

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

Vorstand: Prof. Dr. Thomas Gudermann

Zur Toxizität der chromodiagnostischen Farbstoffe Methylenblau, Toluidinblau und Indigokarmin *in vitro*

Dissertation
zum Erwerb des Doktorgrades Medizin
an der medizinischen Fakultät der
Ludwig-Maximilians-Universität zu
München

vorgelegt von Elias Bekka
aus
München

2022

Mit Genehmigung der Medizinischen Fakultät
der Universität München

Berichterstatter: Prof. Dr. Thomas Gudermann

Mitberichterstatter: Prof. Dr. Franz Worek

Prof. Dr. Frank Mußhoff

Mitbetreuung durch den

promovierten Mitarbeiter:

Dr. Andreas Breit

Dekan:

Prof. Dr. med. Thomas Gudermann

Tag der mündlichen Prüfung: 03.02.2022

Inhaltsverzeichnis

Inhaltsverzeichnis	1
Abkürzungsverzeichnis	4
1 Einleitung.....	6
1.1 Lebensbedrohliche Kreislaufreaktionen nach intravenöser Farbstoffinjektion zur Chromodiagnostik.....	6
1.2 Phenothiazinfarbstoffe und Indigokarmin in der Medizin.....	8
1.3 Physiko-chemische Eigenschaften der untersuchten Stoffe	10
1.4 Pharmakologie der untersuchten Stoffe.....	13
1.5 Fragestellung der Arbeit.....	18
2 Material und Methoden.....	19
2.1 Chemikalien	19
2.2 Apparative Vorkehrungen	22
2.3 Zellkulturmethoden	23
2.4 Testmethoden.....	24
2.5 Statistische Auswertemethoden.....	45
3 Ergebnisse	46
3.1 Morphologische Veränderungen unter Farbstoffeinfluss.....	46
3.2 Metabolische Toxizität der Farbstoffe	47
3.3 Oxidativer Stress nach Farbstoffexposition.....	57
3.4 Zytoprotektive Effekte durch Farbstoffe	60
3.5 Farbstoffverteilung in der Zellfraktionierung.....	62
4 Diskussion	69
4.1 Gegenüberstellung der Ergebnisse.....	69
4.2 Toxizität von den Phenothiazinfarbstoffen und Indigokarmin im Vergleich.....	71
4.3 Metabolische Toxizität der Farbstoffe	71
4.4 Redoxstatus der Zellen nach Farbstoffexposition	75

4.5	Hormetische Wirkung von Phenothiazinfarbstoffen	76
4.6	Methylenblau als Antidot gegen mitochondriale Gifte	77
4.7	Methodenkritik.....	78
4.8	Konsequenzen für die klinische Praxis	82
5	Zusammenfassung.....	86
6	Anhang.....	88
6.1	Abbildungsverzeichnis	88
6.2	Tabellenverzeichnis	89
	Literaturverzeichnis.....	91
	Danksagung.....	102

Abkürzungsverzeichnis

AkdÄ	Arzneimittelkommission der deutschen Ärzteschaft
ATCC	American Type Culture Collection
ATP	Adenosintriphosphat
dH ₂ O	destilliertes Wasser
DMEM	Dulbecco's Modified Eagle Medium
DNA	Desoxyribonukleinsäure
DTNB	5,5'-Dithiobis-2-nitrobenzoesäure
$\Delta\psi_m$	mitochondriales Membranpotenzial
GSH	reduziertes Glutathion
GSSG	oxidiertes Glutathion
GSX	Gesamtglutathion
IC ₅₀	mittlere inhibitorische Konzentration
IK	Indigokarmin
INT	Iodonitrotetrazolium-Violett
JC-1	5,5',6,6'-tetrachloro-1,1',3,3'-tetraethylbenzimidazolocarbocyaniniodid
MAO	Monoaminoxidase
MB	Methylenblau
MB ⁺	oxidiertes Methylenblau
MBH ₂	reduziertes Methylenblau (Leuko-Methylenblau)
MetHb	Methämoglobin

MRSA	Methicillin-resistenter Staphylococcus aureus
NAD	Nicotinamidadenindinukleotid
NADP	Nicotinamidadenindinukleotidphosphat
NO	Stickstoffmonoxid
PI	Proteaseinhibitor
PTZ	Phenothiazine
qH ₂ O	steriles (ATP-freies) Wasser
RNA	Ribonukleinsäure
ROS	reaktive Sauerstoffspezies
SHE	Standard Hydrogen Electrode, Wasserstoffelektrode
STKM	Saccharose-Tris-Kalium-Magnesium
TB	Toluidinblau
TCA	Trichloressigsäure

1 Einleitung

1.1 Lebensbedrohliche Kreislaufreaktionen nach intravenöser Farbstoffinjektion zur Chromodiagnostik

Im Juli 2008 berichtete die Arzneimittelkommission der deutschen Ärzteschaft (AkdÄ) über 5 Fälle von lebensbedrohlichen Herzrhythmusstörungen bis zur Entwicklung von Kammerflimmern oder einer Asystolie nach intravenöser Anwendung von Toluidinblau (TB) [1]. Bis 2010 lagen 22 gemeldete Fälle der AkdÄ vor [2], parallel hierzu wurden zwei Fallberichte von Herzrhythmusstörungen nach TB Applikation publiziert. In dem Fallbericht von Radke et al. [3] wurde einer Patientin zur Behebung einer Prilocain-induzierten Methämoglobinämie 300 mg TB intravenös appliziert. Wenige Minuten danach klagte die Patientin über zunehmende Dyspnoe, trübte ein und entwickelte ein Kammerflimmern, welches durch eine Defibrillation terminiert werden konnte. Zieger et al. [4] berichten über eine ventrikuläre Tachykardie mit Übergang in Kammerflimmern unmittelbar nach der Gabe von 150-180 mg TB. Eine umgehend eingeleitete Reanimation mit Defibrillation zeigte sich auch hier erfolgreich. Aus dem Bericht der AkdÄ geht hervor, dass sich die meisten Herzrhythmusstörungen nach kurzzeitigen Reanimationsmaßnahmen zurückbildeten. Laut der Arzneimittelkommission starb ein bereits schwer vorerkrankter Patient zwei Tage nach dem Ereignis [1], weitere Todesfälle sind in der Literatur nicht beschrieben.

Wie konnte es zu dieser Häufung von schweren kardiovaskulären Komplikationen kommen? In Deutschland waren zum Zeitpunkt des Auftretens der Komplikationen zwei andere Farbstoffe im Gebrauch, deren Verfügbarkeit jedoch im Rahmen von Lieferengpässen und Reinheitsproblemen bei der Herstellung zum Ausweichen auf TB führten: Methylenblau (MB) und Indigokarmin (IK) [5]. Ersteres gehört als Intravitalfarbstoff wie TB zu den Phenothiazinfarbstoffen, das letztere ist ein sogenannter Supravitalfarbstoff aus der Gruppe der Indol- bzw. Isatinfarbstoffe. TB stellte in diesem Zeitraum einen nützlichen alternativen Farbstoffindikator in der Chromodiagnostik dar. Seine tiefblaue Farbe machten dieses Molekül zu einem wertvollen Hilfsmittel in der Urologie und Gynäkologie, aber auch im Bereich der Kinderchirurgie,

z.B. um den funktionellen Anschluss der Nieren an das harnableitende System zu erkennen, der angeboren oder durch intraabdominelle Eingriffe oder Raumforderungen gefährdet sein kann. Der Farbstoff wird nach intravenöser Applikation über die Nieren ausgeschieden und färbt als Summationseffekt den abfließenden gelben Harn deutlich sichtbar blaugrün. TB ist ein Intravital-Farbstoff aus der Gruppe der Phenothiazine, der offiziell zum Antidotarium der Giftnotrufzentralen gehört und als Gegenmittel bei einer Vergiftung durch Methämoglobinbildner seit vielen Jahrzehnten eingesetzt werden kann. Weitere offizielle Indikationen sind vornehmlich topische Anwendungen, zum Beispiel als Vitalfärbung bei der Chromoendoskopie. Diese lokalen Anwendungen bergen offensichtlich ein geringeres Risiko für Komplikationen als die intravenöse Gabe.

Formal stellte die intravenöse Anwendung von TB einen "off-label" Gebrauch dar, der aber zum Zeitpunkt der oben geschilderten Komplikationen als unbedenklich galt, da die eingesetzten Dosen (typischerweise 240 bis 300 mg pro Anwendung) sich an den Dosisempfehlungen der TB-Gabe als Antidot orientierten.

Aufgrund der Warnung der Behörden wurde die Fachinformation des deutschen Herstellers von TB durch folgende Bemerkung ergänzt:

„Die Arzneimittelkommission der deutschen Ärzteschaft warnt vor dem Off-Label-Use des Präparates zur i.v.-Gabe, um intraoperativ Harnabflussstörungen zu diagnostizieren. Es kann bei der schnellen i.v.-Gabe einer 10 ml Ampulle Toluidinblau mit 300 mg Wirkstoff zu schwerwiegenden Kreislaufreaktionen kommen. Es ist vorstellbar, dass diese Nebenwirkungen im Zusammenhang mit der hohen Konzentration des Wirkstoffes und der intraoperativen Gabe stehen“ [6].

Diese schwerwiegenden Komplikationen waren insofern bemerkenswert, als dass TB von menschlichen Probanden scheinbar besser vertragen wurde als das als gering toxisch geltende MB [7; 8] und Berichte über reversible Herzrhythmusstörungen nach TB-Gabe in älterer Literatur möglicherweise in Vergessenheit geraten waren [9]. Trotz des häufigen Einsatzes der Phenothiazinfarbstoffe MB und TB ist wenig über ihre Toxizität bekannt. Diese

sollte in der vorliegenden Arbeit *in vitro* untersucht werden, mit IK als Kontrollfarbstoff.

1.2 Phenothiazinfarbstoffe und Indigokarmin in der Medizin

Die Phenothiazinfarbstoffe MB und TB sowie der Indolfarbstoff IK spielen eine prominente Rolle in der Chromodiagnostik. MB und TB erfreuen sich zusätzlich therapeutischer Anwendungen, die bis zu den Anfängen der modernen Pharmakotherapie zurückreichen. Als Paul Ehrlich und Paul Guttman 1891 erstmalig MB zur Behandlung der Malaria verabreichten, galt dies als der erste Einsatz eines vollsynthetischen Medikaments zu therapeutischen Zwecken [10]. Die Hauptindikation für die Phenothiazinfarbstoffe MB und TB heutzutage ist die Behandlung der erworbenen und hereditären Methämoglobinämie. TB ist zur Chromoendoskopie, Chromolaparoskopie und zur intraoperativen Färbung der Epithelkörperchen in Deutschland zugelassen. MB wird zudem zur Therapie der Ifosfamid-induzierten Enzephalopathie eingesetzt [10]. Darüber hinaus kommen die Farbstoffe zum Einsatz bei der histologischen Färbung von Geweben. Um die Jahrtausendwende wurden neue Anwendungsmöglichkeiten erprobt – im Rahmen etablierter Therapien oder als *off-label* Gebrauch, als Beispiel sei an dieser Stelle vornehmlich der Einsatz von MB in der Behandlung des vasodilatatorischen Schocks in der Intensivmedizin erwähnt [11]. In Tab. 1.1 sind weitere gängige Anwendungen von Phenothiazinfarbstoffen aufgeführt.

IK ist ein blauer Farbstoff, der in der Gynäkologie zur Aufdeckung von amniotischen Leckagen und in der Urologie zur Prüfung der Durchgängigkeit der Ureteren [12] und zur Darstellung von Fisteln [13] eingesetzt wird. In der vorliegenden Arbeit wurde Indigokarmin als Kontrollsubstanz verwendet.

Infektiologie	Anti-Malaria-Mittel (MB, Rx) [14-16]
	Prophylaxe von Harnwegsinfektionen (MB, Rx) [10]
Intensivmedizin	Vasodilatatorischer Schock (MB, Rx [17])
	Vasoplegisches Syndrom nach herzchirurgischen Eingriffen (MB, Rx [17])
	Hepatopulmonales Syndrom (MB, Rx [18])

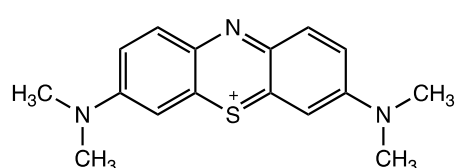
Tumorthherapie	Therapie der Ifosfamid-induzierten Enzephalopathie (MB, Rx [19])
	Erforschung als Zytostatikum (TB, Rx [20])
Chromodiagnostik	Intraoperative Färbungen (Epithelkörperchen, Ureteren, amniotische Leckagen) (MB, Dx [21], TB Dx[5])
	Färbung von präkanzerösen Läsionen (Leukoplakien) (MB, Dx [22], TB Dx [23])
	Rechtsmedizinischer Nachweis vaginaler Läsionen (TB [24])
	Färbung suspekter Herde der Chromoendoskopie (MB [25])
Neurologie	Alzheimer Forschung, Inhibition der Tau-Protein-Aggregation (MB, Rx [26; 27])
Hämatologie	Hereditäre Methämoglobinämie (MB, Rx [28])
Klinische Toxikologie	Antidot bei Vergiftung mit Methämoglobinämiebildnern (MB, Rx [29; 30], TB, Rx [31])
	Co-Antidot bei Zyanidvergiftung (MB, Rx) [32]
Histologie / Pathologie	Bestandteil der Giemsa-Färbung (MB, Dx)
	Toluidinblaufärbung (TB, Dx)
Dermatologie (Photodynamische Therapie)	Therapieresistente Psoriasis en plaques (MB, Rx [33])
	Antimikrobielle Therapie (HIV, West Nile, Hepatitiden, Herpes Viren, <i>P. aeruginosa</i> , <i>S. aureus</i> , <i>Str. pneumoniae</i> , <i>E. faecalis</i> , <i>H. influenzae</i> , <i>E. coli</i>) (MB, Rx [34; 35], TB [35])
	MRSA-infizierte Wunden (MB, Rx [36])
Urologie	Therapie des Priapismus (MB, Rx [37])
Proktologie	Therapie des refraktären Pruritus ani (MB, Rx [38])

Tab 1.1 Übersicht über gängige, *off-label* und erforschte medizinische Anwendungen von Methylenblau (MB) und Toluidinblau (TB). Dx: diagnostischer Einsatz, Rx: therapeutischer Einsatz

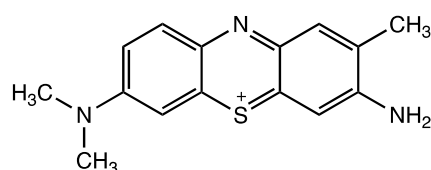
1.3 Physiko-chemische Eigenschaften der untersuchten Stoffe

1.3.1 Phenothiazinfarbstoffe

MB (auch Methylthioniniumchlorid genannt) und TB (auch Toloniumchlorid genannt) sind Farbstoffe der Phenothiazin-Gruppe, deren Grundgerüst das trizyklische 3,7-Diaminophenothiazin ist.



Methylenblau



Toluidinblau

Abb 1.1 Methylenblau und Toluidinblau

Phenothiazinfarbstoffe stellen 2-Elektronen-Redoxsysteme dar: durch Oxidation der reduzierten, farblosen Form (sog. Leuko-Base) entsteht durch ausgedehnte Mesomerie der Elektronen im Ringsystem eine Lichtabsorption im sichtbaren Bereich [20]. So besitzt zum Beispiel MB die Fähigkeit, zwischen einer oxidierten, farbigen und kationischen Form (MB⁺) und einer reduzierten, farblosen, Leuko-Form (MBH₂ oder Leuko-MB) zu alternieren. Das Absorptionsmaximum in wässriger Lösung von MB liegt bei 663 nm [39] und bei für TB 630 nm [23]. Die Phenothiazinfarbstoffe weisen ähnliche Redoxpotenziale auf (0.011 V für MB, bzw. 0.027 V für TB (vs. Wasserstoffelektrode (SHE) pH 7)). Die Redoxpotenziale der Phenothiazinfarbstoffe liegen im Bereich des Redoxpotenzial zahlreicher Biomoleküle [40], wie zum Beispiel der Komplexe der Atmungskette. Dies ermöglicht den Farbstoffen an einer Vielfalt an biologischen Reaktionen reversibel als Elektronendonator oder -akzeptor teilzunehmen [41].

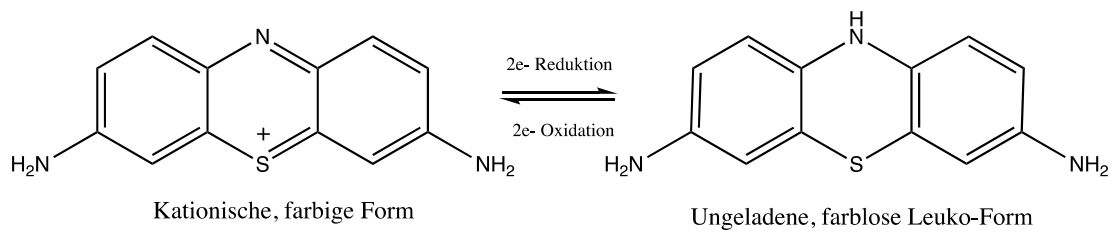


Abb 1.2 Redoxcycling von Phenothiazinfarbstoffen Das hier dargestellte Zwei-Elektronen-Redoxsystem der Phenothiazinfarbstoffe (7-diamino-phenothiazin) ist auf Methylenblau und Toluidinblau übertragbar. Aus der farbigen, oxidierten Form entsteht nach Reduktion die farblose, sogenannte Leuko-Base.

MB und TB sind azidophile Farbstoffe mit hoher Affinität für Carboxylat-, Phosphat- und Sulfatreste und weisen eine Metachromasie auf. Diese bezeichnet das Verhalten einer Substanz, in Abhängigkeit des umgebenden Milieus Änderungen ihres Absorptionsspektrums zu erfahren. Man führt dies auf ein "*stacking*" der delokalisierten π -Elektronensysteme zurück: durch die Bindung an nukleophile Strukturen wie RNA entsteht eine dreidimensionale Packung mehrerer Farbstoffmoleküle übereinander und eine Verschiebung des Absorptionsmaximums [42]. Geeignete Bindungspartner sind sulfatierte Mucopolysaccharide oder -peptide wie Muzin und Chondroitinsulfat [23]. Dies macht man sich in der Chromodiagnostik zunutze, insbesondere bei TB, da beispielsweise an Schleimhäuten (prä)maligne Läsionen sich mit TB anders anfärben als gesunde Bereiche. Innerhalb der Zelle kann TB in Lysosomen, im endoplasmatischen Retikulum bestimmter Zellpopulationen des Immunsystems und – falls vorhanden – in basophilen Zellgranula ein metachromatisches Verhalten zeigen. Obwohl der Zellkern ebenfalls eine hohe Anzahl an elektronegativen Gruppen besitzt, zeigt sich in der Regel keine beachtliche Metachromasie, was möglicherweise auf die Präsenz von Histonen zurückzuführen ist [43].

1.3.2 Promethazin

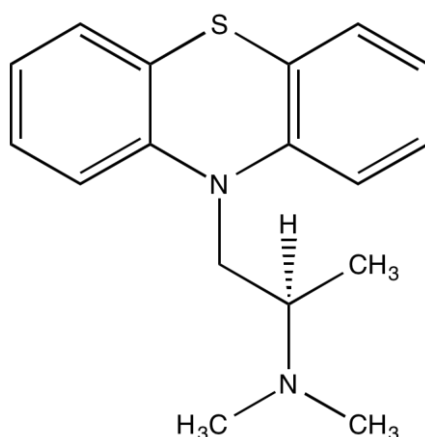


Abb 1.3 Promethazin.

Promethazin ist wie TB und MB ebenfalls ein Phenothiazin-Derivat, und wurde in der vorliegenden Arbeit in einzelnen Versuchen vergleichend zu den Phenothiazinfarbstoffen MB und TB eingesetzt. Durch die Substitution am N-Atom wird die Mesomerie der π -Elektronen wirksam behindert, so dass dieses Molekül keine nennenswerte Lichtabsorption im sichtbaren Bereich aufweist und farblos erscheint. In der Medizin findet Promethazin Einsatz als sedierendes Neuroleptikum, als Anxiolytikum und als Antihistaminikum.

1.3.3 Indigokarmin

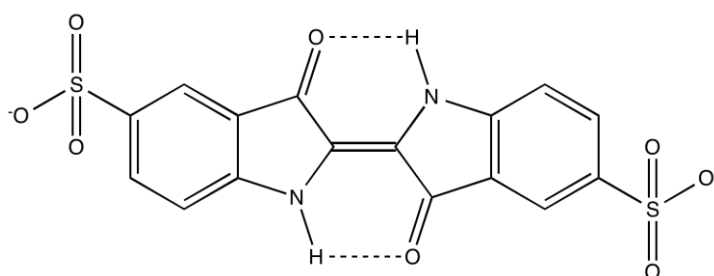


Abb 1.4 Indigokarmin

IK (Indigotin-5,5'-disulfonsäure, Indigotin) ist ein blauer Farbstoff, der keinerlei Verwandtschaft zu den Phenothiazinen aufweist. Es handelt sich um einen indigoiden Farbstoff, der aus Indigo durch Sulfonierung synthetisiert wird. Neben dem Einsatz als Chromodiagnostikum in der Medizin, handelt es sich um ein in der Europäischen Union zugelassenes Lebensmittelfarbstoff (E 132) [44]. Darüber hinaus wird IK auch als Ozonindikator angewendet [45]. Die

Absorptionsmaximum von IK in wässriger Lösung liegt bei 610 nm [39], das Redoxpotenzial beträgt -0,125 V (vs. SHE, pH 7) [39].

	MB	TB	IK
Absorptionsmaximum [nm]	663 nm [39]	630 nm [23]	610 nm [39]
Redoxpotenzial [V] vs. SHE pH = 7,0	0.011 V [46]	0.027 [46]	-0,125 [39]

Tab 1.2 Absorptionsmaximum und Redoxpotenzial von Methylenblau (MB), Toluidinblau (TB) und Indigokarmin (IK).

1.4 Pharmakologie der untersuchten Stoffe

1.4.1 Pharmakodynamische Eigenschaften

Untersuchungen an Erythrozyten und Endothelzellen zeigten, dass MB an der Zelloberfläche [47] durch eine transmembranäre Thiazinfarbstoff-Reduktase reduziert wird [48] und in der lipophilen Leuko-Form über die Zellmembran in das Zellinnere gelangt [49-51]. In den Zellen wird MBH₂ zumindest teilweise in das hydrophile MB⁺ zurückverwandelt und im Zellinneren sequestriert [48]. Als kationischer Farbstoff besitzt MB⁺ eine besondere Affinität zu DNA- und RNA-haltigen Organellen, z.B. Zellkern und endoplasmatisches Retikulum [23].

MB ist ein Elektronenüberträger [52] und moduliert die Aktivität der Cytochrom-c-Oxidase (Komplex IV der Atmungskette) in den Mitochondrien [53]. Der Farbstoff weist in diesem Zusammenhang eine hormetische Konzentrations-Wirkungs-Kurve auf [54]. Der Begriff der Hormesis wurde eingeführt, um nicht-lineare Konzentrations-Wirkungs-Beziehungen in biologischen Systemen zu beschreiben in denen niedrig konzentrierte Expositionen den gegenteiligen Effekt von hochkonzentrierten Expositionen zeigen [55]. In geringen Dosierungen stimuliert MB die Aktivität der Cytochrom-c-Oxidase, in hohen Dosierungen wird sie gehemmt. Darüber hinaus ließ sich im Ratten- und Mäusemodell eine hormetische Wirkung auf verhaltensbiologischer Ebene beobachten: in niedrigen Dosierungen zeigte MB anxiolytische, gedächtnisfördernde Effekte, wohingegen höhere Dosen anxiogen und amnestisch wirkten [54].

Die Redox-Eigenschaften von MB spielen eine Rolle bei der Therapie der erworbenen oder hereditären Methämoglobinämie. Bei diesen Erkrankungen

liegt das Eisenatom des Hämoglobins in oxidiert, dreiwertiger Form vor. MB kann in der Zelle von der NADPH-Methämoglobin-Reduktase zu Leuko-MB reduziert werden, und Reduktionsäquivalente für die nicht-enzymatische Reduktion von Fe^{3+} zu Fe^{2+} bereitstellen [3; 56]. In hoher Konzentration kann MB jedoch die Reduktionskapazitäten der Zelle überlasten und als Oxidationsmittel direkt Hämoglobin zu Methämoglobin oxidieren [57]. Anhand dieses Effektes wurde in älterer Literatur die Wirkung von MB als Antidot bei Blausäurevergiftungen, erklärt, da das Zyanid-Ion vorzugsweise eine Bindung mit dem dreiwertigen Fe-Atom des induzierten Methämoglobins (MetHb) eingeht [32]. Nach neueren Erkenntnissen scheint die Wirkung von MB in zyanidvergifteten Ratten jedoch darüber hinaus auch durch die Wiederherstellung des NAD^+/NADH Quotienten in den Zellen und durch Modulation der Komplexe der Atmungskette zustande zu kommen [58].

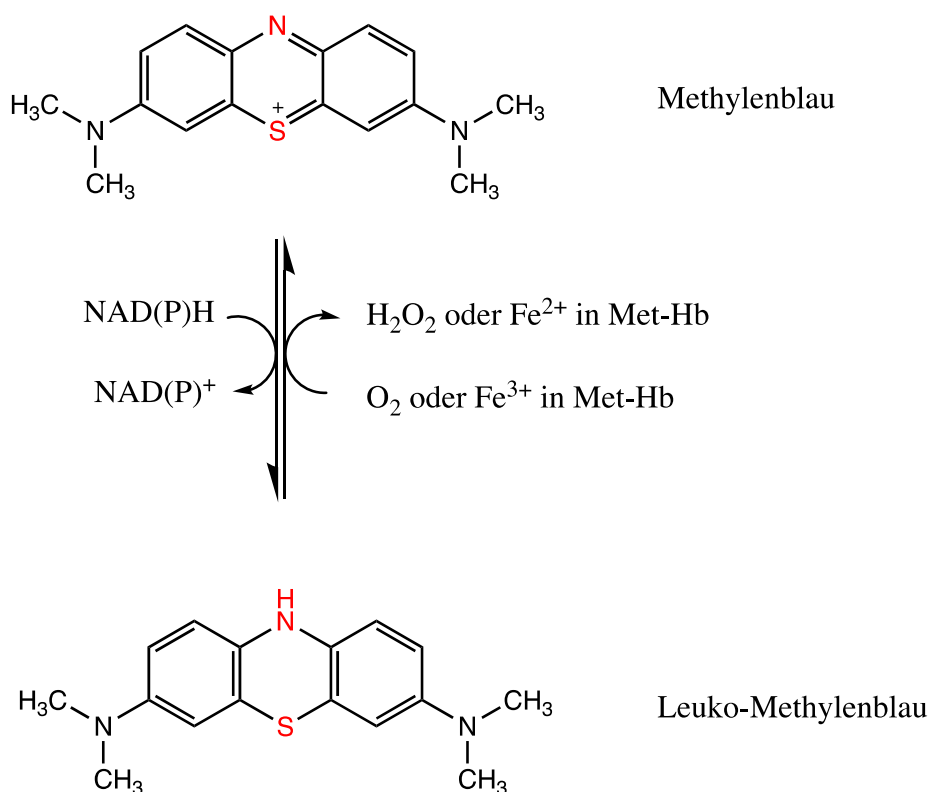


Abb 1.5 Redox-Cycling von Methylenblau. Das nicht-farbige Leuko-Methylenblau kann Elektronen an Sauerstoff (O_2) oder an Fe^{3+} im Methämoglobin (Met-Hb) abgeben. Hierbei wird es in das farbige Methylenblau oxidiert. Methylenblau kann wiederum enzymatisch oder spontan mittels NAD(P)H zurück in Leuko-Methylenblau zurückgeführt werden. Dieses steht nun für einen erneuten Reaktionszyklus zur Verfügung. Adaptiert aus Schirmer et al. [10].

Die Reduktion von Fe^{3+} zu Fe^{2+} in geeigneten Enzymen durch intrazelluläre Oxidation von MBH_2 zu MB^+ erklärt die Effekte von MB auf die eisenhaltigen Hämoenzyme Stickstoffmonoxid-Synthase (NO-Synthase), die Guanylat-Cyclase und die Monoaminoxidase (MAO) [48]. MB inhibiert die NO-Synthase und die Guanylat-Cyclase und wirkt dadurch als Hemmer der NO-vermittelten Vasodilatation, eine Eigenschaft, die aus intensivmedizinischer Sicht von Interesse ist, insbesondere als Intervention bei refraktären vasodilatatorischen Schockzuständen [59].

Ein weiteres eisenhaltiges Enzym, das von MB inhibiert wird, ist die Monoamin-Oxidase (MAO) [60], was insbesondere bei simultaner Behandlung mit Medikamenten relevant ist, die in den Monoamin-Stoffwechsel eingreifen.

Wie MB eignet sich auch TB für die Reduktion von Methämoglobin. Kiese et al. [7] verglichen die Wirksamkeit von MB und TB für diese Indikation in Hunden und menschlichen Probanden. Beim Menschen war eine Dosis von 2mg/kg TB doppelt so effizient in der Reduktion von Methämoglobin wie dieselbe Dosis MB – mit weniger Nebenwirkungen. Diese Tatsache in Kombination mit einer zeitweise besseren Verfügbarkeit von TB könnte die Bevorzugung dieser Substanz gegenüber MB in Deutschland für diese Indikation erklären [3].

Eine weitere Substanz, die in einzelnen Versuchen vergleichend zu den Phenothiazinfarbstoffen eingesetzt wurde ist Promethazin. Das Phenothiazinderivat wirkt vornehmlich als Histamin (H_1) Rezeptor Antagonist und nachrangig als Muskarin- und Dopamin-Rezeptor Antagonist.

Im Elektrokardiogramm kann Promethazin – ähnlich wie andere Phenothiazin-Neuroleptika – zu einer Verlängerung der QT_c -Zeit führen, was auf eine direkte Blockade des *human ether a-go-go-related-gene* (hERG) Kaliumkanals zurückzuführen ist [61]. Eine Verlängerung der QT_c -Zeit erhöht das Risiko für das Auftreten von Torsades-de-Pointes Tachykardien und Kammerflimmern.

Im Gegensatz zu den Phenothiazinfarbstoffen wird Indigokarmin von Enterozyten nicht in relevanten Mengen aufgenommen [62]. An den vaskulären Endothelzellen wird eine Hemmung der NO-vermittelten Vasodilatation diskutiert [63], die hypertensive Ereignisse, die bei der Anwendung gelegentlich beobachtet wurden, erklären könnten [64; 65].

1.4.2 Dosierung und Pharmakokinetik

Über die optimale Dosierung und die Pharmakokinetik von MB, TB und IK ist wenig bekannt. In der Literatur wird keine therapeutische Breite oder Tagesmaximaldosis angegeben; es wird lediglich für MB darauf hingewiesen, dass Dosierungen über 7 mg/kg vermehrt zu Nebenwirkungen führen. Eine intravenöse Gabe von 100 mg MB führte zu einem mittleren Plasmaspiegel von ca. 5 μM [66]. Bei den üblichen Dosierungen von 1-2 mg/kg MB (also 70 – 140 mg für einen 70 kg schweren Erwachsenen) würde man einen vergleichbaren Plasmaspiegel erwarten [49]. Aus diesen Beobachtungen wurden die Konzentrationen der *in vitro* Versuche abgeleitet.

In Tab 1.3 sind Dosierungsempfehlungen und pharmakokinetische Eigenschaften der Farbstoffe bei intravenöser Gabe zusammengefasst.

	Methylenblau	Toluidinblau	Indigokarmin
Dosis	3 – 7,5 mg/kg (Lokalisation der Epithelkörperchen intraoperativ) [67] 1-2 mg/kg (für alle anderen Indikationen) [13]	2-4 mg/kg [3] [6]	40-80 mg (für Erwachsene) [13]
DIS	Verteilung nach Gabe von 10 mg/kg (Ratte, in $\mu\text{g/g}$ Gewebe) [68]: Herz: 46,8 Lunge: 23,5 Leber: 41,1 Niere: 93,2	Verteilung nach Gabe von 10 mg/kg, nach 5 Min (Hund, $\mu\text{g/g}$ Gewebe) [69]: Herz: 151,2 Lunge: 31,6 Leber: 16,8 Niere: 164,2 Blut: 3,6 Nebenschilddrüse: 106,2	Keine Daten
Vd	3,6 L/kg (Mensch) [70]	6,9 L/kg (Schaf) [71]	Keine Daten
Pb	94% (Mensch) [70]	Keine Daten	Keine Daten
MET	hepatisch [70]	Keine Daten	Keine Daten
EXK	Niere (ca. 75%) [70]	Niere [70]	Niere [70]
HWZ	5,25h (Mensch) [72]	9,5 – 14,4h (Hund) [69]	4,5 Min (Mensch) [73]
Cmax	Nach 50 mg i.v.: 2,3 μM (Mensch, Plasma, Kurzinfusion über 10 Min) [74] Nach 100 mg i.v.: 8 μM (Mensch, Vollblut, Bolus 30 s) [72]	Nach 6,6 mg/kg 5,91 μM (Schaf, Vollblut) [71] Nach 10 mg/kg: 13,3 μM (Hund, Vollblut) [69] Nach 9-12 mg/kg: 34 μM (Ratte, Serum) [75]	Keine Daten
Cmean	Nach 100 mg i.v.: 5 μM (Mensch, Plasma) [66]	Keine Daten	Keine Daten
AUC	Nach 100 mg i.v.: 137 nmol/min/ml (Mensch, Vollblut, Bolus 30 s) [56]	Nach 6,6 mg/kg i.v.: 422 nmol/min/ml (Schaf, Vollblut) [71]	Keine Daten

LD₅₀	42.3 mg/kg (Schaf) [76] 77 mg/kg (Maus) [77] 1,250 mg/kg (Ratte) [77]	10 mg/kg (Schaf) [71] 27.56 mg/kg (Maus) [78] 28.93 mg/kg (Ratte) [78] 13.44 mg/kg (Hase) [78]	93 mg/kg (Ratte) [79]
------------------------	---	---	-----------------------

Tab 1.3 Pharmakokinetische Eigenschaften von intravenösem Indigokarmin, Methylenblau und Toluidinblau. Pharmakokinetische Daten zur Dosis, Distribution (DIS), Verteilungsvolumen (Vd), Proteinbindung (Pb), Metabolisierung (MET), Exkretion (EXK), Halbwertszeit (HWZ), maximale Konzentration (C_{max}, in Blut/Serum/Plasma), mittlere Konzentration (C_{mean}), area under the curve (AUC) und mediane letale Dosis (LD₅₀).

1.4.3 Unerwünschte Wirkungen und Kontraindikationen

Laut Oz et al. [77] sind hohe Dosierungen von MB (> 7 mg/kg) mit Symptomen wie Übelkeit, Schweißausbruch, Kopfschmerzen und Schwindel vergesellschaftet. Kiese et al [7] berichteten über Übelkeit, Schweißausbruch und Brennen perioral und in den Fingerspitzen der Probanden bereits ab einer MB Dosis von 2 mg/kg. Die toxikologische Sektion der Datenbank Poisindex Micromedex [70] berichtet zusätzlich über kardiovaskuläre Symptomen wie hypertensive Episoden mit Vasokonstriktionen. Mehrere Fallberichte beschreiben das Auftreten eines Serotoninsyndroms bei der Anwendung von MB (insbesondere bei gleichzeitiger MAO Hemmung durch andere Substanzen) [80-83]. Obwohl MB und TB zur Behandlung von Methämoglobinämien eingesetzt werden, können hohe Dosierungen von den Farbstoffen eine Methämoglobinämie induzieren, in diesem Zusammenhang kann es auch zur Hämolyse kommen [57; 84]. Für MB gibt es Hinweise für eine Embryo- und Fetotoxizität mit Bildung von Heinz-Innenkörperchen, hämolytischer Anämie [85] und Leberschäden [86]. Ferner wurde eine Teratogenität beschrieben [87]. Im Rattenmodell zeigte sich nach chronischer MB Exposition eine erhöhte Inzidenz von Pankreastumoren [88].

Nach versehentlicher, paravasaler oder intramuskulärer Injektion von MB wurden Nekrosen beobachtet [13]. Intrathekale Injektionen resultierten in Paraparese mit paraplegischen und tetraplegischen Zuständen. Die häufigste Nebenwirkung, die bei dem Einsatz von Indigokarmin berichtet wird, ist die Entwicklung einer Hypertonie. Es liegen jedoch ebenfalls Fallberichte über hypotensive Episoden ohne Arrhythmien vor [89], davon ein Fall mit Herzstillstand und konsekutiver zerebraler Ischämie [90].

Bei Vorliegen einer bekannten Überempfindlichkeit gegenüber MB, TB oder IK sind diese Farbstoffe kontraindiziert. Für den Einsatz von TB und MB gilt ein

Glukose-6-Phosphat-Dehydrogenase Mangel als Gegenanzeige, da es in dieser Patientenpopulation zu einer Hämolyse führen kann [57]. Der Einsatz von Phenothiazinfarbstoffen bei gleichzeitiger Behandlung mit MAO-Hemmern ist ebenfalls relativ kontraindiziert [10]. IK ist dagegen bei Vorliegen einer arteriellen Hypertonie relativ kontraindiziert [13].

1.5 Fragestellung der Arbeit

Die Phenothiazinfarbstoffe TB und MB werden routinemäßig parenteral eingesetzt, sei es intraoperativ für diagnostische Zwecke oder therapeutisch bei Methämoglobinämie. Zudem wurden in den letzten Jahren für MB mehrere zukunftssträchtige Anwendungen entdeckt, zum Beispiel die Behandlung des vasodilatatorischen Schocks. In diesem Zusammenhang sind Berichte über schwerwiegende Kreislaufreaktionen nach parenteraler Gabe von TB besorgniserregend, zumal der Farbstoff als wenig toxisch galt, da lediglich Berichte über selbstlimitierende EKG Veränderungen vorlagen, die zu keiner Morbidität führten [9] und die Gabe von TB bei gesunden Probanden weniger Nebenwirkungen als MB aufwies [7]. Trotz der häufigen Verwendung in der Klinik liegen keine präzisen Daten zur therapeutischen Breite der Phenothiazinfarbstoffe vor, und die Wirkung insbesondere von TB auf zellulärer Ebene ist wenig erforscht. Letztere sollte in der vorliegenden Arbeit an unterschiedlichen Zelllinien untersucht werden, die als Indikatororganismen bei toxikologischen Fragestellungen anerkannt sind. In einem ersten Schritt wurde die Wirkung der Phenothiazinfarbstoffe und Indigokarmin auf Endpunkte der zellulären und metabolischen Toxizität untersucht, um die Substanzen in Bezug auf ihre Giftigkeit untereinander zu vergleichen und Toxizitätsmuster näher zu charakterisieren. Zweitens sollte untersucht werden, ob Konzentrationsbereiche unterschiedlicher Toxizität abgegrenzt werden können, und ob diskrepante Wirkungen zwischen niedrigen Konzentrationen (nM-Bereich) und höhere Konzentrationen (µM-Bereich) auftreten, die auf eine Hormesis hindeuten könnten. Abschließend sollte versucht werden, aus dem Vergleich der Toxizität der Farbstoffe bei unterschiedlichen Konzentrationen Empfehlungen für die klinische Praxis abzuleiten.

2 Material und Methoden

2.1 Chemikalien

2.1.1 Feinbiochemika und Reagenzien

Saccharose	Merck, Darmstadt
Tris-HCl	Roth, Karlsruhe
Tris-Base	Merck, Darmstadt
Magnesiumchlorid (MgCl)	Merck, Darmstadt
Kaliumchlorid (KCl)	Merck, Darmstadt
p-Iodonitrotetrazolium-Violett Salz	Sigma-Aldrich, Steinheim
Diphenylamin	Sigma-Aldrich, Steinheim
5,5',6,6'-tetrachloro-1,1',3,3'-tetraethylbenzimidazolocarbocyaniniodid (JC-1)	eBioscience, Frankfurt am Main
Coomassie Blau G	Serva, Heidelberg
Natriumsuccinat	Serva, Heidelberg
Ethylacetat	Merck, Darmstadt
Ethanol	Merck, Darmstadt
Trichloressigsäure	Roth, Karlsruhe
Nicotinamidadenindinukleotid (NADH)	Sigma-Aldrich, Steinheim
Nicotinamidadenindinukleotidphosphat (NADPH)	Roche, Mannheim
Adenosintriphosphat (ATP)	Roche, Mannheim

Firefly-Luciferase	Sigma-Aldrich, Steinheim
Luciferin	Sigma-Aldrich, Steinheim
Pyruvat	Merck, Darmstadt
Wasserstoffperoxid	Merck, Darmstadt
Natriumchlorid (NaCl)	Merck, Darmstadt
Eisessigsäure	Merck, Darmstadt
Schwefelsäure	Merck, Darmstadt
Aprotinin	Sigma-Aldrich, Steinheim
Leupeptin	Sigma-Aldrich, Steinheim
Pepstatin	Sigma-Aldrich, Steinheim
Antipain	Sigma-Aldrich, Steinheim
Benzamidin	Sigma-Aldrich, Steinheim
Phenylmethylsulfonylfluorid (PMSF)	Sigma-Aldrich, Steinheim
Ammoniummolybdat	Sigma-Aldrich, Steinheim
Ascorbinsäure	Sigma-Aldrich, Steinheim
Methylenblau	Merck, Darmstadt
Toluidinblau	Merck, Darmstadt
Indigokarmin	Sigma-Aldrich, Steinheim
Total-ROS-Kit	eBioscience, Frankfurt am Main
di-Natriumhydrogenphosphat (Na_2HPO_4)	Merck, Darmstadt
Kaliumdihydrogenphosphat (KH_2PO_4)	Merck, Darmstadt
Natriumazid (NaN_3)	Merck, Darmstadt
Phosphorsäure	Merck, Darmstadt

Rinderserumalbumin	Sigma-Aldrich, Steinheim
Glutathionreduktase (GR)	Sigma-Aldrich, Steinheim
Glutathion	Sigma-Aldrich, Steinheim
Perchlorsäure	Sigma-Aldrich, Steinheim
Triethanolamin	Merck, Darmstadt
Cell proliferation Kit II (XTT)	Roche, Mannheim

2.1.2 Nährmedien und Pufferlösungen

Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM) , versetzt mit 2%, 5% oder 10% fötalem Kälberserum (FCS), 2mM Glutamin, 100 IU/mL Penicillin und 100 µg/mL Streptomycin	Gibco, Invitrogen, Karlsruhe
Hanks's Balanced Salt Solution (HBSS) NaCl 14mM; KCl 5mM; CaCl ₂ 1mM; MgSO ₄ 0.4mM; MgCl ₂ 0.5mM; Na ₂ HPO ₄ 0.3mM; KH ₂ PO ₄ 0.4mM; D-Glukose 6mM; NaHCO ₃ 4mM	Gibco, Invitrogen, Karlsruhe
Phosphate-Buffered Saline (PBS) NaCl 137mM; KCl 2.7mM; Na ₂ HPO ₄ 8mM; KH ₂ PO ₄ 2mM; pH 7.4	Gibco, Invitrogen, Karlsruhe
Spezial DMEM ohne Phenolrot	Gibco, Invitrogen, Karlsruhe
Trypsin-Lösung: 2,5% in PBS	Gibco, Invitrogen, Karlsruhe
Supplementiertes Claycomb Medium (Claycomb Medium, 100 µM Noradrenalin, 10% Fetales Bovines Serum, 2 mM L-Glutamin)	Sigma-Aldrich, Steinheim

2.2 Apparative Vorkehrungen

CO ₂ -Brutschrank	Heraeus, Hanau
Zentrifuge Rotanta / R	Hettich, Tuttlingen
Neubauer Zählkammer	Brand, Wertheim
Potter-Elvehjem Homogenisator	Braun, Melsungen
Rührmotor	Janke & Kunkel IKA-Werke, Staufen
Sterilbank LB-72-C Lamin Air	Heraeus, Hanau
Lichtmikroskop Axiovert 135M	Zeiss, Göttingen
UV/Vis Spektrometer	Pharmacia LKB Biochrom 4060
Nanophotometer	Implen, München
Holomonitor M3	IUL Instruments, Königswinter
Durchflusszytometer FACSCalibur	BD Biosciences, Franklin Laes, NJ, USA
Ultrazentrifuge Optima XL 90	Beckmann Coulter, Krefeld
Swinging-Bucket Rotor SW40 Ti	Beckmann Coulter, Krefeld
Zentrifuge Sorvall	Thermo Fischer, Waltham, MA, USA
Rotor SS-R für Sorvall Zentrifuge	Thermo Fischer, Waltham, MA, USA
Multi-Plate-Reader Infinite 200 Pro	Tecan, Männedorf, CH
Multilabel Plate Reader Victor ³	Perkin-Elmer, Waltham, MA, USA
Mikrozentrifuge 5412	Eppendorf, Hamburg

2.3 Zellkulturmethoden

2.3.1 Zelluläre Testsysteme

A549 (ATCC® CCL-185™) ist eine Zelllinie aus adhärenenten Typ II Alveolarepithelzellen aus einem humanen Lungenkarzinomgewebe.

L929 Zellen (NCTC clone 929, ATCC® CCL-1™) entstammen aus murinem areolarem Fettgewebe und sind adhärent wachsende Fibroblasten.

HepG2 (ATCC® HB-8065™) ist eine Zelllinie aus humanem hepatozellulärem Karzinomgewebe.

HL-1 Zellen sind eine Weiterentwicklung der transgenen murinen atrialen Tumor-Kardiomyozytenzelllinie AT-1. Es handelt sich um die einzige bisher bekannte, kontraktile Kardiomyozyten-Zelllinie, die seriell passagiert werden kann [91].

2.3.2 Anzucht und Passage der Testzellen

Die A549, L929 und HepG2 Zellen wurden ähnlich behandelt, in leicht abgewandelter Form nach den Empfehlungen der American Type Culture Collection (ATCC).

Die Zellen wurden in einem wasserdampfgesättigten Inkubator bei 37°C, und 7,5 % CO₂ in 25-cm²-Kulturflaschen kontinuierlich vermehrt. Die Inkubation der adhärenenten Zellen erfolgte in DMEM Kulturmedium unter Zusatz von Penicillin (100 IE/mL) und Streptomycin (50 µg/mL) als Schutz gegen bakterielle Kontamination. Die Kulturen wurden täglich inspiziert, um die Dichte der Zellen zu kontrollieren. Bevor die Zellen durch die Ausbildung eines zu dichten Monolayers in ihrem exponentiellen Wachstum beeinträchtigt wurden, wurde eine Zellpassage durchgeführt. Hierbei wurde unter sterilen Bedingungen das DMEM Medium aus den Kulturflaschen abgesaugt. Anschließend wurde der Zellrasen mit ca. 4 ml HBSS gewaschen und in 1,5 ml einer Trypsin-Lösung ca. 15 min im Brutschrank inkubiert. Nachdem die Zellen sich von der Unterlage gelöst hatten, wurden ca. 2,5 ml DMEM zur Inaktivierung des Trypsins auf die Zellen gegeben. Die Lösung wurde mehrfach über den Zellrasen pipettiert, anschließend in ein Zentrifugenröhrchen überführt, und 3 min bei 300xg

zentrifugiert. Das Sediment wurde in DMEM aufgenommen und auf weitere Flaschen oder Mikrotiterplatten ausgesät.

Die HL-1 Zellen wurden nach den Empfehlungen von Claycomb et al. kultiviert [91]. Die Zellen wurden in einem wasserdampfgesättigten Inkubator bei 37°C und 5% CO₂ in 25-cm²-Kulturflaschen kontinuierlich vermehrt. Die Inkubation erfolgte in diesem Fall in supplementiertem Claycomb-Medium. Ähnlich wie in 2.5.2.1 wurde nach Erreichen konfluenter Wachstumsverhältnisse eine Zellpassage unter sterilen Bedingungen durchgeführt. Vor der Passagierung wurden neue 25-cm²-Flaschen oder 6-Well-Platten mit einer Gelatine/Fibronectin-Lösung durch eine einstündige Inkubation bei 37°C vorbehandelt. Nach dieser Zeit wurde die Lösung abgesaugt.

Das Medium einer 25-cm²-Flasche wurde abgesaugt, die konfluenten Zellen mit 1 mL einer 0,05%-Trypsin-Lösung versetzt und 1 min bei 37°C inkubiert. Anschließend wurde die Lösung abgesaugt und erneut 1 mL Trypsin-Lösung auf die Zellen gegeben. Nach einer zweiminütigen Inkubation bei 37°C wurde das Trypsin mit 1 mL Trypsin-Inhibitor-Lösung neutralisiert, und die Zellsuspension in ein 15 mL Zentrifugenröhrchen überführt. Der Flaschenboden wurde mit 5 mL Waschmedium gespült, und die resultierende Lösung wurde ebenfalls in das Zentrifugenröhrchen überführt. Die abgelösten Zellen wurden dann 5 min bei 500xg zentrifugiert und der Überstand abgesaugt. Die Zellen wurden in supplementiertem Claycomb Medium aufgenommen und auf die neuen vorbehandelten Flaschen oder Platten gegeben.

2.4 Testmethoden

2.4.1 Morphologische Voruntersuchungen am digital holographischen Mikroskop (Holomonitor)

Die digitale holographische Mikroskopie ist eine nicht-invasive bildgebende Methode zur quantitativen Beurteilung der Zellmorphologie. Ein einfallender monochromatischer Lichtstrahl wird in einen Referenzlichtstrahl und einen Objektlichtstrahl geteilt. Der Referenzlichtstrahl wird am Objekt vorbeigeleitet, während der Objektlichtstrahl auf das Objekt einfällt. Die vom Objekt

ausgehende Wellenfront wird fokussiert und interferiert mit dem Referenzlichtstrahl. Aus diesem Interferenzmuster wird computergestützt ein dreidimensionales Bild des Objekts rekonstruiert [92].

Es wurden wie in 2.5.2 beschrieben, L929 und A549 Zellen auf 6-Well-Platten ausgesät. Das Medium wurde abgesaugt und die Zellen wurden mit TB und MB Lösungen unterschiedlicher Konzentration 20 Stunden lang inkubiert. Anschließend wurden die Zellen am Holomonitor morphologisch untersucht.

2.4.2 Zytotoxizität

Für die Bestimmung der zellulären Toxizität nach Farbstoffexposition wurde der XTT-Test eingesetzt [93]. Das Tetrazoliumsalz 2,3-bis-(2-methoxy-4-nitro-5-sulfophenyl)-2H-tetrazolium-5-carboxanilid (XTT) ist eine Weiterentwicklung von 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium (MTT). Im Gegensatz zu der Vorgängersubstanz MTT wird das hydrophile Anion XTT nicht in relevanten Mengen von den Zellen aufgenommen, sondern die Elektronenübertragung erfolgt über ein Kopplungsreagenz [94]. XTT wird vornehmlich an der Plasmamembran vitaler Zellen reduziert. Es entsteht eine lösliche, orange Formazanverbindung. Unter Standard-Wachstumsbedingungen ist die Formazanbildung proportional zu der Anzahl vitaler Zellen [95]. Durch photometrische Messung des entstandenen Formazans bei 470 nm und Vergleich mit einer Kontrollpopulation kann die Zellvitalität quantifiziert werden.

2.4.2.1 Verwendete Lösungen

- Elektronenkopplungsreagenz
 - N-methyl-dibenzopyrazin-methylsulfat (PMS), 0.383 mg/ml (1.25 mM), Phosphat-gepufferte Salzlösung (PBS)
- XTT-Reagenz
 - 5x 25 ml XTT (Natrium 3'-[1- (phenylaminocarbonyl)- 3,4-tetrazolium]-bis (4-methoxy- 6-nitro) phenylsulfonat hydrat) Farbstofflösung, in RPMI 1640, ohne Phenolrot • 1 mg/ml, steril filtriert

- XTT-Lösung
 - 6 mL HBSS, 5 mL XTT-Reagenz, 80µL Elektronenkoppelungsreagenz

2.4.2.2 Versuchsdurchführung

Die Zellen einer 96 Well Platte wurden mit unterschiedlichen Farbstoffkonzentrationen 2 Stunden lang im Brutschrank bei 37°C inkubiert. Anschließend wurden die Zellen wie in 2.5.2 abgelöst, zentrifugiert und in 2 ml HBSS resuspendiert.

Folgende Lösungen wurden in die Wells pipettiert:

Probe	100 µL
XTT-Lösung	100 µL

Nach einer 3-stündigen Inkubation im Brutschrank bei 37°C, wurde die Absorption bei 450 nm (A_{450}) an dem Victor³ Plattenmessgerät gemessen.

Zur Korrektur des Tyndalleffektes wurde die gemittelte Absorption bei 690 nm (A_{690}) ungefärbter Kontrollzellen von der Formazan-Absorption bei 450nm (A_{450}) abgezogen.

2.4.3 Fluorimetrie

2.4.3.1 Durchflusszytometrie

Die Durchflusszytometrie ist eine Methode der Zelluntersuchung anhand phänotypischer Merkmale und unter Einsatz von Fluoreszenzfarbstoffen. Mit Fluorochromen markierte Zellen werden hierfür in einem laminaren Strom durch eine Kapillare gesaugt und einzeln einem Laserstrahl ausgesetzt. Es wird zum einen das Vorwärtstreulicht (forward scatter, FSC) gemessen, welches vornehmlich eine Aussage über die Zellgröße möglich macht. Davon unterschieden wird das Seitwärtstreulicht (side scatter, SSC), das senkrecht zum Laserstrahl und Ausdruck der Granularität der Zelle ist. Auf der anderen Seite wird durch das monochromatische Licht der Fluoreszenzfarbstoff zur Emission von Licht einer bestimmten Wellenlänge angeregt. Dieses Signal

konnte in 4 unterschiedlichen Detektoren (FL-1 bis FL-4) gemessen werden. Die Messungen wurden nach Anregung bei 488 nm in den Kanälen FL-1 (530 ± 15 nm) und FL-2 (ca. 585 ± 22 nm) durchgeführt.

2.4.3.2 JC-1 Assay

2.4.3.2.1 Das mitochondriale Membranpotenzial

An der inneren mitochondrialen Membran beteiligen sich Enzyme der Atmungskette am Aufbau eines Protonengradienten über diese Membran. Dieser liefert wiederum die entscheidende Energie für die ATP-Produktion der Zelle. Der Protonengradient kommt durch zweierlei Komponenten zustande: einerseits das mitochondriale Membranpotential ($\Delta\psi_m$, ca. -180 mV) und andererseits die pH Differenz (ca. 1 Einheit, entspricht ca. 60 mV) [96]. Der Hauptteil dieses Gradienten wird folglich vom mitochondrialen Membranpotenzial beigesteuert. Diese Größe eignete sich, um qualitative und quantitative Aussagen über den Zustand von Mitochondrien zu treffen: gesunde, intakte Mitochondrien weisen ein stark negatives $\Delta\psi_m$ auf, während die mitochondriale Depolarisation bis zum Zusammenbruch des mitochondrialen Membranpotenzials ein Merkmal für mitochondrialen Schaden und letztendlich auch für den Zelluntergang ist.

2.4.3.2.2 Der Farbstoff JC-1

Der kationische, lipophile Fluoreszenzfarbstoff JC-1 (5,5',6,6'-tetrachloro-1,1',3,3'-tetraethylbenzimidazolocarbocyaniniodid), ein Zyanin-Derivat, besitzt die Eigenschaft, bei physiologischen $\Delta\psi_m$ Werten innerhalb der Mitochondrien zu aggregieren (sog. J-Aggregate) [97]. Wenn diese von Licht mit einer Wellenlänge von 488 nm angeregt werden, emittieren sie wiederum Licht mit einem Maximum bei 595 nm (Orange-Rot). Dahingegen liegt JC-1 bei kollabiertem $\Delta\psi_m$ in seiner monomeren Form vor. Diese emittiert nach Anregung bei 488 nm Licht mit einem Maximum bei 530 nm (Grün). Das Verhältnis der Rot-Fluoreszenz zur Grün-Fluoreszenz (im Folgenden Rot/Grün-Quotient genannt) hängt nur von $\Delta\psi_m$ ab, und ist unabhängig von Faktoren wie Größe, Form und Dichte der Mitochondrien [98]. Der Rot-Grün-Quotient ist ein geeignetes Maß für das mitochondriale Membranpotenzial.

2.4.3.2.3 Verwendete Lösungen

- JC-1-Lösung, Endkonzentration:
 - 1mg/mL JC-1, DMSO

2.4.3.2.4 Versuchsdurchführung

Die Zellen aus 25-cm²-Flaschen wurden mit unterschiedlichen Farbstoffkonzentrationen behandelt. Der Farbstoff wurde jeweils in HBSS gelöst. Parallel zu den vergifteten Zellen wurden in reinem HBSS inkubierte Flaschen als Kontrollen verwendet. Nach definierten Zeiten wurde der Farbstoff (bzw. das HBSS) entfernt, die Zellen wurden wie in 2.5.2 abgelöst, zentrifugiert und in HBSS aufgenommen. Die Zellzahl wurde auf ca. 10⁶/mL eingestellt und es wurden 2,5 µL der JC-1-Lösung zugefügt. Nach 15-minütiger Inkubation bei 37°C wurden die Zellen auf Eis versetzt und ihr Fluoreszenzverhalten an einem FACSCalibur Durchflusszytometer gemessen.

2.4.3.3 Fluorimetrische Bestimmung der reaktiven Sauerstoffspezies

Der Redoxzustand der Zellen wurde anhand des Total-ROS-Kits von eBioscience nach den Empfehlungen des Herstellers bestimmt.

2.4.3.3.1 Verwendete Lösungen

- 500X ROS Assay Stain Vorratslösung
 - ROS Assay Stain Concentrate, DMSO
- ROS Assay Stain Solution
 - ROS Assay Buffer, ROS Assay Stain

2.4.3.3.2 Versuchsdurchführung

Die Zellen aus 25-cm²-Flaschen wurden wie in 2.5.2 abgelöst, zentrifugiert, in HBSS aufgenommen und in 400 µL Proben portioniert. Die Zellzahl wurde in jeder 400 µL Probe auf ca. 10⁶ eingestellt. Die suspendierten Zellen wurden anschließend mit 100 µL ROS Assay Stain Solution versetzt, und bei 37°C 60 Minuten lang inkubiert.

Danach wurden die Farbstofflösungen unterschiedlicher Konzentration auf die Zellen gegeben, die unter Berücksichtigung der gewünschten Expositionszeiten bei 37°C inkubiert und anschließend auf Eis versetzt.

Aufgrund der kurzen Halbwertszeiten der ROS wurde in Anlehnung an die Literatur wurden kurze Expositionszeiten (20 Minuten) für die Messung der ROS-Produktion ausgewählt [99].

Das Fluoreszenzverhalten der Zellen wurde im FACS Calibur Durchflusszytometer gemessen.

2.4.4 Luminometrische ATP Messung anhand der Firefly-Luciferase-Reaktion

Das Enzym Firefly-Luciferase findet sich beim Leuchtkäfer *Photinus pyralis* und katalysiert folgende Reaktion [100]:

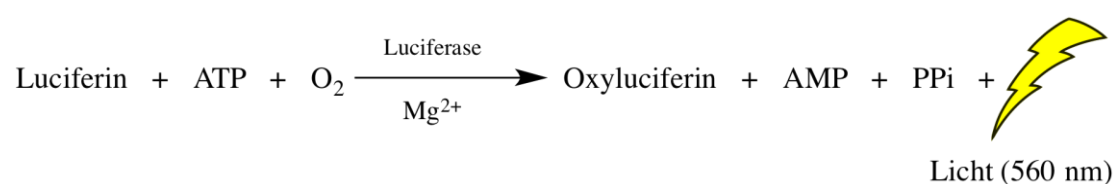


Abb 2.1 Luciferin-Luciferase Reaktion.

Es lassen sich sehr sensitiv geringe Mengen an ATP nachweisen (bis ca. 10^{-12} mol). Da eine ATP Kontamination bakterieller Herkunft die Messungen stark verfälschen konnte, wurde unter sterilen Bedingungen in ATP-freiem Wasser (qH₂O) gearbeitet.

Die Komposition der Reagenzien orientierte sich an Graff et al. [101], während die Versuchsdurchführung und die Komposition der Puffer nach Empfehlungen von Promega erfolgten [100].

2.4.4.1 Verwendete Lösungen

- Reaktionspuffer, Endkonzentrationen:
 - 25 mM Tris-Base, 4mM EDTA, 20 mM MgSO₄, 2 mM ATP, 1 mM Dithiotreitol, qH₂O, pH 7,8
- Lyse-Puffer, Endkonzentrationen:
 - 25 mM Tris-Base, 4mM EDTA, 1 % Triton X-100, 10 % Glycerol, 1 mM Dithiotreitol, qH₂O, pH 7,8
- Luciferase/Luciferin-Reagenz (L-Reagenz), Endkonzentrationen:
 - 75 µg/mL Luciferase, 1 mM D-Luciferin, Reaktionspuffer

2.4.4.2 Versuchsdurchführung

Eine dicht gewachsene schwarzwändige 96-Well-Mikotiterplatte wurde nach Entfernung des Mediums mit unterschiedlichen Konzentrationen von in HBSS gelösten Farbstoffen versetzt. Es wurden jedes zweite Well mit Farbstoff versetzt und für die Messungen eingesetzt, um den Einfluss der Lumineszenz der benachbarten Wells auf die Einzelmessungen zu reduzieren. Nach zweistündiger Inkubation im Brutschrank bei 37°C wurden die Zellen mit 20 µL Lyse-Puffer versetzt und 30 min bei Raumtemperatur inkubiert. Anschließend wurde in jedem Well die Lumineszenz nach automatisierter Injektion von 100 µL L-Reagenz in einem Plate-Reader (Infinite 200 Pro, Tecan) gemessen. Es wurde die Grundlumineszenz vor und 2 Sekunden nach der Injektion des L-Reagenz über 20 Sekunden bestimmt.

2.4.5 Glutathion-Messung

Das gesamte intrazelluläre Glutathion (GSX) der Zellen – bestehend aus dem oxidiertem Glutathion GSSG sowie der reduzierten Form GSH – wurde in Anlehnung an die Methode von Tietze gemessen [102]. Diese besteht aus einem Reaktionszyklus in dem Ellmans Reagenz (5,5'-Dithiobis-2-nitrobenzoesäure, DTNB) eine zentrale Rolle spielt. Weitere essentielle Reagenzien des Tests waren die Glutathionreduktase und NADPH. Das GSSG der Zellen wird in Anwesenheit von NADPH durch die Glutathionreduktase (GR) zu GSH reduziert. Dieses reagiert mit DTNB unter Bildung von 2-Nitro-5-thiobenzoat (TNB⁻) zu GSTNB. Letzteres wird durch die GR in GSH zurückverwandelt, Dieses steht dann wiederum für einen neuen Reaktionszyklus zur Verfügung. Die Reaktionsgeschwindigkeit, gemessen anhand des TNB-Umsatzes (Absorptionsmaximum 412 nm) ist proportional zu der Menge an vorhandenem GSX.

2.4.5.1 Verwendete Lösungen

- Kaliumphosphatpuffer-Mischung pH 7,0
 - 100 mM KH₂PO₄, 1 mM Na₂EDTA, dH₂O
 - 167 mM K₂HPO₄, 1 mM Na₂EDTA, dH₂O
- Triethanolamin

- Perchlorsäure 0,33 M
- DTNB 3g/mL
- NADPH (4,1g/mL)
- Glutathionreduktase (20 U/ml)

2.4.5.2 Versuchsdurchführung

Vor jeder Messreihe wurde eine Eichgerade mit definierten GSSG Konzentrationen und Perchlorsäure erstellt.

Die Zellen wurden mit 2 ml Perchlorsäure lysiert und 3 min bei 250xg zentrifugiert. Aus dem Überstand wurden 200 µL für die Messung entnommen. Diese Probe wurde mit 10 µL Kaliumphosphatpuffermischung und 10 µL Triethanolamin neutralisiert.

Folgende Lösungen wurden anschließend in eine Messküvette pipettiert:

DTNB (3g/mL)	20 µL
NADPH+H ⁺	50 µL
Kaliumphosphatpuffermischung, pH 7,0	800 µL
Probe	100 µL

Die Messung wurde durch Zusatz von GR gestartet:

GR	30 µL
----	-------

Die Absorption wurde alle 30 Sekunden über 3 min am Spektrophotometer bei 412 nm gemessen.

2.4.6 Versuche zur anti-oxidativen Wirkung von Farbstoffen

2.4.6.1 Phenothiazinfarbstoffe und Wasserstoffperoxid-Exposition

Die Zellen wurden mit unterschiedlichen Farbstofflösungen vorinkubiert, anschließend wurde der ROS Assay wie in 2.6.6.3 durchgeführt. Die Zellen wurden nach der Beladung mit ROS Assay Stain Solution 10 min lang mit einer

1mM Wasserstoffperoxid-Lösung (H₂O₂-Lösung) inkubiert. Das Fluoreszenzverhalten der Zellen wurde am FACSCalibur Durchflussszytometer gemessen.

2.4.7 Zellfraktionierung

2.4.7.1 Prinzipien

2.4.7.1.1 Homogenisierung

Als erster Schritt der Zellfraktionierung wurde ein Zellaufschluss durchgeführt. In der vorliegenden Arbeit geschah dies durch eine mechanisch unterstützte Lyse in hypotoner Umgebung. Hierzu wurden die geschwollenen Zellen auf Eis gesetzt und zur Neutralisierung der bei der Lyse freigesetzten intrazellulären Proteasen mit einer Mischung aus Proteaseinhibitoren versetzt. Durch die Auf- und Abwärtsbewegungen eines in einem Motor eingespannten Potter-Elvehjem-Stabes wurden die Zellen durch die Scherkraft lysiert.

2.4.7.1.2 Isolation von Zellfraktionen durch differentielle Zentrifugation

Zur Auftrennung der einzelnen Zellorganellfraktionen wurden sequentielle Zentrifugationsschritte mit Dichtegradienten durchgeführt.

Die theoretische Grundlage dieses Verfahrens wird durch die Svedberg Gleichung verdeutlicht, benannt nach dem Erfinder der Ultrazentrifuge. Sie beschreibt die Sedimentationsgeschwindigkeit eines sphärischen Teilchens in einem viskösen Medium:

$$\frac{dx/dt}{\omega^2 x} = \frac{2r^2(\rho_p - \rho_m)}{h}$$

x ist die Entfernung von der Rotationsachse und somit ist dx/dt die Sedimentationsgeschwindigkeit. ω ist die Winkelgeschwindigkeit. η ist die Viskosität des Mediums. ρ_p und ρ_m bezeichnen jeweils die Dichte des Teilchens und jene des Mediums. r ist der Radius des Teilchens.

Nach dieser Gleichung lässt sich die in dieser Arbeit durchgeführte Isolation von Plasmamembrandomänen in einem diskontinuierlichen Saccharose-Gradienten mit Saccharose-Lösungen unterschiedlicher Dichte erreichen.

2.4.7.1.3 Qualitative Beurteilung der Zellfraktionierung

Zur Beurteilung der Qualität der Zellfraktionierung stehen einerseits die Messung von organellspezifischen Markerproteinen mit proteomischen Methoden, andererseits die Messung von spezifischen Markerenzymaktivitäten anhand spektrophotometrischer Methoden zur Verfügung. Diese wurde Methodik eingesetzt, um relativ schnell eine quantitative Aussage über die Güte der Zellfraktionierung zu treffen [103].

Am Photometer wurden Aktivitäten (\mathcal{A}) von Markerenzymen kolorimetrisch bestimmt, die spezifisch in den jeweiligen Organellfraktionen zu erwarten wären. Mit „spezifischer Aktivität“ (\mathcal{A}_S) wurde die Aktivität des Enzyms bezogen auf den Proteingehalt (m) der jeweiligen Fraktion bezeichnet:

$$\mathcal{A}_S = \frac{\mathcal{A}}{m}$$

Durch erhebliche Verluste im Laufe der Zellfraktionierung wurden stets ein Anteil (T) aus einer Organellfraktion (G) an Organellen isoliert.

Die „Anreicherung“ (engl. Enrichment, E) eines Markerenzym in dem isolierten Anteil T in Bezug auf das Homogenisat H bezeichnet das Verhältnis zwischen spezifischer Aktivität des Enzyms in der Fraktion und spezifischer Aktivität des Enzyms in dem Homogenisat:

$$E = \frac{\mathcal{A}_S(T)}{\mathcal{A}_S(H)}$$

Die „Ausbeute“ (engl. Yield, Y) eines Markerenzym in einer Teilfraktion T in Bezug auf das Homogenisat H bezeichnet das Verhältnis zwischen Aktivität des Enzyms in der Fraktion und Aktivität des Enzyms in dem Homogenisat:

$$Y = \frac{\mathcal{A}(T)}{\mathcal{A}(H)}$$

Die „Kreuzkontamination“ in einer Teilfraktion bezeichnet die Ausbeute der Enzyme, die ein Markerenzym für eine andere Fraktion darstellen.

Der Farbstoffgehalt einer Organellfraktion G lässt sich aus dem photometrisch gemessenen Farbstoffgehalt der isolierten Anteil T und der Ausbeute Y schließen:

$$\mathcal{F}(G) = \frac{\mathcal{F}(T)}{Y}$$

T kann allerdings mit Organellen aus anderen Fraktionen kontaminiert sein. Da diese „Kreuzkontamination“ gemessen wurde, konnte diese anhand einer Kompensationsmatrix berücksichtigt werden, und von dem jeweilig gemessenen Farbstoffgehalt abgezogen werden mittels einer einfachen Matrixrechnung. Die theoretische Grundlage hierfür bildet die Arbeit von Bagwell et al. [104] zur Signalkompensationen bei Kreuzkontaminationen, und wurde ursprünglich zur Berechnung der Kompensation in durchflusszytometrischen Messungen beschrieben. Es wurde somit der korrigierte Farbstoffgehalt der Gesamtfraktion $\mathcal{F}_{ko}(G)$ errechnet.

2.4.7.2 Verwendete Lösungen

Es wurden in Anlehnung an Harford et al. [103] folgende Lösungen hergestellt:

Protease-Inhibitor-Lösungen (PI-Lösungen), Endkonzentrationen:

	Verdünnung bei Zusatz zu Puffer
1,36 mg/mL Aprotinin, dH ₂ O	1:200
200 mM Benzamidin, dH ₂ O	1:200
200 mM Phenylmethylsulfonylfluorid, 100% Ethanol	1:200
1 mg/mL Antipain, 10 % (v/v) DMSO, dH ₂ O	1:1000
1 mg/mL Leupeptin, 10 % (v/v) DMSO, dH ₂ O	1:1000
1 mg/mL Pepstatin, 10 % (v/v) DMSO, dH ₂ O	1:1000

Tris-Kalium-Magnesium-Puffer (TKM Puffer), Endkonzentrationen:

10 mM Tris-HCl, 10 mM KCl, 150 mM MgCl₂, dH₂O, pH 6,7, PI-Lösungen

Saccharose-Tris-Kalium-Magnesium-Puffer (STKM-Puffer),

Endkonzentrationen:

0,25 M bis 2,3 M Saccharose, TKM-Puffer

Mitochondrien-Suspension-Medium, Endkonzentrationen:

0,25 M Saccharose, 10 mM Tris-Base, dH₂O, pH 7,0, PI-Lösungen

2.4.7.3 Versuchsdurchführung

2.4.7.3.1 Homogenisierung

Die Zellen aus 2 bis 4 75-cm²-Flaschen wurden einerseits 2 Stunden lang in 10 mL pro Flasche einer 100 µM Farbstoff-Lösung inkubiert. Andererseits wurden Zellen aus 2 bis 4 75-cm²-Flaschen ohne Farbstoffbehandlung für die Bestimmung der Fraktionsanreicherung, -ausbeute und -reinheit eingesetzt.

Die Zellen wurden wie in 2.5.2 abgelöst, zentrifugiert, und 2 Minuten lang in eiskaltem hypoosmolarem TKM-Puffer zum Anschwellen gebracht und mit PI-Lösung versetzt. Sie wurden anschließend in einen vorgekühlten Potter-Elvehjem-Homogenisator überführt und insgesamt 3 mal 30 Sekunden bei 500 rpm mit jeweils 5 Auf- und Abwärtsbewegungen des im Motor eingespannten S es mechanisch lysiert. Der Homogenisierungsprozess geschah stets auf Eis und es wurden nach jedem Durchgang einminütige Pausen zur Kühlung eingehalten. Nach dem 2. Zyklus wurde das Homogenisierungsmedium anhand von STKM-Puffer auf einen isoosmolaren Wert gebracht (Endkonzentration der Saccharose: 0,25 M). Der Prozess wurde anschließend am Mikroskop überprüft. Falls über 10% Zellen intakt waren, wurde die Homogenisierung mit weiteren 5 Hüben fortgesetzt. Das entstandene Homogenisat (H) wurde 10 min auf Eis gesetzt, ein Aliquot wurde für die Beurteilung der Zellfraktionierung beziehungsweise des Farbstoffgehaltes aufgehoben.

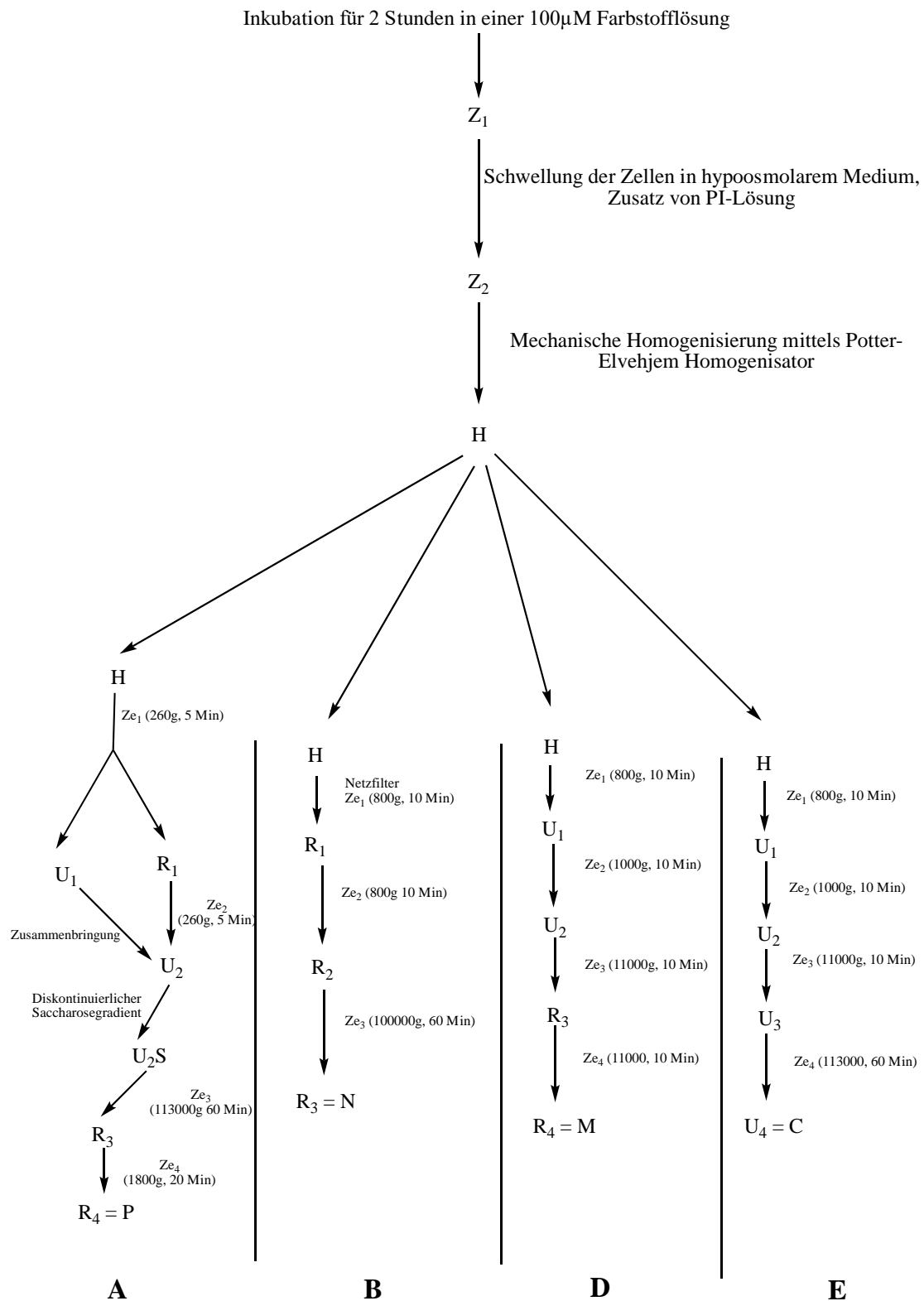


Abb 2.2 Schematische Darstellung der Zellfraktionierung. A: Isolation einer Plasmamembranfraktion ; B: Isolation einer nuclearen Fraktion ; D: Isolation einer mitochondrialen Fraktion ; E: Isolation einer zytosolischen Fraktion. Ze_n: Zentrifugation Nummer n, R_n: Rest nach Ze_n, U_n: Überstand nach Ze_n. P: Plasmamembranfraktion N: nucleare Fraktion, M: mitochondriale Fraktion, C: zytosolische Fraktion.

2.4.7.3.2 Anreicherung der Plasmamembran-Fraktion

In leicht abgewandelter Form nach Harford et al. [103] wurde das Homogenisat in der Tischzentrifuge bei 260xg 5 Minuten lang zentrifugiert. Der Überstand (U1) wurde aufgehoben und der Rückstand (R1), reich an intakten Zellen und Kernen wurde 3 Hüben des Potter-Elvehjem-Homogenisator ausgesetzt und anschließend erneut bei 260xg 5 Minuten lang zentrifugiert. Der Überstand (U2) wurde mit U1 zusammengefügt und anschließend bei 1800 g 10 Minuten lang zentrifugiert. Der entstandene Rückstand (R3) wurde in 6 mL einer 1,4 M STKM-Lösung resuspendiert und 3-malig 10-sekündig auf Eis in ein Ultraschallbad platziert (mit 1-minütigen Pausen auf Eis zwischen den Ultraschallexpositionen). Er wurde anschließend in ein 14 mL Ultrazentrifugenröhrchen überführt. Es wurde ein diskontinuierlicher Saccharose-Gradient erstellt, indem über die 1,4 M Lösung eine 0,25 M STKM-Lösung vorsichtig pipettiert wurde, bis die Röhrchen fast vollständig gefüllt waren. Danach wurden die Proben bei 113 000xg 1 Stunde zentrifugiert. Die Partikel an der Schnittstelle 1,4 M / 0,25 M STKM wurden mit einer Transferpipette aufgenommen und erneut bei 1800xg 20 min zentrifugiert. Der entstandene Rückstand wurde in 1 mL 0,25 M STKM-Puffer aufgenommen und mit „P“ bezeichnet.

2.4.7.3.3 Anreicherung der nukleären Fraktion

In modifizierter Form nach Harford et al. [103] wurde das Homogenisat – nach einer Filtration durch ein 35 µm Nylon-Netz eines Falcon-Röhrchen zur Entfernung noch intakter Zellen – bei 800xg 10 Minuten lang zentrifugiert. Der Rückstand (R1) wurde in 1 mL 0,25 M STKM-Puffer resuspendiert, mit 3 Hüben des Potter-Elvehjem Homogenisators behandelt, und erneut bei 800xg 10 min zentrifugiert. Der entstandene Rückstand (R2) wurde in eine 1,62 M STKM Lösung aufgenommen und in einem 14 mL Ultrazentrifugenröhrchen vorsichtig über 4 mL einer 2,3 M STKM-Lösung pipettiert. Der entstandene diskontinuierliche Saccharose-Gradient wurde anschließend bei 10⁵xg 1 Stunde lang zentrifugiert. Das Sediment wurde in 1,5 mL 0,25 M STKM-Puffer resuspendiert und mit „N“ bezeichnet.

2.4.7.3.4 Anreicherung der Mitochondrien-Fraktion

Adaptiert nach Harford et al. [103] und nach Dimauro et al. [105] wurde das Homogenisat bei 800xg 10 min zentrifugiert. Der Überstand (U1) wurde erneut bei 1000xg 10 min zentrifugiert. Der nun entstandene Überstand (U2) wurde bei 11000xg 10 Minuten lang zentrifugiert. Der Rückstand (R3) wurde in 1 mL des 0,25 M STKM-Puffer aufgenommen, und anschließend erneut bei 11 000xg 10 min zentrifugiert. Der Rückstand (R4) wurde in 1,5 mL Mitochondrien-Medium aufgenommen und mit „M“ bezeichnet.

2.4.7.3.5 Anreicherung der Zytosol-Fraktion

In einer modifizierten Vorschrift von Cox et al. [106] wurde der Überstand nach der 3. Zentrifugation in der Isolation einer mitochondrialen Fraktion (U3) in ein 14 mL Ultrazentrifugenröhrchen gebracht und anschließend eine Stunde lang bei 113000xg zentrifugiert. Der entstandene Überstand (U4) wurde aufbewahrt und mit „C“ bezeichnet.

2.4.8 Proteinbestimmung nach Bradford

Der Proteinanteil der isolierten Fraktionen wurde anhand der von Bradford beschriebenen Coomassie Blau Methode durchgeführt [107]. Nach der Stoschek-Modifizierung [108] wurde die Reaktion in einem alkalischen Milieu durchgeführt und nach Zor et al. [109] wurde der Quotient von den Absorptionen bei 595 nm und bei 465 nm gebildet, da hierdurch eine erhebliche Verbesserung der Linearität erzielt werden konnte. Als Standard wurde bovines Serumalbumin (BSA) verwendet.

2.4.8.1 Verwendete Lösungen

- Bradford-Puffer:
 - 2 mg/mL di-Natriumhydrogenphosphat (Na_2HPO_4), 7 mg/mL Natriumchlorid (NaCl), 0,6 mg/mL Kaliumdihydrogenphosphat (KH_2PO_4), 2 mg/mL Natriumazid (NaN_3), dH_2O
- Bradford Reagenz:
 - 0,1 mg/mL Coomassie Brilliantblau G-250, 0,1 mg/mL 85% Phosphorsäure, 0,0467 mg/mL Ethanol, dH_2O

- Rinderserumalbumin-Standardlösung:
 - 10 mg/mL Rinderserumalbumin, Bradford-Puffer

2.4.8.2 Versuchsdurchführung

Es wurden 50 µL einer Probe mit 900 µL Coomassie Blau Reagenz und 50 µL 1N NaOH-Lösung versetzt. Die Absorptionen wurden nach frühestens 5 min bei 595 nm und 465 nm am Photometer abgelesen. Der Leerwert wurde jeweils aus einer Probe mit Bradford Puffer ermittelt.

Coomassie Blau Reagenz	900 µL
1 N NaOH	50 µL
Probe (Leerwert: Bradford Puffer)	50 µL

2.4.9 Enzymatische und nicht-enzymatische Beurteilung der Fraktionsanreicherung und –reinheit

2.4.9.1 Aktivität des Plasmamembranenzym 5'-Nucleotidase

Die 5'-Nucleotidase ist ein Markerenzym, das sich auf der apikalen Domäne der Plasmamembran befindet. Die Bestimmung erfolgt nach dem Protokoll von Harford et al. [103].

2.4.9.1.1 Verwendete Lösungen

- 5'-Nucleotidase-Puffer, Endkonzentrationen:
 - 90 mM Tris-HCl pH 8,0, 10 mM MgCl₂, 0,5 mg/mL Adenosin-5'-monophosphat (AMP), dH₂O
- Ascorbinsäure-Lösung (AA Lösung), Endkonzentration:
 - 10% (w/v) Ascorbinsäure, dH₂O
- Ammonium-Molybdat-Lösung (AM Lösung), Endkonzentrationen
 - 1 N Schwefelsäure (H₂SO₄), 0,42% (w/v) Ammoniummolybdat (AM), dH₂O
- AA/AM – Lösung
 - 1 Volumen AA-Lösung, 6 Volumina AM-Lösung

2.4.9.1.2 Versuchsdurchführung

In ein Reaktionsgefäß wurden folgende Lösungen pipettiert:

5'-Nucleotidase-Puffer	450 µL
Probe (Leerwert: Aqua dest.)	100 µL

Nach 30-minütiger Inkubation bei 37°C in einem Wasserbad, wurden die Proben auf Eis gesetzt und folgende Lösungen zugesetzt:

TCA 20 %	150 µL
AA/AM	1,5 mL

Nach einer weiteren Inkubation (20 min bei 45°C) wurden die Proben auf Raumtemperatur gebracht. Es wurde anschließend die Absorption bei 750 nm an einem Photometer gemessen.

2.4.9.2 DNA Gehalt als nukleärer Marker (Diphenylamin-Assay)

Der DNA-Gehalt der einzelnen Fraktion, als Ausdruck einer Anwesenheit von Zellkernen, wurde anhand der von Burton etablierten Methode bestimmt [110] mit einer Modifizierung nach Harford et al. [103].

2.4.9.2.1 Verwendete Lösungen

Es wurden folgende Lösungen hergestellt:

- Diphenylamin Reagenz, Endkonzentrationen:
 - 1% (w/v) Diphenylamin, 1 N H₂SO₄, Eisessigsäure
- 20% (w/v) Trichloressigsäure (TCA) in dH₂O
- 10% (w/v) TCA in dH₂O
- 5% (w/v) TCA in dH₂O
- DNA-Standard, Endkonzentrationen:
 - 500 µg/ml DNA, 5% TCA

2.4.9.2.2 Versuchsdurchführung

In ein Versuchsgefäß wurden folgende Lösungen pipettiert:

TCA 20%, eiskalt	300 µL
Probe	300 µL

Nach 10 min auf Eis wurden die Proben 20 min bei 1000xg zentrifugiert. Das Pellet wurde mit 500 µL TCA 10% gewaschen, in 1mL TCA 5% aufgenommen, und in Eppendorf-Reaktionsgefäße überführt. Diese wurden 20 min in ein Wasserbad bei 90°C gestellt.

In einer Mikrozentrifuge wurden die Reaktionsgefäße 2 min bei maximaler Geschwindigkeit zentrifugiert. Es wurden 500 µL des Überstands beziehungsweise der TCA 5% Lösung für die Leerwertprobe wie folgt in ein Eppendorf-Reaktionsgefäß pipettiert:

Überstand Probe (Leerwert: TCA 5%)	500 µL
Diphenylamin Reagenz	1 mL

Zur Erstellung einer Eichgrade wurde eine Verdünnungsreihe des DNA-Standards erstellt, und wie folgt pipettiert:

DNA-Standard Verdünnung	500 µL
Diphenylamin Reagenz	1 mL

Sowohl die Proben aus der Zellfraktionierung als diejenigen aus der Verdünnungsreihe wurden anschließend 10 min in das Wasserbad bei 100°C überführt. Nach dieser Zeit wurden sie auf Raumtemperatur gekühlt, und die Absorption wurde in einem Photometer bei 595 nm gemessen.

2.4.9.3 Aktivität der mitochondrienspezifischen Succinatdehydrogenase (INT-Assay)

Die Succinatdehydrogenase bildet den Komplex II der Atmungskette und somit ein Markerenzym für Mitochondrien. Es wurde das Salz p-Iodonitrotetrazolium-Violett (INT) als endgültiger Elektronenakzeptor eingesetzt. Die bei der Reaktion anfallende Formazanverbindung wurde mittels Ethylacetat und Ethanol ausgefällt.

Der Versuch wurde nach dem Protokoll von Harford et al. [103] durchgeführt mit einer Modifizierung nach Green et al. [111].

2.4.9.3.1 Verwendete Lösungen

- Stopp-Lösung, Endkonzentrationen:
 - 10% (w/v) TCA, 50% (v/v) Ethylacetat, 50% (v/v) Ethanol
- Phosphatpuffer, Endkonzentrationen:
 - 50 mM Na_2HPO_4 , 50 mM KH_2PO_4 pH 7.4, dH_2O
- INT-Lösung, Endkonzentrationen:
 - 2,5 mg/mL INT, Phosphatpuffer
- Succinat-Lösung, Endkonzentrationen:
 - 10 mM Natrium Succinat Hexahydrat, Phosphatpuffer

2.4.9.3.2 Versuchsdurchführung

Folgende Lösungen wurden in ein 2 mL Eppendorf-Reaktionsgefäß pipettiert:

Succinat Lösung	300 μL
Probe (Leerwertprobe: STKM-Puffer)	100-200 μL

Die Reaktionsgefäße wurden anschließend 10 min lang bei 37 °C im Brutschrank inkubiert. Es wurde dann die INT-Lösung zugesetzt:

INT-Lösung	100 μL
------------	-------------------

Die Reaktionsgefäße wurden erneut 20 Minuten lang bei 37°C im Brutschrank inkubiert. Um die Reaktion zu stoppen und die farbige Formazanverbindung auszufällen, wurde die Stopp-Lösung hinzugefügt:

Stopp-Lösung	1 mL
--------------	------

Die Reaktionsgefäße wurden anschließend in einer Mikrozentrifuge 2 Minuten bei 12,800xg zentrifugiert. Die Absorption des Überstandes wurde bei 490 nm gemessen.

2.4.9.4 Aktivität der zytoplasmasspezifischen Laktatdehydrogenase

Die Bestimmung der Aktivität der Laktatdehydrogenase (LDH) erfolgt in leicht modifizierter Form nach Empfehlungen der Société Française de Biologie Clinique (SFBC) [112].

Die LDH katalysiert folgende Reaktion:



Abb 2.3 Reduktion von Pyruvat zu Laktat durch die Laktatdehydrogenase (LDH) mit NADH als Kofaktor.

Da NADH im Gegensatz zu NAD^+ Licht bei 340 nm absorbiert, kann aufgrund der linearen Kinetik der Reaktion die Enzymaktivität ($\mathcal{A}, U/min$) anhand der Extinktionsabnahme pro Minute ($\frac{\Delta A}{\Delta t}, U/min$) determiniert werden.

Nach der SFBC ergibt sich bei 25°C:

$$\mathcal{A}_{LDH} = 6111 \frac{\Delta A}{\Delta t}$$

2.4.9.4.1 Verwendete Lösungen

- Reagenz A, Endkonzentrationen:
 - 80 mM Tris-HCl pH 7,2, 1,6 mM Pyruvat, 200 mM NaCl, dH₂O
- Reagenz B, Endkonzentrationen:
 - 1 mM NADH, dH₂O

2.4.9.4.2 Versuchsdurchführung

Es wurden folgende Lösungen in Eppendorf-Reaktionsgefäße pipettiert:

Reagenz A	1 mL
Probe	33,3 µL

Kurz vor der Messung wurde NADH dem Reaktionsgemisch zugesetzt:

Reagenz B	0,25 mL
-----------	---------

Nach 30 Sekunden wurden über 2 Minuten alle 30 Sekunden die Absorption bei 340 nm gemessen. Zur Bestimmung von \mathcal{A}_{LDH} wurde der Mittelwert der 4 sukzessiven Messungen pro Zeiteinheit ($\frac{\Delta A}{\Delta t}$) gebildet.

2.4.10 Bestimmung des Farbstoffgehaltes der Fraktionen

Der Farbstoffgehalt der isolierten Fraktionen wurde photometrisch gemessen. Es wurden folgende Lösungen in ein Eppendorf-Reaktionsgefäße pipettiert:

2% Triton X100	900 µL
Probe (Leerwertprobe: 2% Triton)	100 µL

Zur Bestimmung des Absorptionsspektrums der Farbstoffe und zur Kalibrierung wurde eine Verdünnungsreihe erstellt. Der Farbstoff wurde hierbei einerseits in HBSS, andererseits in Zellhomogenisat gelöst, um Einflüsse des Milieus zu erfassen.

Es konnte festgestellt werden, dass TB und MB im Homogenisat deutlich höhere Absorptionen aufwiesen als in HBSS. Abb 2.4 zeigt beispielsweise die Absorptionsspektren von TB in HBSS und im Homogenisat.

Es wurden dementsprechend Verdünnungsreihen des Farbstoffes in A549 und L929 Homogenisat hergestellt, diese wurden ebenfalls in 2% Triton X100 Lösung gemessen.

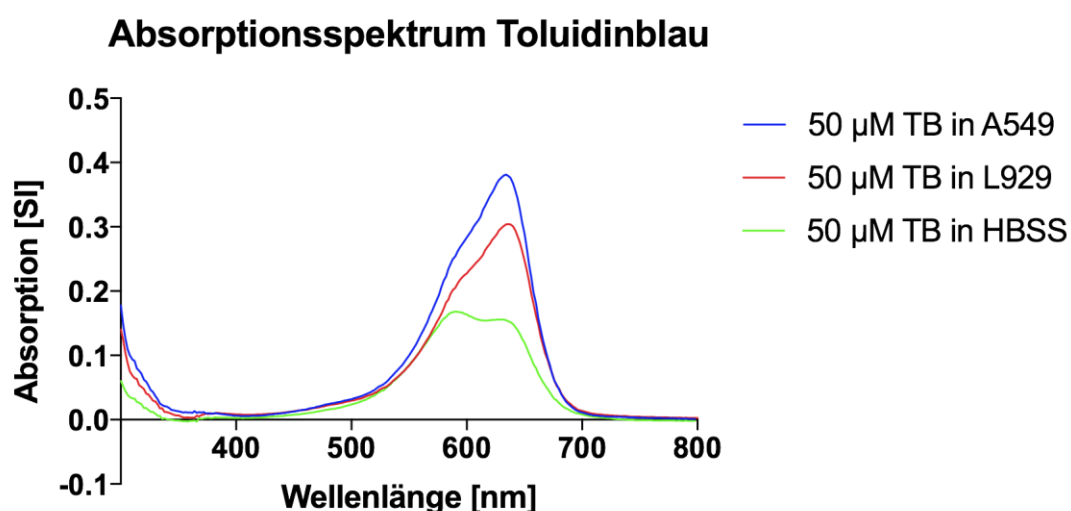


Abb 2.4 Absorptionsspektrum von Toluidinblau in HBSS und im Homogenisat. Dargestellt sind die Absorptionsspektren von Toluidinblau in HBSS Puffer einerseits und in zellhaltigem Milieu in Form von A549 und L929 Homogenisat. Zur Herstellung des

Homogenisats wurden A549 Zellen bzw L929 Zellen mit 50µM der Farbstofflösung inkubiert, abgelöst, zentrifugiert und in hypoosmolarem Puffer mechanisch homogenisiert. Im Anschluss wurden 100 µL Homogenisat (bzw. 100 µL der HBSS gelösten Farbstofflösung) mit 900 µL Triton X100 2% versetzt und ein Absorptionsspektrum am Photometer erstellt.

2.5 Statistische Auswertemethoden

Es wurde bei wiederholten Versuchen eine beschreibende Statistik mit Angabe von Mittelwert und Standardfehler durchgeführt. Zur Beurteilung, ob die Verteilung der gemessenen Daten einer Normalverteilung entsprach, wurde der Kolmogorov-Smirnov Normalitätstest durchgeführt. Bei normalverteilten Stichproben wurde zur Beurteilung der statistischen Signifikanz bei dem Vergleich von zwei Gruppen der ungepaarte t-test durchgeführt. Bei mehr als zwei Gruppen wurde eine Varianzanalyse (ANOVA) durchgeführt, gefolgt von Dunnett's post-hoc Test. Bei nicht-normalverteilten Datensätzen (Zellgröße in der holographischen Mikroskopie) wurde der nicht-parametrische Mann-Whitney-U Test (bzw. der Kruskal-Wallis Test beim Vergleich von mehr als zwei Gruppen) angewendet. Für die Erstellung der Konzentrations-Wirkungs-Kurven wurde eine Kurvenanpassung (GraphPad Prism 7, Methode der kleinsten Quadrate) durchgeführt, der Vergleich der resultierenden IC₅₀ Werten erfolgte mit dem *extra-sums-of-squares F-test*. Eine statistische Signifikanz wurde angenommen für $p \leq 0,05$. Zur Unterscheidung von Signifikanzstufen wurden folgende Abkürzungen verwendet:

* : $0,01 < p < 0,05$; ** : $0,001 < p \leq 0,01$; *** : $p \leq 0,001$

beziehungsweise bei mehreren gleichzeitigen Darstellungen auch

: $0,01 < p < 0,05$; ## : $0,001 < p \leq 0,01$; ### : $p \leq 0,001$

und

& : $0,01 < p < 0,05$; && : $0,001 < p \leq 0,01$; &&& : $p \leq 0,001$

3 Ergebnisse

3.1 Morphologische Veränderungen unter Farbstoffeinfluss

Nach 20-stündiger Farbstoffexposition stellte man am Holomonitor eine generalisierte Zellschwellung fest, sowohl qualitativ auf den digital produzierten Bildern als auch quantitativ anhand einer signifikanten Zunahme der gemessenen Zellgröße in farbstoffexponierten Zellen. Dabei führten beide Farbstoffe zu einer signifikant vermehrten Zellschwellung im Vergleich zu Kontrollen und TB führte in einer Dosierung von 500 μM zu einer signifikant stärkeren Zunahme der Zellgröße als MB in derselben Dosierung.

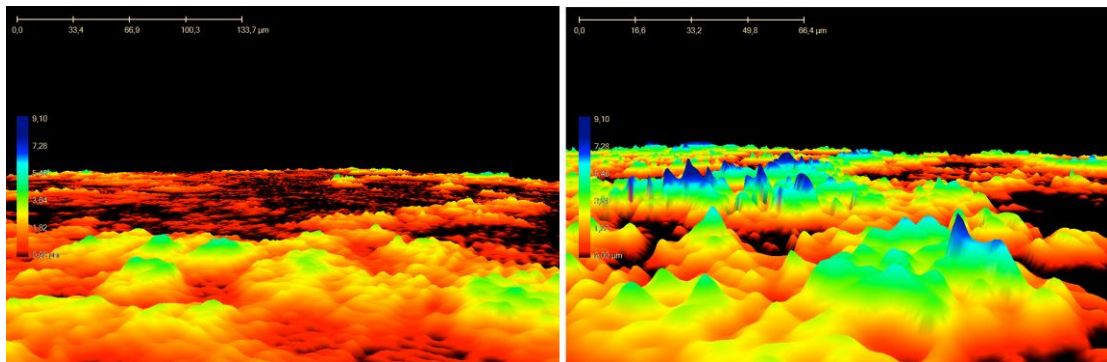


Abb 3.1 Digital rekonstruierte Bilder von Kontroll- und Toluidinblauexponierten L929 Zellen aus holographischer Mikroskopie: Links: Kontrollzellen, nach 20-stündiger Exposition mit reinem HBSS. Rechts: Zellen nach 20-stündiger Exposition mit 50 μM Toluidinblau gelöst in HBSS.

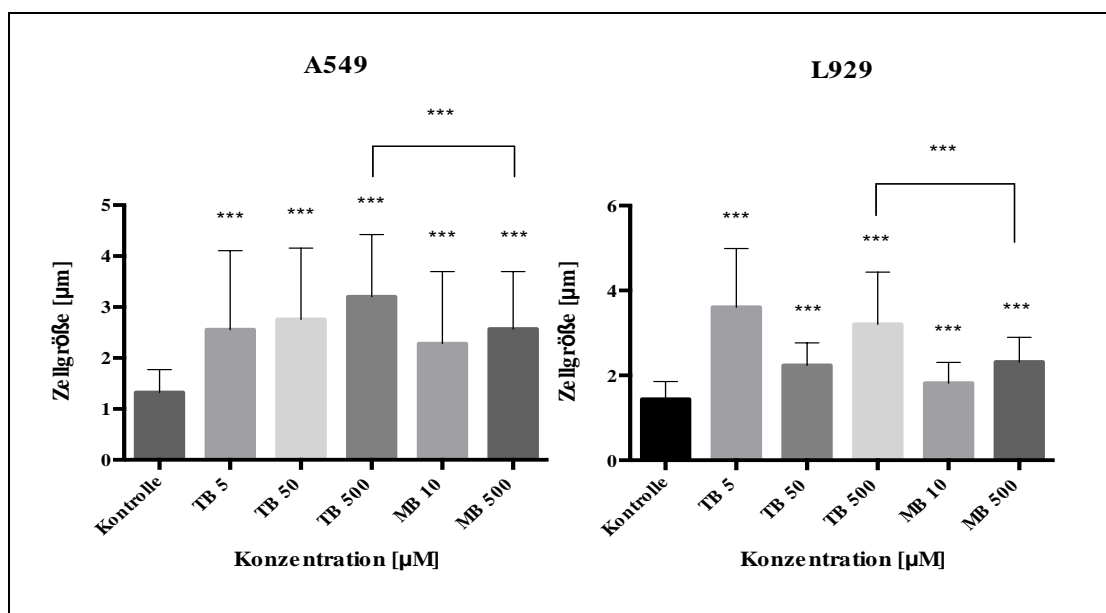


Abb 3.2 Größenzunahme von A549 und L929 Zellen nach Phenothiazin Farbstoffexposition: Holographische Messung der Zellerhabenheit. Man erkennt eine signifikante Zellschwellung in beiden Zelllinien bei allen eingesetzten Konzentrationen.

Dargestellt sind die Mittelwerte der Zellgrößen von über 500 Zellen im Rahmen eines Versuchs (20-stündige Methylenblau (MB) und Toluidinblau (TB) Exposition).

3.2 Metabolische Toxizität der Farbstoffe

3.2.1 Zelluläre Toxizität

Die zelluläre Toxizität wurde anhand des XTT-Tests gemessen. In A549 Zellen zeigte sich nach 2-stündiger Inkubation ab 300 μM MB oder TB eine signifikante Abnahme der Zellvitalität. IK hatte keinen signifikanten Einfluss auf die Vitalität in A549 Zellen. In L929 Zellen zeigte MB bei allen gemessenen Konzentrationen keinen signifikanten Effekt bezüglich der Vitalität. TB hingegen führte ab einer Konzentration von 300 μM zu einer signifikanten zellulären Toxizität, zudem erreichte hier der Unterschied zwischen MB und TB in L929 Zellen eine statistische Signifikanz. IK bot lediglich in der höchsten gemessenen Konzentration (500 μM) eine signifikante Reduktion der Zellvitalität in L929 Zellen. Nach Inkubationen mit Triton X100 als Positivkontrolle zeigten sich praktisch keine vitalen Zellen mehr.

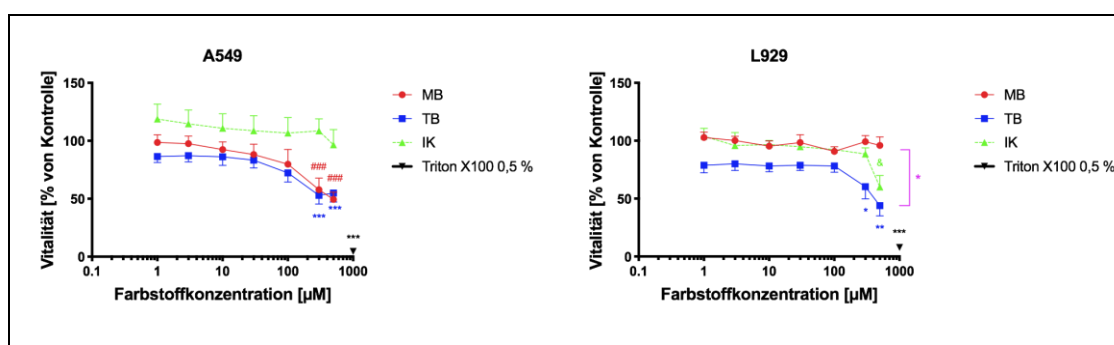


Abb 3.3 Zellvitalität nach 2-stündiger Farbstoffexposition in A549 und L929 Zellen. Zellvitalität gemessen anhand des XTT Tests in A549 und L929 Zellen, nach 2-stündiger Inkubation mit Methylenblau (MB), Toluidinblau (TB), Indigokarmin (IK), Triton X100 0,5% (Positivkontrolle) oder HBSS (Negativkontrolle). In A549 Zellen: signifikante Abnahme der Zellvitalität ab 300 μM MB oder TB. In L929 Zellen: signifikante Abnahme der Zellvitalität ab 300 μM TB bzw. bei 500 μM IK und signifikante Vitalitätsabnahme bei TB im Vergleich zu MB bei 300 μM ($p=0,0348$) und 500 μM ($p=0,0185$, dargestellt in lila). Dargestellt sind die Mittelwerte des prozentualen XTT Anteils in Bezug auf die Negativkontrolle \pm Standardfehler (SEM), aus mindestens 3 unabhängigen Versuchen.

3.2.2 Einfluss der Farbstoffe auf den Energiehaushalt der Zellen

Es wurde der ATP-Gehalt in A549 und L929 Zellen nach zweistündiger Farbstoffexposition gemessen.

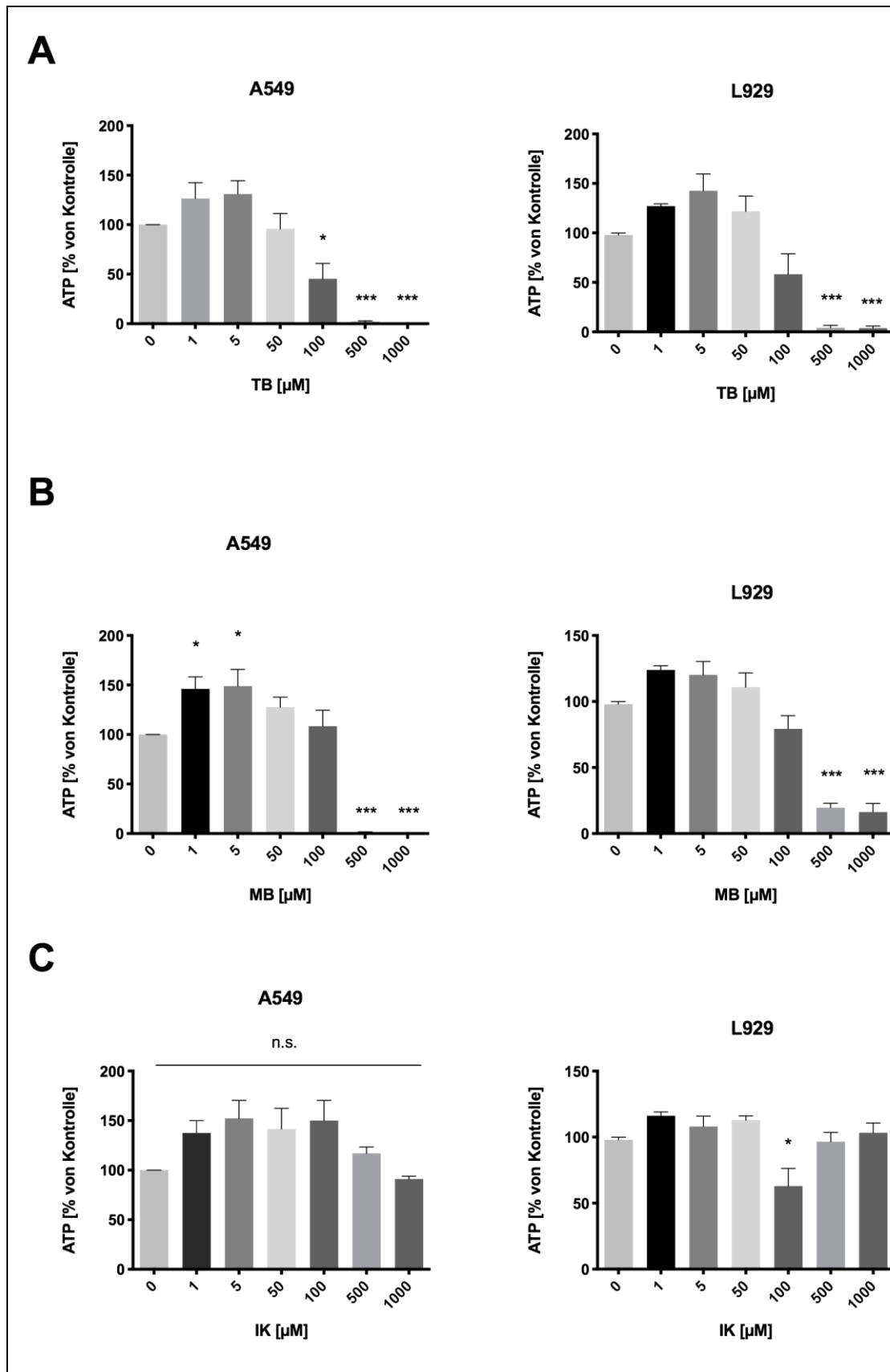


Abb 3.4 Adenosintriphosphat (ATP) Gehalt von Farbstoffexponierten A549 und L929 Zellen. Luminometrische Messung anhand der Luciferin/Luciferase Reaktion der intrazellulären ATP Konzentration in Farbstoffexponierten und Kontrollzellen (Farbstoffkonzentration 0 µM) der Linien A549 und L929. A: Toluidinblau (TB) Exposition.

Signifikante Abnahme der ATP-Konzentration ab einer TB-Konzentration von 100 μM in A549 Zellen, ab 500 μM in L929 Zellen, jeweils im Vergleich zur Kontrolle. B: Methylenblau (MB) Exposition. Signifikante Zunahme des ATP-Gehalts in A549 Zellen, die mit 1 μM und 5 μM MB exponiert wurden. Im Vergleich zur Kontrolle signifikante Abnahme der ATP-Konzentration bei MB-Konzentrationen von 500 und 1000 μM . C: Indigokarmin (IK) Exposition. Nicht signifikante ATP-Variationen bei IK-Exposition im Vergleich zur Kontrolle (Ausnahme: 100 μM IK exponierte L929 Zellen). Dargestellt sind die Mittelwerte des prozentualen ATP Anteils in Bezug auf die Kontrolle (HBSS) \pm Standardfehler (SEM), aus mindestens 3 unabhängigen Versuchen

Es zeigte sich in beiden Zelllinien bei hoher Dosis von MB und TB (ab 500 μM) ein Abfall des intrazellulären ATP-Gehaltes. Bei TB exponierten A549 Zellen war dieser Effekt bereits bei 100 μM zu beobachten. Bei niedriger Dosis (1 und 5 μM) konnte zum Teil ein geringer Anstieg der intrazellulären ATP-Konzentration festgestellt werden. Signifikant war der Anstieg lediglich im Falle von MB-exponierten A549 Zellen.

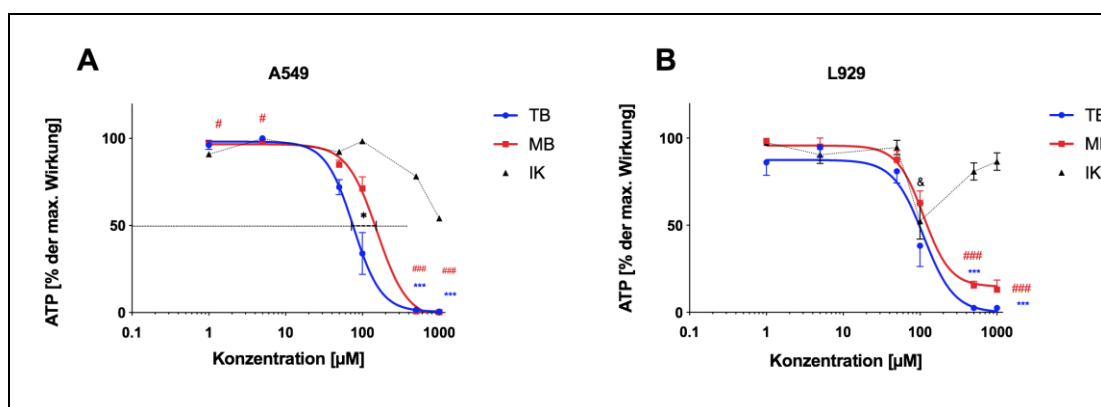


Abb 3.5 Konzentrations-Wirkungs-Kurven von Toluidinblau und Methylenblau für die Abnahme des Adenosintriphosphat Gehalts in A549 und L929 Zellen. A: Exposition von A549 Zellen für 2 Stunden mit Methylenblau (MB), Toluidinblau (TB) und Indigokarmin (IK), $\text{IC}_{50}(\text{TB}) = 76$ (CI [63;130]; $R^2 = 0,92$); $\text{MB: IC}_{50}(\text{MB}) = 155$ (CI [108;436]; $R^2 = 0,90$); In A549 Zellen Signifikanter Unterschied zwischen $\text{IC}_{50}(\text{TB})$ und $\text{IC}_{50}(\text{MB})$ ($p = 0,016$). B: Exposition von L929 Zellen für 2 Stunden mit MB, TB und IK, $\text{IC}_{50}(\text{TB}) = 90$; (CI [73;148]; $R^2 = 0,94$); $\text{IC}_{50}(\text{MB}) = 117$ (CI [92-276]; $R^2 = 0,94$). In L929 Zellen kein signifikanter Unterschied zwischen den IC_{50} Werten. Für IK war keine plausible Konzentrations-Wirkungs-Kurve zu erstellen. Die Konzentration, die eine Reduktion von 50% des ATP Gehalts im Vergleich zur Kontrolle bewirkte (IC_{50}), wurde anhand einer Kurvenanpassung mit der Methode der kleinsten Quadrate ermittelt. Ein Vergleich der IC_{50} zwischen den einzelnen Farbstoffen wurde mit dem *extra-sums-of-squares F-test* durchgeführt. Der Determinationskoeffizient R^2 diente der Beurteilung der Anpassungsgüte. CI: Konfidenzintervall. Dargestellt sind die Mittelwerte \pm Standardfehler (SEM) des prozentualen Anteils am maximalen ATP-Gehalt aus mindestens 3 unabhängigen Versuchen.

In A549 Zellen war der IC_{50} Wert für den ATP-Abfall in TB-exponierten Zellen signifikant niedriger im Vergleich zu MB-exponierten Zellen (76 vs. 155; $p = 0,016$). TB war demnach toxischer als MB in Bezug auf den ATP Verlust in A549 Zellen. In L929 Zellen ließ sich kein signifikanter Unterschied in den IC_{50} Werten von TB und MB nachweisen. Für IK ließ sich im untersuchten

Konzentrationsbereich keine Konzentrations-Wirkungs-Kurve zur Zytotoxizität erstellen.

3.2.3 Mitochondriale Depolarisation nach Farbstoffexposition

3.2.3.1 Einfluss einer 75-min Farbstoffexposition auf das mitochondriale Membranpotenzial

Zur weiteren Charakterisierung der metabolischen Effekte von TB und MB wurde die Wirkung kurzzeitiger Farbstoffexpositionen auf die Kenngrösse $\Delta\psi_m$ untersucht.

In allen untersuchten Zelllinien, insbesondere auch in den HL-1 Kardiomyozyten zeigte sich nach 75-min Behandlung ab einer 100 μM TB Lösung ein Zusammenbruch des $\Delta\psi_m$ im Sinne einer signifikanten Abnahme des Rot/Grün-Quotients der Farbstoff-exponierten Zellen im Vergleich zu Kontrollzellen. In A549, L929 und HepG2 Zellen war dieser Effekt bereits bei einer Exposition von 50 μM TB zu beobachten.

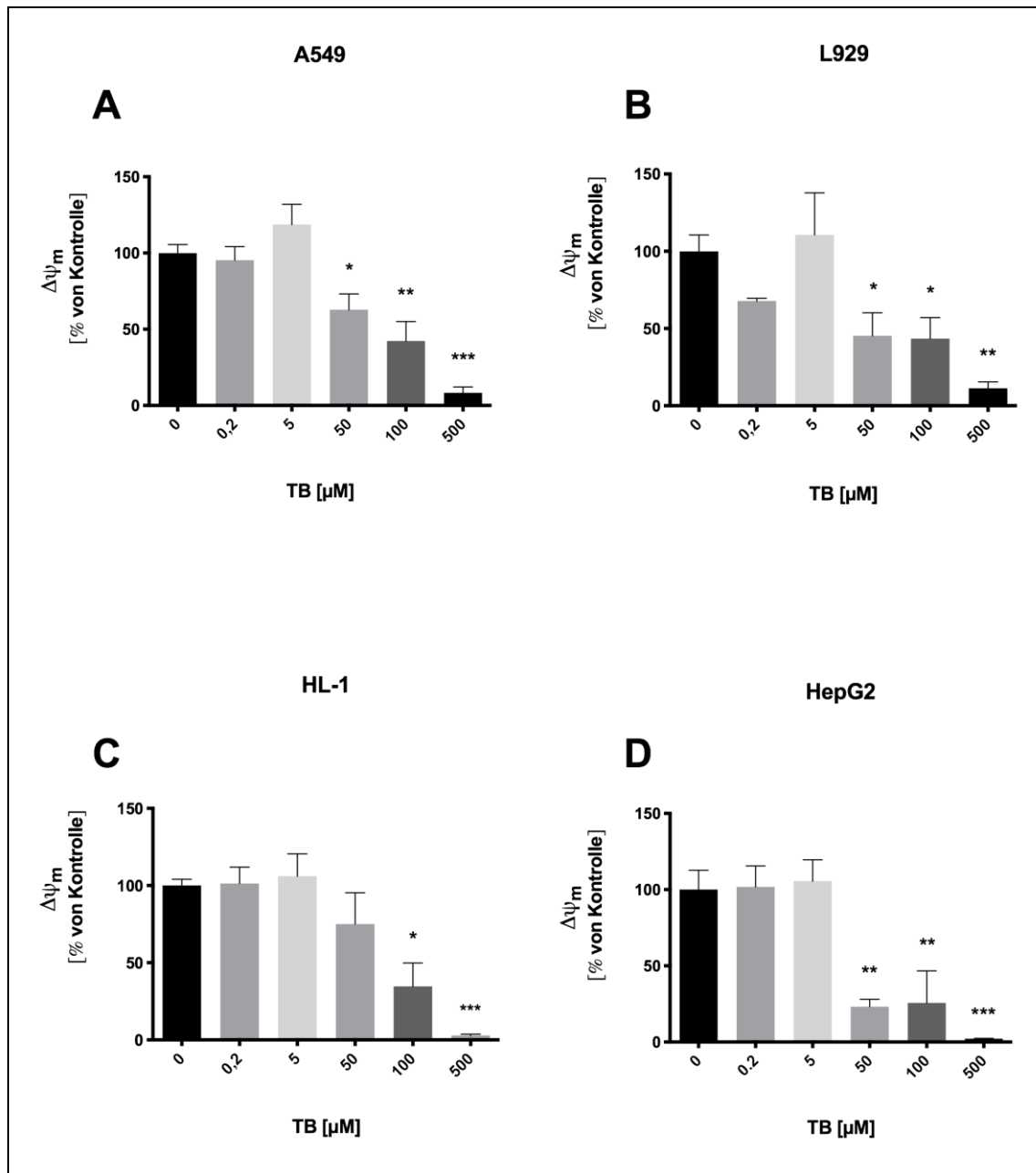


Abb 3.6 Mitochondriale Depolarisation von A549, L929 und HepG2 nach 75-minütiger Toluidinblauexposition. In A549, L929 und HepG2 Zellen signifikante Reduktion des mitochondrialen Membranpotenzials ($\Delta\psi_m$) ab einer TB-Exposition von 50 μM für 75 Minuten (A, B und D), bzw. ab 100 μM in HL-1 Zellen (C). TB: Toluidinblau. Dargestellt sind die prozentualen Mittelwerte des $\Delta\psi_m$ in Bezug auf die Kontrolle \pm Standardfehler (SEM), aus mindestens 3 unabhängigen Versuchen.

Es wurde ebenfalls die Wirkung einer 75-min MB-Exposition in A549, L929 und HepG2 Zellen untersucht (Abb 3.7). Nach 75 min MB-Exposition zeigte sich in A549 Zellen eine signifikante Depolarisation der Mitochondrien aufwärts einer MB-Konzentration von 50 μM . In L929 zeigte sich bei der höchsten gemessenen Konzentration (500 μM) ein signifikanter Abfall des $\Delta\psi_m$. In HepG2 Zellen

zeigten sich lediglich nicht-signifikante Variationen im $\Delta\psi_m$ bei den unterschiedlichen MB-Konzentrationen.

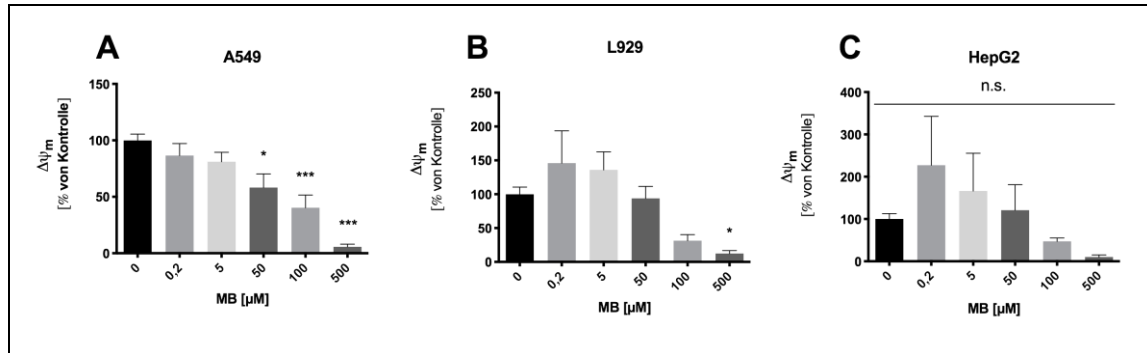


Abb 3.7 Mitochondriales Membranpotenzial in A549, L929 und HepG2 Zellen nach 75-minütiger Methylenblau Exposition. In A549 Zellen signifikante Reduktion des mitochondrialen Membranpotenzials ($\Delta\psi_m$) ab einer MB-Exposition von 50 μ M für 75 Minuten (A); in L929 bei 500 μ M (B), in HepG2 (C) nicht signifikante Fluktuationen des $\Delta\psi_m$ bei einer 75-minütigen MB-Exposition. MB: Methylenblau. Dargestellt sind die prozentualen Mittelwerte \pm Standardfehler (SEM) des $\Delta\psi_m$ in Bezug auf die Kontrolle aus mindestens 3 unabhängigen Versuchen.

Nach 75-minütiger IK-Exposition unterschiedlicher Konzentrationen (Abb 3.8), wurden weder in A549 noch in L929 signifikante Variationen des $\Delta\psi_m$ gemessen. In HepG2 Zellen konnte eine signifikante Abnahme des Potenzials bei einer Konzentration von 500 μ M festgestellt werden. Bei den Promethazin-Expositionen konnte in A549 und HepG2 kein signifikanter Effekt auf das $\Delta\psi_m$ beobachtet werden (Abb 3.9). Es zeigte sich lediglich bei einer 50 μ M Promethazin Exposition in L929 ein signifikant höherer Anteil an Zellen mit intaktem $\Delta\psi_m$ im Vergleich zur Kontrolle.

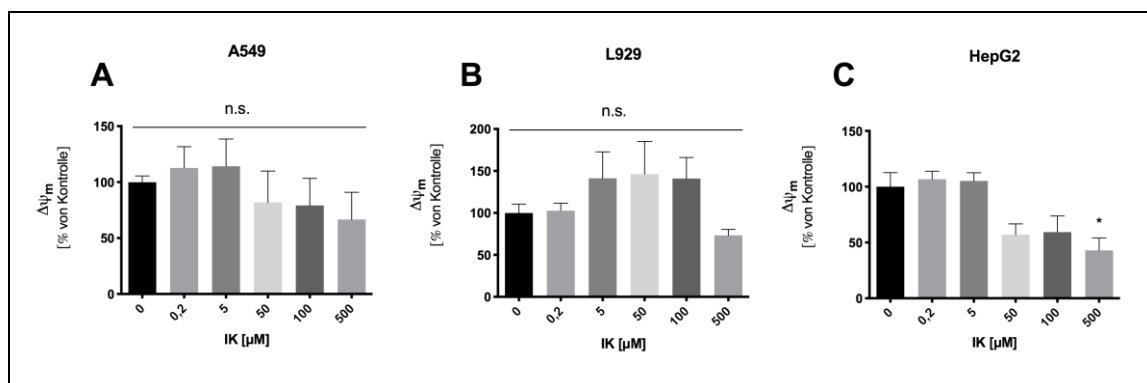


Abb 3.8 Mitochondriales Membranpotenzial in A549, L929 und HepG2 Zellen nach 75-minütiger Indigokarmin Exposition. In A549 und L929 (A und B) nicht signifikante Fluktuationen des mitochondrialen Membranpotenzials ($\Delta\psi_m$) bei einer 75-minütigen Indigokarmin Exposition. In HepG2 Zellen (C) signifikante Abnahme des $\Delta\psi_m$ bei einer

Indigokarminkonzentration von 500 μM . IK: Indigokarmin. Dargestellt sind die prozentualen Mittelwerte \pm Standardfehler (SEM) des $\Delta\psi_m$ in Bezug auf die Kontrolle aus mindestens 3 unabhängigen Versuchen.

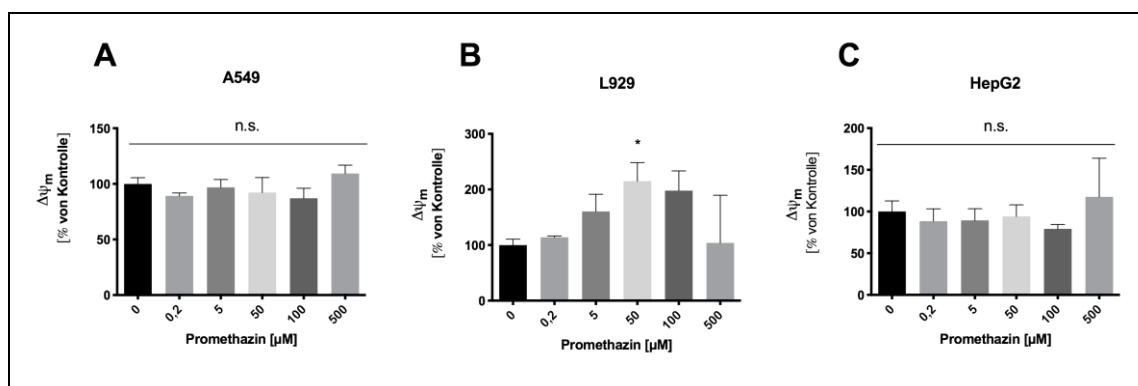


Abb 3.9 Mitochondriales Membranpotenzial in A549, L929 und HepG2 Zellen nach 75-minütiger Promethazin Exposition. In A549 und HepG2 (A und C) nicht signifikante Fluktuationen des mitochondrialen Membranpotenzials ($\Delta\psi_m$) bei einer 75-minütigen Promethazin Exposition. In L929 Zellen (B) signifikant höheres mitochondriale Membranpotenzial bei einer Promethazinkonzentration von 50 μM . Dargestellt sind die prozentualen Mittelwerte des $\Delta\psi_m$ in Bezug auf die Kontrolle \pm Standardfehler (SEM), aus mindestens 3 unabhängigen Versuchen.

3.2.3.2 Einfluss einer vierstündigen Farbstoffexposition auf das mitochondriale Membranpotenzial

Es wurde anschließend die Wirkung einer vierstündigen Farbstoff-Exposition auf die Zellreihen A549, L929 und HepG2 untersucht.

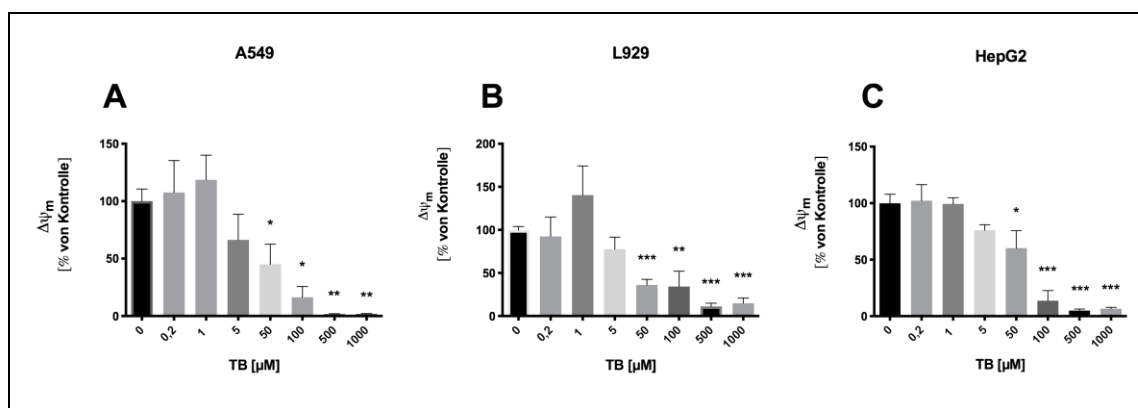


Abb 3.10 Mitochondriales Membranpotenzial von A549, L929 und HepG2 Zellen nach vierstündiger Toluidinblau Exposition. Signifikante Reduktion des mitochondrialen Membranpotenzials ($\Delta\psi_m$) ab einer TB-Konzentration von 50 μM in allen Zelllinien. TB: Toluidinblau. Dargestellt sind die prozentualen Mittelwerte des $\Delta\psi_m$ in Bezug auf die Kontrolle \pm Standardfehler (SEM), aus mindestens 3 unabhängigen Versuchen.

In allen untersuchten Zelllinien konnte man eine signifikante mitochondriale Depolarisation ab einer TB-Konzentration von 50 μM feststellen. In A549 und L929 Zellen zeigte sich bei niedrigen TB-Konzentration (0,2 - 1 μM) eine nicht-signifikante Tendenz zu höheren Anteilen an Zellen mit intaktem $\Delta\psi_m$.

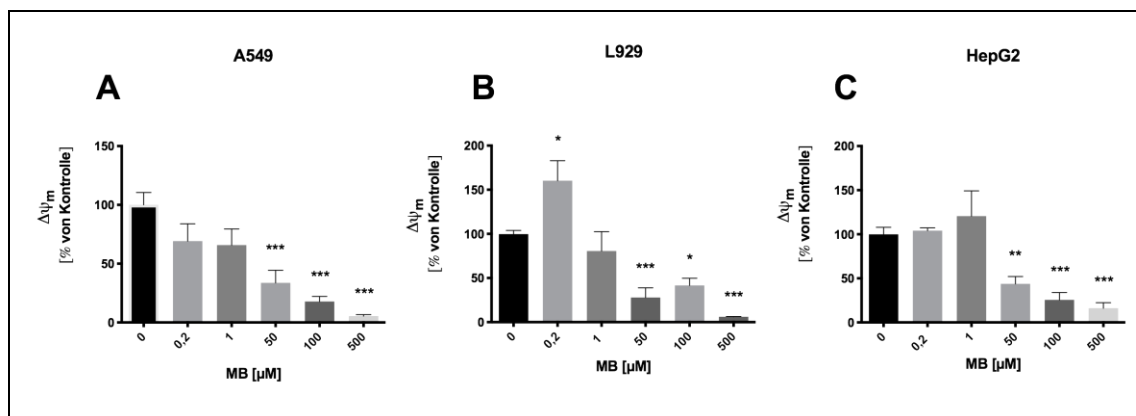


Abb 3.11 Mitochondriales Membranpotenzial von A549, L929 und HepG2 Zellen nach vierstündiger Methylenblau Exposition. Signifikante Reduktion des mitochondrialen Membranpotenzials ($\Delta\psi_m$) ab einer MB-Konzentration von 50 μM in allen Zelllinien. In L929 Zellen (B) signifikant höheres mitochondriales Membranpotenzial bei einer MB-Konzentration von 0,2 μM . MB: Methylenblau. Dargestellt sind die prozentualen Mittelwerte \pm Standardfehler (SEM) des $\Delta\psi_m$ in Bezug auf die Kontrolle aus mindestens 3 unabhängigen Versuchen.

In allen untersuchten Zelllinien konnte man eine signifikante mitochondriale Depolarisation ab einer MB-Konzentration von 50 μM feststellen. Im Gegensatz hierzu ließ sich in L929 Zellen bei einer TB-Konzentration von 0,2 μM eine signifikante Zunahme des Rot/Grün-Quotienten im Vergleich zu Kontrollzellen messen im Sinne eines höheren Anteils von Mitochondrien mit intaktem $\Delta\psi_m$.

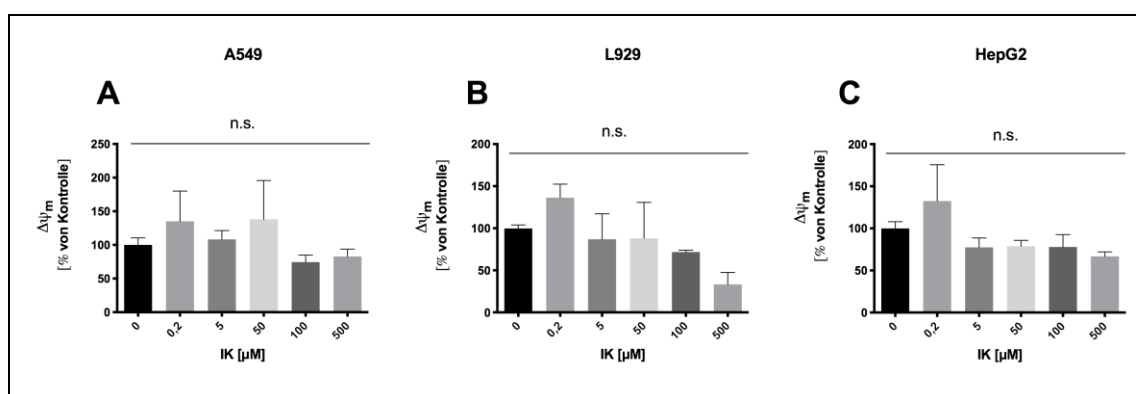


Abb 3.12 Mitochondriales Membranpotenzial von A549, L929 und HepG2 Zellen nach vierstündiger Indigokarmin Exposition. In A549, L929 und HepG2 (A, B und C) nicht signifikante Fluktuationen des mitochondrialen Membranpotenzials ($\Delta\psi_m$) bei einer 75-minütigen IK Exposition. IK: Indigokarmin. Dargestellt sind die prozentualen Mittelwerte \pm Standardfehler (SEM) des $\Delta\psi_m$ in Bezug auf die Kontrolle aus mindestens 3 unabhängigen Versuchen.

In keiner der untersuchten Zelllinien konnte eine signifikante mitochondriale Depolarisation nach vierstündiger IK-Exposition nachgewiesen werden.

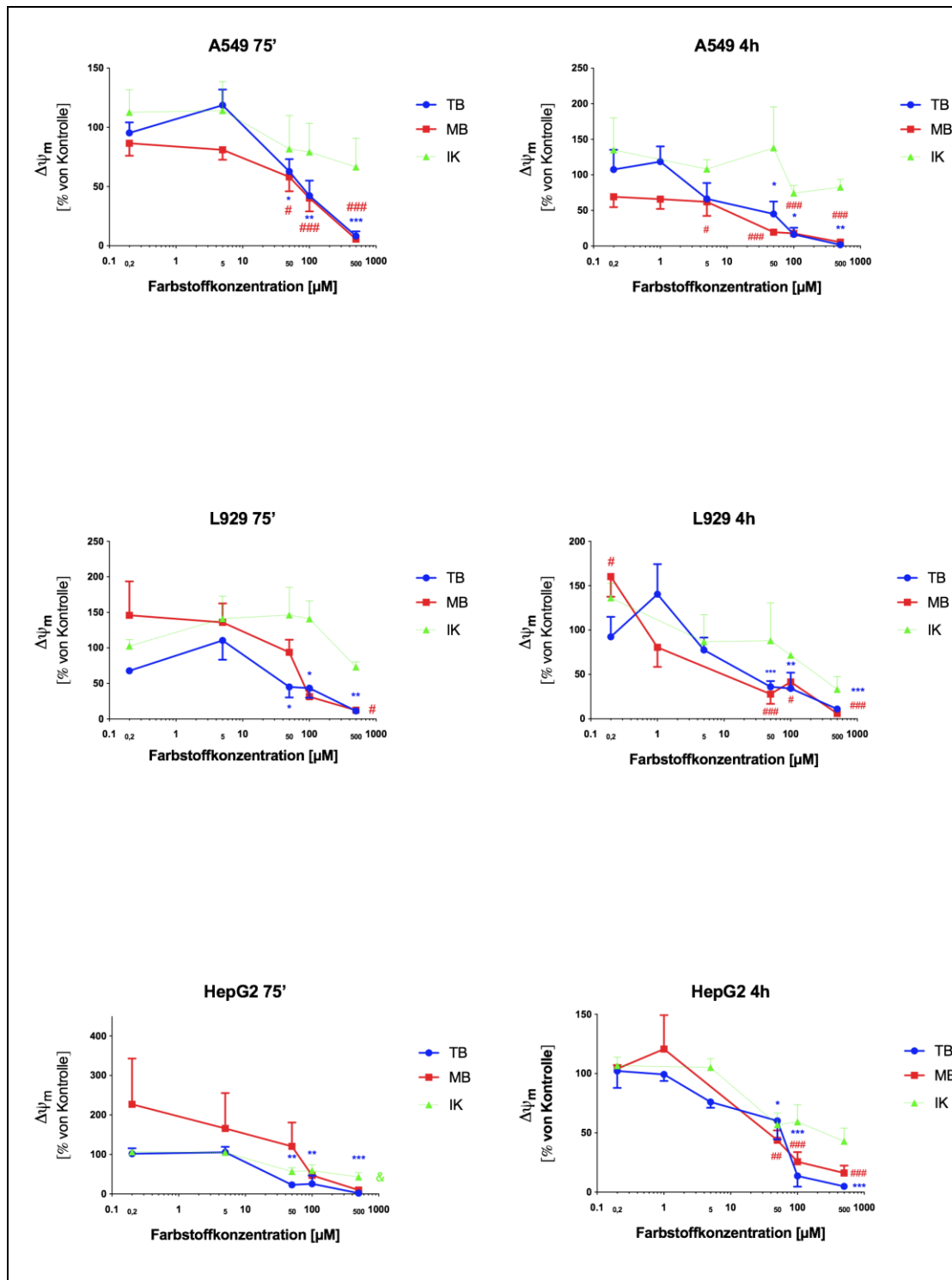


Abb 3.13 Vergleich der Wirkung von Methyleneblau, Toluidinblau und Indigokarmin auf das mitochondriale Membranpotenzial. MB: Methyleneblau, TB: Toluidinblau, IK: Indigokarmin. Dargestellt sind die prozentuale Mittelwerte des mitochondrialen Membranpotenzials ($\Delta\psi_m$) in Bezug auf die Kontrolle \pm Standardfehler (SEM), aus mindestens 3 unabhängigen Versuchen.

Beim Vergleich von MB und TB fiel auf, dass beide Farbstoffe nach 4 Stunden bei Konzentrationen über 50 μM eine Abnahme von $\Delta\psi_m$ bewirkten. In L929 und HepG2 Zellen war dieser Effekt bei TB bereits nach 75 Minuten zu beobachten, im Gegensatz zu MB. L929 Zellen wiesen bei niedrigen MB-Konzentrationen nach 4 Stunden ein signifikant höheres $\Delta\psi_m$ auf als Kontrollzellen, dieser Effekt erreichte bei TB keine Signifikanz. IK zeigte keinen statistisch signifikanten Einfluss auf $\Delta\psi_m$.

Tab 3.1. zeigt die per Kurvenanpassung errechneten relativen IC_{50} - Konzentrationen bei denen eine 50% Reduktion des mittleren $\Delta\psi_m$ auftraten. In den jeweiligen Zelllinien zeigten sich keine signifikanten Unterschiede zwischen MB und TB, in A549 Zellen konnte ein nicht-signifikanter Trend zu niedrigeren IC_{50} für TB im Vergleich zu MB festgestellt werden. Für IK konnte keine sigmoide Konzentrations-Wirkungs-Kurve erstellt werden, da IK auch in hohen Konzentrationsbereichen nur minimale Auswirkungen auf $\Delta\psi_m$ aufwies. Eine Ausnahme hierfür stellten IK exponierte HepG2 Zellen nach 75 Minuten, hier konnte ein IC_{50} Wert von 24 μM berechnet werden. Wie in Abb 3.8 aufgeführt, konnte eine signifikante Abnahme des mitochondrialen Membranpotenzials bei 500 μM IK beobachtet werden, diese Toxizität ließ sich jedoch nicht nach 4-stündiger Exposition bestätigen.

IC ₅₀ für die $\Delta\psi_m$ Reduktion nach 75' Exposition [μM]				
	A549	L929	HepG2	HL-1
MB	121 \pm 4 (R ² = 0,81)	59 \pm 1 (R ² = 0,68)	n.m.	n.d.
TB	63 \pm 1 (R ² = 0,83)	62 \pm 2 (R ² = 0,53)	26 \pm 2 (R ² = 0,81)	73 \pm 1 (R ² = 0,80)
IK	n.m.	n.m.	24 \pm 2 (R ² = 0,75)	n.d.
IC ₅₀ für die $\Delta\psi_m$ Reduktion nach 4h Exposition [μM]				
	A549	L929	HepG2	HL-1
MB	46 \pm 2 (R ² = 0,60)	n.m.	32 \pm 2 (R ² = 0,72)	n.d.
TB	21 \pm 5 (R ² = 0,57)	14 \pm 4 (R ² = 0,65)	51 \pm 1 (R ² = 0,78)	n.d.
IK	n.m.	n.m.	n.m.	n.d.

Tab 3.1 IC₅₀ in Bezug auf die Reduktion des mitochondrialen Membranpotenzials. Es zeigten sich keine signifikanten Unterschiede zwischen den Farbstoffen, Toluidinblau (TB) zeigte einen Trend zu niedrigeren IC_{50} Werten im Vergleich zu Methylenblau (MB) und Indigokarmin (IK) in A549 Zellen. Die IC_{50} Werte wurden durch eine Kurvenanpassung anhand der Methode der kleinsten Quadrate errechnet. Ein Vergleich der IC_{50} zwischen den einzelnen Farbstoffen wurde mit dem *extra-sums-of-squares F-test* durchgeführt. n.m. : nicht quantifizierbar (es zeigte sich im untersuchten Konzentrationsbereich keine konvergente Konzentrations-Wirkungs

Beziehung, für die eine Kurvenanpassung möglich war). n.d.; nicht durchgeführt. Der Korrelationskoeffizient R^2 diente der Beurteilung der Anpassungsgüte. Dargestellt sind die Konzentrationen die eine relative 50% Reduktion des mittleren mitochondrialen Membranpotenzials ($\Delta\psi_m$) verursachten (IC_{50}) \pm Standardfehler (SEM), aus mindestens 3 unabhängigen Versuchen.

3.3 Oxidativer Stress nach Farbstoffexposition

3.3.1 Fluoreszenz-basierte Messung des oxidativen Stresses

Es wurde der Gehalt an reaktiven Sauerstoffspezies in den Zellen nach Farbstoffexposition fluorimetrisch am Durchflusszytometer gemessen.

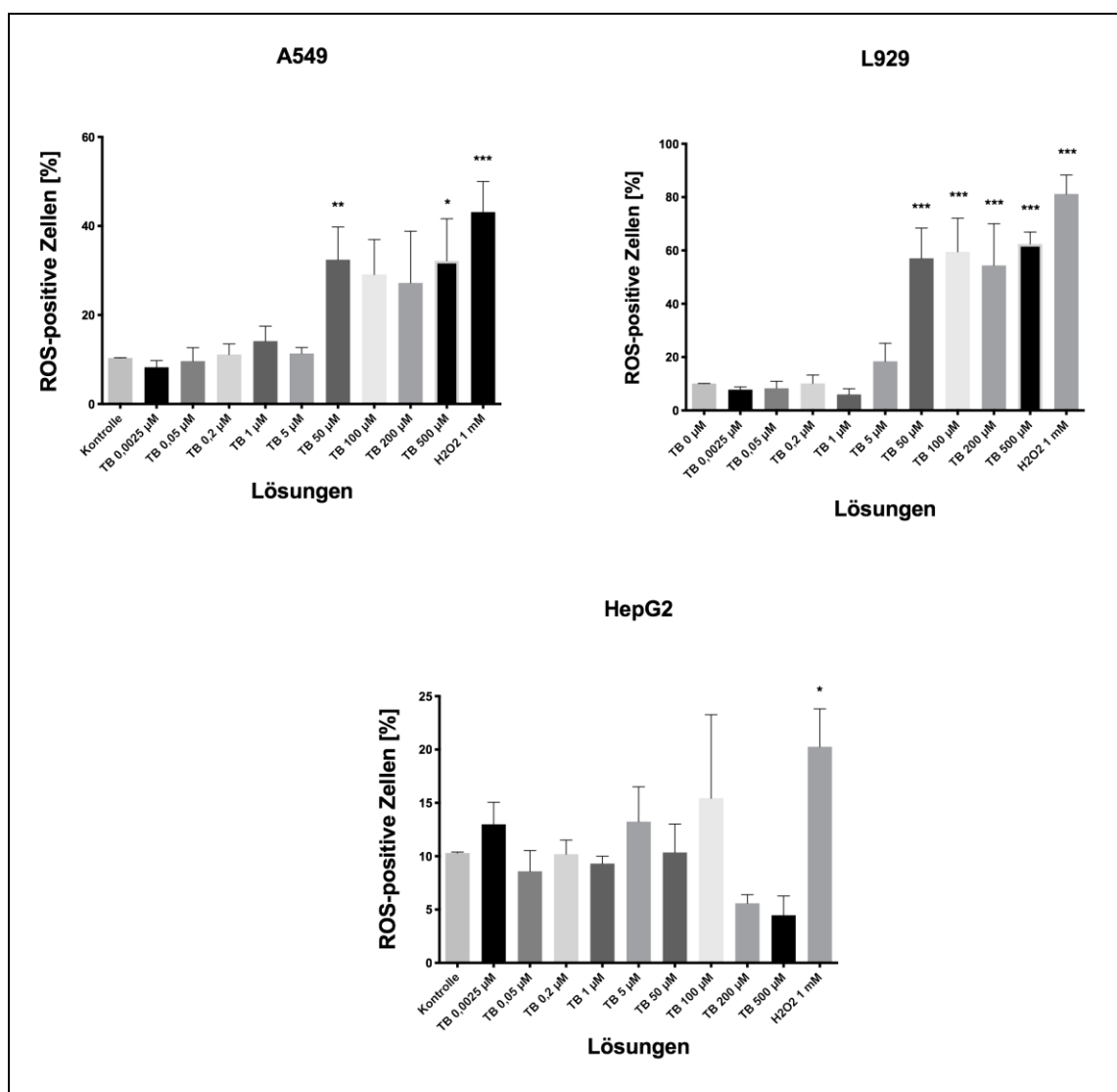


Abb 3.14 Reaktive Sauerstoffspezies Produktion in A549, L929 und HepG2 Zellen nach Toluidinblauexposition. Durchflusszytometrische Messung von reaktiven Sauerstoffspezies (ROS) Konzentration nach Toluidinblau (TB) und Wasserstoffperoxid (H_2O_2) Expositionen. In A549 Zellen signifikante Zunahme des Anteils an ROS positiven Zellen für TB Expositionen von 50 μ M und 500 μ M oder bei H_2O_2 Exposition im Vergleich zur Kontrolle. In L929 Zellen signifikante Zunahme des Anteils an ROS positiven Zellen für TB Expositionen größer als 50 μ M oder bei H_2O_2 Exposition im Vergleich zur Kontrolle. In HepG2 Zellen signifikante Zunahme

des Anteils an ROS positiven Zellen nur bei H₂O₂ Exposition im Vergleich zur Kontrolle. Dargestellt sind die Mittelwerte \pm Standardfehler (SEM) des prozentuellen Anteils der als ROS-positiv definierten Zellen (Kontrolle = 10% ROS-positiv) an der Gesamtzellpopulation aus mindestens 3 unabhängigen Versuchen.

In A549 und L929 Zellen konnte nach 20-minütiger Exposition von TB-Lösungen mit den Konzentrationen 50 und 500 μ M eine signifikante Zunahme des Anteils an Zellen mit erhöhtem ROS-positivem Signal im Vergleich zur Kontrolle festgestellt werden. In L929 Zellen konnte dieser Effekt zusätzlich bei den Konzentrationen 100 μ M und 200 μ M beobachtet werden. In HepG2 Zellen führte keine der TB Expositionen zu einer signifikanten Veränderung des Anteils an ROS-positiven Zellen. Eine Exposition gegenüber Wasserstoffperoxid als Positivkontrolle hingegen führte in allen Zelllinien zu einer signifikanten Zunahme des Anteils an ROS-positiven Zellen im Vergleich zu Kontrollzellen. Dieser Effekt war am stärksten bei L929 und A549 Zellen ausgeprägt.

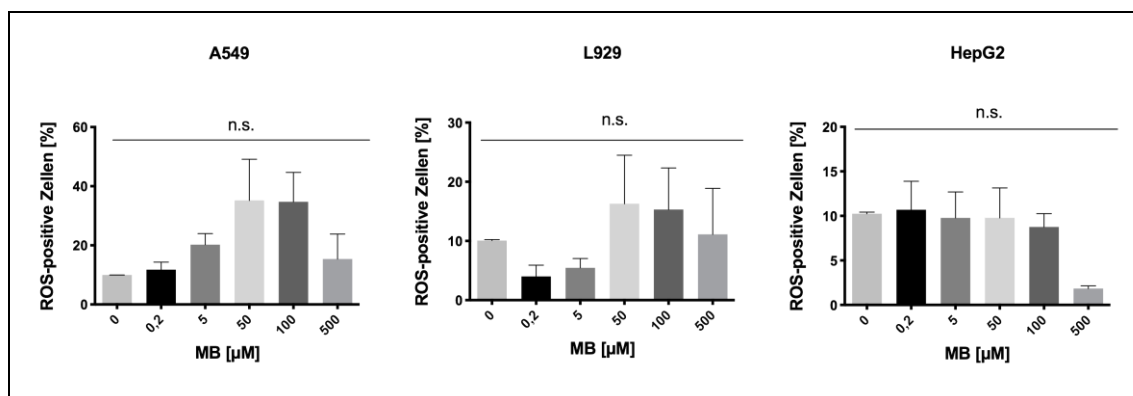


Abb 3.15 Reaktive Sauerstoffspezies Produktion in A549, L929 und HepG2 Zellen nach MB Exposition. Durchflusszytometrische Messung von reaktiven Sauerstoffspezies (ROS) Konzentration nach Methylenblau (MB) Exposition. In allen untersuchten Zelllinien, nicht-signifikante Fluktuationen des Anteils an ROS positiven Zellen für MB Expositionen von 0,2 μ M bis 500 μ M im Vergleich zur Kontrolle. Dargestellt sind die Mittelwerte \pm Standardfehler (SEM) des prozentualen Anteils der als ROS-positiv definierten Zellen (Kontrolle = 10% ROS-positiv) an der Gesamtzellpopulation aus mindestens 3 unabhängigen Versuchen.

In den untersuchten Zelllinien zeigten 20-minütige MB Expositionen keinerlei signifikante Veränderungen bezüglich des Anteils ROS-positiver Zellen in exponierten Populationen im Vergleich zu nichtexponierten Kontrollzellen.

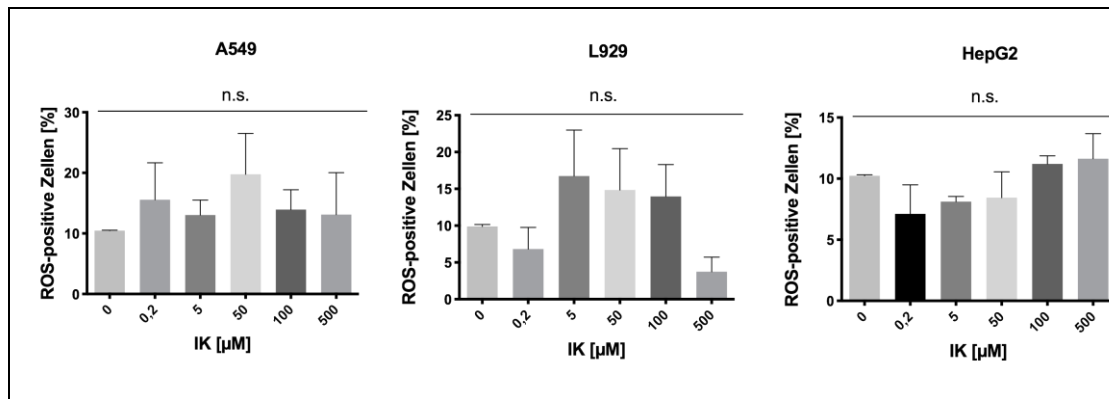


Abb 3.16 Reaktive Sauerstoffspezies Produktion in A549, L929 und HepG2 Zellen nach Indigokarminexposition. Durchflusszytometrische Messung von reaktiven Sauerstoffspezies (ROS) Konzentration nach Indigokarmin (IK) Expositionen. In allen untersuchten Zelllinien, nicht-signifikante Fluktuationen des Anteils an ROS positiven Zellen für IK Expositionen von 0,2 µM bis 500 µM im Vergleich zur Kontrolle. Dargestellt sind die Mittelwerte \pm Standardfehler (SEM) des prozentualen Anteils der als ROS-positiv definierten Zellen (Kontrolle = 10% ROS-positiv) an der Gesamtzellpopulation aus mindestens 3 unabhängigen Versuchen.

Ähnlich wie bei MB Expositionen zeigten sich bei 20-minütigen IK Expositionen keine signifikanten Veränderungen des Anteils ROS-positiver Zellen in exponierten Populationen im Vergleich zu nichtexponierten Kontrollzellen.

3.3.2 Glutathiongehalt von farbstoffexponierten Zellen

Um den oxidativen Stress der Zellen weiter zu charakterisieren, wurde der Glutathiongehalt nach 20-minütiger Phenothiazinfarbstoffexposition gemessen. Es zeigte sich keine signifikante Abnahme des intrazellulären Glutathion nach MB oder TB Exposition.

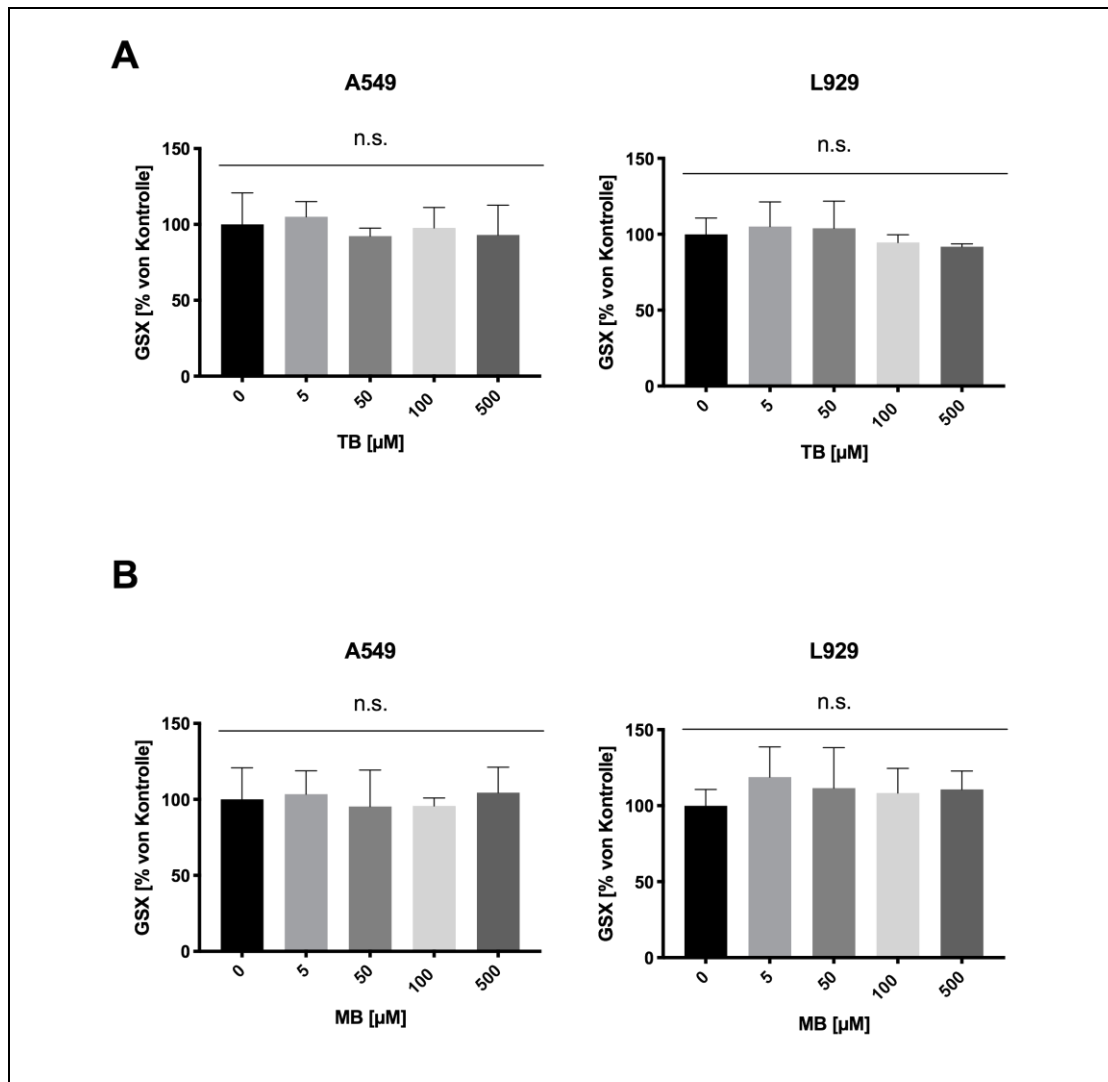


Abb 3.17 Glutathion Gehalt nach 20-minütiger Phenothiazinfarbstoffexposition. Nicht signifikante Fluktuationen des Glutathiongehalts in A549 Zellen nach Methylenblau (MB) und Toluidinblau (TB) Expositionen. Dargestellt sind die Mittelwerte \pm Standardfehler (SEM) des prozentualen Anteils der als ROS-positiv definierten Zellen (Kontrolle = 10% ROS-positiv) an der Gesamtzellpopulation aus mindestens 3 unabhängigen Versuchen.

3.4 Zytoprotektive Effekte durch Farbstoffe

Es wurde untersucht, ob die in der Literatur [113] berichteten anti-oxidativen Eigenschaften von niedrig-konzentriertem MB in den untersuchten Zelllinien nachweisbar waren, und ob diese bei TB ebenfalls zu beobachten waren.

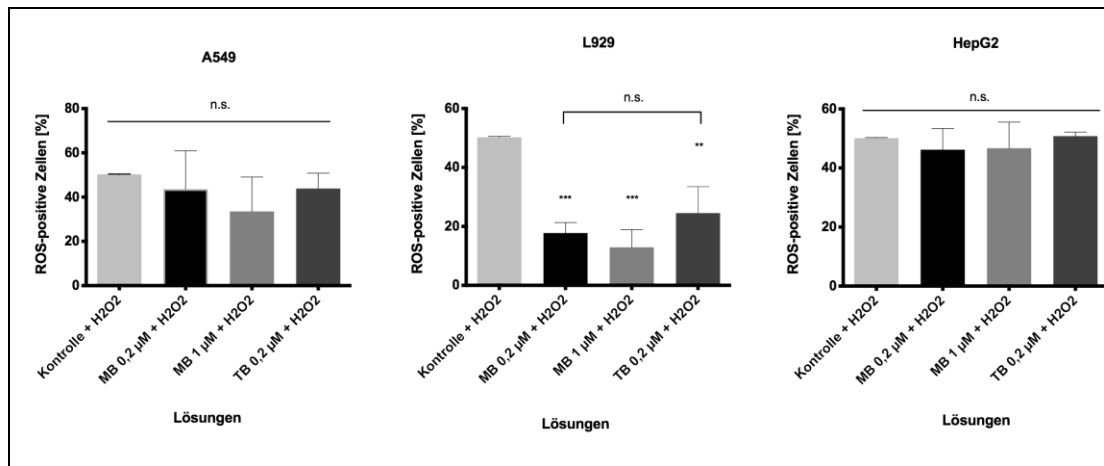


Abb 3.18 Reaktive Sauerstoffspezies Produktion nach Wasserstoffperoxid-Exposition in Phenothiazinfarbstoff-vorinkubierten Zellen. A549, L929 und HepG2 Zellen wurden mit niedrigkonzentriertem Methylenblau (MB) und Toluidinblau (TB) 20 min vorinkubiert, zusätzlich erfolgte eine Vorinkubation von Kontrollzellen mit HBSS. Anschließend wurden die Zellen mit Wasserstoffperoxid (H₂O₂ 1 mM) 10 min lang exponiert. Die reaktiven Sauerstoffspezies (ROS) Konzentration wurde durchflusszytometrisch bestimmt. Signifikante Abnahme der ROS Produktion in mit Phenothiazinfarbstoffen vorinkubierten L929 nach H₂O₂ Exposition in Vergleich zu Kontrollzellen. Nicht signifikante Fluktuationen des Redox Status in A549 und HepG2 Zellen. Dargestellt sind die Mittelwerte des prozentuellen Anteils an der Gesamtzellpopulation der als ROS-positiv definierten Zellen (Kontrolle = 50% ROS-Positiv) ± Standardfehler (SEM), aus mindestens 3 unabhängigen Versuchen.

Hier zeigte sich, dass Vorinkubationen für 20 min mit MB und TB in Dosierungen von 0,2 µM zu einer signifikant geringeren ROS-Produktion in Wasserstoffperoxid-exponierten L929 Zellen führte. Dieser Effekt wurde bei A549 und HepG2 Zellen nicht beobachtet.

Es zeigten sich ebenfalls zellprotektive Effekte von niedrig dosierten Phenothiazinfarbstoffexpositionen in vorausgegangenen Versuchen: bei einer MB Exposition von 2 Stunden in den Bereichen 1 und 5 µM konnte signifikant vermehrt ATP gemessen werden in A549 Zellen im Vergleich zu Kontrollzellen (Abb 3.4). Nach niedrigdosierter 4-stündiger MB-Exposition (0,2 µM) in L929 Zellen konnte eine im Vergleich zu Kontrollzellen signifikante Zunahme der Zellen mit intaktem $\Delta\psi_m$ beobachtet werden (Abb 3.11).

3.5 Farbstoffverteilung in der Zellfraktionierung

3.5.1 Validierung der Zellfraktionierung

Es wurde zunächst die Methode der Zellfraktionierung und der Isolation der einzelnen Organellen durch die Messung von Marker-Enzym Anreicherungen validiert.

Die Anreicherungen der Markerenzyme in den untersuchten Fraktionen sind in Abb 3.19 sowie in Tab 3.2 dargestellt. So wird beispielsweise deutlich, dass in der "mitochondrialen Fraktion" (M) eine Anreicherung von dem mitochondrienspezifischen Enzym Succinatdehydrogenase (SDH) stattfand: diese betrug $3,4 \pm 1,7$ für A549 Zellen und $3,8 \pm 2,7$ für L929 Zellen. Die Kreuzkontamination von anderen Organellen in der M Fraktion ist ebenfalls dargestellt. Als Q_X der Fraktion X wurde der Quotient aus Anreicherung von X zur größten Querkontamination bezeichnet, ein Maß für die Qualität der Zellfraktionierung. A549 Kerne, Mitochondrien und Plasmamembran konnten im Vergleich zu den anderen Fraktionen und dem Homogenisat statistisch signifikant angereichert werden. Bei den übrigen Organellen konnte eine Tendenz zu einer größeren Anreicherung der gewünschten Organellen festgestellt werden, ohne jedoch gegenüber sämtlichen übrigen Fraktionen eine statistische Signifikanz zu erreichen. In Zusammenschau der Markerenzymmessung konnte tendenziell bestätigt werden, dass in den isolierten Organell-Fractionen tatsächlich derjenige Marker vorzugsweise angereichert werden konnten, der für diese Organelle charakteristisch war. Die Qualität der Zellfraktionierung war insbesondere für Kerne hoch (Q_N betrug 3,8 in A549 Zellen und 13,0 in L929 Zellen), jedoch deutlich geringerer für Mitochondrien (Q_M 1,6 (A549) / 2,1 (L929)), Plasmamembran (1,4 (L929)) und Cytosol (2,3 (A549) / 1,4 (L929)). Es konnten jedoch 4 Kompartimente unterschieden werden:

M: eine Mitochondrien-dominierte Fraktion

N: eine vornehmlich kernhaltige Fraktion

P: eine Fraktion überwiegend aus Plasmamembranen bestehend

C: eine Cytosol-dominierte Fraktion

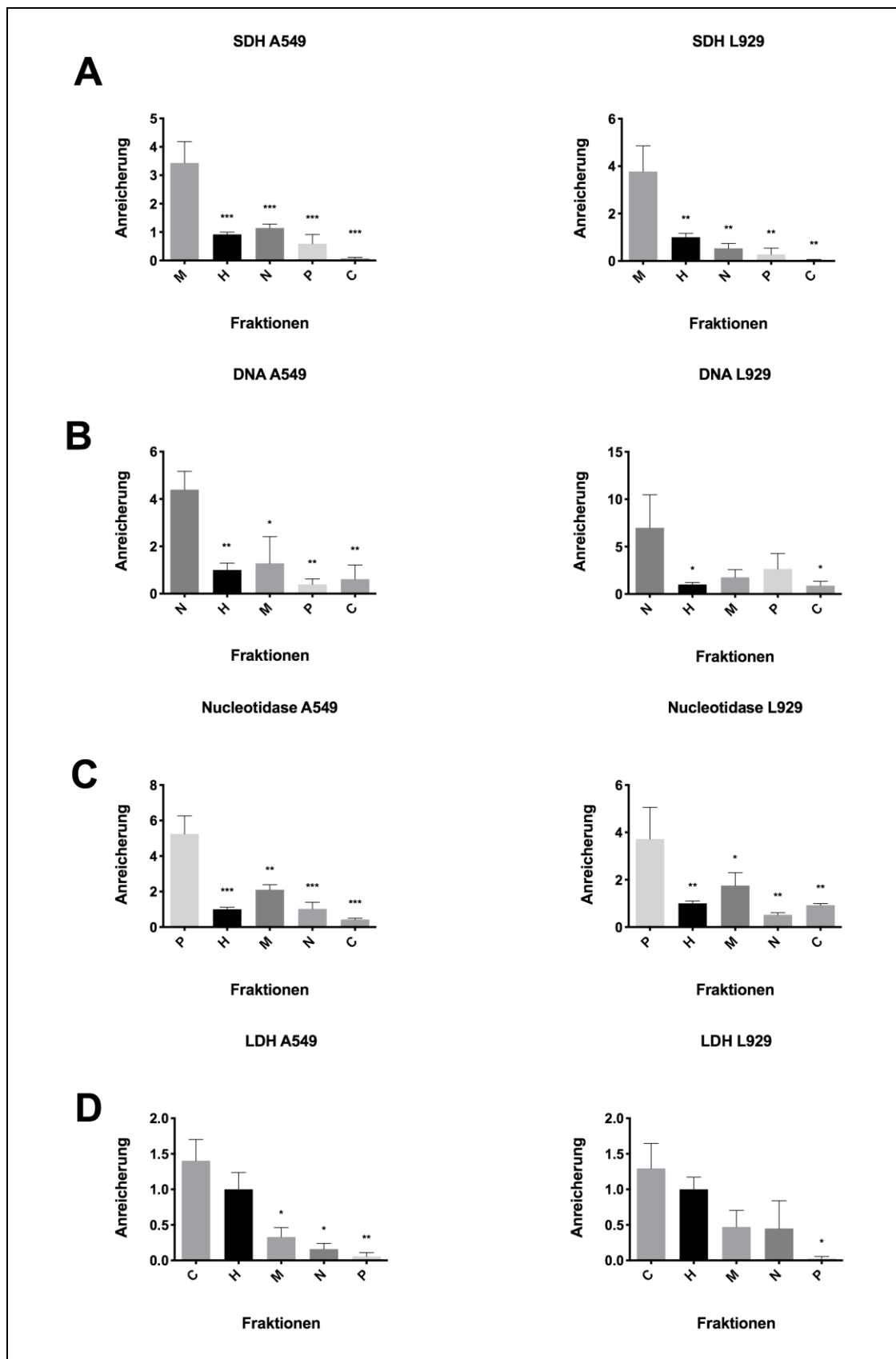


Abb 3.19 Anreicherung von organellespezifischen Markerenzymen in isolierten Fraktionen. Zellfraktionierung mit Herstellung eines Homogenisats (H), Isolation einer mitochondrialen (M),

nuclearen (N), Plasmamembran (P) und cytosolischen (C) Fraktion. A: Photometrische Messung der Aktivität der mitochondrialspezifischen Succinatdehydrogenase (SDH). B: Photometrische Messung des kernassoziierten Diphenylamingehaltes. C: photometrische Messung der plasmamembran assoziierten 5'-Nucleotidase Aktivität. D: Photometrische Messung der Aktivität des Zytoplasma Markerenzym LDH. Dargestellt sind die Mittelwerte der Aktivität der jeweiligen Enzyme in den einzelnen Fraktionen \pm Standardfehler (SEM), aus mindestens 3 unabhängigen Versuchen.

A549	M	N	P	C
SDH	3,4 \pm 0,8	1,2 \pm 0,1	0,6 \pm 0,3	0,08 \pm 0,03
DNA	1,3 \pm 1,1	4,4 \pm 0,8	0,4 \pm 0,2	0,6 \pm 0,6
5'NUC	2,1 \pm 0,3	1,0 \pm 0,4	5,2 \pm 1	0,4 \pm 0,08
LDH	0,3 \pm 0,1	0,2 \pm 0,08	0,06 \pm 0,05	1,4 \pm 0,3
Q	1,6	3,8	8,9	2,3
L929	M	N	P	C
SDH	3,8 \pm 1,1	0,5 \pm 0,2	0,3 \pm 0,3	0,04 \pm 0,02
DNA	1,8 \pm 0,8	7 \pm 3,5	2,6 \pm 1,6	0,9 \pm 0,5
5'NUC	1,8 \pm 0,5	0,5 \pm 0,09	3,7 \pm 1,3	0,9 \pm 0,07
LDH	0,5 \pm 0,2	0,4 \pm 0,4	0,03 \pm 0,03	1,3 \pm 0,4
Q	2,1	13	1,4	1,4

Tab 3.2 Anreicherungen und Kreuzkontaminationen der Markerenzyme für die isolierten Fraktionen von A549 und L929 Zellen. M: Mitochondrien, Markerenzym Succinatdehydrogenase (SDH). N: Nucleare Fraktion, Marker: DNA-Gehalt. P: Plasmamembranfraktion, Markerenzym 5'-Nucleotidase (5'NUC), C: Cytosolische Fraktion, Markerenzym Laktatdehydrogenase (LDH). Q: Quotient von Anreicherung zu höchster Querkontamination in der jeweiligen Fraktion. Gezeigt werden Mittelwert \pm Standardfehler (SEM) aus mindestens 3 unabhängigen Versuchen.

Abb 3.20 stellt mikrographische Bilder intakter L929 Zellen und eines Homogenisats (H) nach mechanischer Lyse der Zellen dar.

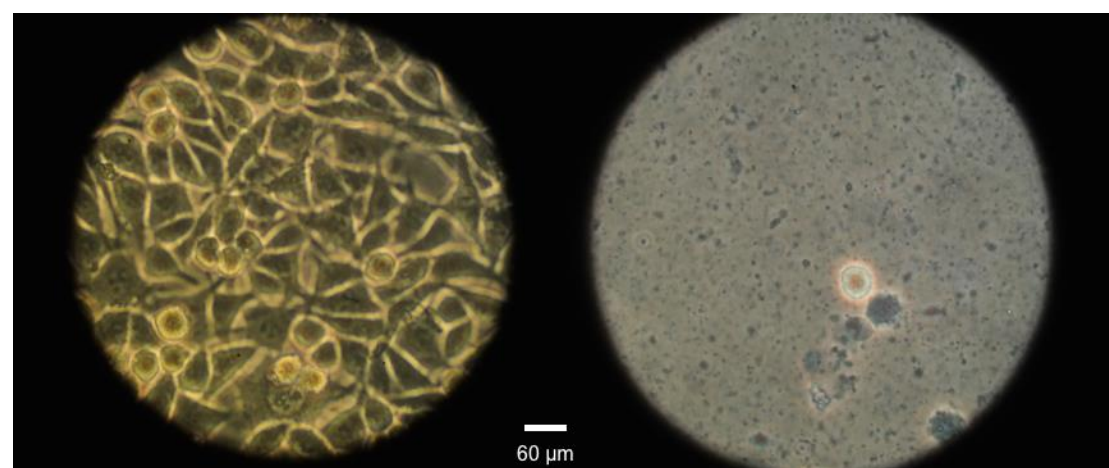


Abb 3.20 Phasenkontrastbilder von L929 Zellen in Medium (nativ) und nach mechanischer Lyse und Homogenisierung: Links: ungefärbte adhären wachsende konfluente L929 Zellen in DMEM Medium. Rechts: Homogenisat entstanden nach mechanischer Lyse von Methylenblau gefärbten L929 Zellen. Vergrößerung: 320x

3.5.2 Farbstoffaufnahme und -verteilung

3.5.2.1 Farbstoffaufnahme in den Zellen

	A549	L929
MB	11 ± 3	24 ± 6
TB	66 ± 8	67 ± 4
IK	5 ± 1	6 ± 1

Tab 3.3 Prozentualer Anteil des von den Zellen aufgenommenen Farbstoffs am initial verabreichten Farbstoff. MB: Methylenblau. TB: Toluidinblau. IK: Indigokarmin. Dargestellt sind die Mittelwerte des prozentualen Farbstoffgehaltes der einzelnen Fraktionen ± Standardfehler (SEM), aus mindestens 3 unabhängigen Versuchen.

Die Farbstoffaufnahme in die Zellen wurde durch Messung des Farbstoffgehaltes im Homogenisat (bei TB und MB) oder im Überstand untersucht (bei IK), nach Inkubation wie in 2.6.2.3.1 beschrieben. Von den Farbstoffen reicherte sich an erster Stelle TB in den Zellen an, gefolgt von MB. IK wurde nur in sehr geringen Mengen intrazellulär aufgenommen.

3.5.2.2 Farbstoffverteilung auf vier Fraktionen

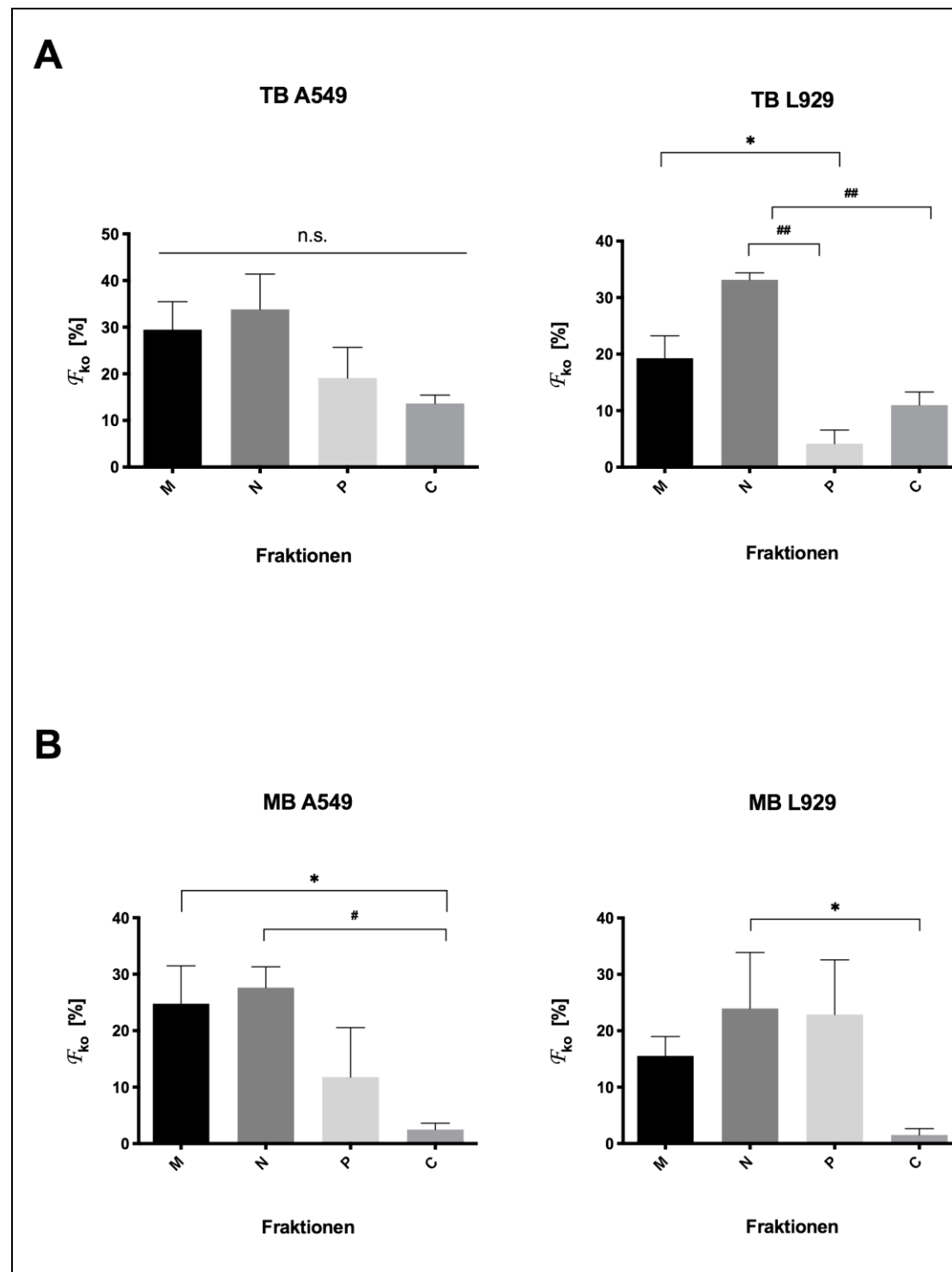


Abb 3.21 Prozentuale Farbstoffverteilung in der Zellfraktionierung von A549 und L929 Zellen. Photometrische Messung des Farbstoffgehaltes nach Abzug der Querkontaminationen (F_{ko}) in isolierten Fraktionen nach Zellfraktionierung. A: Verteilung von Toluidinblau (TB) auf Mitochondrien (M), Nucleus (N), Plasmamembran (P) und Zytosol (C) nach Auftrennung eines Homogenisats. B: Verteilung von Methyleneblau (MB) auf dieselben Fraktionen. Dargestellt sind die Mittelwerte des prozentualen Farbstoffgehaltes der einzelnen Fraktionen \pm Standardfehler (SEM), aus mindestens 3 unabhängigen Versuchen.

Es wurde die Verteilung von MB⁺ und TB⁺ auf die mitochondriale (M), nukleäre (N), Plasmamembran- (P) und zytosolische (C) Fraktion untersucht (Abb 3.21; Tab 3.4). Da IK praktisch nicht intrazellulär aufgenommen wurde (Tab 3.3), wurde auf eine Messung der subzellulären Verteilung von IK verzichtet. In beiden eingesetzten Zelllinien wies die nukleäre Fraktion tendenziell den stärksten Farbstoffanteil auf, gefolgt von der mitochondrialen Fraktion, mit der Ausnahme von MB exponierten L929 Zellen, wo die Plasmamembranfraktion nach der nukleären Fraktion tendenziell den zweithöchsten Farbstoffgehalt aufwies. Der zytoplasmatische Farbstoffanteil war in allen Versuchen gering im Vergleich zu den übrigen Fraktionen. Es konnten oftmals lediglich nicht-signifikante Abweichungen in der Farbstoffverteilung zwischen den einzelnen Fraktionen beobachtet werden, wie z.B. in TB exponierten A549 Zellen. In den übrigen Versuchsreihen konnten signifikante Unterschiede der Kernfraktion und teilweise der mitochondrialen Fraktion als stark gefärbte Fraktionen zu weniger stark gefärbte Fraktionen (insbesondere Zytosol) festgestellt werden.

A549		MB ⁺	TB ⁺
M		25 ± 7	30 ± 6
N		28 ± 4	34 ± 8
P		12 ± 9	19 ± 7
C		2 ± 1	14 ± 2
L929		MB ⁺	TB ⁺
M		16 ± 3	19 ± 4
N		24 ± 10	33 ± 1
P		23 ± 10	4 ± 2
C		2 ± 1	11 ± 2

Tab 3.4 Prozentuale Farbstoffverteilung in der Zellfraktionierung von A549 und L929 Zellen. Spektrophotometrische Messung des relativen farbigen Methylenblau- (MB⁺) und Toluidinblau- (TB⁺) Gehalt in der mitochondrialen (M), der nuclearen (N), der Plasmamembran- (P), sowie der zytosolischen (C) Fraktion. Dargestellt sind die Mittelwerte des relativen MB⁺- und TB⁺-Gehalts in Prozent ± Standardfehler (SEM), aus mindestens 3 unabhängigen Versuchen.

Für die mitochondriale und die nukleäre Fraktionen wurde die absolute Farbstoffverteilung errechnet. Hierzu wurde der spezifische Farbstoffgehalt der Fraktionen bestimmt, also die in der jeweiligen Fraktion gemessene Farbstoffmenge, bezogen auf die Menge (= Masse) der Fraktion. In beiden Zelllinien zeigte sich eine nicht-signifikante Tendenz zu einem höheren spezifischen MB- und TB-Gehalt in den Mitochondrien im Vergleich zu den Kernen.

A549		MB ⁺	TB ⁺
M		21 ± 7	166 ± 50
N		8 ± 1	56 ± 15
L929		MB ⁺	TB ⁺
M		46 ± 16	104 ± 22
N		31 ± 15	103 ± 13

Tab 3.5 Absolute Farbstoffverteilung in der Zellfraktionierung von A549 und L929 Zellen. Spektrophotometrische Messung des absoluten farbigen Methylenblau- (MB⁺) und Toluidinblau- (TB⁺) Gehalts in der mitochondrialen (M) sowie der nukleären (N) Fraktion. Dargestellt sind die Mittelwerte des absoluten MB⁺- und TB⁺-Gehalts in nmol/mg Protein ± Standardfehler (SEM), aus mindestens 3 unabhängigen Versuchen.

4 Diskussion

4.1 Gegenüberstellung der Ergebnisse

Die vorliegende Arbeit stellt den ersten Versuch dar, die *in vitro* Toxizität von drei gängigen medizinischen Farbstoffen (MB, TB und IK) zu vergleichen. Es wurde die metabolische Toxizität, der Redox Status, zytoprotektive Effekte und die subzelluläre Verteilung der Farbstoffe untersucht.

Im Sinne einer metabolischen Toxizität konnte sowohl in Vitalitätsversuchen als auch in der Messung des ATP-Gehalts eine signifikante Beeinträchtigung der Zellen im höheren Expositionsbereich festgestellt werden ($\geq 100\text{-}300\text{ }\mu\text{M}$). Eine Ausnahme stellten MB exponierten L929 Zellen dar. In dieser Zelllinie waren TB-exponierte Zellen signifikant weniger vital als MB-exponierte Zellen. Die Dosiswirkungskurven für den ATP-Abfall ergaben in A549 Zellen eine höhere Toxizität im Sinne eines signifikant niedrigeren IC_{50} Wertes für TB im Vergleich zu MB.

Eine Auswirkung auf das mitochondriale Membranpotenzial zeigte sich bereits bei niedrigeren Konzentrationen. Sowohl nach 75-minütiger als auch nach vierstündiger Exposition zeigte sich ab $50\text{ }\mu\text{M}$ TB eine signifikante Abnahme des mitochondrialen Membranpotenzials in exponierten Zellen im Vergleich zu den Kontrollzellen, in HL-1 Kardiomyozyten war dieser Effekt ab $100\text{ }\mu\text{M}$ zu beobachten. MB Expositionen zeigten ähnliche Effekte allerdings erst nach vierstündiger Exposition in HepG2 und L929 Zellen.

Keine der untersuchten IK- und Promethazin-Expositionen führte zu einer signifikanten Abnahme des $\Delta\psi_m$, mit der Ausnahme von HepG2 Zellen nach 75-minütiger IK Exposition, dieser Effekt konnte jedoch nach vierstündiger Exposition nicht bestätigt werden. Promethazinexpositionen in L929 Zellen zeigten gar tendenziell höhere $\Delta\psi_m$ Werte, eine Signifikanz wurde bei $50\text{ }\mu\text{M}$ erreicht.

TB-Expositionen beeinflussten den Redox-Status der Zellen. Es zeigte sich bereits nach 20-minütiger Farbstoffexposition mit $50\text{ }\mu\text{M}$ oder höheren Konzentrationen ein signifikanter Anstieg der Zellen mit erhöhter ROS Produktion nach TB Exposition. Lediglich in HepG2 Zellen konnte dieser Effekt

nicht beobachtet werden. MB und IK Expositionen führten zu keinem signifikanten Anstieg der ROS Produktion. Der Glutathion Haushalt der Zellen wurde jedoch in keiner Zelllinie von den Farbstoffen signifikant beeinflusst.

Bei niedrigeren Phenothiazinfarbstoffexpositionen ($\leq 5 \mu\text{M}$) konnten zum Teil gegenteilige Effekte zu Expositionen $\geq 50 \mu\text{M}$ festgestellt werden. In A549 Zellen war der ATP-Gehalt nach MB Exposition signifikant höher als bei den Kontrollzellen. In L929 Zellen hatten niedrige MB Konzentrationen einen signifikanten $\Delta\psi_{\text{m}}$ -protektiven Effekt. Eine Vorinkubation mit MB oder TB führte in dieser Zelllinie zudem zu einer geringeren Erzeugung von ROS nach H_2O_2 Exposition.

Expositionen mit MB und TB führten zu einer ausgeprägten Zellschwellung; dieser Effekt war bei TB stärker ausgeprägt als bei MB. TB wurde sowohl in A549 als auch in L929 zu ca. 66% des Gesamtfarbstoffes von den Zellen aufgenommen, MB zu geringeren Anteilen ($< 25\%$). IK blieb überwiegend extrazellulär (intrazellulärer Anteil $< 6\%$).

Nach Aufschluss und Fraktionierung von A549 und in L929 Zellen wurden MB und TB vornehmlich in den Kernen und den Mitochondrien nachgewiesen. Bei beiden Farbstoffen wurden ähnlich hohe oder tendenziell höhere spezifische Farbstoffgehalte in den Mitochondrien im Vergleich zu den Zellkernen gemessen.

4.2 Toxizität von den Phenothiazinfarbstoffen und Indigokarmin im Vergleich

TB zeigte in der vorliegenden Arbeit einen deutlichen Trend zu einer höheren Toxizität im Vergleich zu MB, während die Toxizität von IK vernachlässigbar war. TB wurde zu einem signifikant höheren Anteil als MB von den Zellen aufgenommen. In den Zellvitalitätsversuchen zeigte sich in L929 Zellen TB signifikant toxischer als MB. In den gemessenen Endpunkten der mitochondrialen Depolarisation und des ATP Abfalls zeigten TB und MB ähnliche Wirkungen, TB war jedoch tendenziell toxischer als MB, eine statistische Signifikanz der erhöhten Toxizität von TB zeigte sich in Bezug auf die ATP-depletierende Wirkung in A549 Zellen. In den ROS Versuchen konnte bei TB Expositionen ein signifikanter Anstieg der ROS Produktion gemessen werden, diese Tatsache war bei MB Expositionen nicht anzutreffen. In L929 Zellen hatten MB-Vorinkubationen eine ROS-reduzierende Wirkung nach Erzeugung von oxidativem Stress durch Wasserstoffperoxid, bei TB war dieser Effekt geringer ausgeprägt. In Zusammenschau dieser metabolischen Effekte wies MB in den durchgeführten Versuchen eine tendenziell geringere Toxizität als TB auf und wirkte in niedrigen Dosierungen eher zytoprotektiv.

Nach 75-minütiger IK Exposition zeigte sich in HepG2 Zellen bei 500 μM zwar eine signifikante Abnahme des mitochondrialen Membranpotenzials, dieser Effekt bestätigte sich jedoch nicht nach 4-stündiger Inkubation. Auch in anderen Versuchen zeigte sich kein signifikanter Unterschied von IK Expositionen gegenüber Kontrollen, der Farbstoff wies in den gemessenen Endpunkten eine geringere Toxizität als TB und MB auf, und wurde deutlich weniger von den Zellen aufgenommen.

4.3 Metabolische Toxizität der Farbstoffe

4.3.1 Mitochondriale Wirkung der Phenothiazinfarbstoffe

Metabolische Effekte unter Beteiligung der Mitochondrien scheinen eine prominente Rolle in der Zytotoxizität der Phenothiazinfarbstoffe zu spielen. Expositionen mit einer Phenothiazinfarbstoff-Konzentration über 50 μM führten einer signifikanten Reduktion des mitochondrialen Membranpotenzials in allen

untersuchten Zelllinien. Darüber hinaus führten MB und TB zu einer signifikanten Abnahme des ATP-Gehalts der Zellen, diese Tatsache stützt die Hypothese, dass die Mitochondrien als ATP-produzierende Organellen in ihrer Funktion beeinträchtigt wurden. Die Wirkung in den Mitochondrien trat bereits bei intermediären Konzentrationen ein (50 μ M), bei denen noch kein ATP-Abfall oder eine signifikante Abnahme der Zellvitalität zu messen war. Dies legte die Vermutung nahe, dass nicht-toxische bzw. nicht-ATP-depletierende Phenothiazinfarbstoffkonzentrationen bereits die Mitochondrienfunktion stören. Eine weitere mögliche Erklärung für diese Beobachtung ist die Tatsache, dass Tumorzelllinien in Glukose-haltigem Medium die ATP Produktion trotz mitochondrialer Beeinträchtigung durch Glykolyse aufrechterhalten können [114]. Zukünftige Untersuchungen sollten aufgrund der Beobachtungen in Primärzellkulturen oder in Galaktose-haltigem (glukosefreiem) Medium durchgeführt werden. Die Mitochondrien stellen einen wichtigen Ort der ROS-Produktion in der Zelle dar -insbesondere der Superoxidproduktion [115]- und eine überschießende ROS-Bildung kann wiederum die mitochondriale Funktion beeinträchtigen [116]. Neben dem Abfall des mitochondrialen Membranpotenzials und des intrazellulärem ATP Gehalt könnte die Erhöhung des oxidativen Stresses nach TB Exposition ebenfalls eine Beteiligung der Mitochondrien suggerieren.

MB⁺ und TB⁺ konnten in allen isolierten Zellkompartimenten gemessen werden, der größte prozentuelle Anteil an verabreichtem Farbstoff ließ sich in den Kernen messen. Dies ist in der Literatur sowohl bei MB [117] als auch bei TB aufgrund der hohen Nukleinsäure-Gehalte der Kerne gut belegt [118]. Bemerkenswert war die Tatsache, dass der spezifische Farbstoffgehalt (der Farbstoffgehalt bezogen auf den Proteingehalt der Fraktion) tendenziell höher in den Mitochondrien als in den Kernen war. Diese Differenz erreichte jedoch keine statistische Signifikanz. Es konnte verifiziert werden, dass das Mitochondrium nicht nur funktionell, sondern auch strukturell eine Zielorganelle der untersuchten Phenothiazinfarbstoffe innerhalb der Zelle darstellte.

4.3.2 Mitochondriale Depolarisation und Herzrhythmusstörungen

Die metabolische Toxizität der Phenothiazinfarbstoffe könnte zu den beobachteten kardiovaskulären Nebenwirkungen von TB ursächlich beitragen. Untersuchungen der TB Wirkung an Ratten lieferten laut Petrat et al [5] keine Erklärung für die beobachteten Herzrhythmusstörungen. Insbesondere konnten keine vagalen Effekte festgestellt werden, es gab keine Hinweise auf einen gestörten Calciumhaushalt, und elektrokardiographisch keine Zeichen für eine myokardiale Ischämie oder Störungen der kardialen Exzitabilität. Die mitochondriale Wirkung von TB könnte hier einen alternativen Erklärungsansatz liefern.

Die Rolle von Mitochondrien in der Entstehung von kardialen Arrhythmien ist zunehmend anerkannt [116]. Variationen im mitochondrialen Membranpotenzial können zu metabolischen Fluktuationen in unterschiedlichen Gruppen von Kardiomyozyten führen. Diese können – über ATP-abhängige sarkolemmale Kaliumkanäle vermittelt [119] – zu lokalen Unterschieden im kardialen Aktionspotenzial führen. Diese durch die mitochondriale Toxizität bedingte Heterogenität innerhalb des Myokards könnte zur Entstehung von Arrhythmien beitragen [120; 121].

Ein Abfall des mitochondrialen Membranpotenzials ist oftmals durch eine Überangebot von reaktiven Sauerstoffspezies (ROS) bedingt [122], und begünstigt diese wiederum [123]. Das Phänomen dieses *ROS-induced ROS Release* wird in Verbindung mit der Ausbreitung von pathologischen Depolarisationen über mehrere Mitochondrien innerhalb eines Kardiomyozyts gebracht, und begünstigt das Auftreten von kardialen Arrhythmien [124].

Die festgestellte, dosisabhängige Reduktion des ATP-Gehalts der farbstoffexponierten Zellen bestätigte die metabolische Toxizität der Farbstoffe [125], und könnte durch den Abfall des mitochondrialen Membranpotenzials bedingt sein, oder Ausdruck der Zytotoxizität bei hohen Farbstoffexpositionen sein. Falls diese Beobachtungen auf in vivo Verhältnisse übertragbar sind, lässt sich aus den durchgeführten Versuchen und den Erkenntnissen in der Literatur ein Mechanismus formulieren, der zur zellulären Toxizität von TB beiträgt: TB wird von den Zellen aufgenommen, und verteilt sich neben anderen Organellen auch in die Mitochondrien. TB führt in mittleren

bis hohen Konzentrationen ($\geq 50 \mu\text{M}$) zu einem Anstieg der ROS-Produktion und zu einer Reduktion des mitochondrialen Membranpotenzials. Assoziiert kann insbesondere bei hohen Konzentrationen ein Abfall der ATP-Konzentration in den exponierten Zellen auftreten. Diese Ereignisse begünstigten zusammen (möglicherweise über ATP-abhängige Kaliumkanäle) die Entstehung kardialer Arrhythmien. MB schien weniger oxidativen Stress zu erzeugen, zeigte jedoch ähnliche Wirkungen wie TB auf das mitochondriale Membranpotenzial und die ATP-Produktion. Die Tatsache, dass TB oxidativen Stress und mitochondriale Störungen bei nicht zytotoxischen, jedoch klinisch relevanten Konzentrationen ($50 \mu\text{M}$) [5; 66] hervorrufen kann, könnte eine Erklärung für die prompte Reversibilität der kardiovaskulären Komplikationen – in den meisten Fällen nach kurzzeitiger Reanimation [3; 4] – bieten.

Andere Hypothesen zur Entstehung der beobachteten Herzrhythmusstörungen nach TB Exposition kommen ebenfalls in Frage, insbesondere die Möglichkeit einer direkten Interaktion mit Ionenkanälen. Nicht-farbige Phenothiazine wie Promethazin führen über eine direkte hERG Kaliumkanalblockade (und nicht über sarcolemmale K^+_{ATP} Kanäle) zu QT_c Verlängerungen und erhöhen das Risiko für das Auftreten von Torsades-de-Pointes Tachykardien. Als Phenothiazine könnten MB und TB ebenfalls zu einer direkten hERG Kaliumkanalblockade führen, eine Evidenz für QT_c Verlängerungen nach TB oder MB Gabe ist jedoch in der Literatur nicht zu finden. EKG Veränderungen durch TB wurden durch Yeager et al. [126] in 16 Patienten untersucht. Es wurden T-Wellen Veränderungen (insbesondere ein Abflachen der T-Wellen), AV Blockierungen und myokardiale Irritabilität beobachtet. Die Autoren beschrieben jedoch keine QT_c Verlängerungen als Hinweis auf eine hERG Kaliumkanalblockade oder QRS Verbreiterungen als Ausdruck einer direkten Natriumkanalblockade. Hierzu kam die Beobachtung, dass in den vorliegenden Versuchen das entscheidende Ereignis der mitochondrialen Depolarisation bei Promethazin nicht beobachtet wurde. Dies legt die Vermutung nahe, dass sich die Mechanismen der Zytotoxizität der Phenothiazinfarbstoffe von den nicht-farbigem Phenothiazinen wie Promethazin zum Teil unterscheiden und dass eine mitochondriale Toxizität im Falle der Farbstoffe eine wichtigere Rolle spielen könnte.

Orientierende Versuche an HL-1 Kardiomyozyten in unserem Labor zeigten einen ähnlichen Trend der mitochondrialen Funktionsstörungen bei höher dosierten TB-Expositionen. In einer gleichzeitig durchgeführten Masterarbeit an HL-1 Zellen konnte gezeigt werden, dass die Zellen nach Exposition mit 5 μM TB und mit 10 μM TB signifikant niedrigere Kontraktionsfrequenzen aufwiesen als Kontrollzellen [127]. Weiterführende elektrophysiologische Untersuchungen an HL-1 Kardiomyozyten und *in vivo* Versuche erforderlich, um die kardialen Effekte von MB und TB näher zu beschreiben. Zur weiteren Charakterisierung der mitochondrialen Funktion nach Phenothiazinfarbstoffexposition könnte die Messung des Sauerstoffverbrauchs und die Untersuchung der Effekte auf die einzelnen Komplexe der Atmungskette hilfreich sein.

4.4 Redoxstatus der Zellen nach Farbstoffexposition

In den fluorimetrischen ROS-Versuchen konnte eine signifikante Erhöhung der ROS Produktion der Zellen nach kurzzeitiger (20-minütiger) TB Exposition gemessen werden. Diese hatte jedoch keine signifikante Auswirkung auf den Glutathionhaushalt der Zellen. MB-Expositionen führten nicht zu einem messbaren Anstieg der ROS Produktion – weder in fluorimetrischen Versuchen noch indirekt über eine GSH-Bestimmung. Dieser Effekt könnte durch den Einsatz glukosehaltigen Puffers (HBSS) in den vorliegenden Versuchen erklärbar sein. In Untersuchung an Endothelzellen konnten May et al. [49] zeigen, dass MB in Konzentrationen oberhalb 5 μM zu einer erhöhten Produktion von ROS und zu einem GSH-Abfall in Glucose-freiem Milieu führte. Diesem Effekt konnte durch Supplementierung von Glucose entgegengewirkt werden – sowohl in der fluorimetrischen ROS Bestimmung als auch in der GSH-Messung. Glukose inhibiert also die ROS Produktion durch MB – möglicherweise indirekt über eine Aktivierung des Pentosephosphatwegs – wenngleich man den gegenteiligen Effekt erwarten würde anhand Untersuchungen mit anerkannten „Redoxcyclern“ wie Menadion, bei denen Glukose zu einer Erhöhung der ROS Produktion führte [128]. May et al. schlossen daraus, dass MB in den Zellen kein „Redoxcycling“ eingeht, eine Tatsache, die mit der Beobachtung vereinbar ist, dass MB^+ in Organellen

sequestriert wird und intrazellulär nicht in MBH zurückverwandelt wird [51]. Die Autoren vermuteten, dass bei hoher MBH Konzentration die Oxidationskapazitäten von intrazellulären Hämoenzymen ausgeschöpft sind, und eine ROS Produktion in Form von Superoxid (O_2^-) durch die partielle Oxidation von MBH durch molekularen Sauerstoff erfolgt. Der erhöhte Sauerstoffverbrauch von Erythrozyten nach Inkubation mit einer 5 μ M MB Lösung, würde dazu passen [129]. Diese Hypothese könnte die beachtlichen Unterschiede zwischen niedrig ($\leq 5 \mu$ M) und hochdosiertem ($>100 \mu$ M) MB- und TB-Expositionen zum Teil erklären. Bei hochdosierter Exposition wären die Redox-Kompensationsmechanismen der Zellen überlastet, es entstünden ROS im Überschuss – möglicherweise in Form von Superoxiden – die eine Quelle metabolischer Toxizität darstellen. In unseren Versuchen löste TB – im Gegensatz zu MB – einen signifikanten ROS Anstieg aus in der Fluoreszenzbasierten Messung, und dies bereits ab niedrigen Konzentrationen, und trotz der Verwendung eines glukosehaltigen Puffers. Ob die aus Untersuchungen an Endothelzellen und Erythrozyten resultierenden Vermutungen von May et al. auf die untersuchten Zelllinien und auf TB übertragbar sind ist jedoch nicht geklärt. Eine weitere Differenzierung der generierten reaktiven Sauerstoffspezies wäre an dieser Stelle sinnvoll.

4.5 Hormetische Wirkung von Phenothiazinfarbstoffen

Die toxische Wirkung der Phenothiazinfarbstoffe folgte keinem klassischen Konzentrations-Wirkungs-Verhältnis, sondern war durch entgegengesetzte Effekte bei hohen vs. niedrigen Konzentrationen gekennzeichnet, ein Effekt der als „Hormesis“ bezeichnet wird [55]. Sowohl niedrig-konzentrierte MB als auch TB Expositionen zeigten statistisch signifikante zellprotektive Effekt in einzelnen Versuchen. Vorinkubationen mit den Farbstoffen zeigten ebenfalls protektive Effekte: es kam zu einer Reduktion des oxidativen Stresses nach Wasserstoffperoxid-Exposition in L929 Zellen. Für MB decken sich diese Beobachtungen mit vorausgehenden Erkenntnissen, dass der Farbstoff ein Modulator des bioenergetischen Status der Zelle ist, dessen pro-oxidative Wirkung bei hochkonzentrierten Expositionen sich von antioxidativen Effekten bei niedrigkonzentrierten Expositionen unterscheidet [130-132]. Es konnte

festgestellt werden, dass TB einen vergleichbaren Trend zeigt, wenngleich der Farbstoff toxischer als MB im höheren Konzentrationsbereich zu sein scheint. Ähnliche sogenannte hormetische Dosis-Wirkungs-Beziehungen zeichnen mehrere mitochondriale Stressoren aus [114].

Als milde Redox-Substanz ist MB in niedriger Dosierung ($\leq 5 \mu\text{M}$) in der Lage, an zahlreichen Reaktionen teilzunehmen, ohne den Zellmetabolismus zu hemmen, wie es stärkere Oxidanzien oder stärkere reduzierende Substanzen vermögen [130]. In der vorliegenden Arbeit wird jedoch deutlich, dass bei höheren Konzentrationen ($\geq 50 \mu\text{M}$) eine inhibitorisch-toxische Wirkung auf den Zellmetabolismus überwiegt. Auch bei Haouzi et al. führte in Epithelzellen eine 10-minütige Inkubation mit $100 \mu\text{M}$ MB zu einer signifikanten Abnahme des mitochondrialen Membranpotenzials im Vergleich zur Kontrolle, in einem ähnlichen Ausmaß wie eine 10-minütige $200 \mu\text{M}$ Kaliumzyanid Exposition [133].

Analog zu der Erforschung von MB als Mitochondrien-vermittelte zellprotektive Substanz im zentralen Nervensystem [134] wäre eine weiterführende Untersuchung möglicher antiarrhythmischer und kardioprotektiver Effekte von niedrigkonzentrierten Phenothiazinfarbstoff-Expositionen am Herzen sinnvoll. Hinweise auf solche Effekte zeigten sich in Untersuchungen von Duicu et al.: in isolierten kardialen Mitochondrien von diabetischen Ratten, führte die niedrigkonzentrierte ($0,1 \mu\text{M}$) MB Exposition zu einer verbesserten mitochondrialen Funktion [135].

4.6 Methylenblau als Antidot gegen mitochondriale Gifte

Metabolische Gifte, die ihre Wirkung vornehmlich an Mitochondrien entfalten, sind weit verbreitet. Bei Vergiftungen mit Hemmern von Komplexen der Atmungskette könnte MB durch seine Redoxeigenschaften in geeigneter Konzentration ($\leq 5 \mu\text{M}$) ein attraktives Antidot darstellen. Es wird vermutet, dass MB einen alternativen Elektronen-Carrier darstellen kann, um Elektronen in Richtung zu Komplex IV zu transportieren, wenn vorgeschaltete Komplexe der Atmungskette blockiert sind. In diesem Zusammenhang wurde MB in einem Rattenmodell als Antidot gegen Komplex IV Hemmer wie Schwefelwasserstoff

[136], Kohlenmonoxid [137] und Zyanid [133] erforscht. Nach erfolgreichen Einsätzen von MB bei Intoxikation mit dem Komplex I Inhibitor Metformin in Fallberichten wird empfohlen die Gabe von MB zu erwägen [138], obwohl in dieser Situation zelldurchgängiges Succinat als Substrat für Komplex II erfolgsversprechender zu sein scheint [139].

4.7 Methodenkritik

4.7.1 Wahl der Zelllinien

Eine Limitation der vorliegenden Arbeit stellt die Wahl der Zelllinien dar. Da dies ein erster Schritt zum Vergleich der Zytotoxizität der blauen Farbstoffe darstellte, wurde zunächst versucht, anhand unterschiedlicher Zelllinien zelltypübergreifende Zytotoxizitätsmerkmale der untersuchten Farbstoffe zu identifizieren. Ob die beobachteten Effekte generalisierbar sind, ist unklar. Dennoch ist zu erwarten, dass Effekte, die in verschiedenen Zelllinien zu beobachten waren, einem allgemein gültigen Muster entsprechen könnten. A549 und L929 Zellen wurden als generelle Indikator-Säugerzelllinien eingesetzt. L929 Zellen werden von der amerikanischen Aufsichtsbehörde Food and Drug Administration (FDA) in der Beurteilung von Zytotoxizität bevorzugt eingesetzt [140], z.B. bei der Beurteilung der Biokompatibilität von Materialien. A549 Zellen sind vor allem wegen ihres initial hohen Glutathiongehalts interessant [141]. HepG2 Zellen kamen als metabolisch kompetente menschliche Zelllinie zum Einsatz [142].

HL-1 Zellen [91] wurden als kontraktile Herzmuskel-Zelllinie eingesetzt, um die Übertragbarkeit der Beobachtungen aus Versuchen in anderen Zelllinien auf Kardiomyozyten zu verifizieren. Aufgrund der technisch aufwändigen Kulturbedingungen wurde diese Zelllinie nur in einzelnen Versuchen eingesetzt. In weiterführenden Versuchen wäre die Verwendung von Kardiomyozyten, Endothelzellen oder Nervenzellen angezeigt, um die Wirkung der Phenothiazinfarbstoffen an diesen spezialisierten Zellen näher zu untersuchen.

4.7.2 Qualität der Zellfraktionierung

Zur Zellfraktionierung stehen mehrere Verfahren zur Verfügung unter anderen mittels osmotischer bzw. mechanischer Lyse oder der „freeze-thaw“ Methode (Lyse durch wiederholtes Einfrieren und Auftauen der Zellen).

Die hier ausgewählte Methode der Zellfraktionierung – mittels mechanisch-unterstützter osmotischer Lyse der Zellen – stellt eine gut etablierte Methode in der Literatur dar [103]. Um die Homogenisierung möglichst schonend durchzuführen, wurden alle Schritte auf Eis vorgenommen. Zur Hemmung der freigesetzten proteolytischen Enzyme kam ein Cocktail von Proteaseinhibitoren zum Einsatz. Die unterschiedlichen Schritte der differentiellen Zentrifugation und Aufreinigung der Organellen waren mit erheblichen Verlusten an Zellmaterial verbunden.

Die Kreuzkontamination durch andere Organellen in den einzelnen Fraktionen schränkte die Aussage der Zellfraktionierung ein, da die Zellkompartimente nur bis zu einem gewissen Grad angereichert werden konnten. Eine Differenzierung von 4 Kompartimenten war jedoch zu erreichen. Gemessen an dem Quotienten Q von Anreicherung zur größten Querkontamination, ließen sich insbesondere Kerne gut isolieren (siehe Tab 3.2). In A549 Zellen war die Mitochondrien-Fraktion durch Kerne verunreinigt, so dass die Aussagekraft in dieser Zelllinie deutlich eingeschränkt ist.

Die Anreicherung war am geringsten für die zytosolische Fraktion. Dies ist möglicherweise dadurch bedingt, dass das Zytosol bereits vor Isolierung den Großteil des Volumens der Zelle darstellt, und ist in diesem Fall nicht als Hinweis auf eine eingeschränkte Qualität der Zytosolaufbereitung zu werten.

Eine weitere Schwierigkeit bot der Störeinfluss der Farbstoffe auf sämtliche spektrophotometrische Methoden aufgrund überlappender Absorptionsspektren. Hierfür wurden ungefärbte Zellen für die Beurteilung der Fraktionierungsqualität zusätzlich zu den farbstoffexponierten Zellen nach demselben Protokoll aufgearbeitet. Da Versuche am Holomonitor zeigten, dass MB und TB erst nach 20 Stunden zu einer ausgeprägten Schwellung der Zellen in Vergleich zu nicht exponierten Zellen führte, konnte nicht ausgeschlossen werden, dass die intrazelluläre Organellverteilung in Farbstoff-exponierten

Zellen erhalten blieb. Dem wurde versucht entgegenzuwirken, indem kürzere Farbstoffexpositionen (2 Stunden) für die Zellfraktionierungsversuche ausgewählt wurden.

Zusammenfassend erlaubte die Zellfraktionierung eine ungefähre Auftrennung der Kompartimente: eine mitochondriale, kernhaltige, Plasmamembran- und zytosolische Fraktion. Diese Auftrennung diente einer groben Sondierung der subzellulären Verteilung der Farbstoffe.

4.7.3 Grenzen der spektrophotometrischen Farbstoffmessung

In der vorliegenden Arbeit wurde lediglich die farbige Form der Phenothiazinfarbstoffe gemessen (MB^+ und TB^+). Die Phenothiazinfarbstoffe werden zwar zu einem großen Teil in der Zelle in der farbigen Form sequestriert [48], es ist dennoch anzunehmen, dass ein nicht vernachlässigbarer Anteil an der Leuko-Base in den Fraktionen vorlag, und in der vorliegenden Arbeit nicht erfasst wurde.

Die Metachromasie von TB und MB stellt die Anwendbarkeit des Beer-Lambert'schen Gesetz in biologischen Matrices in Frage und erschwert die spektrophotometrische Bestimmung des Farbstoffgehaltes in den isolierten Zellfraktionen. Da innerhalb der Zellen vor allem Lysosomen, das endoplasmatische Retikulum und Zellgranula eine ausgeprägte Metachromasie der Phenothiazinfarbstoffe induzieren können [143; 144], wurde auf die Isolation dieser Organellen verzichtet. Es wurden Kerne, Mitochondrien, die Plasmamembran und die zytosolische Fraktion separiert – mit der Annahme, dass in diesen Strukturen die Metachromasie der Farbstoffe folglich vernachlässigbar ist. Für die Kerne beruht diese Annahme auf der Tatsache, dass DNA keine Metachromasie aufweist [145], was teilweise auf die Präsenz von Histonen zurückgeführt wird [43]. Der RNA Gehalt -welcher zur Metachromasie beiträgt- ist im Vergleich zum DNA-Gehalt in den Kernen vernachlässigbar [146].

Die Annahmen bezüglich der Metachromasie der einzelnen Organellen schränken die Aussagen der verwendeten Methoden bezüglich der Farbstoffverteilung ein. Die Zellfraktionierung und die Bestimmung der Farbstoffkonzentrationen in den Fraktionen dienten vornehmlich einer groben

Einschätzung der subzellulären Verteilung von MB und TB sowie der Verifizierung der Präsenz der Phenothiazinfarbstoffe in den Mitochondrien.

4.7.4 Metabolische Untersuchungen

Die metabolischen Versuche basierend auf spektrophotometrischen (XTT- und Glutathion-Test), luminometrischen (ATP-Versuch) und fluorimetrischen Methoden (JC-1 und ROS Test) waren erheblich weniger störanfällig als die Zellfraktionierung, dennoch waren auch hier methodische Limitationen zu verzeichnen. Die Phenothiazinfarbstoffe MB und TB weisen eine Eigenfluoreszenz auf; dies war im Kontext der fluorimetrischen Versuche zu berücksichtigen. MB hat ein Exzitationsmaximum bei 668 nm und ein Emissionsmaximum bei 688 nm [147]. TB hat ein Exzitationsmaximum bei 595 nm und ein Emissionsmaximum bei 660 nm [148]. Hieran orientierte sich die Wahl der Fluoreszenzfarbstoffe und der Detektoren in den durchflusszytometrischen Versuchen, um Störeinflüsse durch die Eigenfluoreszenz der Farbstoffe zu minimieren. Es wurde eine Anregung bei 488 nm, die Messung erfolgte in den Kanälen FL-1 (530 ± 15 nm, Detektion der grünen JC-1-Monomere und der Total-ROS) und FL-2 (585 ± 22 nm, Detektion der roten J-Aggregate) verwendet werden.

Sowohl MB als TB zeichnen sich durch photodynamische Effekte aus [35] im Sinne einer Erzeugung von reaktiven Sauerstoffspezies unter Lichteinfluss. Diese Effekte waren nicht Gegenstand der vorliegenden Untersuchungen, könnten jedoch einen Störeinfluss auf die metabolischen Versuche ausüben – insbesondere auf die ROS-Versuche. Um dies zu vermeiden wurden die Versuche im Dunklen durchgeführt.

Die Expositionszeiten wurden in Anlehnung an die Literatur gewählt, und wichen innerhalb der einzelnen metabolischen Versuche teilweise voneinander ab, was die direkte Vergleichbarkeit der Ergebnisse etwas einschränkte. Aufgrund des zeitlichen Verlaufs des Auftretens von Nebenwirkungen nach Phenothiazinfarbstoffgabe wurden entsprechend kurze Expositionszeiten für die metabolischen Versuche ausgewählt (20 Minuten, 75 Minuten, 2 Stunden und 4 Stunden) [3; 4; 85; 149]. Aufgrund der Instabilität der ROS [99] wurde eine sehr kurze Expositionszeit (20 Minuten) favorisiert.

4.8 Konsequenzen für die klinische Praxis

4.8.1 Aktuelle Situation der Farbstoffe in Chromodiagnostik und Therapie

Im deutschsprachigen Raum wurde TB zum Zeitpunkt der Verfassung dieser Arbeit weiterhin als Erstlinientherapie der Methämoglobinämie vorzugsweise eingesetzt [150]. Die „Bremer Liste“ als Empfehlung einer minimalen Antidota-Ausstattung im Rettungsdienst beinhaltet TB [151; 152] und der Farbstoff ist Teil von Antidotdepots für Massenvergiftungen z.B. in Bayern [153]. Neben TB steht im deutschsprachigen Raum auch MB für die Behandlung der Methämoglobinämie zur Verfügung, weltweit wird lediglich MB als Phenothiazinfarbstoff für diese Indikation empfohlen [154]. Seit den Warnungen der Arzneimittelkommission der deutschen Ärzteschaft wurde zumindest der intraoperative Einsatz von TB zur Darstellung der ableitenden Harnwege in einem deutschen Universitätsklinikum eingestellt und stattdessen Indigokarmin verabreicht [155].

4.8.2 Dosierungsempfehlung

Aus den durchgeführten Versuchen konnten für TB und MB zelllinienübergreifend vier Konzentrationsbereiche abgeleitet werden (siehe auch Tab 4.2):

A: Konzentrationen $\leq 5 \mu\text{M}$: hier zeigten sich mögliche zytoprotektive Effekte in einzelnen Versuchen. Diese Wirkungen waren jedoch nicht zuverlässig in allen Zelllinien anzutreffen.

B: Konzentrationen im Bereich $[5\text{--}50 \mu\text{M}]$: ein neutraler Konzentrationsbereich, wo sich weder zytoprotektive noch toxische Effekte zeigten.

C: Konzentrationen im Intervall $[50\text{--}100 \mu\text{M}]$: in diesem Bereich trat eine metabolische Toxizität auf, gekennzeichnet durch eine mitochondriale Beeinträchtigung und einen erhöhten oxidativen Stress bei erhaltener Vitalität der Zellen.

D: Konzentrationen > 100 µM: in dieser Konzentrationsdomäne konnte eine zelluläre Toxizität festgestellt werden, gemessen als Abnahme des ATP-Gehalts und der Zellvitalität.

	A	B	C	D
Konzentrationsbereich [µM]	[0 ; 5[[5 ; 50[[50 ; 100[≥100–300
Effekte	Zellprotektive Effekte	Neutrale Wirkung	Mitochondriale Toxizität	Zytotoxizität
$\Delta\psi_m$	↑ oder ↔	↔	↓	↓
ATP	↑ oder ↔	↔	↔	↓
ROS	↓ oder ↔	↔	↑ oder ↔	↑
Zellvitalität	↔	↔	↔	↓
Klinische Praxis	Konzentration im Plasma bei niedrig-therapeutischer Dosis	Konzentration im Plasma bei therapeutischer Dosis	Konzentrationen in Zielorganen bei therapeutischer Dosis	Konzentrationen in Zielorganen bei therapeutischer Dosis

Tab 4.2 Metabolische Effekte von Methylenblau und Toluidinblau in unterschiedlichen Konzentrationsbereichen. $\Delta\psi_m$: Mitochondriales Membranpotenzial, ATP: Adenosintriphosphat Gehalt der Zellen, ROS: Reaktive Sauerstoffspezies, ↑: Erhöhte Werte im Vergleich zur Kontrolle, ↓: Erniedrigte Werte im Vergleich zur Kontrolle, ↔: Kein Unterschied zur Kontrolle.

Die in der Literatur angegebenen pharmakokinetischen Daten *in vivo* zeigen (Tab. 1.3), dass die typischen Konzentrationen der Farbstoffe im Blut im Bereich B zu erwarten sind, auch nach hochdosierten Gaben. Tierversuche zeigten jedoch, dass insbesondere am Herzmuskel Gewebskonzentrationen die Bereiche C und D erreichen können. Nach der intravenösen Gabe von 10 mg/kg TB stellten Di Giulio et al [69] in Hunden eine 42-fach höhere Konzentration im Herzmuskel im Vergleich zur Konzentration im Blut fest (151,2 (Herzmuskel) vs. 3,6 (Blut) µg/g Gewebe, entsprechend einer Konzentration von 558 (Herzmuskel) vs. 13,3 (Blut) µM). Wünschenswert wäre es, im diagnostischen und therapeutischen Einsatz von MB und TB Gewebskonzentrationen des Bereichs B nicht zu überschreiten. Um dies zu erreichen, wäre es sinnvoll, den unteren Bereich der empfohlenen Dosisbereiche der Phenothiazinfarbstoffe anzustreben. Diese Tatsache gilt vornehmlich für TB, welches ein höheres Verteilungsvolumen als MB aufzuweisen scheint [71]. Die empfohlene Dosis von 2-4 mg/kg für TB basiert auf Versuchen von Kiese et al. [7], in denen in 31 menschlichen gesunden Probanden die Wirksamkeit von MB und TB zur Behebung einer induzierten Methämoglobinämie verglichen wurde. Es konnte festgestellt werden, dass 1 mg/kg MB marginal wirksamer als 1 mg/kg TB war. Eine Dosiserhöhung auf 2

mg/kg führte zu keiner Zunahme der Wirksamkeit von MB. TB war jedoch bei 2 mg/kg ca. doppelt so wirksam wie MB. Eine Dosis von 4 mg/kg TB zeigte eine fast 3-fach höhere Wirksamkeit im Vergleich zu einer 1 mg/kg Dosis MB. MB konnte aufgrund von Nebenwirkungen (Übelkeit, Schwitzen, Parästhesien) in dieser Dosierung nicht gegeben werden. Dies steht in Kontrast zu dem vorteilhaften Sicherheitsprofil von MB [77], insbesondere im Vergleich zu TB: in sämtlichen untersuchten Tiermodellen (Ratte, Maus, Schaf) wies MB höhere LD₅₀ Werte als TB auf und schwerwiegende kardiovaskuläre Komplikationen sind bei MB in der Literatur lediglich indirekt in Form einer möglichen Auslösung eines Serotonin-Syndroms bei gleichzeitiger Behandlung mit serotonergen Substanzen beschrieben [80]. Über TB hingegen legen neben älteren Berichte über transiente Herzrhythmusstörungen (T Wellen Abflachung, PQ Verlängerung [126], AV-Knotenersatzrhythmus [156] und ST-Senkung [69]), seit 2008 Berichte über maligne Arrhythmien vor, die in mehreren Fällen zu Reanimationsmaßnahmen führten [2]. Neben der Dosis scheint auch die Infusionsgeschwindigkeit eine Rolle zu spielen. Klopfer et al. [157] stellten eine kardiotoxische Wirkung bei Hunden fest bei einer TB-Infusionsdauer von 10-15 Minuten, welche durch Verdünnung der Lösung oder durch eine langsamere Gabe aufgehoben werden konnte. Owens et al. [158] stellten ebenfalls die Reversibilität von EKG Veränderungen durch Reduktion der TB Infusionsgeschwindigkeit fest. Zusammenfassend kann betont werden, dass eine Bevorzugung von geringeren Dosen der Phenothiazinfarbstoffe und längeren Infusionszeiten wahrscheinlich vorteilhaft wäre. Die von Kiese et al beschriebene höhere Wirksamkeit von TB zur Korrektur der Methämoglobinämie scheint die beachtlichen Risiken von hochdosierten Gaben nicht auszugleichen, zumal MB weltweit eine wirksame und sichere Therapie darstellt [159]. Was den Einsatz der Phenothiazinfarbstoffe zur intraoperativen Färbung betrifft, scheint eine Dosisreduktion ebenfalls möglich zu sein. Untersuchungen an Ratten haben gezeigt, dass eine zehnfach verringerte Dosis (0,4 mg/kg) in diesem Tiermodell zu einer ausreichenden Färbung des Harns führte [5]. Zur intraoperativen Darstellung der Epithelkörperchen werden zwar 3 – 7,5 mg/kg MB gegeben [67], eine Dosis von 0,4-0,5 mg/kg MB war jedoch ausreichend, um die Fluoreszenz der

Farbstoffe zur Identifizierung der Nebenschilddrüsen [160] oder der ableitenden Harnwege [147] auszunutzen.

4.8.3 Schlussfolgerung

Die *in vitro* Untersuchungen der vorliegenden Arbeit zeigen eindeutig, dass TB ein deutlich ungünstigeres Nutzen-Risiko-Profil im Vergleich zu MB und IK aufweist. In Bezug auf Vitalität und ATP Gehalt der Zellen war TB toxischer als MB, während IK sich weitgehend inert verhielt. Ähnlich wie MB scheint eine metabolische Toxizität mit einer Beeinträchtigung der mitochondrialen Funktion ab Konzentrationen von 50 μM aufzutreten, TB verursachte oberhalb dieser Konzentration zusätzlich oxidativen Stress. In Bezug auf Hinweise auf eine zellprotektive Wirkung bei deutlich niedrigeren Konzentrationen ($< 5 \mu\text{M}$) scheint es keinen Vorteil von TB gegenüber MB zu geben.

Aus diesen Gründen und bei der Häufung von schweren kardiovaskulären Komplikationen nach TB Gabe erscheint die Präferenz von TB gegenüber MB im deutschsprachigen Raum fragwürdig. Aufgrund der von Kiese et al. [7] festgestellten höheren Wirksamkeit von TB im Vergleich zu MB, wäre TB als Zweitlinientherapie bei Wirkungslosigkeit von MB besser geeignet. Für intraoperative Färbungen stellen MB und IK ebenfalls Alternativen mit geringerer Toxizität dar. Sollte TB gegeben werden, empfiehlt sich den unteren therapeutischen Dosisbereich sowie eine langsame Gabe als Kurzinfusion über mindestens 20 Minuten [157] einzustellen, um das kurzzeitige Auftreten lokal hoher Gewebekonzentrationen, die mit einer erheblichen Toxizität assoziiert sind, zu vermeiden.

5 Zusammenfassung

TB, MB und IK sind blaue Farbstoffe mit zahlreichen medizinischen Anwendungen, sei es als Antidota bei Vergiftungen mit Methämoglobinbildnern (MB und TB) oder als intraoperative Färbesubstanzen (MB, TB und IK). Die therapeutische Breite dieser Farbstoffe ist jedoch nicht ausreichend untersucht. Insbesondere bei TB häuften sich Hinweise auf eine erhöhte Toxizität, in Form von unmittelbar nach intravenöser Gabe auftretenden kreislaufwirksamen Herzrhythmusstörungen.

Es gelang in dieser Arbeit erstmalig, einen Vergleich der Zytotoxizität von MB, TB und IK in Indikatorzelllinien durchzuführen und die toxischen Konzentrationsbereiche der Phenothiazinfarbstoffe genauer zu charakterisieren. In Bezug auf metabolische und zelluläre Toxizität war TB giftiger als MB. Beide Phenothiazinfarbstoffe waren toxischer als IK, welches praktisch keinen Einfluss auf metabolische Parameter in klinisch relevanten Konzentrationen hatte. Niedrig-konzentrierte MB- und TB-Expositionen ($< 5 \mu\text{M}$) schützten Zellen teilweise vor oxidativem Stress. Bei intermediären Konzentrationen ($50\text{-}100 \mu\text{M}$) zeigte sich eine metabolische Toxizität (Abfall des mitochondrialen Membranpotenzial, Anstieg der ROS Produktion bei TB-exponierten Zellen). Bei höheren Konzentrationen kam es zu einem Abfall des intrazellulären ATP und zum Absterben der Zellen. MB und TB waren in allen isolierten Zellkompartimenten zu messen, vor allem auch in Mitochondrien, während IK größtenteils extrazellulär blieb.

Die beobachtete metabolische und insbesondere mitochondriale Toxizität könnte der Auslöser kardialer Arrhythmien sein und zu den beobachteten Herzrhythmusstörungen nach TB Exposition führen, sofern die Beobachtungen auf *in vivo* Situationen übertragen werden können.

MB und IK haben ein deutlich vorteilhafteres Risikoprofil im Vergleich zu TB, in der klinischen Praxis sollte der Einsatz von MB als Antidot bei Methämoglobinämie vorgezogen werden, TB eignet sich hier allenfalls als Zweitlinientherapie. Als intraoperative Färbesubstanzen stellen MB und IK Optionen mit einem vorteilhafteren Sicherheitsprofil dar, und Dosisreduktionen

ohne Einbußen an chromodiagnostischer Aussagekraft sind in vielen klinischen Szenarien möglich.

6 Anhang

6.1 Abbildungsverzeichnis

Abb 1.1 Methylenblau und Toluidinblau	10
Abb 1.2 Redoxcycling von Phenothiazinfarbstoffen	11
Abb 1.3 Promethazin.	12
Abb 1.4 Indigokarmin	12
Abb 1.5 Redox-Cycling von Methylenblau.	14
Abb 2.1 Luciferin-Luciferase Reaktion.	29
Abb 2.2 Schematische Darstellung der Zellfraktionierung.	36
Abb 2.3 Reduktion von Pyruvat zu Laktat durch die Laktathydrogenase (LDH) mit NADH als Kofaktor.	43
Abb 2.4 Absorptionsspektrum von Toluidinblau in HBSS und im Homogenisat.	44
Abb 3.1 Digital rekonstruierte Bilder von Kontroll- und Toluidinblauexponierten L929 Zellen aus holographischer Mikroskopie:	46
Abb 3.2 Größenzunahme von A549 und L929 Zellen nach PhenothiazinFarbstoffexposition:	46
Abb 3.3 Zellvitalität nach 2-stündiger Farbstoffexposition in A549 und L929 Zellen.	47
Abb 3.4 Adenosintriphosphat (ATP) Gehalt von Farbstoffexponierten A549 und L929 Zellen.	48
Abb 3.5 Konzentrations-Wirkungs-Kurven von Toluidinblau und Methylenblau für die Abnahme des Adenosintriphosphat Gehalt in A549 und L929 Zellen.	49
Abb 3.6 Mitochondriale Depolarisation von A549, L929 und HepG2 nach 75- minütiger Toluidinblauexposition.....	51
Abb 3.7 Mitochondriales Membranpotenzial in A549, L929 und HepG2 Zellen nach 75-minütiger Methylenblau Exposition.	52
Abb 3.8 Mitochondriales Membranpotenzial in A549, L929 und HepG2 Zellen nach 75-minütiger Indigokarmin Exposition.	52
Abb 3.9 Mitochondriales Membranpotenzial in A549, L929 und HepG2 Zellen nach 75-minütiger Promethazin Exposition.	53

Abb 3.10 Mitochondriales Membranpotenzial von A549, L929 und HepG2 Zellen nach vierstündiger Toluidinblau Exposition.	53
Abb 3.11 Mitochondriales Membranpotenzial von A549, L929 und HepG2 Zellen nach vierstündiger Methylenblau Exposition.	54
Abb 3.12 Mitochondriales Membranpotenzial von A549, L929 und HepG2 Zellen nach vierstündiger Indigokarmin Exposition.	54
Abb 3.13 Vergleich der Wirkung von Methylenblau, Toluidinblau und Indigokarmin auf das mitochondriale Membranpotenzial.	55
Abb 3.14 Reaktive Sauerstoffspezies Produktion in A549, L929 und HepG2 Zellen nach Toluidinblauexposition.	57
Abb 3.15 Reaktive Sauerstoffspezies Produktion in A549, L929 und HepG2 Zellen nach MB Exposition.	58
Abb 3.16 Reaktive Sauerstoffspezies Produktion in A549, L929 und HepG2 Zellen nach Indigokarminexposition.	59
Abb 3.17 Glutathion Gehalt nach 20-minütiger Phenothiazinfarbstoffexposition	60
Abb 3.18 Reaktive Sauerstoffspezies Produktion nach Wasserstoffperoxid-Exposition in Phenothiazinfarbstoff-vorinkubierten Zellen.	61
Abb 3.19 Anreicherung von organellspezifischen Markernzymen in isolierten Fraktionen:.....	63
Abb 3.20 Phasenkontrastbilder von L929 Zellen in Medium (nativ) und nach mechanischer Lyse und Homogenisierung:.....	64
Abb 3.21 Prozentuale Farbstoffverteilung in der Zellfraktionierung von A549 und L929 Zellen.	66

6.2 Tabellenverzeichnis

Tab 1.1 Übersicht über gängige, <i>off-label</i> und erforschte medizinische Anwendungen von Methylenblau (MB) und Toluidinblau (TB).	9
Tab 1.2 Absorptionsmaximum und Redoxpotenzial von Methylenblau (MB), Toluidinblau (TB) und Indigokarmin (IK).	13
Tab 1.3 Pharmakokinetische Eigenschaften von intravenösem Indigokarmin, Methylenblau und Toluidinblau.	17

Tab 3.1 Relative-IC ₅₀ in Bezug auf die Reduktion des mitochondrialen Membranpotenzials.	56
Tab 3.2 Anreicherungen und Kreuzkontaminationen der Markerenzyme für die isolierten Fraktionen von A549 und L929 Zellen.	64
Tab 3.3 Prozentualer Anteil des von den Zellen aufgenommenen Farbstoffs am initial verabreichten Farbstoff.	65
Tab 3.4 Prozentuale Farbstoffverteilung in der Zellfraktionierung von A549 und L929 Zellen.	67
Tab 3.5 Absolute Farbstoffverteilung in der Zellfraktionierung von A549 und L929 Zellen.	68

Literaturverzeichnis

1. Mitteilungen: Arzneimittelkommission der deutschen Ärzteschaft: „Aus der UAW-Datenbank“ - Schwerwiegende Kreislaufreaktionen nach intravenöser Gabe von Toluidinblau® zur Darstellung der ableitenden Harnwege. Dtsch Arztebl Int. 2008;105(28-29):1570.
2. Ludwig S, Baethge C. Lebensbedrohliche Kreislaufreaktionen auf Toluidinblau. Dtsch Arztebl Int. 2010;107(31-32):A-1496-A-.
3. Radke OC, Hoffmann C, Klut I, Koch T. Kammerflimmern nach Toluidinblau. Anaesthesist. 2011;60(5):446-50.
4. Zieger J, Siegert N, Reddersen S, Hirsch P, Stricker E, Schädle B, et al. Kammerflimmern nach i. v. Gabe von Toluidinblau. Arzneimitteltherapie. 2008(26):461-3.
5. Petrat F, Hartmann M, Schmidt E, Grabellus F, Hamburger T, de Groot H. Toluidine blue for the intraoperative staining of the ureters. Studies on the safe administration in rats. Langenbecks Arch Surg. 2012;397(6):983-93.
6. Fachinformation Toluidinblau Injektionslösung, Klinische Angaben. Dr. Franz Köhler Chemie. 2010.
7. Kiese M, Lörcher W, Weger N, Zierer A. Comparative studies on the effects of toluidine blue and methylene blue on the reduction of ferrihaemoglobin in man and dog. Eur J Clin Pharmacol. 4(2):115-8.
8. Barnes TG, Hompes R, Birks J, Mortensen NJ, Jones O, Lindsey I, et al. Methylene blue fluorescence of the ureter during colorectal surgery. Surgical Endoscopy. 2018;32(9):4036-43.
9. Rosen IB, Bohnen DR, Walfish PG. The use of toluidine blue in locating abnormal parathyroid tissue at operation. Can Med Assoc J. 1974;110(4):393-6.
10. Schirmer RH, Adler H, Pickhardt M, Mandelkow E. "Lest we forget you--methylene blue...". Neurobiol Aging. 2011;32(12):2325 e7-16.
11. Stawicki SP, Sims C, Sarani B, Grossman MD, Gracias VH. Methylene blue and vasoplegia: who, when, and how? Mini Rev Med Chem. 2008;8(5):472-90.
12. Monson FC, Wein AJ, McKenna BA, Whitmore K, Levin RM. Indigocarmine as a quantitative indicator of urothelial integrity. J Urol. 1991;145(4):842-5.
13. Lee M, Sharifi R. Methylene blue versus indigo carmine. Urology. 1996;47(5):783-4.
14. Coulibaly B, Zoungrana A, Mockenhaupt FP, Schirmer RH, Klose C, Mansmann U, et al. Strong Gametocytocidal Effect of Methylene Blue-Based Combination Therapy against Falciparum Malaria: A Randomised Controlled Trial. PLoS ONE. 2009;4(5):e5318.
15. Farber PM, Arscott LD, Williams CH, Jr., Becker K, Schirmer RH. Recombinant Plasmodium falciparum glutathione reductase is inhibited by the antimalarial dye methylene blue. FEBS Lett. 1998;422(3):311-4.

16. Vennerstrom JL, Makler MT, Angerhofer CK, Williams JA. Antimalarial dyes revisited: xanthenes, azines, oxazines, and thiazines. *Antimicrob Agents Chemother*. 1995;39(12):2671-7.
17. Shanmugam G. Vasoplegic syndrome--the role of methylene blue. *Eur J Cardiothorac Surg*. 2005;28(5):705-10.
18. Schenk P, Madl C, Rezaie-Majd S, Lehr S, Muller C. Methylene blue improves the hepatopulmonary syndrome. *Ann Intern Med*. 2000;133(9):701-6.
19. Kupfer A, Aeschlimann C, Wermuth B, Cerny T. Prophylaxis and reversal of ifosfamide encephalopathy with methylene-blue. *Lancet*. 1994;343(8900):763-4.
20. Wondrak GT. NQO1-activated phenothiazinium redox cyclers for the targeted bioreductive induction of cancer cell apoptosis. *Free Radic Biol Med*. 2007;43(2):178-90.
21. O'Leary JL, Petty J, Harris AB, Inukai J. Supravital staining of mammalian brain with intra-arterial methylene blue followed by pressurized oxygen. *Stain Technol*. 1968;43(4):197-201.
22. Riaz A, Shreedhar B, Kamboj M, Natarajan S. Methylene blue as an early diagnostic marker for oral precancer and cancer. *Springerplus*. 2013;2(1):95.
23. Sridharan G, Shankar AA. Toluidine blue: A review of its chemistry and clinical utility. *J Oral Maxillofac Pathol*. 2012;16(2):251-5.
24. Bays J, Lewman LV. Toluidine blue in the detection at autopsy of perineal and anal lacerations in victims of sexual abuse. *Arch Pathol Lab Med*. 1992;116(6):620-1.
25. Ormeci N, Savas B, Coban S, Palabiyikoglu M, Ensari A, Kuzu I, et al. The usefulness of chromoendoscopy with methylene blue in Barrett's metaplasia and early esophageal carcinoma. *Surg Endosc*. 2008;22(3):693-700.
26. Gura T. Hope in Alzheimer's fight emerges from unexpected places. *Nat Med*. 2008;14(9):894.
27. Hattori M, Sugino E, Minoura K, In Y, Sumida M, Taniguchi T, et al. Different inhibitory response of cyanidin and methylene blue for filament formation of tau microtubule-binding domain. *Biochem Biophys Res Commun*. 2008;374(1):158-63.
28. Cawein M, Behlen CH, 2nd, Lappat EJ, Cohn JE. Hereditary Diaphorase Deficiency and Methemoglobinemia. *Arch Intern Med*. 1964;113:578-85.
29. Boylston M, Beer D. Methemoglobinemia: a case study. *Crit Care Nurse*. 2002;22(4):50-5.
30. Clifton J, 2nd, Leikin JB. Methylene blue. *Am J Ther*. 2003;10(4):289-91.
31. Daunderer M. Antidot-Therapie: Toluidinblau bei Methämoglobinämie. *Fortschr Med*. 1980;98(13):462-4.
32. Alston TA. Why does methylene blue reduce methemoglobin in benzocaine poisoning but beneficially oxidize hemoglobin in cyanide poisoning? *J Clin Anesth*. 2014;26(8):702-3.

33. Salah M, Samy N, Fadel M. Methylene blue mediated photodynamic therapy for resistant plaque psoriasis. *J Drugs Dermatol*. 2009;8(1):42-9.
34. Müller-Breitkreutz K, Mohr H. Hepatitis C and human immunodeficiency virus RNA degradation by methylene blue/light treatment of human plasma. *J Med Virol*. 1998;56(3):239-45.
35. Usacheva MN, Teichert MC, Biel MA. Comparison of the methylene blue and toluidine blue photobactericidal efficacy against gram-positive and gram-negative microorganisms. *Lasers Surg Med*. 2001;29(2):165-73.
36. Zolfaghari PS, Packer S, Singer M, Nair SP, Bennett J, Street C, et al. In vivo killing of *Staphylococcus aureus* using a light-activated antimicrobial agent. *BMC Microbiol*. 2009;9:27.
37. Van der Horst C, Stuebinger H, Seif C, Melchior D, Martínez-Portillo FJ, Juenemann KP. Priapism: etiology, pathophysiology and management. *International braz j urol*. 2003;29:391-400.
38. Sutherland AD, Faragher IG, Frizelle FA. Intradermal injection of methylene blue for the treatment of refractory pruritus ani. *Colorectal Disease*. 2009;11(3):282-7.
39. Tratnyek PG, Reilkoff TE, Lemon AW, Scherer MM, Balko BA, Feik LM, et al. Visualizing Redox Chemistry: Probing Environmental Oxidation–Reduction Reactions with Indicator Dyes. *Chem Educat*. 2001;6(3):172-9.
40. Ju H, Zhou J, Cai C, Chen H. The electrochemical behavior of methylene blue at a microcylinder carbon fiber electrode. *Electroanalysis*. 1995;7(12):1165-70.
41. Cragan JD. Teratogen update: Methylene blue. *Teratology*. 1999;60(1):42-8.
42. D'Ilario L, Martinelli A. Toluidine blue: aggregation properties and structural aspects. *Modelling and Simulation in Materials Science and Engineering*. 2006;14(4):581-95.
43. Modis L. *Organization of the Extracellular Matrix: A Polarization Microscope Approach*; CRC Press; 1991.
44. Efsa Panel on Food additives. Scientific Opinion on the re-evaluation of Indigo Carmine (E 132) as a food additive. *EFSA Journal*. 2014;12(7):3768.
45. Felix EP, de Souza KA, Dias CM, Cardoso AA. Measurements of ambient ozone using indigo blue-coated filters. *J AOAC Int*. 2006;89(2):480-5.
46. Liu XW, Sun XF, Chen JJ, Huang YX, Xie JF, Li WW, et al. Phenothiazine derivative-accelerated microbial extracellular electron transfer in bioelectrochemical system. *Sci Rep*. 2013;3:1616.
47. Bongard RD, Merker MP, Shundo R, Okamoto Y, Roerig DL, Linehan JH, et al. Reduction of thiazine dyes by bovine pulmonary arterial endothelial cells in culture. *Am J Physiol*. 1995;269(1 Pt 1):L78-84.
48. May JM, Qu ZC, Cobb CE. Reduction and uptake of methylene blue by human erythrocytes. *Am J Physiol Cell Physiol*. 2004;286(6):C1390-8.

49. May JM, Qu ZC, Whitesell RR. Generation of oxidant stress in cultured endothelial cells by methylene blue: protective effects of glucose and ascorbic acid. *Biochem Pharmacol.* 2003;66(5):777-84.
50. Olson LE, Merker MP, Patel MK, Bongard RD, Daum JM, Johns RA, et al. Cyanide increases reduction but decreases sequestration of methylene blue by endothelial cells. *Ann Biomed Eng.* 2000;28(1):85-93.
51. Merker MP, Bongard RD, Linehan JH, Okamoto Y, Vyprachticky D, Brantmeier BM, et al. Pulmonary endothelial thiazine uptake: separation of cell surface reduction from intracellular reoxidation. *Am J Physiol.* 1997;272(4 Pt 1):L673-80.
52. Poteet E, Winters A, Yan LJ, Shufelt K, Green KN, Simpkins JW, et al. Neuroprotective actions of methylene blue and its derivatives. *PLoS One.* 2012;7(10):e48279.
53. Atamna H, Nguyen A, Schultz C, Boyle K, Newberry J, Kato H, et al. Methylene blue delays cellular senescence and enhances key mitochondrial biochemical pathways. *FASEB J.* 2008;22(3):703-12.
54. Bruchey AK, Gonzalez-Lima F. Behavioral, Physiological and Biochemical Hormetic Responses to the Autoxidizable Dye Methylene Blue. *Am J Pharmacol Toxicol.* 2008;3(1):72-9.
55. Calabrese EJ, Bachmann KA, Bailer AJ, Bolger PM, Borak J, Cai L, et al. Biological stress response terminology: Integrating the concepts of adaptive response and preconditioning stress within a hormetic dose-response framework. *Toxicol Appl Pharmacol.* 2007;222(1):122-8.
56. Sikka P, Bindra VK, Kapoor S, Jain V, Saxena KK. Blue cures blue but be cautious. *J Pharm Bioallied Sci.* 2011;3(4):543-5.
57. McDonagh EM, Bautista JM, Youngster I, Altman RB, Klein TE. PharmGKB summary: methylene blue pathway. *Pharmacogenet Genomics.* 2013;23(9):498-508.
58. Haouzi P, McCann M, Tubbs N, Judenherc-Haouzi A, Cheung J, Bouillaud F. Antidotal Effects of the Phenothiazine Chromophore Methylene Blue Following Cyanide Intoxication. *Toxicol Sci.* 2019.
59. Wolin MS, Cherry PD, Rodenburg JM, Messina EJ, Kaley G. Methylene blue inhibits vasodilation of skeletal muscle arterioles to acetylcholine and nitric oxide via the extracellular generation of superoxide anion. *J Pharmacol Exp Ther.* 1990;254(3):872-6.
60. Gillman PK. Methylene blue is a potent monoamine oxidase inhibitor. *Can J Anaesth.* 2008;55(5):311-2; author reply 2.
61. Jo SH, Hong HK, Chong SH, Lee HS, Choe H. H(1) antihistamine drug promethazine directly blocks hERG K(+) channel. *Pharmacol Res.* 2009;60(5):429-37.
62. Davies J, Burke D, Olliver JR, Hardie LJ, Wild CP, Routledge MN. Methylene blue but not indigo carmine causes DNA damage to colonocytes in vitro and in vivo at concentrations used in clinical chromoendoscopy. *Gut.* 2007;56(1):155-6.

63. Chang KS, Zhong Mz Fau - Davis RF, Davis RF. Indigo carmine inhibits endothelium-dependent and -independent vasodilation. (0194-911X (Print)).
64. Jeffords DL, Lange PH, DeWolf WC. Severe hypertensive reaction to indigo carmine. *Urology*. 1977;9(2):180-1.
65. Harioka T, Mori H, Mori K. Hypertensive reaction to indigo carmine during transurethral resection of a bladder tumor. *Anesth Analg*. 1987;66(10):1049.
66. Aeschlimann C, Cerny T, Kupfer A. Inhibition of (mono)amine oxidase activity and prevention of ifosfamide encephalopathy by methylene blue. *Drug Metab Dispos*. 1996;24(12):1336-9.
67. Pollack G, Pollack A, Delfiner J, Fernandez J. Parathyroid surgery and methylene blue: a review with guidelines for safe intraoperative use. *Laryngoscope*. 2009;119(10):1941-6.
68. DiSanto Ar Fau - Wagner JG, Wagner JG. Pharmacokinetics of highly ionized drugs. 3. Methylene blue--blood levels in the dog and tissue levels in the rat following intravenous administration. (0022-3549 (Print)).
69. Di Giulio W, Lindenauer SM. Use of tolonium chloride in localization of parathyroid tissue. *Jama*. 1970;214(13):2302-6.
70. Micromedex® 2.0, (electronic version). Truven Health Analytics, Greenwood Village, Colorado, USA. Available at: <http://www.micromedexsolutions.com/> (cited:09/12/2017).
71. Cudd LA, Burrows GE, Clarke CR. Pharmacokinetics and toxicity of tolonium chloride in sheep. *Vet Hum Toxicol*. 1996;38(5):329-32.
72. Peter C, Hongwan D, Kupfer A, Lauterburg BH. Pharmacokinetics and organ distribution of intravenous and oral methylene blue. *Eur J Clin Pharmacol*. 2000;56(3):247-50.
73. Troy DB, Remington JP, Beringer P. Remington: The Science and Practice of Pharmacy: Lippincott Williams & Wilkins; 2006.
74. Walter-Sack I, Rengelshausen J, Oberwittler H, Burhenne J, Mueller O, Meissner P, et al. High absolute bioavailability of methylene blue given as an aqueous oral formulation. *Eur J Clin Pharmacol*. 2009;65(2):179-89.
75. Archer EG, Potchen EJ, Studer R, Siegel B. Tissue distribution of ¹²⁵I-toluidine blue in the rat. *J Nucl Med*. 1972;13(1):85-91.
76. Burrows GE. Methylene blue: effects and disposition in sheep. *J Vet Pharmacol Ther*. 1984;7(3):225-31.
77. Oz M, Lorke DE, Hasan M, Petroianu GA. Cellular and molecular actions of Methylene Blue in the nervous system. *Med Res Rev*. 2011;31(1):93-117.
78. Haley TJ, Stolarsky F. A study of the acute and chronic toxicity of toluidine blue and related phenazine and thiazine dyes. *Stanford Med Bull*. 1951;9(2):96-100.
79. Lewis RJS. Sax's Dangerous Properties of Industrial Materials, 11th Edition By Richard J. Lewis. *Journal of the American Chemical Society*. 2005;127(8):1749.

80. Hashmi AT, Gupta SS, Shankar S, Seneviratne C, Yoon TS, Kupfer Y. Life-Threatening Serotonin Syndrome Due to Methylene Blue-Citalopram Interaction. *Am J Ther*. 2019.
81. Smith CJ, Wang D, Sgambelluri A, Kramer RS, Gagnon DJ. Serotonin syndrome following methylene blue administration during cardiothoracic surgery. *J Pharm Pract*. 2015;28(2):207-11.
82. Hencken L, To L, Ly N, Morgan JA. Serotonin Syndrome Following Methylene Blue Administration for Vasoplegic Syndrome. *J Card Surg*. 2016;31(4):208-10.
83. Nicolaou G, Lee D. Methylene blue-induced serotonin syndrome presenting with ocular clonus and failure of emergence from general anesthesia. *Can J Anaesth*. 2016.
84. Teunis BS, Leftwich EI, Pierce LE. Acute methemoglobinemia and hemolytic anemia due to toluidine blue. *Arch Surg*. 1970;101(4):527-31.
85. Sills MR, Zinkham WH. Methylene blue-induced Heinz body hemolytic anemia. *Arch Pediatr Adolesc Med*. 1994;148(3):306-10.
86. McFadyen I. The dangers of intra-amniotic methylene blue. *Br J Obstet Gynaecol*. 1992;99(2):89-90.
87. Mahadevan MM, Weitzman GA, Hogan S, Breckinridge S, Miller MM. Methylene blue but not indigo carmine is toxic to human luteal cells in vitro. *Reprod Toxicol*. 1993;7(6):631-3.
88. Auerbach SS, Bristol DW, Peckham JC, Travlos GS, Hebert CD, Chhabra RS. Toxicity and carcinogenicity studies of methylene blue trihydrate in F344N rats and B6C3F1 mice. *Food Chem Toxicol*. 2010;48(1):169-77.
89. Shir Y, Raja SN. Indigo carmine-induced severe hypotension in patients undergoing radical prostatectomy. *Anesthesiology*. 1993;79(2):378-81.
90. Lee WJ, Jang HS. Cardiac arrest from intravenous indigo carmine during laparoscopic surgery -A case report. *Korean J Anesthesiol*. 2012;62(1):87-90.
91. Claycomb WC, Lanson NA, Jr., Stallworth BS, Egeland DB, Delcarpio JB, Bahinski A, et al. HL-1 cells: a cardiac muscle cell line that contracts and retains phenotypic characteristics of the adult cardiomyocyte. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1998;95(6):2979-84.
92. Alm K E-SZ, Falck Miniotis M, Gjörlöf Wingren A, Janicke B et al. Holograms and digital holographic microscopy as a tool to study the morphology of living cells. In: Mihaylova E, editor. *Holography - Basic Principles and Contemporary Applications: In Tech*; 2013. p. 335-51.
93. Scudiero DA, Shoemaker RH, Paull KD, Monks A, Tierney S, Nofziger TH, et al. Evaluation of a soluble tetrazolium/formazan assay for cell growth and drug sensitivity in culture using human and other tumor cell lines. *Cancer Res*. 1988;48(17):4827-33.
94. Stockert JC, Horobin RW, Colombo LL, Blazquez-Castro A. Tetrazolium salts and formazan products in Cell Biology: Viability assessment, fluorescence imaging, and labeling perspectives. *Acta Histochem*. 2018;120(3):159-67.

95. Berridge MV, Herst PM, Tan AS. Tetrazolium dyes as tools in cell biology: new insights into their cellular reduction. *Biotechnol Annu Rev.* 2005;11:127-52.
96. Chen LB. Mitochondrial membrane potential in living cells. *Annu Rev Cell Biol.* 1988;4:155-81.
97. Perelman A, Wachtel C, Cohen M, Haupt S, Shapiro H, Tzur A. JC-1: alternative excitation wavelengths facilitate mitochondrial membrane potential cytometry. *Cell Death Dis.* 2012;3(11):e430.
98. Chazotte B. Labeling mitochondria with JC-1. *Cold Spring Harb Protoc.* 2011;2011(9).
99. Griendling KK, Touyz RM, Zweier JL, Dikalov S, Chilian W, Chen YR, et al. Measurement of Reactive Oxygen Species, Reactive Nitrogen Species, and Redox-Dependent Signaling in the Cardiovascular System: A Scientific Statement From the American Heart Association. *Circ Res.* 2016;119(5):e39-75.
100. Promega. Luciferase Assay System Protocol. Technical Bulletin: Promega; 2011.
101. Graff RD, Lee GM. Microplate live cell assay system for early events in mechanotransduction. *Anal Biochem.* 2003;318(2):181-6.
102. Tietze F. Enzymic method for quantitative determination of nanogram amounts of total and oxidized glutathione: applications to mammalian blood and other tissues. *Anal Biochem.* 1969;27(3):502-22.
103. Harford JB, Bonifacino JS. Subcellular Fractionation and Isolation of Organelles. *Curr Protoc Cell Biol.* 2011;52(1):3.0.1-3.0.8.
104. Bagwell CB, Adams EG. Fluorescence spectral overlap compensation for any number of flow cytometry parameters. *Ann N Y Acad Sci.* 1993;677:167-84.
105. Dimauro I, Pearson T, Caporossi D, Jackson MJ. A simple protocol for the subcellular fractionation of skeletal muscle cells and tissue. *BMC Res Notes.* 2012;5:513.
106. Cox B, Emili A. Tissue subcellular fractionation and protein extraction for use in mass-spectrometry-based proteomics. *Nature Protocols.* 2006;1(4):1872-8.
107. Bradford MM. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem.* 1976;72:248-54.
108. Stoscheck CM. Quantitation of protein. *Methods Enzymol.* 1990;182:50-68.
109. Zor T, Selinger Z. Linearization of the Bradford protein assay increases its sensitivity: theoretical and experimental studies. *Anal Biochem.* 1996;236(2):302-8.
110. Burton K. A study of the conditions and mechanism of the diphenylamine reaction for the colorimetric estimation of deoxyribonucleic acid. *Biochem J.* 1956;62(2):315-23.

111. Green JD, Narahara HT. Assay of succinate dehydrogenase activity by the tetrazolium method: evaluation of an improved technique in skeletal muscle fractions. *J Histochem Cytochem.* 1980;28(5):408-12.
112. Société Française de Biologie Clinique. *Ann Biol Clin (Paris).* 1982;40:160.
113. Rojas JC, Bruchey AK, Gonzalez-Lima F. Neurometabolic mechanisms for memory enhancement and neuroprotection of methylene blue. *Prog Neurobiol.* 2012;96(1):32-45.
114. Meyer JN, Hartman JH, Mello DF. Mitochondrial Toxicity. *Toxicol Sci.* 2018;162(1):15-23.
115. Brand MD, Affourtit C, Esteves TC, Green K, Lambert AJ, Miwa S, et al. Mitochondrial superoxide: production, biological effects, and activation of uncoupling proteins. *Free Radic Biol Med.* 2004;37(6):755-67.
116. Brown DA, O'Rourke B. Cardiac mitochondria and arrhythmias. *Cardiovasc Res.* 2010;88(2):241-9.
117. Hu X, Laguerre V, Packert D, Nakasone A, Moscinski L. A Simple and Efficient Method for Preparing Cell Slides and Staining without Using Cytocentrifuge and Cytoclips. *Int J Cell Biol.* 2015;2015:813216.
118. Epstein JB, Oakley C, Millner A, Emerton S, van der Meij E, Le N. The utility of toluidine blue application as a diagnostic aid in patients previously treated for upper oropharyngeal carcinoma. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod.* 1997;83(5):537-47.
119. O'Rourke B, Ramza BM, Marban E. Oscillations of membrane current and excitability driven by metabolic oscillations in heart cells. *Science.* 1994;265(5174):962-6.
120. Akar FG, Aon MA, Tomaselli GF, O'Rourke B. The mitochondrial origin of postischemic arrhythmias. *J Clin Invest.* 2005;115(12):3527-35.
121. Aon MA, Cortassa S, Akar FG, Brown DA, Zhou L, O'Rourke B. From mitochondrial dynamics to arrhythmias. *Int J Biochem Cell Biol.* 2009;41(10):1940-8.
122. Aon MA, Cortassa S, Marban E, O'Rourke B. Synchronized whole cell oscillations in mitochondrial metabolism triggered by a local release of reactive oxygen species in cardiac myocytes. *J Biol Chem.* 2003;278(45):44735-44.
123. Akar FG, O'Rourke B. Mitochondria are sources of metabolic sink and arrhythmias. *Pharmacol Ther.* 2011;131(3):287-94.
124. Zorov DB, Filburn CR, Klotz LO, Zweier JL, Sollott SJ. Reactive oxygen species (ROS)-induced ROS release: a new phenomenon accompanying induction of the mitochondrial permeability transition in cardiac myocytes. *J Exp Med.* 2000;192(7):1001-14.
125. Ryu SY, Lee SH, Ho WK. Generation of metabolic oscillations by mitoKATP and ATP synthase during simulated ischemia in ventricular myocytes. *J Mol Cell Cardiol.* 2005;39(6):874-81.
126. Yeager RM, Krementz ET. Toluidine blue in identification of parathyroid glands at operation. *Ann Surg.* 1969;169(6):829-38.

127. Krautloher A. Wirkung von Phenothiazinfarbstoffen in Säugerzellen: Masterarbeit, Ludwig-Maximilians Universität München, Walther-Straub-Institut für Pharmakologie und Toxikologie [persönliche Mitteilung, nicht veröffentlichte Daten]; 2014.
128. May JM, Qu ZC, Li X. Ascorbic acid blunts oxidant stress due to menadione in endothelial cells. *Arch Biochem Biophys*. 2003;411(1):136-44.
129. Metz EN, Balcerzak P, Sagone AL, Jr. Mechanisms of methylene blue stimulation of the hexose monophosphate shunt in erythrocytes. *J Clin Invest*. 1976;58(4):797-802.
130. Atamna H, Mackey J, Dhahbi JM. Mitochondrial pharmacology: Electron transport chain bypass as strategies to treat mitochondrial dysfunction. *Biofactors*. 2012;38(2):158-66.
131. Duicu OM, Scurtu I, Popescu R, Sturza A, Coricovac D, Danila MD, et al. Assessment of the effects of methylene blue on cellular bioenergetics in H9c2 cells. *Revista de Chimie*. 2015;66(4):519-22.
132. Visarius TM, Stucki JW, Lauterburg BH. Stimulation of respiration by methylene blue in rat liver mitochondria. *FEBS Lett*. 1997;412(1):157-60.
133. Haouzi P, Gueguinou M, Sonobe T, Judenherc-Haouzi A, Tubbs N, Trebak M, et al. Revisiting the physiological effects of methylene blue as a treatment of cyanide intoxication. *Clin Toxicol (Phila)*. 2018;56(9):828-40.
134. Atamna H, Kumar R. Protective role of methylene blue in Alzheimer's disease via mitochondria and cytochrome c oxidase. *J Alzheimers Dis*. 2010;20 Suppl 2:S439-52.
135. Duicu OM, Privistirescu A, Wolf A, Petrus A, Danila MD, Ratiu CD, et al. Methylene blue improves mitochondrial respiration and decreases oxidative stress in a substrate-dependent manner in diabetic rat hearts. *Can J Physiol Pharmacol*. 2017;95(11):1376-82.
136. Sonobe T, Chenuel B, Cooper TK, Haouzi P. Immediate and Long-Term Outcome of Acute H₂S Intoxication Induced Coma in Unanesthetized Rats: Effects of Methylene Blue. *PLoS One*. 2015;10(6):e0131340.
137. Zhao N, Liang P, Zhuo X, Su C, Zong X, Guo B, et al. After Treatment with Methylene Blue is Effective against Delayed Encephalopathy after Acute Carbon Monoxide Poisoning. *Basic Clin Pharmacol Toxicol*. 2018;122(5):470-80.
138. Wang GS, Hoyte C. Review of Biguanide (Metformin) Toxicity. *J Intensive Care Med*. 2018;885066618793385.
139. Piel S, Ehinger JK, Chamkha I, Frostner EA, Sjoval F, Elmer E, et al. Bioenergetic bypass using cell-permeable succinate, but not methylene blue, attenuates metformin-induced lactate production. *Intensive Care Med Exp*. 2018;6(1):22.
140. Biological evaluation of medical devices--Part 5: Tests for in vitro cytotoxicity.: Geneva (Switzerland):International Organization for Standardization/ANSI ISO 10993-5:1999; 1999.

141. Kang YJ, Enger MD. Glutathione content and growth in A549 human lung carcinoma cells. *Exp Cell Res.* 1990;187(1):177-9.
142. Snopov SA, Teryukova NP, Sakhenberg EI, Teplyashina VV, Nasyrova RF. Use of HepG2 cell line for evaluation of toxic and metabolic antipsychotic action. *Cell and Tissue Biology.* 2017;11(5):405-15.
143. Lajtha A. *Handbook of Neurochemistry: Volume 2 Structural Neurochemistry*: Springer Science & Business Media; 2013.
144. D'mello AXP, Sylvester TV, Ramya V, Britto FP, Shetty PK, Jasphin S. Metachromasia and Metachromatic Dyes: A review. *Int J Adv Health Sci.* 2016;2(10):12-7.
145. Feder N, Wolf MK. Studies on nucleic acid metachromasy. II. Metachromatic and orthochromatic staining by toluidine blue of nucleic acids in tissue sections. *J Cell Biol.* 1965;27(2):327-36.
146. Shinohara K, Tone S, Ejima T, Ohigashi T, Ito A. Quantitative Distribution of DNA, RNA, Histone and Proteins Other than Histone in Mammalian Cells, Nuclei and a Chromosome at High Resolution Observed by Scanning Transmission Soft X-Ray Microscopy (STXM). *Cells.* 2019;8(2).
147. Matsui A, Tanaka E, Choi HS, Kianzad V, Gioux S, Lomnes SJ, et al. Real-time, near-infrared, fluorescence-guided identification of the ureters using methylene blue. *Surgery.* 2010;148(1):78-86.
148. Jebaramya J, Ilanchelian M, Prabahar S. Spectral studies of toluidine blue o in the presence of sodium dodecyl sulfate. *sensors.* 2009;21:22.
149. Kapadia K, Cheung F, Lee W, Thalappillil R, Florence FB, Kim J. Methylene Blue Causing Serotonin Syndrome Following Cystocele Repair. *Urol Case Rep.* 2016;9:15-7.
150. Wollina U, Koch A, Heinig B. Acute edema induced by toluidine blue extravasation-first report. *Wien Med Wochenschr.* 2019;169(1-2):41-3.
151. Schaper A, Bandemer G, Callies A, Brau C, Braun J, Döriges V, et al. Vorhaltung von Antidota im Notarztdienst. *Notarzt.* 2012;28(03):114-8.
152. Müller D, Desel H. Common causes of poisoning: etiology, diagnosis and treatment. *Dtsch Arztebl Int.* 2013;110(41):690-700.
153. Eyer F, Rabe C. *Antidotarium*, In: Rote Liste 2019.
154. Skold A, Cosco DL, Klein R. Methemoglobinemia: pathogenesis, diagnosis, and management. *South Med J.* 2011;104(11):757-61.
155. Klinikum rechts der Isar der Technischen Universität München[persönliche Mitteilung]. 2020.
156. Hurvitz RJ, Perzik SL, Morgenstern L. In vivo staining of the parathyroid glands. A clinical study. *Arch Surg.* 1968;97(5):722-6.
157. Klopper PJ, Moe RE. Demonstration of the parathyroids during surgery in dogs, with preliminary report of results in some clinical cases. *Surgery.* 1966;59(6):1101-7.

158. Owens MP, Sorock ML, Brown EM. The clinical application of in vivo parathyroid staining. *Surgery*. 1968;64(6):1049-52.
159. Wright RO, Lewander WJ, Woolf AD. Methemoglobinemia: etiology, pharmacology, and clinical management. *Ann Emerg Med*. 1999;34(5):646-56.
160. Hillary SL, Guillermet S, Brown NJ, Balasubramanian SP. Use of methylene blue and near-infrared fluorescence in thyroid and parathyroid surgery. *Langenbecks Arch Surg*. 2018;403(1):111-8.

Danksagung

An erster Stelle gebührt mein Dank Herrn Privatdozent Dr. med. Dr. rer. nat. Harald Mückter für die Überlassung des Themas, die stets offene Tür und die bereichernde Betreuung auf dem Weg dieser Doktorarbeit. Nicht nur seine rigorose wissenschaftliche Arbeitsweise hat mich weitreichend geprägt, auch das mittägliche Mokkaritual und die Einführung in die Geheimnisse der Knoblauchpflanze werden mich noch lange begleiten.

Herrn Professor Dr. med. Thomas Gudermann danke ich für die Aufnahme als Doktorand an dem Walther-Straub-Institut und für die Möglichkeit die Arbeit auf den Kongressen der Deutschen Gesellschaft für Pharmakologie und Toxikologie vorstellen zu dürfen. Für die Übernahme der Betreuung nach dem Ausscheiden von Harald Mückter bin ich zutiefst dankbar. Vielen Dank an dieser Stelle auch an Herrn Dr. rer. nat. Andreas Breit für die Gegenlektüre der Arbeit und die äußerst hilfreichen Anmerkungen.

Frau Christine Hopfer danke ich für die gutmütige Einführung in die Laborarbeit und für die stets zuverlässige technische Unterstützung mit großem Engagement.

Meinen Mitstreitern Christian Juretschke und Johannes Meyer gilt ein ganz besonderer Dank für die schöne Zeit im Labor, die bereichernde Laborseminare, und die freundschaftlichen Momente auch außerhalb des Instituts.

Ohne die bedingungslose Unterstützung meiner Eltern und die motivierende Anstachelung meiner Schwester wäre die Durchführung dieser Arbeit nicht möglich gewesen, Ihnen gilt an dieser Stelle ein großer Dank.

Meiner Juliette danke in tiefster Verbundenheit für die unendlich liebevolle Geduld, das unerschütterliche Vertrauen und die stets wohlwollende Begleitung.

Eidesstattliche Versicherung

Bekka, Elias

Name, Vorname

Ich erkläre hiermit an Eides statt,

dass ich die vorliegende Dissertation mit dem Thema

Zur Toxizität der chromodiagnostischen Farbstoffe Methylenblau, Toluidinblau und Indigokarmin in vitro

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.

Bern, 24.02.2022

Ort, Datum

Elias Bekka

Unterschrift Doktorandin/Doktorand