

Aus dem Walther-Straub-Institut
für Pharmakologie und Toxikologie
der Ludwig-Maximilians-Universität München

Vorstand Prof. Dr. med. Thomas Gudermann

**Testung potenzieller Therapeutika zur
Behandlung nach S-Lost-Exposition in
Hautmodellen**

**Examination of therapeutic agents for
treatment after sulfur mustard exposure in
skin models**

Dissertation
zum Erwerb des Doktorgrades der Humanbiologie
der Medizinischen Fakultät der
Ludwig-Maximilians-Universität zu München

vorgelegt von

Simon Rudolf Lang

aus

Weißenburg i. Bay.

2020

Mit Genehmigung der Medizinischen Fakultät
der Universität München

Berichterstatter: Privatdozent Dr. med. Kai Kehe

Mitberichterstatter: Professor Dr. med. Franz Worek

Mitberichterstatter: Professor Dr. med. Christian Schmoeckel

Mitbetreuer: Privatdozent Dr. med. Dirk Steinritz

Dekan: Professor Dr. med. dent. Reinhard Hickel

Tag der mündlichen Prüfung: 24. Juli 2020

Eidesstattliche Versicherung

Ich erkläre hiermit an Eides statt, dass ich die vorliegende Dissertation mit dem Thema „Testung potenzieller Therapeutika zur Behandlung nach S-Lost-Exposition in Hautmodellen“ selbständig verfasst, mich außer der angegebenen keiner weiteren Hilfsmittel bedient und alle Erkenntnisse, die aus dem Schrifttum ganz oder annähernd übernommen sind, als solche kenntlich gemacht und nach ihrer Herkunft unter Bezeichnung der Fundstelle einzeln nachgewiesen habe.

Ich erkläre des Weiteren, dass die hier vorgelegte Dissertation nicht in gleicher oder in ähnlicher Form bei einer anderen Stelle zur Erlangung eines akademischen Grades eingereicht wurde.

München, 12. Februar 2020

(Simon Lang)

Zusammenfassung

Bei dem Hautkampfstoff Schwefelost (S-Lost) handelt es sich um einen chemischen Kampfstoff, der seit dem 1. Weltkrieg in verschiedenen militärischen Konflikten eingesetzt wurde. Trotz der Vereinbarungen durch die Chemiewaffenkonvention S-Lost nicht mehr einzusetzen und die Restbestände zu vernichten, besteht weiterhin die Gefahr einer Verwendung in asymmetrischen Konflikten oder Terrorszenarien. Gut dokumentierte Vergiftungsfälle aus dem Bürgerkrieg in Syrien verdeutlichen, wie wichtig eine intensive Forschung an Therapieoptionen auf diesem Gebiet ist.

Die Symptomatik nach einer S-Lost-Exposition betrifft vor allem die Augen, Atemwege und die Haut. Typisch ist eine zeitliche Verzögerung bis zum Einsetzen der ersten Anzeichen einer Intoxikation. Durch eine anhaltende Entzündungsreaktion und Gewebnekrosen verläuft der Heilungsprozess sehr langsam und es können irreversible Narben und Hautverfärbungen zurückbleiben. Bis heute konnte der molekulare Pathomechanismus von S-Lost nicht vollständig aufgeklärt werden und daher fehlt es an zielgerichteten Behandlungsoptionen. Die derzeitigen therapeutische Ansätze fokussieren sich ausschließlich auf die symptomatische Behandlung von S-Lost-Vergifteten.

Im Bereich der Toxikologie sind *in vitro* Modelle ein wissenschaftlich etablierter Standard. Zur besseren Abbildung der physiologischen Bedingungen und zur Erhöhung der Aussagekraft für eine spätere *in vivo* Translation, wurde am Institut für Pharmakologie und Toxikologie der Bundeswehr eine Co-Kultur-Testbatterie etabliert. Hierbei handelt es sich um ein Hautmodell bestehend aus der Keratinozyten-Zelllinie HaCaT und der humanen Monozyten-Zelllinie THP-1. Ein standardisiertes Vergiftungsprotokoll mit anschließenden Assays zur Bestimmung der Apoptose und Nekrose sowie den Entzündungsmarkern IL-6 und IL-8 erlaubt eine experimentelle Evaluierung potenzieller S-Lost-Therapeutika.

Der Naturstoff Berberin zeigte in einer Studie mit der Testbatterie anti-apoptotische und antientzündliche Eigenschaften. Für Berberin ist kein spezifischer Wirkmechanismus beschrieben, allerdings zeigte es in unterschiedlichen Versuchen eine Vielzahl pharmakologischer Effekte. Die Behandlung eine Stunde nach S-Lost-Exposition führte konzentrationsabhängig zu einer Reduktion der IL-6- und IL-8-Freisetzung sowie zu einer signifikanten Abnahme der Apoptose. Dieses Ergebnis zeigte, dass die pleiotropen Effekte von Berberin eine S-Lost-Intoxikation positiv modulieren können und es möglicherweise eine alternative therapeutische Option zu etablierten Entzündungshemmern darstellen kann.

Eine zweite Substanz, die im Wirkstoffscreening zytoprotektive und antiinflammatorische Wirkung zeigte, war der Nekrose-Inhibitor Necrosulfonamid. Entgegen der Erwartung war die Zytoprotektivität nicht auf eine Reduktion der Nekrose zurückzuführen, sondern es kam zu einer Verminderung der Apoptose. Eine signifikante Absenkung der Entzündungsmarker IL-6 und IL-8 konnte in der mit 5 μM Necrosulfonamid behandelten Gruppe für allen Vergiftungsstufen gezeigt werden. Da Necrosulfonamid in erster Linie die über MLKL-induzierte Nekroptose inhibiert und deren Rolle am S-Lost vermittelten Zelltod noch unerforscht ist, zeigten die Untersuchungen, dass eine mechanistische Aufklärung der Nekroptose weitere grundlegende Erkenntnisse über die molekulare Toxizität von S-Lost liefern kann.

Abstract

Sulfur mustard is a chemical warfare agent that was used in various military conflicts since WWI. Despite a ban by the chemical weapons convention, considerable amounts of sulfur mustard are still in stock which results in a potential risk for future use particularly in scenarios of asymmetric warfare and terrorist attacks. Well documented cases from the war in Syria underline the importance of further studies on new therapeutic options in this area.

Symptoms of a sulfur mustard exposure target above all the eyes, the respiratory system and the skin. One of the most typical indicators for an intoxication is the latency between exposure and the occurrence of the first symptoms. Due to a chronic inflammation and necrotic tissue damage the wound healing process is slow and eventually results in permanent scar tissue.

A lack of therapeutic options is caused by the incomplete understanding of the pathomechanisms of sulfur mustard. Already existing therapies merely focus on symptomatic treatment with the goal to reduce inflammatory reactions. Since skin tissue is sufficient to trigger intoxication, skin models were established as an appropriate approach for testing potential therapeutics.

In vitro models are an established scientific method in toxicology. A co-culture model consisting of HaCaT skin cells and the monocytic cell line THP-1 was introduced by the Bundeswehr Institute of Pharmacology and Toxicology as an *in vitro* test system. With its help, it is possible to mimic a more physiological environment as compared to a mono-culture, and the results are more promising for an *in vivo* translation. Standardized protocols and assays for necrosis, apoptosis and the inflammation markers IL-6 and IL-8 enable an evaluation of a wide range of potential therapeutics.

In a study, Berberine, a naturally occurring substance, showed anti-apoptotic and anti-inflammatory effects. No specific mode of action was described for berberine so far, although, it showed a variety of pharmacological capacities in different studies. Post-treatment after sulfur mustard exposure resulted in a significant reduction of apoptosis and the inflammation markers IL-6 and IL-8. Obviously, Berberine offers an interesting therapeutic option to positively modulate a sulfur mustard intoxication.

Another substance with cytoprotective and anti-inflammatory outcome was the necroptosis inhibitor Necrosulfonamide. Unexpectedly, Necrosulfonamide showed anti-apoptotic effects rather than reducing necrosis. Additionally, IL-6 and IL-8 levels were reduced significantly by 5 μ M Necrosulfonamide post-treatment. Necrosulfonamide is defined as a MLKL-inhibitor and, thus, reduces necroptotic cell death. Since no research on necroptosis after sulfur mustard exposure exists, these results form a basis for further mechanistical understanding of sulfur mustard-induced cell damage.

Erklärung über den Eigenanteil

Anti-apoptotic and moderate anti-inflammatory effects of berberine in sulfur mustard exposed keratinocytes

Anhand in der Literatur beschriebener Wirkmechanismen wurden mögliche Wirkstoffe für eine serielle Testung und deren Einsatz nach einer S-Lost-Exposition ausgewählt. Hier führte ich eine umfangreiche Literaturrecherche sowohl zur Toxikodynamik von S-Lost wie auch zu möglichen anti-inflammatorischen und zytoprotektiven Wirkstoffen durch. Basierend auf der Literaturrecherche wurde Berberin als möglicher Wirkstoffkandidat für eine Testung in der standardisierten Testbatterie ausgewählt. Im experimentellen Teil plante, koordinierte und führte ich die *in vitro* Experimente in einem Zellkulturmodell durch. Neben der fortlaufenden Zellkultivierung und den Vergiftungsexperimenten führte ich Adjustierungen im Test-Setting (z.B. Festlegung der Wirkstoffkonzentrationen, Lösungsmittel, Zellzahlen) durch und etablierte Methoden zur Automatisierung und damit Durchsatzsteigerung in der Datenerhebung. Im Anschluss wertete ich die Daten unter Verwendung verschiedener Analyse-Programme aus und visualisierte die Ergebnisse. Auf Basis dieser Ergebnisse erstellte ich ein Manuskript, welches ich als „Corresponding Author“ bei der Fachzeitschrift *Toxicology Letters* einreichte und anschließend im Review-Prozess entsprechend der Reviewer-Vorgaben anpasste.

Necrosulfonamide - Unexpected effect in the course of a sulfur mustard intoxication

Zur Gewinnung neuer Erkenntnisse im Bereich der zellulären Zytotoxizität von S-Lost sollte die Beteiligung der Nekroptose am Untergang der Zellen näher untersucht werden. In diesem Projekt war ich vorrangig für die Versuchsdurchführung, Datenerhebung und statistische Auswertung verantwortlich. Hier wendete ich die optimierten Methoden aus dem vorangegangenen Projekt (Anti-apoptotic and moderate anti-inflammatory effects of berberine in sulfur mustard exposed keratinocytes) an. Zu der Publikation trug ich die Abbildungen bei und lieferte fachliche Beratung. Den Review-Prozess und die nachträglich geforderten Nachweise bzw. Versuche führte ich selbst durch und passte das Manuskript entsprechend an.

Abbildungsverzeichnis

1.1	Strukturformel eines S-Lost-Moleküls.	2
1.2	Ein Poster der US-amerikanischen Streitkräfte aus der Zeit des 2. Weltkriegs. https://www.flickr.com/photos/medicalmuseum/5404772407/in/album-72157683971090082/ (zuletzt geprüft am 02.02.2020)	3
1.3	S-Lost-Verwundungen am Arm eines Kämpfers der „Freien Syrischen Armee“.	5

Abkürzungsverzeichnis

ABC	Atomar, Biologisch und Chemisch
AK	Adenylatkinase
ATM	Ataxia Telangiectasia Mutated (Enzym zur Signalübermittlung bei DNA-Schäden)
ATP	Adenosintriphosphat
ATR	Ataxia telangiectasia and Rad3 related (siehe ATM)
COPD	Chronic obstructive pulmonary disease
COX-2	Cyclooxygenase-2
CYP	Cytochrom P450
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonukleinsäure
ELISA	Enzyme-linked Immunosorbent Assay
G-Day	Geplanter Ersteinsatz von Gas während des 2. Weltkriegs durch die Achsenmächte
HaCaT	humane Keratinozytenzelllinie
IL-1β	Interleukin-1 β
IL-6	Interleukin-6
IL-8	Interleukin-8
IUPAC	International Union of Pure and Applied Chemistry
LC	Lethal concentration
MAP	Mitogen Activated Protein
MLKL	Mixed lineage kinase domain-like protein
MMP-9	Matrix Metalloprotease-9
NAD⁽⁺⁾	Nicotinamidadeninucleotid (oxidierte Form)
NATO	North Atlantic Treaty Organization
NCCN	National Comprehensive Cancer Network
N-Lost	Stickstofflost
OPCW	Organisation for the Prohibition of Chemical Weapons
p53	Protein p53
PARP	Poly(ADP-Ribose)-Polymerase
RIPK3	Receptor-interacting serine/threonine-protein kinase 3
RSDL	Reactive Skin Decontamination Lotion
S-Lost	Schwefelost
THP-1	Humane Monozytenzelllinie
TNF-α	Tumornekrosefaktor- α
US	United States
USAMRICD	U.S. Army Medical Research Institute of Chemical Defense
WWI	World War 1
γH2AX	Histon-H2AX (Protein im eukaryontischen Zellkern)

Publikationsliste

Publikationen der kumulativen Dissertation

Simon Lang, Tanja Popp, Christian Silvester Kriegs, Annette Schmidt, Frank Balszuweit, Georg Menacher, Kai Kehe, Horst Thiermann, Thomas Gudermann, Dirk Steinritz, (2018). Anti-apoptotic and moderate anti-inflammatory effects of berberine in sulfur mustard exposed keratinocytes, *Toxicology Letters*, 293, 2-8.

Georg Menacher, Frank Balszuweit, **Simon Lang**, Horst Thiermann, Kai Kehe, Thomas Gudermann, Annette Schmidt, Dirk Steinritz, Tanja Popp, (2018). Necro-sulfonamide - Unexpected effects in the course of a sulfur mustard intoxication, *Chemico-Biological Interactions*, 298, 80-85.

Weitere Publikationen

Simon Lang, Tanja Popp, Horst Thiermann, Stefan Eder, Mathias Port, Dirk Steinritz, (2016). Zwei Noxen ein Wirkstoff: Methylbardoxolone (CDDO-Me) bei Exposition mit S-Lost und ionisierender Strahlung, *Wehrmedizinische Monatsschrift*, 60, 402-403.

Simon Wagner, **Simon Lang**, Tanja Popp, Annette Schmidt, Kai Kehe, Horst Thiermann, Dirk Steinritz, (2018). Untersuchung von selektiven und nicht-selektiven Cyclooxygenase Inhibitoren (COX-Hemmer) bei S-Lost induzierten Zellschäden, *Wehrmedizinische Monatsschrift*, 62, 32-33.

Simon Lang, Yi-hua Jan, Kai Kehe, Horst Thiermann, Jeffrey D. Laskin, Dirk Steinritz, (2018). Vom Gefechtsfeld in die Klinik und zurück - neue Wege in der Lost-Forschung, *Wehrmedizinische Monatsschrift*, 62, 444-445. (nominiert für den Heinz-Gerngroß-Förderpreis)

Simon Wagner, **Simon Lang**, Tanja Popp, Annette Schmidt, Horst Thiermann, Dirk Steinritz, Kai Kehe, (2019). Evaluation of selective and non-selective cyclooxygenase inhibitors on sulfur mustard induced pro-inflammatory cytokine formation in normal human epidermal keratinocytes, *Toxicology Letters*, 312, 109-117.

Dirk Steinritz, **Simon Lang**, Tanja Popp, Markus Siegert, Simone Rothmiller, Andreas Kranawetvogl, Annette Schmidt, Harald John, Thomas Gudermann, Horst Thiermann, Kai Kehe, (2019). Skin sensitizing effects of sulfur mustard and other alkylating agents in accordance to OECD guidelines, *Toxicology Letters*, 314, 172-180.

Posterpräsentationen

Simon Lang, Tanja Popp, Horst Thiermann, Stefan Eder, Matthias Port, Dirk Steinritz. Zwei Noxen ein Wirkstoff: Methylbardozone (CDDO-Me) bei Exposition mit S-Lost und ionisierender Strahlung, 47. Jahreskongress der Deutschen Gesellschaft für Wehrmedizin und Wehrpharmazie e.V. (DGWMP), Ulm, 2016.

Simon Lang, Tanja Popp, Horst Thiermann, Stefan Eder, Matthias Port, Dirk Steinritz. Two noxious agents one therapeutic option: Methylbardozone (CDDO-Me) therapy for sulfur mustard and radiation exposure. 2nd German Pharm-Tox Summit, Heidelberg, 2017.

Simon Lang, Tanja Popp, Christian Silvester Kriegs, Annette Schmidt, Frank Balszuweit, Georg Menacher, Kai Kehe, Horst Thiermann, Thomas Gudermann, Dirk Steinritz. Anti-apoptotic and anti-inflammatory effects of berberine in sulfur mustard exposed keratinocytes, 16th Medical Chemical Defense Conference (MCDC), München, 2017.

Simon Lang, Tanja Popp, Horst Thiermann, Stefan Eder, Matthias Port, Dirk Steinritz. Modulation of Nrf2 and NF- κ B pathways by Methylbardozone (CDDO-Me) in sulfur mustard and radiation exposed keratinocytes, 16th Medical Chemical Defense Conference (MCDC), München, 2017.

Simon Wagner, **Simon Lang**, Tanja Popp, Annette Schmidt, Kai Kehe, Horst Thiermann, Dirk Steinritz. Investigation of selective and non-selective cyclooxygenase-inhibitors on sulfur mustard (SM) induced cell damage. 3rd German Pharm-Tox Summit, Göttingen, 2018.

Simon Lang, Yi-Hua Jan, Dirk Steinritz, Horst Thiermann, Kai Kehe, Laurie B. Joseph, Gabriella M. Composto, Diane E. Heck, Jeffrey D. Laskin. Cell cycle specific sensitivity of human keratinocytes to nitrogen mustard (HN2). 57th Annual Meeting and ToxExpo Society of Toxicology (SOT), San Antonio, TX, 2018.

Simon Lang, Markus Siegert, Simone Rothmiller, Tanja Popp, Kai Kehe, Horst Thiermann, Dirk Steinritz. Skin sensitizing mechanism of sulfur mustard and other alkylating agents in accordance to OECD guidelines. 4th German Pharm-Tox Summit, Stuttgart, 2019.

Simon Lang, Simon Wagner, Tanja Popp, Kai Kehe, Horst Thiermann, Dirk Steinritz. Systematic evaluation of anti-inflammatory effects by cyclooxygenase inhibitor administration after sulfur mustard exposure. 17th Medical Chemical Defense Conference (MCDC), München, 2019.

Inhaltsverzeichnis

Eidesstattliche Versicherung	I
Zusammenfassung	II
Abstract	III
Erklärung über den Eigenanteil	IV
Abbildungsverzeichnis	V
Abkürzungsverzeichnis	VI
Publikationsliste	VII
Posterpräsentationen	VIII
1 Einführung	1
1.1 S-Lost	1
1.2 Historisches, militärischer Einsatz und aktuelle Bedrohungssituation	2
1.3 Klinisches Bild einer S-Lost-Exposition	4
1.4 Molekulare Toxikologie von S-Lost	6
1.5 Expositionsprophylaxe und Therapie einer S-Lost-Intoxikation	7
1.6 Modelle zur Testung potentieller Therapeutika	8
1.7 Methodik der Testbatterie	9
2 Zielsetzung der Arbeit	10
2.1 Effekte von Berberin in S-Lost-exponierten Zellkulturmodellen	10
2.2 Auswirkung der Nekroptose-Inhibition mit Necrosulfonamid auf die S-Lost-vermittelte Toxizität in Keratinozyten-Modellen	11
3 Ergebnisse und veröffentlichte Publikationen	12
3.1 Anti-apoptotic and moderate anti-inflammatory effects of berberine in sulfur mustard exposed keratinocytes	12
3.2 Necrosulfonamide - Unexpected effect in the course of a sulfur mustard intoxication	20
4 Zusammenfassung der Ergebnisse	27
5 Diskussion und Ausblick	28
6 Literatur	31

1 Einführung

1.1 S-Lost

Seit seiner ersten militärischen Verwendung durch deutsche Truppen im Jahr 1917 ist Schwefellost, kurz auch S-Lost genannt, ein gefürchteter chemischer Kampfstoff. Aufgrund seiner stark hautschädigenden Wirkung wird S-Lost als Hautkampfstoff kategorisiert. Zu den weiteren Vertretern dieser Gruppe zählen unter anderem Stickstofflose (N-Loste) und bestimmte organische Arsenverbindungen wie beispielsweise Lewisit.

Das Akronym „Lost“ ist auf die beiden Chemiker Lommel und Steinkopf zurückzuführen, welche ein Verfahren entwickelten, um die Substanz erstmals großtechnisch herzustellen. Neben der nach IUPAC chemisch korrekten Bezeichnung Bis(2-chlorethyl)sulfid (chemische Formel siehe Abbildung 1.1) sind im deutschen Sprachgebrauch auch Yperit, Gelbkreuz oder Schwefellost gängige Synonyme. Die häufig verwendete Bezeichnung „Senfgas“ ist unter physikochemischen Gesichtspunkten nicht korrekt, da es sich bei der Reinsubstanz nicht um ein Gas, sondern um eine klare, ölige Flüssigkeit handelt. Charakteristisch ist allerdings der starke Geruch nach Knoblauch oder Senf, welcher für die Bezeichnungen „Senfgas“ oder englisch auch „Sulfur Mustard“ namensgebend war (siehe Abbildung 1.2). Umstritten ist, ob dieser Geruch von Verunreinigungen hervorgerufen wird, oder ob die Reinsubstanz selbst diese Wahrnehmung verursacht.

Neben der Haut zählen vor allem die Augen und die Lunge als Hauptangriffspunkte einer S-Lost-Vergiftung. Während die Symptomatik einer Hautkontamination erst mit mehrstündiger Verzögerung auftritt, zeigen sich die Folgen eines Augen- oder Lungenkontakts schon deutlich früher. So kann eine Kontamination des Auges bereits nach einer Stunde zu erhöhter Lichtempfindlichkeit mit einer Einschränkung des Sehvermögens führen. Im Falle einer Inhalation kommt es zu einer massiven Reizung der Atemwege. Die ersten Symptome einer Intoxikation des Respirationstraktes, wie Atemnot, Husten und Halsschmerzen, können sich in Abhängigkeit zur aufgenommenen Dosis bereits nach wenigen Stunden äußern.

Zusätzlich zu der verzögert auftretenden Symptomatik stellt vor allem das Fehlen einer zielgerichteten Therapieoption eine Herausforderung für die medizinische Versorgung von S-Lost-kontaminierten Personen dar. Neben akutmedizinischen Maßnahmen, wie einer oberflächlichen Hautdekontamination, Augenspülung oder Sauerstoffgabe, werden die Patienten hauptsächlich symptomatisch behandelt. Ein tieferes Verständnis der Toxikodynamik von S-Lost und die Testung von Arzneimitteln zur Therapie liefern einen unerlässlichen Beitrag, um die zukünftige Versorgung von Vergiftungsopfern zu verbessern.

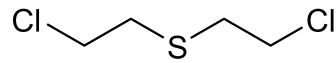


Abbildung 1.1: Chemische Struktur eines S-Lost Moleküls.

1.2 Historisches, militärischer Einsatz und aktuelle Bedrohungssituation

Erste Hinweise auf die Synthese von S-Lost lieferte der französische Chemiker Despretz im Jahr 1822 [20]. Die Beschreibungen seiner Versuche erlauben den Schluss, dass er S-Lost mit einem niedrigen Reinheitsgrad herstellte. Toxische Effekte wurden in seiner Veröffentlichung allerdings noch nicht erwähnt. Erst der britische Wissenschaftler Frederick Guthrie und der deutsche Apotheker Albert Niemann beschrieben im Jahr 1859 reizende Eigenschaften und Blasenbildung nach Hautkontakt mit einer Substanz, bei der es sich vermutlich um S-Lost handelte [30, 57]. Victor Meyer gelang es im Jahr 1866 mit einer überarbeiteten Synthese „Thiodiglykolchlorid“ in hoher Reinheit zu gewinnen [55]. Die Substanz verursachte bei einem seiner Praktikanten starke Hautausschläge und eine Augenentzündung, woraufhin er toxikologische Untersuchungen an Kaninchen veranlasste. Diese Experimente bestätigten die Vermutung, dass es sich dabei um eine hochtoxische Verbindung handelte.

Als man im Rahmen des ersten Weltkriegs nach Möglichkeiten forschte, um Bewegung in den festgefahrenen Stellungskrieg zu bringen, kam man wieder auf diese Verbindung. Unter der Leitung von Fritz Haber, dem Direktor des Kaiser-Wilhelm-Instituts für Physikalische Chemie und Elektrochemie in Berlin-Dahlem, wurde der Einsatz chemischer Kampfstoffe für den militärischen Einsatz erprobt. Im Rahmen dieser Forschung entwickelten die beiden Wissenschaftler Wilhelm Lommel und Georg Wilhelm Steinkopf ein Verfahren zur großtechnischen Synthese von S-Lost. Die vor allem in Soldatenkreisen gebräuchliche Bezeichnung „Gelbkreuz“ ist auf die Kennzeichnung der Granaten, in welchen S-Lost verschossen wurde, zurückzuführen. Der erstmalige Einsatz durch deutsche Truppen fand am 12. Juli 1917 während der dritten Flandernschlacht bei Ypern statt [51]. Als Defensivkampfstoff sollte das S-Lost den Vorstoß der alliierten Truppen behindern. Da der Kampfstoff zu großen Teilen über die Haut resorbiert wird, boten die Gasmasken den Angreifern kaum Schutz und jeder mögliche Kontakt wurde zur Bedrohung. Im weiteren Verlauf des Krieges gewann der Einsatz von S-Lost aufgrund seiner Sesshaftigkeit vor allem bei Defensivszenarien an taktischer Bedeutung für das deutsche Heer. Die kontaminierten Gebiete konnten teilweise über Wochen nicht ohne das Risiko schwerer Verletzungen betreten werden [12]. Erst im letzten Kriegsjahr 1918 gelang auch den Alliierten Mächten die Produktion von Senfgas in Mengen, die für den militärischen Einsatz relevant waren. Insgesamt wurden im Laufe des ersten Weltkriegs mehr als 12.000 Tonnen Gelbkreuz-



Abbildung 1.2: Dieses Poster wurde im Zeitraum von 1941-1945 durch das Texas Military Forces Museum's Art Department at Camp Barkeley, Texas produziert. Zu finden ist es im National Museum of Health and Medicine, Otis Historical Archives. Das Poster sollte die Soldaten für die geruchliche Wahrnehmung von S-Lost sensibilisieren.

kampfstoff hergestellt, wovon ein Großteil durch deutsche Streitkräfte eingesetzt wurde [77]. Obwohl Lungenkampfstoffe wie Phosgen bei Betrachtung der absoluten Zahlen eine größere Anzahl an Opfern und Verwundeten forderten, war S-Lost bezüglich der Kenngröße „Verletzte pro eingesetzte Tonne“ die mit Abstand effektivste Substanz [77], was ihm letztlich den Beinamen „König der Kampfgase“ einbrachte [91].

In den Jahren zwischen den beiden Weltkriegen wurde S-Lost vereinzelt in regionalen Konflikten eingesetzt, aber bei Weitem nicht in dem Maßstab wie im ersten Weltkrieg [49]. Auch auf den Hauptschauplätzen des zweiten Weltkriegs in Europa spielte S-Lost keine Rolle. Aufmerksamkeit erregte allerdings die Versenkung des US-Frachters SS John Harvey durch die deutsche Luftwaffe im Hafengebiet von Bari 1943. Das Schiff hatte große Mengen S-Lost geladen, welche durch die Bomberattacke freigesetzt wurden und über 600 Opfer forderte [1]. Pläne von einem „G-Day“, bei dem 30 deutsche Städte unter anderem mit S-Lost und anderen chemischen Kampfstoffen angegriffen werden sollten, wurden durch die Alliierten nicht umgesetzt [94].

Mit dem Ende des zweiten Weltkriegs bestand kein Bedarf mehr für die großen Vorräte chemischer Waffen. Um einen erneuten Einsatz auszuschließen und das Risiko der weiteren Lagerung zu vermeiden, wurden große Teile der überflüssigen Kampfmittel in Nord- und Ostsee verklappt. Da die Versenkungsgebiete nicht geräumt wurden und die Strömung viele der Gasgranaten im Meer verteilte, stellen die Kampfstoffe noch immer eine andauernde Gefahr für Fischer und Strandurlauber dar [8, 103].

Die Spannungen während des kalten Krieges und schwelende Konflikte, vor allem im mittleren Osten, veranlassten etliche Regime, weiterhin Chemiewaffenprogramme

zu unterhalten. Zum wiederholten Einsatz von Senfgas kam es dann während des Iran-Irak-Krieges von 1980 bis 1988. Nachweislich führte der Einsatz von S-Lost in diesem Konflikt zu einer hohen Anzahl ziviler Opfer, vor allem in Teilen der iranischen und kurdischen Bevölkerung [92, 22].

Mit Gründung der Organisation zum Verbot chemischer Waffen (Organisation for the Prohibition of Chemical Weapons, OPCW) im Jahr 1997 sollte der zukünftige Einsatz von chemischen Waffen unterbunden werden. Alle Unterzeichnerstaaten der Chemiewaffenkonvention erklären, dass sie unter keinen Umständen Chemiewaffen entwickeln, produzieren und einsetzen, sowie die bevorrateten Altbestände vernichten [60]. Durch die Arbeit der OPCW gelang es bis Ende 2018, über 96 % aller deklarierten Chemiewaffen der Unterzeichnerstaaten zu vernichten [59]. Wie riskant allerdings auch die Vernichtung von chemischen Waffen sein kann, zeigte ein Unfall, der sich 2014 in Deutschland bei der Verbrennung syrischer S-Lost-Rückstände ereignete [83].

Trotz aller Anstrengungen belegen Vorkommnisse aus dem Nahen und Mittleren Osten, dass die Bedrohung durch chemische Waffen weiterhin existiert. Beträchtliche Altbestände und das Know-how aus Giftgasprogrammen überdauerten wechselnde Regime in der Region und stellen auch gegenwärtig eine ernstzunehmende Bedrohung dar. Gut dokumentierte Fälle von mit S-Lost verwundeten US-Soldaten gab es beispielsweise aus dem ab 2003 geführten Irakkrieg [15]. Auch in den asymmetrischen Folgekonflikten im Irak und Syrien wurde wiederholt S-Lost eingesetzt. Es gibt Fälle, in denen der Kampfstoff durch Artillerie verschossen wurde, aber auch über die Ausbringung unter Zuhilfenahme von Sprengfallen wurde berichtet (siehe Abbildung 1.3) [72, 45]. Ein nachhaltiger militärischer Nutzen war durch Attacken dieser Art nicht zu erwarten. Der Einsatz zielte in erster Linie darauf ab, Verunsicherung und Schrecken in der Bevölkerung zu verbreiten.

Die mediale Resonanz, eine Vielzahl von Opfern und das Fehlen einer zielgerichteten Therapie führt dazu, dass chemische Waffen für terroristische Aktivitäten ein besonderes Potenzial darstellen. Dazu kommt, dass Wissen zu chemischen Waffen und Synthesevorschriften über die modernen Kommunikationsmittel schnell übertragbar sind. Da chemische Grundkenntnisse und die Verfügbarkeit der Ausgangsstoffe zur Herstellung von S-Lost ausreichen, stellt die Gefahr einer terroristischen Verwendung ein weltweit reales Bedrohungsszenario dar. Aufgrund der fatalen Folgen bei relativ geringem Aufwand sprechen Dacre und Goldman auch von der „Atombombe des armen Mannes“ [18].

1.3 Klinisches Bild einer S-Lost-Exposition

Typisch für eine Exposition mit S-Lost ist die zeitliche Verzögerung bis zum Auftreten erster Symptome. Die Expositions-dosis und die Expositions-dauer sind entscheidend für die pathophysiologischen Veränderungen und den weiteren Krankheitsverlauf nach der Intoxikation. Aufgrund der meist unkontrollierten Freisetzung und der Sesshaftigkeit ist die Beteiligung mehrerer Organe beziehungsweise Körperregionen im Falle einer Exposition sehr wahrscheinlich.

Da die Augen die höchste Sensitivität bei Kontakt mit S-Lost zeigen, sind dort in der Regel auch die ersten Symptome einer Kontamination feststellbar. Es kommt zu gesteigertem Tränenfluss, starken Schmerzen, eingetrübter Sicht und erhöhter Lichtempfindlichkeit [81]. Ausgehend von den auftretenden Symptomen wird die



Abbildung 1.3: Verwundung eines Kämpfers der „Freien Syrischen Armee“ nach Explosion einer Sprengfalle mit S-Lost in Al-Bab, Syrien im November 2016. Die Verwundeten wurden in einem türkischen Militärkrankenhaus an der Syrisch-Türkischen Grenze behandelt [45].

Augenverletzung als mild, moderat oder schwer kategorisiert [100]. Die Symptomatik reicht von einer leichten Konjunktivitis mit Lidkrämpfen bis hin zu schwerwiegenden Hornhautveränderungen. Durch die Ausbildung eines Lidödems tritt in der Folge häufig eine temporäre Erblindung ein, die im Mittel nach etwa zehn Tagen mit einer Regeneration des Sehvermögens ausheilt [69, 44]. Wurden die Augen mit einer sehr hohen Dosis kontaminiert ($> 200\text{mg} \cdot \text{min} / \text{m}^3$), ist auch eine dauerhafte, irreversible Erblindung möglich [9]. Allerdings bleiben auch im Falle einer reversiblen Erblindung häufig Folgeschäden, die als „mustard gas keratopathy“ bezeichnet werden und im Laufe der Zeit durch eine Eintrübung der Hornhaut sichtbar werden [44]. Symptomatische Spätschäden durch eine Exposition der Augen treten bei nahezu 90 % der Fälle auf [44].

Neben der Symptomatik am Auge äußern sich frühe Vergiftungserscheinungen bei Exposition der Atemwege. Im Falle einer Inhalation von Lost-Dämpfen oder Lost-Aerosolen werden die Schleimhäute der oberen Atemwege gereizt und Husten setzt ein [44]. Die Schwere der Komplikationen wird auch hier entscheidend von der aufgenommenen Dosis bestimmt. Für den tödlichen Verlauf einer S-Lost-Intoxikation sind meist schwere Lungenschädigungen verantwortlich [97]. Zu den histologischen Veränderungen des Lungengewebes kommt die Ausbildung von Pseudomembranen, Lungenödemem und eine erhöhte Anfälligkeit für Sekundärinfektionen [99]. Da speziell diese Sekundärinfektionen in der prä-antibiotischen Zeit des ersten Weltkriegs noch nicht effektiv therapiert werden konnten, stellte eine infektiöse Lungenentzündung häufig das Todesurteil für den zuvor kontaminierten Soldaten dar [76]. Aber auch mit der Verfügbarkeit von Antibiotika haben die Effekte auf die Atemorgane schwerwiegende Folgen für Betroffene [5]. Durch die irreversible Schädigung der Lunge kommt es zu bedeutenden Langzeitkomplikationen. Das pathologische Bild dieser Lungenaffektion, auch „Mustard Lung“ genannt, unterscheidet sich trotz ähnlicher Symptomatik in wesentlichen Punkten von Asthma bronchiale und COPD [70]. Trotz initialer Unterschiede, beispielsweise im Entzündungsgeschehen, können sich chronische Lungenkrankheiten wie COPD, Asthma oder eine chronische Bronchitis manifestieren [65].

Schon ein Tropfen mit einigen Milligramm reinem S-Lost auf der Haut ist ausreichend,

um eine schmerzhafte, mit bernsteinfarbener Flüssigkeit gefüllte Lost-Blase zu verursachen [106]. Der Blasenbildung geht eine Latenzphase von mehreren Stunden voraus, in der es zu einer Hautrötung mit Juckreiz kommt [44]. Hautaffektionen sind die Hauptursache für die vergleichsweise lange Hospitalisierung von S-Lost-Verwundeten, da sich der Heilungsprozess über einen langen Zeitraum erstreckt. Die tiefen, nekrotischen Wunden verheilen erst nach mehreren Wochen und die Verwundeten sind teilweise ihr Leben lang durch Narben und Pigmentstörungen gezeichnet (siehe Abbildung 1.3) [71].

Im Vergiftungsgeschehen mit S-Lost spielt die orale Aufnahme nur eine untergeordnete Rolle, aber auch die kutane und die inhalative Exposition führt zu systemischen Effekten. Beispielsweise können unspezifische gastrointestinale Symptome wie schmerzhafte Übelkeit, Durchfall und Erbrechen auftreten [4]. In diesem Fall wird der Effekt nicht durch eine direkte Einwirkung auf die Mukosa des Verdauungstraktes erzielt, sondern es handelt sich vermutlich um eine reflexartige Reaktion, in deren Folge es auch zu einem bedrohlichen Flüssigkeits- und Elektrolytdefizit kommen kann [4]. Ebenso führen hohe Intoxikationsdosen zu einer Knochenmarksdepression und in der Folge zu Veränderungen des Blutbildes. Eine Myelosuppression äußert sich primär in einer reduzierten Leukozytenzahl, da Leukozyten die kürzeste Halbwertszeit aller Blutzellen aufweisen [76]. Schon bei Lost-Verwundeten des ersten Weltkriegs konnte eine Korrelation zwischen der Schwere der Leukozytopenie und dem prognostischen Verlauf festgestellt werden [46]. Die zytotoxischen Eigenschaften führten in der Folge dazu, dass der chemotherapeutische Einsatz bei Tumorerkrankungen untersucht wurde [28]. S-Lost und die später entwickelten N-Lost-Derivate gelten als die Ursprungssubstanzen einer effektiven Chemotherapie und Vertreter der Substanzklasse der „Alkylanzien“ werden teilweise noch heute im klinischen Alltag eingesetzt [61].

1.4 Molekulare Toxikologie von S-Lost

Aufgrund der chemischen Reaktivität wird S-Lost auch als alkylierender Hautkampfstoff bezeichnet, da es in der Lage ist, mit nahezu allen biologischen Strukturen des menschlichen Körpers Alkylierungsreaktionen einzugehen. In Proteinen sind es vor allem die Cystein-Reste, die durch Lost alkyliert werden und deren Alkylierungszustand auch als Biomarker in der Verifikationsanalytik verwendet wird [58, 83, 26]. S-Lost besitzt zwei reaktive Chlorethyl-Seitenketten, welche Quervernetzungen von Biomakromolekülen verursachen und damit strukturelle und funktionelle Änderungen hervorrufen können.

Die Reaktion von S-Lost mit zellulärer DNA wurde schon vergleichsweise früh beschrieben. Neben der einfachen DNA-Alkylierung ist S-Lost aufgrund seiner Bifunktionalität zusätzlich in der Lage, DNA-Quervernetzungen zu verursachen [50]. Mit einem Anteil von etwa 61 % aller DNA-Addukte ist Guanin mit einer Alkylierung an der N7-Position das häufigste DNA-Addukt nach Lost-Exposition [52, 40]. Neuere Untersuchungen bestätigten, dass die N7-Guanin-Addukte das häufigste Reaktionsprodukt darstellen, es aber Schwankungen in Abhängigkeit von der Messmethode und der exponierten Matrix gibt [107]. Im Allgemeinen korreliert die Toxizität der alkylierenden Substanzen maßgeblich mit der Fähigkeit, DNA-Modifikationen herbeizuführen und in der Folge zelluläre Prozesse zu verändern. Für die hohe Zytotoxizität von S-Lost wird vor allem die Möglichkeit zur Ausbildung von DNA-Quervernetzungen verantwortlich gemacht [24, 37]. Die Schädigung der DNA führt zu einem Arrest des Zellzyklus und zu einer Aktivierung zellulärer DNA-Reparaturmechanismen. Für

die Detektion der DNA-Schädigung und die anschließende Initiierung der Schadensbekämpfung werden vor allem die Proteine ATM (Ataxia-teleangiectasia mutated protein) und ATR (Ataxia-teleangiectasia and Rad3-related kinase) verantwortlich gemacht [37, 78]. Im nachfolgenden Downstream-Prozess kommt es durch Phosphorylierung von beispielsweise p53 und γ H2AX zu einer erhöhten Aktivität von Proteinen, welche die Funktionalität der DNA wiederherstellen sollen [68, 36]. Eine Enzymgruppe, die für die Behebung von Lost-induzierten Doppelstrangbrüchen unter Verbrauch von $\text{NAD}^{(+)}$ und ATP eine wichtige Rolle einnimmt, sind die Poly(ADP-Ribose)-Polymerasen (PARPs) [19]. Sind die Energievorräte erschöpft und lassen sich die zellulären Schäden sowie die Schädigung der DNA nicht mehr beheben, kommt es zum Untergang der Zelle. Um den Zelltod im Allgemeinen genauer zu charakterisieren, wurde eine umfängliche Nomenklatur etabliert [25]. Im Zusammenhang mit der Zytotoxizität von S-Lost wurden bisher vor allem die Apoptose und die Nekrose genauer beschrieben [38], wobei für die Apoptose nochmals eine Unterteilung in extrinsische und intrinsische Apoptose erfolgen kann. Für beide Varianten wurde eine Beteiligung im Rahmen der pathophysiologischen Effekte von S-Lost beschrieben [40].

Es gelang zwar, mit gezielter *in vitro* Proteininhibition den S-Lost-induzierten Zelltod zu modulieren, jedoch waren die Resultate bisher nicht so überzeugend, dass spezielle Moleküle als Therapieoption in Betracht gezogen wurden [29]. Vielversprechender verliefen die Ansätze, eine durch S-Lost ausgelöste Immunantwort einzudämmen und die Entzündungsreaktion abzumildern. Zu den Entzündungsmarkern, welche nach Lost-Exposition gut beschrieben sind, zählen beispielsweise IL-1 β , IL-6, IL-8 und TNF- α [3]. Diese pro-inflammatorischen Moleküle können auch als Biomarker für die durch S-Lost ausgelöste Entzündung herangezogen werden. Zelluläre Vorgänge, welche diese Entzündungsreaktion auslösen, wurden noch nicht vollständig aufgeklärt, da sie unter der Beteiligung einer Vielzahl verschiedener Signalkaskaden ablaufen. Dokumentiert ist beispielweise die Aktivierung des MAP-Kinase-Wegs, der Cyclooxygenase-2 (COX-2) und verschiedener Matrix-Metalloproteasen wie MMP-9 [102, 21, 74]. All diese Signalwege bieten die Möglichkeit, als potenzielle Zielstrukturen für eine antientzündliche Therapie nach S-Lost-Exposition adressiert zu werden.

1.5 Expositionsprophylaxe und Therapie einer S-Lost-Intoxikation

Aufgrund der mehrstündigen Latenzzeit bis zum Auftreten erster Symptome ist eine effektive Früherkennung und Expositionsprophylaxe bei Hautkampfstoffen besonders wichtig. Da scheinbar lineare Zusammenhänge zwischen der Expositionsdauer, wie auch der Expositionsdosis zu den toxischen Effekten von S-Lost bestehen, bilden Maßnahmen zur Minimierung der Exposition und schnellen Dekontamination die Basis für effektive Behandlungsstrategien [85].

Um bei möglicher Gefahr entsprechende Schutzkleidung anzulegen oder eine mögliche Kontamination festzustellen, wurden Testsysteme zur Früherkennung und Detektion geringster Mengen des Kampfstoffs im militärischen ABC-Schutz etabliert [41]. Neben dem Ganzkörperschutzanzug stellen vor allem ABC-Schutzmasken eine wirksame Barriere zur Vermeidung einer Augenschädigung und inhalativen Lungenexposition dar. Eine retrospektive Untersuchung unter Einbeziehung von über 5.000 S-Lost-Geschädigten aus dem Iran-Irak-Krieg zeigte, dass knapp 40 % der Verwundeten mit adäquater Schutzmaske vor ihrer Verletzung geschützt worden wären [69].

Im Falle einer unzureichenden Expositionsprophylaxe oder einer überraschenden Exposition sollten umgehend Dekontaminationsmaßnahmen eingeleitet werden. Ziel sollte es sein, die kontaminierte Kleidung schnellstmöglich zu entfernen, die Expositionszeit zu minimieren und entsprechende Stellen mit einem Dekontaminationsmittel zu reinigen [96]. Im Bereich der NATO ist die Reactive Skin Decontamination Lotion (RSDL) etabliert, wobei sich im Tiermodell auch Bleicherde (Fuller's earth (FE)) als wirksames Mittel bei Exposition mit chemischen Kampfstoffen erwies [90, 89].

Da ein spezifisches Antidot fehlt, zielt eine auf die Dekontaminationsmaßnahmen folgende Behandlung darauf ab, Vergiftungssymptome zu unterdrücken und eine schnelle Heilung zu ermöglichen. Die therapeutischen Maßnahmen werden in Abhängigkeit zur Organbeteiligung und des Expositionsgrads individuell festgelegt. Mögliche Interventionen umfassen ein breites Spektrum, angefangen mit akutmedizinischen Maßnahmen zur Stabilisierung, wie Flüssigkeitssubstitution und künstliche Beatmung, bis hin zu chirurgischen Eingriffen, wie beispielsweise eine Hauttransplantation [75, 71, 96].

Gerade im Bereich der Pharmakotherapie gibt es für S-Lost-Verwundete bisher kaum innovative Ansätze mit vielversprechenden Ergebnissen. Ein Großteil der Therapieempfehlungen basiert auf Erkenntnissen, die während des ersten Weltkriegs oder bei Verwundeten des Iran-Irak-Kriegs gewonnen wurden [101]. Die zunehmende Aufklärung der molekularen Mechanismen von S-Lost führt dazu, dass fortlaufend mögliche Angriffspunkte für eine zielgerichtete Pharmakotherapie identifiziert werden. Ausgehend von den biochemischen Veränderungen, welche S-Lost im exponierten Organismus hervorruft, wurden im Jahr 2002 verschiedene Ansätze für eine pharmakologische Intervention definiert und über 500 Substanzen für den prophylaktischen oder postexpositionellen Einsatz geprüft [79]. Als Substanzen mit therapeutischem Potential nannte das U.S. Army Medical Research Institute of Chemical Defense (USAMRICD) Wirkstoffe, die als intrazelluläre Scavenger, DNA-Zellzyklus- oder Calcium-Modulatoren eingesetzt werden, sowie Inhibitoren der Protease und der PARP. Ganz allgemein stellen vor allem Arzneistoffe mit einer antiinflammatorischen Wirkung eine vielversprechende Option für die Therapie nach einer S-Lost-Exposition dar [79, 43].

1.6 Modelle zur Testung potentieller Therapeutika

Zur Etablierung neuer therapeutischer Ansätze ist es notwendig, zusätzliche Erkenntnisse über den biochemischen Pathomechanismus der S-Lost-Intoxikation zu gewinnen und mögliche Therapeutika auf ihre Effektivität zu testen. Neben den etablierten Tiermodellen ist die Entwicklung geeigneter *in vitro* Testsysteme eins der Hauptziele für die Antidot-Entwicklung und wurde auch am Institut für Pharmakologie und Toxikologie der Bundeswehr mit Nachdruck verfolgt [43, 7].

Ein gut charakterisierter und im Bereich der Hautkampfstoffe angewendeter *in vivo* Test ist das „Mouse ear vesicant model“ [13, 14]. Mit diesem Modell lässt sich vor allem das antiinflammatorische Potenzial verschiedener Wirkstoffe testen. Für die Durchführung breit angelegter Screening-Experimente ist diese Methode allerdings aufwendig und kostspielig. Aus diesem Grund und zur Vermeidung unnötiger Tierexperimente, gelten im Bereich der präklinischen Wirkstofffindung *in vitro* Tests inzwischen als verbreiteter Standard. Um die Wirkung von Hautkampfstoffen zu charakterisieren, werden schon seit vielen Jahren Keratinozyten-Testsysteme ein-

gesetzt [80]. Zur verbesserten Abbildung der komplexen Hautphysiologie und zum weitreichenden Verständnis der zellulären Interaktionen, wurden Co-Kulturmodelle aus mehreren unterschiedlichen Zelltypen etabliert [39]. Eine Herausforderung stellt vor allem die Integration von Immunzellen dar, welche eine entscheidende Rolle bei der Entstehung von Entzündungsreaktionen spielen, dar. Zur mechanistischen Aufklärung der Kontaktdermatitis verwendeten Henne et al. HaCaT-Keratinocyten, denen THP-1-Monozyten zugesetzt wurden [34]. Auf diesem Prinzip basierend und unter Verwendung von HaCaT-Zellen in einer Co-Kultivierung mit THP-1-Monozyten, entwickelten Balszuweit et al. und Menacher eine Testbatterie zum Screening potenzieller Therapeutika gegen eine S-Lost-Intoxikation [7, 54]. In einer *in vitro* Testreihe, bestehend aus mehreren Assays, können Substanzen auf zytoprotektive und antiinflammatorische Eigenschaften untersucht werden [6].

1.7 Methodik der Testbatterie

Nekrose wie auch Apoptose spielen bei S-Lost-vermitteltem Zelltod eine entscheidende Rolle. Um eine quantitative Differenzierung der beiden Mechanismen vornehmen zu können, entwickelten Heinrich et al. eine assaybasierte Methode, mit welcher Apoptose und Nekrose simultan bestimmbar sind [33].

Die Nekrose wird als eine schnelle Form des Zelltods charakterisiert, bei der die Membran ihre Integrität verliert, die DNA unsystematisch abgebaut und die Zellbestandteile in umliegende Gewebe bzw. Zellkulturmedium abgegeben werden [2]. Während dieses Prozesses wird auch die Adenylatkinase (AK) freigesetzt. Die Aktivität der AK im Zellkulturmedium in Relation zur gesamten AK-Aktivität kann als Marker für den Anteil nekrotischer Zellen verwendet werden. In der Testbatterie wurde zur Bestimmung der AK-Aktivität der ToxiLight-Biolumineszenz-Assay durchgeführt.

Apoptose läuft unter Beteiligung verschiedener Proteine, wie beispielsweise Caspasen, im Gegensatz zur Nekrose vergleichsweise geordnet und nach einem strukturierten Schema ab [10, 23]. Im Verlauf der Apoptose sorgen unter anderem Endonukleasen für eine Fragmentierung der DNA. Diese DNA-Fragmente bilden mit Histon-Proteinen spezifische Komplexe, welche zur Bestimmung der ablaufenden Apoptose mit dem Cell Death Detection ELISA detektierbar sind. Über eine Standardkurve kann in diesem semiquantitativen Verfahren der Anteil apoptotischer Zellen im Testmodell bestimmt werden [33].

Da der komplexe Vergiftungsverlauf nach einer Exposition mit S-Lost immer unter Entwicklung einer starken Entzündungsreaktion abläuft, ist ein detaillierteres Verständnis der immunologischen Prozesse für eine zielgerichtete Intervention essentiell [42, 40]. Physiologisch kommen in der Haut verschiedene immunkompetente Zelltypen vor, welche auch das Krankheitsgeschehen nach einer S-Lost-Intoxikation entscheidend prägen [17]. Die von Balszuweit et al. entwickelte Co-Kultur aus HaCaT-Keratinocyten und den immunkompetenten THP-1-Monozyten kann die Situation der Haut vergleichsweise realitätsnah abbilden [7]. Neben einer vermehrten Expression von Entzündungsmarkern wirkt sich die parakrine Aktivität der THP-1-Zellen auch direkt auf die Apoptose der HaCaT-Zellen aus [7]. Die Bestimmung der Zytokine IL-6 und IL-8 als Surrogatparameter liefert daher wichtige Erkenntnisse über inflammatorische Vorgänge im Testsystem. IL-6 und IL-8 Konzentrationen können im Überstand mittels spezifischem ELISA bestimmt werden. Durch anschließende Normierung auf die Zellzahl lässt sich eine Aussage über das Entzündungsgeschehen treffen.

2 Zielsetzung der Arbeit

Im Rahmen dieser Arbeit wurden zwei Substanzen mit unterschiedlichen Wirkmechanismen als potentielle Therapeutika nach einer S-Lost-Exposition untersucht. Neben Experimenten in einer HaCaT-Monokultur boten vor allem die Versuche in der komplexen Co-Kultur aus Keratinozyten und Immunzellen eine erhöhte Aussagekraft bezüglich einer angestrebten *in vivo* Translation. In zwei unabhängigen Versuchsreihen wurden zum einen der Naturstoff Berberin und zum anderen der Nekroptose-Inhibitor Necrosulfonamid als Optionen für eine zytoprotektive und antiinflammatorische Therapie nach S-Lost-Exposition getestet.

2.1 Effekte von Berberin in S-Lost-exponierten Zellkulturmodellen

Berberin ist ein Naturstoff, der in verschiedenen pflanzlichen Organismen, wie beispielsweise der Gewöhnlichen Berberitze (*Berberis vulgaris*), enthalten ist. Entsprechend der chemischen Struktur wird Berberin den Isochinolinalkaloiden zugeordnet. Aufgrund seiner intensiven gelben Farbe hat der Einsatz von Berberin als Farbstoff eine lange Tradition in der Textilindustrie und wird auch heute noch unter der Bezeichnung „natural yellow 18“ als Naturfarbstoff eingesetzt [98]. Erste medizinische Untersuchungen mit Berberin fanden Ende des 19. Jahrhunderts statt, welche auch zur Beschreibung pharmakologischer Effekte führten [53]. Neben den von Mafori dokumentierten Auswirkungen auf das Herz-Kreislauf-System, wurden in der Folge weitere pharmakologische Eigenschaften von Berberin beschrieben [47]. Trotz zahlreicher klinischer Studien (58 bei clinicaltrials.gov; Stand: 03.05.2019) erfolgte bisher noch keine therapeutische Zulassung in Deutschland. Ein Großteil der Studien wurde in asiatischen Ländern durchgeführt, in welchen berberinhaltige Pflanzen seit langer Zeit therapeutische Verwendung in der traditionellen Medizin finden [86, 88].

Eine Forschungsarbeit von Germoush und Mahmoud zeigte, dass Berberin eine durch Cyclophosphamid hervorgerufene Leberschädigung in Ratten mildern kann [27]. Als alkylierendes Zytostatikum zeigt Cyclophosphamid mit S-Lost vergleichbare biochemische Effekte und toxische Wirkmechanismen. Daher generierten die Ergebnisse dieser Arbeit die Hypothese, dass möglicherweise auch durch S-Lost verursachte Hautschäden positiv mit Berberin modulierbar sind.

Zielsetzung der Arbeit war die Untersuchung der Effekte von Berberin auf die durch S-Lost initiierte Zytotoxizität und Inflammation in zwei etablierten Keratinozyten-Modellen. Nach einem standardisierten Protokoll wurden die Nekrose, Apoptose und die Entzündungsmarker IL-6 und IL-8 quantifiziert und ermittelt, welchen Einfluss ein Post-Treatment mit Berberin auf die untersuchten Parameter hat.

2.2 Auswirkung der Nekroptose-Inhibition mit Necrosulfonamid auf die S-Lost-vermittelte Toxizität in Keratinozyten-Modellen

Bei der Nekroptose handelt es sich um eine spezifische Form des nekrotischen Zelltods, der ähnlich zur Apoptose in aufeinanderfolgenden Schritten abläuft. Obwohl der molekulare Mechanismus der Nekroptose bereits detailliert beschrieben wurde, sind die physiologischen Auswirkungen bisher nur ansatzweise verstanden [93]. Als ein Mechanismus des zellulären Untergangs ist die Nekroptose mit schwerwiegenden Entzündungsreaktionen assoziiert [105]. Durch den Einsatz verschiedener Inhibitoren kann der nekroptotische Zelltod verhindert werden und es kommt zu einer Abmilderung entzündlicher Vorgänge [16]. Um den Einfluss einer Nekroptose-Inhibition auf den S-Lost-vermittelten Zelltod und die Entzündungsreaktion zu charakterisieren, wurden die Effekte des Nekroptose-Inhibitors Necrosulfonamid in der Testbatterie untersucht.

3 Ergebnisse und veröffentlichte Publikationen

3.1 Anti-apoptotic and moderate anti-inflammatory effects of berberine in sulfur mustard exposed keratinocytes

Simon Lang, Tanja Popp, Christian Silvester Kriegs, Annette Schmidt, Frank Balszuweit, Georg Menacher, Kai Kehe, Horst Thiermann, Thomas Gudermann, Dirk Steinritz, *Toxicology Letters* **2018**, 293, 2-8.

In der HaCaT-Monokultur und der HaCaT-/THP-1-Co-Kultur wurden die Auswirkungen einer Behandlung mit Berberin näher untersucht. In vier unabhängigen Versuchsreihen wurden jeweils unterschiedliche Konzentrationen einer S-Lost-Exposition mit dem Zusatz verschiedener Konzentrationen Berberin untersucht. Eine Stunde nach der Exposition mit 100 μM , 200 μM , 300 μM S-Lost oder der entsprechenden Lösungsmittelkontrolle wurde eine Berberin-Lösung in den Konzentrationen 0 μM (Kontrolle), 10 μM , 30 μM oder 50 μM zugesetzt. Insgesamt wurden 16 verschiedenen Bedingungen erzeugt, welche 25 Stunden nach der Exposition mit S-Lost unter Einbeziehung biochemischer Analysemethoden verglichen wurden.

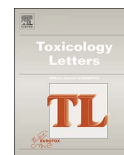
Die Behandlung mit Berberin führte in der Monokultur wie auch in der Co-Kultur konzentrationsabhängig zu einer signifikanten Reduktion der Apoptose. Die größten Effekte konnten in der Gruppe mit 50 μM Berberin festgestellt werden. Bei der Nekrose zeigte die Behandlung mit Berberin kaum Veränderung. Lediglich in der mit 300 μM exponierten Monokultur wurde die Nekrose signifikant reduziert. Bei den Entzündungsmarkern wurden durch Berberin vor allem die IL-6 Konzentrationen in der 200 μM und 300 μM S-Lost-Gruppe sowohl in der Mono- als auch in der Co-Kultur signifikant verringert. Die höchsten absoluten Zytokin-Konzentrationen wurden in den 200 μM S-Lost-Gruppen gemessen. Diese Beobachtung lässt sich darauf zurückführen, dass die Zellschädigung bei höheren Expositionsdosen derart ausgeprägt ist, dass die Zellen nicht mehr in der Lage sind, Entzündungsmarker zu produzieren. Eine signifikante Reduktion von IL-8 konnte durch 10 μM und 30 μM Berberin in der mit 200 μM S-Lost-exponierten Gruppe ermittelt werden. Insgesamt zeigte die Behandlung mit Berberin eine signifikante Reduktion der Apoptose sowie der Entzündungsmarker IL-6 und IL-8.

Da Berberin eine Vielzahl pharmakologischer Targets besitzt und der Wirkmechanismus bisher nicht im Detail aufgeklärt ist, wäre eine molekularbiologische Untersuchung der Pharmakologie von Berberin ein anschließender Schritt. Erkenntnisse über den Wirkmechanismus würden auch Rückschlüsse über die biochemischen Pathomechanismen von S-Lost erlauben. In einem weiteren Schritt würde die Testung in *in vivo* Modellen weitreichendere Erkenntnisse über das therapeutische Potenzial von Berberin generieren.



Contents lists available at ScienceDirect

Toxicology Letters

journal homepage: www.elsevier.com/locate/toxlet

Anti-apoptotic and moderate anti-inflammatory effects of berberine in sulfur mustard exposed keratinocytes

Simon Lang^{a,*}, Tanja Popp^{a,b}, Christian Silvester Kriegs^{a,d}, Annette Schmidt^{a,g}, Frank Balszuweit^c, Georg Menacher^a, Kai Kehe^{b,e}, Horst Thiermann^a, Thomas Gudermann^{b,f}, Dirk Steinritz^{a,b}

^a Bundeswehr Institute of Pharmacology and Toxicology, 80937 Munich, Germany

^b Walther-Straub-Institute of Pharmacology and Toxicology, Ludwig-Maximilians-Universität München, 80336 Munich, Germany

^c Bundeswehr Medical Command, 56070 Koblenz, Germany

^d LVR-Klinik Viersen, 41749 Viersen, Germany

^e Bundeswehr Medical Academy, 80937 Munich, Germany

^f Comprehensive Pneumology Center Munich (CPCM), German Center for Lung Research, 81377 Munich, Germany

^g Universität der Bundeswehr, Faculty of Human Sciences, Department for Sports Science, 85577 Neubiberg, Germany



ARTICLE INFO

Keywords:

HaCaT
THP-1
Co-culture
Cytotoxicity
IL-6
IL-8
Pharmaceutical
Berberine

ABSTRACT

Skin affections after sulfur mustard (SM) exposure include erythema, blister formation and severe inflammation. An antidote or specific therapy does not exist. Anti-inflammatory compounds as well as substances counteracting SM-induced cell death are under investigation. In this study, we investigated the benzylisoquinoline alkaloid berberine (BER), a metabolite in plants like *berberis vulgaris*, which is used as herbal pharmaceutical in Asian countries, against SM toxicity using a well-established *in vitro* approach. Keratinocyte (HaCaT) mono-cultures (MoC) or HaCaT/THP-1 co-cultures (CoC) were challenged with 100, 200 or 300 mM SM for 1 h. Post-exposure, both MoC and CoC were treated with 10, 30 or 50 μM BER for 24 h. At that time, supernatants were collected and analyzed both for interleukin (IL) 6 and 8 levels and for content of adenylate-kinase (AK) as surrogate marker for cell necrosis. Cells were lysed and nucleosome formation as marker for late apoptosis was assessed. In parallel, AK in cells was determined for normalization purposes. BER treatment did not influence necrosis, but significantly decreased apoptosis. Anti-inflammatory effects were moderate, but also significant, primarily in CoC. Overall, BER has protective effects against SM toxicity *in vitro*. Whether this holds true should be evaluated in future *in vivo* studies.

1. Introduction

Sulfur mustard (SM) has a nearly 100-year history as chemical warfare agent after its first military use by German troops in April 1917 during World War I in Ypres, Belgium. Unfortunately, despite an international ban by the Chemical Weapons Convention (OPCW), SM is still used in current conflicts in the Middle East (OPCW Technical Secretariat, 2015). After contact, SM causes skin symptoms (i.e. erythema, skin blistering and ulceration) which are accompanied by strong inflammation (Kehe et al., 2009a; Steinritz et al., 2016; Kehe and Szinicz, 2005). No specific antidote is available. However, counteracting SM-induced inflammation represents a well-accepted therapeutic approach and was already proven effective in *in vivo* studies (Casillas et al., 2000; Dachir et al., 2002). In order to identify appropriate, well-

tolerated drugs or new pharmacological substances, *in vitro* screening studies using cell models are frequently conducted (Kehe et al., 2008; Balszuweit et al., 2014).

The benzylisoquinoline alkaloid berberine (BER), a secondary metabolite in certain plants like *berberis vulgaris* is a commonly used herbal pharmaceutical in Asian countries (Imanshahidi and Hosseinzadeh, 2008). Various pharmacological and therapeutic applications have been described, e.g. clinical trials indicate BER as an option in type 2 diabetes therapy (Kumar et al., 2015; Zhang et al., 2008; Dong et al., 2012). Generally, it is assumed that BER has influence on cell death, although its effect on apoptosis is controversially: both, anti- and pro-apoptotic mechanisms have been reported (Wang et al., 2017; Xie et al., 2015). A well proven essential characteristic of BER is the anti-inflammatory effect by modulating NF-κB pathways, which are

Abbreviations: AK, adenylate kinase; BER, berberine; CDDE, Cell Death Detection ELISA; CoC, co-culture; DMEM, Dulbecco's Modified Eagle Medium; ELISA, enzyme linked immunosorbent assay; FBS, fetal bovine serum; HaCaT, Human immortalized keratinocytes; IL-6, interleukin 6; IL-8, interleukin 8; MoC, mono-culture; ROS, reactive oxygen species; SM, sulfur mustard

* Corresponding author.

E-mail addresses: lang_simon@gmx.net, simon1lang@bundeswehr.org (S. Lang).

<http://dx.doi.org/10.1016/j.toxlet.2017.09.004>

Received 29 May 2017; Received in revised form 6 September 2017; Accepted 11 September 2017

Available online 13 September 2017

0378-4274/© 2017 Elsevier B.V. All rights reserved.

also known to play an important role in SM toxicity (Rebholz et al., 2008; Pandey et al., 2008).

However, so far it has not been investigated whether BER exhibits protective, i.e. anti-inflammatory or anti-apoptotic, effects after SM challenge and is therefore subject of the presented study.

A mono-culture of HaCaT cells (MoC) and a co-culture of HaCaT and THP-1 cells (CoC) were used as *in vitro* models. Both models are well-established and frequently used to investigate effects of pharmaceuticals or chemical compounds on human skin (Mangerich et al., 2016; Crosera et al., 2015). Especially the co-cultures, consisting of keratinocytes and immune cells, allow the consideration of immune-cell associated effects and thereby mimicking the physiology of the skin *in vitro* more closely than monocultures of keratinocytes (Balszuweit et al., 2014; Hennen and Blomeke, 2017).

Inflammation is a very complex physiological process that is difficult to assess using *in vitro* models. Determination of pro-inflammatory cytokine production has turned out as a reliable method to cope with this problem. The well-established release of interleukin 6 (IL-6) and interleukin 8 (IL-8), which are both described as SM-associated pro-inflammatory cytokines, were used as pro-inflammatory surrogate parameters (Arroyo et al., 2000; Lardot et al., 1999). Moreover, both necrotic and apoptotic cell death was assessed by the combination of a cell death detection ELISA and a cytotoxicity bioassay (ToxiLight) (Heinrich et al., 2009).

2. Materials and methods

2.1. Chemicals

Sulfur mustard (SM) was provided by the German Ministry of Defense. Cell Proliferation Kit II (XTT) produced by Roche (Basel, Switzerland) was obtained from Sigma-Aldrich (Taufkirchen, Germany). Berberine-Chloride (BER) and Triton X-100 were purchased from Sigma-Aldrich (Taufkirchen, Germany). Cell Death Detection ELISA (CDDE) was obtained from Roche (Basel, Switzerland) and ToxiLight BioAssay Kit from Lonza (Basel, Switzerland). IL-6 and IL-8 ELISA kits were purchased from eBioscience (Frankfurt am Main, Germany). HaCaT cells purchased from CLS (Eppelheim, Germany), Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM) and fetal bovine serum (FBS) from Gibco (Darmstadt, Germany).

2.2. Cell culture

Human immortalized keratinocytes (HaCaT) (Boukamp et al., 1988) and human THP-1 cells (Tsuchiya et al., 1980) were cultured as described previously (Balszuweit et al., 2014; Balszuweit et al., 2016). In short, cells grew in flasks under standard conditions (humidified atmosphere with 5% CO₂ and 37 °C), until reaching a confluence between 80% and 90%. HaCaT were cultivated in DMEM supplemented with 5% FBS (subsequently referred to as HaCaT medium) while THP-1 cells were cultured using RPMI medium with 20% FBS and 1% mercaptoethanol (subsequently referred to as THP medium) without using antibiotics. HaCaT were dissociated by trypsin for subsequent experiments or for splitting for further culture. For mono-cultures (MoC), 30,000 HaCaT cells were seeded in 200 µl HaCaT medium per well in a 96-well-plate. After 24 h, HaCaT medium was replaced by 80 µl THP-1 medium. HaCaT/THP-1 co-cultures (CoC) were prepared as described previously (Balszuweit et al., 2014). In short, 2% THP-1, a ratio of immune cells proved to obtain expressive results, were added to HaCaT MoC by replacing the 200 µl HaCaT medium with 80 µl THP medium containing 600 THP-1 cells. Both MoC and CoC were grown for additional 24 h before starting the experiments. A schematic overview about the experimental design is given in Fig. 1.

2.3. Sulfur mustard exposure and berberine treatment

MoC or CoC were initially exposed to a range between 0.2 to 1000 µM SM to determine LC₅₀, which was found at 200 µM for both MoC and CoC by XTT. Subsequent experiments were then carried out with 100, 200 and 300 µM SM. Cells were treated with either 10, 30 or 50 µM BER according to prior studies (Hu et al., 2011). Treatment was performed 1 h after SM exposure. These BER concentrations did not induce any effects themselves as shown in our results. Sham controls were treated with THP medium, the solvent for BER. Details are given in Fig. 1. In pre-trial studies, viability was determined by XTT viability assay in accordance to experimental design. These experiments indicated no relevant differences between sham-treated and BER-treated groups (data not shown).

2.4. Analysis of necrosis, apoptosis and cytokine production

Necrosis and apoptosis were assessed as described previously (Heinrich et al., 2009). In short, supernatants were collected 24 h after BER treatment. As surrogate parameters for an anti-inflammatory response IL-6 and IL-8 levels were measured by ELISA kits. To obtain interleukin production relative to number of cells per well, absolute levels of IL-6 and IL-8 were normalized to the total number of cells (F 1). Total cell number is represented by total AK (F 2), which reports the combined amount of disintegrated and viable cells at the end of the experiment (Heinrich et al., 2009; Balszuweit et al., 2016; Balszuweit et al., 2013).

$$IL_{relative} = \frac{IL_{total}}{AK_{total}} \quad (F 1)$$

$$AK_{total} = AK_{supernatant} + AK_{lysate} \quad (F 2)$$

As surrogate parameter for necrotic cell death, adenylate kinase (AK) activity in supernatants was determined using the ToxiLight BioAssay Kit. Finally, cells in each well were washed twice with PBS and lysed by adding 200 µl 0.1% Triton X-100 in PBS. Lysates were then also assayed for AK activity using the ToxiLight BioAssay Kit. The ratio between AK in supernatants and total AK was calculated resulting in the quota of necrotic cells (necrotic index, NI) (F 3).

$$NI = \frac{AK_{supernatant}}{AK_{total}} \quad (F 3)$$

Nucleosome formation, a marker for late apoptosis, was quantified in lysates using the Cell Death Detection ELISA. Apoptosis was normalized in a semi-quantitative approach by calculating the apoptotic index (AI): CDDE values divided by AK_{lysate} values as described in previous studies (F 4) (Heinrich et al., 2009).

$$AI = \frac{CDDE_{rawvalue}}{AK_{lysate}} \quad (F 4)$$

2.5. Statistics

Data from four independent experiments were normalized by using the mean of the sham-treated, 300 µM SM CoC value as the 100% reference and pooled. In every trial, experimental groups consisted of 6 samples and control groups of 3 samples. One-Way ANOVA, followed by Bonferroni's Multiple Comparison test was used to identify intergroup differences. p-Values below 0.05 were considered significant. Normalization of the results and analysis was done in accordance with previous studies that investigated other potential therapeutics against SM toxicity (Balszuweit et al., 2013) in order to allow a direct comparison of the results obtained. Therefore, the 300 µM SM sham-treated CoC was defined as 100% value.

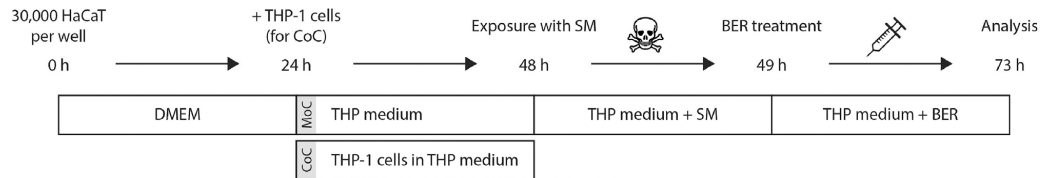


Fig. 1. Experimental design in a schematic overview. First, 30,000 HaCaT cells per well (96-well plate format) were seeded in 200 μ l HaCaT medium and allowed to grow for 24 h. Then, medium was exchanged to 80 μ l THP medium for both mono-cultures (MoC) and co-cultures (CoC). For CoC, 600 THP-1 cells per well were included in the medium. MoC and CoC were then allowed to grow for additional 24 h. Then, both models were exposed to 100, 200 or 300 μ M SM for 1 h. Afterwards, cells were either sham-treated with pure THP medium or treated with 10, 30 or 50 μ M berberine (BER). Cells and supernatant were analyzed after additional 24 h.

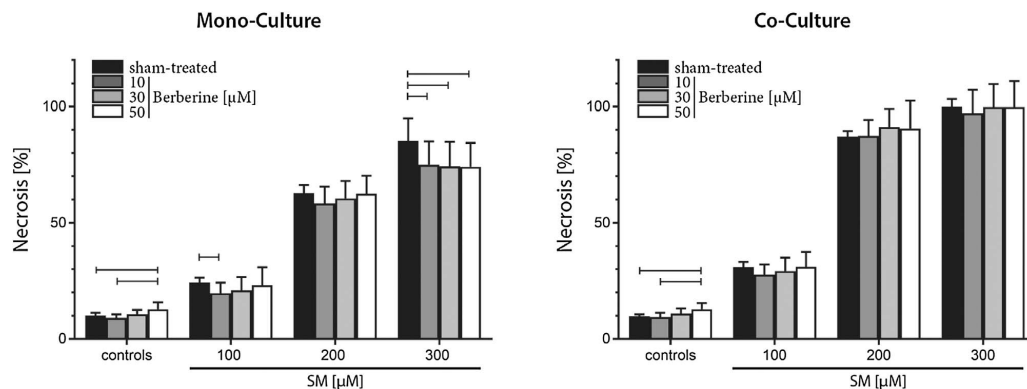


Fig. 2. Necrotic cell death was determined by measuring the activity of adenylate kinase (AK) in supernatants using the ToxiLight assay. Mean values were normalized (100%) to the mean value of the 300 μ M SM-exposed, sham-treated co-culture group. Black bars represent the sham-treated groups, while other bars indicate post-exposure treatment with berberine (BER) (dark grey = 10 μ M, light grey = 30 μ M, and white bars = 50 μ M). Necrosis increased after SM exposure following a dose-response relationship in both mono-culture (MoC) and co-culture (CoC). BER treatment had only minor effects on necrotic cell death and reduced necrosis just in 300 μ M SM-exposed MoC. Horizontal bars indicate significant differences (one-way ANOVA, $p < 0.05$). Error bars represent standard deviations. Bars represent means from 4 independent experiments, each with 6 individual wells per SM exposures.

3. Results

3.1. Effect of BER on SM-induced necrosis

Observed baseline levels of AK in supernatants of sham-treated cell-models (Fig. 2) were low in both MoC 10.2 (± 1.1)% and CoC 9.8 (± 0.8)%. Increasing doses of SM augmented necrosis, with the largest effect at 300 μ M. Necrosis in sham-treated, 300 μ M SM exposed MoC was found to be 85.3 (± 9.7)%. Lower SM exposures also resulted in AK release with 62.8 (± 3.5)% in MoC and 87.1 (± 2.4)% in CoC at 200 μ M SM, and 24.3 (± 2.1)% or 31.0 (± 2.2)% at 100 μ M SM, respectively.

BER treatment had basically no observable effect in CoC. Nevertheless, some weak, but statistically significant, effects on necrosis in MoC after 300 μ M SM exposure were recorded. A slight decrease of 10% in necrosis was achieved by 10 μ M, 30 μ M, and 50 μ M BER. A detailed tabular overview of the results is given in Suppl. Table 1.

3.2. Effect of BER on SM-induced apoptosis

Nucleosome formation, as indicator of late apoptosis, was not detectable in either MoC or CoC controls whereas SM exposure resulted in a concentration-dependent increase in nucleosome formation (Fig. 3). At 300 μ M SM CoC, apoptosis reached its highest rate, which was defined as the 100% value. Both, MoC and CoC revealed a comparable concentration-dependent response, with slightly lower nucleosome formation in MoC groups. At 100 μ M SM, apoptosis was determined with 18.3 (± 3.7)% and 22.1 (± 6.1)% in MoC or CoC, respectively. At

200 μ M SM, a distinct increase with 69.3 (± 26.3)% or 83.2 (± 18.3)% in MoC or CoC was detectable.

BER treatment showed significant, dose-dependent anti-apoptotic effects. In 300 μ M SM-exposed CoC, 10 μ M BER reduced nucleosome formation from 100% to 73.9 (± 37.0)%, 30 μ M BER to 46.5 (± 26.2)% and 50 μ M BER to 40.9 (± 14.5)%. Comparable anti-apoptotic observations were found in 200 μ M and 100 μ M exposed groups: nucleosome formation in the 200 μ M SM exposed, sham-treated CoC (83.1 (± 18.3)%) was reduced to 63.3 (± 22.2)% by 10 μ M BER, to 42.1 (± 11.3)% by 30 μ M BER and to 37.4 (± 10.5)% by 50 μ M BER. After exposure of CoC with 100 μ M SM, apoptosis was lowered from 22.1 (± 6.1)% to 16.6 (± 5.0)% by 10 μ M BER, to 11.2 (± 3.5)% by 30 μ M BER and to 8.6 (± 3.8)% by 50 μ M BER.

Similar results were found in MoC: nucleosome formation was calculated to be 66.1 (± 24.4)% after 300 μ M SM exposure which was reduced by 10 μ M BER to 43.4 (± 17.0)%, to 26.9 (± 12.9)% by 30 μ M BER and to 27.9 (± 19.1)% by 50 μ M BER, respectively. MoC, exposed to 200 μ M SM, exhibited a nucleosome formation of 69.3 (± 26.3)% that was reduced by 10, 30 and 50 μ M BER treatment to 48.2 (± 18.3)%, 33.4 (± 8.3)% and 27.9 (± 19.1)%. Apoptosis was also extenuated in 100 μ M SM-exposed MoC in a significant manner by BER treatment: 18.3 (± 3.7)% in sham-treated, was decreased to 13.6 (± 3.3)%, 8.7 (± 4.3)% and 7.0 (± 4.5)% by 10, 30 and 50 μ M BER, respectively. A detailed tabular overview of the results is given in Suppl. Table 1.

3.3. Effect of BER on SM-induced production of IL-6 and IL-8

IL-6 and IL-8 levels of sham-treated and 300 μ M SM exposed CoC

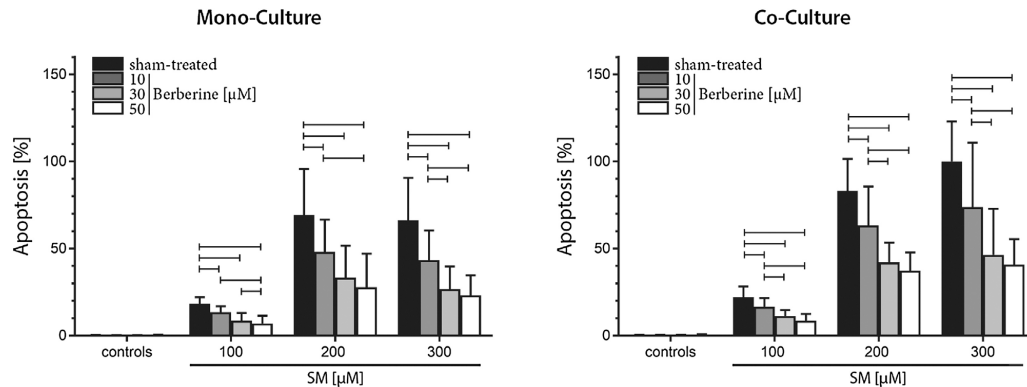


Fig. 3. Nucleosome formation, measured by CDD ELISA, was assessed as marker for apoptotic cell death. Normalization was realized by using the 300 μM SM-exposed, sham-treated group as 100 % reference. Apoptosis was not detectable in control groups. In general, levels of apoptosis were slightly lower in mono-cultures (MoC) compared to co-cultures (CoC). SM exposure resulted in increased apoptosis following a dose-response relationship especially in CoC. Black bars represent the sham-treated groups, while other bars indicate post-exposure treatment with berberine (BER) (dark grey = 10 μM , light grey = 30 μM , and white bars = 50 μM). Treatment with BER significantly reduced apoptosis in a dose-dependent manner in both MoC and CoC. Horizontal bars indicate significant differences (one-way ANOVA, $p < 0,05$). Error bars represent standard deviations. Bars represent means from 4 independent experiments, each with 6 individual wells per SM exposures.

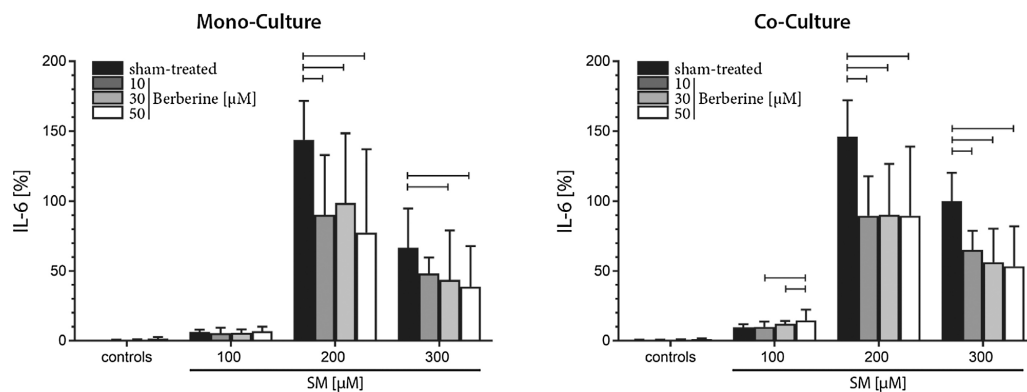


Fig. 4. IL-6 levels in supernatants were analyzed by ELISA. Relative IL-6 levels were calculated by dividing absolute IL-6 by total levels of adenylate kinase ($\text{AK}_{\text{supernatant}} + \text{AK}_{\text{lytate}}$) as surrogate parameter for the total cell number. Afterwards, mean values were normalized (100%) to the mean value of the 300 μM SM-exposed, sham-treated co-culture group. In both mono-cultures (MoC) and co-cultures (CoC), IL-6 levels were almost not detectable in our experiments. SM exposure resulted in increased IL-6 production, with a maximum at 200 μM SM. A decrease, most probably due to impaired protein biosynthesis, was observed at 300 μM SM. Nevertheless IL-6 levels exceeded control levels by far. Black bars represent the sham-treated groups, while other bars indicate post-exposure treatment with berberine (BER) (dark grey = 10 μM , light grey = 30 μM , and white bars = 50 μM). Treatment with BER significantly reduced IL-6 production after SM exposure in both MoC and CoC experiments. A dose-response relationship was not observed. Horizontal bars indicate significant differences (one-way ANOVA, $p < 0,05$). Error bars represent standard deviations. Bars represent means from 4 independent experiments, each with 6 individual wells per SM exposures.

were again defined as 100 % value to enable adequate comparison of all results. However, absolute IL-6 (Fig. 4) and IL-8 (Fig. 5) reached maximum values at lower concentrations, i.e. 200 μM SM, a phenomenon already observed in previous studies (Balszuweit et al., 2016). Exposure with 100 μM SM had almost no effect on IL-6 levels in both MoC 6.3 (± 1.6)% and CoC 9.7 (± 2.3)%. Regarding IL-6, MoC and CoC exhibited a similar profile: exposure to 200 μM SM resulted in relative IL-6 levels of 143.9 (± 27.9)% in MoC or 146.1 (± 26.1)% in CoC. Treatment with BER significantly decreased IL-6, however, a clear concentration-response relationship was not observed: IL-6 levels were reduced to 90.3 (± 42.7)%, 98.7 (± 49.8)% or 77.5 (± 59.7)% in 10, 30 or 50 μM BER treated MoC and to 89.6 (± 28.3)%, 90.3 (± 36.4)% or 89.6 (± 49.3)% in BER treated CoC, respectively. After 300 μM SM exposure, IL-6 levels were determined at 66.6 (± 28.3)% in MoC that were only decreased by 30 μM BER to 43.8 (± 35.3)% or 50 μM BER to 38.8 (± 29.1)%. In CoC, all used BER concentrations significantly lowered IL-6 levels: a reduction from the initial 100 (± 20.3)% to 65.2

(± 13.5)% was achieved by 10 μM , to 56.2 (± 24.1)% by 30 μM or to 53.4 (± 28.6)% by 50 μM BER. Here, a dose-response relationship could be estimated by trend.

IL-8 values, also defined as 100% in the 300 μM SM-exposed and sham-treated CoC, were found more prominent in CoC, while in MoC only a minor response was observed: relative IL-8 levels were determined as 15.0 (± 2.7)%, 42.6 (± 7.7)%, and 31.5 (± 10.1)% in 100, 200, and 300 μM SM-exposed MoC, compared to 43.7 (± 7.4)%, 147.1 (± 27.8)%, and 100.0 (± 20.8)% in 100, 200, and 300 μM SM-exposed CoC. BER treatment had only moderate effects in MoC: relative IL-8 levels were not significantly influenced by BER treatment on 100 μM or 300 μM SM-exposed cultures. Only in the 200 μM SM-exposed group a small decrease of IL-8 was evident. Here, 10 μM BER resulted in relative IL-8 levels of 33.1 (± 9.8)%, 30 μM BER decreased levels to 35.3 (± 12.8)%, and 50 μM BER reduced IL-8 to 31.5 (± 10.2)%. In CoC, effects were slightly more pronounced: After exposure to 100 μM SM relative IL-8 levels were found to be 34.8 (± 11.9)%, 29.1 (± 10.1)%,

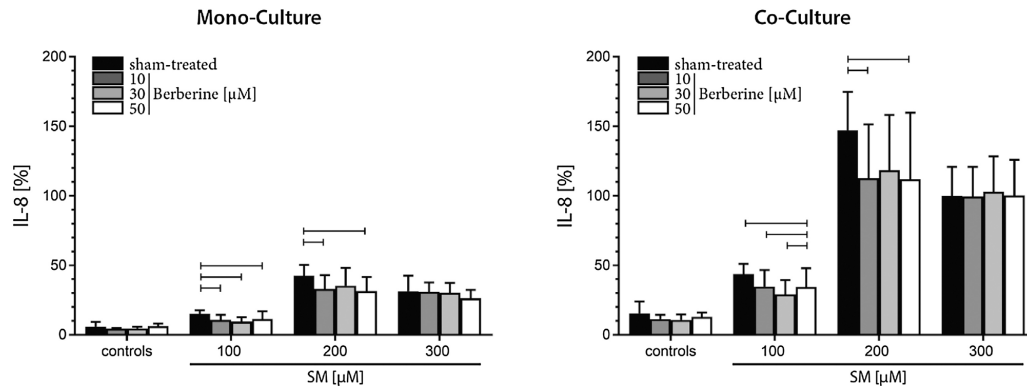


Fig. 5. IL-8 levels in supernatants were analyzed by ELISA. Relative IL-8 levels were calculated by dividing absolute IL-8 by total levels of adenylate kinase ($AK_{\text{supernatant}} + AK_{\text{lysate}}$) as surrogate parameter for the total cell number. Afterwards, mean values were normalized (100%) to the mean value of the 300 μM SM-exposed, sham-treated co-culture group. In both mono-cultures (MoC) and co-cultures (CoC), basal IL-8 levels were low. SM exposure resulted in increased IL-8 production, predominantly in CoC, with a maximum at 200 μM SM. A decrease, most probably due to impaired protein biosynthesis, was observed at 300 μM SM. Nevertheless IL-6 levels exceeded control levels by far, especially in CoC. Black bars represent the sham-treated groups, while other bars indicate post-exposure treatment with berberine (BER) (dark grey = 10 μM , light grey = 30 μM , and white bars = 50 μM). Treatment with BER significantly had only minor effect on IL-8 levels. Only after 200 μM SM exposure a significant decrease was observed in both MoC and CoC groups. A dose-response relationship was not observed. Horizontal bars indicate significant differences (one-way ANOVA, $p < 0.05$). Error bars represent standard deviations. Bars represent means from 4 independent experiments, each with 6 individual wells per SM exposures.

and 34.5 (± 13.4)% in 10, 30, and 50 μM BER treated groups. BER was also able to decrease IL-8 levels after 200 μM challenge. Here, relative IL-8 was found to be 112.7 (± 38.8)%, 118.6 (± 39.7)%, and 112.0 (± 47.8)% in 10, 30, and 50 μM BER treated groups. A significant reduction of IL-8 by BER in the 300 μM SM group was not observed. A detailed tabular overview of the results is given in Suppl. Table 1.

4. Discussion

Since decades pharmaceutical drugs, experimental compounds and phytochemicals with promising properties are under investigation as potential therapeutics against SM-poisoning. In this study, we focused on the phytochemical berberine (BER). BER, a benzylisoquinoline alkaloid that can be found in certain plants like *berberis vulgaris*, is a widely used herbal pharmaceutical in Asian countries (Imanshahidi and Hosseinzadeh, 2008; Kumar et al., 2015). Various pharmacological and therapeutic effects, including anti-apoptotic and anti-inflammatory effects, have been described. Its administration may help counteracting SM toxicity (Kumar et al., 2015; Kuo et al., 2004). Thus, we found it worthwhile to investigate this substance in more detail.

Two well established *in vitro* models were used in our experiments: (i) a mono-culture (MoC) of human immortalized keratinocytes (HaCaT), which is frequently used for high-throughput experiments and screening approaches (Ermolli et al., 2001), and (ii) a co-culture (CoC) of HaCaT cells and a human monocyte cell line (THP-1 cells), which allows a better investigation of inflammatory processes (Hennen and Blomeke, 2017; Hennen et al., 2011; Tietze and Blomeke, 2008). Both models and test methods were established and discussed in previous studies (Balszuweit et al., 2014; Heinrich et al., 2009; Balszuweit et al., 2016).

Molarity of neat SM is calculated to be 8 M. *In vivo* studies revealed a blistering concentration higher than 50 μM (Smith et al., 2008). In our experiments, LC_{50} was determined 200 μM for both MoC and CoC, both ranging in the relevant scope and magnitude. Thus, it appeared rational choosing 100, 200 and 300 μM SM for our study. Sampling was done 24 h post exposure as described previously, thus allowing a direct comparison with previous studies. In addition, investigation of the inflammatory processes 24 h post exposure was chosen in accordance to previous *in vivo* studies (Sabourin et al., 2002).

Clinical symptoms of SM-poisoning, such as erythema, skin blister

formation and ulceration have been linked to apoptotic cell death which is discussed as one of the main mechanisms of molecular toxicology (Kehe et al., 2009b). Therefore, anti-apoptotic substances appear promising for counteracting SM toxicity.

BER was shown to exhibit both anti-apoptotic and anti-inflammatory properties (Wang et al., 2017). In order to investigate non-toxic doses of BER in our final experiments, we first determined its cytotoxicity in our cell models. BER was well tolerated in our experiments with a LC_{50} of 370 μM . Other studies reported 50 μM BER as the maximum applicable concentration without toxic effects while higher concentrations exhibited phototoxic effects in cell cultures (Inbaraj et al., 2001). Thus, we have chosen BER concentrations of 10, 30 or 50 μM for our experiments. These concentrations did not affect viability measured in pretrial experiments using XTT viability assay relevantly.

BER showed distinct, dose-dependent anti-apoptotic properties after SM exposure in both MoC and CoC experiments. A reduction of more than 50% was achieved by 50 μM BER. Extrinsic apoptosis is a process triggered by the activation of membrane death receptors. Whereas intrinsic apoptosis is linked to mitochondria permeabilization and dysfunction (Fulda and Debatin, 2006). Both pathways have been described to be influenced by SM (Kehe et al., 2009b; Rosenthal et al., 2000; Rosenthal et al., 2003). Activation of the extrinsic pathway by SM is triggered by death receptor stimulation e.g. TNF receptor 1 (TNFR1) and an enhanced expression of Fas receptor and Fas ligand (FasL). Regulation of the intrinsic pathway is contributed to changes in mitochondrial functionality. SM exposure leads to a mitochondrial outer membrane permeabilization (MOMP) and subsequent an activation of pro-apoptotic signals. Recent studies have attributed anti-apoptotic properties to BER; results in line with our findings (Wang et al., 2017).

Furthermore, apoptotic cell death and inflammation are influenced by the generation of reactive oxygen species (ROS) (Simon et al., 2010). Preventing tissue from destructive impact of oxidative stress is a therapeutic strategy in various inflammatory scenarios, also in sulfur mustard induced injury (Laskin et al., 2010). Regarding the anti-inflammatory and anti-apoptotic results in our study, a relation to the anti-oxidative effects of BER is suggested. Both, apoptosis and inflammation are linked to oxidative stress, therefore synergistic effects, as observed in our experiments, are the consequence. Various examinations revealed the anti-oxidative activity of BER (Shirwaikar et al., 2006). Particularly, modulation of oxidative markers is related to

S. Lang et al.

Toxicology Letters 293 (2018) 2–8

a shift in protein expression. Signal cascades responsible for upregulation of anti-oxidative proteins are activated under BER-treatment, for example the Nrf2 pathway (Hsu et al., 2013). Enhancing this pathway may prevent keratinocytes from vesicant induced cytotoxicity (Udasin et al., 2016).

Although the exact mechanism how BER affects cell death has not been unraveled so far, further research, including *in vivo* experiments, is required for a final assessment. Nevertheless, the observed anti-apoptotic effects *in vitro* may suggest BER as a therapeutic option in SM injury.

In addition to its impact on apoptotic cell death, BER decreased the release of inflammatory cytokines.

Inflammation is a highly complex process and thus difficult to investigate *in vitro*. We have chosen the pro-inflammatory cytokines IL-6 and IL-8 as surrogate parameters for the assessment of inflammatory activity. Increased levels of these cytokines have been described in SM injury, both *in vitro* and *in vivo* (Arroyo et al., 2000; Ricketts et al., 2000). As mentioned above, oxidative stress is a trigger for inflammation. Furthermore, NF- κ B-regulated pathways contribute to SM-induced cytokine release (Rebholz et al., 2008). BER is a modulator of NF- κ B-pathways thereby reducing the formation of inflammatory mediators (Chitra and Saiprasad, 2013): BER inhibits the phosphorylation of I κ B kinase with subsequent stabilization of the inactive I κ B/NF- κ B complex preventing its nuclear translocation and thereby reducing the expression of pro-inflammatory cytokines. Inhibition of NF- κ B pathways was found beneficial for treatment of SM-exposed patients (Kehe et al., 2008). Again, our results indicate that BER could also be beneficial by addressing SM-induced activation of NF- κ B pathways. However, the detailed mechanism is not identified yet; therefore more research focusing on the underlying mode of action of BER is needed.

In order to mimic the physiology of the skin more properly, we have used a CoC model, consisting of both keratinocytes and immune-competent cells, as described earlier (Balszweit et al., 2014). In general, effects of both SM and BER were more pronounced in CoC. Nevertheless, BER had comparable effects in both MoC and CoC models.

Our results have proven anti-apoptotic and anti-inflammatory effects of BER after SM exposure *in vitro*. So far, some clinical trials, testing the therapeutic benefit of BER in various diseases including metabolic syndrome, diabetes and radiation-induced acute intestinal symptoms, are undertaken (Zhang et al., 2008; Affuso et al., 2010; Li et al., 2010). All these studies describe beneficial effects of BER treatment and declare BER as well tolerated without any substance-related toxicity. The protective mechanism of BER is unknown. It is assumed to address multiple targets (Yao et al., 2016). But especially this fact may be beneficial against SM toxicity, which is also a complex process with many pathways and mechanisms involved. Although BER is not a magic bullet counteracting SM, its use as add-on to other therapeutics is conceivable. A challenging characteristic of BER with regard to therapy will be the low solubility and the low permeability, which limits the systemic bioavailability (Battu et al., 2010). Therefore, research groups already addressed this issue and focused on innovative pharmaceutical dosage forms which should overcome this limitation (Chen et al., 2011; Ke et al., 2015).

Overall, BER has protective effects against SM toxicity *in vitro*. Whether this holds true *in vivo* should be evaluated in future studies.

Appendix A. Supplementary data

Supplementary data associated with this article can be found, in the online version, at <http://dx.doi.org/10.1016/j.toxlet.2017.09.004>.

References

Affuso, F., Ruvoilo, A., Micillo, F., Sacca, L., Fazio, S., 2010. Effects of a nutraceutical combination (berberine, red yeast rice and policosanols) on lipid levels and endothelial function randomized, double-blind, placebo-controlled study. *Nutr. Metab.*

- Cardiovasc. 20, 656–661.
- Arroyo, C.M., Schafer, R.J., Kurt, E.M., Broomfield, C.A., Carmichael, A.J., 2000. Response of normal human keratinocytes to sulfur mustard: cytokine release. *J. Appl. Toxicol.* 20.
- Balszweit, Frank, John, Harald, Schmidt, Annette, Kehe, Kai, Thiermann, Horst, Steinritz, Dirk, 2013. Silibinin as a potential therapeutic for sulfur mustard injuries. *Chem. Biol. Interact.* 206, 496–504.
- Balszweit, Frank, Menacher, Georg, Bloemeke, Brunhilde, Schmidt, Annette, Worek, Franz, Thiermann, Horst, Steinritz, Dirk, 2014. Development of a co-culture of keratinocytes and immune cells for *in vitro* investigation of cutaneous sulfur mustard toxicity. *Chem. Biol. Interact.* 223, 117–124.
- Balszweit, Frank, Menacher, Georg, Schmidt, Annette, Kehe, Kai, Popp, Tanja, Worek, Franz, Thiermann, Horst, Steinritz, Dirk, 2016. Protective effects of the thiol compounds GSH and NAC against sulfur mustard toxicity in a human keratinocyte cell line. *Toxicol. Lett.* 244, 35–43.
- Battu, S.K., Repka, M.A., Maddineni, S., Chittiboyina, A.G., Avery, M.A., Majumdar, S., 2010. Physicochemical characterization of berberine chloride: a perspective in the development of a solution dosage form for oral delivery. *AAPS PharmSciTech* 11 (3), 1466–1475.
- Boukamp, P., Petrussevska, R.T., Breitkreutz, D., Hornung, J., Markham, A., Fusenig, N.E., 1988. Normal keratinization in a spontaneously immortalized aneuploid human keratinocyte cell line. *J. Cell Biol.* 106 (3), 761–771.
- Casillas, R.P., Kiser, R.C., Truxall, J.A., Singer, A.W., Shumaker, S.M., Niemuth, N.A., Ricketts, K.M., Mitcheltree, L.W., Castrejon, L.R., Blank, J.A., 2000. Therapeutic approaches to dermatotoxicity by sulfur mustard I. Modulation of sulfur mustard-induced cutaneous injury in the mouse ear vesicant model. *J. Appl. Toxicol.* 20 (S1).
- Chen, W., Miao, Y.Q., Fan, D.J., Yang, S.S., Lin, X., Meng, L.K., Tang, X., 2011. Bioavailability study of berberine and the enhancing effects of TPGS on intestinal absorption in rats. *AAPS PharmSciTech* 12 (2), 705–711.
- Chitra, G., Saiprasad, R., 2013. Berberine attenuates bleomycin induced pulmonary toxicity and fibrosis via suppressing NF- κ B dependant TGF- β activation: a biphasic experimental study. *Toxicol. Lett.* 219 (2), 178–193.
- Crosera, M., Prodi, A., Mauro, M., Pelin, M., Florio, C., Bellomo, F., Adami, G., Apostoli, P., de Palma, G., Bovenzi, M., Campanini, M., Filon, F.L., 2015. Titanium dioxide nanoparticle penetration into the skin and effects on HaCaT cells. *Int. J. Environ. Res. Public Health* 12 (8), 9282–9297.
- Dachir, S., Fishbeine, E., Meshulam, Y., Sahar, R., Amir, A., Kadar, T., 2002. Potential anti-inflammatory treatments against cutaneous sulfur mustard injury using the mouse ear vesicant model. *Hum. Exp. Toxicol.* 21 (4), 197–203.
- Dong, H., Wang, N., Zhao, L., Lu, F., 2012. Berberine in the treatment of type 2 diabetes mellitus: a systemic review and meta-analysis. *Evid.-Based Complement. Altern. Med.* 2012.
- Ermolli, M., Menné, C., Pozzi, G., Serra, M.-Á., Clerici, L.A., 2001. Nickel, cobalt and chromium-induced cytotoxicity and intracellular accumulation in human haCaT keratinocytes. *Toxicology* 159 (1–2), 23–31.
- Fulda, S., Debatin, K.-M., 2006. Extrinsic versus intrinsic apoptosis pathways in anticancer chemotherapy. *Oncogene* 25 (34), 4798–4811.
- Heinrich, A., Balszweit, F., Thiermann, H., Kehe, K., 2009. Rapid simultaneous determination of apoptosis, necrosis, and viability in sulfur mustard exposed HaCaT cell cultures. *Toxicol. Lett.* 191 (2–3), 260–267.
- Hennen, J., Blomeke, B., 2017. Keratinocytes improve prediction of sensitization potential and potency of chemicals with THP-1 cells. *ALTEX* 34.
- Hennen, J., Aebly, P., Goebel, C., Schettgen, T., Oberli, A., Kalmes, M., Blomeke, B., 2011. Cross talk between keratinocytes and dendritic cells: impact on the prediction of sensitization. *Toxicol. Sci.* 123 (2), 501–510.
- Hsu, Y.-Y., Tseng, Y.-T., Lo, Y.-C., 2013. Berberine, a natural antidiabetic drug, attenuates glucose neurotoxicity and promotes Nrf2-related neurite outgrowth. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* 272 (3), 787–796.
- Hu, Z., Jiao, Q., Ding, J., Liu, F., Liu, R., Shan, L., Zeng, H., Zhang, J., Zhang, W., 2011. Berberine induces dendritic cell apoptosis and has therapeutic potential for rheumatoid arthritis. *Arthritis Rheumatol.* 63 (4), 949–959.
- Imanshahidi, M., Hosseinzadeh, H., 2008. Pharmacological and therapeutic effects of *Berberis vulgaris* and its active constituent, berberine. *Phytother. Res.* 22.
- Inbaraj, J.J., Kukielczak, B.M., Bilski, P., Sandvik, S.L., Chignell, C.F., 2001. Photochemistry and photocytotoxicity of alkaloids from goldenseal (*Hydrastis canadensis* L.) I. berberine. *Chem. Res. Toxicol.* 14 (11), 1529–1534.
- Ke, Z., Zhu, Z., Xu, Z., Fang, C., Hu, S., 2015. Formulation design and *In vitro* evaluation of berberine-loaded self-Nanoemulsifying drug delivery system. *Trop. J. Pharm. Res.* 14 (5), 747–752.
- Kehe, K., Szincz, L., 2005. Medical aspects of sulphur mustard poisoning. *Toxicology* 214 (3), 198–209.
- Kehe, K., Balszweit, F., Emmler, J., Kreppel, H., Jochum, M., Thiermann, H., 2008. Sulfur mustard research—strategies for the development of improved medical therapy. *Eplasty* 8, e32.
- Kehe, K., Thiermann, H., Balszweit, F., Eyer, F., Steinritz, D., Zilker, T., 2009a. Acute effects of sulfur mustard injury—Munich experiences. *Toxicology* 263 (1), 3–8.
- Kehe, K., Balszweit, F., Steinritz, D., Thiermann, H., 2009b. Molecular toxicology of sulfur mustard-induced cutaneous inflammation and blistering. *Toxicology* 263 (1), 12–19.
- Kumar, A., Ekavali, Chopra, K., Mukherjee, M., Pottabathini, R., Dhull, D.K., 2015. Current knowledge and pharmacological profile of berberine: an update. *Eur. J. Pharmacol.* 761, 288–297.
- Kuo, C.-L., Chi, C.-W., Liu, T.-Y., 2004. The anti-inflammatory potential of berberine *in vitro* and *in vivo*. *Cancer Lett.* 203 (2), 127–137.
- Lardot, C., Dubois, V., Lison, D., 1999. Sulfur mustard upregulates the expression of interleukin-8 in cultured human keratinocytes. *Toxicol. Lett.* 110 (1–2), 29–33.

S. Lang et al.

Toxicology Letters 293 (2018) 2–8

- Laskin, J.D., Black, A.T., Jan, Y., Sinko, P.J., Heindel, N.D., Sunil, V., Heck, D.E., Laskin, D.L., 2010. Oxidants and antioxidants in sulfur mustard-induced injury. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* 1203 (1), 92–100.
- Li, G.-H., Wang, D.-L., Hu, Y.-D., Pu, P., Li, D.-Z., Wang, W.-D., Zhu, B., Hao, P., Wang, J., Xu, X.-Q., Wan, J.-Q., Zhou, Y.-B., Chen, Z.-T., 2010. Berberine inhibits acute radiation intestinal syndrome in human with abdomen radiotherapy. *Med. Oncol.* 27 (3), 919–925.
- Mangerich, A., Debiak, M., Birtel, M., Ponath, V., Balszuweit, F., Lex, K., Martello, R., Burckhardt-Boer, W., Strobelt, R., Siegert, M., Thiermann, H., Steinritz, D., Schmidt, A., Burkle, A., 2016. Sulfur and nitrogen mustards induce characteristic poly(ADP-ribose)ylation responses in HaCaT keratinocytes with distinctive cellular consequences. *Toxicol. Lett.* 244, 56–71.
- OPCW Technical Secretariat, 2015. Report of the OPCW fact-finding Mission in Syria regarding alleged incidents in MAREA, Syrian Arab Republic August 2015.
- Pandey, M.K., Sung, B., Kunnumakkara, A.B., Sethi, G., Chaturvedi, M.M., Aggarwal, B.B., 2008. Berberine modifies cysteine 179 of I κ B α kinase, suppresses nuclear factor- κ B-Regulated antiapoptotic gene products, and potentiates apoptosis. *Cancer Res.* 68 (13), 5370–5379.
- Rebholz, B., Kehe, K., Ruzicka, T., Rupec, R.A., 2008. Role of NF- κ B/RelA and MAPK pathways in keratinocytes in response to sulfur mustard. *J. Invest. Dermatol.* 128 (7), 1626–1632.
- Ricketts, K.M., Santai, C.T., France, J.A., Graziosi, A.M., Doyel, T.D., Gazaway, M.Y., Casillas, R.P., 2000. Inflammatory cytokine response in sulfur mustard-exposed mouse skin. *J. Appl. Toxicol. JAT* 20 (Suppl 1), S73–6.
- Rosenthal, D.S., Simbulan-Rosenthal, C.M., Iyer, S., Smith, W.J., Ray, R., Smulson, M.E., 2000. Calmodulin, poly(ADP-ribose)polymerase and p53 are targets for modulating the effects of sulfur mustard. *J. Appl. Toxicol. JAT* 20 (Suppl 1), S43–9.
- Rosenthal, D.S., Veleno, A., Chou, F.P., Schlegel, R., Ray, R., Benton, B., Anderson, D., Smith, W.J., Simbulan-Rosenthal, C.M., 2003. Expression of dominant-negative Fas-associated death domain blocks human keratinocyte apoptosis and vesication induced by sulfur mustard. *J. Biol. Chem.* 278 (10), 8531–8540.
- Sabourin, C.L.K., Danne, M.M., Buxton, K.L., Casillas, R.P., Schlager, J.J., 2002. Cytokine, chemokine, and matrix metalloproteinase response after sulfur mustard injury to weanling pig skin. *J. Biochem. Mol. Toxicol.* 16 (6), 263–272.
- Shirwaikar, A., Shirwaikar, A., Rajendran, K., Punitha, I.S.R., 2006. In vitro antioxidant studies on the benzyl tetra isoquinoline alkaloid berberine. *Biol. Pharm. Bull.* 29 (9), 1906–1910.
- Simon, H.-U., Haj-Yehia, A., Levi-Schaffer, F., 2010. Role of reactive oxygen species (ROS) in apoptosis induction. *Apoptosis* 5 (5), 415–418.
- Smith, W.J., Sanders, K.M., Ruddle, S.E., Gross, C.L., 2008. Cytometric analysis of DNA changes induced by sulfur mustard, journal of toxicology. *Cutan. Ocul. Toxicol.* 12 (4), 337–347.
- Steinritz, D., Striepling, E., Rudolf, K.-D., Schroder-Kraft, C., Puschel, K., Hullard-Pulstinger, A., Koller, M., Thiermann, H., Gandor, F., Gawlik, M., John, H., 2016. Medical documentation, bioanalytical evidence of an accidental human exposure to sulfur mustard and general therapy recommendations. *Toxicol. Lett.* 244, 112–120.
- Tietze, C., Blomeke, B., 2008. Sensitization assays: monocyte-derived dendritic cells versus a monocytic cell line (THP-1). *J. Toxicol. Environ. Health A* 71 (13–14), 965–968.
- Tsuchiya, S., Yamabe, M., Yamaguchi, Y., Kobayashi, Y., Konno, T., Tada, K., 1980. Establishment and characterization of a human acute monocytic leukemia cell line (THP-1). *Int. J. Cancer* 26 (2), 171–176.
- Udasin, R.G., Wen, X., Bircsak, K.M., Aleksunes, L.M., Shakarjian, M.P., Kong, A.-N.T., Heck, D.E., Laskin, D.L., Laskin, J.D., 2016. Nr2f regulates the sensitivity of mouse keratinocytes to nitrogen mustard via multidrug resistance-Associated protein 1 (Mrp1). *Toxicol. Sci.* 149 (1), 202–212.
- Wang, Z., Chen, Z., Chen, T., Yi, T., Zheng, Z., Fan, H., 2017. Berberine attenuates inflammation associated with delayed-Type hypersensitivity via suppressing th1 response and inhibiting apoptosis. *Inflammation* 40 (1), 221–231.
- Xie, J., Xu, Y., Huang, X., Chen, Y., Fu, J., Xi, M., Wang, L., 2015. Berberine-induced apoptosis in human breast cancer cells is mediated by reactive oxygen species generation and mitochondrial-related apoptotic pathway. *Tumor Biol.* 36 (2), 1279–1288.
- Yao, J., Kong, W., Jiang, J., 2016. Learning from berberine: treating chronic diseases through multiple targets. *Sci. China Life Sci.* 58 (9), 854–859.
- Zhang, Y., Li, X., Zou, D., Liu, W., Yang, J., Zhu, N., Huo, L., Wang, M., Hong, J., Wu, P., Ren, G., Ning, G., 2008. Treatment of type 2 diabetes and dyslipidemia with the natural plant alkaloid berberine. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 93 (7), 2559–2565.

3.2 Necrosulfonamide - Unexpected effect in the course of a sulfur mustard intoxication

Georg Menacher, Frank Balszuweit, Simon Lang, Horst Thiermann, Kai Kehe, Thomas Gudermann, Annette Schmidt, Dirk Steinritz, Tanja Popp, *Chemico-Biological Interactions* **2018**, 298, 80-85.

Der Versuchsaufbau und Versuchsablauf waren an die Untersuchungen mit Berberin und die standardisierten Bedingungen der Testbatterie angelehnt. Einziger Unterschied war eine Anpassung der absoluten Zellzahl entsprechend des charge-nabhängigen Wachstumsverhaltens der HaCaT-Zellen, sodass letztlich, wie in der Testbatterie vorgesehen, eine konfluente Zellschicht untersucht wurde. Das Verhältnis von THP-1 zu HaCaT in der Co-Kultur blieb identisch bei 1:49. Die Exposition mit S-Lost erfolgte 48 Stunden nach der Aussaat der HaCaT-Zellen in den Konzentrationen 100 μM , 200 μM und 300 μM . Als Necrosulfonamid-Konzentrationen wurde für die Behandlung eine Stunde nach der Exposition basierend auf ermittelten LC_{50} -Daten 1 μM , 5 μM und 10 μM festgelegt. DMSO fungierte als Lösungsmittel für Necrosulfonamid und wurde als Lösungsmittelkontrolle in den für die Normierung jeweils unbehandelten Kontrollen eingesetzt.

Entgegen der ursprünglichen Hypothese, durch die Supplementierung von Necrosulfonamid den Anteil an nekrotischen Zellen zu vermindern, konnte dieser Effekt nicht gezeigt werden. Tendenziell erhöhte Necrosulfonamid sogar die Nekroserate. Ein relevanter Anstieg der Apoptose war vor allem bei den mit 200 μM und 300 μM S-Lost-exponierten Zellen zu sehen. Die Gabe von Necrosulfonamid reduzierte den Anteil apoptotischer Zellen in der Behandlungsgruppe um teilweise auf ein Fünftel im Vergleich zur unbehandelten Kontrolle, wobei 2 μM Necrosulfonamid keine signifikanten Effekte lieferte und erst ab 5 μM eine Wirksamkeit erkennbar wurde. Der Unterschied zwischen 5 μM und 10 μM war hier nicht sehr ausgeprägt. Ähnlich wie bei der Apoptose führte vor allem die Exposition mit 200 μM und 300 μM S-Lost zu deutlichen Anstiegen der IL-6- und IL-8-Level. Die Beobachtung, dass mittlere S-Lost-Konzentrationen (hier 200 μM) zur Produktion der höchsten Zytokinmengen führten, wurde auch bei den Versuchen mit Berberin beobachtet und zeigt, dass es sich um einen konsistenten Effekt handelt. Vergleichbar mit der Beschreibung im Abschnitt 3.1, ist diese Peak-Konzentration der inflammatorischen Zytokine mit dem Ausmaß des Zellschadens assoziiert. Leicht geschädigte Zellen sezernieren demnach weniger Entzündungsmarker und die schwer geschädigten, beispielsweise nekrotischen Zellen, sind nicht mehr in der Lage, Interleukine zu produzieren. Die Behandlung mit 5 μM Necrosulfonamid sorgte auch bei den Entzündungsmarkern IL-6 und IL-8 für die größte Reduktion. Statistische Signifikanz konnte in allen Gruppen gezeigt werden.

Die Tatsache, dass eine Behandlung mit dem Nekroptose-Inhibitor Necrosulfonamid die Zellschädigung und Entzündungsaktivität nach S-Lost-Exposition signifikant reduziert, liefert wertvolle Hinweise, dass dieser Mechanismus auch bei einer S-Lost-Intoxikation eine Rolle spielt. Um die Bedeutung der Nekroptose an der S-Lost-induzierten Gewebeschädigung weiter zu verstehen, sind im nächsten Schritt detailliertere Untersuchungen der genauen Abläufe notwendig. Hier können Zellmodelle und Untersuchungen auf Proteinebene wichtige Erkenntnisse liefern. Spätere Versuche in Tiermodellen müssen dann zeigen, ob es sich um eine erfolversprechende Therapieoption auch außerhalb der *in vitro* Modelle handeln kann.



Contents lists available at ScienceDirect

Chemico-Biological Interactions

journal homepage: www.elsevier.com/locate/chembioint

Necrosulfonamide – Unexpected effect in the course of a sulfur mustard intoxication



Georg Menacher^{a,1}, Frank Balszuweit^{b,1}, Simon Lang^a, Horst Thiermann^a, Kai Kehe^{a,d},
Thomas Gudermann^c, Annette Schmidt^{a,e}, Dirk Steinritz^{a,c}, Tanja Popp^{a,c,*}

^a Bundeswehr Institute of Pharmacology and Toxicology, Neuherbergstraße 11, 80937, Munich, Germany

^b Bundeswehr Medical Command, 56070, Koblenz, Germany

^c Walther-Straub-Institute of Pharmacology and Toxicology, Ludwig-Maximilian-University Munich, Goethestraße 33, 80336, Munich, Germany

^d Bundeswehr Medical Academy, Dept. Medical CBRN Defense, 80937, Munich, Germany

^e Bundeswehr University Munich, Faculty of Human Sciences, 85577, Neubiberg, Germany

ARTICLE INFO

Keywords:

Sulfur mustard
Necrosulfonamide
Apoptosis
Necrosis
Necroptosis
Interleukin

ABSTRACT

Although its first military use in Ypres was 100 years ago, no causal therapy for sulfur mustard (SM) intoxications exists so far. To improve the therapeutic options for the treatment of SM intoxications, we developed a co-culture of keratinocytes (HaCaT cells) and immunocompetent cells (THP-1 cells) to identify potential substances for further research. Here, we report on the influence of necrosulfonamide (NSA) on the course of a SM intoxication *in vitro*. The cells were challenged with 100, 200 and 300 μM SM and after 1 h treated with NSA (1, 5, 10 μM). NSA was chosen for its known ability to inhibit necroptosis, a specialized pathway of programmed necrosis. However, in our settings NSA showed only mild effects on necrotic cell death after SM intoxication, whereas it had an immense ability to prevent apoptosis. Furthermore, NSA was able to reduce the production of interleukin-6 and interleukin-8 at certain concentrations. Our data highlight NSA as a candidate compound to address cell death and inflammation in SM exposure.

1. Introduction

Sulfur mustard (SM) is a vesicant agent which leads dose-dependently to necrosis, apoptosis and inflammation [18]. Despite immense research effort, the underlying toxicological mechanism of SM is not fully understood. Most likely there is an interplay of several mechanisms [37]. SM is able to alkylate cell components like DNA, RNA, proteins and membrane lipids that lead *per se* to cell damage [19]. The activation of poly-ADP-ribose polymerase (PARP) occurs due to a congestion of the DNA-repair mechanisms [10,25]. SM intoxication also leads to an increase in the production of reactive oxygen species (ROS) and reactive nitrogen species (RNS) which results in oxidative stress and cell damage [26,36]. Furthermore, an increase in the cellular calcium (Ca^{2+}) levels [31] and the production of inflammatory cytokines, like interleukin (IL)-1 α , IL-1 β , IL-6, IL-8 and tumor necrosis factor-alpha (TNF- α) is observable [19,32].

Though its first military use in Ypres was 100 years ago, no causal therapy for SM intoxication is available so far [37]. To improve the therapeutic options for the treatment of SM casualties we established an

in vitro co-culture model consisting of keratinocytes (HaCaT) and immunocompetent cells (THP-1) to identify potential candidate substances for further research [4].

Apoptosis is described as a regulated cell death which can be activated by physiological as well as pathophysiological stimuli. It is characterized by two discrete stages: Firstly, condensation of nuclear and cytoplasmic structures and the breakdown of the cell into vesicles. Secondly, uptake of the apoptotic bodies by phagocytic cells and lysis of the vesicles in phagosomes [20]. Apoptosis does not provoke inflammation because it is an orderly process which leads not to cellular leakage. In contrast, during necrosis, damage-associated molecular patterns (DAMPs) proteins like HMGB1 protein (high mobility group box 1), which is a potent mediator of inflammation, are released into the adjacent tissue and induce inflammation-associated processes [33]. Necrosis is characterized by swelling and puncturing of the cytoplasmic membrane. A highly regulated pathway of necrosis is the RIPK 3 dependent necroptosis. The best characterized activation mechanism of necroptosis includes the TNF- α receptor 1 (TNFR1) [40]. Upon TNF- α binding, trimerization of TNFR1 occurs and a necroptosis inducing

* Corresponding author. Neuherbergstraße 11, 80937, Munich, Germany.

E-mail address: tanjapopp@bundeswehr.org (T. Popp).

¹ contributed equally.

<https://doi.org/10.1016/j.cbi.2018.10.030>

Received 11 June 2018; Received in revised form 23 October 2018; Accepted 31 October 2018

Available online 02 November 2018

0009-2797/ © 2018 Elsevier B.V. All rights reserved.

Abbreviations		IL-6	interleukin-6
AK	adenylate kinase	IL-8	interleukin-8
AU	artificial units	MLKL	mixed lineage kinase domain-like
Ca ²⁺	calcium-ion	NSA	necrosulfonamide
CDDE	Cell Death Detection ELISA	PBS	phosphate-buffered saline
DMSO	dimethyl sulfoxide	RIPK	receptor-interacting protein kinase
ELISA	enzyme linked immunosorbent assay	SIRS	systemic inflammatory response syndrome
EtOH	ethanol	SM	sulfur mustard
FBS	fetal bovine serum	TNF- α	tumor necrosis factor-alpha

complex is formed which consist, among other factors, of receptor-interacting protein kinase (RIPK) 1 and RIPK3 [15]. This leads to the phosphorylation of the mixed lineage kinase like pseudokinase (MLKL). The subsequent oligomerization and translocation to the plasma membrane results in permeabilization of the cell membrane and in an influx of positively charged ions resulting in cell death [11,11,11,44]. Although the biological functions of necroptosis are not completely understood, a contribution in disease pathology and tissue homeostasis was ascertained [44]. Described as the main trigger of necroptosis, TNF- α secretion was increased in SM exposed skin and keratinocyte models [13,41]. Based on these findings, a contribution of necroptosis in SM induced inflammation and cell death seems plausible and a new promising approach for therapeutic treatment. Inhibitors of the necroptotic pathway are under investigation to modulate various clinical pictures in inflammatory diseases and systemic inflammatory response syndrome (SIRS) [8]. A substance which interacts with the RIPK3 downstream molecule MLKL is necrosulfonamide (NSA, (E)-N-(4-(N-(3-methoxy-pyrazin-2-yl)sulfamoyl)phenyl)-3-(5-nitrothiophene-2-yl)acrylamide). By binding to the active domain of MLKL, NSA arrests cellular necroptosis although the active necrosome containing RIPK1 and RIPK3 is still present in the cytoplasm [38]. Interestingly, NSA was able to prevent cell death of motor neurons co-cultivated with human sporadic amyotrophic lateral sclerosis (ALS) astrocytes [29]. Furthermore, in a sepsis mouse model NSA was already used reducing cell death and alleviates harmful inflammation response [27]. In this study, we focused on the cytoprotective and anti-inflammation effects of NSA after SM exposure *in vitro*.

2. Material and methods

2.1. Materials

Sulfur mustard (SM) was provided by the German Ministry of Defense. Cell Death Detection ELISAs (CDDE) were obtained from Roche (Basel, Switzerland) and ToxiLight BioAssay kits from Lonza (Basel, Switzerland). IL-6 and IL-8 ELISA kits were purchased from eBioscience (Frankfurt am Main, Germany). HaCaT cells were purchased from CLS (Eppelheim, Germany). Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM), RPMI-1640, phosphate-buffered saline (PBS) and fetal bovine serum (FBS) from Gibco (Darmstadt, Germany). Ethanol (EtOH) and dimethyl sulfoxide (DMSO) was obtained from Carl Roth (Karlruhe, Germany). Necrosulfonamide (NSA) and 2-mercaptoethanol

was purchased from Sigma Aldrich (Taufkirchen, Germany).

2.2. Cell culture methods

HaCaT cells [6,7] were cultivated in Dulbecco's modified Eagles medium (DMEM) containing 5% fetal bovine serum (FBS). THP-1 cells [39] were cultured in flasks with THP-medium (RPMI-1640 supplemented with 20% FBS and 0.05 mM 2-mercaptoethanol). No antibiotics were used in the whole experiment procedure. Cell numbers were assessed by an impedance-based count system (CASY) which finally displays event counts.

In the experiment 50,000 HaCaT cells (event counts) per well were seeded on two 96-well-plates and incubated at 37 °C for 24 h in a humidified atmosphere containing 5% CO₂. This enabled the HaCaT cells to adhere and start proliferation. Then, the DMEM was removed from the plates and a THP-1 cell suspension (1000 cells (event counts)) was applied on each well of the first 96-well-plate like in our previous experiments [4]. The other 96-well plate was treated with pure THP-medium and served as HaCaT monoculture. Both plates were then incubated for another 24 h at the before mentioned conditions (Fig. 1).

2.3. Sulfur mustard exposure

Stock solutions of SM were prepared in EtOH beforehand and the SM working solutions in THP-medium were prepared immediately before usage to avoid SM hydrolysis. We exposed the cells to SM concentrations of 100, 200 and 300 μ M. THP-medium with the equivalent amount of EtOH was applied to the control wells. After SM exposure, cells were incubated for 1 h under before mentioned conditions (Fig. 1).

2.4. Necrosulfonamide treatment

For therapy, necrosulfonamide (NSA) was applied in different concentrations (1, 5 and 10 μ M) 1 h after SM exposure. The medium was not removed during the experiment procedure. DMSO served as solvent and was added to the THP-medium for the sham-treated wells in equivalent amounts. After NSA therapy, cells were incubated for another 24 h under before mentioned conditions (Fig. 1).

2.5. Sampling

Supernatants were collected after centrifugation of the 96-well-

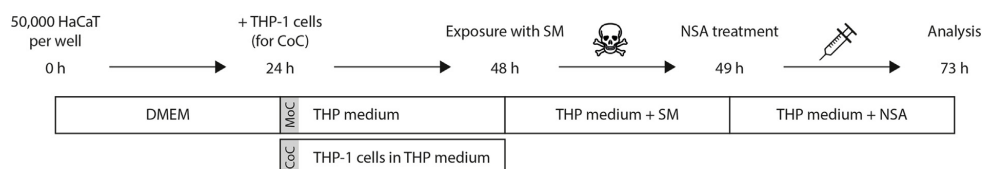


Fig. 1. Timeline of the experimental design. 50,000 HaCaT were seeded. After 24 h DMEM was either replaced by THP-1 medium (monoculture) or 1000 THP-1 cells were added (co-culture). Exposure to SM was performed 24 h later and after 1 h cells were treated with NSA. Samples were analyzed 24 h after NSA treatment.

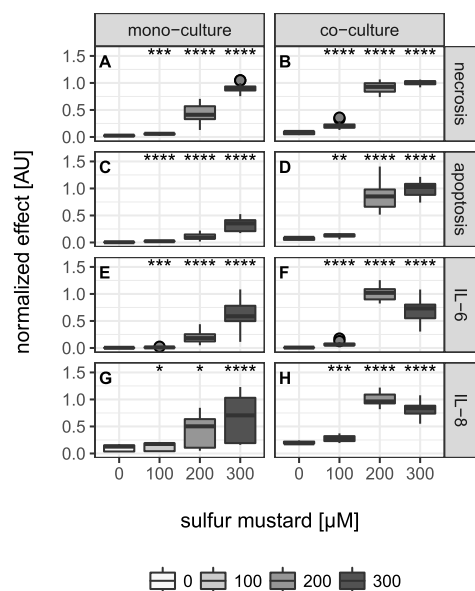


Fig. 2. HaCaT cells grown in monoculture (A, C, E, G) and in co-culture together with THP-1 cells (B, D, F, H) were challenged with 100, 200, 300 μM sulfur mustard (SM) or were exposed to the vehicle control (0 μM) for 1 h (A, B). Effects on cell integrity were determined by measurement of the adenylate kinase (AK) in the supernatants and the lysates to calculate the proportion of necrotic cells. (C, D) Apoptotic activity was assessed by a cell death ELISA measuring the amount of nucleosomes in the cytoplasm. (E, F) Interleukin-6 (IL-6) and (G, H) interleukin-8 (IL-8) secretion levels were quantified in the supernatants 24 h after treatment. Means and standard deviations were calculated from triplicate analysis ($n = 3$) measured in technical replicates ($n = 6$ for each treatment; $n = 3$ for the controls) and are visualized by Tukey boxplots (median, lower and upper quartile, whiskers at 1.5 IQR, circles indicate single outliers). Asterisks indicate significant differences to the 0 μM SM group with ns for not significant, * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$ and **** $p < 0.0001$.

plates at 300 g and 4 °C for 5 min. Either AK activity was determined immediately, or supernatants were stored at -20 °C for cytokine quantification. Afterwards, cells were washed twice with phosphate-buffered saline (PBS) to remove cell debris and cell remnants. The remaining cells were lysed with 0.1% Triton-X-100 in PBS on a plate shaker at 100 rpm for 30 min (cooled on ice). The lysates were collected and immediately analyzed.

2.6. Analysis of necrosis (cell integrity), apoptosis and release of inflammatory cytokines

The methodology used for quantification of the different parameters was previously described in detail [3,5,16].

In brief, adenylate kinase (AK) is an ubiquitous enzyme that is only released into the supernatant upon cell disruption. For quantification of the AK in the supernatant as well as in the lysate, the ToxiLight BioAssay (Lonza, Basel, Switzerland) was used. The amount of AK in the supernatant ($\text{AK}_{\text{supernatant}}$) represents the loss of cell integrity, whereas the amount of AK in the lysate ($\text{AK}_{\text{lysate}}$) correlates with the number of intact, adherent cells. The sum of $\text{AK}_{\text{supernatant}}$ and $\text{AK}_{\text{lysate}}$ (AK_{total}) reflects the total number of cells in the particular well. The percentage of necrotic cells was calculated by forming the ratio of $\text{AK}_{\text{supernatant}}$ and AK_{total} for each well individually.

For quantification of enriched nucleosomes in the cytoplasm, which

are formed during apoptosis, the CDDE (Cell Death Detection ELISA plus from Roche, Basel, Switzerland) was used. Results were calculated from the ratio of the amount of nucleosomes and $\text{AK}_{\text{lysate}}$ for each well individually. Consequently, we obtained the apoptotic activity in the intact cells at the end of the incubation period.

SM intoxication usually is accompanied by inflammation and leads to the upregulation of cytokines like interleukin-6 (IL-6) [1] and interleukin-8 (IL-8) [21]. In our experiments, we monitored the progress of inflammation on the basis of IL-6- and IL-8-release in the supernatants. For interleukin quantification, we used ELISA kits (eBioscience, San Diego, USA) according to the manufacturer's protocol. To correlate absolute interleukin levels with the number of cells per well we calculated the ratio of interleukin levels in the supernatant and AK_{total} for each well individually.

2.7. Cytokine release in different cell culture systems

SM exposure results in varied impact on cytokine expression depending on the investigated cell line. For a wide cytokine screening, experiments in monocultures were performed. For HaCaT, 300,000 cells were seeded on a 12-well plate and exposed to 100 μM SM 48 h later. THP-1 cells were cultured in a density of 400,000 cells per well and exposure to 100 μM SM was performed 24 h later. Experimental settings were chosen in accordance to the other experiments and therefore the cell count at the timepoint of exposure was comparable. Supernatants were analyzed 24 h post-exposure using a bioplex multiplex assay (BioRad Laboratories, Hercules, USA).

2.8. Statistical analysis

The data of three independent experiments were normalized using the sham-treated, 300 μM SM-exposed co-cultures for evaluation of necrosis and apoptosis, or sham-treated, 200 μM SM-exposed co-cultures for IL-6 and IL-8 levels. Normalized values were then pooled. Every group in each of the three experiments consisted of 6 wells resulting in $n = 18$. Only the control groups in each experiment consisted of 3 wells ($n = 9$). R version 3.4.1 was used for statistical analysis. Normal distribution of experimental values was tested using the Shapiro-Wilk's test. Several violations of normal distribution were found in all groups. Moreover, Figner-Killeen and Levene's revealed violation of homoscedasticity. Thus, Wilcoxon signed-rank test was chosen to evaluate statistical differences between groups.

3. Results

3.1. Effect of SM on HaCaT cells in different cell culture systems

HaCaT cells were cultivated in monoculture and in a co-culture system together with THP-1 cells. Cells were exposed to various SM concentrations ranging from 100 to 300 μM or to EtOH as a solvent control. Subsequently, different parameters like necrosis (Fig. 2A and B), apoptosis (Fig. 2C and D) and the expression of the inflammatory cytokines IL-6 (Fig. 2E and F) and IL-8 (Fig. 2G and H) were evaluated. Fig. 2 convincingly shows that all parameters were significantly increased in a dose-dependent manner. Nevertheless, the exposure to 300 μM SM lead to a drop in cytokine secretion in co-culture due to enhanced cytotoxic effects which is in line with own previous observations [4]. To assess which cell type was the main source of the cytokines, the supernatants of monocultured cells were analyzed. IL-6 and IL-8 were mainly secreted by the keratinocytes (Figs. S1A and C) whereas TNF- α , which is important for various cell death pathways, was produced solely by the THP-1 cells (Fig. S1F). Levels of all analyzed cytokines increased after SM exposure (Fig. S1).

Interestingly, the extend of the effects of SM on all investigated parameters were more prominent in the co-culture system in which HaCaT cells were grown together with THP-1 cells (Figs. 2 and S2).

3.2. Effect of NSA in the co-culture after SM exposure

3.2.1. Effect of NSA on SM-induced necrosis

Since co-cultures were found more sensitive towards SM exposures, we focused on NSA treatment in these models. Nevertheless, similar experiments were performed also in monoculture which revealed comparable results (supplement Fig. S3). Co-cultured cells were exposed to different concentrations of SM (100–300 μM) or the solvent control EtOH as described before. Subsequently, cells were treated with NSA in various concentrations ranging from 1 to 10 μM or DMSO as the solvent control. Treatment with NSA had no biological relevant effect on the necrotic index in the control cells which were not exposed to SM (Fig. 3A). However, in SM-exposed cells, NSA surprisingly revealed to have the tendency to induce necrosis with increasing concentrations (Fig. 3B–D). In SM exposed cells, necrosis unexpectedly increased to some extent after NSA treatment.

3.2.2. Effect of NSA on apoptosis upon SM exposure

Cells were exposed to SM and subsequently treated with NSA to assess the apoptotic index in both cell culture systems. In the control groups (0 μM SM), apoptosis was almost non-existent (Fig. 3E). With increasing SM concentrations, apoptotic levels increased in a dose-dependent manner with a 1.5-, 10-, 12-fold increase from 100 μM to 300 μM (Fig. 3F–H). In the experiments with high SM concentrations of 200 μM and 300 μM the effect was considerable when treated with 5 and 10 μM NSA (Fig. 3G–H). A 3-fold decrease by 5 μM NSA and of 5-fold by 10 μM NSA in 200 μM SM exposed groups was observed compared to the untreated controls (Fig. 3G). With 300 μM the decrease was even stronger with 3.5-fold and 10-fold in 5 μM and 10 μM treated cells (Fig. 3H). The same trend was seen in NSA-treated monocultures (Fig. S3B) showing the strongest effect in monocultured HaCaT cells by reducing apoptosis by 95% in 300 μM SM exposed groups (Fig. S3B).

3.2.3. Impact of NSA on interleukin-6 production after SM exposure

Intoxication with SM is always accompanied by inflammation processes. To monitor the inflammatory response, the release of relevant cytokines was measured. The inflammation-associated IL-6 levels in the supernatant of monocultured cells increased with SM concentration (Fig. S3C). In co-cultures, IL-6 production of the cells exposed to 100 and 200 μM SM rose even stronger before it declined (Fig. 2F). Treatment with NSA had only significant effects at the SM concentrations which led to the highest IL-6 secretion. In co-culture, the most prominent reduction of IL-6 release of up to 50% was observed when 200 μM -exposed cells were treated with 10 μM NSA (Fig. 3K).

3.2.4. Impact of NSA on interleukin-8 production after SM exposure

In contrast to IL-6, cells showed a basal expression of IL-8 in the control groups which were not exposed to SM (Fig. 3M). The secretion of the pro-inflammatory cytokine IL-8 increased with SM concentration (Fig. 3N–P). NSA had only slight effects on IL-8 secretion. In co-cultures, 1 and 5 μM NSA reduced IL-8 significantly by 16 and 25% when cells were exposed to 200 μM SM (Fig. 3O).

4. Discussion

The aim of our study was to evaluate the ability of NSA to alleviate SM-induced pathways *in vitro* and therefore preventing SM induced cell death and inflammation. SM is an alkylating agent and induces a broad range of health problems which are based on very complex and inter-related molecular mechanisms ranging from inflammation to cell death. In the approach to compare monocultured HaCaT cells with HaCaT's co-cultivated with THP-1 cells, a higher percentage of necrosis, apoptosis and IL-production in the co-culture compared to the monoculture was observed. This is in agreement with our previous findings, in which the presence of THP-1 cells in the co-culture aggravates the course of a SM

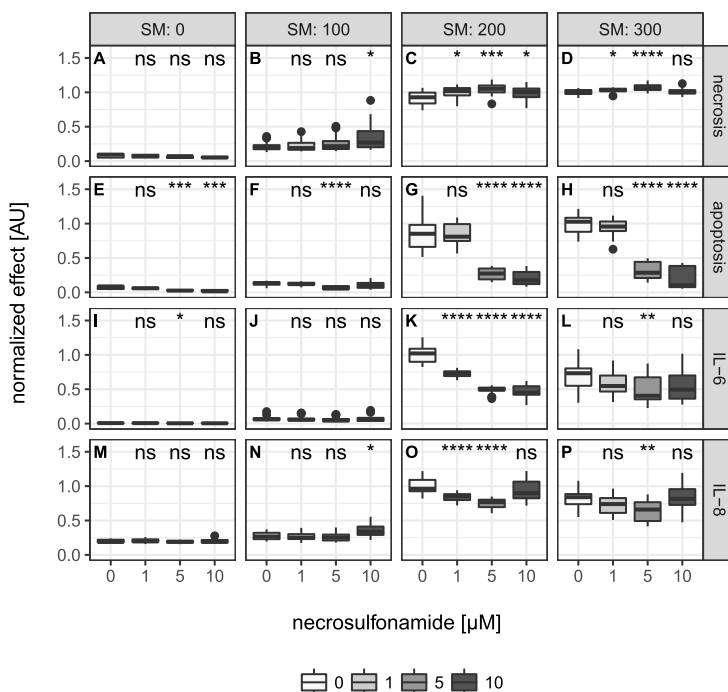


Fig. 3. HaCaT cells grown in co-culture together with THP-1 cells were challenged with 100, 200, 300 μM sulfur mustard (SM) or were exposed to the vehicle control (0 μM) for 1 h. Afterwards cells were treated with 1, 5 or 10 μM necrosulfonamide (NSA) or DMSO as a solvent control (0 μM). Effects on necrosis (A–D), apoptosis (E–H), interleukin-6 (IL-6) (I–L) and interleukin-8 (IL-8) (M–P) were determined. Means and standard deviations were calculated from triplicate analysis ($n = 3$) measured in technical replicates ($n = 6$ for each treatment; $n = 3$ for the controls) and are visualized by Tukey boxplots (median, lower and upper quartile, whiskers at 1.5 IQR, circles indicate single outliers). Asterisks indicate significant differences to the 0 μM SM group with ns for not significant, * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$ and **** $p < 0.0001$.

intoxication and therefore reflects the physiology of the skin more closely [4]. In this study, the participation of THP-1 after SM exposure was investigated in more detail (Fig. S3). A screening experiment in monocultures of THP-1 and HaCaT compared the release of various cytokines. THP-1 cells turned out to be the main producers of TNF- α , a key mediator of inflammation and various types of cell death. This may explain the higher level of cell death in co-cultures.

Former studies revealed that NSA can block the programmed form of necrosis called necroptosis [38]. They showed that NSA is a potent inhibitor of MLKL, a specific target of RIPK3. However, in our experiments the effect of NSA on necrosis was rather low. This implicates that HaCaT cells in monoculture and also in co-culture with monocytes do not respond with necroptosis to SM exposure but with a rather classical necrosis mechanism which was already described before [9].

In contrast to necrosis, NSA unexpectedly blocked SM-induced apoptosis impressively. Nucleosomes are released during apoptotic cell death and is a widely accepted surrogate marker for apoptosis. Therefore, apoptosis was determined using the CDDE assay which quantifies the number of nucleosomes. The decrease of nucleosomes after NSA treatment indicates cytoprotective effects of the substance. However, if rescuing apoptotic cells is desirable or not is a matter of debate during the last decade and still no final conclusion can be drawn.

From cancer research it is already known that chemotherapeutics like cyclophosphamide induce various types of cell death including immunogenic cell death (ICD) [34]. Interestingly, RIP3 and MLKL contribute to the ICD signaling pathway [42]. Previous work showed that tumor cells expressing high levels of MLKL are more sensitive to chemotherapeutics [28]. This means in turn that a reduction of MLKL levels results in resistance to the chemotherapeutic-dependent induction of apoptosis. Noteworthy, many chemotherapeutics were developed from nitrogen mustard which belongs to the group of vesicants that also included SM [14,35]. Thereof, an assumed reduced level of MLKL due to NSA treatment may explain the strong reduction of apoptosis in our system.

From *in vitro* experiments and *in vivo* models it is widely accepted that SM strongly induces IL-6 expression [2,30]. IL-6 was even suggested as biomarker for evaluating anti-inflammatory drugs against SM-induced skin injury [30]. In our experiments, NSA treatment resulted in a significant reduction of IL-6 secretion, especially in the 200 μ M SM group, while effects in 300 μ M SM group were only moderate.

In accordance, previously Sun et al. suggested that MLKL may mediate signal transduction beyond RIPK3 because it is more widely expressed than RIPK3 in different cell types [38]. In other cell systems, the impact of inhibition of RIPK3/MLKL on IL-6 expression was already shown. In a mouse model of neonatal hypoxia-ischemia, necrostatin-1, an inhibitor of RIPK1, effectively blocked the gene and protein expression of the cytokines IL-1 β , TNF- α and IL-6 [24]. Furthermore, in a colitis model necrostatin-1 significantly suppressed colitis symptoms in mice, including excessive production of IL-6 [22]. Also in acute liver injury, blocking of RIPK1 lead to a reduction of IL-6 serum levels which resulted in diminished inflammasome activation and reduced sterile inflammation [12]. The capacity of NSA to reduce IL-6 availability also in our system implicates that NSA could be a potent drug to target SM-induced inflammation.

Especially in co-cultures, NSA treatment showed significant reduction of IL-8. MLKL was already described as an activator of proinflammatory cytokine expression and its inhibition by NSA can reduce IL-8 production [45]. This indicates that necroptosis-associated pathways are induced by SM and are involved in SM-associated inflammation.

In conclusion, NSA proved to be a promising candidate for further research. The ability to reduce apoptosis in SM-intoxicated cells, though unexpected, may provide a new therapeutic approach after SM intoxication.

Funding

The work has been conducted in accordance to the scope and duties of the Bundeswehr Institute of Pharmacology and Toxicology. The institute is part of the German Armed Forces and funded by the German Ministry of Defence. No external funding for this research project has been received, offered or applied for.

Appendix A. Supplementary data

Supplementary data to this article can be found online at <https://doi.org/10.1016/j.cbi.2018.10.030>.

Transparency document

Transparency document related to this article can be found online at <https://doi.org/10.1016/j.cbi.2018.10.030>.

References

- [1] C.M. Arroyo, C.A. Broomfield, B.E., J.R. Hackley, The role of interleukin-6 (IL-6) in human sulfur mustard (HD) toxicology, *Int. J. Toxicol.* 20 (2001) 281–296.
- [2] C.M. Arroyo, D.L. Burman, R.E. Sweeney, C.A. Broomfield, M.C. Ross, B.E. Hackley, Neutralization effects of interleukin-6 (IL-6) antibodies on sulfur mustard (HD)-induced IL-6 secretion on human epidermal keratinocytes, *Environ. Toxicol. Pharmacol.* 17 (2004) 87–94, <https://doi.org/10.1016/j.etap.2004.03.004>.
- [3] F. Balszuweit, H. John, A. Schmidt, K. Kehe, H. Thiermann, D. Steinritz, Silibinin as a potential therapeutic for sulfur mustard injuries, *Chem. Biol. Interact.* 206 (2013) 496–504, <https://doi.org/10.1016/j.cbi.2013.06.010>.
- [4] F. Balszuweit, G. Menacher, B. Bloemeke, A. Schmidt, F. Worek, H. Thiermann, D. Steinritz, Development of a co-culture of keratinocytes and immune cells for *in vitro* investigation of cutaneous sulfur mustard toxicity, *Chem. Biol. Interact.* 223 (2014) 117–124, <https://doi.org/10.1016/j.cbi.2014.09.002>.
- [5] F. Balszuweit, G. Menacher, A. Schmidt, K. Kehe, T. Popp, F. Worek, H. Thiermann, D. Steinritz, Protective effects of the thiol compounds GSH and NAC against sulfur mustard toxicity in a human keratinocyte cell line, *Toxicology Letters* 244 (2016) 35–43, <https://doi.org/10.1016/j.toxlet.2015.09.002>.
- [6] P. Boukamp, R.T. Petrussevska, D. Breitkreutz, J. Hornung, A. Markham, N.E. Fusenig, Normal keratinization in a spontaneously immortalized aneuploid human keratinocyte cell line, *J. Cell Biol.* 106 (1988) 761–771.
- [7] D. Breitkreutz, H.J. Stark, P. Plein, M. Baur, N.E. Fusenig, Differential modulation of epidermal keratinization in immortalized (HaCaT) and tumorigenic human skin keratinocytes (HaCaT-ras) by retinoic acid and extracellular Ca²⁺, *Differentiation: research in biological diversity* 54 (1993) 201–217.
- [8] M. Conrad, J.P.F. Angeli, P. Vandenabeele, B.R. Stockwell, Regulated necrosis: disease relevance and therapeutic opportunities, *Nat. Rev. Drug Discov.* 15 (2016) 348–366, <https://doi.org/10.1038/nrd.2015.6>.
- [9] M.I. Dabrowska, L.L. Becks, J.L. Lelli, M.G. Levee, D.B. Hinshaw, Sulfur mustard induces apoptosis and necrosis in endothelial cells, *Toxicol. Appl. Pharmacol.* 141 (1996) 568–583.
- [10] M. Debiak, K. Kehe, A. Burkle, Role of poly(ADP-ribose) polymerase in sulfur mustard toxicity, *Toxicology* 263 (2009) 20–25, <https://doi.org/10.1016/j.tox.2008.06.002>.
- [11] A. Degterev, Z. Huang, M. Boyce, Y. Li, P. Jagtap, N. Mizushima, G.D. Cuny, T.J. Mitchison, M.A. Moskowitz, J. Yuan, Chemical inhibitor of nonapoptotic cell death with therapeutic potential for ischemic brain injury, *Nat. Chem. Biol.* 1 (2005) 112–119, <https://doi.org/10.1038/nchembio711>.
- [12] M. Deutsch, C.S. Graffeo, R. Rokosh, M. Pansari, A. Ochi, E.M. Levie, E. van Heerden, D.M. Tippens, S. Greco, R. Barilla, L. Tomkötter, C.P. Zambirinis, N. Avanzi, R. Gulati, H.L. Pachter, A. Torres-Hernandez, A. Eisenthal, D. Daley, G. Miller, Divergent effects of RIP1 or RIP3 blockade in murine models of acute liver injury, *Cell Death Dis.* 6 (2015) e1759, <https://doi.org/10.1038/cddis.2015.126>.
- [13] J.F. Dillman, K.L. McGary, J.J. Schlager, An inhibitor of p38 MAP kinase down-regulates cytokine release induced by sulfur mustard exposure in human epidermal keratinocytes, *Toxicol. Vitro: An International Journal Published in Association With BIBRA* 18 (2004) 593–599, <https://doi.org/10.1016/j.tiv.2004.01.009>.
- [14] A. Gilman, The initial clinical trial of nitrogen mustard, *Am. J. Surg.* 105 (1963) 574–578.
- [15] S. He, L. Wang, L. Miao, T. Wang, F. Du, L. Zhao, X. Wang, Receptor interacting protein kinase-3 determines cellular necrotic response to TNF- α , *Cell* 137 (2009) 1100–1111, <https://doi.org/10.1016/j.cell.2009.05.021>.
- [16] A. Heinrich, F. Balszuweit, H. Thiermann, K. Kehe, Rapid simultaneous determination of apoptosis, necrosis, and viability in sulfur mustard exposed HaCaT cell cultures, *Toxicol. Lett.* 191 (2009) 260–267, <https://doi.org/10.1016/j.toxlet.2009.09.008>.
- [17] K. Kehe, L. Szincz, Medical aspects of sulphur mustard poisoning, *Toxicology* 214 (2005) 198–209, <https://doi.org/10.1016/j.tox.2005.06.014>.
- [18] K. Kehe, F. Balszuweit, D. Steinritz, H. Thiermann, Molecular toxicology of sulfur mustard-induced cutaneous inflammation and blistering, *Toxicology* 263 (2009)

G. Menacher et al.

Chemico-Biological Interactions 298 (2019) 80–85

- 12–19, <https://doi.org/10.1016/j.tox.2009.01.019>.
- [20] J.F.R. Kerr, A.H. Wyllie, A.R. Currie, Apoptosis: a basic biological phenomenon with wideranging implications in tissue kinetics, *Br J Cancer* 26 (1972) 239–257, <https://doi.org/10.1038/bjc.1972.33>.
- [21] C. Lardot, V. Dubois, D. Lison, Sulfur mustard upregulates the expression of interleukin-8 in cultured human keratinocytes, *Toxicol. lett.* 110 (1999) 29–33.
- [22] Z.-Y. Liu, B. Wu, Y.-S. Guo, Y.-H. Zhou, Z.-G. Fu, B.-Q. Xu, J.-H. Li, L. Jing, J.-L. Jiang, J. Tang, Z.-N. Chen, Necrostatin-1 reduces intestinal inflammation and colitis-associated tumorigenesis in mice, *Am. J. Cancer Res.* 5 (2015) 3174–3185.
- [24] F.J. Northington, R. Chavez-Valdez, E.M. Graham, S. Razdan, E.B. Gauda, L.J. Martin, Necrostatin decreases oxidative damage, inflammation, and injury after neonatal HI, *J. Cerebr. Blood Flow Metabol.*: Official Journal of the International Society of Cerebral Blood Flow and Metabolism 31 (2011) 178–189, <https://doi.org/10.1038/jcbfm.2010.72>.
- [25] B. Papirmeister, C.L. Gross, H.L. Meier, J.P. Petrali, J.B. Johnson, Molecular basis for mustard-induced vesication, *Fund. Appl. Toxicol.*: Official Journal of the Society of Toxicology 5 (1985) S134–S149.
- [26] V. Paromov, Z. Suntries, M. Smith, W.L. Stone, Sulfur mustard toxicity following dermal exposure: role of oxidative stress, and antioxidant therapy, *Journal of burns and wounds* 7 (2007) e7.
- [27] J.K. Rathkey, J. Zhao, Z. Liu, Y. Chen, J. Yang, H.C. Kondolf, B.L. Benson, S.M. Chirieleison, A.Y. Huang, G.R. Dubyak, T.S. Xiao, X. Li, D.W. Abbott, Chemical disruption of the pyroptotic pore-forming protein gasdermin D inhibits inflammatory cell death and sepsis, *Science immunology* 3 (2018), <https://doi.org/10.1126/sciimmunol.aat2738>.
- [28] E.A. Ratovitski, Phospho- Δ Np63 α -responsive microRNAs contribute to the regulation of necroptosis in squamous cell carcinoma upon cisplatin exposure, *FEBS Lett.* 589 (2015) 1352–1358, <https://doi.org/10.1016/j.febslet.2015.04.020>.
- [29] D.B. Re, V. Le Verche, C. Yu, M.W. Amoroso, K.A. Politi, S. Phani, B. Iki, L. Hoffmann, M. Koolen, T. Nagata, D. Papadimitriou, P. Nagy, H. Mitsumoto, S. Kariya, H. Wichterle, C.E. Henderson, S. Przedborski, Necroptosis drives motor neuron death in models of both sporadic and familial ALS, *Neuron* 81 (2014) 1001–1008, <https://doi.org/10.1016/j.neuron.2014.01.011>.
- [30] K.M. Ricketts, C.T. Santai, J.A. France, A.M. Graziosi, T.D. Doyel, M.Y. Gazaway, R.P. Casillas, Inflammatory cytokine response in sulfur mustard-exposed mouse skin, *Journal of Applied Toxicology: JAT* 20 (Suppl 1) (2000) S73–S76.
- [31] D.S. Rosenthal, C.M. Simbulan-Rosenthal, S. Iyer, A. Spoonde, W. Smith, R. Ray, M.E. Smulson, Sulfur mustard induces markers of terminal differentiation and apoptosis in keratinocytes via a Ca²⁺-calmodulin and caspase-dependent pathway, *J. Invest. Dermatol.* 111 (1998) 64–71, <https://doi.org/10.1046/j.1523-1747.1998.00250.x>.
- [32] C.L.K. Sabourin, M.M. Danne, K.L. Buxton, R.P. Casillas, J.J. Schlager, Cytokine, chemokine, and matrix metalloproteinase response after sulfur mustard injury to weanling pig skin, *J. Biochem. Mol. Toxicol.* 16 (2002) 263–272, <https://doi.org/10.1002/jbt.10050>.
- [33] P. Scaffidi, T. Misteli, M.E. Bianchi, Release of chromatin protein HMGB1 by necrotic cells triggers inflammation, *Nature* 418 (2002) 191–195, <https://doi.org/10.1038/nature00858>.
- [34] G. Schiavoni, A. Sistigu, M. Valentini, F. Mattei, P. Sestili, F. Spadaro, M. Sanchez, S. Lorenzi, M.T. D'Urso, F. Belardelli, L. Gabriele, E. Proietti, L. Bracci, Cyclophosphamide synergizes with type I interferons through systemic dendritic cell reactivation and induction of immunogenic tumor apoptosis, *Cancer Res.* 71 (2011) 768–778, <https://doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-10-2788>.
- [35] C.L. Spurr, T.R. Smith, M. Block, L.O. Jacobson, The role of nitrogen mustard therapy in the treatment of lymphomas and leukemias, *Am. J. Med.* 8 (1950) 710–723.
- [36] D. Steinritz, A. Elischer, F. Balszuweit, S. Gonder, A. Heinrich, W. Bloch, H. Thiermann, K. Kehe, Sulphur mustard induces time- and concentration-dependent regulation of NO-synthesizing enzymes, *Toxicol. lett.* 188 (2009) 263–269, <https://doi.org/10.1016/j.toxlet.2009.04.012>.
- [37] D. Steinritz, E. Striepling, K.-D. Rudolf, C. Schroder-Kraft, K. Puschel, A. Hullard-Pulstinger, M. Koller, H. Thiermann, F. Gandor, M. Gawlik, H. John, Medical documentation, bioanalytical evidence of an accidental human exposure to sulfur mustard and general therapy recommendations, *Toxicol. lett.* 244 (2016) 112–120, <https://doi.org/10.1016/j.toxlet.2015.08.1105>.
- [38] L. Sun, H. Wang, Z. Wang, S. He, S. Chen, D. Liao, L. Wang, J. Yan, W. Liu, X. Lei, X. Wang, Mixed lineage kinase domain-like protein mediates necrosis signaling downstream of RIP3 kinase, *Cell* 148 (2012) 213–227, <https://doi.org/10.1016/j.cell.2011.11.031>.
- [39] S. Tsuchiya, M. Yamabe, Y. Yamaguchi, Y. Kobayashi, T. Konno, K. Tada, Establishment and characterization of a human acute monocytic leukemia cell line (THP-1), *Int. J. Canc.* 26 (1980) 171–176.
- [40] T. Vanden Berghe, W.J. Kaiser, M.J. Bertrand, P. Vandenabeele, Molecular crosstalk between apoptosis, necroptosis, and survival signaling, *Mol. Cell. Oncol.* 2 (2015) e975093, <https://doi.org/10.4161/23723556.2014.975093>.
- [41] U. Wormser, B. Brodsky, E. Proscura, J.F. Foley, T. Jones, A. Nyska, Involvement of tumor necrosis factor-alpha in sulfur mustard-induced skin lesion; effect of topical iodine, *Arch. Toxicol.* 79 (2005) 660–670, <https://doi.org/10.1007/s00204-005-0681-5>.
- [42] H. Yang, Y. Ma, G. Chen, H. Zhou, T. Yamazaki, C. Klein, F. Pietrocola, E. Vacchelli, S. Souquere, A. Sauvat, L. Zitvogel, O. Kepp, G. Kroemer, Contribution of RIP3 and MLK1 to immunogenic cell death signaling in cancer chemotherapy, *Oncotmunology* 5 (2016) e1149673, <https://doi.org/10.1080/2162402X.2016.1149673>.
- [44] W. Zhou, J. Yuan, Necroptosis in health and diseases, *Semin. Cell Dev. Biol.* 35 (2014) 14–23, <https://doi.org/10.1016/j.semcdb.2014.07.013>.
- [45] K. Zhu, W. Liang, Z. Ma, D. Xu, S. Cao, X. Lu, N. Liu, B. Shan, L. Qian, J. Yuan, Necroptosis promotes cell-autonomous activation of proinflammatory cytokine gene expression, *Cell Death Dis.* 9 (2018) 500, <https://doi.org/10.1038/s41419-018-0524-y>.

4 Zusammenfassung der Ergebnisse

Besonders im Bereich der Toxikologie fehlt es häufig an klinischen und *in vivo* Daten. Gerade hier liefern realitätsnahe *in vitro* Testsysteme wichtige Erkenntnisse für das Verständnis der molekularen Pathomechanismen und geben Hinweise für die Einführung einer gezielten Antidot-Therapie. Mit der „S-Lost-Testbatterie“ wurde am Institut für Pharmakologie und Toxikologie der Bundeswehr ein Testmodell zur systematischen Untersuchung potentieller Therapeutika für eine Behandlung der S-Lost-induzierten Hautschäden entwickelt und als Screeningmethode etabliert.

Berberin, welchem vor allem im asiatischen Raum ein breites Anwendungs- und Wirkspektrum zugeschrieben wird und daher dort auch im Fokus der Forschung steht, wurde auf seine Wirksamkeit nach S-Lost-Exposition im Hautmodell untersucht. Gerade durch die beachtliche Reduktion der Apoptose und Senkung von Entzündungsmarkern stellt es eine Substanz dar, welche auf einen möglichen klinischen Einsatz näher untersucht werden sollte. Neben dem klinischen Nutzen wäre ein weiterführendes Verständnis des Wirkmechanismus ein wichtiger Ansatzpunkt für eine zielgerichtete Behandlung.

Mit Necrosulfonamid wurde eine Substanz in der Testbatterie untersucht, die einen im Zusammenhang mit S-Lost bisher noch nicht untersuchten Weg des Zelltods adressiert. Entgegen der ursprünglichen Hypothese konnte Necrosulfonamid die gemessene Nekrose nicht signifikant reduzieren, sondern hatte vor allem Einfluss auf Apoptose und Entzündungsmarker. Hier zeigte sich, dass die therapeutische Breite möglicherweise sehr klein ist, da 2 μM kaum und 10 μM teilweise gegensätzliche Effekte zeigten. Das Post-Treatment mit 5 μM Necrosulfonamid führte allerdings zu einer signifikanten Reduktion der Entzündungsmarker IL-6 und IL-8 bei verschiedenen S-Lost-Konzentrationen und senkte die Apoptoserate signifikant. Diese Ergebnisse liefern Indizien, dass die Nekroptose ein wichtiger Faktor für die toxischen Schäden durch S-Lost sein kann. Versuche in Knockout-Modellen können in diesem Zusammenhang zusätzliche Erkenntnisse über die Rolle der Nekroptose liefern.

5 Diskussion und Ausblick

Der erste militärische Einsatz von S-Lost liegt mittlerweile über 100 Jahre zurück und trotz enormer wissenschaftlicher Fortschritte seit dieser Zeit, gelang es noch nicht, die molekulare Toxizität vollständig aufzuklären und einen gezielten Therapieansatz in die medizinische Praxis einzuführen [31, 67]. Die zytotoxischen Effekte wurden in der Folgezeit vielmehr aus therapeutischen Überlegungen für den Einsatz in der Antitumorthherapie untersucht.

Basierend auf Entdeckungen bei Verwundeten des ersten Weltkriegs begründete S-Lost und speziell die besser dosierbaren Stickstoffderivate (z.B. Melphalan oder Cyclophosphamid) Mitte des 20. Jahrhunderts die moderne Chemotherapie bei Tumorerkrankungen [46, 61]. In den NCCN-Leitlinien zur Behandlung des Multiplen Myeloms beispielsweise, ist Cyclophosphamid nach wie vor Bestandteil der First-Line-Kombinationstherapie [48]. Obwohl Cyclophosphamid seine Wirksamkeit in klinischen Studien unter Beweis gestellt hat, ist der Wirkmechanismus, ähnlich wie bei S-Lost, bisher nicht vollständig aufgeklärt [66]. Da die pharmakodynamischen Effekte von Cyclophosphamid mit denen von S-Lost eine hohe Übereinstimmung aufweisen, ist weiteres Wissen über den Wirkmechanismus der Alkylanzien aus zweierlei Überlegungen von Relevanz: Zum einen könnte man die Therapie mit Cyclophosphamid optimieren und zum anderen hätte man mögliche Zielstrukturen für eine Therapie nach der Intoxikation mit Alkylanzien wie S-Lost oder N-Lost. So lieferte beispielsweise eine tierexperimentelle Studie von Germoush und Mahmoud mit Cyclophosphamid den Denkanstoß für die Untersuchung von Berberin in der Testbatterie. Bei Cyclophosphamid handelt es sich zwar um ein Prodrug, welches erst durch CYP-Enzym-Aktivierung in der Leber zytotoxisch wirkt, aber nach der Metabolisierung sind die Effekte ähnlich wie bei S-Lost [35]. In der erwähnten Studie konnte Berberin die Cyclophosphamid induzierte Hepatotoxizität durch antiinflammatorische und antioxidative Effekte deutlich abmildern [27]. Dass sich diese Wirkung von Berberin auch im mit S-Lost-exponierten Zellkulturmodell zeigen ließ, verdeutlicht, wie wertvoll dieser interdisziplinäre Ansatz für die medizinische und toxikologische Forschung sein kann.

Neben der komplexen Toxizität sind strenge regulatorische Auflagen und begrenzte finanzielle Ressourcen limitierende Faktoren für die Forschung auf diesem Gebiet. Durch das Fehlen einer effektiven Therapieoption geht von der Substanz allerdings auch weiterhin eine latente Bedrohung aus. Mit den Ereignissen des 11. September 2001, den anschließenden Militärinterventionen sowie einem gesteigertem Bewusstsein über die terroristische Bedrohungslage, rückte auch die Forschung an Therapien für eine mögliche Exposition mit chemischen Kampfstoffen wieder stärker in den Fokus [79]. Um die Forschung auf diesem Gebiet möglichst effizient voranzutreiben, wurden Strategien und Schwerpunkte für die Antidot-Forschung festgelegt [87].

Ansätze bisheriger Forschungsvorhaben waren meist die Untersuchung isolierter Zielstrukturen wie Cyclooxygenasen, MAP-Kinasen oder Ionenkanäle sowie die Charakterisierung einer Hemmung der toxischen Effekte [95, 104, 84]. Im Vergleich dazu ist die Wirkweise von Berberin relativ unspezifisch, da es eine Vielzahl physiologischer

Mechanismen moduliert [47]. Als ein Wirkstoff mit pleiotropen Effekten könnte dies, gerade bei einer unselektiv wirkenden Substanz wie S-Lost, ein vielversprechender Ansatz sein [67]. Speziell die dämpfende Wirkung auf oxidative, entzündliche und metabolische Prozesse kann die homöostatischen Entgleisungen nach einer Vergiftung mit S-Lost eindämmen. Eine Substanz, die im klinischen Alltag aufgrund der pleiotropen Wirkweise eingesetzt wird, ist Metformin. Auch hier geht man von verschiedenen Faktoren aus, die bei der Stoffwechselentgleisung durch einen Diabetes mellitus abmildern und damit die kardiovaskulären Begleiterkrankungen positiv modulieren [11]. Ein genaues Verständnis für den Wirkmechanismus besteht trotz intensivster Forschung bis heute nicht [63, 82]. Es bedarf allerdings weiterer Forschung, um den zukünftigen Stellenwert von Berberin bei der Behandlung einer S-Lost-Intoxikation abzuklären.

Die Rolle der Nekroptose als eine spezifische Form des Zelltodes wurde bisher noch nicht im Zusammenhang mit S-Lost untersucht. Eine in den 1970er Jahren etablierte Einteilungsweise, welche zwischen zwei verschiedene Formen des Zelltods, der Nekrose und der Apoptose, unterscheidet, wurde in den letzten Jahren zunehmend aufgeweicht. Vielmehr wurde durch ein tiefgreifenderes Verständnis für den Untergang einer Zelle ein Paradigmenwechsel eingeleitet und eine noch genauere Differenzierung angestrebt [32]. Teil dieser Neukategorisierung ist die Nekroptose. Die physiologische Rolle der Nekroptose ist bisher noch nicht vollständig verstanden, sie scheint aber bei der Entwicklung entzündlicher Autoimmunerkrankungen eine wichtige Rolle zu spielen [62]. Völlig unbekannt war daher, inwieweit die Nekroptose an den pathophysiologischen Vorgängen nach einer S-Lost-Exposition beteiligt ist und ob eine Inhibition zytoprotektive Effekte zur Folge haben kann. Die in der Testbatterie gemessenen Ergebnisse zeigten, dass durch Inhibition der Nekroptose auch klinisch relevante Parameter wie die Entzündungsaktivität beeinflussbar sind. Eine reduzierte Freisetzung von Zytokinen könnte sich positiv auf den Organismus auswirken und die starke Entzündungsreaktion abmildern. Die Komplexität der Nekroptose verdeutlichten auch Experimente von Moerke et al. in RIPK3- und MLKL-Knockout-Mäusen, bei welchen nur das Fehlen von RIPK3 oder MLKL positive Effekte zeigte, nicht aber der Doppel-Knockout [56]. Mit ähnlichen Versuchen in Knockout-Modellen könnte man auch die Rolle der Nekroptose am toxischen Zelltod durch Alkylanzien wie S-Lost näher charakterisieren. Ein besseres Verständnis der Nekroptose und die zielgerichtete Weiterentwicklung von Inhibitoren könnten wertvolle Bausteine für die Etablierung neuer Therapiekonzepte zur Behandlung einer S-Lost-Intoxikation sein.

Der in dieser Arbeit eingeschlagene Weg, beginnend mit der Wirkstofftestung *in vitro*, bedarf notwendigerweise weitergehender Untersuchungen in *in vivo* Modellen und einer klinischen Prüfung im Menschen, bis es zum therapeutischen Einsatz der Substanzen kommen kann. Aus regulatorischen Gesichtspunkten ist es daher gerade für selten auftretende Krankheitsbilder sinnvoll, bereits etablierte Wirkstoffe zu untersuchen und dann gegebenenfalls einen Off-Label-Gebrauch zu empfehlen. Doch solange keine auf dem Markt befindliche Substanzklasse oder Substanzkombination eine effektive Wirksamkeit zeigt, sind weitere Wirkstofftestungen und neue mechanistische Ansätze wie in dieser Arbeit unerlässlich. Eine Weiterentwicklung der Testmethoden und die Nutzung neuester Technologien könnte die Wirkstofffindung zukünftig noch effizienter gestalten. Gerade im Bereich der Toxikologie bieten *in silico* Verfahren eine wertvolle Ergänzung zum etablierten Methodenspektrum [64].

Der medizinische Bedarf zur Therapie von Verletzungen mit chemischen Kampfstof-

fen wird durch Vorfälle wie im Syrien-Konflikt nochmals verdeutlicht. Wissen aus Giftgasprogrammen und Altbestände wurden dort auch in jüngster Vergangenheit für militärische und paramilitärische Aktivitäten genutzt und sorgten für zahlreiche Opfer [73]. Es ist darüber hinaus auch aus humanitären Gesichtspunkten wichtig, ein Bewusstsein für die Gefahren durch chemische Waffen in der breiten Bevölkerung zu etablieren und damit auch einem zukünftigen Einsatz ablehnend gegenüber zu stehen.

6 Literatur

1. Alexander, S. F. Medical report of the Bari Harbor casualties. *The Military Surgeon* **101**, 1–17 (1947).
2. Allen, R., Hunter, W. J. & Agrawal, D. K. Morphological and biochemical characterization and analysis of apoptosis. *Journal of Pharmacological and Toxicological Methods* **37**, 215–228 (1997).
3. Arroyo, C. M., Schafer, R. J., Kurt, E. M., Broomfield, C. A. & Carmichael, A. J. Response of normal human keratinocytes to sulfur mustard: Cytokine release. *Journal of applied toxicology* **20 Suppl 1**, 63–72 (2000).
4. Balali-Mood, M. & Hefazi, M. The pharmacology, toxicology, and medical treatment of sulphur mustard poisoning. *Fundamental & Clinical Pharmacology* **19**, 297–315 (2005).
5. Balali-Mood, M. & Hefazi, M. Comparison of early and late toxic effects of sulfur mustard in Iranian veterans. *Basic & clinical pharmacology & toxicology* **99**, 273–282 (2006).
6. Balszuweit, F., John, H., Schmidt, A., Kehe, K., Thiermann, H. & Steinritz, D. Silibinin as a potential therapeutic for sulfur mustard injuries. *Chemico-biological interactions* **206**, 496–504 (2013).
7. Balszuweit, F., Menacher, G., Bloemke, B., Schmidt, A., Worek, F., Thiermann, H. & Steinritz, D. Development of a co-culture of keratinocytes and immune cells for in vitro investigation of cutaneous sulfur mustard toxicity. *Chemico-biological interactions* **223**, 117–124 (2014).
8. Bomben-Strände. *Der Spiegel*, 52–54 (2013).
9. Borak, J. & Sidell, F. R. Agents of chemical warfare: Sulfur mustard. *Annals of Emergency Medicine* **21**, 303–308 (1992).
10. Bröker, L. E., Kruyt, F. A. E. & Giaccone, G. Cell death independent of caspases: A review. *Clinical cancer research: an official journal of the American Association for Cancer Research* **11**, 3155–3162 (2005).
11. Bromage, D. I. & Yellon, D. M. The pleiotropic effects of metformin: Time for prospective studies. *Cardiovascular diabetology* **14**, 109 (2015).
12. Büscher, H. *Giftgas! Und wir? Die Welt der Giftgase: Wesen und Wirkung/Hilfe und Heilung* (1937).
13. Casillas, R. P., Mitcheltree, L. W. & Robert, F. The mouse ear model of cutaneous sulfur mustard injury. *Toxicology Methods* **7**, 381–397 (1997).
14. Casillas, R. P., Kiser, R. C., Truxall, J. A., Singer, A. W., Shumaker, S. M., Niemuth, N. A., Ricketts, K. M., Mitcheltree, L. W., Castrejon, L. R. & Blank, J. A. Therapeutic approaches to dermatotoxicity by sulfur mustard I. Modulation of sulfur mustard-induced cutaneous injury in the mouse ear vesicant model. *Journal of Applied Toxicology* **20**, 145–151 (2000).
15. Chivers, C. J. Veterans Hurt by Chemicals Get an Apology. *New York Times* (2015).
16. Conrad, M., Angeli, J. P. F., Vandenabeele, P. & Stockwell, B. R. Regulated necrosis: disease relevance and therapeutic opportunities. *Nature Reviews Drug Discovery* **15**, 348 (2016).
17. Cowan, F. M. & Broomfield, C. A. Putative roles of inflammation in the dermatopathology of sulfur mustard. *Cell Biology and Toxicology* **9**, 201–213 (1993).
18. Dacre, J. C. & Goldman, M. Toxicology and pharmacology of the chemical warfare agent sulfur mustard. *Pharmacological Reviews* **48**, 289–326 (1996).

19. Debiak, M., Kehe, K. & Bürkle, A. Role of poly(ADP-ribose) polymerase in sulfur mustard toxicity. *Toxicology* **263**, 20–25 (2009).
20. Despretz, C.-M. Des composes triples du chlore. *Ann. Chem. Phys* **21**, 438 (1822).
21. Dillman, J. F., McGary, K. L. & Schlager, J. J. An inhibitor of p38 MAP kinase downregulates cytokine release induced by sulfur mustard exposure in human epidermal keratinocytes. *Toxicology in vitro : an international journal published in association with BIBRA* **18**, 593–599 (2004).
22. Director of Central Intelligence. Impact and implications of chemical weapons use in the iran-iraq war (1988).
23. Elmore, S. Apoptosis: A review of programmed cell death. *Toxicologic pathology* **35**, 495–516 (2007).
24. Fidder, A., Moes, G. W., Scheffer, A. G., van der Schans, G. P., Baan, R. A., de Jong, L. P. & Benschop, H. P. Synthesis, characterization, and quantitation of the major adducts formed between sulfur mustard and DNA of calf thymus and human blood. *Chemical research in toxicology* **7**, 199–204 (1994).
25. Galluzzi, L. *u. a.* Molecular mechanisms of cell death: recommendations of the Nomenclature Committee on Cell Death 2018. *Cell Death & Differentiation* **25**, 486 (2018).
26. Gandor, F., Gawlik, M., Thiermann, H. & John, H. Evidence of Sulfur Mustard Exposure in Human Plasma by LC-ESI-MS-MS Detection of the Albumin-Derived Alkylated HETE-CP Dipeptide and Chromatographic Investigation of Its Cis/Trans Isomerism. *Journal of analytical toxicology* **39**, 270–279 (2015).
27. Germoush, M. O. & Mahmoud, A. M. Berberine mitigates cyclophosphamide-induced hepatotoxicity by modulating antioxidant status and inflammatory cytokines. *Journal of Cancer Research and Clinical Oncology* **140**, 1103–1109 (2014).
28. Goodman, L. S. & Wintrobe, M. M. Nitrogen mustard therapy; use of methyl-bis (beta-chloroethyl) amine hydrochloride and tris (beta-chloroethyl) amine hydrochloride for Hodgkin's disease, lymphosarcoma, leukemia and certain allied and miscellaneous disorders. *Journal of the American Medical Association* **132**, 126–132 (1946).
29. *Handbook of toxicology of chemical warfare agents* (Hrsg. Gupta, R. C.) (Elsevier/AP, Amsterdam, 2009).
30. Guthrie, F. Ueber einige Derivate der Kohlenwasserstoffe C_nH_n. *Justus Liebigs Annalen der Chemie* **113**, 266–288 (1860).
31. Hanslian, R. *Der Chemische Krieg: Dritte, völlig neubearbeitete Auflage* (Verlag von E.S. Mittler & Sohn, Berlin, 1937).
32. Hanson, B. Necroptosis: A new way of dying? *Cancer biology & therapy* **17**, 899–910 (2016).
33. Heinrich, A., Balszuweit, F., Thiermann, H. & Kehe, K. Rapid simultaneous determination of apoptosis, necrosis, and viability in sulfur mustard exposed HaCaT cell cultures. *Toxicology letters* **191**, 260–267 (2009).
34. Hennen, J., Aeby, P., Goebel, C., Schettgen, T., Oberli, A., Kalmes, M. & Blömeke, B. Cross talk between keratinocytes and dendritic cells: Impact on the prediction of sensitization. *Toxicological sciences : an official journal of the Society of Toxicology* **123**, 501–510 (2011).
35. Hill, D. L., Laster, W. R. & Struck, R. F. Enzymatic Metabolism of Cyclophosphamide and Nicotine and Production of a Toxic Cyclophosphamide Metabolite. *Cancer Research* **32**, 658–665 (1972).
36. Ismail, I. H., Nyström, S., Nygren, J. & Hammarsten, O. Activation of Ataxia Telangiectasia Mutated by DNA Strand Break-inducing Agents Correlates Closely with the Number of DNA Double Strand Breaks. *Journal of Biological Chemistry* **280**, 4649–4655 (2005).

37. Jowsey, P. A., Williams, F. M. & Blain, P. G. DNA damage responses in cells exposed to sulphur mustard. *Toxicology letters* **209**, 1–10 (2012).
38. Kan, R. K., Pleva, C. M., Hamilton, T. A., Anderson, D. R. & Petrali, J. P. Sulfur mustard-induced apoptosis in hairless guinea pig skin. *Toxicologic pathology* **31**, 185–190 (2003).
39. Kehe, K., Abend, M., Ridi, R., Peter, R. U. & van Beuningen, D. Tissue engineering with HaCaT cells and a fibroblast cell line. *Archives of Dermatological Research* **291**, 600–605 (1999).
40. Kehe, K., Balszuweit, F., Steinritz, D. & Thiermann, H. Molecular toxicology of sulfur mustard-induced cutaneous inflammation and blistering. *Toxicology* **263**, 12–19 (2009).
41. Kehe, K., Müller, H., Balszuweit, F., Steinritz, D., Thiermann, H., Klaus, S. & Kreppel, H. *New Methods to Detect Sulfur Mustard (SM) and SM-Induced Skin Damage in Counteraction to Chemical and Biological Terrorism in East European Countries* (Hrsg. Dishovsky, C. & Pivovarov, A.) (Springer Netherlands, Dordrecht, 2009), 127–133.
42. Kehe, K., Thiermann, H., Balszuweit, F., Eyer, F., Steinritz, D. & Zilker, T. Acute effects of sulfur mustard injury—Munich experiences. *Toxicology* **263**, 3–8 (2009).
43. Kehe, K., Balszuweit, F., Emmeler, J., Kreppel, H., Jochum, M. & Thiermann, H. Sulfur Mustard Research—Strategies for the Development of Improved Medical Therapy. *Eplasty* **8** (2008).
44. Kehe, K. & Szinicz, L. Medical aspects of sulphur mustard poisoning. *Toxicology* **214**, 198–209 (2005).
45. Kilic, E., Ortatatli, M., Sezigen, S., Eyison, R. K. & Kenar, L. Acute intensive care unit management of mustard gas victims: The Turkish experience. *Cutaneous and ocular toxicology* **37**, 332–337 (2018).
46. Krumbhaar, E. B. & Krumbhaar, H. D. The Blood and Bone Marrow in Yellow Cross Gas (Mustard Gas) Poisoning: Changes produced in the Bone Marrow of Fatal Cases. *The Journal of Medical Research* **40**, 497–508.3 (1919).
47. Kumar, A., Ekavali, Chopra, K., Mukherjee, M., Pottabathini, R. & Dhull, D. K. Current knowledge and pharmacological profile of berberine: An update. *European journal of pharmacology* **761**, 288–297 (2015).
48. Kumar, S. K., Callander, N. S., Alsina, M., Atanackovic, D., Biermann, J. S., Castillo, J., Chandler, J. C., Costello, C., Faiman, M., Fung, H. C., Godby, K., Hofmeister, C., Holmberg, L., Holstein, S., Huff, C. A., Kang, Y., Kassim, A., Liedtke, M., Malek, E., Martin, T., Neppalli, V. T., Omel, J., Raje, N., Singhal, S., Somlo, G., Stockerl-Goldstein, K., Weber, D., Yahalom, J., Kumar, R. & Shead, D. A. NCCN Guidelines Insights: Multiple Myeloma, Version 3.2018. *Journal of the National Comprehensive Cancer Network: JNCCN* **16**, 11–20 (2018).
49. Kunz, R. & Müller, R.-D. *Giftgas gegen Abd el Krim: Deutschland, Spanien und der Gaskrieg in Spanisch-Marokko 1922 - 1927* 1. Aufl. (Rombach, Freiburg im Breisgau, 1990).
50. Lawley, P. D. & Brookes, P. Interstrand cross-linking of DNA by difunctional alkylating agents. *Journal of Molecular Biology* **25**, 143–160 (1967).
51. Lockemann. *Der chemische Krieg. Von Dr. Rudolf Hanslian. Mit 111 Abbildungen im Text auf Tafeln Nebst 3 Kartenskizzen. Zweite umgearbeitete und wesentlich vermehrte Auflage. Verlegt bei E. S. Mittler & Sohn, Berlin 1927. VII u. 411 Seiten. Zeitschrift für Angewandte Chemie* **40**, 1407–1408 (1927).
52. Ludlum, D. B., Austin-Ritchie, P., Hagopian, M., Niu, T.-Q. & Yu, D. Detection of sulfur mustard-induced DNA modifications. *Chemico-biological interactions* **91**, 39–49 (1994).
53. Marfori, P. Pharmakologische Untersuchungen über Hydrastin, Berberin und einige Derivate derselben. *Archiv für experimentelle Pathologie und Pharmakologie* **27**, 161–190 (1890).

54. Menacher, G. *Entwicklung und Anwendung eines in vitro Co-Kultur-Modells der Haut zur Identifizierung potentieller Therapeutika bei Schwefelost-Vergiftungen* Dissertation (LMU München: Medizinische Fakultät, 2018).
55. Meyer, V. Ueber Thiodiglykolverbindungen. *Berichte der deutschen chemischen Gesellschaft* **19**, 3259–3266 (1886).
56. Moerke, C., Bleibaum, F., Kunzendorf, U. & Krautwald, S. Combined Knockout of RIPK3 and MLKL Reveals Unexpected Outcome in Tissue Injury and Inflammation. *Frontiers in Cell and Developmental Biology* **7**, 19 (2019).
57. Niemann, A. Ueber die Einwirkung des braunen Chlorschwefels auf Elaylgas. *Justus Liebig's Annalen der Chemie* **113**, 288–292 (1860).
58. Noort, D., Hulst, A. G., de Jong, L. P. & Benschop, H. P. Alkylation of human serum albumin by sulfur mustard in vitro and in vivo: Mass spectrometric analysis of a cysteine adduct as a sensitive biomarker of exposure. *Chemical research in toxicology* **12**, 715–721 (1999).
59. OPCW 2018. *OPCW by the numbers* <https://www.opcw.org/media-centre/opcw-numbers> (zuletzt geprüft am 02.02.2019).
60. Organisation for the Prohibition of Chemical Weapons. *Convention on the prohibition of the development, production, stockpiling and use of chemical weapons and on their destruction* 2005.
61. Papac, R. J. Origins of cancer therapy. *The Yale Journal of Biology and Medicine* **74**, 391–398 (2001).
62. Pasparakis, M. & Vandenabeele, P. Necroptosis and its role in inflammation. *Nature* **517**, 311 (2015).
63. Pernicova, I. & Korbonits, M. Metformin—mode of action and clinical implications for diabetes and cancer. *Nature Reviews Endocrinology* **10**, 143 (2014).
64. Raies, A. B. & Bajic, V. B. In silico toxicology: Computational methods for the prediction of chemical toxicity. *Wiley interdisciplinary reviews. Computational molecular science* **6**, 147–172 (2016).
65. Razavi, S. M., Ghanei, M., Salamati, P. & Safiabadi, M. Long-term effects of mustard gas on respiratory system of Iranian veterans after Iraq-Iran war: a review: Seyed. *Chinese Journal of Traumatology* **16**, 163–168 (2013).
66. Reeder, C. B., Reece, D. E., Kukreti, V., Chen, C., Trudel, S., Hentz, J., Noble, B., Pirooz, N. A., Spong, J. E., Piza, J. G., Zepeda, V. H. J., Mikhael, J. R., Leis, J. F., Bergsagel, P. L., Fonseca, R. & Stewart, A. K. Cyclophosphamide, bortezomib and dexamethasone induction for newly diagnosed multiple myeloma: High response rates in a phase II clinical trial. *Leukemia* **23**, 1337–1341 (2009).
67. Rose, D., Schmidt, A., Brandenburger, M., Sturmheit, T., Zille, M. & Boltze, J. Sulfur mustard skin lesions: A systematic review on pathomechanisms, treatment options and future research directions. *Toxicology letters* **293**, 82–90 (2018).
68. Ruff, A. L. & Dillman, J. F. Signaling Molecules in Sulfur Mustard-Induced Cutaneous Injury. *Eplasty* **8** (2008).
69. Safarinejad, M. R., Moosavi, S. A. & B., M. Ocular Injuries Caused by Mustard Gas: Diagnosis, Treatment, and Medical Defense. *Military Medicine* **166**, 67–70 (2001).
70. Sahebkar, A., Antonelli-Incalzi, R., Panahi, Y., Ghanei, M. & Pedone, C. Mustard lung and COPD: common features and treatment? *The Lancet Respiratory Medicine* **3**, 747–748 (2015).
71. Schmidt, A., Steinritz, D., Rudolf, K.-D., Thiermann, H. & Striepling, E. Accidental sulfur mustard exposure: A case report. *Toxicology letters* **293**, 62–66 (2018).
72. Sezigen, S., Ivelik, K., Ortatatli, M., Almacioglu, M., Demirkasimoglu, M., Eyison, R. K., Kunak, Z. I. & Kenar, L. Victims of chemical terrorism, a family of four who were exposed to sulfur mustard. *Toxicology letters* **303**, 9–15 (2019).

73. Sezigen, S., Eyison, R. K., Kilic, E. & Kenar, L. Evidence of sulfur mustard exposure in victims of chemical terrorism by detection of urinary beta-lyase metabolites. *Clinical toxicology (Philadelphia, Pa.)* 1–9 (2019).
74. Shakarjian, M. P., Bhatt, P., Gordon, M. K., Chang, Y.-C., Casbohm, S. L., Rudge, T. L., Kiser, R. C., Sabourin, C. L., Casillas, R. P., Ohman-Strickland, P., Riley, D. J. & Gerecke, D. R. Preferential expression of matrix metalloproteinase-9 in mouse skin after sulfur mustard exposure. *Journal of applied toxicology* **26**, 239–246 (2006).
75. Sidell, F. R. *Medical aspects of chemical and biological warfare* (U S Govt. Printing Office, [Place of publication not identified], 1997).
76. *Chemical warfare agents: Toxicology and treatment* 2nd ed. (Hrsg. Sidell, F. R., Maynard, R. L. & Marrs, T. C.) (Wiley, Chichester, England und Hoboken, NJ, 2007).
77. SIPRI Stockholm International Peace Research Institute. *The Problem of Chemical and Biological Warfare Volume 1 The Rise of CB Weapons* (1971).
78. Smith, W. J., Sanders, K. M., Ruddle, S. E. & Gross, C. L. Cytometric Analysis of DNA Changes Induced by Sulfur Mustard. *Journal of Toxicology: Cutaneous and Ocular Toxicology* **12**, 337–347 (2008).
79. Smith, W. J. & Gross, C. L. Sulfur Mustard Medical Countermeasures in a Nuclear Environment. *Military Medicine* **167**, 101–102 (2002).
80. Smith, W. J., Gross, C. L., Chan, P. & Meier, H. L. The use of human epidermal keratinocytes in culture as a model for studying the biochemical mechanisms of sulfur mustard toxicity. *Cell Biology and Toxicology* **6**, 285–291 (1990).
81. Solberg, Y., Alcalay, M. & Belkin, M. Ocular injury by mustard gas. *Survey of Ophthalmology* **41**, 461–466 (1997).
82. Spiering, M. J. The mystery of metformin. *Journal of Biological Chemistry* **294**, 6689–6691 (2019).
83. Steinritz, D., Striepling, E., Rudolf, K.-D., Schröder-Kraft, C., Püschel, K., Hullard-Pulstinger, A., Koller, M., Thiermann, H., Gandor, F., Gawlik, M. & John, H. Medical documentation, bioanalytical evidence of an accidental human exposure to sulfur mustard and general therapy recommendations. *Toxicology letters* **244**, 112–120 (2016).
84. Stenger, B., Zehfuß, F., Mückter, H., Schmidt, A., Balszuweit, F., Schäfer, E., Büch, T., Gudermann, T., Thiermann, H. & Steinritz, D. Activation of the chemosensing transient receptor potential channel A1 (TRPA1) by alkylating agents. *Archives of Toxicology* **89**, 1631–1643 (2015).
85. Subcommittee on Acute Exposure Guideline Levels, Committee on Toxicology National Research. *Acute Exposure Guideline Levels for Selected Airborne Chemicals: Volume 3* (National Academies Press, Washington, D.C, 2003).
86. Sun, Y., Xun, K., Wang, Y. & Chen, X. A systematic review of the anticancer properties of berberine, a natural product from Chinese herbs. *Anti-cancer drugs* **20**, 757–769 (2009).
87. Szinicz, L., Worek, F., Thiermann, H., Kehe, K., Eckert, S. & Eyer, P. Development of antidotes: Problems and strategies. *Toxicology* **233**, 23–30 (2007).
88. Tang, J., Feng, Y., Tsao, S., Wang, N., Curtain, R. & Wang, Y. Berberine and Coptidis rhizoma as novel antineoplastic agents: A review of traditional use and biomedical investigations. *Journal of ethnopharmacology* **126**, 5–17 (2009).
89. Taysse, L., Daulon, S., Delamanche, S., Bellier, B. & Breton, P. Skin decontamination of mustards and organophosphates: Comparative efficiency of RSDL and Fuller’s earth in domestic swine. *Human & experimental toxicology* **26**, 135–141 (2007).
90. Taysse, L., Dorandeu, F., Daulon, S., Foquin, A., Perrier, N., Lallement, G. & Breton, P. Cutaneous challenge with chemical warfare agents in the SKH-1 hairless mouse (II): Effects of some currently used skin decontaminants (RSDL and Fuller’s earth) against liquid sulphur mustard and VX exposure. *Human & experimental toxicology* **30**, 491–498 (2011).

91. Tuorinsky, S. D. *Medical Aspects of Chemical Warfare* (2008).
92. United Nations. Report of the Specialist Appointed by the Secretary-General to Investigate Allegations by the Islamic Republic of Iran Concerning the Use of Chemical Weapons (1984).
93. Vanden Berghe, T., Kaiser, W. J., Bertrand, M. J. & Vandenabeele, P. Molecular crosstalk between apoptosis, necroptosis, and survival signaling. *Molecular & cellular oncology* **2**, e975093 (2015).
94. Vom Himmel hoch. *Der Spiegel*, 81–85 (1988).
95. Wagner, S., Lang, S., Popp, T., Schmidt, A., Thiermann, H., Steinritz, D. & Kehle, K. Evaluation of selective and non-selective cyclooxygenase inhibitors on sulfur mustard-induced pro-inflammatory cytokine formation in normal human epidermal keratinocytes. *Toxicology letters* (2019).
96. Wattana, M. & Bey, T. Mustard Gas or Sulfur Mustard An Old Chemical Agent as a New Terrorist Threat: An Old Chemical Agent as a New Terrorist Threat. *Prehospital and Disaster Medicine* **24**, 19–29 (2009).
97. Weinberger, B., Malaviya, R., Sunil, V. R., Venosa, A., Heck, D. E., Laskin, J. D. & Laskin, D. L. Mustard vesicant-induced lung injury: Advances in therapy. *Toxicology and applied pharmacology* **305**, 1–11 (2016).
98. Weiß, D. & Brandl, H. Fluoreszenzfarbstoffe in der Natur. *Chemie in unserer Zeit* **47**, 122–131 (2013).
99. White, C. W., Rancourt, R. C. & Veress, L. A. Sulfur mustard inhalation: Mechanisms of injury, alteration of coagulation, and fibrinolytic therapy. *Annals of the New York Academy of Sciences* **1378**, 87–95 (2016).
100. Whiting, M.H., Bickerton, R.E., Phillips, T.J., Neame, H., Lyle. Gas Injuries to the Eye: (Section of Ophthalmology). *Proceedings of the Royal Society of Medicine* **33**, 225–236 (1940).
101. Willems, J. L. Clinical management of mustard gas casualties (1989).
102. Wormser, U., Langenbach, R., Peddada, S., Sintov, A., Brodsky, B. & Nyska, A. Reduced sulfur mustard-induced skin toxicity in cyclooxygenase-2 knockout and celecoxib-treated mice. *Toxicology and applied pharmacology* **200**, 40–47 (2004).
103. Wulf, H., Aasted, A., Darre, E. & Niebuhr, E. Sister chromatid exchanges in fishermen exposed to leaking mustard gas shells. *The Lancet* **325**, 690–691 (1985).
104. Yego, E. C. K. & Dillman, J. F. Cytokine regulation by MAPK activated kinase 2 in keratinocytes exposed to sulfur mustard. *Toxicology in vitro : an international journal published in association with BIBRA* **27**, 2067–2075 (2013).
105. Zhou, W. & Yuan, J. Necroptosis in health and diseases. *Seminars in cell & developmental biology* **35**, 14–23 (2014).
106. Zilker, T. Medical management of incidents with chemical warfare agents. *Toxicology* **214**, 221–231 (2005).
107. Zubel, T., Hochgesand, S., John, H., Steinritz, D., Schmidt, A., Bürkle, A. & Mangerich, A. A mass spectrometric platform for the quantitation of sulfur mustard-induced nucleic acid adducts as mechanistically relevant biomarkers of exposure. *Archives of Toxicology* **93**, 61–79 (2019).