 8 Wells von der gesamten Platte abgetrennt und entweder über Nacht im Kühlschrank oder 3 Stunden bei Raumtemperatur aufgetaut werden. Danach wird für 5 Sekunden bei 2100 U/min zentrifugiert. Mit dem Decapper können alle 8 Wells auf einmal geöffnet werden. In jedes Well werden 15 μ l der zuvor hergestellten 80 μ M Stammlösung pipettiert. Nach dem Verschließen der Wells folgt die Inkubation am Plate Shaker für 12 min bei 1000 U/min. Eine Ausnahme stellen AGP-Bindungs-Kits dar. Hier wird nur 30 sec am Plate Shaker inkubiert und dann weitere 2 min mit der Unterseite nach oben vorsichtig in der Hand geschüttelt. Es folgt eine Zentrifugation für 10 min bei 2100 U/min, um einen klaren, proteinfreien Überstand zu erhalten.

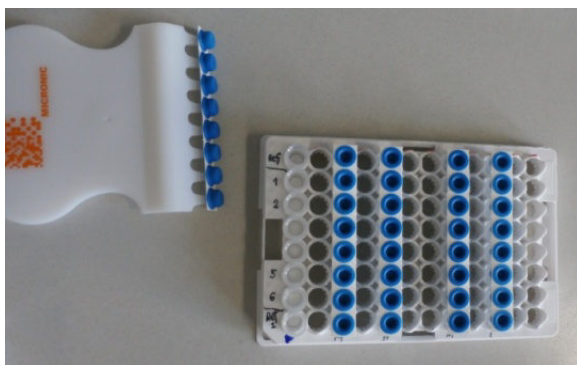


Abbildung 22: Wells geöffnet mit Decapper



Abbildung 23: Plate Shaker

Für die Analyse mittels HPLC entnimmt man vorsichtig ca. 80 μ l des Überstands mit Pasteurpipetten und füllt diesen in Mikroeinsätze. Der Flüssigkeitsstand in den Mikroeinsätzen soll bis zu den blauen Wellenlinien reichen.

Die Peaks aus den HPLC-Chromatogrammen können dann mithilfe der Transil Kits^{XL} Sovicell-Software ausgewertet werden. Das Programm berechnet unter anderem f_u , f_b und K_d .

f_u = ungebundener Anteil

f_b = gebundener Anteil

K_d = Dissoziationskonstante

$$K_d = \frac{[A] \cdot [P]}{[AP]}$$

Die Dissoziationskonstante ist abhängig von der freien Arzneistoffkonzentration $[A]$, der freien Proteinkonzentration $[P]$ und die Konzentration des an das Protein gebundenen Arzneistoffs $[AP]$.

2.8. HPLC Analyse

2.8.1. HPLC Anlagen



Abbildung 24: HPLC Anlage 2

Tabelle 5: Parameter des HPLC-2 Systems von der Firma MERCK HITACHI®

Autosampler	L-7200 La Chrom
Heizsystem	CTO- 10A Firma SHIMADZU
Thermostat	Peltier Sample Thermostat
Säulentemperatur	$36 \pm 1^\circ\text{C}$
Pumpe	L-7120 La Chrom
UV Detektor	L-7400 La Chrom
Degaser	Model 2003, Firma VWR

Tabelle 6: Parameter des HPLC-3 Systems von der Firma MERCK HITACHI®

Autosampler	L-7200 LaChrom
Thermostat	Column- Thermostat Jetstream 2
Säulentemperatur	36 ± 1°C
Pumpe inkl. Degaser	L-7100 LaChrom
Dioden Array Detektor	L-7450 La Chrom, MERCK HITACHI

Tabelle 7: Parameter des HPLC-4 Systems von der Firma VWR HITACHI®

Autosampler	5210
Heizsystem	5310
Säulentemperatur	36 ± 1°C
Pumpe	5110
UV Detektor	5410

2.8.2. HPLC Systeme

Tabelle 8: HPLC Systeme

Substanz	Säule	HPLC-Anlage	Eluent	Fluss [ml/min]	Wellenlänge [nm]	Injektionsvolumen [µl]	Retentionszeit [min]	Druck [bar]
SL1	ACE	2	iso1	0,75	270	20	5,4	89
SL3	ACE	2	iso2	0,75	270	20	5,6	83
SL5	ACE	2	iso1	0,75	270	20	7,7	86
SL6	ACE	2	iso1	0,75	270	20	4,7	91
SL10	ACE	2	iso1	0,75	270	20	8	86
SL11	ACE	2	iso2	0,75	270	20	7,5	103
SL13	ACE	2	iso1	0,75	270	20	5,8	86
Capecitabin	LiC	4	Eluent CCB	0,6	240	10	5,2	85
Diosmin	ACE	2	iso2	0,8	345	20	2,7	89
Doxorubicin	LiC	4	Eluent Doxorubicin	0,6	485	10	3,3	102
Flavopiridol	ACE	2	iso2	0,75	250	20	3,6	118
Linezolid	S	3	Eluent Linezolid	0,8	254	20	1,7	105

2.9. In-vivo Proben

Die erhaltenen Plasmaproben von Ratten, Meerschweinchen und Mäusen wurden mittels FORT und FORD-Test bestimmt. Das verwendete Versuchsvolumen war dabei von der Spezies abhängig.

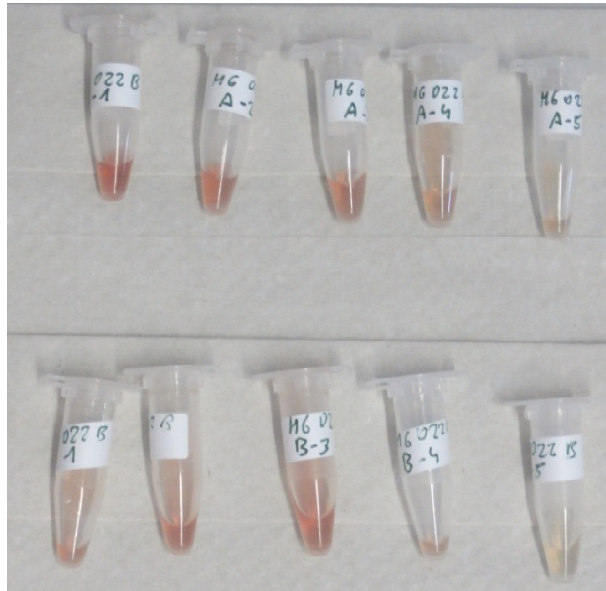


Abbildung 25: Plasmaproben von Ratten



Abbildung 26: Probengefäße nach FORT und FORD Test

3. Ergebnisse und Diskussion

3.1. Ultrafiltration

3.1.1. Chromatogramme

Wie bereits erwähnt ist es bei der Ultrafiltration wichtig den Abrieb der Membran zu berücksichtigen und auch der Leerwert der Organe ist relevant, um sich durch die hohen Peaks nicht vom gesuchten Substanz-Peak ablenken zu lassen. Für die Leerwerte wurde das Homogenisat ohne zugesetzte Stammlösung wie beschrieben analysiert.

Die durch HPLC-Analyse entstandenen Chromatogramme, können übereinander gelegt werden, um eine Interpretation zu vereinfachen.

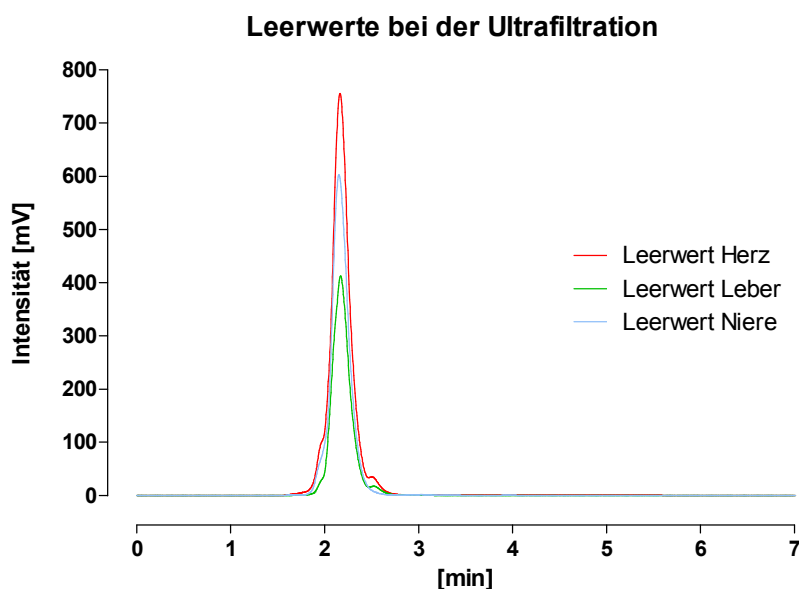
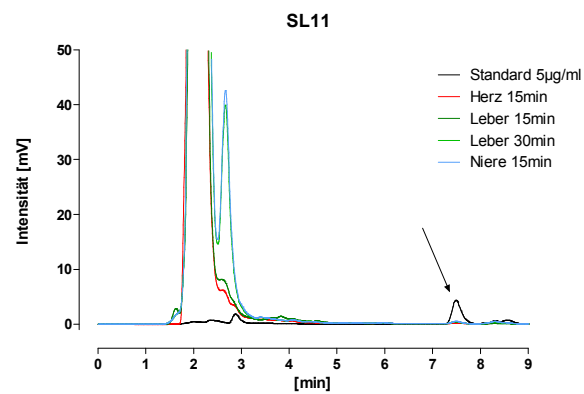
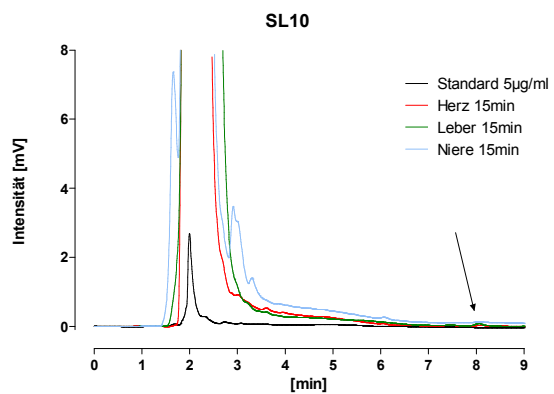
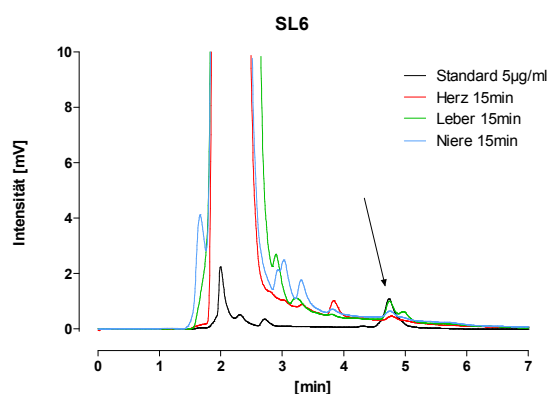
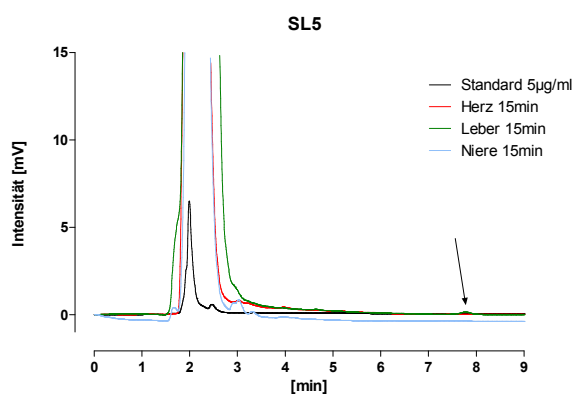
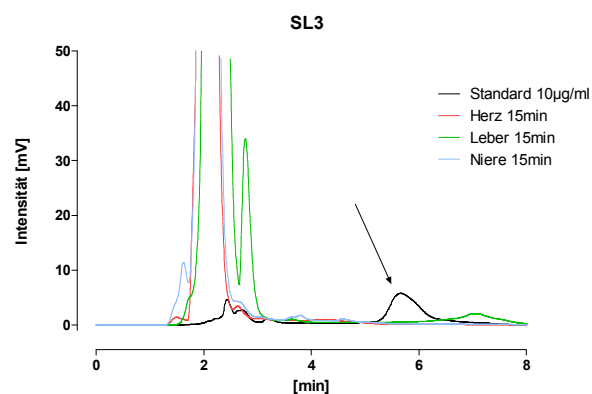
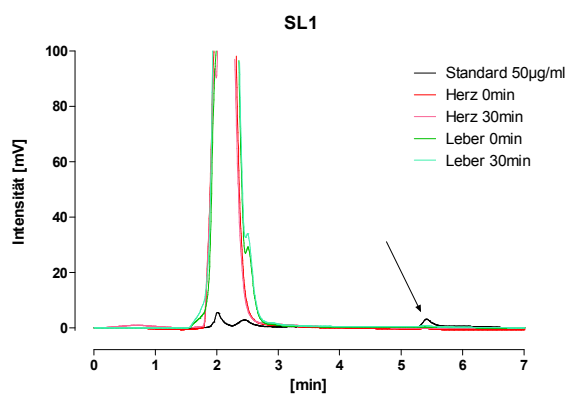


Abbildung 27: Leerwerte der Organe



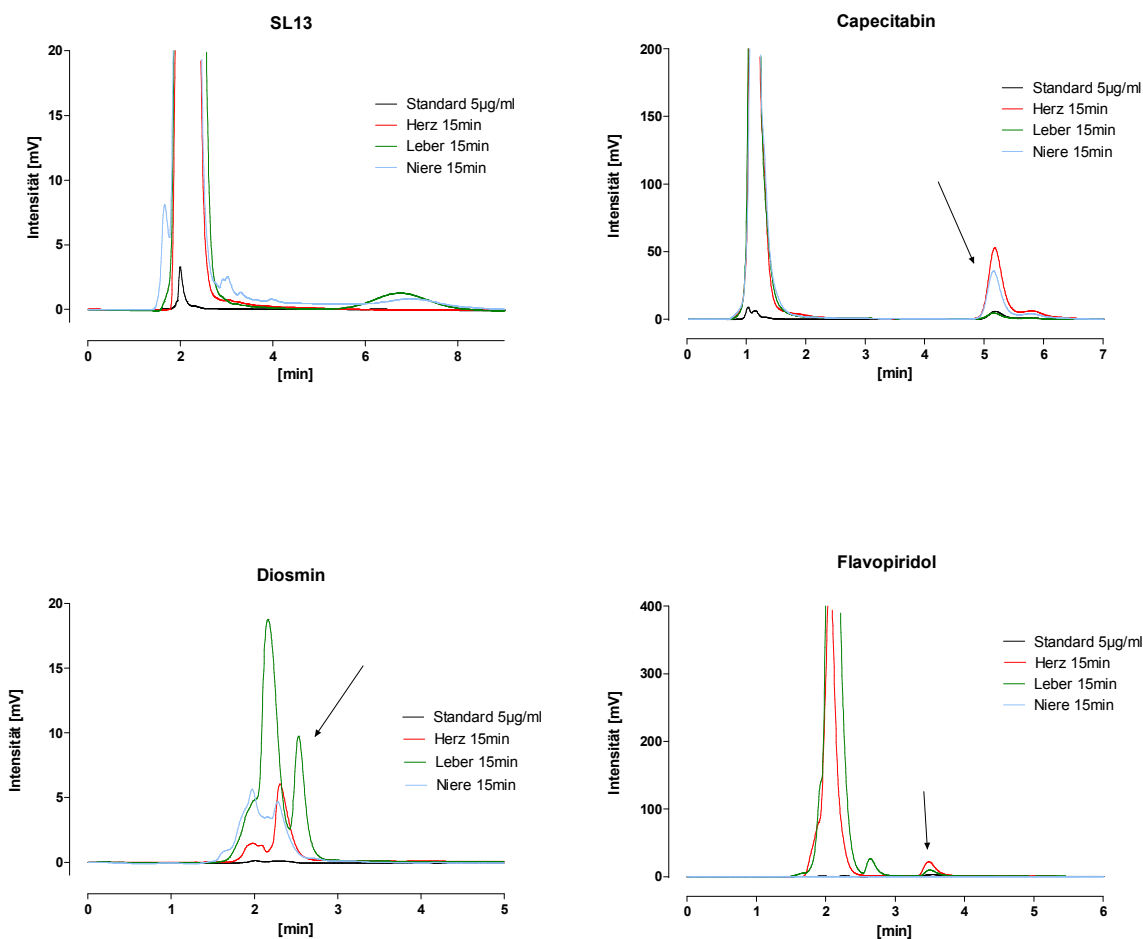


Abbildung 28: Chromatogramme der Ultrafiltration mit SL- und Vergleichsubstanzen

Die Peaks der Substanzen sind im Vergleich zu den Leerwerten nicht besonders hoch. Ein Grund dafür könnte sein, dass die Verbindungen an die Ultrafiltrationsmembran binden oder in zu geringen Konzentrationen gearbeitet wurde. Dadurch war es auch schwer, verwertbare Chromatogramme von Standards in bekannter Konzentration herzustellen. Einige Chromatogramme, wie die von SL5 und SL10, sind kaum interpretierbar, da nur ein sehr kleiner Peak an der gewünschten Stelle auftritt. Bei Diosmin tritt das Problem auf, dass sich die Peaks der Organe mit den Substanzpeaks mischen und diese überlagern. Bei Capecitabin sieht man, dass die Bindung an die Organe Herz und Niere geringer ist, als an die Leber.

3.1.2. Bindungsrate

Um den Anteil des gebundenen Arzneistoffs an die Organe ermitteln zu können, wurden die theoretischen 100% berechnet. Das ist jene Arzneistoffkonzentration, die man im Filtrat zu finden würde, wenn nichts an das Organ oder die Membran bindet.

Berechnung der theoretischen 100% nach der Ultrafiltration:

Zu den 10 ml Homogenisat (davon ca. 2 g Organ, mit PBS auf 10 g aufgefüllt) werden 1000 µl der Stammlösung mit einer Konzentration von 1 mg/ml (1000 µg/ml) gegeben.

→ Konzentration=1 mg in 11 ml= 1 000 µg/11 000 µl

→ 200 µl werden zentrifugiert und 100 µl des Überstands ultrafiltriert

→ 9,0909 µg/100 µl

→ Verdünnung 1:1 mit ACN
= 4,54 µg/200µl = **22,73 µg/ml**

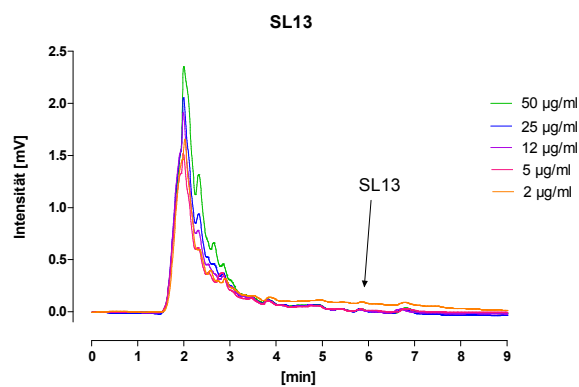
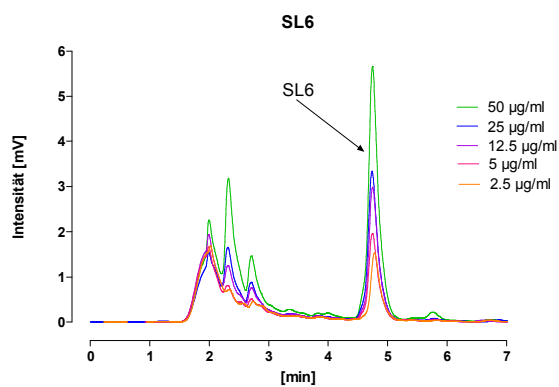
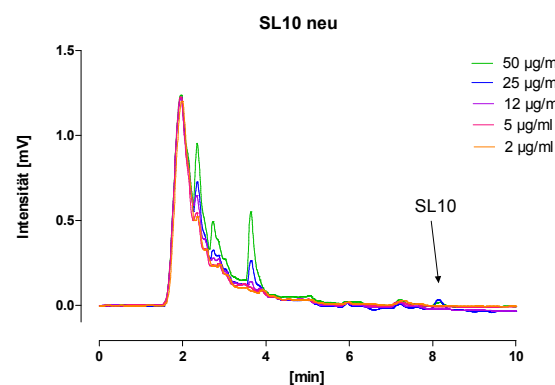
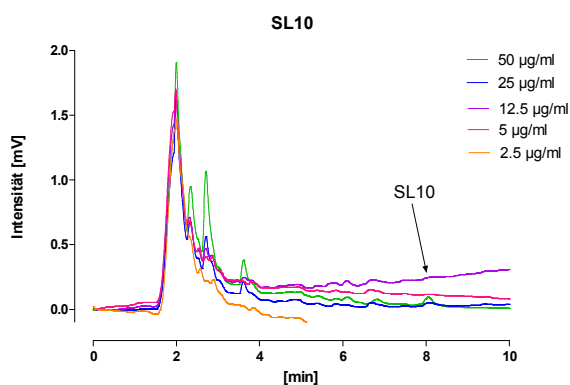
Die Berechnung der Bindungsrate wird immer mit den theoretischen 100% durchgeführt, außer bei den in Tabelle 9 mit * gekennzeichneten Substanzen. Hier entspricht der höchste Peak einer Arzneistoffbindung von 0 %.

Tabelle 9: Gebundener Arzneistoffanteil nach der Ultrafiltration

Substanz	Ultrafiltration gebunden (%)		
	Herz 15min	Leber 15min	Niere 15min
SL1	98,4	98,7	x
SL3	100	100	100
SL5	nb	100	100
SL6	96,6	93,3	96
SL10	100	nb	nb
SL11	98,2	98,2	97,9
SL13	100	100	100
Capecitabin *	0	91,8	34,1
Diosmin	45,4	52,5	85,2
Flavopiridol *	0	56,7	100

Es ergab sich eine sehr hohe Bindungsrate für die SL-Substanzen. Die Bindung der Vergleichsubstanzen an die Organe war sehr unterschiedlich, ist aber im Vergleich zu den Testverbindungen niedriger.

3.2. Globulinbindung



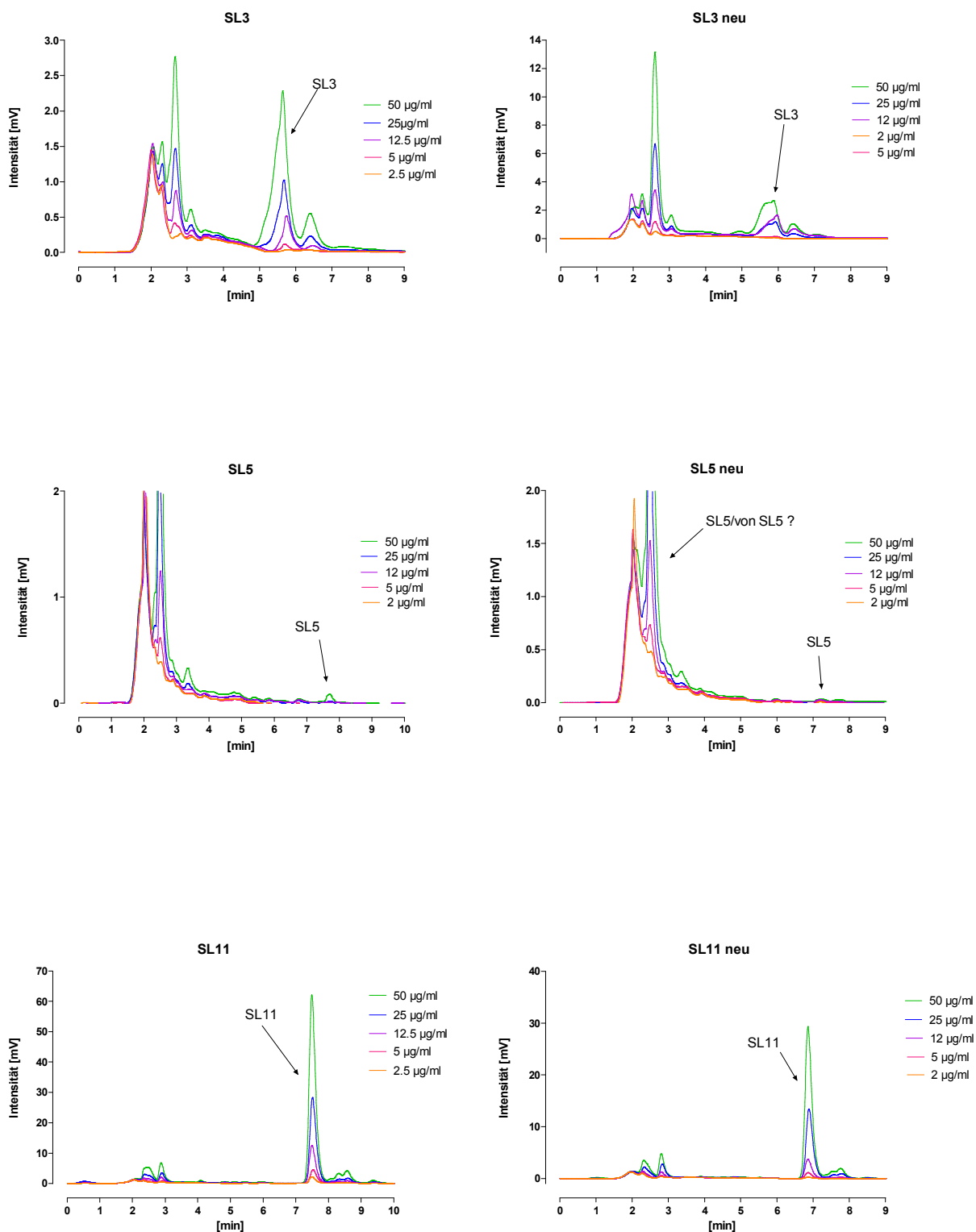


Abbildung 29: Bindung der SL-Substanzen an Globulin

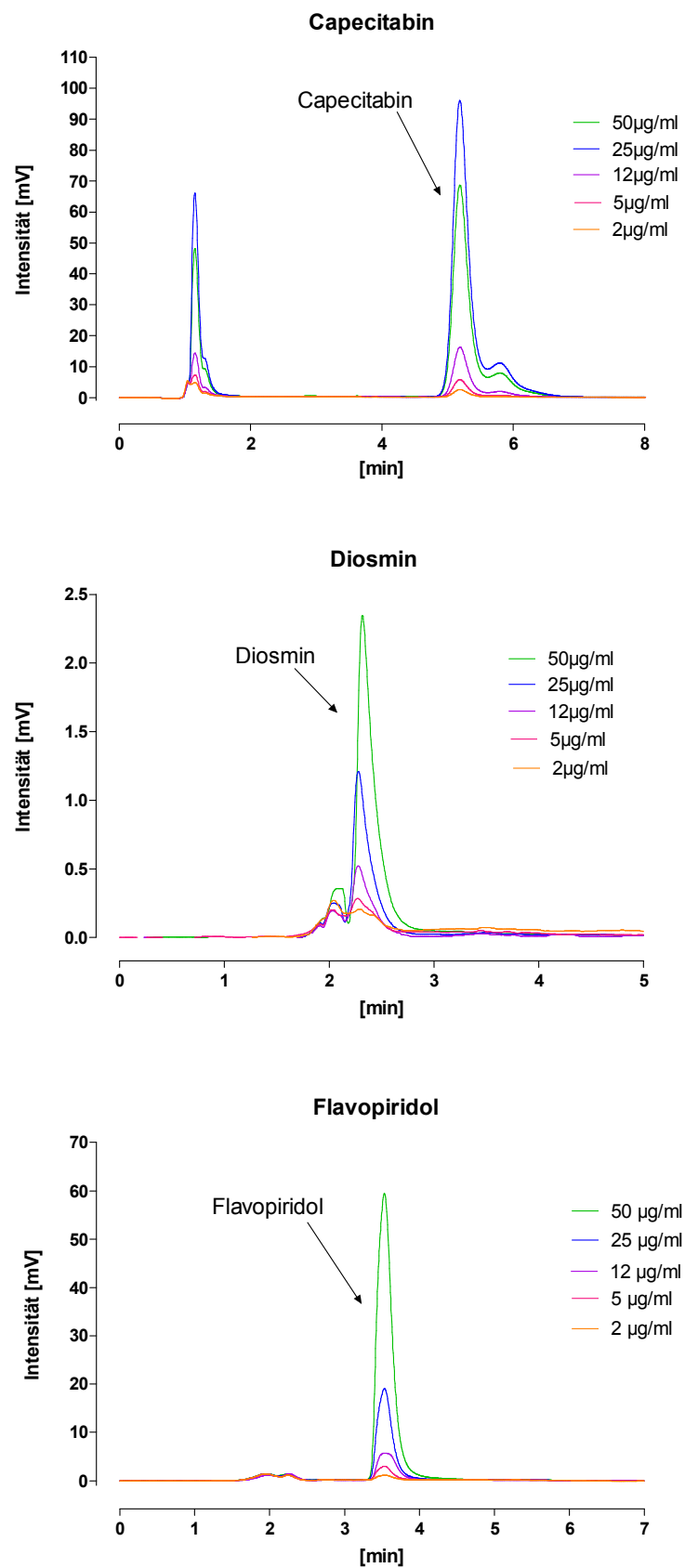


Abbildung 30: Bindung der Vergleichsubstanzen an Globulin

Bei fast allen Substanzen wie z.B.: SL3, SL5, SL6, SL13 ist vor dem eigentlichen Peak eine Kinetik erkennbar. Vermutlich handelt es sich hier um Metaboliten der zu testenden Substanzen. Diese Zersetzungsprodukte deuten auf eine Instabilität der SL-Verbindungen hin. SL5 stellt sich wieder als „Problemsubstanz“ heraus, da sie kaum einen Peak bildet. Vermutlich ist sie durch ihre chemischen Eigenschaften ungeeignet für die Ultrafiltration.

3.2.1. Affinität der Bindung zu Globulin

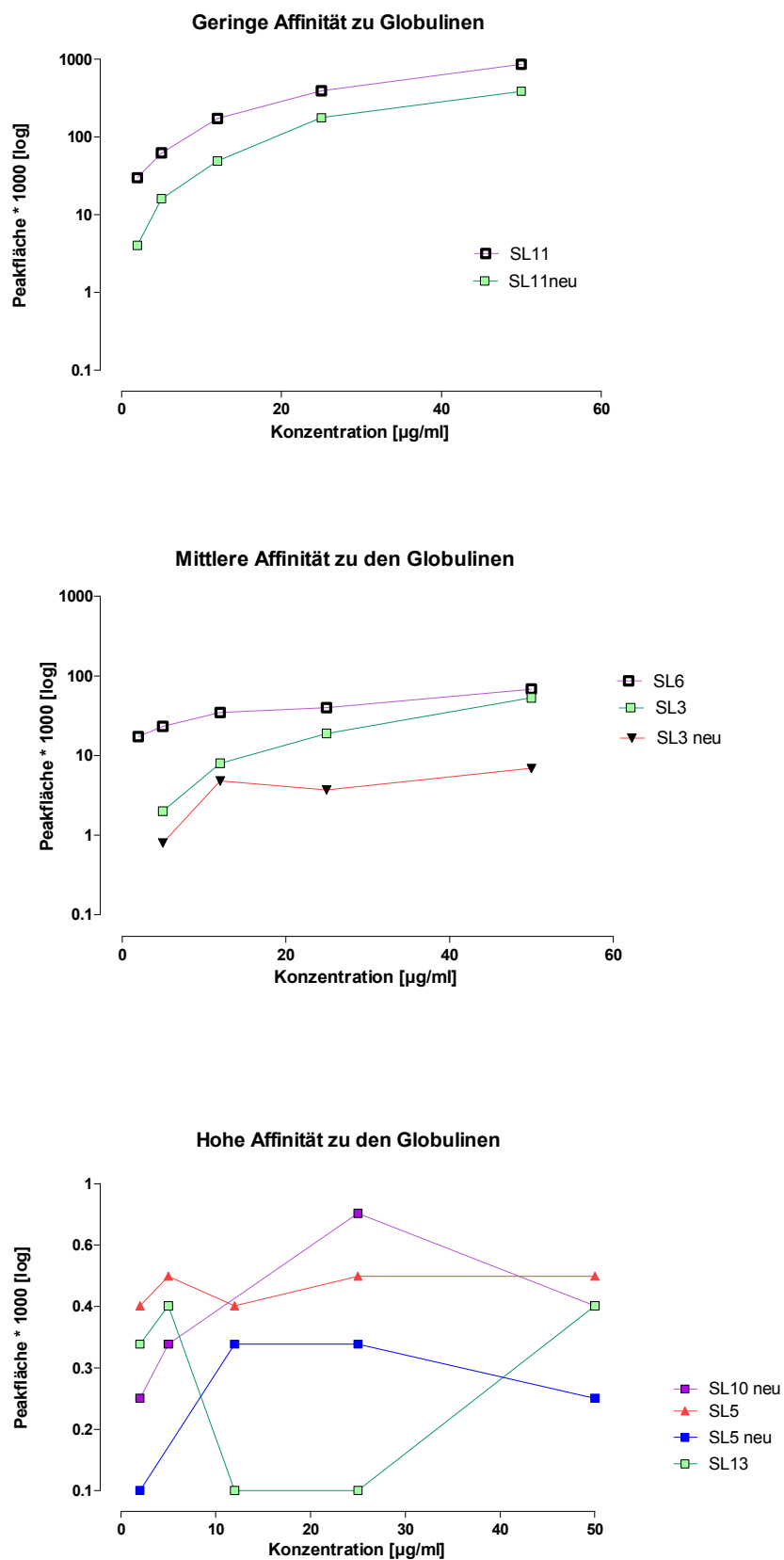


Abbildung 31: Affinität der SL-Substanzen zu Globulin

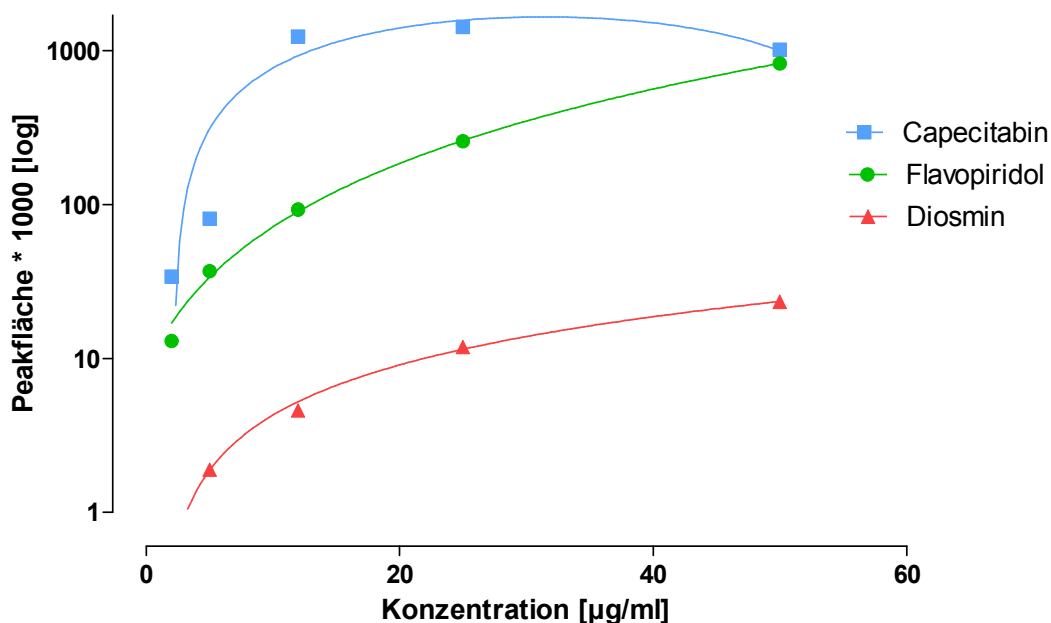


Abbildung 32: Affinität der Vergleichsubstanzen zu Globulin

Für die Auswertung der Globulinbindung wurde das Prinzip der Affinität gewählt. Die Substanzen wurden in drei Gruppen unterteilt, je nachdem, ob sie eine hohe, mittlere und niedrige Affinität zu den Globulinen aufweisen konnten.

Von allen Substanzen hatte Capecitabin die geringste Affinität.

Eine starke Bindung an Globulin zeigten SL5, SL10 und SL13. Diosmin, SL3 und SL6 binden mit einer mittleren Affinität. Capecitabin, Flavopiridol und SL11 zeigten einen geringen Bindungsgrad.

3.3. Bindung an Cholesterol

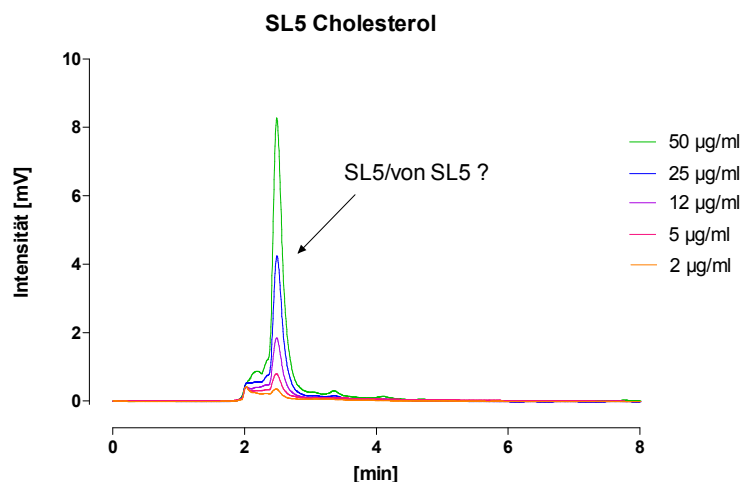


Abbildung 33:Chromatogramm von Cholesterolbindung mit SL5

Der Versuch der Bindung an Cholesterol wurde nur einmal durchgeführt, da sich an der gewünschten Stelle bei einer Retentionszeit von 7,6 Minuten kein Peak bildete. Durch Betrachten der Chromatogramme stellte sich aber heraus, dass trotzdem ein Ansteigen der Konzentration bei einer Retentionszeit von 2,5 min sichtbar ist. Es handelt sich vermutlich um einen Metaboliten von SL5.

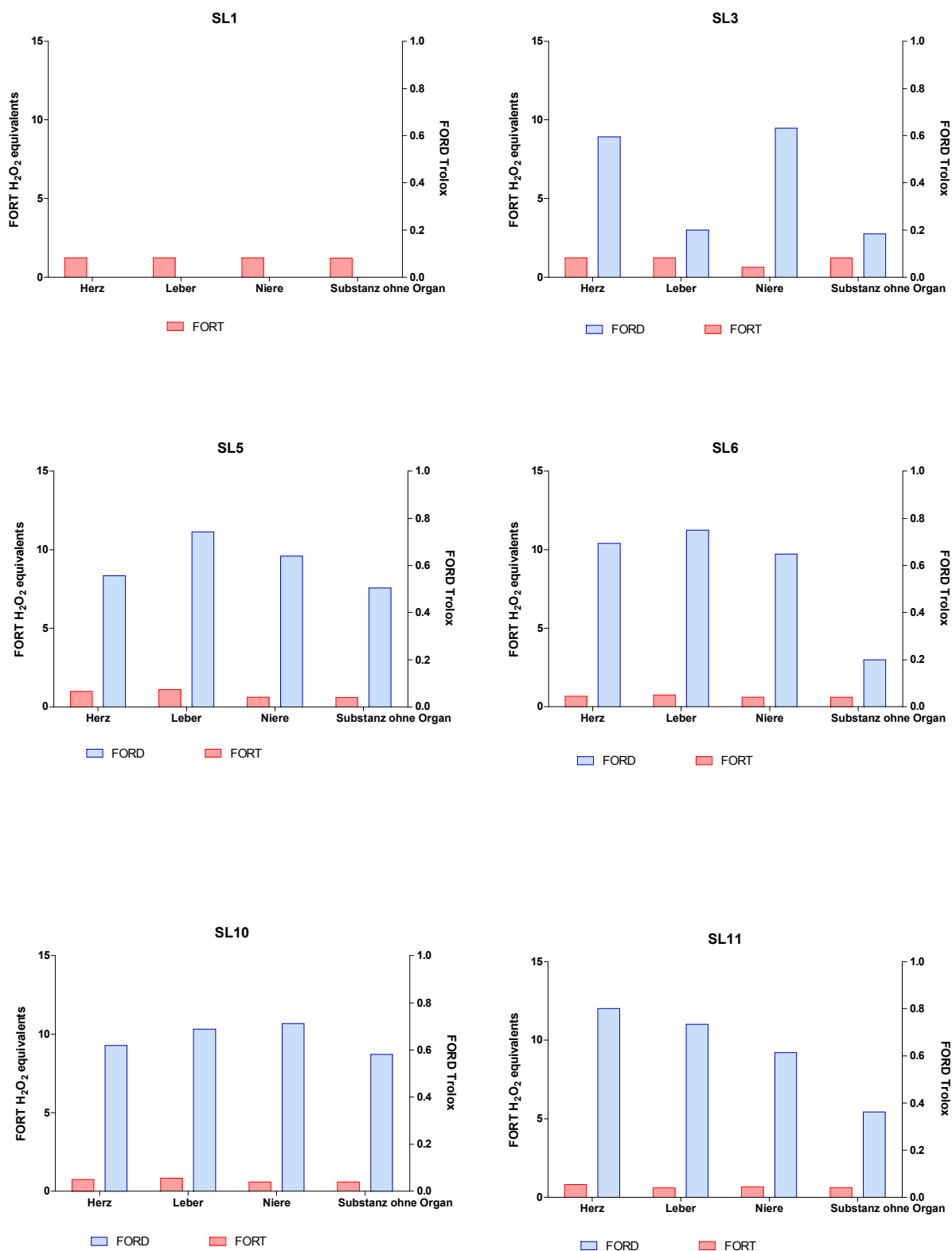
3.4. TransilKits

Tabelle 10: Ergebnisse TransilKits

Name	PPB		AGP			HSA		
	K _d	fb	K _d AGP	fb	fu	K _d HSA	fb	fu
Diosmin	2.83E-04	68.4%	2.77E-04	6.7%	39.4%	4.02E-04	59.4%	39.5%
Linezolid	1.03E-03	37.4%	7.97E-05	20.1%	< 59.8%	1.40E-03	< 29.6%	59.8%
Flavopiridol	2.95E-05	95.4%	1.86E-04	9.7%	6.0%	3.75E-05	94%	6.0%
Capecitabin	3.14E-04	66.1%	1.40E-03	< 1.4%	57.6%	8.13E-04	42.0%	< 57.6%
Doxorubicin	3.11E-04	66.3%	4.21E-04	4.5%	38.2%	3.73E-04	61.2%	38.1

Die in der Literatur beschriebenen Werte lassen sich sehr gut mit den Werten aus den TransilKits vergleichen. Das bestätigt die Reproduzierbarkeit dieser Methode.

3.5. FORT- und FORD-Test



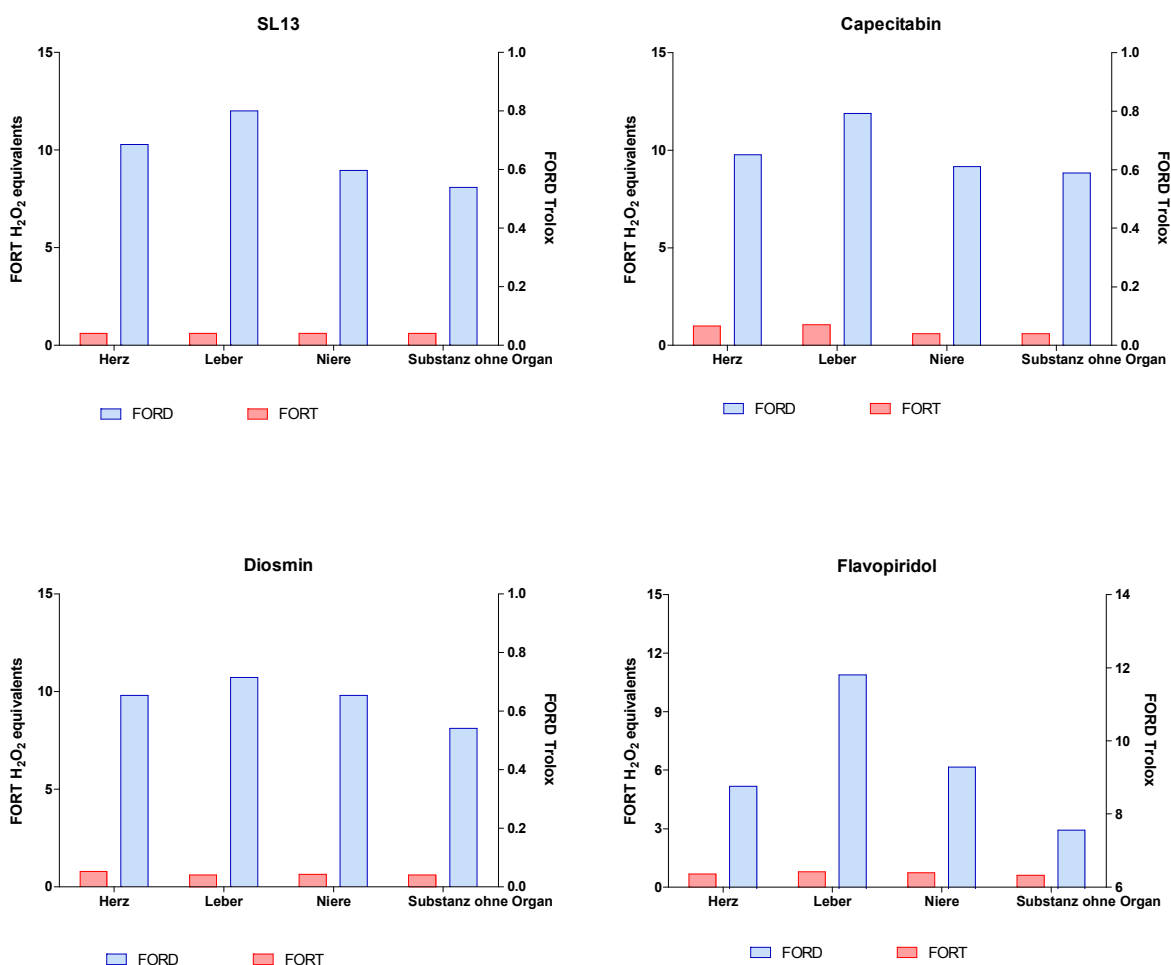


Abbildung 34: FORT- und FORD-Test

Alle Ergebnisse des FORT-Tests sind $< 2,35 \text{ mmol/l H}_2\text{O}_2$, das heißt die Radikalbildung ist sehr niedrig. Die Stammlösungen ohne Organ haben immer die geringsten Messwerte. Die Leberwerte waren bei SL6, SL10, Flavopiridol und Capecitabin am höchsten. Bei SL5, SL11 und Diosmin hatte das Herz die höchste Radikalbildung. Die Niere hatte nie die höchsten Werte und bei SL1, SL3 und SL13 waren alle Werte gleich. Der FORD-Wert bei der Leber ist bei den Substanzen SL5, SL6, SL13, Capecitabin, Diosmin und Flavopiridol am höchsten. Bei SL11 hat das Herz, bei SL3 und SL10 die Niere den höchsten Wert. Bei allen getesteten Verbindungen hat die Stammlösung ohne Substanz die geringste antioxidative Kapazität. Aber alle Ergebnisse liegen über dem Referenzbereich von 1,07-1,53 mmol/l Trolox.

3.6. In-vivo Proben

In Abbildung 35-37 wurden die Mittelwerte der FORT- und FORD-Tests für jedes Versuchstier gebildet:

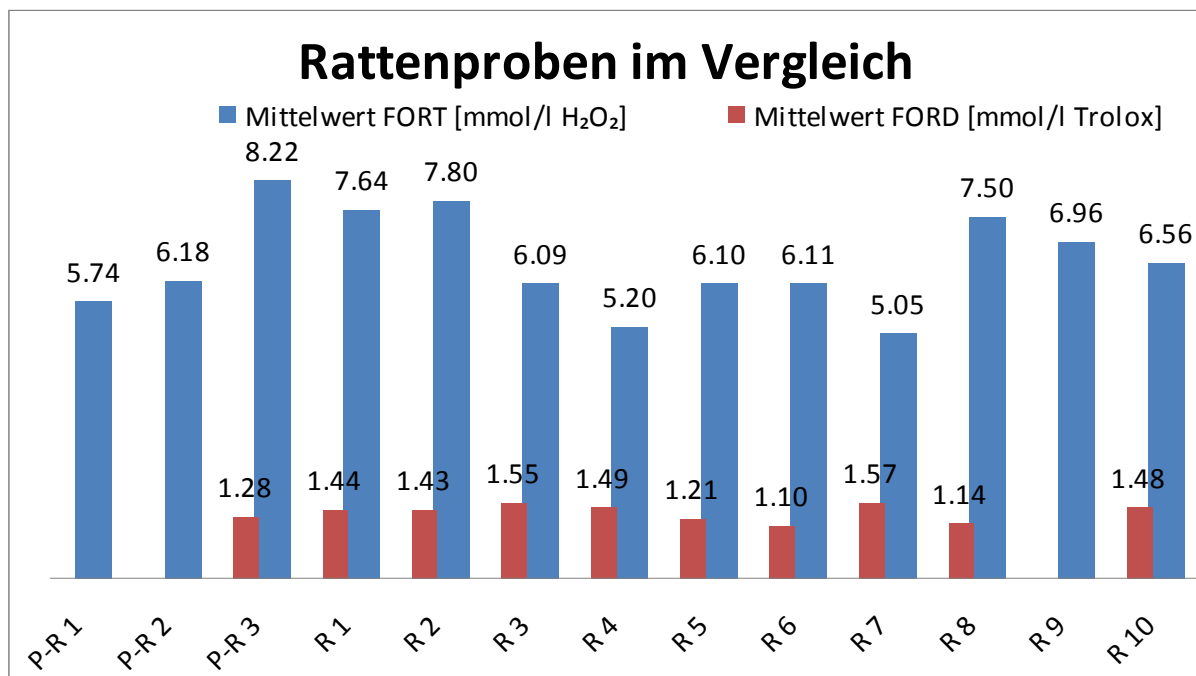


Abbildung 35: Rattenproben

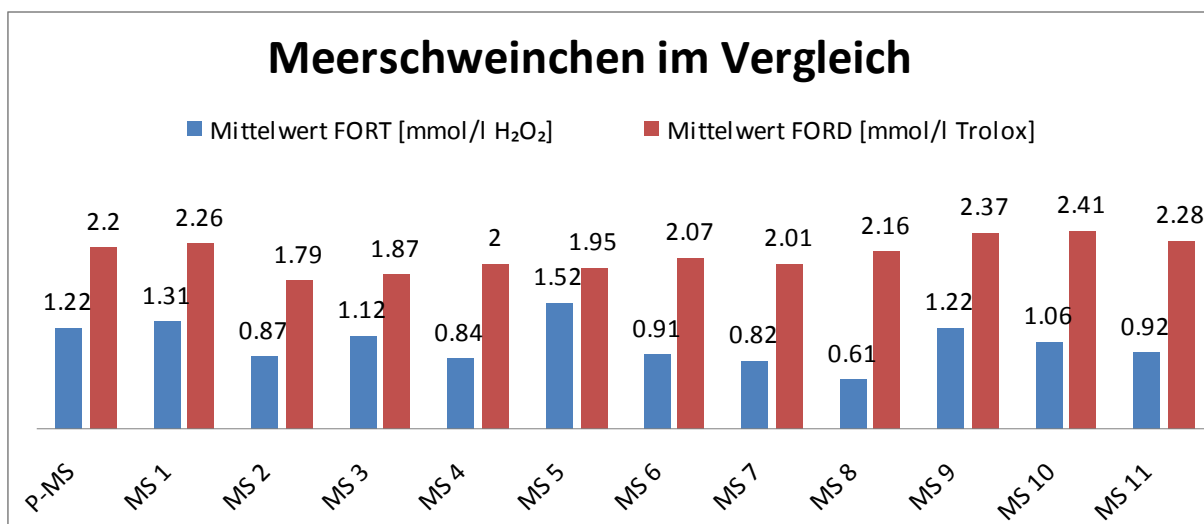


Abbildung 36: Meerschweinchenproben

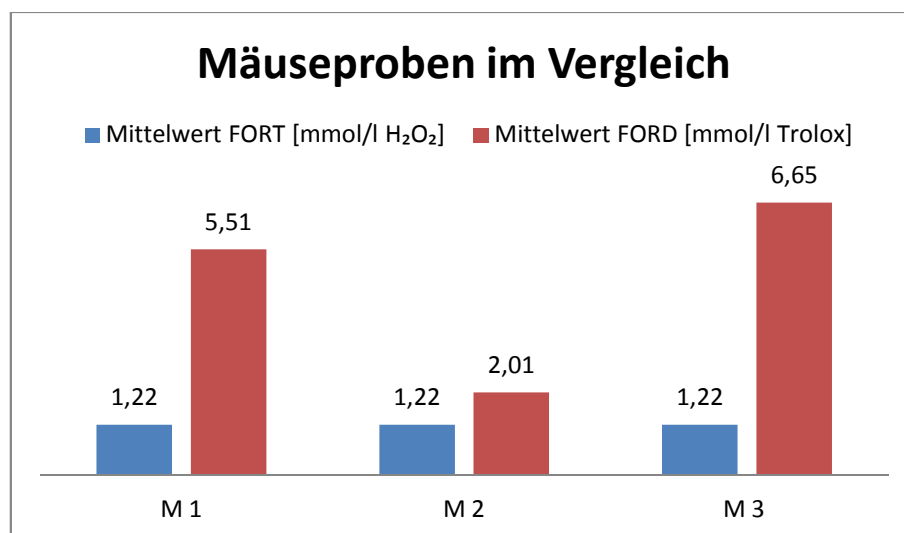


Abbildung 37: Mäuseproben

Die Ratten hatten im Gegensatz zu den anderen Versuchstieren die größte Radikalbildung. Der höchste Radikalwert einer Ratte lag bei 8,22 mmol/l H₂O₂, das ist deutlich über dem Referenzwert von < 2,35. Die antioxidative Kapazität war bei diesen Tieren am geringsten. Man kann aber keinen Unterschied erkennen, ob den Ratten die SL-Substanzen verabreicht wurden oder nicht (Placebo-Ratten).

Fast resistent gegen den oxidativen Stress scheinen die Mäuse zu sein, deren Radikalwerte kaum nachweisbar waren. Sie haben auch die höchsten AOK-Werte.

Die Meerschweinchenproben bilden auch wenige Radikale. Wieder zeigt sich keinen Unterschied zwischen den Placebo-Tieren und Meerschweinchen, die die Proben lokal appliziert bekamen.

Es ist erkennbar, dass jede Spezies ein anderes Radikal- und AOK-Level aufweist. Vermutlich spielt auch die Applikationsart der Substanzen eine Rolle.

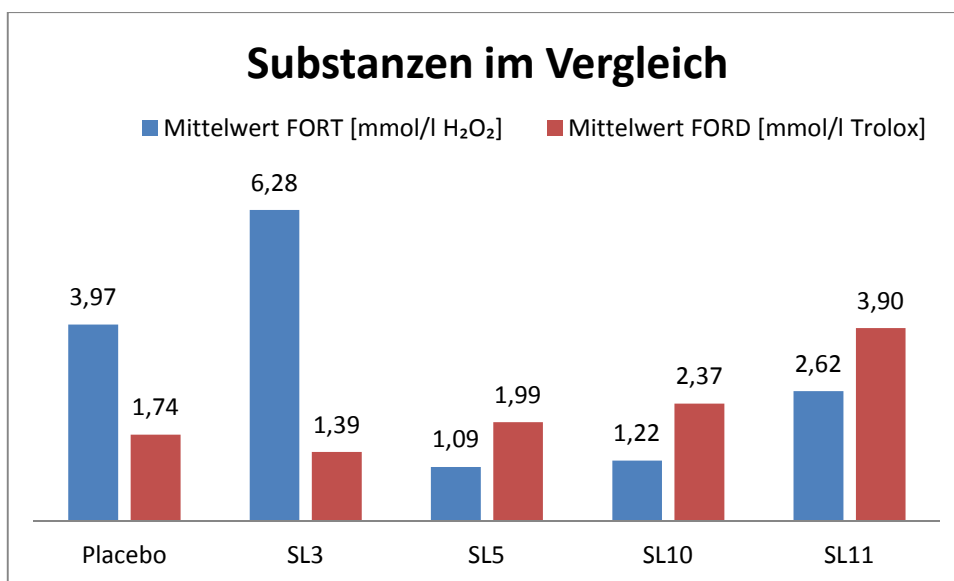


Abbildung 38: Vergleich der SL-Substanzen

In Abbildung 38 wurden die Mittelwerte aller Tiere, die eine Substanz verabreicht bekamen, zusammengefasst. Es ist ersichtlich, dass SL3 der größte Radikalbildner ist und zusätzlich den niedrigsten FORD-Wert besitzt. Die Substanz SL11 kann die höchste antioxidative Kapazität aufweisen und SL5 hat den geringsten FORT-Wert.

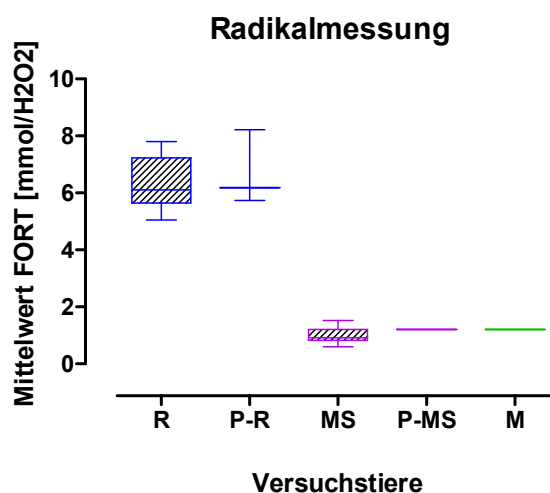


Abbildung 39: FORT-Test

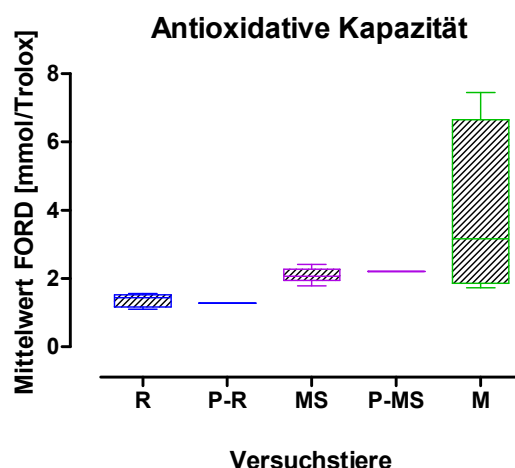


Abbildung 40: FORD-Test

Aus Abbildung 39 lässt sich ableiten, dass die Ratten sehr hohe Radikalwerte, die Mäuse und Meerschweinchen jedoch niedrige Werte besitzen. Außerdem sieht man keinen Unterschied zu den Placebotieren.

Die FORD-Werte der Mäuse sind schwankend, aber im Mittel am höchsten. Die Ratten haben die niedrigste antioxidative Kapazität.

Tabelle 11: T-Test Auswertung FORT Werte Ratten versus Meerschweinchen

Table Analyzed	FORD_Werte
Column B vs A	MS vs R
Unpaired t test	
P value	< 0,0001
P value summary	****
Are means signif. different? (P < 0.05)	Yes
One- or two-tailed P value?	Two-tailed
t, df	t=9,332 df=20
How big is the difference?	
Mean ± SEM of column A	1,369 ± 0,05446 N=10
Mean ± SEM of column B	2,114 ± 0,05699 N=12
Difference between means	-0,7452 ± 0,07985
95% confidence interval	-0,9117 to -0,5786
R square	0,8132

Tabelle 12: T-Test Auswertung FORT Werte Ratten

Table Analyzed	Ratten
Kontrolle vs SLP	A vs B
Unpaired t test	
P value	0,7643
P value summary	ns
Are means signif. different? ($P < 0.05$)	No
One- or two-tailed P value?	Two-tailed
t, df	t=0,3074 df=11
How big is the difference?	
Mean $\pm$ SEM of column A	882,7 $\pm$ 100,6 N=3
Mean $\pm$ SEM of column B	854,9 $\pm$ 40,33 N=10
Difference between means	27,77 $\pm$ 90,34
95% confidence interval	-171,1 to 226,6
R square	0,008515

Aus den beiden T-Tests geht hervor, dass es einen signifikanten Unterschied zwischen Ratten und Meerschweinchen gibt. Aber die Werte einer Placebo-Ratte haben keinen Unterschied zu den Werten der SL-Substanzen.

4. Zusammenfassung

In der vorliegenden Diplomarbeit wurden präklinische Untersuchungen mit neuen Anthrachinonderivaten durchgeführt. SL1, SL3, SL5, SL6, SL10, SL11 und SL13 wurden getestet und mit fünf verschiedenen, bereits bekannten und zur Therapie eingesetzten Arzneistoffen verglichen. Es wurde die Bindung an die Organe Herz, Leber, Niere mittels Ultrafiltration bestimmt. Auch zur Beurteilung der Affinität zu Globulin und Cholesterol wurde die Ultrafiltration verwendet. Außerdem sollte die Bindung an Plasmaprotein, Alpha₁-saures Glykoprotein und Humanes Serum Albumin mittels Transil Kits^{XL} festgestellt werden. HPLC-Analyse diente zur Quantifizierung der Proben. Mittels FORT- und FORD-Test wurden zusätzlich die Radikalwerte und die antioxidative Kapazität von Substanzen in den Organen und in Proben von Versuchstieren gemessen.

Bei der Ultrafiltration ergab sich eine hohe Bindungsrate der Substanzen an die Organe oder an die Ultrafiltrationsmembran. Der Lead-Compound SL5 zeigt kaum einen Peak. Zur Bestimmung der Bindungsrate sollte daher für diese Substanz eine andere Methode gewählt werden, da Interaktionen mit der Ultrafiltrationsmembran wahrscheinlich sind. Bei den Chromatogrammen der Bindung an Globulin waren Peaks von vermeintlichen Metaboliten zu sehen, die auf eine Instabilität der Substanzen hindeuten.

Eine starke Bindung an Globulin zeigten SL5, SL10 und SL13. Diosmin, SL3 und SL6 binden mit einer mittleren Affinität. Die Vergleichsubstanzen Capecitabin, Flavopiridol und SL11 zeigten einen geringen Bindungsgrad. Von allen Substanzen hatte Capecitabin die geringste Affinität.

Die Transil Kits^{XL} liefern reproduzierbare Ergebnisse, wie sich am Vergleich mit der Literatur erkennen lässt.

Die Radikalbildung in den Organen war sehr gering, noch kleiner waren die Ergebnisse für die Stammlösungen ohne Organ. Im Vergleich bildeten Leber und Herz am öftesten einen hohen FORT-Wert.

Beim FORD-Test hatte die Leber die mit der Stammlösung am häufigsten den höchsten Wert. Bei allen getesteten Verbindungen hat die Stammlösung ohne Gewebe die geringste antioxidative Kapazität. Bei FORT- und FORD-Test der In-vivo-Proben gab es deutliche Unterschiede je nach Art. Dies bedeutet, dass in-vitro bzw. in-vivo eine Bioaktivierung der jeweiligen Substanz erfolgen muss. Die Ratten hatten sehr hohe

Radikal- und niedrige ROS-Werte. Die Mäuse und Meerschweinchen hatten im Gegensatz dazu eine niedrige Radikalbildung und eine hohe antioxidative Kapazität. Es gab aber keinen Unterschied zwischen den Versuchstieren und den Placebotieren. Im Vergleich der Substanzen in allen Tieren war SL3 der größte Radikalbildner.

5. Summary

In this present diploma thesis new derivatives of anthraquinones were tested with preclinical methods. SL1, SL3, SL5, SL6, SL10, SL11 and SL13 were compared to already known and clinically used drugs. The binding to tissue like heart, liver and kidney, and also the binding to globulins and cholesterol was explored with ultrafiltration. Transil Kits^{XL} verified the binding rate to plasma proteins, α_1 -acid glycoprotein and human serum albumin. The samples were quantified by HPLC-analysis. Additionally samples from tissue and animal serum including the drugs were investigated to find out the ability of producing and defending radicals.

Ultrafiltration showed a high amount of binding to tissue or maybe also to the ultra filtration membrane. The lead-compound SL5 hardly had any peaks. Another method to test this substance should be found. There are probably metabolites of the original drugs at an earlier retention time, this could indicate a certain instability. A strong binding to Globulin have been seen in the chromatograms of SL5, SL10 and SL13. Diosmin, SL3 and SL6 showed a lower binding affinity. Flavopiridol, SL11 and most of all Capecitabine were nearly unbound. It can be seen that the result of Transil Kits^{XL} is reproducible compared to literature. In FORT-test there was a small amount of radicals in the tissue plus drug and even a smaller one in the drug without tissue. The liver had four times, the heart three times and the kidney never the highest level. The test of antioxidative capacity showed that the liver generated six times, the kidney two times and the heart once the highest amount. The stock solution of the pure drug had the smallest activity to defence radicals at every test. The FORT- and FORD-test of animal serum samples showed differences depending on the species. Rats had high radical- and low ROS-levels. Mice and cavies on the contrary showed small radical- and high ROS-levels. There was no difference between placebo-animals and animals which were administered a SL-substance. Comparing all drugs SL3 generated the most radicals in the animals.

6. Conclusio

Die vorliegende Diplomarbeit zeigt die praktische Bedeutung der Protein- und Membranbindung an Hand verschiedener Substanzen auf. Mit ausgewählten Arzneistoffkandidaten konnte die hohe PPB dokumentiert werden. Als Negativkontrolle dienten bereits etablierte Arzneistoffe wie Capecitabin, Diosmin, Doxorubicin, Flavopiridol und Linezolid, die unterschiedliches Bindungsverhalten aufzeigten.

Erstmals konnte auch die Bedeutung der ROS Bildung und AOK in biologischen Systemen, vor allem am lebenden Tier dokumentiert werden. Diese Ergebnisse sind von hoher klinischer Bedeutung, da die Radikalbildung wichtig für die pharmakologische Wirkung von Antibiotika und Zytostatika ist.

Weiterführende Untersuchungen in diese Richtung würden die gewonnenen Erkenntnisse vertiefen.

7. Literatur

- [1] U. Jaehde, R. Radziwill, S. Mühlebach und W. Schunack, Lehrbuch der Klinischen Pharmazie, Stuttgart: Wissenschaftliche Verlagsgesellschaft mbH, 2003.
- [2] A. Pretsch, P. Proksch und A. Debbab, „Novel Anthraquinone derivatives“. EU Patent EP2435394, 8 Mai 2013.
- [3] M. H. Teiten, F. Mack, A. Debbab, A. H. Aly, M. Dicato, P. Proksch und M. Diederich, „Anticancer effect of altersolanol A,“ Elsevier Ltd., 2013.
- [4] J. Ondeyka, A. V. Buevich, R. T. Williamson, D. L. Zink, J. D. Polishook, J. Occi, F. Vicente, A. Basilio, G. F. Bills, R. G. K. Donald, J. W. Phillips, M. A. Goetz und S. B. Singh, „Isolation, Structure Elucidation, and Biological Activity of Altersolanol P,“ *Journal of Natural Products*, 16. September 2013.
- [5] J. N. Adkins, S. M. Varnum, K. J. Auberry, R. J. Moore, N. H. Angell, R. D. Smith, D. L. Springer und J. G. Pounds, „Toward a Human Blood Serum Proteome: Analysis by Multidimensional Separation Coupled with Mass Spectrometry,“ *Molecular & Cellular Proteomics*, 2002.
- [6] K. Aktoris, U. Förstermann, F. Hofmann und K. Starke, Allgemeine und Spezielle Pharmakologie und Toxikologie, Urban&Fischer.
- [7] H. Kurz, „Pharmakokinetische Bedeutung der Proteinbindung,“ *Klinische Wochenschrift*, 1978.
- [8] P. Högger und E. Strehl, Repetitorium Klinische Pharmazie, Govi Verlag.
- [9] P. J. Theodore, All about albumin: Biochemistry, Genetics, and Medical Applications, San Diego: Academic Press, 1996.
- [10] P. G. Blain, J. C. Mucklow, M. D. Rawlins, D. F. Roberts, P. A. Rutledge und D. G. Shand, „Determinants of plasma a-acid glycoprotein (AAG) concentrations in health,“ *Britisch Journal of clinical Pharmacy*, pp. 500-502, 1985.
- [11] T. Fournier, N. Medjoubi-N und D. Porquet, „Alpha-1-acid glycoprotein,“ *Biochimica et Biophysica Acta*, 2000.
- [12] A. Pingoud und C. Urbanke, Arbeitsmethoden der Biochemie, De-Gruyter, 1997.

- [13] „Chemgargo, Elektrophorese,“ [Online]. Available: <http://www.chemgapedia.de/vsengine/glossary/de/elektrophorese.glos.html>. [Zugriff am 23 Februar 2014].
- [14] „Drug Bank, Capectabine,“ [Online]. Available: <http://www.drugbank.ca/drugs/DB01101>. [Zugriff am 21 Februar 2014].
- [15] L. Yan-feng, M. Ying-li und M. Chao, „Study on plasma protein binding rate of diosmin,“ *Journal of Harbin University of Commerce (Natural Sciences Edition)*, Jänner 2008.
- [16] „PubChem, Diosmin,“ [Online]. Available: https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/summary/summary.cgi?cid=5281613&loc=ec_rcs#x281. [Zugriff am 23 Februar 2014].
- [17] Y. Tanrikulu, M. Sahin, K. Kismet, S. Kilicoglu, E. Devrim, C. Tanrikulu, E. Erdemil, S. Erel, K. Bayraktar und M. Akkus, „The protective effect of diosmin on hepatic ischemia reperfusion injury: an experimental study,“ *Bosn J Basic Med Sci*, November 2013.
- [18] „Drug Bank, Doxorubicine,“ [Online]. Available: <http://www.drugbank.ca/drugs/DB00997>. [Zugriff am 21 Februar 2014].
- [19] D. G. Power, C. Cisek, T. Malbari, A. Barbi, J. Randazzo, H. Dials, M. Capanu, D. P. Kelsen, G. K. Schwartz und M. A. Shah, „Correlation of flavopiridol toxicity with baseline serum albumin und bilirubin,“ 2009.
- [20] „Drug Bank, Flavopiridol,“ [Online]. Available: <http://www.drugbank.ca/drugs/DB03496>. [Zugriff am 21 Februar 2014].
- [21] „Drug Bank, Linezolid,“ [Online]. Available: <http://www.drugbank.ca/drugs/DB00601>. [Zugriff am 21 Februar 2014].
- [22] K. J. A. Davies, „Oxidative Stress, Antioxidant Defenses, and Damage Removal, Repair, and Replacement Systems,“ *IUMLB Life*, Nr. 50, pp. 279-289, 2000.
- [23] M. Valko, D. Leibfritz, J. Moncol, M. T. D. Cronin, M. Mazur und J. Telser, „Free radicals and antioxidants in normal physiological functions and human disease,“ *The International Journal of Biochemistry & Cell Biology*, Nr. 39, pp. 44-84, 2007.
- [24] L. Lorgis, M. Zeller, G. Dentan, P. Sicard, C. Richard, P. Buffet, I. L'Huillier, J. C. Beer, Y. Cottin, L. Rochette und C. Vergely, „The free oxygen radicals test (FORT) to assess circulating oxidative stress in patients with acute myocardial infarction,“ *Atherosclerosis*, Nr. 213, 2010.

- [25] P. Sangeetha, U. N. Das, R. Koratkar und P. Suryaprabha, „Increase in free radical generation and lipid peroxidation following chemotherapy in patients with cancer,“ *Free Radical Biology and Medicine*, pp. 15-19, 1990.
- [26] H. M. Alessio, „Exercise-induced oxidative stress,“ *Medicine and Science in Sports and Exercise*, Nr. 25, 1993.
- [27] „incomat, Medizinische Geräte GmbH,“ [Online]. Available: <http://micromedical.de/de/products/data/FORM-CR3000-MiniLab.php?productPage=6>. [Zugriff am 4. März 2014].
- [28] R. Re, N. Pellegrini, A. Proteggente, A. Pannala, M. Yang und C. Rice-Evans, „Antioxidant activity applying an improved ABTS radical cation decolorization assay,“ *Free Radical Biology and Medicine*, pp. 1231-1237, 1999.
- [29] „SeaLife Pharma,“ [Online]. Available: <http://www.sealifepharma.com/>. [Zugriff am 20 Februar 2014].
- [30] M. M. Tarpey, D. A. Wink und M. B. Grisham, „Methods for detection of reactive metabolites of oxygen and nitrogen: in vitro and in vivo considerations,“ *American Journal of Physiology - Regulatory, Integrative and Comparative Physiology*, Nr. 286, 2004.
- [31] I. Berggård, „Studies on the plasma proteins in normal human urine,“ *Clinica Chimica Acta*, pp. 413-429, 1961.

8. Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: Grundstruktur der SL-Substanzen	1
Abbildung 2: Altersolanol A.....	2
Abbildung 3: Skizze zur Ultrafiltration mit Zentrifugation.....	6
Abbildung 4: Vivaspin.....	6
Abbildung 5: Centrisart®I	6
Abbildung 6: Capecitabin	8
Abbildung 7: Diosmin	9
Abbildung 8: Doxorubicin	9
Abbildung 9: Flavopiridol	10
Abbildung 10: Linezolid.....	10
Abbildung 11: pH-Meter.....	19
Abbildung 12: Ultraschallbad	19
Abbildung 13: Ultraturraxgefäß.....	20
Abbildung 14: Gefäße mit Organen befüllt	20
Abbildung 15: Homogenisat nach der Zentrifugation	21
Abbildung 16: Nanosep®.....	21
Abbildung 17: Befülltes Nanosep®	21
Abbildung 18: Globuline in PBS	22
Abbildung 19: FORM-Messgerät	23
Abbildung 20: FORT-Test.....	23
Abbildung 21: FORD Test.....	24
Abbildung 22: Wells geöffnet mit Decapper.....	26
Abbildung 23: Plate Shaker.....	26
Abbildung 24: HPLC Anlage 2	27
Abbildung 25: Plasmaproben von Ratten	29
Abbildung 26: Probengefäße nach FORT und FORD Test.....	29
Abbildung 27: Leerwerte der Organe	30
Abbildung 28: Chromatogramme der Ultrafiltration mit SL- und Vergleichs- substanzen.....	32
Abbildung 29: Bindung der SL-Substanzen an Globulin	35
Abbildung 30: Bindung der Vergleichsubstanzen an Globulin	36
Abbildung 31: Affinität der SL-Substanzen zu Globulin	38

Abbildung 32: Affinität der Vergleichsubstanzen zu Globulin.....	39
Abbildung 33: Chromatogramm von Cholesterolbindung mit SL5	40
Abbildung 34: FORT- und FORD-Test.....	42
Abbildung 35: Rattenproben.....	43
Abbildung 36: Meerschweinchenproben	43
Abbildung 37: Mäuseproben	44
Abbildung 38: Vergleich der SL-Substanzen	45
Abbildung 39: FORT-Test.....	45
Abbildung 40: FORD-Test	46

9. Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: Analysierte Substanzen.....	15
Tabelle 2: Verwendete Chemikalien und Reagenzien	15
Tabelle 3: Verwendete Geräte und Materialien	16
Tabelle 4: Pipettierschema Globuline.....	22
Tabelle 5: Parameter des HPLC-2 Systems von der Firma MERCK HITACHI®.....	27
Tabelle 6: Parameter des HPLC-3 Systems von der Firma MERCK HITACHI®.....	28
Tabelle 7: Parameter des HPLC-4 Systems von der Firma VWR HITACHI®	28
Tabelle 8: HPLC Systeme.....	28
Tabelle 9: Gebundener Arzneistoffanteil nach der Ultrafiltration.....	33
Tabelle 10: Ergebnisse TransilKits.....	40
Tabelle 11: T-Test Auswertung FORT Werte Ratten versus Meerschweinchen	46
Tabelle 12: T-Test Auswertung FORT Werte Ratten.....	47
Tabelle 13: Abkürzungen.....	58
Tabelle 14: Erklärung zu in-vivo Proben.....	60

10. Anhang

Tabelle 13: Abkürzungen

ACE	ACE Säule 3C8 150 × 4.6 mm id
ACN	Acetonitril
AGP	Alpha ₁ -saures Glykoprotein
AOK	Antioxidative Kapazität
AUC	Area under the curve
CCB	Capecitabin
CsCl	Cäsium-Chlorid
DCFH-DA-Test	Dichloro-dihydro-fluorescein diacetate-Test
DNA	Desoxyribonukleinsäure
DMSO	Dimethylsulfoxid
EPR	Electron paramagnetic resonance
FORD	Free oxygen radicals defence
FORM	Free oxygen radicals monitor
FORT	Free oxygen radicals test
HPLC	High-performance liquid chromatography
HSA	Humanes Serum Albumin
iso1	Isokratisch 1
iso2	Isokratisch 2
kDa	Kilodalton
LiC	LiChrospher® Säule 100 RP-18e (5µm)
MeOH	Methanol
MG	Molekulargewicht
MRSA	Methicillinresistenter Staphylococcus aureus
NF-κB	Nuclear factor-κB
ORAC-Test	Oxygen Radical Absorbance Capacity
PBS	Phosphate buffered saline
PPB	Plasmaproteinbindung
RNA	Ribonukleinsäure
ROS	Reactive oxygen species
S	Symmetry® Säule C8 3.5µm

SL-Substanzen	SeaLife-Substanzen
TBARS	Thiobarbituric acid reactive substances
TEAC-Test	Trolox Equivalent Antioxidative Capacity- Test
TRAP-Test	Total radical trapping antioxidant potential
TNF α	Tumornekrosefaktor α

Tabelle 14: Erklärung zu in-vivo Proben

M 1	= Maus 1 , SL11 iv/sc, 18.02.2014
M 2	= Maus 2 , SL11 iv/sc, 18.02.2014
M 3	= Maus 3 , SL11 iv/sc, 18.02.2014
P-MS	= Placebo-Meerschweinchen, keine Substanz, 03.12.2013
MS 1	= Meerschweinchen 1, SL5+SL6+SL11 lokal, 21.10.2013
MS 2	= Meerschweinchen 2, SL5+SL11 lokal, 21.10.2013
MS 3	= Meerschweinchen 3, SL5+SL6 lokal, 21.10.2013
MS 4	= Meerschweinchen 4, SL5+SL6+SL11 lokal, 21.10.2013
MS 5	= Meerschweinchen 5, SL5+SL6+SL11 lokal, 21.10.2013
MS 6	= Meerschweinchen 6, SL5+SL6+SL11 lokal, 21.10.2013
MS 7	= Meerschweinchen 7, SL5+SL11 lokal, 21.10.2013
MS 8	= Meerschweinchen 8, SL6 lokal, 21.10.2013
MS 9	= Meerschweinchen 9, SL10 lokal, 03.12.2013
MS 10	= Meerschweinchen 10, SL10 lokal, 03.12.2013
MS 11	= Meerschweinchen 11, SL10 lokal, 03.12.2013
P-R 1	= Placebo-Ratte 1, keine Substanz, 23.07.2012
P-R 2	= Placebo-Ratte 2, keine Substanz, 07.10.2013
P-R 3	= Placebo-Ratte 3, keine Substanz, 07.10.2013
R 1	= Ratte 1, SL3 iv, 23.07.2012
R 2	= Ratte 2, SL3 iv, 23.07.2012
R 3	= Ratte 3, SL3 iv, 15.11.2013
R 4	= Ratte 4, SL3 iv, 15.11.2013
R 5	= Ratte 5, SL3 ip, 07.10.2013
R 6	= Ratte 6, SL3 ip, 07.10.2013
P 7	= Ratte 7, SL3 ip, 07.10.2013
R 8	= Ratte 8, SL11 iv, 16.10.2013
R 9	= Ratte 9, SL11 iv, 16.10.2013
R 10	= Ratte 10, SL11 iv, 05.11.2013

Lebenslauf

Persönliche Daten

Name: Cornelia Oberndorfer
Staatsbürgerschaft: Österreich

Schul Ausbildung

Volksschule: 1996 - 2000 in Weibern
Musikhauptschule: 2000 - 2004 in Haag am Hausruck
Bundesoberstufenrealgymnasium: 2004 - 2008 in Grieskirchen
Studium der Pharmazie: 2008 - dato in Wien

Berufsnahe Praxis

Sommer 2009: Krankenhausapotheke der Barmherzigen Schwestern in Ried im Innkreis bei Frau Mag. pharm. Elisabeth Kuc

Sommer 2010 und 2011: „St. Michael Apotheke“ in Andorf unter der Leitung von Frau Mag. pharm. Isabel Lombardini

Sommersemester 2012 und 2013: Tutorin im Rahmen des Praktikums „Methoden zur Identifizierung und Charakterisierung arzneistoffliefernder Organismen“ unter der Leitung von Herrn Dr. Christoph Dobes an der Universität Wien

Sommer 2012 und 2013: „Heilborn Apotheke“ in Bad Schallerbach unter der Leitung von Herrn Mag. Dr. Gunther Wenninger-Weinzierl

Wintersemester 2013: Geringfügige Anstellung in der Apotheke „Zum weißen Hirschen“ 7. Bezirk, in Wien, unter der Leitung von Frau Mag. pharm. Liselotte Schlederer