

Aus dem Institut für Arbeits-, Sozial- und Umweltmedizin
(Prof. Dr. med. E. Hallier)
der Medizinischen Fakultät der Universität Göttingen

Zytotoxizität reduktiver Metabolite von Thiomersal

INAUGURAL - DISSERTATION
zur Erlangung des Doktorgrades
der Medizinischen Fakultät der
Georg-August-Universität zu Göttingen

vorgelegt von
Lisa-Maria Tyroller
aus
Lörrach

Göttingen 2016

Dekan: Prof. Dr. rer. nat. H. K. Kroemer

Referent: PD Dr. rer. nat. M. Müller

Ko-Referent: PD Dr. med. A. Schaper

Drittreferent/in:

Datum der mündlichen Prüfung: 24. 01. 2017

Hiermit erkläre ich, die Dissertation mit dem Titel "Zytotoxizität reduktiver Metabolite von Thiomersal" eigenständig angefertigt und keine anderen als die von mir angegebenen Quellen und Hilfsmittel verwendet zu haben.

Göttingen, den

.....
(Unterschrift)

Inhaltsverzeichnis

1	Einleitung	5
1.1	Thiomersal.....	5
1.1.1	Chemie.....	5
1.1.2	Metabolisierung im menschlichen Organismus	6
1.1.3	Wirkungen und Nebenwirkungen.....	8
1.1.4	Thiomersal-Dissoziationsprodukte und -Konjugate	16
1.2	<i>p</i> -Chlormercuribenzoessäure (Referenzsubstanz Nr. 1).....	18
1.2.1	Chemie.....	19
1.2.2	Wirkungen.....	19
1.3	Ethylquecksilberchlorid (Referenzsubstanz Nr. 2)	20
1.3.1	Chemie.....	20
1.3.2	Wirkungen.....	21
1.4	Zytotoxizitäts-Testsysteme und Zelllinien.....	21
1.5	Fragestellung	23
2	Material und Methoden.....	25
2.1	Geräte und Verbrauchsmaterialien.....	25
2.2	Chemikalien und Lösungsmittel	26
2.2.1	Zusammensetzung der Puffer- und Versuchslösungen	27
2.3	Gase.....	28
2.4	Instrumentelle Analytik.....	28
2.4.1	Präparative Hochdruckflüssigkeitschromatographie (HPLC)	29
2.4.2	Photometrie und Software.....	29
2.5	Zelllinien.....	30
2.5.1	A-549.....	30
2.5.2	Hep-G2.....	31
2.5.3	Zellkonservierung und -kultivierung.....	32
2.6	Thioadduktsynthese der Thiomersal-Konjugate Ethylquecksilber-L-Glutathion und Thiosalicyl-L-Glutathion-Disulfid.....	33
2.6.1	Reaktionsansatz und Inkubation.....	33
2.6.2	Aufreinigung	34
2.6.3	Reinheitsbestimmung	35
2.6.4	Strukturanalyse.....	35
2.6.4.1	NMR-Spektroskopie.....	35

2.6.4.2	Massenspektrometrie.....	36
2.6.4.3	NMR- und ESI-MS-Daten der Thiomersal-L-Glutathion-Konjugate..	36
2.7	Neutralrot-Assay als dosisabhängiger Zytotoxizitätstest.....	39
2.7.1	Standardverfahren.....	39
2.7.2	Test zur Zellvitalität in Anwesenheit von Thiomersal, <i>p</i> -Chlormercuribenzoessäure, Ethylquecksilberchlorid, Ethylquecksilber-L-Glutathion und Thiosalicyl-L-Glutathion-Disulfid.....	42
3	Ergebnisse.....	43
3.1	Synthese und Charakterisierung.....	43
3.2	Zellvitalität in Anwesenheit von Thiomersal	43
3.3	Zellvitalität in Anwesenheit von <i>p</i> -Chlormercuribenzoessäure.....	45
3.4	Zellvitalität in Anwesenheit von Ethylquecksilber-Chlorid	46
3.5	Zellvitalität in Anwesenheit von Ethylquecksilber-L-Glutathion.....	48
3.6	Zellvitalität in Anwesenheit von Thiosalicyl-L-Glutathion-Disulfid.....	49
3.7	IC ₅₀ der getesteten Substanzen	51
4	Diskussion	52
4.1	GSH-abhängige Bioaktivierung und Zytotoxizität von Thiomersal sowie seiner Dissoziationsprodukte.....	54
4.2	Inhibition der Zellvitalität durch Thiomersal-Konjugate.....	57
4.3	Vergleich der IC ₅₀ -Werte der Thiomersal-Konjugate mit den IC ₅₀ -Werten des Thiomersals und der Referenzsubstanzen.....	58
4.4	Allergenes Potential von Thiomersal und seinen Dissoziationsprodukten.....	61
4.5	Ausblick.....	62
5	Zusammenfassung.....	63
6	Literaturverzeichnis	64

Abkürzungsverzeichnis

AAP	American Academy of Pediatrics
APT	<i>attached proton test</i>
c	Stoffmengenkonzentration
CAS	Chemical Abstracts Service
CDC	Centers for Disease Control and Prevention
ddH ₂ O	deionisiertes Wasser destilliert
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNS	Desoxyribonukleinsäure
DSMZ	Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen
EC ₅₀	mittlere effektive Konzentration (Konzentration bzw. Dosis, bei der ein halbmaximaler Effekt beobachtet wird)
ELISA	<i>enzyme linked immunosorbent assay</i>
EpCAM	<i>epithelial cell adhesion molecule</i> (Epitheliales Zelladhäsionsmolekül)
ESI-MS	Elektrospray-Ionisation Massenspektrometrie
FCS	Fetales Kälberserum
FDA	Food and Drug Administration
FSME	Frühsommer-Meningoenzephalitis
g	relative Zentrifugalkraft ($9,81 \text{ m} \cdot \text{s}^{-2}$)
GACVS	Global Advisory Committee on Vaccine Safety
GFAP	<i>glial fibrillary acidic protein</i> (Gliafilament-Protein)
GSH	Glutathion
GST	Glutathion-S-Transferase
GSTM1	Glutathion-S-Transferase M1
GSTO	Glutathion-S-Transferase-Omega
GSTT1	Glutathion-S-Transferase T1
hGSTT1-1	humane Glutathion-S-Transferase T1
HIV	Humanes Immundefizienz-Virus
HPLC	<i>high performance liquid chromatography</i> (Hochdruckflüssigkeitschromatographie)
HTLV	Humanes T-lymphotropes Virus
IC ₅₀	Konzentration eines Inhibitors, bei der eine halbmaximale Inhibition beobachtet wird
i.e.	<i>id est</i> (das heißt)
IL	Illinois

IPA	International Pediatric Association
<i>J</i>	Kopplungskonstante
LD ₅₀	Wirkstoffdosis, bei der 50 % der Versuchsorganismen innerhalb eines bestimmten Zeitraums sterben
m	Massenzahl
MeOH	Methanol
mM	Millimolar
mod.	modifiziert
mol	Mol
MRPs	<i>multidrug resistance-associated proteins</i> (Multidrug Resistenz-assoziierte Proteine)
MS	Massenspektrometrie
MTT	3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazoliumbromid
<i>m/z</i>	Maßzahl: Verhältnis der Masse zur Ladung
NMR	<i>nuclear magnetic resonance</i> (Kernspinresonanz)
NRA	Neutralrot-Assay
PBS	<i>phosphate buffered saline</i>
PCMB	<i>p</i> -Chlormercuribenzoessäure
pH	<i>pondus hydrogenii</i> (negativer dekadischer Logarithmus der Wasserstoffionenkonzentration)
PTFE	Polytetrafluorethylen
rpm	<i>revolutions per minute</i>
RPMI	Roswell Park Memorial Institute (Zellkulturmedium)
SAGE	Strategic Advisory Group of Experts on Immunization
SMRV	<i>squirrel monkey retrovirus</i> (Totenkopffäffchen-Retrovirus)
U	<i>unit</i>
UDP	Uridindiphosphat
UNEP	United Nations Environment Programme
WHO	World Health Organization
z	Ladungszahl

1 Einleitung

1.1 Thiomersal

Thiomersal (CAS-Nr. 54-64-8) kommt als wasserlösliches Natriumsalz seit seiner Entwicklung durch die Firma Eli Lilly in den 30er Jahren des 20. Jahrhunderts aufgrund seiner antibakteriellen und fungistatischen Eigenschaften vielfältig zur Anwendung, unter anderem als Konservierungsstoff und Antiseptikum. Man findet es beispielsweise in Reinigungs- und Aufbewahrungsflüssigkeiten für Kontaktlinsen sowie in Kosmetikprodukten, insbesondere aber auch in pharmazeutischen Produkten wie Nasen- und Ohrentropfen, Blutkonserven oder Impfstoffen. Vor allem Letztere haben in den vergangenen Jahrzehnten zu häufigen und andauernden Diskussionen über die Unbedenklichkeit der Anwendung des Konservierungsstoffes geführt, da Thiomersal wiederholt durch verschiedene Studien in den Verdacht geraten war, Autismus oder andere neurologische Entwicklungsverzögerungen hervorzurufen. Darüber hinaus ist Thiomersal aufgrund weiterer unerwünschter Eigenschaften wie z. B. seiner Wirkung als potentes Allergen in den Fokus der wissenschaftlichen Aufmerksamkeit getreten. Gebräuchliche Bezeichnungen für Thiomersal sind auch Thimerosal, Merfamin, Merthiolat, Natrium-2-(ethylmercurithio)benzoat oder Quecksilberethyl-natriumthiosalicylat.

1.1.1 Chemie

Bei Thiomersal handelt es sich um das Natriumsalz der Quecksilberethyl-Thiosalicylsäure. Die Summenformel lautet $C_9H_9HgNaO_2S$ (Molekulargewicht 404,81 g/mol). Die Struktur ist Abb. 1 zu entnehmen.

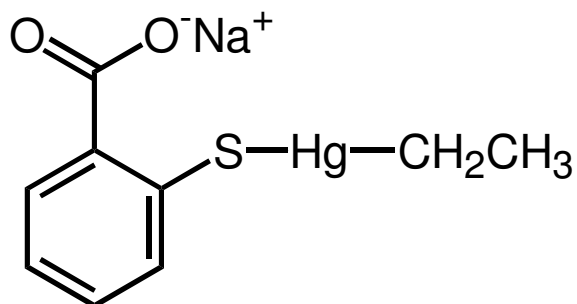


Abb. 1: Strukturformel des Natriumsalzes von Thiomersal.

Thiomersal besteht zu 49,6 % aus Quecksilber. Die Synthese von Thiomersal erfolgt in Anwesenheit von Natronlauge durch die Konjugation von Thiosalicylsäure mit Ethylquecksilber-Chlorid.

Thiomersal besitzt oxidative Eigenschaften, welche durch den über eine Schwefelbrücke gebundenen Quecksilberanteil bedingt sind. Seine gute Wasserlöslichkeit ergibt sich durch die polare Carboxylgruppe.

1.1.2 Metabolisierung im menschlichen Organismus

Im menschlichen Organismus dissoziiert Thiomersal durch Hydrolyse rasch zu den Folgeprodukten Thiosalicylsäure und Ethylquecksilber, wobei der Schwerpunkt des Reaktionsgleichgewichts auf Seiten des Thiomersals liegt (s. Abb. 2).

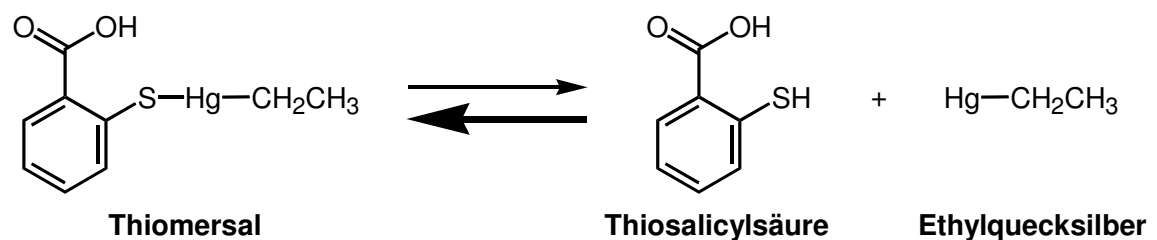


Abb. 2: Hydrolyse von Thiomersal zu Thiosalicylsäure und Ethylquecksilber.

Die entstandene Thiosalicylsäure durchläuft weitere Reaktionsschritte, beginnend mit der Bildung des Disulfids Dithiosalicylsäure durch Oxidation. Im nächsten Schritt kann dieses Disulfid in Kombination mit reaktivem Ethylquecksilber durch Spaltung der Schwefel-Schwefelbindung zu Thiomersal zurückreagieren, wobei als weiteres Produkt (Sulf-) Benzoessäuren freigesetzt werden (s. Abb. 3).

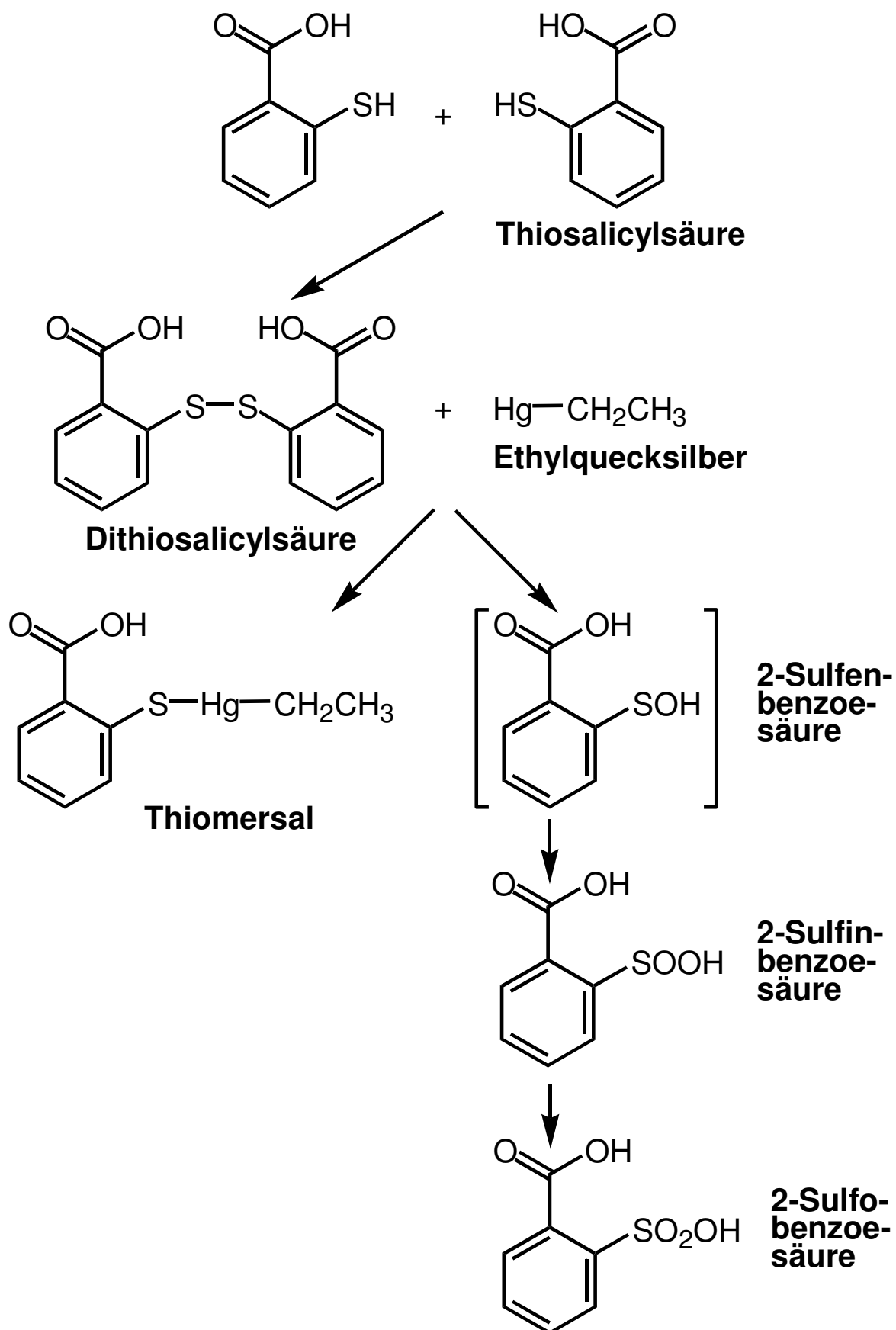


Abb. 3: Oxidation von Thiosalicylsäure zur Dithiosalicylsäure und Folgereaktionen.

Das entstandene Natriumsalz kann erneut hydrolysiert werden, sodass der oben beschriebene Reaktionszyklus theoretisch bis zum vollständigen Verbrauch des vorliegenden Thiomersals durchlaufen werden kann (Tan und Parkin 2000).

Diese Abbauschritte können durch die Anwesenheit von NaCl beschleunigt werden (Reader und Lines 1983), was darauf zurückzuführen ist, dass das Chloridion einen Komplex mit Ethylquecksilber eingeht und daraufhin größere Mengen freier Thiosalicylsäure zur Oxidation zur Verfügung stehen (Tan und Parkin 2000).

1.1.3 Wirkungen und Nebenwirkungen

Wie oben erwähnt, verfügt Thiomersal über bakterizide und fungizide Eigenschaften, welche den Großteil seiner Anwendungsgebiete bedingen. Es besitzt ein breites Wirkspektrum, welches bereits bei sehr geringen Konzentrationen von 0,01 – 0,02 % beginnt. Dies sind typische Konzentrationen, in welchen Thiomersal zur Konservierung von Impfstoffen eingesetzt wird.

Für die beobachteten Wirkungen von Thiomersal wird von Seiten der meisten Autoren (Pichichero *et al.* 2008) der Ethylquecksilberanteil verantwortlich gemacht. Bereits in den 80er Jahren des zwanzigsten Jahrhunderts vermuteten Canty *et al.* (1984), dass die Thiomersal-assoziierten Wirkungen *in vivo* auf die Bindung von Ethylquecksilber an biologische Liganden zurückzuführen wären.

Zugleich schrieben viele Autoren lange Zeit dem noch nicht umfangreich untersuchten Ethylquecksilber aufgrund der chemischen Verwandtschaft ähnliche Wirkungen wie dem in seinen Wirkweisen wesentlich bekannteren Neurotoxin Methylquecksilber zu (Pless und Risher 2000, Tan und Parkin 2000, Ball *et al.* 2001, Goldman *et al.* 2001). Diese Annahme wird inzwischen angezweifelt, wenn man die Toxikokinetik der beiden Substanzen auf unterschiedlichen Applikationswegen vergleicht (Pichichero *et al.* 2008, Wu *et al.* 2008, Aschner und Ceccatelli 2010, Cooper und Katz 2013, King *et al.* 2013). In anderen Aspekten, etwa im Hinblick auf ihre Eigenschaft als Kontakt-Allergene (Santucci *et al.* 1998), das initiale Verteilungsverhalten nach Injektion sowie die Quecksilber-Ausscheidung über den Stuhl (Clarkson und Magos 2006) mögen Ethylquecksilber und Methylquecksilber vergleichbar sein.

Unter den eingangs beschriebenen Anwendungen in unterschiedlichsten pharmazeutischen und kosmetischen Produkten ist besonders die Verwendung als Konservierungsstoff für Impfstoffe von Bedeutung. Bereits kurz nach seiner Entwicklung

wurde Thiomersal erfolgreich auf diese Weise eingesetzt, nachdem es Anfang des 20. Jahrhunderts zu Todesfällen in Zusammenhang mit mikrobiell verunreinigten Impfstoffchargen gekommen war (Wilson 1967). Bis heute wird Thiomersal vor allem in Toxoidimpfstoffen, i.e. Tetanus-, Diphtherie-, Influenza-, Hepatitis A- und B-Impfstoffen, eingesetzt. Für die Konservierung von Lebendimpfstoffen kommt die Verwendung von Thiomersal aufgrund seiner toxischen Eigenschaften nicht in Frage (Ball *et al.* 2001, Fombonne *et al.* 2006, GACVS 2006). In Impfstoffen verschiedener Hersteller gegen zum Beispiel FSME (Frühsommer-Meningoenzephalitis), Influenza und Tetanus/Diphtherie für Erwachsene beträgt die Konzentration jeweils 0,1 mg/ml (Committee on Infectious Diseases and Committee on Environmental Health 1999, Fischer *et al.* 2001). Die äquivalenten Impfstoffe für Kinder unter 6 Jahren werden seit einigen Jahren teilweise ohne Einsatz von Thiomersal hergestellt.

Die pro Impfung enthaltene Dosis an Thiomersal beträgt laut dem innerhalb der World Health Organization (WHO) zuständigen Global Advisory Committee for Vaccine Safety (GACVS) zwischen 10 und 50 µg (GACVS 2006). Injizierte Dosen dieser Größenordnung werden vom GACVS als gesundheitlich unbedenklich erachtet, sodass die WHO sich in ihren Empfehlungen für den Einsatz von Thiomersal-haltigen Impfstoffen zur Prävention von Infektionskrankheiten ausspricht (GACVS 2002).

Bei Zufuhr großer Mengen von Thiomersal kommt es in erster Linie zu neurotoxischen und nephrotoxischen Effekten (Ball *et al.* 2001), die tödlich sein können. Es wurden verschiedene Fälle von Vergiftungen durch die Verabreichung von unterschiedlichen Thiomersal-haltigen Arzneimitteln und Medizinprodukten beschrieben (Clarkson 2002). Die Verabreichung eines fehlerhaft hergestellten Antibiotikums mit einer um Faktor 10^3 zu hohen Konzentration von Thiomersal führte zu mehreren Todesfällen. Die verstorbenen Patienten hatten Thiomersal-Dosen erhalten, welche die für Ratten geltende LD_{50} von 60 mg/kg Körpergewicht um Faktor 2 bis 6 überschritten (Axton 1972). Nach der topischen Behandlung einer chronischen Otitis media mit Merthiolat, einer wässrigen Lösung von 0,1 % Thiomersal und 0,14 % Natriumborat, entwickelte ein 18 Monate altes Mädchen unter anderem schwere hepatische und renale Vergiftungserscheinungen mit Todesfolge, da Anteile der Lösung versehentlich über den Nasopharynx aufgenommen wurden. Über einen Verlauf von vier Wochen war es mit einer Gesamtmenge von 1,2 l Merthiolat antiseptisch behandelt worden. Die aufgenommene Dosis an Thiomersal entsprach 127 mg/kg Körpergewicht (Rohyans *et al.* 1984).

Ein Patient, welcher eine Thiomersal-haltige Lösung in suizidaler Absicht einnahm, entwickelte unter anderem schwere renale Funktionsstörungen, eine Polyneuropathie,

respiratorisches Versagen sowie Delirium und Koma. Die eingenommene Menge Thiomersal betrug 83 mg/kg Körpergewicht, wobei – vermutlich aufgrund von Erbrechen – die vom Organismus aufgenommene Menge gering genug blieb, um das Überleben des Patienten zu ermöglichen (Pfab *et al.* 1996).

In biomedizinischen Studien findet Thiomersal Verwendung als Sulfhydrylgruppenreagens sowie als Kalzium-mobilisierendes Agens (Elferink 1999), da Thiomersal konzentrationsabhängig aktivierende oder inhibierende Effekte auf verschiedene Zellfunktionen aufzuweisen scheint. Diese lassen sich wahrscheinlich auf die Reaktivität des Thiomersals mit Sulfhydrylgruppen zurückführen sowie die unterschiedliche Fähigkeit der jeweiligen Zellen, Kalzium freizusetzen. Die Wirkungen von Thiomersal als Kalzium-Kanal-Modulator sind konzentrationsabhängig und vermutlich auch abhängig vom Zelltyp und dessen jeweiligen Kalzium-Kanalstrukturen. Zu beachten ist, dass einige Wirkweisen des Thiomersals, wie ein konzentrationsabhängiger Einfluss auf die Neutrophilen-Migration, auch durch den Thiomersal-Bestandteil Thiosalicylsäure hervorgerufen werden können, wohingegen andere Effekte, etwa die Freisetzung exozytotischer Enzyme aus neutrophilen Zellen, durch Thiosalicylsäure allein nicht induziert werden, sodass hierfür der Quecksilberanteil des Thiomersal-Moleküls von ausschlaggebender Bedeutung zu sein scheint (Elferink 1999).

In Zellkulturen wird ein zytotoxischer Effekt von Thiomersal in einem Konzentrationsbereich von 6,25 µg/ml bis 12,5 µg/ml beschrieben (Fischer *et al.* 2001). Die Reaktivität von Thiomersal mit Sulfhydrylgruppen kann der Grund für eine inhibierende Wirkung auf das Enzym Glutathion-S-Transferase T1 der menschlichen Erythrozyten sein, eine Eigenschaft, welche von Vesper (2007) untersucht wurde. Hinweise auf die Interaktion von Thiomersal mit schwefelhaltigen Aminosäuren erbrachte eine Studie von Zieminska *et al.* (2010).

Weitere Zellfunktionen, auf die Thiomersal sich auswirken kann, und bei denen meist sein Einfluss auf die Kalzium-Homöostase eine wichtige Rolle spielt, werden von zahlreichen Autoren beschrieben, unter anderem von Bootman *et al.* (1992), Gericke *et al.* (1993), Elferink (1999), Fischer *et al.* (2001), Westphal *et al.* (2002), Wu *et al.* (2008), Kern *et al.* (2013).

Wie in Abschnitt 1.1 erwähnt, handelt es sich bei einer der wichtigsten unerwünschten Wirkungen, die im Zusammenhang mit Thiomersal-haltigen Impfstoffen befürchtet werden, um ein erhöhtes Risiko für neurologische Erkrankungen oder Defizite wie Autismus oder Sprachentwicklungsstörungen. Besonders in den Jahren nach 1999 entbrannten immer wieder neue Diskussionen um diesen Sachverhalt und mehrere

daraufhin durchgeführte Studien wollen einen solchen Zusammenhang nachgewiesen haben (Geier und Geier 2003a, 2003b, 2004, 2005, 2006a, 2006b, Young *et al.* 2008). Es ist bei der Betrachtung dieser Veröffentlichungen allerdings zu beachten, dass es sich bei einer nicht unerheblichen Anzahl lediglich um Folgestudien mit der Auswertung derselben Datensätze handelt.

Die beschriebenen Wirkungen werden von den Autoren auf eine Akkumulation von Ethylquecksilber im Organismus zurückgeführt.

Andere Studien konnten einen solchen Zusammenhang allerdings nicht bestätigen (unter anderen Ball *et al.* 2001, Hviid *et al.* 2003, Madsen *et al.* 2003, Verstraeten *et al.* 2003, Andrews *et al.* 2004, Heron und Golding 2004, Fombonne *et al.* 2006, Schechter und Grether 2008). Eine Untersuchung fand sogar Ergebnisse, die darauf hindeuten, dass Kinder, welche mit Thiomersal-haltigen Impfstoffen behandelt worden waren, im Vergleich zur Kontrollgruppe seltener Zeichen von Hyperaktivität sowie von motorischen und sprachlichen Entwicklungsverzögerungen aufwiesen (Heron und Golding 2004).

Der Verzicht auf Thiomersal-haltige Impfstoffe in mehreren Ländern ging nicht mit einem Rückgang der Autismus-Inzidenz einher (Madsen *et al.* 2003, Stehr-Green *et al.* 2003, Heron und Golding 2004, Parker *et al.* 2004, Schechter und Grether 2008). Auch konnte die Gabe von Thiomersal-konservierten anti-D-Immunglobulinen in der Schwangerschaft in Studien von Miles und Takahashi (2007) sowie Croen *et al.* (2008) nicht mit gesteigerten Raten an neurologischen Entwicklungsstörungen nach der Geburt in Verbindung gebracht werden. Dies steht im Widerspruch zu einer Studie von Geier und Geier (2007), welche allerdings mögliche Variablen wie z. B. das Geschlecht des Kindes, das Alter der Mutter, Ethnie und den mütterlichen Bildungsstand außer Acht ließ (Schultz 2010).

Des Weiteren entsprechen bei weitem nicht alle Studien, die für eine Korrelation von Thiomersal-haltigen Impfstoffen und neurologischen Entwicklungsstörungen sprechen, den wissenschaftlichen Anforderungen an solche Studien und können somit kaum zur Klärung dieser Sachlage herangezogen werden (Parker *et al.* 2004, Schultz 2010).

Heutzutage kann der Verdacht, dass Thiomersal für neurologische Entwicklungsstörungen direkt verantwortlich sein könne, nicht mehr aufrecht erhalten werden, da er nicht durch wissenschaftliche Daten aussagekräftig genug untermauert werden konnte (Fritsche *et al.* 2010, King *et al.* 2013).

Allerdings ist die Möglichkeit nicht vollständig auszuschließen, dass durch bestimmte Genvarianten das individuelle Risiko, welches mit der Aufnahme von potentiell schädigenden Substanzen einhergeht, in relevantem Ausmaße gesteigert werden könnte (Aschner und Ceccatelli 2010). So besteht beispielsweise der Verdacht, dass autistische Kinder über eine gegenüber gesunden Kindern veränderte Toxikokinetik

verfügen, die in einer verminderten Entgiftungskapazität resultieren könnte, welche die Eliminierung von Quecksilber aus dem Organismus erschwert (Aposhian 2004). Damit läge eine erhöhte innere Exposition vor (Kern *et al.* 2013).

Unabhängig von der zu jenem Zeitpunkt bekannten Datenlage wurde in den USA im Juli des Jahres 1999 von der American Academy of Pediatrics (AAP) sowie dem U.S. Public Health Service die Empfehlung ausgesprochen, zumindest Impfstoffe für Kinder von Thiomersal frei zu halten (Committee on Infectious Diseases and Committee on Environmental Health 1999, CDC 1999, Ball *et al.* 2001), obgleich laut US-Studien ein nachteiliger Effekt von Thiomersal-haltigen Impfungen bis dato nicht nachgewiesen werden konnte. Nichtsdestoweniger sollte mit dieser Empfehlung zahlreichen Bedenken von Seiten der Öffentlichkeit, insbesondere von besorgten Eltern (Cooper und Katz 2013), begegnet werden. Allerdings betonten die Centers for Disease Control and Prevention (CDC) zu diesem Zeitpunkt ausdrücklich, dass das Risiko schwerer Erkrankungen bei ungeimpften Kindern das von Impfungen ausgehende potentielle Risiko bei weitem übersteigt (Committee on Infectious Diseases and Committee on Environmental Health 1999, CDC 1999). In Ermangelung von Langzeitstudien zu Thiomersal war das Ziel der CDC-Empfehlung, einer möglicherweise durch Akkumulation von Ethylquecksilber im Organismus hervorgerufenen Schädigung vorzubeugen. In den Monaten zwischen ihrer Herausgabe und der Verfügbarmachung Thiomersal-freier Impfstoffe kam es durch Unterlassen wichtiger Impfungen bei Kindern zum Ausbruch von vermeidbaren Infektionskrankheiten (CDC 2001).

Andere Maßstäbe setzte schon damals das GACVS, welches in seinen Bekanntmachungen ebenfalls betonte, dass bislang kein von Thiomersal-haltigen Impfstoffen ausgehendes erhöhtes Erkrankungsrisiko festgestellt werden konnte und darüber hinaus darauf hinwies, dass das in Thiomersal enthaltene Ethylquecksilber im Hinblick auf seine toxischen Wirkungen nicht mit Methylquecksilber gleichgesetzt werden könne. Die beiden Substanzen weisen trotz chemischer Ähnlichkeiten eine deutlich unterschiedliche Toxikokinetik auf und Ethylquecksilber wird durch seine kürzere Halbwertszeit wesentlich rascher aus dem Organismus ausgeschieden (GACVS 2002). Dies wird auch in einer Studie von Pichichero *et al.* (2002) beschrieben, welche keine im toxischen Bereich liegenden Konzentrationen von Quecksilber im Blut nach Gabe von Thiomersal-haltigen Impfstoffen nachweisen konnte.

Alternative Konservierungsmittel wie 2-Phenoxyethanol beschreibt die WHO als weniger wirksam, wenn es um die Haltbarmachung von Impfstoffen insbesondere in Mehrfachdosis-Gefäßen geht (GACVS 2006).

Die Entwicklung neuer Konservierungsstoffe wiederum geht mit aufwendigen Untersuchungen in Bezug auf Sicherheit und Wirkstärke der damit versetzten Impfstoffe einher (Ball 2012).

Die europäischen Länder folgten in ihrer Impfstoff-Politik weitgehend der WHO-Empfehlung, notwendige Impfungen trotz des darin enthaltenen Ethylquecksilbers keinesfalls zu unterlassen. Ungeachtet der Tatsache, dass die befürchtete Assoziation zwischen Thiomersal und neurologischen Entwicklungsstörungen nicht bestätigt werden konnte, verzichteten viele Länder zunehmend auf Thiomersal-konservierte Impfstoffe (Fritsche *et al.* 2010). Die U.S. Food and Drug Administration (FDA) ist seit Jahren generell bemüht, die Exposition gegenüber Quecksilber besonders bei Kindern und Schwangeren zu reduzieren, so auch durch vermehrte Bereitstellung Thiomersal-freier Impfstoffe (FDA 2009).

Derzeit werden in über 120 Ländern Thiomersal-haltige Mehrfachdosen-Impfstoffe verwendet (King *et al.* 2013). Noch 2012 bekräftigte die WHO, dass die Studienlage zu Thiomersal in Impfstoffen keinen Hinweis auf ein Gesundheitsrisiko liefere und dass es derzeit keine Alternative zu Thiomersal gebe, welche in vergleichbarer Weise die Konservierung von Impfstoffen und dadurch Millionen von Menschen den Zugang zu Impfungen ermögliche (GACVS 2012).

Im Januar 2013 trat das United Nations Environment Programme (UNEP) zusammen, um eine Übereinkunft zu treffen, welche darauf abzielte, die Quecksilber-Exposition für Menschen und Umwelt zu reduzieren. Die AAP ebenso wie die Pediatric Infectious Diseases Society und die International Pediatric Association (IPA) unterstützten die Empfehlung der innerhalb der WHO gegründeten Strategic Advisory Group of Experts on Immunization (SAGE) (AAP 2012, 2013), insbesondere in Entwicklungsländern keinesfalls auf die Verwendung von Thiomersal in Impfstoffen zu verzichten, weil eine solche Maßnahme die Sicherheit, Qualität und Effizienz der Impfstoffe maßgeblich beeinträchtigen würde (SAGE 2012). Quecksilber-haltige Konservierungsstoffe in Impfstoffen bleiben von den durch die „Minamata“-Übereinkunft geplanten Reduktionsmaßnahmen ausgenommen und können weiter in handelsüblichen Dosen verwendet werden (UNEP 2013).

Eine andere unerwünschte Wirkung von Thiomersal in handelsüblichen Dosen, wie sie in Impfstoffen enthalten sind, ist hingegen unbestritten und wirft weitere Fragen nach der Unbedenklichkeit Thiomersal-haltiger Produkte auf. Thiomersal weist in zahlreichen aktuellen Studien (unter anderen Cox und Forsyth 1988, Bonitsis *et al.* 2011) ein deutliches Sensibilisierungspotential für Allergien vom Spättyp auf (Elferink 1999, Ball *et al.* 2001) und durch die weitverbreitete Verwendung von Thiomersal insbesondere in

Impfstoffen lässt sich eine hohe Sensibilisierungs-Prävalenz schlüssig erklären, eine Annahme, welche mehrere Autoren unterstützen (Seidenari *et al.* 1990, Aberer 1991, Schäfer *et al.* 1995, Janach *et al.* 2010, Boonchai *et al.* 2011).

Cox und Forsyth (1988) kamen des weiteren zu dem Schluss, Impfstoffe mit Thiomersal führen nur selten zu Hypersensibilisierung, möglicherweise weil Toxoid-Impfstoffe meist subcutan oder intramuskulär verabreicht werden, eine Hypersensibilisierung aber eher auf epicutanem Wege stattfindet, etwa durch Desinfektionsmittel oder topisch applizierte Arzneimittel.

Im Allgemeinen handelt es sich bei den Sensibilisierungen, welche mit Thiomersal in Zusammenhang gebracht werden, um klinisch irrelevante, von den Patienten nicht bemerkte Allergien (Möller 1994, van't Veen und van Joost 1998), doch ist es ohne weiteres möglich, dass einzelne sensibilisierte Patienten auf Thiomersal-haltige Produkte auch starke allergische Reaktionen zeigen (Cox und Forsyth 1988, Elferink 1999). Besonders relevant wird dieser Umstand in Hinblick auf die Anwendung von Thiomersal in ophthalmologischen Produkten wie Augentropfen oder Kontaktlinsen-Pflegemitteln. Insgesamt herrscht unter den Autoren Uneinigkeit, was die Größe der medizinischen Bedeutung der weitverbreiteten Sensibilisierung auf Thiomersal angeht (Ball *et al.* 2001).

Zu den biochemischen Vorgängen, welche bei der Sensibilisierung durch Thiomersal eine Rolle spielen, gab es lange Zeit nur wenige verfügbare Daten. Starke Hinweise auf die Mediation einer Sensibilisierung mittels reaktiver Sauerstoffspezies und Kalzium-Signalkaskaden liefert eine Testreihe von Migdal und Kollegen (2010). Im Rahmen dieser Arbeit wurde eine promyelomonozytische Zelllinie (U937) – diese Zellen werden als *in vitro*-Surrogat für dendritische Zellen verwendet, welche im menschlichen Organismus eine bedeutende Rolle bei der Immunantwort spielen – diversen potentiell sensibilisierenden Substanzen, unter anderem Thiomersal, Ethylquecksilberchlorid und Thiosalicylsäure ausgesetzt. Thiomersal und Ethylquecksilberchlorid riefen eine deutliche immunmodulatorische Antwort hervor und führten darüber hinaus zu einem Abbau des zelleigenen Glutathions; im Gegensatz dazu kam es unter Einfluss von Thiosalicylsäure zu keiner solchen Reaktion. Interessanterweise konnte die Aktivierung der dendritischen Zellen durch eine Vorbehandlung mit N-Acetylcystein vermindert werden (vgl. hierzu Zimmermann *et al.* 2013).

In vielen Studien zu Kontakt-Allergenen nahm Thiomersal, verwendet in handelsüblichen Konzentrationen, einen der vorderen Ränge unter den getesteten Substanzen ein. Bei Aberer (1991) handelt es sich um das häufigste Allergen im Patientenkollektiv. Seidenari *et al.* (1990) und Wekkeli *et al.* (1990) bezeichnen Thiomersal als das zweithäufigste

Kontakt-Allergen neben Nickel im beobachteten Patientenkollektiv, wobei Seidenari *et al.* auf die höhere Sensibilisierungsrates im gesunden Kollektiv im Vergleich zu Patienten mit Verdacht auf Kontaktdermatitis hinweisen. In Studien von Schäfer *et al.* (2001), Uter *et al.* (2004), Dotterud und Smith-Sivertsen (2007) sowie Yin *et al.* (2011) stellt Thiomersal das dritthäufigste Kontakt-Allergen innerhalb der jeweiligen Studie dar. In Übereinstimmung damit bemerken Dotterud und Smith-Sivertsen (2007), dass epidemiologische Studien zu Kontakt-Allergien deutliche geographische Unterschiede aufweisen, was die Prävalenz der Sensibilisierung gegenüber den verschiedenen Allergenen angeht. Dies wird zumindest teilweise auf die sehr unterschiedliche Exposition in den jeweiligen Ländern oder auch schon verschiedenen Gegenden des gleichen Landes (Yin *et al.* 2011) zurückgeführt.

Ebenfalls schwierig gestalten sich die Interpretation und Vergleichbarkeit diverser Studien, die sich mit dem Versuch befassen, die jeweilige Relevanz der allergenisierenden Komponenten von Thiomersal genauer zu bestimmen, weil auch hier eine breite Diversität unter den Ergebnissen vorherrscht. Laut einer Studie von Gonçalo *et al.* (1996) beispielsweise ist die Hypersensibilität entweder auf Ethylquecksilber (87,2 % des Patientenkollektivs) oder auf Thiosalicylsäure (45 % des Patientenkollektivs) oder beides zurückzuführen. Keiner der getesteten Patienten im Kollektiv zeigte Reaktionen auf das Thiomersal-Molekül allein, ohne zugleich auf einen seiner Bestandteile zu reagieren. Bei Pirker *et al.* (1993) und Wantke *et al.* (1994) hingegen spielt die Sensibilisierung gegenüber Thiosalicylsäure eine untergeordnete oder gar keine Rolle, dafür reagierten in der Studie von Wantke *et al.* (1994) 40 % der Patienten auch ausschließlich auf das vollständige Thiomersal-Molekül mit Hautreaktionen. Andere Studien (Aberer 1991) präsentieren abweichende Zahlen, sodass es sehr schwer fällt, hieraus auf die Bedeutung der einzelnen Komponenten eindeutige Rückschlüsse zu ziehen.

1.1.4 Thiomersal-Dissoziationsprodukte und -Konjugate

Wie in Abschnitt 1.1.2 erwähnt, dissoziiert Thiomersal hydrolytisch zu Ethylquecksilber und Thiosalicylsäure.

Bei Ethylquecksilber ($\text{CH}_3\text{CH}_2\text{-Hg}^+$, Molekulargewicht 229,65 g/mol) handelt es sich um eine kurzkettige Alkylquecksilber-Verbindung, welche 56,7 % des gesamten Thiomersal-Moleküls ausmacht. Wie in Abschnitt 1.1.3 erwähnt, werden einige Effekte von Thiomersal-Konjugaten spezifisch dem Ethylquecksilber-Anteil zugeschrieben. Dies gilt insbesondere für seine toxischen und antimikrobiellen Wirkkomponenten, die auf die rasche Bindung des Ethylquecksilber-Kations an freie Thiol-(SH-)Liganden in proteinhaltigem Gewebe und an Enzyme zurückgeführt werden (Clarkson 2002, Kern *et al.* 2013). Durch seine lipophilen Eigenschaften kann Ethylquecksilber leicht die Blut-Hirn-Schranke überwinden.

Die bakterizide Wirkung von Ethylquecksilber war schon im 19. Jahrhundert bekannt, wo es in Form von Diethylquecksilber als Medikament zur Behandlung von *Treponema pallidum*-Infektionen eingesetzt wurde (Aschner und Ceccatelli 2010). Ab dem 20. Jahrhundert wurde es als Fungizid in der Landwirtschaft verwendet, was in einigen Ländern zu zahlreichen Vergiftungsfällen nach dem Konsum von mit Ethylquecksilber vorbehandeltem Saatgut führte. Bei diesen Vergiftungen wurde neben vielen anderen betroffenen Organen, wie Niere, Haut, Herz oder Gastrointestinaltrakt, insbesondere das Nervensystem in Mitleidenschaft gezogen. Als häufige Symptome zeigten die Betroffenen Sprechstörungen, Ataxie und Spastiken. Die Symptome traten dabei je nach aufgenommener Menge mit einer zeitlichen Verzögerung von mehreren Tagen bis Wochen nach Ingestion auf (Jalili und Abbasi 1961).

Derzeit stellen Thiomersal-konservierte Impfstoffe die Hauptaufnahmequelle von Ethylquecksilber für den Menschen dar (Clarkson und Magos 2006).

Da, wie in Abschnitt 1.1.3 erwähnt, viele Autoren die früher geltende Annahme, Ethylquecksilber sei in seinen Wirkweisen allgemein mit Methylquecksilber ($\text{CH}_3\text{-Hg}^+$) vergleichbar, nicht mehr unterstützen, gab es in den vergangenen Jahren zahlreiche Studien, die sich um eine Differenzierung der beiden Substanzen bemühten, um den Mangel an toxikologischen Erkenntnissen zu Thiomersal zu beheben.

Die Autoren Zareba *et al.* (2007) zeigten in einer Untersuchung mit neugeborenen Mäusen, dass Ethyl- und Methylquecksilber einander zwar in einigen physiologischen Wirkmechanismen ähneln, etwa was die initiale Aufnahme nach Injektion betrifft, sich aber deutliche Unterschiede zeigen, was die Gewebeverteilung sowie die Verstoffwechslung und Elimination von Hg^{2+} angeht. An jungen Affen wurde von

Burbacher *et al.* (2005) nachgewiesen, dass sich die Akkumulation von Quecksilber im Gehirn nach Gabe von Ethyl- und Methylquecksilber aufgrund einer erheblich längeren Halbwertszeit von Methylquecksilber im Blut jeweils stark unterscheidet, was die Autoren auf eine raschere Dealkylierung von Ethylquecksilber zurückführten.

Von Pichichero *et al.* (2002, 2008) wurde gezeigt, dass Ethylquecksilber nach Thiomersal-Gabe rasch über den Darm aus dem Blut eliminiert wird und dass nach Immunisierung mit Thiomersal-haltigen Impfstoffen in keinem Fall eine Quecksilber-Konzentration von 29 nmol/l im Blut überschritten wurde, was als unbedenkliche Konzentration für Quecksilber im Nabelschnurblut gilt (Pichichero *et al.* 2002).

Diese und weitere Studien mit ähnlichen Zielsetzungen wurden von einigen Autoren zu folgenden Hauptaussagen zusammengefasst: Zum einen werde Quecksilber nach Zuführung von Ethylquecksilber wesentlich rascher aus dem Organismus ausgeschieden als nach der Zuführung von Methylquecksilber. Zum anderen berge Ethylquecksilber aufgrund seiner wesentlich rascheren Zersetzung ein weit geringeres Risiko für eine Schädigung des Zentralnervensystems als Methylquecksilber (Aschner und Ceccatelli 2010).

Allerdings wird an diesen Untersuchungen teilweise kritisiert, dass in ihnen der rasche Zerfall des Ethylquecksilbers mit einer Elimination aus dem Körper gleichgesetzt wird und nicht ausreichend in Betracht gezogen wird, dass das bei der Metabolisierung entstehende anorganische Quecksilber im Gewebe – besonders im Gehirn – verbleiben und akkumulieren kann. Da Studien, welche einen spezifischen Vergleich der Neurotoxizität von Ethyl- und Methylquecksilber im Fokus haben, zum Teil widersprüchliche Aussagen liefern, sind in Zukunft weitere Untersuchungen zu diesen Fragestellungen erforderlich (Kern *et al.* 2013).

Bei dem zweiten Dissoziationsprodukt von Thiomersal, der Thiosalicylsäure ($C_7H_6O_2S$, Molekulargewicht 154,19 g/mol), handelt es sich um ein Schwefelanalogon der Salicylsäure.

Dieses Molekül wies die Arbeitsgruppe um Wu (2008) mittels ESI-MS (Elektrospray-Ionisation Massenspektrometrie) nach. Im negativen Ionen-Modus zeigte sich ein Molekularpeak bei m/z 153,1, einem Wert, welcher der Masse des Thiosalicylat-Anions ($C_7H_5O_2S^-$) entspricht.

In Anwesenheit von Sauerstoff wird Thiosalicylsäure zu Dithiosalicylsäure, einem Disulfid, oxidiert.

Der Thiosalicylsäure wird im Allgemeinen nur ein geringes Wirkpotential auf Zell- und Enzymfunktionen zugesprochen. Im Kontrast dazu steht eine experimentelle Studie von Vesper (2007), welche eine Hemmung der humanen Glutathion-S-Transferase T1

(hGSTT1-1) – eines Enzyms, welches Bestandteil des menschlichen Entgiftungssystems ist und eine potentiell zellprotektive Funktion besitzt – nicht nur durch Thiomersal, sondern auch (in schwächerem Maße) durch Thiosalicylsäure nachweist.

Die allergene Wirkung sowohl von Thiomersal als auch seinen Komponenten wurde in Abschnitt 1.1.3 dargestellt.

In Anwesenheit von L-Glutathion, einem Tripeptid, welches sich aus den Aminosäuren L-Glutaminsäure, Glycin und L-Cystein zusammensetzt, bilden die beiden aus Thiomersal entstandenen Substanzen Konjugate.

Ein massenspektrometrischer Nachweis für Ethylquecksilber-L-Glutathion wurde erstmals von Wu und Kollegen (2008) mittels ESI-MS-Analyse erbracht. Der Reaktionsansatz für die Messung wurde durch eine 1:1-Mischung von Thiomersal und L-Glutathion (GSH) in 50%igem Methanol hergestellt. Als Resultat zeigte sich ein charakteristischer Molekularpeak bei m/z 536,2 der Verbindung $C_{12}H_{20}HgN_3O_6S^-$ (vgl. hierzu Abschnitt 2.6.4).

In einer Arbeit von Zieminska *et al.* (2010) fanden sich erste Hinweise auf die durch Kernresonanz-Spektroskopie nachweisbare Konjugation von Thiomersal mit L-Glutathion. Die chemische Struktur der Konjugate wurde hier aber nicht aufgeklärt.

1.2 *p*-Chlormercuribenzoessäure (Referenzsubstanz Nr. 1)

Im Rahmen dieser Arbeit wurden zwei Referenzsubstanzen ausgewählt, deren biochemische Eigenschaften bekannt sind und die aufgrund ihrer strukturellen Ähnlichkeit mit Thiomersal ebenfalls auf ihre toxischen Wirkungen untersucht werden sollten.

Die erste Referenzsubstanz, *p*-Chlormercuribenzoessäure (CAS-Nr. 59-85-8), ist auch unter den Synonymen 4-Chlormercuribenzoessäure und PCMB bekannt.

1.2.1 Chemie

p-Chlormercuribenzoessäure hat die Summenformel $\text{ClHgC}_6\text{H}_4\text{CO}_2\text{H}$ (Molekulargewicht 357,16 g/mol). Die Struktur ist Abb. 4 zu entnehmen und weist einige Gemeinsamkeiten mit dem Thiomersal-Molekül auf.

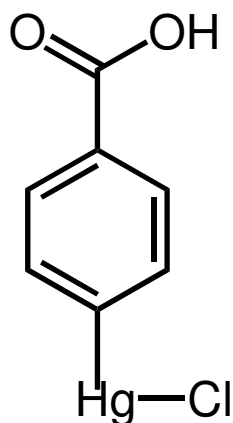


Abb. 4: Strukturformel von *p*-Chlormercuribenzoessäure.

Aufgrund seiner Reaktivität mit Thiolgruppen fungiert *p*-Chlormercuribenzoessäure als unspezifischer Inhibitor von Enzymen, die für ihre Aktivität eine freie SH-Gruppe benötigen. Diese Eigenschaft ermöglicht den Einsatz von *p*-Chlormercuribenzoessäure zur Quantifizierung von Thiolgruppen in Proteinen durch Titration.

Der Quecksilber-Anteil des Moleküls stellt dabei in erster Linie das reaktive Agens dar. Die entstehende Bindung ist reversibel.

p-Chlormercuribenzoessäure ist wasserlöslich. In einer wässrigen NaOH-Lösung wandelt es sich in *p*-Hydroxymercuribenzoessäure um.

1.2.2 Wirkungen

In einer von Borenfreund *et al.* (1988) durchgeführten Studie zum Vergleich zweier Zelltoxizitäts-Testsysteme – in beiden wurden BALB/c-Mausfibroblasten als Testzellen eingesetzt – bewirkte *p*-Chlormercuribenzoessäure im Neutralrot-Assay eine Vitalitätsminderung der Zellen um 10 % bei einer Konzentration von 20 μM sowie eine Vitalitätsminderung um 50 % bei einer Konzentration von 42 μM .

In einer aktuellen Studie fanden sich Hinweise darauf, dass das Quecksilber-Ion der *p*-Chlormercuribenzoessäure eine Bindung mit dem im Ligandenbindungskanal nahe

dem aktiven Zentrum von Neurolysin liegenden Cystein cys650 eingeht (Santos *et al.* 2013). Diese Reaktion kann durch eine Konformationsänderung des Neurolysin zur Freilegung einer bislang unbekanntenen Bindungsstelle für vasokonstriktorisches Peptide führen (Santos *et al.* 2013).

Auf Aquaporine in Zellmembranen hat *p*-Chlormercuribenzoessäure eine inhibierende Wirkung, welche in einem verminderten Wasser-Ein- und -Ausstrom resultiert und auf diese Weise etwa bei Erythrozyten zu erhöhter Zellyse führt (Yamaguchi *et al.* 2012).

Aktivierende Eigenschaften der *p*-Chlormercuribenzoessäure zeigte hingegen eine Studie auf, in welcher eine deutliche Aktivitätssteigerung der Aldo-Keto-Reduktase AKR1B19 in Anwesenheit von SH-Reagenzien nachgewiesen werden konnte (Endo *et al.* 2013).

1.3 Ethylquecksilberchlorid (Referenzsubstanz Nr. 2)

Bei der zweiten zum Vergleich mit den Testsubstanzen gewählten Referenzsubstanz handelt es sich um Ethylquecksilberchlorid (CAS-Nr. 107-27-7). Im englischsprachigen Raum ist es auch unter den Synonymen Chloroethylmercury und dem Handelsnamen Granosan bekannt.

1.3.1 Chemie

Ethylquecksilberchlorid (zur Struktur s. Abb. 5) ist ein Derivat von Ethylquecksilber. Das Molekül hat die Summenformel C_2H_5ClHg (Molekulargewicht 265,13 g/mol). Der Quecksilber-Anteil macht über 75 % des Molekulargewichts aus.

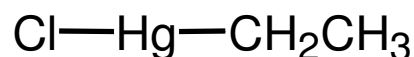


Abb. 5: Strukturformel von Ethylquecksilberchlorid.

In Reinform liegt es als weißer kristalliner Feststoff vor. Es ist lichtempfindlich und wasserlöslich.

1.3.2 Wirkungen

Bei Ethylquecksilberchlorid handelt es sich um ein hochtoxisches Agens, welches bei Berührung mit der Haut starke Verbrennungsreaktionen hervorrufen kann und durch die Haut rasch absorbiert wird. Chronische Exposition kann dauerhaften Schaden am Zentralnervensystem hervorrufen.

In einer Konzentration von 2 % findet die Substanz Anwendung als Fungizid, um Saatgut zu behandeln. Eine dem Ethylquecksilber verwandte chemische Struktur, Chloro-(2-methoxyethyl)quecksilber, auch als Emisan-6 bekannt, wird ebenfalls als Saatgut-Fungizid verwendet.

Die Wirkungen von Ethylquecksilber wurden in Abschnitt 1.1.4 eingehend beschrieben.

1.4 Zytotoxizitäts-Testsysteme und Zelllinien

Zytotoxizitäts-Testsysteme stellen ein wichtiges Instrument in toxikologischen Untersuchungen dar. Als Ersatzmethode für Tierversuche haben sie sich als besonders wertvoll erwiesen, wenn es darum geht, Effekte neu entwickelter oder in ihren Wirkungen nicht ausreichend bekannter Substanzen auf humane Gewebe bzw. Zellen aufzuzeigen (Riss und Moravec 2004). Es gibt mehrere Klassen von Zytotoxizitäts-Testsystemen, welche sich hinsichtlich der betrachteten Wirkmechanismen sowie der gemessenen Parameter unterscheiden und sich in der Vergangenheit bewährt haben (Niles *et al.* 2008).

Als Indikator für die Integrität der Zellmembran dient beispielsweise die Aufnahme von Farbstoffen, wie etwa der anionische Farbstoff Trypanblau, welcher nur von membrangeschädigten Zellen aufgenommen wird (Riss und Moravec 2004). Ein anderer Ansatz betrachtet Stoffwechsel-Vorgänge, welche in lebenden Zellen stattfinden und mit dem Zelltod beendet werden, wie etwa im Tetrazolium MTT Assay, bei welchem enzymvermittelt eine Reduktion von einem löslichen gelben Salz zu einem unlöslichen blauen Produkt stattfindet (Mosmann 1983). Ein ähnlicher Ansatz wird mit dem Redox-Indikator Resazurin verfolgt, mit dem Unterschied, dass dieser in lebenden Zellen zu einem Fluoreszenzprodukt umgewandelt wird (Ahmed *et al.* 1994). Auch der Adenosintriphosphat-Gehalt eignet sich als Marker für Zellvitalität (Squatrito *et al.* 1995). Eine weitere Methode der Zytotoxizitätsbestimmung stellt die Messung freigesetzter Bestandteile des Zytoplasmas in das umgebende Medium dar, beispielsweise der zelleigenen Laktat-Dehydrogenase (Decker und Lohmann-Matthes 1988).

Ein gängiges *in vitro* angewandtes Zytotoxizitäts-Testsystem ist der Neutralrot-Assay (NRA), welcher im Rahmen dieser Arbeit verwendet wird.

Der NRA misst die Zellvitalität über die Aufnahme von Farbstoff in Lysosomen lebender Zellen, die anschließende Auswaschung des Neutralrots durch Zugabe von Ethanol und die photometrische Messung der Menge des ausgetretenen Farbstoffs, welche proportional zur Anzahl lebender Zellen ist (s. Abschnitt 2.7.1). Vorteile des NRA liegen unter anderem in seinen niedrigen Kosten und seiner hohen Sensitivität (Repetto *et al.* 2008). Der NRA wird zum Beispiel zur Abschätzung von zytotoxischen T-Zell-Populationsgrößen, Tumorzellwachstum und Effizienz von Behandlungsmethoden oder zur Aufklärung antagonistischer und synergistischer Arzneimittelinteraktionen verwendet (Repetto *et al.* 2008). Er ist leicht auf verschiedenste Zellen anwendbar (Repetto *et al.* 2008).

Einzelne Zelllinien haben als Modell für lebende Organismen in pharmakologischen und toxikologischen Untersuchungen besondere Bedeutung erlangt, insbesondere Karzinom-Zellen (Gillet *et al.* 2013, Kim *et al.* 2014), die die Eigenschaft nahezu unbegrenzter Reproduktion besitzen.

Die vorliegende Arbeit beschäftigt sich mit der Untersuchung möglicher toxischer Effekte von Thiomersal-Glutathion-Konjugaten auf Zellkulturen vom Typ A-549 und Hep-G2 (vgl. Abschnitt 2.5).

Gewählt wurden diese beiden Zelllinien aufgrund ihrer Eigenschaften, welche sie für toxikologische Untersuchungen repräsentativ machen.

Zellen vom Typ A-549 entstammen menschlichem Lungengewebe. Die Lunge stellt ein interessantes mögliches Zielorgan für toxische Wirkungen dar, weil sie als Grenzzone zwischen der Umwelt und dem Organismus fungiert und ihre Intaktheit bedeutend für die Unversehrtheit des restlichen Körpers ist.

Bei Zellen vom Typ Hep-G2 handelt es sich um metabolisch kompetente Leberzellen. Direkte oder durch Bioaktivierung (Giftung) auftretende Effekte toxischer Substanzen auf diese Zelllinie sind von großer Relevanz, da der in der Leber stattfindende Stoffwechsel sich unmittelbar auf weite Anteile des menschlichen Organismus auswirkt.

Beide Zelllinien zeichnen sich durch leichte Kultivierbarkeit und schnelles Wachstum aus.

1.5 Fragestellung

Um sich mit Fragen nach der Wirkung bestimmter toxikologisch relevanter Substanzen auseinanderzusetzen, muss zunächst die Chemie dieser Substanzen betrachtet werden. Thiomersal hydrolysiert in wässrigen Lösungen zu Ethylquecksilber und Thiosalicylsäure. In weiteren Reaktionsschritten oxidiert Thiosalicylsäure zu 2,2'-Dithiosalicylsäure (Reader und Lines 1983). Wie bereits eingangs beschrieben, kann Dithiosalicylsäure in Kombination mit Ethylquecksilber, welches den primär reaktiven Anteil des Thiomersal-Moleküls darstellt, zu Thiomersal zurückreagieren, wobei (Sulf-) Benzoessäuren freigesetzt werden. Dieser Reaktionszyklus kann bis zum vollständigen Verbrauch des vorliegenden Thiomersals durchlaufen werden (Tan und Parkin 2000).

Was den weiteren Abbauweg des reaktiven Ethylquecksilbers angeht, so ist unter anderem dessen Gewebeverteilung als Gegenstand von *in vivo*-Untersuchungen von Bedeutung, insbesondere die Verteilung in den bei Thiomersal-Intoxikationen hauptsächlich betroffenen Organsystemen Niere und Zentralnervensystem sowie in der Leber als metabolisch aktivem Organ (Zareba *et al.* 2007).

Die Giftung und Entgiftung der Dissoziationsprodukte von Thiomersal im humanen Organismus wird noch nicht vollständig verstanden. Eine mögliche protektive Abbaureaktion dieser Produkte könnte die Konjugation mit GSH darstellen. Nur wenige Forschungsarbeiten haben sich mit der Detektion potentiell entstehender GSH-Konjugate von Thiomersal sowie ihren Auswirkungen auf zellulärer Ebene befasst (Wu *et al.* 2008, Zieminska *et al.* 2010). Obwohl die GSH-Konjugation mit elektrophilen Komponenten allgemein als protektiver Mechanismus im Fremdstoffmetabolismus verstanden wird (Landi 2000), ist sie im Zusammenhang mit Thiomersal bislang nicht ausreichend untersucht worden.

An der Metabolisierung exogener Substanzen im humanen Organismus sind verschiedene Enzyme beteiligt, unter anderem die UDP-Glucuronyltransferasen, die Sulfotransferasen, die *N*-Acetyltransferasen sowie die Glutathion-S-Transferasen, welche die GSH-Konjugation katalysieren und Zellbestandteile dadurch vor reaktiven elektrophilen Molekülen schützen können (Efferth 2006). Beispiele für eine solche detoxifizierende Wirkung stellen die Konjugation von GSH mit *N*-Acetyl-*p*-benzochinonimin – dem reaktiven Zwischenprodukt von Paracetamol (Lüllmann *et al.* 2006) – oder mit aus Aflatoxin B1 entstandenen Epoxid-Metaboliten (Efferth 2006) dar. GSH-Konjugate sind jedoch darüber hinaus in der Lage, toxisch zu wirken, etwa durch die Konjugation mit halogenierten Alkenen, Hydrochinonen oder Isothiocyanaten

(Monks *et al.* 1990) oder durch die Umwandlung aktivierter Butane zu Mutagenen (Thier *et al.* 1995).

Die Mechanismen, welche mit der GSH-abhängigen Bioaktivierung halogener Alkane und Alkene wie z. B. der Lösemittel Trichlorethen oder Tetrachlorethen zusammenhängen, werden bei Anders und Dekant (1998) eingehend beschrieben. Durch GSH-Konjugation in der Leber entstehen Dihaloalkenyl- oder 1,1-difluoroalkyl-GSH-S-Konjugate, welche in weiteren enzymvermittelten Schritten zu Cystein-S-Konjugaten gespalten werden. Diese Konjugate dienen als Substrate für diverse Enzyme in weiteren Stoffwechselschritten, deren Produkte nephrotoxisch sind und darüber hinaus mit der renalen Tumorbildung bei Ratten assoziiert werden (Anders und Dekant 1998).

Im Rahmen dieser Arbeit sollen daher GSH-Konjugate von Thiomersal synthetisiert und isoliert werden, um sie anschließend in Hinblick auf ihre möglichen toxischen Eigenschaften charakterisieren zu können.

Der Fokus dieser Arbeit liegt darauf, die Zytotoxizität der GSH-Konjugate im Neutralrot-Assay mit zwei humanen Zelllinien, A-549 und Hep-G2, zu untersuchen. Als Kennwerte für die toxischen Effekte sollen die IC_{50} -Werte in Abhängigkeit von der Zelllinie bestimmt und zur Beurteilung der Toxizität herangezogen werden. Um die Ergebnisse in einen Kontext stellen zu können, wird darüber hinaus auch die Zytotoxizität von Thiomersal selbst sowie von zwei Referenzsubstanzen im gleichen System untersucht und die Ergebnisse aller Zytotoxizitätstests miteinander verglichen. So soll eine Aussage darüber getroffen werden, ob die GSH-Konjugate von Thiomersal sich humanen Zellen gegenüber als mehr oder weniger toxisch im Vergleich zum Ausgangsmolekül bzw. zu den Referenzsubstanzen erweisen.

2 Material und Methoden

2.1 Geräte und Verbrauchsmaterialien

Sämtliche nicht gesondert aufgeführten Verbrauchsmaterialien wie 13-ml-Röhrchen, Einwegpipetten, Pipettenspitzen, Reagenzröhrchen und Zentrifugenröhrchen sowie die verwendeten Reaktionsgefäße wurden von den Firmen Eppendorf (Hamburg, D) oder Sarstedt (Nümbrecht, D) bezogen.

Geräte und Verbrauchsmaterialien:

Analysenwaage Analytic AC 2103	Sartorius (Göttingen, D)
Autoklaven:	
Varioklav® Dampfsterilisator	Thermo Scientific (Langensfeld, D)
Lösungs-Sterilisator Modell CS-Labor	Webeco (Bad Schwartau, D)
Cellulose-Acetat-Filter 0,2 µm	Sartorius (Göttingen, D)
Einwegspritzen 10 ml	
Finnpipette (1 – 5 ml)	Labsystems (Helsinki, FI)
Ganzglas-Vakuumfiltrationsgerät	Sartorius (Göttingen, D)
Lyophilisator Lyovac GT2	Steris (Hürth, D)
Magnetrührer	
Magnetrührstab	
Mehrkanalpipette (8 Kanäle, 30 – 300 µl)	Eppendorf (Hamburg, D)
Mikropipetten (0,5 – 10 µl, 2 – 20 µl, 10 – 100 µl, 100 – 1000 µl)	Eppendorf (Hamburg, D)
Mikroskop (Vergrößerung 20x – 100x)	Zeiss (Göttingen, D)
Mikrotiterplatten (96 Wells)	Nunc (Wiesbaden, D)
pH-Meter MultiCal® pH 538	WTW Labor (Weilheim, D)
Rollmischer	MedChrom (Flörsheim, D)
Rotrandfilter Whatman™ 0,2 µm	GE Healthcare (Little Chalfont, Buckinghamshire, UK)
Schraubkappen Rotilabo®	Roth (Karlsruhe, D)
Septen Rotilabo®:	Roth (Karlsruhe, D)
8 mm x 0,60 mm PTFE/Silikonkautschuk	
13 mm x 0,60 mm PTFE/Silikonkautschuk	
Sterilbank HERAsafe	Heraeus (Hanau, D)

Tankpipette	Eppendorf (Hamburg, D)
Tankpipettenaufsätze Combitips 5 ml	Eppendorf (Hamburg, D)
Thoma-Zählkammer mit Deckglas	Brand (Wertheim/Main, D)
Vakuu-Exsikkator	
Vial 2 ml und 4 ml	Roth (Karlsruhe, D)
Wägebapier	Macherey-Nagel (Düren, D)
Wärmeschränke:	
Wärmeschrank Typ U	Memmert (Schwabach, D)
Function Line	Heraeus (Hanau, D)
Wasserfiltrationsanlage (Milli-Q Plus)	Millipore (Eschborn, D)
Zellkulturflaschen (25 cm ² , 75 cm ²)	Sarstedt (Nümbrecht, D)
Zentrifugen:	
Tischzentrifuge Biofuge pico	Heraeus (Hanau, D)
Rotina 35R	Hettich (Tuttlingen, D)

2.2 Chemikalien und Lösungsmittel

Die für diese Arbeit verwendeten und in der folgenden Übersicht aufgelisteten Chemikalien und Lösungsmittel wurden in der für die Versuche notwendigen Reinheit mit dem Reinheitsgrad „pro analysi“ direkt von den Herstellern bezogen.

Acetonitril (Reinheitsgrad 99,9 %)	Merck (Darmstadt, D)
Ammoniumacetat-Puffersalz	Fluka (Steinheim, D), Merck (Darmstadt, D)
Dimethylsulfoxid (DMSO)	Fluka (Steinheim, D)
Essigsäure	Fluka (Steinheim, D)
Ethanol, vergällt	Merck (Darmstadt, D)
Ethylquecksilber-Chlorid (Ethyl-Hg-Cl)	Alfa Aesar (Karlsruhe, D)
Calciumchlorid-Dihydrat	Merck (Darmstadt, D)
FCS Superior (Fetales Kälberserum)	Biochrom AG (Berlin, D)
Formaldehyd 37 %	AppliChem (Darmstadt, D)
L-Glutathion (L-GSH, reduziert)	Fluka (Steinheim, D)
Methanol (MeOH)	Merck (Darmstadt, D)
Natrium-Hydrogenphosphat-Puffersalz (NaH ₂ PO ₄)	Fluka (Steinheim, D)

Neutral Red Solution (enthält 3,3 g Neutralrot pro l PBS-Dulbecco)	Sigma-Aldrich (Taufkirchen bei München, D)
PBS-Dulbecco (10fach konzentriert) (<i>phosphate buffered saline</i>)	Biochrom (Berlin, D)
Penicillin (10.000 U/ml) / Streptomycin (10.000 µg/ml)	Biochrom (Berlin, D)
p-Chlormercuribenzoessäure	Sigma-Aldrich (München, D)
Phosphor-Pentoxid	Fluka (Steinheim, D)
RPMI 1640 Medium	Biochrom (Berlin, D)
Thiomersal	Sigma-Aldrich (München, D)
Trypsin	Biochrom (Berlin, D)

2.2.1 Zusammensetzung der Puffer- und Versuchslösungen

Alle verwendeten Lösungen wurden mit destilliertem Wasser angesetzt. Das HPLC-Wasser (HPLC = *high performance liquid chromatography*) wurde durch Aufreinigung mittels eines Elix 3 / Milli-Q-Systems der Firma Millipore (Eschborn, D) hergestellt. Die Lösungen wurden bei Raumtemperatur hergestellt. Die jeweils erforderlichen pH-Werte wurden durch Titration mit Essigsäure eingestellt. Die angesetzten Puffer für die HPLC-Chromatographie-Säule wurden mittels eines Ganzglas-Vakuumfiltrationsgeräts durch einen Biofilter aus Cellulose-Acetat filtriert.

Ammoniumacetat-Puffer

CH₃COONH₄ (100 mM)

ad ddH₂O

pH = 4,6 eingestellt mit Essigsäure

Natriumhydrogenphosphat-Puffer

Na₂HPO₄ x 2H₂O (250 mM)

ad ddH₂O

pH = 7,2 eingestellt mit Essigsäure

Zellkulturmedium (serumhaltig)

89 % RPMI 1640 (enthält 1,5 % Glutamin)

10 % FCS

1 % Penicillin (10.000 U/ml) / Streptomycin (10.000 µg/ml)

Einfriermedium

70 % Zellkulturmedium

20 % FCS

10 % DMSO

Neutralrot-Stammlösung

Neutral Red Solution (Verdünnung 1:66)

mit Zellkulturmedium (serumfrei)

2.3 Gase

Helium 4.6

Messer-Griesheim (Krefeld, D)

Stickstoff 5.0

Messer-Griesheim (Krefeld, D)

Die beiden HPLC-Puffer wurden kontinuierlich mit Helium zur Entlüftung begast. Stickstoffgas wurde verwendet, um Reste von Acetonitril möglichst schonend aus den aufgefangenen Fraktionen der Thiomersal-Konjugate zu entfernen.

2.4 Instrumentelle Analytik

Zur Aufreinigung der beiden *in vitro* synthetisierten Thiomersal-Konjugate Ethylquecksilber-L-Glutathion und Thiosalicyl-L-Glutathion-Disulfid wurde eine von Müller *et al.* (2001) entwickelte und auf UV-Detektion adaptierte HPLC-Methode eingesetzt.

2.4.1 Präparative Hochdruckflüssigkeitschromatographie (HPLC)

Gerät:

HPLC-System von Knauer, Ausstattung:

- 2 Kurzhub-Doppelkolben-Pumpen Typ 364
- Helium-Eluenten-Entgasungsvorrichtung
- Sechsweg-Injektionsventil
- Mischkammer
- Spektralphotometer Typ 731.870
- 500 µl Probenschleife

HPLC-Säule (stationäre Phase) zur chromatographischen Trennung:

Trennsäule 10 mm x 25 cm (Ultrasphere C18, phenomenex® Beckmann)

Reversed phase Silica 5 µm

Laufpuffer:

Puffer [A]: 100 mM Ammoniumacetatpuffer pH 4,6

Puffer [B]: Acetonitril

<u>Linearer Gradient:</u>	0 - 50 % [B]	(0 min – 15,5 min)
	100 % [B]	(15,5 min – 20,5 min)
	0 % [B]	(20,5 min – 25,5 min)
	0 % [B]	(25,5 min – 30,0 min)

Flussrate: 2,5 ml/min

UV-Detektion: 240 nm

2.4.2 Photometrie und Software

Die photometrische Auswertung der im Neutralrottest verwendeten Mikrotiterplatten erfolgte mit Hilfe eines Mikrotiterplatten-Lesegeräts Typ Sunrise sowie der Datenanalyse-Software Magellan™ der Firma Tecan (Crailsheim, D).

Die Datenerfassung und Auswertung der präparativen HPLC erfolgte mittels der Software DS 450–MT1–EMS Version 3.94 der Firma Kontron Instruments (Eching, D).

2.5 Zelllinien

Die zwei im Rahmen dieser Arbeit verwendeten Zelllinien wurden aufgrund von Eigenschaften ausgewählt, welche sie für toxikologische Untersuchungen interessant machen (s. hierzu Abschnitt 1.4).

Beide Zelllinien zeichnen sich darüber hinaus durch eine leichte Kultivierbarkeit und schnelles Wachstum aus.

2.5.1 A-549

Die Zellen der Zelllinie A-549 standen aus den Beständen des Göttinger Instituts für Arbeits-, Sozial- und Umweltmedizin zur Verfügung.

Bei den Zellen dieser Zelllinie handelt es sich um menschliche Lungenkarzinom-Zellen, welche aus dem 1972 entfernten Alveolarzellkarzinom eines zu diesem Zeitpunkt 58jährigen kaukasischen Mannes entnommen wurden (Lieber *et al.* 1976). Zuerst beschrieben wurde diese Zelllinie von Giard *et al.* (1973).

Die Lunge stellt nicht nur an sich ein interessantes mögliches Zielorgan für toxische Wirkungen dar, sondern weist in ihren histologischen Eigenschaften auch Ähnlichkeiten mit Haut und Schleimhaut auf, sodass eine Anwendbarkeit der Untersuchungsergebnisse auf diese Gewebe naheliegt.

Es wurde beschrieben, dass die Zellen vom Typ A-549 in der Lage sind, bei Nacktmäusen mit fehlender Thymusfunktion Tumoren zu induzieren (McLemore *et al.* 1987). Des Weiteren besitzen sie diverse Eigenschaften von Typ-II-Alveolarzellen, unter anderem die Fähigkeit, Lecithin und Surfactant zu synthetisieren (Lieber *et al.* 1976). Morphologisch handelt es sich um Epithelzellen, welche adhärent als Monozellschicht wachsen. Die Verdopplungszeit beträgt ca. 40 Stunden.

Immunhistochemisch sind die Zellen positiv für Cytokeratin, Cytokeratin-7, Cytokeratin-8, Cytokeratin-18 und Vimentin, negativ für Cytokeratin-17, Desmin, Endothel, EpCAM (*epithelial cell adhesion molecule*), GFAP (*glial fibrillary acidic protein*) und Neurofilament.

Der Zellstamm weist in ELISA-Tests (ELISA = *enzyme linked immunosorbent assay*) negative Ergebnisse für reverse Transkriptase-Viren sowie für das Epstein-Barr-Virus, Hepatitis B- und C-Virus, Humanes Herpesvirus 8, HIV (Humanes Immundefizienz-

Virus), HTLV-I/II (HTLV = Humanes T-lymphotropes Virus) und für SMRV (*squirrel monkey retrovirus*) auf (DSMZ 2013a).

Die verwendeten Zellen zeigten ein besonders rasches Wachstum, sodass im Rahmen dieser Arbeit die Zellpassagen bei einer Konfluenz von 70 bis 80 % alle drei bis vier Tage unter Verwendung von Trypsin erfolgten. In Abhängigkeit von der jeweils ermittelten Zellzahl pro ml Nährflüssigkeit wurden Aliquots von $1 - 2 \times 10^6$ Zellen/ml ausgesät.

Die Inkubation der Zellkulturflaschen erfolgte bei 37 °C in einer 5%igen CO₂-Atmosphäre.

2.5.2 Hep-G2

Die Zellen der Zelllinie Hep-G2 standen aus den Beständen des Göttinger Instituts für Arbeits-, Sozial- und Umweltmedizin zur Verfügung.

Die Zellen dieser Linie wurden aus 1975 entnommenem hepatozellulären Karzinom-Gewebe eines zu diesem Zeitpunkt 15jährigen argentinischen Jungen kultiviert (Aden *et al.* 1979).

Es handelt sich um metabolisch kompetente Leberzellen, welche sich viele Eigenschaften primärer Leberzellen erhalten haben und sich somit hervorragend als Surrogat für menschliche Hepatozyten in experimentellen Studien eignen (Lu und Huang 1994). Der Effekt potentiell toxischer Substanzen auf Hepatozyten ist medizinisch von großer Relevanz, da der in der Leber stattfindende Stoffwechsel sich unmittelbar auf weite Anteile des menschlichen Organismus auswirkt.

Es wurde beschrieben, dass die Zellen vom Typ Hep-G2 kein Hepatitis B-Virusgenom enthielten (Aden *et al.* 1979). Sie besitzen jedoch die Fähigkeit, eine Reihe von lebereigenen Zellsyntheseprodukten wie alpha-Fetoprotein, Albumin, alpha-2-Makroglobulin, alpha-1-Antitrypsin, Transferrin, alpha-1-Antichymotrypsin, Haptoglobin, Coerulosplasmin, Plasminogen, Komplementfaktoren (C3, C4), C3-Aktivator, Fibrinogen, alpha-1-saures-Glykoprotein, alpha-2-HS-Glykoprotein, beta-Lipoprotein und Retinol-bindendes Protein zu synthetisieren (Knowles *et al.* 1980).

Morphologisch handelt es sich um adhärent wachsende epithelartige Zellen, welche in Monoschichten und kleinen Aggregaten wachsen.

Die Verdopplungszeit beträgt ca. 50 – 60 Stunden.

Immunhistochemisch sind die Zellen positiv für Cytokeratin, Cytokeratin-8, Cytokeratin-18, EpCAM, negativ für Cytokeratin-7, Cytokeratin-17, Desmin, Endothel, GFAP, Neurofilament und Vimentin.

Der Zellstamm weist in ELISA-Tests negative Ergebnisse für reverse Transkriptase-Viren sowie für das Epstein-Barr-Virus, Hepatitis B- und C-Virus, Humanes Herpesvirus 8, HIV, HTLV-I/II und SMRV auf (DSMZ 2013b).

Im Rahmen dieser Arbeit erfolgten die Zellpassagen bei einer Konfluenz von 70 bis 80 % alle drei bis vier Tage unter Verwendung von Trypsin. In Abhängigkeit von der jeweils ermittelten Zellzahl pro ml Nährflüssigkeit wurden Aliquots von $2 - 3 \times 10^6$ Zellen/ml ausgesät.

Die Inkubation der Zellkulturflaschen erfolgte bei 37 °C in einer 5%igen CO₂-Atmosphäre.

2.5.3 Zellkonservierung und -kultivierung

Die verwendeten Zelllinien wurden unter sterilen Bedingungen in 75-cm²-Kulturflaschen angezüchtet, wobei die jeweiligen Verdoppelungszeiten beachtet wurden und jede Kulturflasche für 2 Zellpassagen verwendet wurde.

Bei ausreichender Konfluenz von idealerweise 80 % wurde das Kulturmedium abgegossen und die Zellen mit 2 ml PBS-Dulbecco zum Entfernen des restlichen Mediums überspült. Nach Abgießen des PBS wurden 2 ml Trypsin zum Ablösen der Zellen einerseits vom Boden der Kulturflasche und andererseits voneinander hinzugegeben und durch Schwenken gleichmäßig über die Zellen verteilt. Für die Dauer der Trypsinierung wurden die Kulturflaschen bei 37 °C und 5 % CO₂ im Brutschrank aufbewahrt. Nach weitgehend vollständiger Ablösung der Zellen vom Flaschenboden wurden 3 ml Kulturmedium zum Abblocken des Trypsinierungs-Vorgangs hinzugegeben und die gesamte Flüssigkeitsmenge mit den darin enthaltenen Zellen in ein 13-ml-Zentrifugenröhrchen überführt. Das Röhrchen wurde bei Raumtemperatur mit 300 g entsprechend 1080 rpm 6 min zentrifugiert und der Überstand verworfen. Nach Aufklopfen des Zentrifugats wurden 5 ml frisches Zellkulturmedium hinzugegeben und der Zellrückstand durch vorsichtiges Klopfen gleichmäßig im Medium verteilt.

Zur Bestimmung der Zellzahl wurden 10 µl der Zellsuspension auf eine Thoma-Zählkammer gegeben und bei 40facher Vergrößerung im Lichtmikroskop ausgezählt.

In Abhängigkeit von der zur Weiterzucht benötigten Zellzahl wurde eine entsprechende Menge der Zellsuspension entnommen und zusammen mit insgesamt 20 ml Kulturmedium wieder in eine 75-cm²-Kulturflasche passagiert. Die restliche Zellsuspension wurde verworfen. Die Flaschen wurden zwischen den einzelnen Passagen bei 37 °C in angefeuchteter 5%iger CO₂-Atmosphäre bebrütet.

Zur Konservierung bestimmter Passagen der Zellstämme wurden in regelmäßigen Abständen Anteile der im obigen Absatz erwähnten Zellsuspension nach Abzug der zur Weiterzucht benötigten Menge bei -80 °C eingefroren. Das Einfriermedium setzte sich zu 70 % aus dem jeweiligen Kulturmedium, 20 % FCS und 10 % DMSO zusammen. Für jedes einzufrierende Röhrchen mit Zellen wurde wiederum eine Menge der Zellsuspension entnommen, welche die jeweilige zur Weiterzucht nötige Zellzahl enthielt, und bei Raumtemperatur mit 300 g für 6 min zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen und das Zentrifugat durch leichtes Anklopfen des Röhrchens aufgelockert. Nach Zugabe von 1 ml des Einfriermediums wurde das Röhrchen bei -80 °C eingefroren. Der Zellabfall wurde zum Ausschluss eines Infektionsrisikos autoklaviert.

2.6 Thioadduktsynthese der Thiomersal-Konjugate Ethylquecksilber-L-Glutathion und Thiosalicyl-L-Glutathion-Disulfid

2.6.1 Reaktionsansatz und Inkubation

Um die Zelltoxizität der im menschlichen Körper durch Reaktion mit dem körpereigenen Tripeptid Glutathion (GSH) entstehenden Thiomersal-Konjugate Ethylquecksilber-L-Glutathion und Thiosalicyl-L-Glutathion-Disulfid zu testen, wurden diese Metaboliten synthetisiert.

Der Reaktionsansatz erfolgte unter physiologischen Bedingungen durch Einwaage von 4 mg Thiomersal und 9 mg reduziertem GSH pro 1 ml Natriumhydrogenphosphatpuffer (Na₂HPO₄ x 2 H₂O). Der Ansatz inkubierte für 16 h über Nacht zunächst bei einer der menschlichen Körpertemperatur entsprechenden Temperatur von 37 °C auf einem Rollmischer (40 rpm). Für eine größere Ausbeute wurde die Inkubations-Temperatur letztlich auf 60 °C erhöht. Um eventuelle bei dieser Temperatur entstehende unlösliche Nebenprodukte zu entfernen, wurden die Reaktionsansätze im Anschluss an die Inkubation mikrofiltriert und zentrifugiert.

Zur Kontrolle wurden Ansätze der beiden Reinsubstanzen GSH und Thiomersal hergestellt und gleichermaßen über Nacht auf dem Rollmischer inkubiert.

2.6.2 Aufreinigung

Mittels der präparativen HPLC konnten die beiden Thiomersal-Konjugate nach Reaktion isoliert (s. hierzu Abb. 6) und in Mengen im Milligramm-Bereich gewonnen werden. Da nur ein Volumen von 100 µl pro HPLC-Lauf auf die Chromatographie-Säule gegeben werden konnten – der Einsatz größerer Mengen führte zu einer wesentlich schlechteren Trennung und wurde daher wieder aufgegeben – zog der Prozess der Konjugatsynthese sich über einen Zeitraum von mehreren Monaten hin.

Über diesen Zeitraum wurden 41 Reaktionsansätze von je 1 ml (2 Ansätze), 2 ml (6 Ansätze), 3 ml (6 Ansätze) oder 4 ml (27 Ansätze) hergestellt und aufgearbeitet.

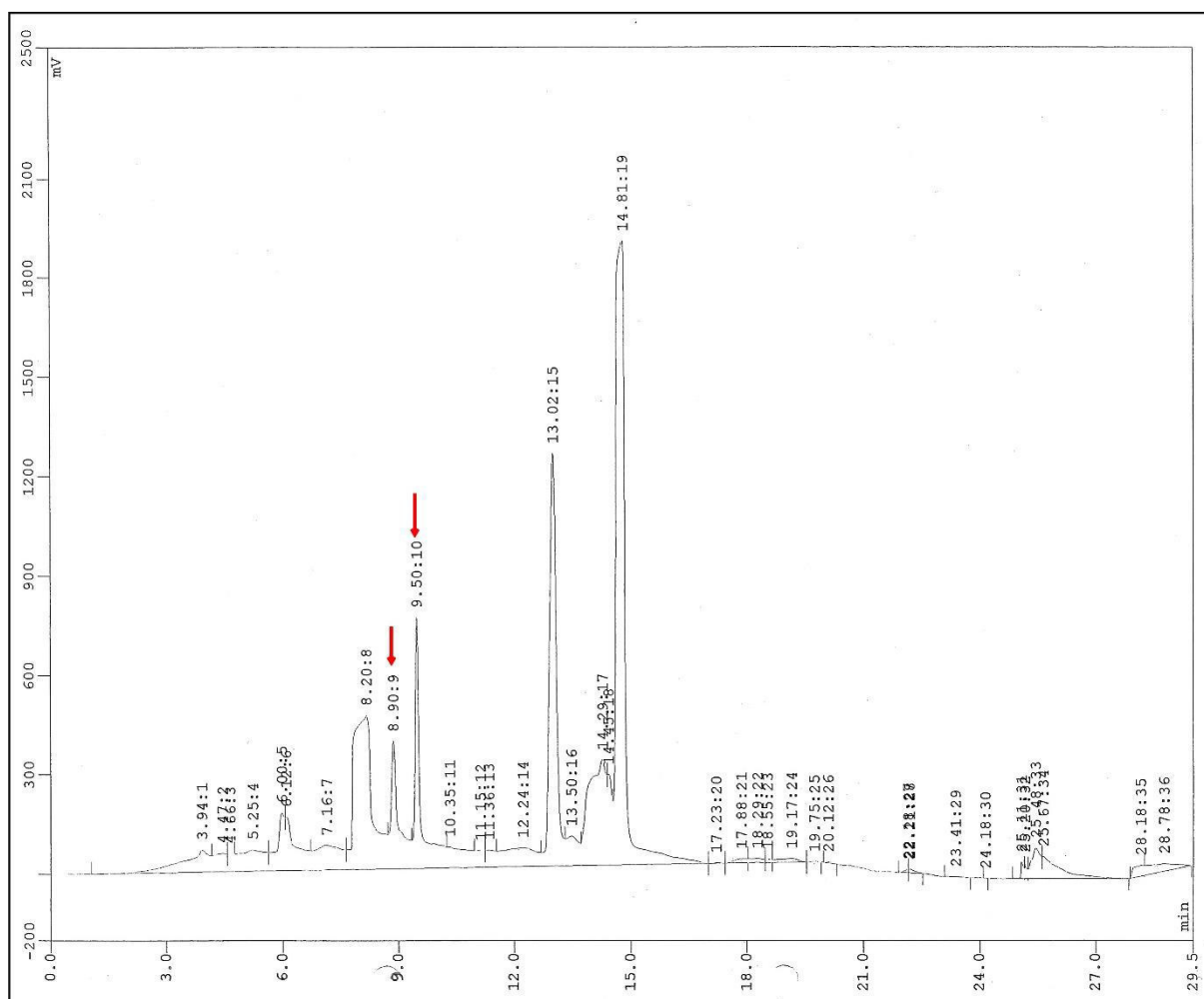


Abb. 6: HPLC-Chromatogramm zur Aufreinigung der Thiomersal-Konjugate. Ethylquecksilber-L-Glutathion eluiert bei 8.90:9 min und Thiosalicyl-L-Glutathion-Disulfid bei 9.50:10 min.

Die in Lösung befindlichen Konjugate wurden nach dem Auffangen in 50-ml-Reaktionsröhrchen mit Stickstoffgas eingengt, um möglichst große Mengen an

Acetonitril aus dem Acetonitril-Puffergemisch schonend zu entfernen. Die verbleibenden Flüssigkeitsmengen wurden bei $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ tiefgefroren und anschließend mit Hilfe eines Lyophilisators gefriergetrocknet, bis zum Vorliegen der Trockenmasse.

Um die völlige Trocknung der Substanz sicherzustellen, wurden die gefriergetrockneten Substanzmengen in einem Vakuum-Exsikkator über Phosphor-Pentoxid aufbewahrt.

Ethylquecksilber-L-Glutathion stellte sich nach der Gefrier Trocknung als weißes kristallines Pulver dar, Thiosalicyl-L-Glutathion-Disulfid ebenfalls als weißes kristallines Pulver oder als bernsteinfarbene kristallartige Festsubstanz.

Insgesamt wurden ca. 580 mg Ethylquecksilber-L-Glutathion sowie ca. 820 mg Thiosalicyl-L-Glutathion-Disulfid gewonnen.

2.6.3 Reinheitsbestimmung

Um die Reinheit der gesammelten Substanzen zu überprüfen, wurden aus den gefriergetrockneten Trockenmassen ca. 0,5 mg entnommen und in jeweils 500 μl destilliertem Wasser gelöst. In Portionen von 100 μl wurden diese Lösungen auf die HPLC-Säule gegeben, analysiert und erneut aufgefangen und gefriergetrocknet. Die HPLC-Chromatogramme zeigten eine Reinheit von $> 95\%$.

2.6.4 Strukturanalyse

2.6.4.1 NMR-Spektroskopie

^1H - und ^{13}C -NMR-Spektren: Varian U 300 (300 bzw. 75.5 MHz). Chemische Verschiebungen sind in δ -Werten relativ zu externem Tetramethylsilan bzw. zu dem eingesetzten Lösungsmittel als internem Standard angegeben. Multiplizitätsangaben bei zusätzlicher APT-Technik (APT = *attached proton test*): + = CH/CH₃, - = C/CH₂.

Charakterisierung der Signalaufspaltung: s = Singulett, d = Duplett, t = Triplett, q = Quartett, M = Multipllett, dd = doppeltes Duplett. Alle Spektren wurden nach 1. Ordnung ausgewertet. Sämtliche Kopplungskonstanten wurden als Betrag angegeben.

Für die Zuordnung der Signale verwendete Abkürzungen sind: Glu- = Glutamyl-, Gly- = Glycinyln-, Cys- = Cysteinyl-.

2.6.4.2 Massenspektrometrie

Bruker Esquire System mit Multi-Hochfrequenz Ionenfalle, Elektrospray-Ionisation (ESI) im Positiv-Ionen-Modus (Aufgabe mittels Spritzenpumpe), Full-Scan-Detektion. Systemsoftware: Bruker DataAnalysis Version 1.0.

Für die erweiterte Strukturaufklärung wurden MS/MS-Spektren spezifischer Ionen durch Isolierung in der Ionenfalle und anschließende Fragmentierung aufgezeichnet.

2.6.4.3 NMR- und ESI-MS-Daten der Thiomersal-L-Glutathion-Konjugate

Ethylquecksilber-L-Glutathion ($C_{12}H_{21}N_3O_6HgS$):

1H -NMR (300 MHz, DMSO- d_6): δ = 1.28 (t, J = 6 Hz, 3 H, -CH₃), 1.38 (m, J = 9 Hz, 2 H, -CH₂Hg), 1.96 (q, J = 6 Hz, 2 H, H-3 in Glu), 2.38 (t, J = 6 Hz, 2 H, H-4 in Glu), 3.07 (dd, J = 12 Hz, J = 7 Hz, 1 H, CH^AH^BS), 3.27 (dd, J = 15 Hz, J = 7 Hz, 1 H, CH^AH^BS), 3.63 (t, J = 6 Hz, 1 H, H-2 in Glu), 3.75 (d, J = 6 Hz, 2 H, CH₂ in Gly), 4.38 (m, J = 6 Hz, 1 H, CHN in Cys), 8.18 (d, J = 9 Hz, 1 H, CONH in Cys), 8.52 (t, J = 6 Hz, 1 H, CONH in Gly). Abb. 7 stellt das 1H -NMR von Ethylquecksilber-L-Glutathion dar.

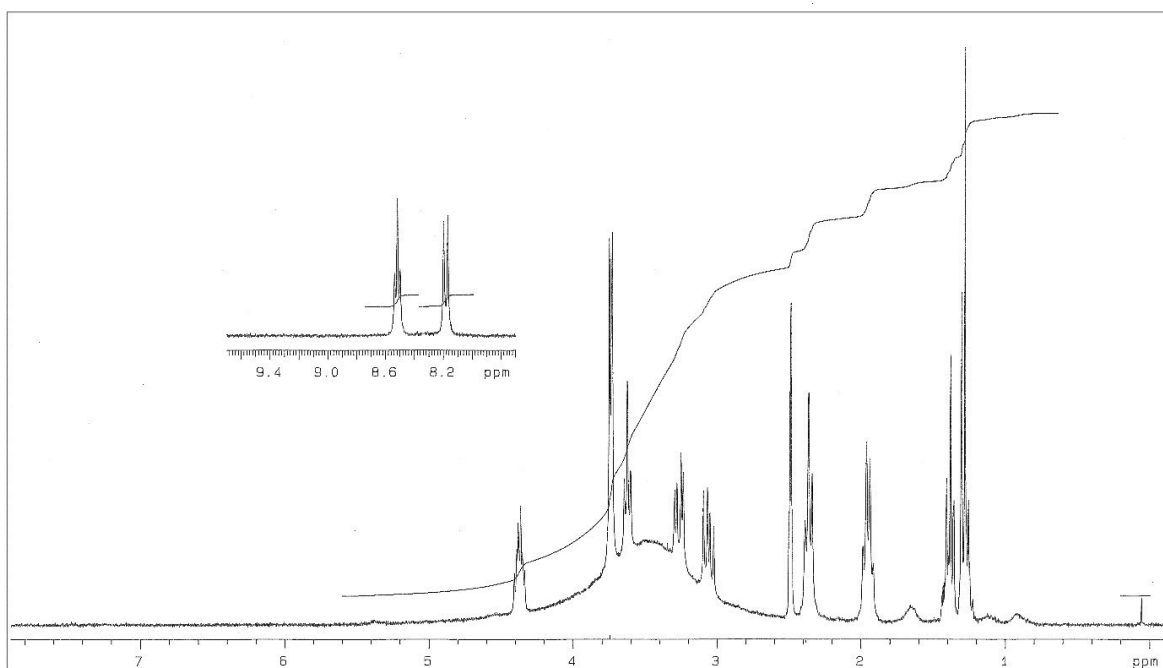


Abb. 7: 1H -NMR von Ethylquecksilber-L-Glutathion.

^{13}C -NMR (75.5 MHz, DMSO- d_6): δ = 13.5 (CH_3), 26.4, 27.0, 29.0, 31.2 (CH_2), 40.7 (CH_2N), 52.3 (CHN in Glu), 56.6 (CHN in Cys), 170.4, 170.8, 171.0, 171.6 (CO).

ESI-MS: m/z (%) = 538 (100) [$\text{M}^+ + \text{H}$], 409 (8) [$\text{M}^+ + \text{H} - \text{Glu}$] (s. Abb. 8).

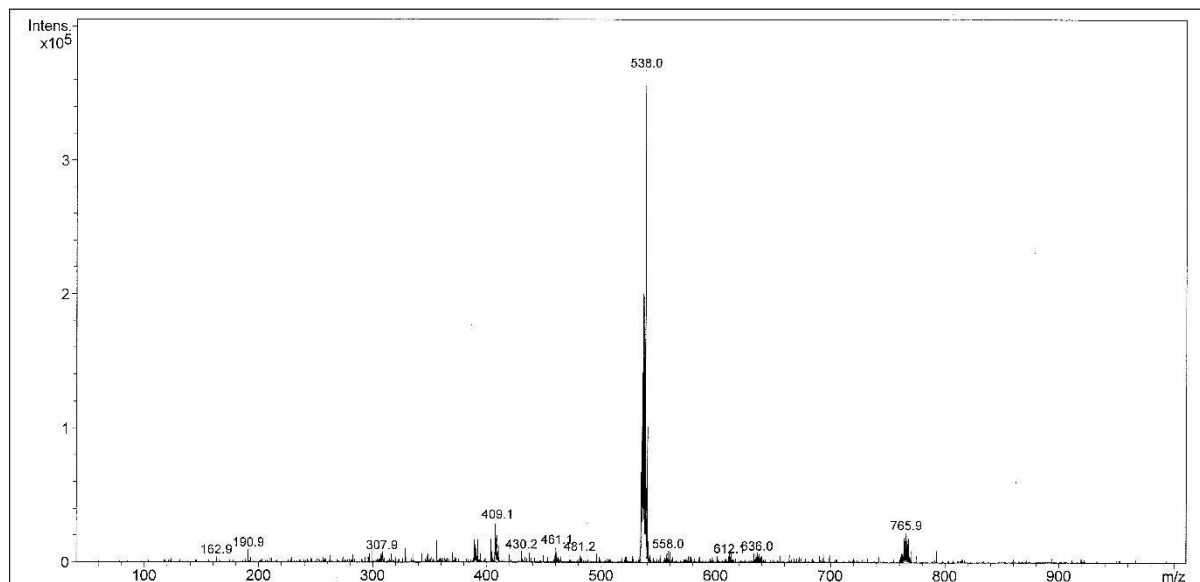


Abb. 8: ESI-Massenspektrum von Ethylquecksilber-L-Glutathion.

Das Element Quecksilber umfasst sieben häufige natürliche Isotope (^{196}Hg bis ^{204}Hg). Das häufigste Isotop ist ^{202}Hg (Häufigkeit: 29,7 %), die Häufigkeiten der anderen Isotope reichen von 0,2 – 23,1 %. Daraus resultiert im Massenspektrum ein charakteristisches Isotopenmuster mit dem Hauptpeak m/z 538 [$\text{M}^+ + \text{H}$] (s. Abb. 9).

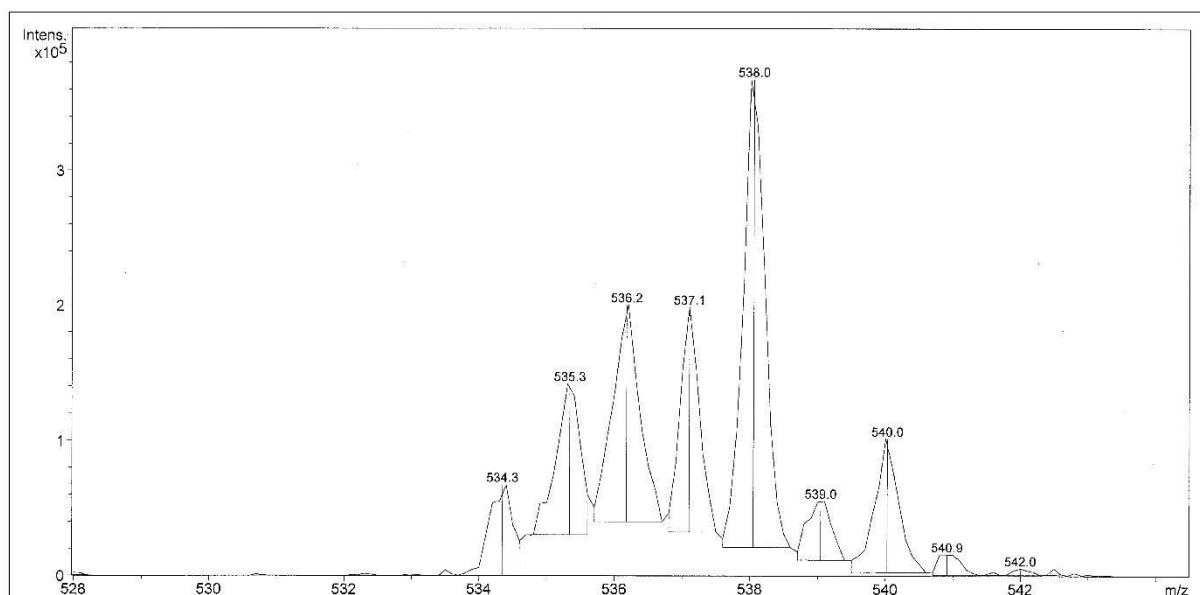


Abb. 9: Isotopenmuster von Quecksilber mit Hauptpeak m/z 538.

Thiosalicyl-L-Glutathion-Disulfid (C₁₇H₂₁N₃O₈S₂):

¹H-NMR (300 MHz, DMSO-d₆): δ = 1.97 (m, *J* = 6 Hz, 2 H, H-3), 2.34 (m, *J* = 6 Hz, 2 H, H-4), 2.88 (dd, *J* = 12 Hz, *J* = 7 Hz, 1 H, CH^AH^BS), 3.02 (dd, *J* = 15 Hz, *J* = 7 Hz, 1 H, CH^AH^BS), 3.67 (d, *J* = 6 Hz, 2 H, CH₂ in Gly), 3.78 (t, *J* = 6 Hz, 1 H, H-2 in Glu), 4.47 (m, *J* = 6 Hz, 1 H, CHN in Cys), 7.27 (t, *J* = 8 Hz, 1 H, H-3'), 7.58 (t, *J* = 8 Hz, 1 H, H-4'), 7.90 (d, *J* = 8 Hz, 1 H, H-5'), 8.02 (d, *J* = 8 Hz, 1 H, H-2'), 8.32 (d, *J* = 6 Hz, 1 H, CONH), 8.36 (d, *J* = 9 Hz, 1 H, CONH).

Abb. 10 stellt das ¹H-NMR von Thiosalicyl-L-Glutathion-Disulfid dar.

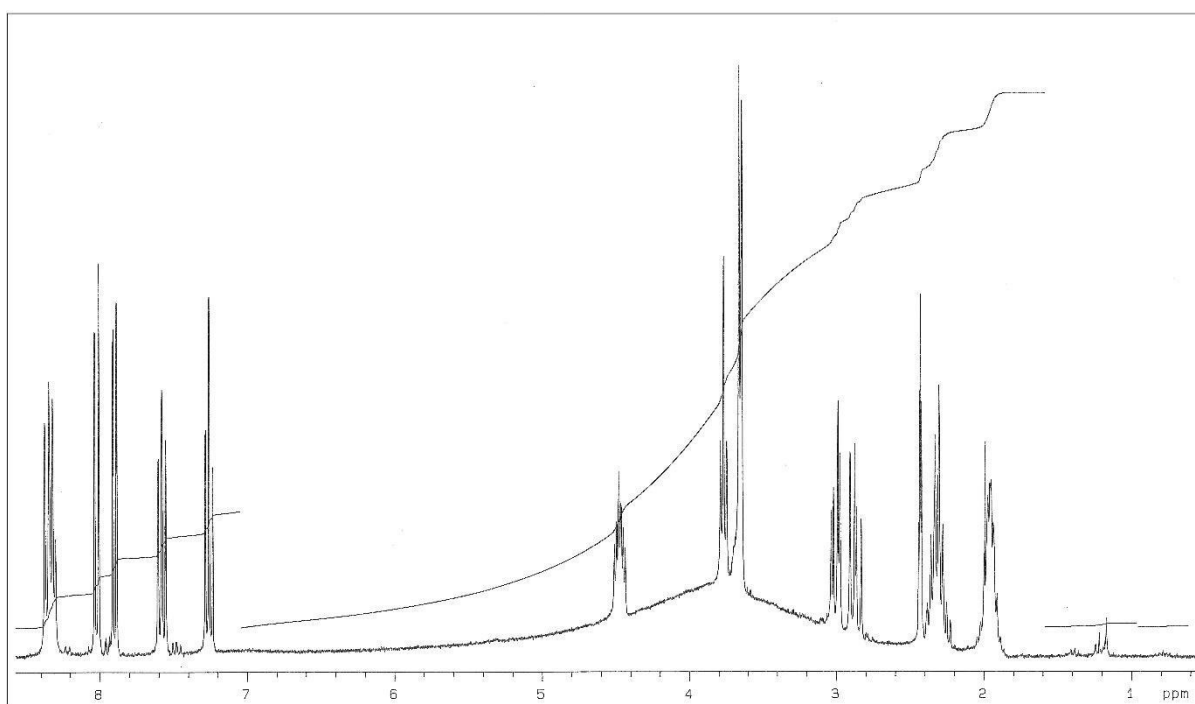


Abb. 10: ¹H-NMR von Thiosalicyl-L-Glutathion-Disulfid.

¹³C-NMR (75.5 MHz, DMSO-d₆): δ = 26.0, 30.8 (CH₂), 40.8 (CH₂N), 51.9 (CH₂N in Glu), 125.0, 125.4, 131.3, 132.9 (CH), 127.8 (C), 140.1 (C), 167.4, 170.0, 170.6, 170.7 (CO).

ESI-MS: m/z (%) = 460 (100) [$M^+ + H$], 331 (4) [$M^+ + H - Glu$] (s. Abb. 11).

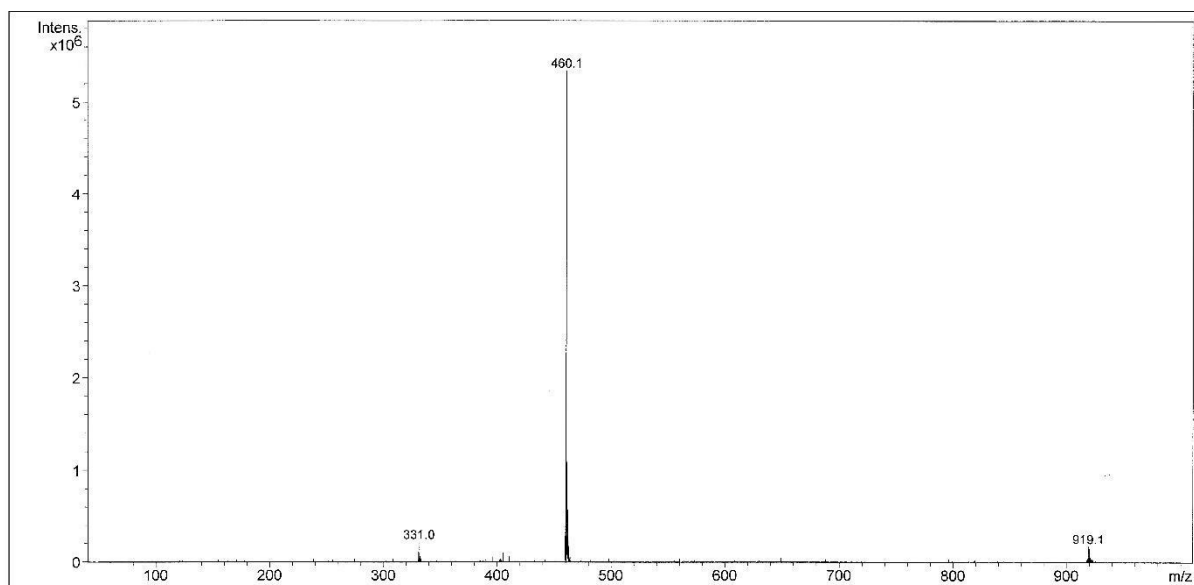


Abb. 11: ESI-Massenspektrum von Thiosalicyl-L-Glutathion-Disulfid.

2.7 Neutralrot-Assay als dosisabhängiger Zytotoxizitätstest

Bei dem Neutralrot-Assay handelt es sich um eine seit langem etablierte Methode, die Zytotoxizität einer Substanz in Verdünnungsreihen zu bestimmen, als Grundlage zur Ermittlung der IC_{50} . Borenfreund *et al.* (1988) beschreiben, dass der Neutralrot-Assay die Anforderungen an die Verlässlichkeit eines Zytotoxizitätstests erfüllt, sodass er als Verfahren für die im Rahmen dieser Arbeit durchgeführten *in vitro*-Untersuchungen gewählt wurde.

2.7.1 Standardverfahren

Um die Zellaktivität der für diese Arbeit verwendeten Zellstämme A-549 und Hep-G2 nach der Exposition gegen die Testsubstanzen Thiomersal, Ethylquecksilber-L-Glutathion und Thiosalicyl-L-Glutathion-Disulfid sowie gegen die Referenzsubstanzen *p*-Chlormercuribenzoessäure und Ethylquecksilberchlorid zu bestimmen, wurden Zellkulturen der Zelllinien in Mikrotiterplatten mit je 12 x 8 Kavitäten angelegt. Hierzu

wurde jede Kavität mit einer definierten Anzahl Zellen und einem Zellkulturmedium unter sterilen Bedingungen beimpft.

Die Ermittlung der Zellzahl erfolgte mittels einer Thoma-Zählkammer, wobei in den Versuchsreihen mit A-459 je 10.000 Zellen pro Kavität und in den Versuchsreihen mit Hep-G2 je 16.000 Zellen pro Kavität ausgestreut wurden. Die Zellen wurden in 200 µl Kulturmedium pro Kavität aufgebracht und über 24 h bei 37 °C in einer angefeuchteten, 5%igen CO₂-Atmosphäre angezüchtet, um eine ausreichende Konfluenz zu erhalten.

Nach Ablauf von 24 h wurde eine Verdünnungsreihe der jeweils zu prüfenden Testsubstanz in serumfreiem Kulturmedium hergestellt und nach Entfernung des alten Kulturmediums durch Ausklopfen der Mikrotiterplatten in Mengen von je 200 µl auf die Kavitäten aufgetragen. Hierbei wurden von jeder erstellten Konzentration der Testsubstanz 8 Proben auf die Platte aufgebracht. Eine Negativkontrolle erfolgte mittels einer 20%igen DMSO-Lösung, eine Positivkontrolle mittels einer Kavitätenreihe, welche nicht mit einer Testsubstanz versetzt wurde, ebenso wie der zur Aktivitätsmessung erforderliche Leerwert.

Es folgte eine weitere Inkubation der Mikrotiterplatten bei 37 °C und 5 % CO₂ über 24 h. Die Neutralrot-Stammlösung wurde am Vortag der Aktivitätsbestimmung mit serumfreiem Kulturmedium angesetzt und ebenfalls über Nacht bei 37 °C inkubiert. Vor der Verwendung wurde die Stammlösung durch eine sterile Membran filtriert, um ausgefallene Farbkristalle zu entfernen und die Sterilität der Lösung zu gewährleisten. Der Neutralrottest erfolgte in modifizierter Form nach Borenfreund und Puerner (1985): Nachdem die Zellen 24 h der Testsubstanz ausgesetzt waren, wurden diese durch erneutes Ausklopfen der Mikrotiterplatten entfernt und in alle Kavitäten mit Ausnahme der Leerwerte 100 µl des Neutralrotmediums pipettiert. Die Leerwert-Kavitäten wurden mit 100 µl PBS versetzt. Anschließend wurden die Platten für weitere 3 h bei 37 °C und 5 % CO₂ inkubiert, ehe der Farbstoff durch Ausklopfen der Platten entfernt wurde. Danach erfolgte ein Waschschrift, bei welchem alle Kavitäten mit 100 µl einer Lösung von 1 % Formaldehyd und 1 % Calciumchlorid in destilliertem Wasser versetzt und nach 2 min erneut ausgeklopft wurden. Zur Farbextraktion des von den Zellen aufgenommenen Neutralrots wurden pro Kavität je 100 µl einer Lösung von 1 % Essigsäure und 50 % Ethanol aufgebracht.

Nach weiteren 10 min bei Raumtemperatur wurden die Mikrotiterplatten in einem Plattenphotometer für 15 sec geschüttelt und anschließend die Absorption des aus den Zellen extrahierten Farbstoffs bei 540 nm gemessen.

Es besteht eine lineare Beziehung zwischen der optischen Dichte des extrahierten Farbstoffs und der Zahl der vitalen Zellen (Borenfreund *et al.* 1988).

Nach der photometrischen Messung der Mikrotiterplatten erfolgte die Berechnung der Vitalität der überlebenden Zellen mittels folgender Gleichung:

$$\frac{OD_{TC} - OD_{NC}}{OD_{PC} - OD_{NC}} \times 100 = \text{Zellvitalität (in \%)}$$

Dabei sind:

OD_{TC} = Optische Dichte der Testkonzentration,

OD_{PC} = Optische Dichte der Positivkontrolle,

OD_{NC} = Optische Dichte der Negativkontrolle.

Hierfür wurde im Vorfeld das arithmetische Mittel der jeweils acht Einzelmesswerte jeder Substanzkonzentration sowie von Leerwert, Positivkontrolle und Negativkontrolle berechnet.

Die Berechnungen wurden mit Hilfe des Software-Programms Magellan™ der Firma Tecan durchgeführt.

Die Mittelwerte wurden berechnet und als Dosis-Wirkungs-Kurve aufgetragen. Aus diesen Kurven kann durch graphische Auswertung die effektive Dosis einer Substanz bestimmt werden, welche die Vitalität oder Aktivität der Zellen unter Standardbedingungen um 50 % reduziert (IC₅₀). Hierfür wird in der Dosis-Wirkungs-Kurve durch den Punkt, welcher auf der Ordinate einer Vitalität von 50 % entspricht, eine Parallele gezogen. Ausgehend von dem Schnittpunkt dieser Parallelen mit der Dosis-Wirkungs-Kurve wird ein Lot gefällt, welches die Abszisse schneidet, wodurch sich der IC₅₀-Wert ablesen lässt.

2.7.2 Test zur Zellvitalität in Anwesenheit von Thiomersal, *p*-Chlormercuribenzoessäure, Ethylquecksilberchlorid, Ethylquecksilber-L-Glutathion und Thiosalicyl-L-Glutathion-Disulfid

Um die Messergebnisse der toxischen Effekte der untersuchten Substanzen auf die Zellen vergleichen zu können, wurden im Neutralrottest jeweils Konzentrationsbereiche gewählt, die erstens ein möglichst breites Vitalitätsspektrum abdeckten und zweitens nach Möglichkeit die IC₅₀ der jeweiligen Testsubstanz beinhalteten (s. hierzu Tab. 1). Zunächst wurden die Konzentrationsbereiche anhand von aus Studien oder Voruntersuchungen bereits bekannten Daten gewählt und im Verlauf der Untersuchungen nach Bedarf erweitert.

Für jeden Konzentrationsbereich wurde mindestens drei Mal eine Messung der Zellvitalität mittels des oben beschriebenen Neutralrot-Assays durchgeführt.

Tab. 1: Konzentrationsbereiche im Neutralrot-Zytotoxizitätsassay für die Testsubstanzen Thiomersal, *p*-Chlormercuribenzoessäure, Ethylquecksilberchlorid, Ethylquecksilber-L-Glutathion und Thiosalicyl-L-Glutathion-Disulfid und die Zelllinien A-549 und Hep-G2. c_{min}, minimale Stoffmengenkonzentration; c_{max}, maximale Stoffmengenkonzentration.

	Zelllinie			
	A-549		Hep-G2	
Testsubstanz	c _{min} [μM]	c _{max} [μM]	c _{min} [μM]	c _{max} [μM]
Thiomersal	0,08	80	0,08	80
<i>p</i> -Chlormercuribenzoessäure	0,31	120	0,31	120
Ethylquecksilberchlorid	0,16	80	0,16	80
Ethylquecksilber-L-Glutathion	0,31	80	0,31	80
Thiosalicyl-L-Glutathion-Disulfid	2,5	320	5	320

3 Ergebnisse

3.1 Synthese und Charakterisierung

Unter physiologischen Bedingungen wurden aus Thiomersal und L-Glutathion Ethylquecksilber-L-Glutathion und Thiosalicyl-L-Glutathion-Disulfid *in vitro* synthetisiert und mittels präparativer HPLC in einem Verfahren nach Müller *et al.* (2001) isoliert (s. Abschnitte 2.6.1 und 2.6.2).

Die isolierten Substanzen wurden mit Kernresonanz und Massenspektrometrie charakterisiert (s. Abschnitt 2.6.4).

3.2 Zellvitalität in Anwesenheit von Thiomersal

Die Zellvitalität der Zelllinien A-549 und Hep-G2 wurde jeweils für den Konzentrationsbereich von 0,08 μM bis 80 μM Thiomersal untersucht.

Für die Zelllinie A-549 ergab sich in diesem Konzentrationsbereich eine Zellvitalität von 99,93 % bis 0,60 % in Abhängigkeit von den gewählten Konzentrationen.

Die Zelllinie Hep-G2 wies in diesem Konzentrationsbereich eine Zellvitalität von 100 % bis 0 % in Abhängigkeit von den gewählten Konzentrationen auf.

Abb. 12 gibt die Messergebnisse wieder.

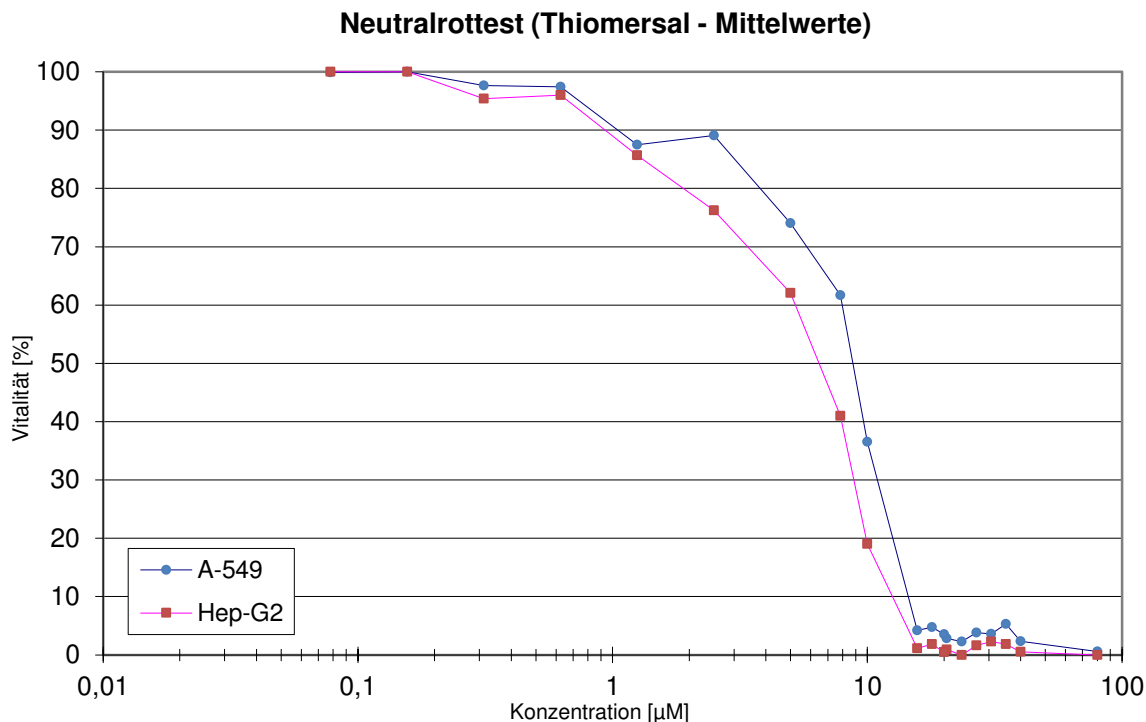


Abb. 12: Zellvitalität der Zelllinien A-549 und Hep-G2 in Anwesenheit von Thiomersal für die Konzentrationsbereiche von 0,08 μM bis 80 μM (Mittelwerte von mindestens 3 Bestimmungen).

Nach Inkubation mit Thiomersal zeigten die Zellen vom Typ A-549 eine Abnahme der Vitalität bei steigender Substanzkonzentration. Der steilste Abfall war im Bereich zwischen 7,85 und 15,71 μM sichtbar. Die IC_{50} lag bei 8,7 μM . Ab einer Konzentration von 15,71 μM war nur noch eine minimale Zellvitalität vorhanden.

Die Zellen vom Typ Hep-G2 zeigten ebenfalls einen deutlichen Vitalitätsverlust bei steigender Substanzkonzentration nach Inkubation mit Thiomersal, wobei der toxische Effekt in dieser Zelllinie durchweg stärker war als bei den Zellen vom Typ A-549. Die stärkste Vitalitätsreduktion fand sich zwischen den Konzentrationen 5 und 10 μM . Die IC_{50} lag bei 6,43 μM , und damit bei einer etwas geringeren Substanzkonzentration als bei der Zelllinie A-549. Ab einer Konzentration von 15,71 μM war auch bei diesen Zellen nur noch eine minimale bis gar keine Zellvitalität mehr nachzuweisen.

3.3 Zellvitalität in Anwesenheit von *p*-Chlormercuribenzoessäure

Die erste Referenzsubstanz *p*-Chlormercuribenzoessäure wurde jeweils in einem Konzentrationsbereich von 0,31 μM bis 120 μM für die Zelllinien A-549 und Hep-G2 untersucht.

Für die Zelllinie A-549 ergab sich in diesem Konzentrationsbereich eine Zellvitalität von 95,88 % bis 0,41 % in Abhängigkeit von den gewählten Konzentrationen.

Die Zelllinie Hep-G2 wies in diesem Konzentrationsbereich eine Zellvitalität von 93,97 % bis 0,21 % in Abhängigkeit von den gewählten Konzentrationen auf.

Abb. 13 zeigt die Messergebnisse.

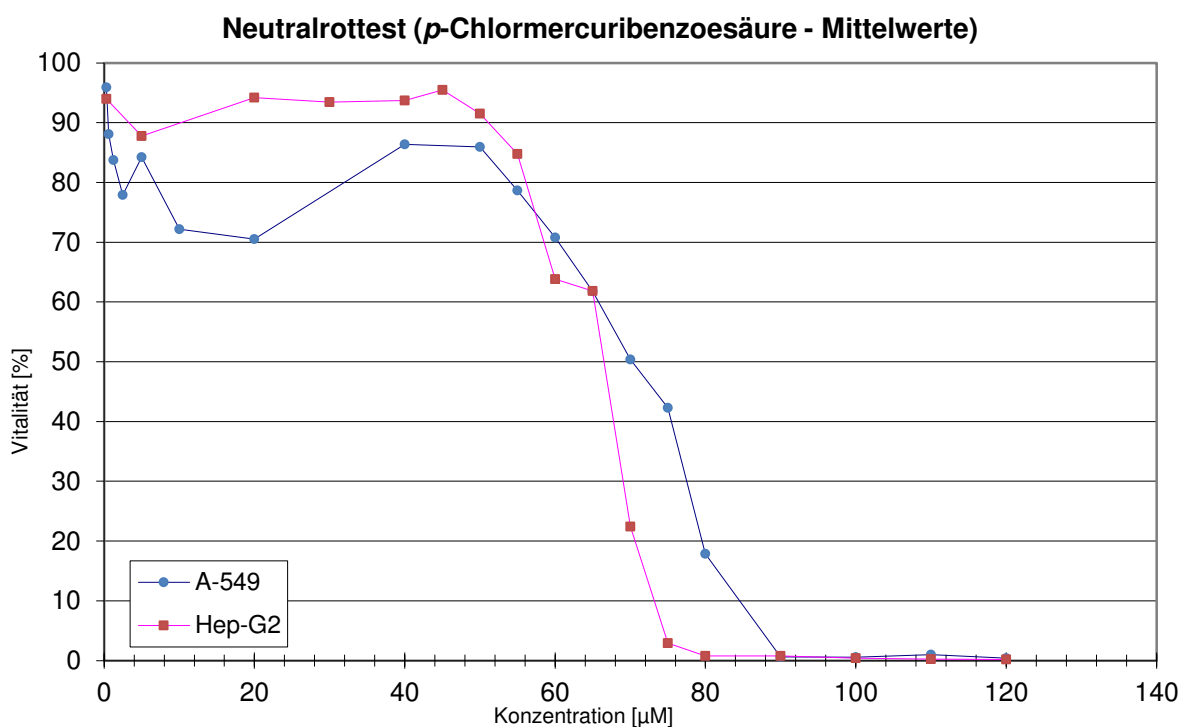


Abb. 13: Zellvitalität der Zelllinien A-549 und Hep-G2 in Anwesenheit von *p*-Chlormercuribenzoessäure für die Konzentrationsbereiche von 0,31 μM bis 120 μM (Mittelwerte von mindestens 3 Bestimmungen).

Die Zellen vom Typ A-549 zeigten in Anwesenheit von *p*-Chlormercuribenzoessäure bei steigender Substanzkonzentration eine stetige Vitalitätsreduktion, welche zwischen 75 und 80 μM am deutlichsten sichtbar war. Die IC_{50} lag für *p*-Chlormercuribenzoessäure bei 70,72 μM , also bei einer wesentlichen höheren Konzentration als für Thiomersal, wie

auch insgesamt bei dieser Substanz höhere Konzentrationen zu einer Vitalitätsreduktion in der gleichen Größenordnung führten.

Eine Abnahme der Vitalität bei steigender Substanzkonzentration von *p*-Chlormercuribenzoessäure wiesen auch die Zellen vom Typ Hep-G2 auf, mit einem starken Abfall bei Konzentrationen von 55 bis 75 μM . Ab Konzentrationen von 80 μM ließ sich nur noch eine Restvitalität nachweisen. Die IC_{50} lag bei einer Konzentration von 66,88 μM .

3.4 Zellvitalität in Anwesenheit von Ethylquecksilber-Chlorid

Für die zweite Referenzsubstanz Ethylquecksilber-Chlorid wurden für die Zelllinien A-549 und Hep-G2 jeweils Konzentrationsbereiche von 0,16 μM bis 80 μM untersucht.

Die Zelllinie A-549 zeigte in diesem Konzentrationsbereich eine Zellvitalität von 100 % bis 0 % in Abhängigkeit von den gewählten Konzentrationen.

Die Zelllinie Hep-G2 wies in diesem Konzentrationsbereich eine Zellvitalität von 96,37 % bis 0 % in Abhängigkeit von den gewählten Konzentrationen auf.

Die Messergebnisse sind in Abb. 14 dargestellt.

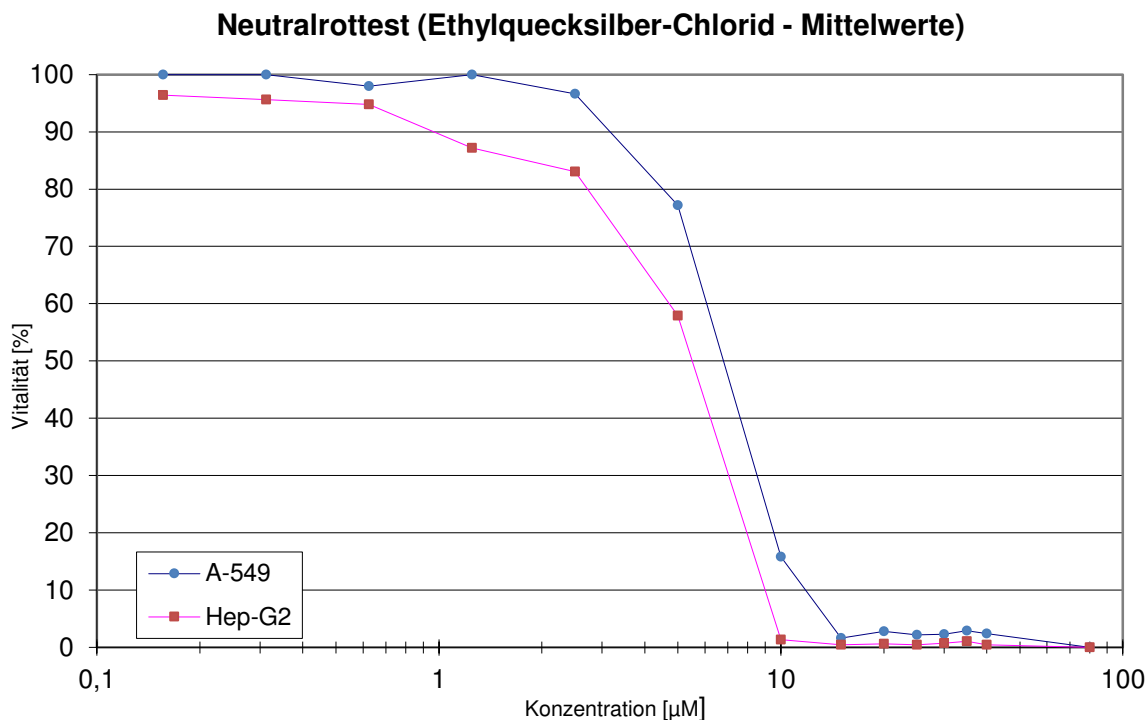


Abb. 14: Zellvitalität der Zelllinien A-549 und Hep-G2 in Anwesenheit von Ethylquecksilber-Chlorid für die Konzentrationsbereiche von 0,16 μM bis 80 μM (Mittelwerte von mindestens 3 Bestimmungen).

Die Inkubation mit steigenden Substanzkonzentrationen von Ethylquecksilber-Chlorid führte bei Zellen vom Typ A-549 zu einer starken Vitalitätsreduktion, besonders deutlich sichtbar im Bereich zwischen 5 und 10 μM , wo auch die IC_{50} bei 6,77 μM lag. Die Vitalität war ähnlich wie in Anwesenheit von Thiomersal bei einer Konzentration von 15 μM auf ein Minimum reduziert.

Die Zellen vom Typ Hep-G2 wiesen schon bei geringen Ethylquecksilber-Chlorid-Konzentrationen von < 0,63 μM keine volle Zellvitalität mehr auf. Eine nahezu kontinuierliche Vitalitätsreduktion fand hier ebenso statt wie bei der Zelllinie A-549 unter Einfluss derselben Substanz, wobei der toxische Effekt auf die Hep-G2-Zellen durchweg stärker war. Die deutlichste Vitalitätsreduktion fand im Bereich zwischen 5 und 10 μM statt. Die IC_{50} lag bei 5,45 μM . Schon ab einer Konzentration von 10 μM fand sich bei diesen Zellen nur noch eine Restvitalität.

3.5 Zellvitalität in Anwesenheit von Ethylquecksilber-L-Glutathion

Das GSH-Konjugat Ethylquecksilber-L-Glutathion wurde jeweils in einem Konzentrationsbereich von 0,31 μM bis 80 μM für die Zelllinien A-549 und Hep-G2 untersucht.

Die Zelllinie A-549 wies in diesem Konzentrationsbereich eine Zellvitalität von 100 % bis 26,83 % in Abhängigkeit von den gewählten Konzentrationen auf.

Für die Zelllinie Hep-G2 ergab sich in diesem Konzentrationsbereich eine Zellvitalität von 96,65 % bis 5,58 % in Abhängigkeit von den gewählten Konzentrationen.

Abb. 15 zeigt die Messergebnisse.

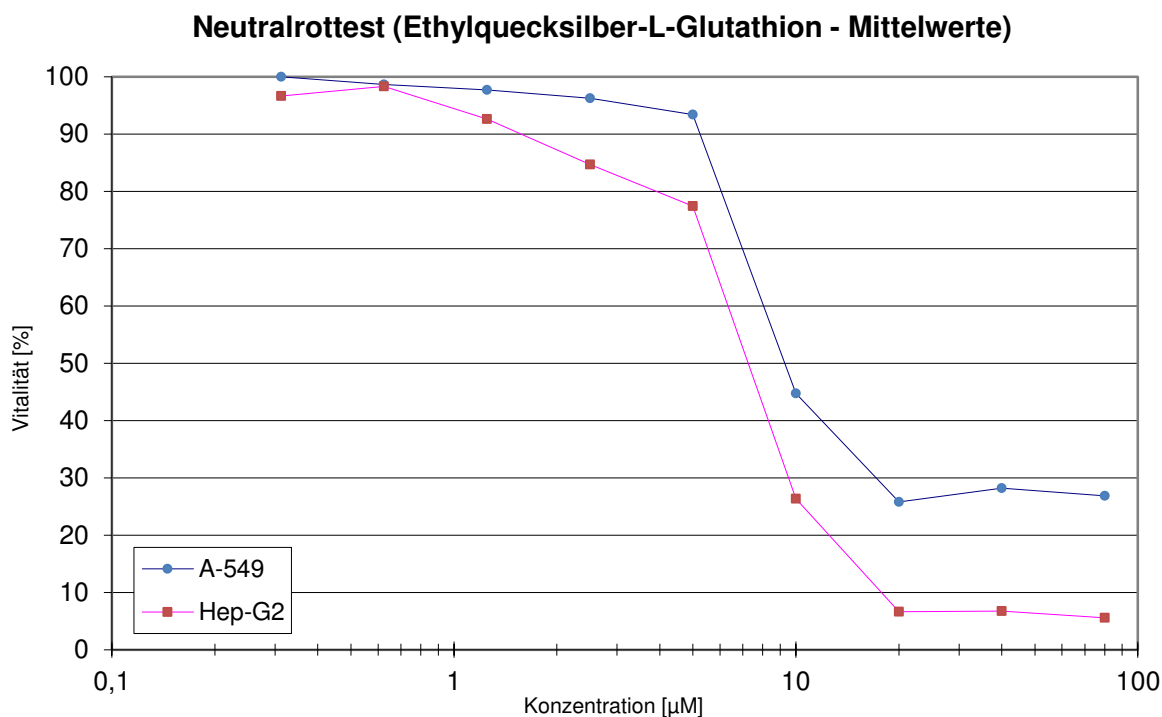


Abb. 15: Zellvitalität der Zelllinien A-549 und Hep-G2 in Anwesenheit von Ethylquecksilber-L-Glutathion für die Konzentrationsbereiche von 0,31 μM bis 80 μM (Mittelwerte von mindestens 3 Bestimmungen).

Auch für Ethylquecksilber-L-Glutathion ließ sich bei steigenden Konzentrationen eine Vitalitätsreduktion der Zellen vom Typ A-549 nachweisen. Der stärkste Effekt der Reduktion zeigte sich im Bereich zwischen 5 und 10 μM , die IC_{50} lag bei 9,19 μM . Ab einer Konzentration von ca. 20 μM sank die Zellvitalität auf ein Viertel des Ausgangswertes.

Auch für die Zellen vom Typ Hep-G2 ließ sich in Anwesenheit steigender Konzentrationen von Ethylquecksilber-L-Glutathion eine deutliche Vitalitätsreduktion nachweisen, wobei sich wiederum ein durchweg stärkerer Effekt zeigte als bei den Zellen vom Typ A-549. Der deutlichste Vitalitätsabfall ließ sich zwischen den Konzentrationen von 5 und 10 μM nachweisen, die IC_{50} lag bei 7,2 μM . Bei einer Konzentration von 80 μM war nur noch eine Restvitalität von durchschnittlich 5,58 % sichtbar, im Vergleich zu 26,83 % bei der Zelllinie A-549.

3.6 Zellvitalität in Anwesenheit von Thiosalicyl-L-Glutathion-Disulfid

Für das GSH-Konjugat Thiosalicyl-L-Glutathion-Disulfid wurde für die Zelllinien A-549 und Hep-G2 jeweils ein Konzentrationsbereich von 2,5 μM (für A-549) bzw. 5 μM (für Hep-G2) bis 320 μM untersucht.

Für die Zelllinie A-549 konnte in diesem Konzentrationsbereich eine Zellvitalität von 93,55 % bis 61,28 % in Abhängigkeit von den gewählten Konzentrationen gezeigt werden.

Die Zelllinie Hep-G2 wies in diesem Konzentrationsbereich eine Zellvitalität von 92,13 % bis 25,78 % in Abhängigkeit von den gewählten Konzentrationen auf.

In Abb. 16 sind die Messergebnisse dargestellt.

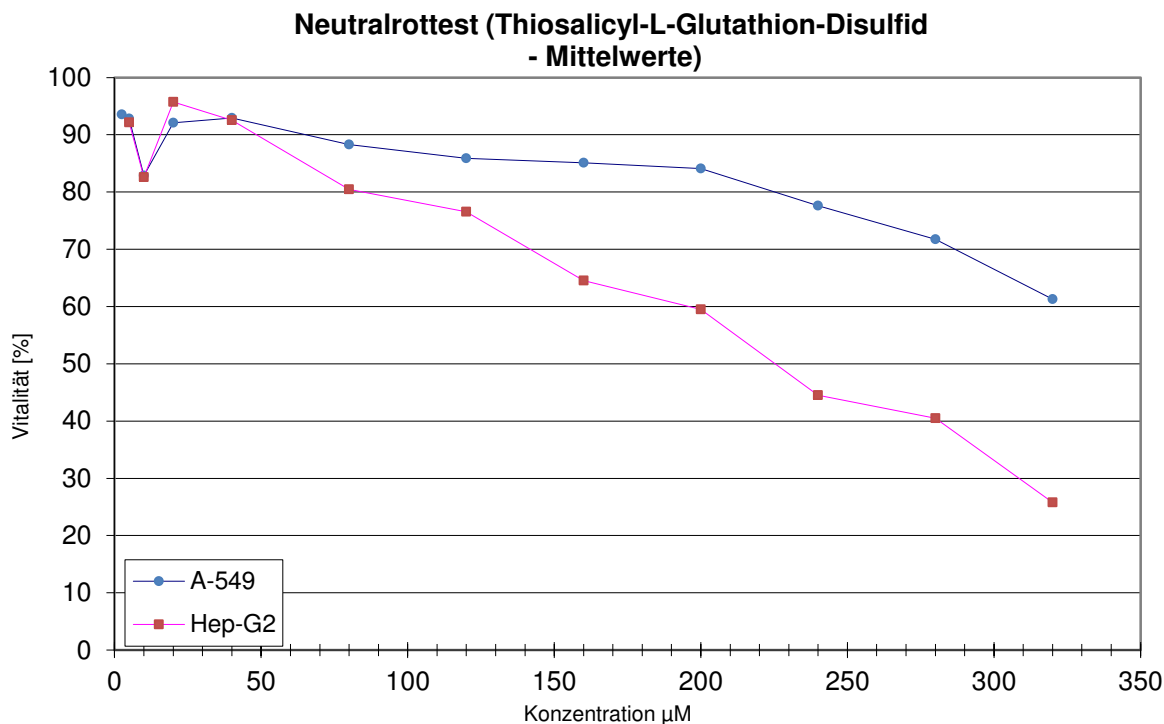


Abb. 16: Zellvitalität der Zelllinien A-549 und Hep-G2 in Anwesenheit von Thiosalicyl-L-Glutathion-Disulfid für die Konzentrationsbereiche von 2,5 μM bzw. 5 μM bis 320 μM (Mittelwerte von mindestens 3 Bestimmungen).

Thiosalicyl-L-Glutathion-Disulfid als das zweite im Fokus dieser Arbeit stehende Thiomersal-Konjugat wies ebenfalls einen Vitalitäts-reduzierenden Effekt auf die Zellen vom Typ A-549 auf, allerdings erst in sehr hohen Konzentrationen. Wegen einsetzender Schwerlöslichkeit der Substanz konnte die Konzentration nicht weiter gesteigert werden, sodass es nicht möglich war, eine IC_{50} für die Wirkung von Thiosalicyl-L-Glutathion-Disulfid auf die Zelllinie A-549 zu ermitteln. Bei einer Konzentration von 320 μM lag die Zellvitalität noch bei > 60 %.

Für die Zellen vom Typ Hep-G2 ließ sich eine stärkere Abnahme der Vitalität in Anwesenheit steigender Konzentrationen von Thiosalicyl-L-Glutathion-Disulfid nachweisen als für A-549. Wegen einsetzender Schwerlöslichkeit der Substanz konnte die Konzentration nicht beliebig gesteigert werden. Bei der im Laborversuch höchsten getesteten Konzentration von 320 μM lag die Zellvitalität bei > 25 %.

Es fehlte der typische umgekehrt sigmoidale Kurvenverlauf, sodass hier keine IC_{50} bestimmt werden konnte.

3.7 IC₅₀ der getesteten Substanzen

Tab. 2 gibt einen Überblick der IC₅₀ der in den Zelllinien A-549 und Hep-G2 untersuchten Substanzen.

Tab. 2: Im Neutralrot-Zytotoxizitätsassay ermittelte IC₅₀ für die Testsubstanzen Thiomersal, *p*-Chlormercuribenzoessäure, Ethylquecksilberchlorid, Ethylquecksilber-L-Glutathion und Thiosalicyl-L-Glutathion-Disulfid und die Zelllinien A-549 und Hep-G2.

	Zelllinie	
	A-549	Hep-G2
Testsubstanz	IC ₅₀ [μM]	IC ₅₀ [μM]
Thiomersal	8,7	6,43
<i>p</i> -Chlormercuribenzoessäure (Referenzsubstanz 1)	70,72	66,88
Ethylquecksilberchlorid (Referenzsubstanz 2)	6,77	5,45
Ethylquecksilber-L-Glutathion	9,19	7,2
Thiosalicyl-L-Glutathion-Disulfid	Nicht abschätzbar Zellvitalität bei 320 μM: >60 %	Nicht abschätzbar Zellvitalität bei 320 μM: >25 %

4 Diskussion

Thiomersal ist eine Substanz, mit der große Teile der Bevölkerung in Industrie- ebenso wie Entwicklungsländern in Kontakt kommen, zum Beispiel durch Kontaktlinsenflüssigkeiten, Kosmetikprodukte, Ohrentropfen, Blutkonserven und insbesondere durch Impfstoffe. Daher ist eine fundierte Kenntnis ihrer Wirkmechanismen sowie ihrer Effekte auf den menschlichen Organismus anzustreben. Die Konjugation zahlreicher exogener Substanzen mit GSH stellt einen wichtigen Stoffwechselschritt im humanen Organismus dar. Da GSH allerdings je nach Substanz und Stoffwechselweg ebenso zur Giftung wie zur Entgiftung im humanen Organismus beitragen kann (Anders *et al.* 1988, Anders *et al.* 1992, Anders 2004, Efferth 2006, Lüllmann *et al.* 2006), ist es wichtig, für spezifische Substanzen das Ausmaß der Zytotoxizität von GSH-Konjugaten im Verhältnis zu den Ausgangssubstanzen bzw. zu geeigneten Referenzsubstanzen zu kennen.

Für die vorliegende Arbeit wurde Thiomersal als vollständiges Molekül, zwei *in vitro* synthetisierte GSH-Konjugate von Thiomersal – Ethylquecksilber-L-Glutathion und Thiosalicyl-L-Glutathion-Disulfid – sowie zwei Referenzsubstanzen – Ethylquecksilberchlorid und *p*-Chlormercuribenzoessäure – auf ihre zytotoxische Wirkung im Neutralrottest untersucht. Dafür wurden die humanen Zelllinien A-459 und Hep-G2 verwendet.

Zur präparativen Isolierung der beiden Thiomersal-GSH-Konjugate wurde eine von Müller *et al.* (2001) entwickelte und adaptierte HPLC-Methode eingesetzt.

Mit Hilfe von Verdünnungsreihen wurden beide Zelllinien in mehreren Untersuchungsreihen jeder der getesteten Substanzen ausgesetzt und das Ausmaß der nach Inkubation verbleibenden Zellvitalität mittels des Neutralrot-Assays bestimmt. Dadurch sollte ermittelt werden, welches der Thiomersal-Konjugate eine stärkere zytotoxische Wirkung aufweist, sowie diese Wirkungen mit denjenigen der Ausgangssubstanz und der Referenzsubstanzen verglichen werden.

Für die Zelllinie Hep-G2 lag die IC_{50} bei 7,2 μ M Ethylquecksilber-L-Glutathion, für Thiosalicyl-L-Glutathion-Disulfid ließ sich die IC_{50} allerdings nicht hinreichend bestimmen. Eine Reduktion der Zellvitalität auf Werte um 50 % wurde bei einer Konzentration zwischen 220 und 230 μ M Thiosalicyl-L-Glutathion-Disulfid erreicht. Bei einer Konzentration von 320 μ M lag die Zellvitalität noch über 25 %.

Für die Zelllinie A-549 lag die IC_{50} bei einer Konzentration von 9,19 μ M Ethylquecksilber-L-Glutathion. Die benötigte Konzentration von Thiosalicyl-L-Glutathion-Disulfid, um die

Zellvitalität der Zelllinie A-549 auf 50 % zu verringern, konnte aufgrund von Löslichkeitsproblemen im hohen Konzentrationsbereich nicht ermittelt werden.

Bei einer Konzentration von 320 μM Thiosalicyl-L-Glutathion-Disulfid lag die Zellvitalität der A-549-Zellen immer noch bei über 60 %.

Die ermittelten IC_{50} -Werte für Thiomersal als vollständiges Molekül betragen 8,7 μM für die Zelllinie A-549 bzw. 6,43 μM für die Linie Hep-G2. Sie liegen also geringfügig niedriger als die entsprechenden Werte für Ethylquecksilber-L-Glutathion (9,19 μM für A-549; 7,2 μM für Hep-G2).

Die mit Thiomersal strukturell verwandte erste Referenzsubstanz *p*-Chlormercuribenzoessäure weist für die Zelllinie A-549 einen IC_{50} -Wert von 70,72 μM auf bzw. für die Zelllinie Hep-G2 einen IC_{50} -Wert von 66,88 μM .

Für die zweite Referenzsubstanz, Ethylquecksilberchlorid, ergaben sich IC_{50} -Werte von 6,77 μM für die Zelllinie A-549 bzw. 5,45 μM für die Zelllinie Hep-G2.

Es fällt auf, dass sowohl bei den beiden getesteten Thiomersal-Konjugaten als auch bei Thiomersal und den verwendeten Referenzsubstanzen höhere Konzentrationen vonnöten sind, um bei der Zelllinie A-549 das gleiche Ausmaß an Vitalitätsreduktion zu erzielen wie bei der Zelllinie Hep-G2. Zellen vom Typ A-549 scheinen also resistenter gegenüber der toxischen Wirkung von Thiomersal und verwandten Substanzen zu sein als diejenigen vom Typ Hep-G2. Diese Tatsache lässt die Vermutung zu, dass Hepatozyten generell stärker von den potentiell toxischen Wirkungen von Thiomersal und seinen Konjugaten betroffen sein könnten als Alveolarzellen. Die Ursache hierfür liegt vermutlich in der unterschiedlich ausgeprägten metabolischen Kapazität der beiden Zellsysteme begründet.

Hepatozyten besitzen im menschlichen Körper eine hohe metabolische Kompetenz (Lu und Huang 1994) und können daher mit potentiellen Noxen in starkem Ausmaß konfrontiert zur Verstoffwechslung und Entgiftung/Giftung beitragen. Auch menschliche Alveolarzellen besitzen eine metabolische Kompetenz und tragen zu Verstoffwechslung von Xenobiotika bei, dies allerdings in deutlich geringerem Ausmaß als Hepatozyten (Urani *et al.* 1998, DSMZ 2013a, DSMZ 2013b).

4.1 GSH-abhängige Bioaktivierung und Zytotoxizität von Thiomersal sowie seiner Dissoziationsprodukte

Vor kurzem wurde gezeigt, dass sowohl Ethyl- als auch Methylquecksilber *in vitro* eine reduzierende Wirkung auf die Zellvitalität von Ratten-Gliom-Zellen haben (Zimmermann *et al.* 2013). Die gemessene EC_{50} betrug 4,83 μM für Methyl- und 5,05 μM für Ethylquecksilber. Dieser Effekt ließ sich jedoch durch Konjugation der beiden Substanzen mit der schwefelhaltigen Aminosäure Cystein zu MeHg-S-Cys bzw. EtHg-S-Cys maßgeblich verringern, mit einer EC_{50} von 11,2 μM respektive 9,37 μM (Zimmermann *et al.* 2013).

Generell spielen schwefelhaltige Verbindungen – so zum Beispiel auch L-Glutathion – in der Pharmakokinetik von Thiomersal und Quecksilber-Derivaten eine nicht zu vernachlässigende Rolle (Wu *et al.* 2008, Kern *et al.* 2013).

Allerdings ist, wie bereits in Abschnitt 1.5 erwähnt, die GSH-abhängige Bioaktivierung auch in der Giftung, also den zur Toxizität diverser Substanzen führenden Stoffwechselwegen, von Bedeutung. Cristofori *et al.* (2015) legen in einer Übersicht zu drei verschiedenen Wegen, auf denen halogenierte Alkane und Alkene nephrotoxische Wirkung erzielen können, die Rolle der GSH-Konjugation in der Bioaktivierung einiger Haloalkene dar. Durch die Konjugation mit GSH entstehen als Abbauprodukt Cysteinkonjugate und letztlich durch Acetylierung Mercaptursäuren. Die besonders hohe Durchblutung der Niere sowie ihre Fähigkeit, lösliche Stoffe zu konzentrieren, legt die Vermutung nahe, dass sie Fremdstoffen und deren Metaboliten, die im Organismus zirkulieren, in hohem Maße ausgesetzt ist und ein vulnerables Organsystem darstellt (Dekant 2003). Die Nephrotoxizität ist insbesondere bei Ratten und Hasen belegt; hinsichtlich der Auswirkungen auf den menschlichen Organismus sind vor allem die Karzinogenität von Tri- und Tetrachlorethylen belegt (Cristofori *et al.* 2015). Einen Überblick über die Verstoffwechslung und Toxizität von Trichlorethen und anderen älteren sowie modernen Anästhetika liefert Anders (2005).

Die ambivalente Rolle von GSH in der Bioaktivierung sieht man auch bei Arsen, wie von Watanabe und Hirano (2013) beschrieben. Hier wird GSH als Modulator der Toxizität gesehen. Arsen und arsenartige Stoffe werden in Gegenwart von GSH oder anderen Thiol-Komponenten weitgehend konjugiert und in Form von GSH-Konjugaten mittels *multidrug resistance-associated proteins* (MRPs) aus den Zellen transportiert, weshalb Störungen im Gleichgewicht von GSH oder MRPs die Ausscheidung und somit die Toxizität von Arsen entscheidend beeinflussen. Besonders interessant hinsichtlich der Frage, wann GSH toxifizierend und wann es detoxifizierend wirkt, ist die Tatsache, dass die Toxizität von Dimethylarsinsäure durch intrazelluläres GSH gesteigert, die Toxizität

von Arsenit, Arsenat, Monomethylarsonsäure und Trimethylarsinoxid durch GSH hingegen effektiv reduziert wird. Bei der Reduktion und Konjugation von arsenartigen Stoffen spielen möglicherweise unter anderem Subklassen der Glutathion-S-Transferase-Omega (GSTO) sowie Glutathion-S-Transferase M1 (GSTM1) oder Glutathion-S-Transferase T1 (GSTT1) eine entscheidende Rolle. In einem mathematischen Modell zeigten Stamatelos *et al.* (2011), welche Schlüsselrolle GSH insbesondere auch bei der Metabolisierung von Arsen in Hepatozyten einnimmt.

Im Haushalt von Astrozyten, welche andere Gehirnzellen z. B. vor Sauerstoffradikalen schützen, spielt GSH in erster Linie eine protektive Rolle (Dringen *et al.* 2015). Mit GSH konjugierte Noxen können effektiv aus den Zellen heraus transportiert werden. Störungen im GSH-Haushalt scheinen bei einer Reihe von neurologischen Erkrankungen von Bedeutung für deren Fortschreiten zu sein (Dringen *et al.* 2015).

Unglücklicherweise hat die Fähigkeit vieler Zellen, sich durch ihren jeweiligen GSH-Haushalt vor exogenen Noxen zu schützen, auch den nachteiligen Aspekt, dass dies für Tumorzellen ebenso gilt wie für gesunde Körperzellen. Dadurch können bestimmte dem Organismus in heilender Absicht zugefügte zytotoxische Medikamente, also Chemotherapeutika, in ihrer Wirkung abgeschwächt werden (Ramsay und Dilda 2014). Diese Erkenntnis kann allerdings konstruktiv genutzt werden, insbesondere bei Tumoren, die unempfindlich gegenüber den herkömmlichen Behandlungsstrategien sind, neue Medikamenten-Ansätze zu entwickeln, welche die enzymatische Aktivität der Glutathion-S-Transferasen berücksichtigen.

Bereits im Vorfeld legten Ergebnisse einer *in vitro*-Studie von Wu *et al.* (2008) die Vermutung nahe, dass Thiomersal auch *in vivo* aufgrund seiner hohen Reaktivität mit Thiolgruppen rasch metabolisiert werde. Wie in Abschnitt 1.1.4 erwähnt, gelang dieser Arbeitsgruppe der massenspektrometrische Nachweis für Ethylquecksilber-L-Glutathion und für das zweite Dissoziationsprodukt von Thiomersal, Thiosalicylsäure (in unkonjugierter Form), mittels ESI-MS-Analyse.

Allerdings wurden zwar die Reaktionsabläufe, aber nicht die entstehenden Verbindungen von Wu und Kollegen charakterisiert. Dies ist im Rahmen der vorliegenden Arbeit geschehen (siehe hierzu Abschnitt 2.6.4).

Wu und Kollegen nahmen in der erwähnten Studie von 2008 unter anderem Untersuchungen vor, um die Frage zu klären, ob die Anwesenheit von Glutathion in Gegenwart von Thiomersal protektiv auf die Topoisomerase-II α wirken würde. Topoisomerase II ist als Enzym unabdingbar für die Zellteilung und ermöglicht temporäre Strangbrüche in der DNS. Eine Inhibition dieses Enzyms kann vermutlich je nach Ausmaß Störungen im reibungslosen und fehlerfreien Ablauf der Zellteilung

verursachen. Die Topoisomerase II ist sehr reaktiv gegenüber Thiol-Agenzien und geht bevorzugt Cysteinkomplexe ein.

Ein Vorliegen von 5 mM und auch bereits von 0,1 mM GSH im Versuchsaufbau verhinderte effektiv eine Inhibition der Topoisomerase-Aktivität, welche beim Fehlen von GSH von Thiomersal-Konzentrationen zwischen 5 μ M und 20 μ M ausgeht. Hieraus wurde geschlossen, dass das in Gegenwart von GSH entstandene Ethylquecksilber-GSH-Konjugat im Gegensatz zu aus Thiomersal frisch freigesetztem Ethylquecksilber keine wesentliche Bindungsaffinität zu freien Topoisomerase-Cysteinkomplexen habe. Auch führte in derselben Studie eine Reduktion der intrazellulären GSH-Konzentrationen in Zellen vom Typ K-562 (menschliche Leukämie-Zellen) zu erhöhter Thiomersal-assoziiertes Zytotoxizität, was wiederum für den protektiven Effekt von GSH spricht. Eine Vorinkubation von Thiomersal mit Glutathion ergab in dieser Untersuchungsreihe allerdings praktisch keine Änderung der IC_{50} , wie man es angesichts der oben genannten Prämisse der Protektion durch GSH eigentlich hätte erwarten können. Hieraus wurde die Hypothese generiert, dass das aus dieser Vorinkubation hervorgegangene GSH-konjugierte Ethylquecksilber verglichen mit dem unkonjugierten Thiomersal möglicherweise dessen hohe Cystein-Affinität und die daraus hervorgehende zytotoxische Kompetenz in Bezug auf essentielle Cysteinkomplexe innerhalb der Zellen oder an der Zelloberfläche (anders als bei der oben genannten Topoisomerase, wo ein protektiver Effekt nach Vorinkubation von Thiomersal mit GSH gesehen wurde) weitgehend unbeeinträchtigt behalte. In diesem Fall scheint die in den Voruntersuchungen nachgewiesene GSH-assoziierte Zytoprotektivität also nicht unmittelbar in der Konjugation von Thiomersal mit GSH begründet zu sein, sondern durch einen anderen, in dieser Arbeit nicht näher untersuchten Mechanismus zustande zu kommen (Wu *et al.* 2008).

Eine andere Studie von Zieminska *et al.* (2010) untersuchte die Rolle von Glutathion als zytoprotektives Element bei der Kurzzeit- und Langzeit-Exposition von cerebralen Ratten-Zellen gegenüber Thiomersal. Die Zellkulturen wurden 24 Stunden vor der Thiomersal-Exposition entweder mit einem GSH-Synthese-Hemmer, mit einem Aktivator der GSH-Synthese oder mit GSH selbst in Konzentrationen von 0,3 bis 2,5 mM inkubiert. Die Anwesenheit des GSH-Synthese-Hemmers für sich genommen konnte die Thiomersal-abhängige Zytotoxizität steigern, also durch eine Reduktion des GSH-Levels die protektive Wirkung senken. In allen drei Versuchsaufbauten, sowohl bei initial erniedrigten (durch den Synthese-Hemmer) wie auch bei initial erhöhten (durch Zugabe von GSH bzw. des Synthese-Aktivators) GSH-Spiegeln in der Zelle, konnte gezeigt werden, dass eine anschließende (weitere) Applikation von GSH, zum gleichen Zeitpunkt hinzugefügt wie Thiomersal, die Zellvitalität im Vergleich zum Thiomersal-

Toxizitäts-Versuch ohne gleichzeitige oder anschließende GSH-Zugabe dosisabhängig steigern oder sogar vollständig erhalten konnte. Eine Steigerung des GSH-Spiegels in den Thiomersal-exponierten Zellen führte also in jedem Fall zu erhöhten Vitalitätsniveaus, unabhängig von den Ausgangsbedingungen.

4.2 Inhibition der Zellvitalität durch Thiomersal-Konjugate

In der vorliegenden Arbeit wurde gezeigt, dass die IC_{50} von Ethylquecksilber-L-Glutathion für Zellen vom Typ A-549 und Hep-G2 mit 9,19 μ M bzw. 7,2 μ M nur wenig höher liegt als diejenige von Thiomersal mit 8,7 μ M bzw. 6,43 μ M. Dies stützt zum einen die These, dass die GSH-Konjugation prinzipiell eine zytoprotektive Rolle im lebenden Organismus einnimmt, gleichzeitig aber macht es deutlich, dass Ethylquecksilber auch in konjugierter Form eine starke zytotoxische Komponente besitzt.

Der größere Anteil der bisherigen Datenlage zu den Effekten von Thiomersal-Dissoziationsprodukten ließ vermuten, dass die vorwiegende zytotoxische Wirkung von Ethylquecksilber-L-Glutathion ausgehen würde (Clarkson 2002, Kern *et al.* 2013).

Interessanterweise führte im Rahmen unserer Untersuchungen sowohl die Anwesenheit von Ethylquecksilber-L-Glutathion als auch die von Thiosalicyl-L-Glutathion-Disulfid zu einer Vitalitätsminderung bei beiden verwendeten Zelllinien. Für Thiosalicyl-L-Glutathion-Disulfid waren hierfür allerdings um etwa Faktor 30 höhere Konzentrationen notwendig.

Eine mögliche biochemische Erklärung für die beobachteten Vitalitätsveränderungen könnte in einer Störung der Enzymsysteme der Zellen liegen.

Westphal *et al.* (2000) konnten einen Zusammenhang zwischen der Ausbildung einer Sensibilisierung und dem genetisch bedingten Fehlen der humanen Glutathion-S-Transferase M1, insbesondere bei gleichzeitigem Vorliegen einer Gendelektion der Glutathion-S-Transferase T1, nachweisen. Dem GST-System wird ein zytoprotektiver Effekt gegenüber Thiomersal und seinen Dissoziationsprodukten zugesprochen. Gemäß einer Arbeit von Vesper (2007) weist Thiomersal eine inhibierende Wirkung auf die Glutathion-S-Transferase T1 (hGSTT1-1) auf (vgl. Abschnitt 1.1.3.). Die genaueren Zusammenhänge zwischen einem Sensibilisierungspotential durch Thiomersal und seinen Wechselwirkungen mit dem humanen Glutathion-S-Transferasesystem sind von praktisch-klinischer Relevanz, da Patienten mit entsprechender genetischer

Veranlagung durch Thiomersal oder Quecksilber in anderen Verbindungen einem erhöhten Erkrankungsrisiko ausgesetzt sein könnten. In der Arbeit von Vesper wird beschrieben, dass die Enzymaktivität der in humanen Erythrozyten vorhandenen hGSTT1-1 in Anwesenheit von Thiomersal ebenso wie in Anwesenheit von Thiosalicylsäure gemindert wird, wobei Thiosalicylsäure alleine die Aktivität weniger stark inhibiert als Thiomersal.

Die klinischen Manifestationen bestimmter potentiell mit Thiomersal assoziierter Erkrankungen oder Nebenwirkungen, die weiter oben beschrieben wurden, lassen sich möglicherweise durch die Eigenschaft der GSH-Konjugate als Transport- und Speicherpeptide erklären. Trotz des grundlegend entgiftenden Mechanismus können bei Akkumulierung und Verteilung im humanen Organismus, je nachdem, welche Kompartimente betroffen sind, organspezifische problematische und pathologische Wirkungen auftreten; ein ähnliches Verhalten ist von chlorierten Konjugaten bereits bekannt (Anders 2005, Cristofori *et al.* 2015).

4.3 Vergleich der IC₅₀-Werte der Thiomersal-Konjugate mit den IC₅₀-Werten des Thiomersals und der Referenzsubstanzen

Die kumulative Quecksilber-Dosis, die nach Empfehlung geimpfte Kinder in Großbritannien im Alter von 4 Monaten erhalten haben, liegt bei 150 µg (Andrews *et al.* 2004), in den USA liegt die Dosis für Kinder von 6 Monaten bei 187,5 µg (Andrews *et al.* 2004).

Im Blut gemessene Konzentrationen an Quecksilber betragen in einer Studie von Pichichero *et al.* (2002) unter 3,75 bis 20,55 nmol/l (entsprechend 0,00375 bis 0,02055 µM) bei 2 Monate alten und weniger als 7,5 nmol/l (entsprechend 0,0075 µM) bei 6 Monate alten US-amerikanischen Kindern, welche die empfohlenen Impfungen erhalten hatten.

Diese Konzentrationen liegen also jeweils um ca. Faktor 1000 unter den ermittelten IC₅₀-Werten für die im Rahmen dieser Arbeit getesteten Substanzen und Zelllinien.

Daraus ließe sich zunächst die Vermutung ableiten, dass die Konzentrationen an Thiomersal und seinen Komponenten, welche nötig wären, um eine essentielle Zellschädigung *in vivo* hervorzurufen, in einer regulär geimpften Population in der klinischen Realität nicht erreicht werden. Diese Folgerung ist allerdings aus mehreren

Gründen zu kurz gefasst. Zum einen ist es wahrscheinlich, dass die niedrigen im Blut gemessenen Konzentrationen lediglich durch eine rasche Umverteilung des Quecksilbers in andere Kompartimente bedingt sind (Mutter *et al.* 2005). Zum zweiten ist es nur in seltenen Fällen die unmittelbare zytotoxische Wirkung, welche im Organismus Schaden verursachen kann, sondern es handelt sich bei schädigenden Wirkweisen bestimmter Substanzen oft um eine komplexere Wirkkette, zum Beispiel über Enzymhemmung oder einen veränderten Zellmetabolismus. Im Zusammenhang mit dem hier besprochenen Themenkomplex sind etwa die Hemmung der humanen Glutathion-S-Transferase (Westphal *et al.* 2000) oder ein durch Thiomersal gesteigerter Kalzium-Einstrom (Migdal *et al.* 2010) relevante Beispiele.

Über lange Zeit standen nur wenige Daten zu den biochemischen Vorgängen, welche bei der Sensibilisierung durch Thiomersal eine Rolle spielen, zur Verfügung. Untersuchungen durch Migdal und Kollegen (2010) lieferten Hinweise auf die Mediation einer Sensibilisierung mittels reaktiver Sauerstoffspezies und Kalzium-Signalkaskaden. Im Rahmen dieser Untersuchungen wurde eine promyelomonozytische Zelllinie (U937) – eine Zelllinie, welche als *in vitro*-Surrogat für dendritische Zellen, die im menschlichen Organismus eine bedeutende Rolle bei der Immunantwort innehaben, Verwendung findet – verschiedenen potentiell sensibilisierenden Substanzen, unter anderem Thiomersal, Ethylquecksilberchlorid und Thiosalicylsäure ausgesetzt. Thiomersal und Ethylquecksilberchlorid riefen eine immunmodulatorische Antwort hervor und führten außerdem zu einer Reduktion des zelleigenen Glutathions; unter Einfluss von Thiosalicylsäure kam es zu keiner solchen Reaktion. Durch eine Vorbehandlung mit N-Acetylcystein konnte die Aktivierung der dendritischen Zellen vermindert werden (vgl. hierzu Zimmermann *et al.* 2013).

Nicht nur die beschriebenen Konjugate, sondern auch Thiomersal als vollständiges Molekül führten in den im Rahmen dieser Arbeit durchgeführten Zytotoxizitätstests zu einer Vitalitätsreduktion. Die IC₅₀-Werte wurden hierbei zum Vergleich der jeweiligen Wirkstärke der unterschiedlichen Substanzen herangezogen und für Rückschlüsse auf die zytotoxischen Effekte der getesteten Substanzen genutzt.

Thiomersal weist nach unseren Ergebnissen einen stärkeren vitalitätsreduzierenden Effekt als seine beiden Glutathion-konjugierten Komponenten auf. Dies lässt vermuten, dass das hemmende Potential nicht allein dem Ethylquecksilber-Anteil zuzuschreiben ist. Vor allem aber lässt dieses Ergebnis darauf schließen, dass die Konjugation mit GSH in den Abbauwegen von Thiomersal tatsächlich eine entgiftende Funktion besitzt.

Eine wichtige Referenzsubstanz für die vorliegende Arbeit ist die mit Thiomersal strukturverwandte *p*-Chlormercuribenzoessäure.

In einer Arbeit, welche die Präzision zwei unterschiedlicher Zytotoxizitäts-Assays miteinander verglich, betrug die ermittelte IC_{50} im Neutralrot-Test für *p*-Chlormercuribenzoessäure 42 μ M sowie im vergleichenden Tetrazolium MTT Assay (s. Abschnitt 1.4) 36 μ M.

Die unterschiedlichen Ergebnisse in den beiden von Borenfreund und Kollegen untersuchten Assays wurden am ehesten auf die schlechtere Löslichkeit des enzymvermittelten Farbstoffprodukts zurückgeführt sowie auf die Tatsache, dass die Menge an Neutralrot, welche von Lysosomen aufgenommen werden kann, größer ist als die Menge an Tetrazoliumsalz, welche Mitochondrien reduzieren können.

Bei den im Rahmen dieser Untersuchung verwendeten Zellen handelte es sich um BALB/c-3T3-Mäusefibroblasten (Borenfreund *et al.* 1988). Im Rahmen der für die vorliegende Arbeit durchgeführten Untersuchungen weist *p*-Chlormercuribenzoessäure für die Zelllinie A-549 einen IC_{50} -Wert von 70,72 μ M auf bzw. für die Zelllinie Hep-G2 einen IC_{50} -Wert von 66,88 μ M.

Bezüglich der Differenz zwischen den von Borenfreund und Kollegen sowie den im Rahmen dieser Doktorarbeit gemessenen IC_{50} -Werten der *p*-Chlormercuribenzoessäure im Neutralrottest ist eine unterschiedliche Widerstandsfähigkeit der humanen im Vergleich zu den tierischen Zelllinien zu vermuten.

Auch die jeweils gewählten Inkubationszeiten können grundsätzlich zu Unterschieden in den Ergebnissen verschiedener Studien führen, wobei im Rahmen der vorliegenden Arbeit die gleichen Inkubationszeiten wie von Borenfreund *et al.* (1988) gewählt wurden (s. hierzu Abschnitt 2.7.1), sodass zumindest die Unterschiede in diesen beiden Arbeiten dadurch nicht erklärt werden können.

Die gemessenen Werte in den beiden Arbeiten zur Toxizität von *p*-Chlormercuribenzoessäure im Neutralrottest bewegen sich dennoch in einer vergleichbaren Größenordnung, sodass sie zu Referenzzwecken herangezogen werden können.

Trotz der strukturellen Verwandtschaft übersteigt das vitalitätsreduzierende Potential von Thiomersal auf die beiden getesteten Zelllinien dasjenige von *p*-Chlormercuribenzoessäure um ca. Faktor 10. Ergebnisse aus labortechnischen Untersuchungen mit einer dieser beiden Substanzen lassen also nur vorsichtige Rückschlüsse auf das Verhalten der jeweils anderen zu.

Die strukturelle Ähnlichkeit der zweiten Referenzsubstanz Ethylquecksilberchlorid mit Ethylquecksilber-L-Glutathion ließ vermuten, dass diese beiden Substanzen einen zytotoxischen Effekt ähnlicher Größenordnung aufweisen würden.

Im Rahmen unserer Untersuchungen wurde die Reduktion der Zellvitalität in Anwesenheit von Ethylquecksilberchlorid bereits bei geringfügig niedrigeren

Konzentrationen bewirkt als in Anwesenheit von Ethylquecksilber-L-Glutathion. Da die Konjugation von Glutathion mit Fremdsubstanzen einen elementaren Schritt in Entgiftungsmechanismen darstellt (Coles und Ketterer 1990), ist es nicht erstaunlich, dass Ethylquecksilberchlorid einen stärkeren toxischen Effekt hat als das Glutathion-Konjugat.

Zweifelhaft bleibt allerdings, ob dieser Toxizitäts-reduzierende Effekt für alle Glutathion-Quecksilber-Konjugate gilt. In einer Arbeit zur Toxizität von Metall-Ionen beschreibt Ballatori (2002), dass das Neurotoxin Methylquecksilber durch die Konjugation mit GSH zu einem Substrat für MRPs wird und somit der Transport über die Zellmembran erleichtert wird, das Toxin also durch die Konjugation sogar einfacheren Zugang zum Zellsystem erhält. Wie allerdings schon in Abschnitt 1.1.3 ausgeführt, ist ein direkter Vergleich der beiden Substanzen aufgrund ihrer unterschiedlichen Toxikokinetik trotz der strukturellen Ähnlichkeit nicht ohne weiteres zulässig.

4.4 Allergenes Potential von Thiomersal und seinen Dissoziationsprodukten

In verschiedenen Studien wurde bereits das allergene Potential von Thiomersal und seinen Dissoziationsprodukten untersucht (Seidenari *et al.* 1990, Wekkeli *et al.* 1990, Aberer 1991, Möller 1994, van't Veen und van Joost 1998, Elferink 1999, Ball *et al.* 2001, Schäfer *et al.* 2001, Uter *et al.* 2004, Dotterud und Smith-Sivertsen 2007, Yin *et al.* 2011). Die Ergebnisse der Studien, was die klinische Relevanz der Sensibilisierungen sowie den Stellenwert von Thiomersal unter den bekannten Kontaktallergenen angeht, sind dabei sehr heterogen.

Sie lassen allerdings die Vermutung zu, dass auch die beiden Glutathion-Konjugate von Thiomersal über allergenes Potential verfügen könnten.

4.5 Ausblick

Das Ziel dieser Arbeit war die *in vitro*-Untersuchung des zytotoxischen Wirkpotentials von zwei unterschiedlichen L-Glutathion-Konjugaten des vielseitig eingesetzten, doch kontrovers diskutierten Konservierungsstoffes Thiomersal auf zwei humane Zelllinien. Zum Wirkvergleich wurden darüber hinaus die zytotoxischen Effekte von Thiomersal selbst sowie zweier Referenzsubstanzen – *p*-Chlormercuribenzoessäure und Ethylquecksilberchlorid – auf die gewählten Zellen untersucht. Es konnten im Verlauf dieser Untersuchungen aufschlussreiche Erkenntnisse gewonnen werden; nichtsdestoweniger besteht in Bezug auf den künftigen Einsatz Thiomersal-haltiger Produkte nach wie vor ein großer Klärungsbedarf bezüglich der Wirkweisen und des Abbaus seiner Komponenten im humanen Organismus.

Von besonderem Interesse wären folglich weitere Untersuchungsreihen, welche sich mit der Wirkung von Thiomersal und seinen Komponenten auf bestimmte Zelllinien auseinandersetzen sollten. Aufgrund des immer wieder aufgeworfenen Verdachts einer Assoziation von Thiomersal-haltigen Impfstoffen mit Autismus (Geier und Geier 2003a, 2003b, 2004, 2005, 2006a, 2006b, Young et al. 2008) wäre eine entsprechende Testreihe mit humanen neuronalen Zellen hochinteressant. Ebenfalls wertvolle Ergebnisse könnten Untersuchungsreihen mit renalen Zellen liefern, da die Niere eine essentielle Rolle in der Verstoffwechslung von GSH- und Cystein-S-Konjugaten im Organismus spielt.

Außerdem wären vergleichende Zytotoxizitätstests mit Cysteinkonjugaten und Mercaptursäuren als Stoffwechselfolgeprodukte von GSH-Konjugaten und eine Gegenüberstellung der Ergebnisse mit denen der GSH-Konjugate sinnvolle Untersuchungsthemen.

Auch die Frage nach einer Inhibition der humanen Glutathion-S-Transferase T1 durch Thiomersal-Konjugate ist von Interesse.

Ebenfalls bedarf die Frage nach den sensibilisierenden Mechanismen von Thiomersal und seiner Folgeprodukte einer Abklärung, insbesondere, inwieweit konjugierte Thiomersalbestandteile als Haptene fungieren können.

Darüber hinaus wären weiterführende Untersuchungen von Bedeutung, welche sich mit der Fragestellung befassen, inwieweit die Abbauwege für Quecksilber bei Kindern mit neurologischen Defiziten durch Genvarianten verändert sind. Innerhalb solcher Untersuchungen könnte insbesondere auch die Frage nach Ursache und Wirkung geklärt werden, was nicht zuletzt für Eltern von betroffenen Kindern sowie für Pädiater von essentieller Wichtigkeit sein kann.

5 Zusammenfassung

Bei Thiomersal handelt es sich um ein immer noch weit verbreitetes Konservierungsmittel in Medizinprodukten, mit dem viele Kinder und Erwachsene im Laufe ihres Lebens insbesondere über Impfungen in mehrfachen Kontakt kommen.

Im menschlichen Organismus könnte Thiomersal mit L-Glutathion Ethylquecksilber-L-Glutathion und Thiosalicyl-L-Glutathion-Disulfid bilden. In der vorliegenden Arbeit wurde die Toxizität von Thiomersal und von Glutathionkonjugaten seiner Dissoziationsprodukte sowie zum Vergleich die Toxizität von zwei strukturell mit Thiomersal bzw. seinen Metaboliten verwandten Referenzsubstanzen, *p*-Chlormercuribenzoessäure und Ethylquecksilberchlorid, in Zellsystemen mit humanen Zellen vom Typ A-549 und Hep-G2 untersucht.

Zu diesem Zweck wurden die Glutathionkonjugate der Dissoziationsprodukte synthetisiert und mit Hilfe eines HPLC-Verfahrens aufgereinigt. Anschließend wurden alle fünf Testsubstanzen in Verdünnungsreihen auf mit Zellen beimpfte Mikrotiterplatten aufgetragen und nach Inkubation mittels eines Neutralrot-Assays die Vitalität der Zellen bestimmt. Zu Vergleichszwecken wurde, soweit möglich, die IC₅₀ der Substanzen bestimmt.

Alle fünf Substanzen führten zu einer dosisabhängigen Vitalitätsreduktion bei beiden Zelllinien. Die stärkste Vitalitätsreduktion wurde durch Ethylquecksilberchlorid erzielt, danach folgten in absteigender Reihenfolge Thiomersal, Ethylquecksilber-L-Glutathion und *p*-Chlormercuribenzoessäure. Den schwächsten vitalitätsreduzierenden Effekt zeigte Thiosalicyl-L-Glutathion-Disulfid; für diese Substanz ließ sich eine IC₅₀ nicht bestimmen. Diese Ergebnisse sprechen dafür, dass die Glutathion-Konjugation von Thiomersal zu einer Abschwächung der Toxizität im menschlichen Organismus führt und untermauern die Annahme einer protektiven Wirkung von Glutathion. Die giftige Rolle von Glutathion in Bioaktivierungsprozessen anderer Noxen wurde diskutiert.

Bei allen Substanzen zeigte sich eine stärkere vitalitätsreduzierende Wirkung in den Versuchen mit Hep-G2-Zellen im Vergleich zu A-549-Zellen. Dies wurde auf die unterschiedlich ausgeprägte metabolische Kapazität der Zelllinien zurückgeführt.

Es wurde im Rahmen dieser Arbeit ein Beitrag zum besseren Verständnis der Toxizität von Thiomersal im humanen Organismus geleistet und darüber hinaus Bezüge zum potentiellen allergenen Potential von Thiomersal hergestellt.

6 Literaturverzeichnis

AAP (American Academy of Pediatrics) (2012): Ban on all mercury-based products would risk global immunization: AAP endorsement, commentaries.

URL:

<<http://aapnews.aappublications.org/content/early/2012/12/17/aapnews.20121217-1>>

[Zugriffsdatum: 27.09.2013]

AAP (American Academy of Pediatrics) (2013): Recommendation of WHO Strategic Advisory Group of Experts (SAGE) on immunization. *Pediatrics* 131, e343

Aberer W (1991): Vaccination despite thimerosal sensitivity. *Contact Dermatitis* 24, 6-10

Aden DP, Fogel A, Plotkin S, Damjanov I, Knowles BB (1979): Controlled synthesis of HBsAg in a differentiated human liver carcinoma-derived cell line. *Nature* 282, 615-616

Ahmed SA, Gogal RM Jr, Walsh JE (1994): A new rapid and simple non-radioactive assay to monitor and determine the proliferation of lymphocytes: an alternative to [³H]thymidine incorporation assay. *J Immunol Methods* 170, 211-224

Anders MW (2004): Glutathione-dependent Bioactivation of Haloalkanes and Haloalkenes. *Drug Metab Rev* 36, 583-594

Anders MW (2005): Formation and Toxicity of Anesthetic Degradation Products. *Annu Rev Pharmacol Toxicol* 45, 147-176

Anders MW, Dekant W (1998): Glutathione-dependent bioactivation of haloalkenes. *Annu Rev Pharmacol Toxicol* 38, 501-537

Anders MW, Lash L, Dekant W, Elfarra AA, Dohn DR (1988): Biosynthesis and biotransformation of glutathione S-conjugates to toxic metabolites. *Crit Rev Toxicol* 18, 311-341

Anders MW, Dekant W, Vamvakas S (1992): Glutathione-dependent toxicity. *Xenobiotica* 22, 1135-1145

Andrews N, Miller E, Grant A, Stowe J, Osborne V, Taylor B (2004): Thimerosal exposure in infants and developmental disorders: a retrospective cohort study in the United Kingdom does not support a causal association. *Pediatrics* 114, 584-591

Aposhian HV (2004): A Toxicologist's View of Thimerosal and Autism.

URL:

<<http://www.iom.edu/~media/Files/Activity%20Files/PublicHealth/ImmunizationSafety/AposhianSlides.pdf>> [Zugriffsdatum: 26.09.2013]

Aschner M, Ceccatelli S (2010): Are neuropathological conditions relevant to ethylmercury exposure? *Neurotox Res* 18, 59-68

Axton JH (1972): Six cases of poisoning after a parenteral organic mercurial compound (Merthiolate). *Postgrad Med J* 48, 417-421

Ball LK, Ball R, Pratt RD (2001): An assessment of thimerosal use in childhood vaccines. *Pediatrics* 107, 1147-1154

Ball R (2012): Substituting Thimerosal Preservative used in Vaccines: FDA perspective. URL:

<http://who.int/immunization/sage/meetings/2012/april/USFDA_perspective_thimerosal_alternatives.pdf> [Zugriffsdatum: 27.09.2013]

Ballatori N (2002): Transport of Toxic Metals by Molecular Mimicry. *Environ Health Perspect* 110, 689-694

Bonitsis NG, Tatsioni A, Bassioukas K, Ioannidis JP (2011): Allergens responsible for allergic contact dermatitis among children: a systematic review and meta-analysis. *Contact Dermatitis* 64, 245-257

Boonchai W, Desomchoke R, Iamtharachai P (2011): Trend of contact allergy to cosmetic ingredients in Thais over a period of 10 years. *Contact Dermatitis* 65, 311-316

Bootman MD, Taylor CW, Berridge MJ (1992): The thiol reagent, thimerosal, evokes Ca^{2+} spikes in HeLa cells by sensitizing the inositol 1,4,5-trisphosphate receptor. *J Biol Chem* 267, 25113-25119

Borenfreund E, Puerner JA (1985): Toxicity determined in vitro by morphological alterations and neutral red absorption. *Toxicol Lett* 24, 119-124

Borenfreund E, Babich H, Martin-Alguacil N (1988): Comparisons of two *in vitro* cytotoxicity assays – The neutral red (NR) and tetrazolium MTT tests. *Toxicol In Vitro* 2, 1-6

Burbacher TM, Shen DD, Liberato N, Grant KS, Cernichiari E, Clarkson T (2005): Comparison of blood and brain mercury levels in infant monkeys exposed to methylmercury or vaccines containing thimerosal. *Environ Health Perspect* 113, 1015-1021

Canty AJ, Moors PW, Deacon GB (1984): Octanol/water partition coefficients as a model system for assessing antidotes for methylmercury(II) poisoning, and for studying mercurials with medicinal applications. *J Inorg Biochem* 22, 65-72

CDC (Centers for Disease Control and Prevention) (1999): Thimerosal in vaccines: a joint statement of the American Academy of Pediatrics and the Public Health Service. *MMWR Morb Mortal Wkly Rep* 48, 563-565

CDC (Centers for Disease Control and Prevention) (2001): Impact of the 1999 AAP/USPHS joint statement on thimerosal in vaccines on infant hepatitis B vaccination practices. *MMWR Morb Mortal Wkly Rep* 50, 94-97

Clarkson TW (2002): The three modern faces of mercury. *Environ Health Perspect* 110, Suppl 1, 11-23

Clarkson TW, Magos L (2006): The toxicology of mercury and its chemical compounds. *Crit Rev Toxicol* 36, 609-662

Coles B, Ketterer B (1990): The role of glutathione and glutathione transferases in chemical carcinogenesis. *Crit Rev Biochem Mol Biol* 25, 47-70

Committee on Infectious Diseases and Committee on Environmental Health (1999): Thimerosal in vaccines – An interim report to clinicians. *Pediatrics* 104, 570-574

Cooper LZ, Katz SL (2013): Ban on thimerosal in draft treaty on mercury: why the AAP's position in 2012 is so important. *Pediatrics* 131, 152-153

Cox NH, Forsyth A (1988): Thiomersal allergy and vaccination reactions. *Contact Dermatitis* 18, 229-233

Cristofori P, Sauer AV, Trevisan A (2015): Three common pathways of nephrotoxicity induced by halogenated alkenes. *Cell Biol Toxicol* 31, 1-13

Croen LA, Matevia M, Yoshida CK, Grether JK (2008): Maternal Rh D status, anti-D immune globuline exposure during pregnancy, and risk of autism spectrum disorders. *Am J Obstet Gynecol* 199, 234.e1-234.e6

Decker T, Lohmann-Matthes ML (1988): A quick and simple method for the quantitation of lactate dehydrogenase release in measurements of cellular cytotoxicity and tumor necrosis factor (TNF) activity. *J Immunol Methods* 115, 61-69

Dekant A (2003): Biosynthesis of toxic glutathione conjugates from halogenated alkenes. *Toxicol Lett* 144, 49-54

Dotterud LK, Smith-Sivertsen T (2007): Allergic contact sensitization in the general adult population: a population-based study from Northern Norway. *Contact Dermatitis* 56, 10-15

Dringen R, Brandmann M, Hohnholt MC, Blumrich EM (2015): Glutathione-Dependent Detoxification Processes in Astrocytes. *Neurochem Res* 40, 2570-2582

DSMZ (Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen) (2013a): Leibniz-Institut DSMZ-Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH. Catalogues: Cell line: A-549.

URL:

<[http://www.dsmz.de/catalogues/details/culture/ACC-107.html?tx_dsmzresources_pi5\[returnPid\]=192](http://www.dsmz.de/catalogues/details/culture/ACC-107.html?tx_dsmzresources_pi5[returnPid]=192)> [Zugriffsdatum: 27.11.2013]

DSMZ (Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen) (2013b): Leibniz-Institut DSMZ-Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH. Catalogues: Cell line: HEP-G2.

URL:

<[http://www.dsmz.de/catalogues/details/culture/ACC-180.html?tx_dsmzresources_pi5\[returnPid\]=192](http://www.dsmz.de/catalogues/details/culture/ACC-180.html?tx_dsmzresources_pi5[returnPid]=192)> [Zugriffsdatum: 27.11.2013]

Efferth T: Molekulare Pharmakologie und Toxikologie. Biologische Grundlagen von Arzneimitteln und Giften. Springer-Verlag, Berlin 2006

Elferink JG (1999): Thimerosal: a versatile sulfhydryl reagent, calcium mobilizer, and cell function-modulating agent. *Gen Pharmacol* 33, 1-6

Endo S, Fujimoto A, Kumada S, Matsunaga T, Ohno S, Mano J, Tajima K, El-Kabbani O, Hara A (2013): Modulation of activity and inhibitor sensitivity of rabbit aldose reductase-like protein (AKR1B19) by oxidized glutathione and SH-reagents. *Chem Biol Interact* 202, 146-152

FDA (U.S. Food and Drug Administration) (2009): Thimerosal in Vaccines.

URL:

<<http://www.fda.gov/BiologicsBloodVaccines/SafetyAvailability/VaccineSafety/UCM096228#t1>> [Zugriffsdatum: 10.02.2014]

Fischer M, Keller-Stanislawski B, Schober-Bendixen S, Schosser R, Hacke K, Hartung T, Montag T (2001): Einfluß des Konservierungsmittels Thiomersal auf die Interleukin-1 Beta Ausschüttung humaner peripherer Blutzellen. *Altex* 18 1/01, 47-49

Fombonne E, Zakarian R, Bennett A, Meng L, McLean-Heywood D (2006): Pervasive developmental disorders in Montreal, Quebec, Canada: prevalence and links with immunizations. *Pediatrics* 118, e139-e150

Fritsche PJ, Helbling A, Ballmer-Weber BK (2010): Vaccine hypersensitivity – update and overview. *Swiss Med Wkly* 140, 238-246

GACVS (Global Advisory Committee on Vaccine Safety) (2002): Global Advisory Committee on Vaccine Safety, 20-21 June 2002. *Wkly Epidemiol Rec* 77, 389-394

GACVS (Global Advisory Committee on Vaccine Safety) (2006): Thiomersal and vaccines: Questions and answers.

URL:

<http://www.who.int/vaccine_safety/committee/topics/thiomersal/questions/en/index.html> [Zugriffsdatum: 27.09.2013]

GACVS (Global Advisory Committee on Vaccine Safety) (2012): Global Advisory Committee on Vaccine Safety, June 2012. *Wkly Epidemiol Rec* 87, 281-287

Geier DA, Geier MR (2003a): An assessment of the impact of thimerosal on childhood neurodevelopmental disorders. *Pediatr Rehabil* 6, 97-102

Geier DA, Geier MR (2003b): Neurodevelopmental disorders after thimerosal-containing vaccines: a brief communication. *Exp Biol Med* 228, 660-664

Geier DA, Geier MR (2004): Neurodevelopmental disorders following thimerosal-containing childhood immunizations: a follow-up analysis. *Int J Toxicol* 23, 369-376

Geier DA, Geier MR (2005): A two-phased population epidemiological study of the safety of thimerosal-containing vaccines: a follow-up analysis. *Med Sci Monit* 11, CR160-CR170

Geier DA, Geier MR (2006a): An assessment of downward trends in neurodevelopmental disorders in the United States following removal of Thimerosal from childhood vaccines. *Med Sci Monit* 12, CR 231-CR239

Geier DA, Geier MR (2006b): An evaluation of the effects of thimerosal on neurodevelopmental disorders reported following DTP and Hib vaccines in comparison to DTPH vaccine in the United States. *J Toxicol Environ Health A* 69, 1481-1495

Geier DA, Geier MR (2007): A prospective study of thimerosal-containing Rho(D)-immune globulin administration as a risk factor for autistic disorders. *J Matern Fetal Neonatal Med* 20, 385-390

Gericke M, Droogmans G, Nilius B (1993): Thimerosal induced changes of intracellular calcium in human endothelial cells. *Cell Calcium* 14, 201-207

Giard DJ, Aaronson SA, Todaro GJ, Arnstein P, Kersey JH, Dosik H, Parks WP (1973): In vitro cultivation of human tumors: establishment of cell lines derived from a series of solid tumors. *J Natl Cancer Inst* 51, 1417-1423

Gillet JP, Varma S, Gottesman MM (2013): The clinical relevance of cancer cell lines. *J Natl Cancer Inst* 105, 452-458

Goldman LR, Shannon MW and the Committee on Environmental Health (2001): Technical report: mercury in the environment: implications for pediatricians. *Pediatrics* 108, 197-205

Gonçalo M, Figueiredo A, Gonçalo S (1996): Hypersensitivity to thimerosal: the sensitizing moiety. *Contact Dermatitis* 34, 201-203

Heron J, Golding J (2004): Thimerosal exposure in infants and developmental disorders: a prospective cohort study in the United kingdom does not support a causal association. *Pediatrics* 114, 577-583

Hviid A, Stellfeld M, Wohlfahrt J, Melbye M (2003): Association between thimerosal-containing vaccine and autism. *JAMA* 290, 1763-1766

Jalili MA, Abbasi MH (1961): Poisoning by ethyl mercury toluene sulphonanilide. *Br J Ind Med* 18, 303-308

Janach M, Kühne A, Seifert B, French LE, Ballmer-Weber B, Hofbauer GF (2010): Changing delayed-type sensitizations to the baseline series allergens over a decade at the Zurich University Hospital. *Contact Dermatitis* 63, 42-48

Kern JK, Haley BE, Geier DA, Sykes LK, King PG, Geier MR (2013): Thimerosal exposure and the role of sulfation chemistry and thiol availability in autism. *Int J Environ Res Public Health* 10, 3771-3800

Kim N, He N, Yoon S (2014): Cell line modeling for systems medicine in cancers (review). *Int J Oncol* 44, 371-376

King K, Paterson M, Green SK (2013): Global justice and the proposed ban on thimerosal-containing vaccines. *Pediatrics* 131, 154-156

Knowles BB, Howe CC, Aden DP (1980): Human hepatocellular carcinoma cell lines secrete the major plasma proteins and hepatitis B surface antigen. *Science* 209, 497-499

Landi S (2000): Mammalian class theta GST and differential susceptibility to carcinogens: a review. *Mutat Res* 463, 247-283

Lieber M, Smith B, Szakal A, Nelson-Rees W, Todaro G (1976): A continuous tumor-cell line from a human lung carcinoma with properties of type II alveolar epithelial cells. *Int J Cancer* 17, 62-70

Lu SC, Huang HY (1994): Comparison of sulfur amino acid utilization for GSH synthesis between HepG2 cells and cultured rat hepatocytes. *Biochem Pharmacol* 47, 859-869

Lüllmann H, Mohr K, Hein L: *Pharmakologie und Toxikologie. Arzneimittelwirkungen verstehen – Medikamente gezielt einsetzen*. 16. Auflage; Georg Thieme Verlag, Stuttgart 2006

Madsen KM, Lauritsen MB, Pedersen CB, Thorsen P, Plesner AM, Andersen PH, Mortensen PB (2003): Thimerosal and the occurrence of autism: negative ecological evidence from Danish population-based data. *Pediatrics* 112, 604-606

McLemore TL, Liu MC, Blacker PC, Gregg M, Alley MC, Abbott BJ, Shoemaker RH, Bohlman ME, Litterst CC, Hubbard WC et al. (1987): Novel intrapulmonary model for orthotopic propagation of human lung cancers in athymic nude mice. *Cancer Res* 47, 5132-5140

Migdal C, Foggia L, Tailhardat M, Courtellemont P, Haftek M, Serres M (2010): Sensitization effect of thimerosal is mediated in vitro via reactive oxygen species and calcium signaling. *Toxicology* 274, 1-9

Miles JH, Takahashi TN (2007): Lack of association between Rh status, Rh immune globulin in pregnancy and autism. *Am J Genet Med A* 143A, 1397-1407

- Möller H (1994): All these positive tests to thimerosal. *Contact Dermatitis* 31, 209-213
- Monks TJ, Anders MW, Dekant W, Stevens JL, Lau SS, van Bladeren PJ (1990): Glutathione conjugate mediated toxicities. *Toxicol Appl Pharmacol* 106, 1-19
- Mosmann T (1983): Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays. *J Immunol Methods* 65, 55-63
- Müller M, Voss M, Heise C, Schulz T, Bünger J, Hallier E (2001): High-performance liquid chromatography/fluorescence detection of *S*-methylglutathione formed by glutathione-*S*-transferase T1 in vitro. *Arch Toxicol* 74, 760-767
- Mutter J, Naumann J, Walach H, Daschner F (2005): Amalgam: Eine Risikobewertung unter Berücksichtigung der neuen Literatur bis 2005. *Gesundheitswesen* 67, 204-216
- Niles AL, Moravec RA, Riss TL (2008): Update on *in vitro* cytotoxicity assays for drug development. *Expert Opin Drug Discov* 3, 655-669
- Parker SK, Schwartz B, Todd J, Pickering LK (2004): Thimerosal-containing vaccines and autistic spectrum disorder: a critical review of published original data. *Pediatrics* 114, 793-804
- Pfab R, Mückter H, Roeder G, Zilker T (1996): Clinical course of severe poisoning with thiomersal. *J Toxicol Clin Toxicol* 34, 453-460
- Pichichero ME, Cernichiari E, Lopreiato J, Treanor J (2002): Mercury concentrations and metabolism in infants receiving vaccines containing thiomersal: a descriptive study. *Lancet* 360, 1737-1741
- Pichichero ME, Gentile A, Giglio N, Umido V, Clarkson T, Cernichiari E, Zareba G, Gotelli C, Gotelli M, Yan L (2008): Mercury levels in newborns and infants after receipt of thimerosal-containing vaccines. *Pediatrics* 121, e208-e214
- Pirker C, Möslinger T, Wantke F, Götz M, Jarisch R (1993): Ethylmercuric chloride: the responsible agent in thimerosal hypersensitivity. *Contact Dermatitis* 29, 152-154
- Pless R, Risher JF (2000): Mercury, infant neurodevelopment, and vaccination. *J Pediatr* 136, 571-573
- Ramsay EE, Dilda PJ (2014): Glutathione *S*-conjugates as prodrugs to target drug-resistant tumors. *Front Pharmacol* 5, 1-11
- Reader MJ, Lines CB (1983): Decomposition of thimerosal in aqueous solution and its determination by high-performance liquid chromatography. *J Pharm Sci* 72, 1406-1409

Repetto G, del Peso A, Zurita JL (2008): Neutral red uptake assay for the estimation of cell viability/cytotoxicity. *Nat Protoc* 3, 1125-1131

Riss TL, Moravec RA (2004): Use of multiple assay endpoints to investigate the effects of incubation time, dose of toxin, and plating density in cell-based cytotoxicity assays. *Assay Drug Dev Technol* 2, 51-62

Rohyans J, Walson PD, Wood GA, MacDonald WA (1984): Mercury toxicity following merthiolate ear irrigations. *J Pediatr* 104, 311-313

SAGE (Strategic Advisory Group of Experts on immunization) (2012): Meeting of the Strategic Advisory Group of Experts on immunization, April 2012 – conclusions and recommendations. *Wkly Epidemiol Rec* 87, 201-216

Santos KL, Vento MA, Wright JW, Speth RC (2013): The effects of para-chloromercuribenzoic acid and different oxidative and sulfhydryl agents on a novel, non-AT1, non-AT2 angiotensin binding site identified as neurolysin. *Regul Pept* 184, 104-114

Santucci B, Cannistraci C, Cristaudo A, Camera E, Picardo M (1998): Thimerosal positivities: the role of organomercury alkyl compounds. *Contact Dermatitis* 38, 325-328

Schäfer T, Enders F, Przybilla B (1995): Sensitization to thimerosal and previous vaccination. *Contact Dermatitis* 32, 114-116

Schäfer T, Böhler E, Ruhdorfer S, Weigl L, Wessner D, Filipiak D, Wichmann HE, Ring J (2001): Epidemiology of contact allergy in adults. *Allergy* 56, 1192-1196

Schechter R, Grether JK (2008): Continuing increases in autism reported to California's developmental services system: mercury in retrograde. *Arch Gen Psychiatry* 65, 19-24

Schultz ST (2010): Does thimerosal or other mercury exposure increase the risk for autism? A review of current literature. *Acta Neurobiol Exp* 70, 187-195

Seidenari S, Manzini BM, Danese P, Motolese A (1990): Patch and prick test study of 593 healthy subjects. *Contact Dermatitis* 23, 162-167

Squatrito RC, Connor JP, Buller RE (1995): Comparison of a novel redox dye cell growth assay to the ATP bioluminescence assay. *Gynecol Oncol* 58, 101-105

Stamatelos SK, Brinkerhoff CJ, Isukapalli SS, Georgopoulos PG (2011): Mathematical model of uptake and metabolism of arsenic(III) in human hepatocytes - Incorporation of cellular antioxidant response and threshold-dependent behavior. *BMC Syst Biol* 5, 16

Stehr-Green P, Tull P, Stellfeld M, Mortenson PB, Simpson D. (2003): Autism and thimerosal-containing vaccines: lack of consistent evidence for an association. *Am J Prev Med* 25, 101–106

Tan M, Parkin JE (2000): Route of decomposition of thiomersal (thimerosal). *Int J Pharm* 208, 23-34

Thier R, Müller M, Taylor JB, Pemble SE, Ketterer B, Guengerich FP (1995): Enhancement of bacterial mutagenicity of bifunctional alkylating agents by expression of mammalian glutathione S-transferases. *Chem Res Toxicol* 8, 465-472

UNEP (United Nations Environment Programme) (2013): 'Minamata' Convention Agreed by Nations. Global Mercury Agreement to Lift Health Threats from Lives of Millions World-Wide.

URL:

<http://www.unep.org/hazardoussubstances/Portals/9/Mercury/Documents/INC5/press_release_mercury_Jan_19_2013.pdf> [Zugriffsdatum: 27.09.2013]

Urani C, Doldi M, Crippa S, Camatini M (1998): Human-derived cell lines to study xenobiotic metabolism. *Chemosphere* 37, 2785-2795

Uter W, Ludwig A, Balda BR, Schnuch A, Pfahlberg A, Schäfer T, Wichmann HE, Ring J (2004): The prevalence of contact allergy differed between population-based and clinic-based data. *J Clin Epidemiol* 57, 627-632

van't Veen AJ, van Joost T (1998): Sensitization to thimerosal (Merthiolate) is still present today. *Contact Dermatitis* 31, 293-298

Verstraeten T, Davis RL, DeStefano F, Lieu TA, Rhodes PH, Black SB, Shinefield H, Chen RT (2003): Safety of thimerosal-containing vaccines: a two-phased study of computerized health maintenance organization database. *Pediatrics* 112, 1039-1048

Vesper AC: Untersuchungen zu Thiomersal als Inhibitor der humanen Glutathion-S-Transferase T1 (hGSTT1-1). *Med. Diss. Göttingen* 2007

Wantke F, Demmer CM, Götz M, Jarisch R (1994): Contact dermatitis from thimerosal. 2 years' experience with ethylmercuric chloride in patch testing thimerosal-sensitive patients. *Contact Dermatitis* 30, 115-117

Watanabe T, Hirano S (2013): Metabolism of arsenic and its toxicological relevance. *Arch Toxicol* 87, 969-979

Wekkeli M, Hippmann G, Rosenkranz AR, Jarisch R, Götz M (1990): Mercury as a contact allergen. *Contact Dermatitis* 22, 295-296

Westphal G, Asgari S, Schulz TG, Bünger J, Müller M, Hallier E (2002): Thimerosal induces micronuclei in the cytochalasin B block micronucleus test with human lymphocytes. *Arch Toxicol* 77, 50-55

Westphal GA, Schnuch A, Schulz TG, Reich K, Aberer W, Brasch J, Koch P, Wessbecher R, Szliska C, Bauer A (2000): Homozygous gene deletions of the glutathione S-transferases M1 and T1 are associated with thimerosal sensitization. *Int Arch Occup Environ Health* 73, 384-388

Wilson GS: *The Hazards of Immunization*. The Athlone Press, London 1967

Wu X, Liang H, O'Hara KA, Yalowich JC, Hasinoff BB (2008): Thiol-modulated mechanisms of the cytotoxicity of thimerosal and inhibition of DNA topoisomerase II α . *Chem Res Toxicol* 21, 483-493

Yamaguchi T, Iwata Y, Miura S, Kawada K (2012): Reinvestigation of drugs and chemicals as aquaporin-1 inhibitors using pressure-induced hemolysis in human erythrocytes. *Biol Pharm Bull* 35, 2088-2091

Yin R, Huang XY, Zhou XF, Hao F (2011): A retrospective study of patch tests in Chongqing, China from 2004 to 2009. *Contact Dermatitis* 65, 28-33

Young HA, Geier DA, Geier MR (2008): Thimerosal exposure in infants and neurodevelopmental disorders: An assessment of computerized medical records in the Vaccine Safety Datalink. *J Neurol Sci* 271, 110-118

Zareba G, Cernichiari E, Hojo R, Nitt SM, Weiss B, Mumtaz MM, Jones D E, Clarkson TW (2007): Thimerosal distribution and metabolism in neonatal mice: comparison with methyl mercury. *J Appl Toxicol* 27, 511-518

Zieminska E, Toczyłowska B, Stafiej A, Lazarewicz JW (2010): Low molecular weight thiols reduce thimerosal neurotoxicity in vitro: modulation by proteins. *Toxicology* 276, 154-163

Zimmermann LT, Santos DB, Naime AA, Leal RB, Dórea JG, Barbosa F Jr, Aschner M, Rocha JB, Farina M (2013): Comparative study on methyl- and ethylmercury-induced toxicity in C6 glioma cells and the potential role of LAT-1 in mediating mercurial-thiol complexes uptake. *Neurotoxicology* 38, 1-8

Danksagung

Zuvorderst gilt mein Dank Herrn PD Dr. Michael Müller für die hervorragende Betreuung und die stete Ansprechbarkeit bei Fragen und Problemen aller Art.

Unentbehrlich war auch die Hilfe von Seiten der Mitarbeiterinnen und Mitarbeiter des Instituts für Arbeits-, Sozial- und Umweltmedizin. Ich möchte mich besonders bei Gesa Homann, Pia Hoppmann, Martina Lange, Bianca Rohland und Anke Seeckts bedanken. Jede hat mich auf ihre besondere und unverzichtbare Weise unterstützt. Herrn Prof. Dr. Ernst Hallier danke ich für die Möglichkeit, im Institut für Arbeits-, Sozial- und Umweltmedizin die Arbeiten für diese Dissertation durchzuführen. Dem gesamten Team des Instituts danke ich für die herzliche Aufnahme und die stete Hilfsbereitschaft, die angenehme Atmosphäre und den gelegentlich nötigen Trost.

Bei Sonani Mindt und Alexander Vesper bedanke ich mich für unschätzbare Orientierungshilfen.

Herrn Dr. H. Frauendorf und Herrn Dipl.-Chem. R. Machinek aus dem Institut für Organische und Biomolekulare Chemie gilt mein Dank für die geduldigen und wiederholten NMR- und ESI-MS-Analysen, die unabdingbar für die Durchführung dieser Arbeit waren.