

Aus der Klinik für Zahn-, Mund- und Kieferheilkunde  
im Universitätsklinikum Schleswig-Holstein, Campus Kiel  
an der Christian-Albrechts-Universität zu Kiel

**VERGLEICH DER ANWENDBARKEIT UNTERSCHIEDLICHER  
TETRAZOLIUMSALZE IN BIOTOXIZITÄTSASSAYS IN ANWESENHEIT VON  
NICKEL- UND KUPFERIONEN**

Inauguraldissertation  
zur  
Erlangung der Würde eines Doktors der Zahnheilkunde  
der Medizinischen Fakultät  
der Christian-Albrecht-Universität zu Kiel

vorgelegt von

**JULIA OTT**

aus **Stepnogorsk**

Kiel **2012**

1. Berichtstatter: Prof. Dr. med. dent. H. Fischer-Brandies

2. Berichtstatter: Priv.-Doz. Dr. med. dent. S. Paris

Tag der mündlichen Prüfung: 01.11.2012

Zum Druck genehmigt, Kiel, den 01.11.2012

gez.: Prof. Dr. med. dent. H.-J. Wenz





## ***I. Inhaltsverzeichnis***

|  |     |
|--|-----|
| I. Inhaltsverzeichnis .....  | I   |
| II. Abkürzungsverzeichnis.....   | III |
| 1. Einleitung.....   | 1   |
| 1.1 Literatur Übersicht.....   | 2   |
| 1.2 Ziel der Studie.....   | 5   |
| 2. Methode.....  | 7   |
| 2.1 Vorversuche.....   | 7   |
| 2.2 Versuche in einem zellfreien System unter Verwendung von Diaphorase .....                  | 7   |
| 2.3 Versuche mit humanen Fibroblasten .....  | 11  |
| 2.3.1 Zellkultur: Anzucht, Passagen und Zellzählung.....                                       | 11  |
| 2.3.2 Photometrie .....  | 14  |
| 2.3.3 Morphologische Untersuchung mittels inversem Mikroskop: MTT und humane Fibroblasten..... | 15  |
| 2.4 Versuche zur Charakterisierung von MTT-Formazan in Anwesenheit von Nickel .....            | 15  |
| 2.5 Datenerfassung und –verarbeitung.....  | 16  |
| 2.5.1 Photometrische Analyse.....  | 16  |
| 2.5.2 Raman-Spektroskopie .....  | 18  |
| 2.5.3 Graphische Darstellung.....  | 19  |
| 3. Ergebnisse.....   | 20  |
| 3.1 Vorversuche.....   | 20  |
| 3.2 Versuche in einem zellfreien System unter Verwendung von Diaphorase .....                  | 21  |
| 3.3 Versuche mit humanen Fibroblasten .....  | 29  |
| 3.4 Versuche zur Charakterisierung von MTT-Formazan in Anwesenheit von Nickel .....            | 41  |
| 3.5 Zusammenfassung der Resultate .....  | 47  |
| 4. Diskussion .....  | 48  |
| 5. Zusammenfassung und Schlussfolgerung.....   | 57  |
| 6. Literaturverzeichnis .....  | 59  |
| 7. Anhang .....  | 63  |
| 7.1 Material .....   | 63  |
| 7.1.1 Chemikalien.....   | 63  |

## II

|   |    |
|---|----|
| 7.1.2 Gebrauchswaren .....                                      | 64 |
| 7.1.3 Geräte .....  | 64 |
| 7.1.4 Stammlösungen, Gebrauchslösungen, Puffer und Medien ..... | 64 |
| 7.1.5 Verwendete eukaryontische Zelllinien und Medien.....      | 67 |
| 7.2 Tabellen .....  | 67 |
| 7.3 Abbildungen .....   | 72 |
| Lebenslauf.....   | 74 |
| Eigene Veröffentlichungen.....                                  | 75 |
| Ethik-Kommission Antrag .....                                   | 75 |

## Abkürzungsverzeichnis

|                   |  |
|-------------------|--|
| %                 | Prozent                                |
| $\Sigma$          | Summe                                  |
| °C                | Grad Celsius                           |
| $\mu$ l           | Mikroliter                             |
| $\mu$ m           | Mikrometer                             |
| A                 | Absorption                             |
| A.dest.           | Aqua destillatum/ destilliertes Wasser |
| Abb.              | Abbildung                              |
| ad                | zu                                     |
| BSA               | Albumin, bovine serum                  |
| Bl                | Blank, Kontrollversuch ohne Diaphorase |
| Brd-U             | 5-Brom-2-desoxyuridin                  |
| bzw.              | beziehungsweise                        |
| C                 | Celsius                                |
| c                 | Konzentration in mg/l                  |
| <i>c</i>          | Lichtgeschwindigkeit                   |
| cm                | Zentimeter                             |
| cm <sup>2</sup>   | Quadratcentimeter                      |
| CO <sub>2</sub>   | Kohlenstoffdioxid                      |
| Cu                | Kupfer(II)-Ionen                       |
| CuSO <sub>4</sub> | Kupfersulfat                           |
| d                 | Schichtdicke (in cm)                   |
| dest.             | destilliert                            |
| Dia               | Diaphorase, Versuch mit Diaphorase     |
| DMF               | N,N-Dimethylformamid                   |
| DNA               | Desoxyribonukleinsäure                 |
| E                 | Energie                                |
| EDTA              | Ethylendiamintetraessigsäure           |
| F99               | humane Fibroblasten, Zelllinie 99      |
| FAD               | Flavinadenindinucleotid                |

## IV

|                  |  |
|------------------|--|
| FBS              | fetal bovine serum   |
| FMN              | Flavinmononucleotid  |
| g                | Gramm  |
| <i>h</i>         | Plancksches Wirkungsquantum  |
| h                | Stunden  |
| H <sub>2</sub> O | Wasser   |
| HCl              | Chlorwasserstoff, bildet in Wasser gelöst Salzsäure                                      |
| I                | Intensität   |
| i.A.             | im Anhang  |
| Js               | Joulesekunde   |
| KCL              | Kaliumchlorid  |
| kJ               | Kilojoule  |
| l                | Liter  |
| lg               | Logarithmus  |
| M                | molar  |
| max.             | maximal  |
| Med/MED          | Medium   |
| MEM              | Minimum Essential Medium Eagle   |
| MF               | MTT-Formazan   |
| mg               | Milligramm   |
| min              | Minuten  |
| mind.            | mindestens   |
| ml               | Milliliter   |
| mM               | millimolar   |
| mm               | Millimeter   |
| mm <sup>3</sup>  | Kubikmillimeter  |
| MTS              | 3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-5-(3-carboxymethoxyphenyl)-2-(4-sulfophenyl)-2H-tetrazolium |
| MTT              | 3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazoliumbromid                               |

|                        |  |
|------------------------|--|
| MTT-Formazan           | 3,5-Diphenyl-1-(4,5-dimethyl-2-thiazolyl)-Formazan   |
| N                      | Normalität   |
| NaHCO <sub>3</sub>     | Natrium-Bikarbonat   |
| NAD/NADH               | Nicotinamidadenindinukleotid   |
| NADP/NADPH             | Nicotinamidadenindinukleotidphosphat   |
| Ni                     | Nickel (II)-Ionen  |
| NiSO <sub>4</sub>      | Nickelsulfat   |
| NLCF                   | non-linear curve-fit / nicht-lineare Kurvenanpassung   |
| nm                     | Nanometer  |
| OD                     | optische Dichte  |
| PBS                    | phosphate buffered saline/<br>phosphatgepufferte Salzlösung  |
| pH                     | potentia Hydrogenii  |
| PMS                    | Phenazinmethosulfat  |
| s                      | Sekunde  |
| S.                     | Seite  |
| SDS                    | Natriumlaurylsulfat  |
| t                      | Zeit   |
| Tab.                   | Tabelle  |
| Tris/HCl, Tris/HCl/KCl | Tris(hydroxymethyl)-aminomethan in Wasser, pH-Wert mit Salzsäure eingestellt oder mit Salzsäure und Kaliumchloridlösung. |
| U/min                  | Umdrehungen pro Minute   |
| UV                     | Ultraviolett   |
| Vis                    | visible/ sichtbar  |
| WST1                   | 2-(4-Iodophenyl)-3-(4-nitrophenyl)-5-(2,4-disulfophenyl)-2H-tetrazolium  |
| XTT                    | 2,3-Bis(2-methoxy-4-nitro-5-sulfophenyl)-5-((phenylamino)carbonyl)-2H-tetrazoliumhydroxid                                |

## VI

|                  |  |
|------------------|--|
| z.B.             | zum Beispiel                                       |
| Zell/ ZELL/ Z    | Zellen   |
| $\alpha$ MEM     | Minimum Essential Medium Eagle, Alpha Modification |
| $\varepsilon$    | molarer dekadischer Extinktionskoeffizient         |
| $\lambda$        | Wellenlänge  |
| $\lambda_{\max}$ | Wellenlänge des Absorptionsmaximums                |





## 1. Einleitung

In der Kieferorthopädie kommen unterschiedliche metallische Werkstoffe zum Einsatz. Vor dem Gebrauch der Werkstoffe muss sichergestellt sein, dass diese keine toxische Wirkung auf den menschlichen Organismus haben. Hierfür gibt es zahlreiche Zytotoxizitätstestverfahren, die durch unterschiedliche Ansätze die Vitalität humaner Zellen nachweisen. Hierzu gehören unter anderem die Zellzählung, der Nachweis der DNA-Synthese z.B. mit dem Brd-U-Assay, die morphologische Untersuchung der Zellen und viele weitere Assays. Mit dem MTT-Test wird der Nachweis einer metabolischen Aktivität vitaler Zellen erbracht.

Bei dem MTT-Test wird das Redoxsystem, bestehend aus Tetrazoliumsalz und Formazan, verwendet, um enzymatische und nicht-enzymatische Redoxreaktionen nachzuweisen (35). Das System findet vor allem Anwendung im Bereich der Histochemie und Biochemie zum Nachweis dehydrierter Enzyme (25).

Für den MTT-Test werden Zellen *in vitro* mit dem Tetrazoliumsalz 3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-2,5-Diphenoltetrazoliumbromid (MTT) behandelt, wobei in der Regel der Anteil vitaler Zellen in Anwesenheit der Probe im Vergleich zur probefreien Kontrollösung gemessen wird. MTT ist ein gelblicher und wasserlöslicher Farbstoff, der durch Enzyme der untersuchten Zellen, zu einem violetten und wasserunlöslichen Formazan reduziert wird. Der positiv geladene Ring des Tetrazoliumsalzes wird gespalten und es entsteht ein ungeladenes Amin, welches hydrophob ist und im polaren Medium ausfällt. Die Reaktion ist unter normalen Bedingungen fast irreversibel und führt zur Bildung von Formazan. Die Formazanbildung lässt sich photometrisch bestimmen, da es ein charakteristisches Absorptionsmaximum aufweist. Die Zellaktivität (Umsatz / Vermehrung) lässt sich damit in Anwesenheit bzw. Abwesenheit des Prüfkörpers feststellen.

Dieses Prinzip funktioniert auch mit anderen Tetrazoliumsalzen, wie z.B. MTS, XTT, WST-1. Die Formazane der drei genannten Tetrazoliumsalze sind anders als das MTT-Formazan hydrophil (7).

Wie das MTT liegen auch diese Tetrazoliumsalze als gelbliche bis farblose, wasserlösliche Farbstoffvorstufen vor und werden enzymatisch zu den jeweiligen Formazanprodukten reduziert.

Die Formazanprodukte können mit Metallionen, wie z.B. Nickel- oder Kupfer-Ionen chelatieren (1), (35). Diese Chelatkomplexe haben im Vergleich zu den Ausgangssubstanzen eine andere Farbe und somit auch veränderte Absorptionsmaxima. Beinhalten die zu untersuchenden Proben Metallionen, die mit den gebildeten Formazanen chelatieren, so kann es zu einer Verfälschung der Aussagekraft des Zytotoxizitätstests kommen.

### ***1.1 Literatur Übersicht***

Formazyilverbindungen wurden 1892 von Bamberger und Wheelwright (3), sowie von Pechmann (32) entdeckt. In beiden Veröffentlichungen wurde die Vorgehensweise zur Herstellung der neuartigen Substanz beschrieben.

Nur zwei Jahre später fanden Pechmann und Runge (33) heraus, dass sich die Formazane unter spezifischen Oxidationsbedingungen zu Tetrazoliumsalzen dehydrieren lassen. Tetrazoliumsalze wurden als farblose und gut wasserlösliche Verbindungen beschrieben, welche mit Reduktionsmitteln sehr leicht zu Formazanen reduziert werden können (33). Diese Reaktion ist unter normalen Bedingungen fast irreversibel (33).

Die Bedeutung der Tetrazoliumsalze als Reduktionsindikatoren und ihre Bedeutung zur Sichtbarmachung biologischer Reduktionsvorgänge wurden 1941 von Kuhn und Jerchel erkannt (25). Der Vorteil des Tetrazoliumsalz-Formazan-Systems ist, dass die oxidierte Form (Tetrazoliumsalze) nahezu farblos und die reduzierte Form (Formazane) gefärbt ist (35). Die Formazanprodukte sind unempfindlich gegenüber Sauerstoff und bestimmte Formen sind zudem nicht wasserlöslich (35), (31).

Mosmann stellte 1983 den MTT-Test als einen quantitativen kolorimetrischen Assay zum Nachweis von Zytotoxizität, Proliferation und Aktivität vor (31). Mosmann zeigte in seiner Veröffentlichung, dass sich die Extinktion des durch vitale Zellen umgesetzten MTT bei der photometrischen Messung proportional zu der Zellanzahl

verhält. Das Formazanprodukt ist bei Raumtemperatur über Stunden stabil (31). Die Vorteile des MTT-Assays sind die Schnelligkeit, der Umsatz allein in vitalen Zellen, der Verzicht von Waschungen, die Genauigkeit sowie die schnelle visuelle Bestimmung, auch schon mit bloßem Auge (31). Die spektrophotometrische Auswertung bietet die Möglichkeit große Probenanzahlen anzufertigen, zumal die Kosten des Tests im Vergleich zu anderen Alternativen gering ausfallen (31).

Ein Problem stellte beim MTT-Assay zunächst die Löslichkeit des hydrophoben MTT-Formazans dar, welcher somit als Teststoff in Zellkulturassays nicht quantifizierbar war. Der anfängliche Versuch MTT-Formazan in Ethanol (31) oder in Isopropanol (31) zu lösen, lieferte keine befriedigenden Ergebnisse. 1986 gelang es Tada et. al. mit einer sauren SDS-Lösung (42) diese Schwierigkeiten zu überwinden. Auch mit DMSO oder Aceton konnten gute Ergebnisse erzielt werden (30).

Der Mechanismus der zellulären Reduktion war Thema vieler Untersuchungen. Nachdem Kuhn und Jerchel die Möglichkeit entdeckten, Tetrazoliumsalze als Indikatoren biologischer Reduktionsvorgänge zu nutzen (25), wurden diese in erster Linie als Nachweis der Aktivität mitochondrialer Dehydrogenasen verwendet (2), (35), (40).

Erst 1993 machten Berridge und Tan darauf aufmerksam, dass man trotz der Beliebtheit des MTT-Assays weder den genauen subzellulären Ort, noch den Mechanismus der zellulären Reduktion kannte (6). Ein Jahr zuvor hatten schon Huet et. al. darauf hingewiesen, dass ein Teil der MTT-Reduktion extramitochondrial stattfinden muss (21).

Berridge und Tan stellten fest, dass vor allem NAD(P)H-abhängige Reaktionen verantwortlich sind und diese auch in der äußeren Mitochondrienmembran und in Mikrosomen nachgewiesen werden können (6). Der MTT-Assay konnte damit nicht mehr als Nachweis mitochondrialer Aktivität eingesetzt werden, blieb jedoch weiterhin als Zytotoxizitäts- und Proliferationsassay interessant (6).

Den genauen Mechanismus der MTT-Reduktion beschrieben Liu et. al. 1997 (27). Sie fanden heraus, dass MTT nicht membrangängig ist und somit nur per Endozytose in die Zellen gelangen kann (27). Die Vesikel, die MTT intrazellulär enthielten, wurden als Endosomen und Lysosomen identifiziert (27). Das Formazanprodukt wurde durch Exozytose aus den Zellen heraus transportiert und

bildete dort nadelförmige Kristalle, die die weitere MTT-Aufnahme in die Zelle zu behindern schienen (27). Nur 25-45 % der gesamten MTT-Reduktion findet in Mitochondrien durch Enzyme der Atmungskette statt, der übrige Anteil u.a. in Plasmamembranen und im Zytosol (5).

WST-1 und XTT werden ebenfalls durch NADH/NADPH reduziert (8). Dies geschieht in einem Mechanismus der Sauerstoffradikale involviert, auch wenn keine Zellen oder Enzyme vorhanden sind (8). Es ist daher notwendig, dass ein Elektronenakzeptor anwesend ist (8). Die mitochondriale Succinat-abhängige Reduktion durch Dehydrogenasen ist im Vergleich dazu langsamer (8).

Tetrazoliumsalze unterscheiden sich u.a. in ihrer Struktur als Mono- oder Ditetrazoliumsalze. Die strukturellen Unterschiede bestimmen über Reduzierbarkeit, Stabilität, Fettlöslichkeit und Kristallisationsgröße der Tetrazoliumsalze (20).

Die Art der Substitution erzeugt Unterschiede in der Farbe und im Verhalten. Monoformazane weisen einen gelben bis roten Farbton auf, Diformazane sind eher blau bis schwarz (39). Diphenyl-substituierte Formazane zeichnet eine tiefrote Farbe aus, die mit Zunahme an Diphenylresten auch an Intensität zunimmt (22). Die neue Generation der Tetrazoliumsalze (XTT, MTS und WST-1), deren Formazane im Gegensatz zu den bisher verwendeten wasserlöslich sind, wurde näher untersucht. Die Reduktion aller drei war proportional zur zellulären Biomasse (28). Der Vorteil der Wasserlöslichkeit ist das Ausschneiden der Notwendigkeit die entstehenden Formazane aus den Zellen zu extrahieren (28). Diese Tatsache stellte bisher die Schwierigkeit der Assays dar. Die wasserlöslichen Formazane diffundieren selbstständig aus den Zellen, so dass direkt eine spektrophotometrische Analyse folgen kann (28). Die spektrophotometrische Untersuchung ergab die Absorptionsmaxima bei 470 nm für XTT, 480 nm für MTS und 440 nm für WST-1 (8) bzw. für das jeweilige Formazan. Die nähere Untersuchung von XTT führte zu dem Schluss, dass PMS für die Reduktion als Elektronenakzeptor in Anwesenheit von Zellen notwendig ist (8).

Es ist eine vielfach beobachtete und untersuchte Eigenschaft der Formazane mit Schwermetallen tiefgefärbte, kristalline Komplexverbindungen zu bilden (4), (13),

(14), (16)-(19), (22), (41), (43). Als Metallsalze kommen z.B. Ni(II), Cu(II) und Co(II) (1), (22) oder auch Zn(II) (38) in Frage.

Schon Kuhn und Jerchel bemerkten, dass sich ein Kupferkomplex von grünschwarzer Farbe mit dem roten N-Phenyl-N'-p-nitro-phenyl-C-undecyl-formazan bildet (25).

1949 beschreiben Jerchel und Fischer ebenfalls, dass es zur Bildung von fast schwarzen Kristallen kommt, die als Komplexe durch Umsetzung des Triphenylformazans mit alkoholischer Kupfer, Kobalt- oder Nickelacetatlösung entstehen (22). Es wurde darauf hingewiesen, dass die Toxizität der Tetrazoliumsalze mit der aromatischen Substitution zunimmt (22).

Uneinigkeit bestand jedoch in Bezug auf die Struktur der Komplexe.

Jerchel und Fischer gingen von Komplexen aus, bei denen sich zwei Formazanmoleküle mit einem Molekül Metallsalz verbinden (22). Auch Beffa et. al. vertraten diese Ansicht (4). Seyhan und Ocakeioglu wiederum unterschieden je nach Metallsalz (41). Mit Nickel formulierten sie 1:1 Komplexe, mit Kobalt 2:1 Komplexe. Hirsch sah den 1:1 Komplex dagegen mit Kupfer, während er Nickel- und Kobaltkomplexe im Verhältnis 2:1 beschrieb (16)-(19). Mester beschreibt 1958 die Komplexbildung von Formazanen mit Metallsalzen in Bezug auf ihre Substitution (29). Bei einfachen Formazanen reagieren jeweils zwei Formazanmoleküle mit einem Metallsalzmolekül (29). Verfügt das Formazan jedoch über Hydroxyl- oder Carboxylgruppen, entstehen Komplexe im Verhältnis 1:1 (29).

Die Chelatkomplexe, die in einem 2:1-Verhältnis reagieren, sind konplanar und haben eine größere Absorptionsfläche (4). Die Absorptionsspektren der Chelatkomplexe unterscheiden sich von den Absorptionsspektren der Formazane (4), (43).

## **1.2 Ziel der Studie**

In der folgenden Arbeit wurde die Reduktion der Tetrazoliumsalze MTT, MTS, XTT, WST-1 in Anwesenheit von Nickel- und Kupfer-Ionen untersucht. Zunächst wurden die Tetrazoliumsalze in einem zellfreien System unter Verwendung von Diaphorase geprüft, anschließend mit humanen Fibroblasten. Jedes der vier Tetrazoliumsalze wurde mit Nickel- und Kupfer-Ionen in verschiedenen Konzentrationen untersucht

und stets im Vergleich zu einem Kontrollversuch ohne Enzyimbeteiligung. Die Auswertung erfolgte photometrisch zunächst als Messung im Bereich zwischen 250-850 nm zu den Zeitpunkten  $t=0$  min,  $t=60$  min,  $t=120$  min im zellfreien System. Anschließend wurden die Testsubstanzen in einer Kinetikstudie über 2 Stunden mit einem Messintervall von 2,5 Minuten und im Bereich des Absorptionsmaximums des jeweiligen Formazans gemessen. Im System mit humanen Fibroblasten wurden die Tetrazoliumsalze nach einer Inkubationsdauer von 180 Minuten in einer photometrischen Messung untersucht.

Ziel der Versuche war es folgende Fragestellungen zu beantworten:

1. Wie reagieren die verschiedenen Tetrazoliumsalze auf die Anwesenheit von Metallionen?
2. Reagiert das Tetrazoliumsalz und/oder das Formazan mit den Metallionen?
3. Wie könnte ein Komplex aussehen, in welchem Verhältnis könnten die beteiligten Stoffe reagieren?

Die Beantwortung der Fragestellungen 1. – 3. dient der Erarbeitung der Antwort der hauptsächlichen Fragestellung 4.:

4. Können Tests mit Tetrazoliumsalzen verlässliche Ergebnisse in Anwesenheit von Metallionen (z.B. Nickel und Kupfer) liefern?

## 2. Methode

### 2.1 Vorversuche

Zu Beginn der Versuche wurden alle Substanzen einzeln in Tris-Puffer in einem Wellenbereich zwischen 250 und 850 nm photometrisch mit dem Photometer  $\mu$ Quant von BioTek charakterisiert. Hierfür wurden jeweils 10  $\mu$ l der zu prüfenden Substanz (siehe Tab. 1) mit Tris-Puffer auf ein Volumen von 168  $\mu$ l aufgefüllt. Getestet wurden alle verwendeten Nickel- und Kupfer-Ionen-Konzentrationen, NADH, FMN, Diaphorase, sowie die Tetrazoliumsalze MTT, MTS, WST-1 und XTT. Es wurden 96-well-Platten verwendet.

| <b>Substanz (jeweils 10 <math>\mu</math>l) in Tris-Puffer (jeweils 158<math>\mu</math>l)</b> |
|--|
| 0,23 mM $\beta$ NADH   |
| 0,272 mM FMN   |
| Diaphorase   |
| 12 mM MTT  |
| 1,2 mM MTS/WST-1/XTT   |
| Ni(II)-Lösung (jeweils 2 mg/l, 5 mg/l, 10 mg/l, 50 mg/l)                                     |
| Cu(II)-Lösung (jeweils 0,2 mg/l, 0,4 mg/l, 0,5 mg/l, 1mg/l)                                  |

Tab. 1: Verwendete Substanzen für die Vorversuche.

### 2.2 Versuche in einem zellfreien System unter Verwendung von Diaphorase

Der MTT-Test kann in einem zellfreien System durchgeführt werden. Für die Reduktion des Tetrazoliumsalzes zum entsprechenden Formazan reicht die Anwesenheit eines Enzyms, in dieser Studie Diaphorase, aus. Das Tetrazoliumsalz wird durch die Enzyme und in Anwesenheit von Cofaktoren wie NADH reduziert (siehe Abb. 1), so dass der Umsatz photometrisch bestimmt werden kann.

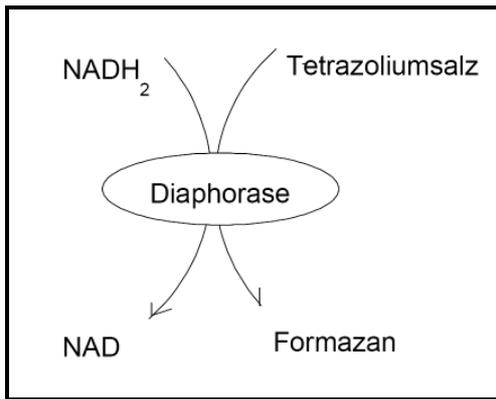


Abb. 1: Reduktion des Tetrazoliumsalses .

Es ist aus der Literatur (31) und aus eigener Messung bekannt (siehe Tab. 21 i.A.), dass das MTT-Formazan ein Absorptionsmaximum bei einer Wellenlänge von 570 nm hat. Mit einem Photometer kann man die Extinktion bei der bekannten Wellenlänge messen. Man setzt in diesem Fall voraus, dass die Kontrolllösung, die keine weiteren Zusätze enthält, einen MTT-Umsatz von 100 % aufweist. Nun kann man die zu untersuchenden Substanzen hinzufügen und auch hier die Extinktion messen. Liegt diese unter dem Wert der Kontrolllösung, so lässt sich der Grad der Toxizität der untersuchten Substanz als Prozentsatz der zuvor untersuchten Kontrolllösung angeben.

Der MTT-Test erfreut sich großer Beliebtheit, da er im Vergleich zu anderen Verfahren preisgünstig und einfach durchzuführen ist (31). Das Testprinzip ist auch auf andere Tetrazoliumsalsze übertragbar (28). Für den Versuch im zellfreien System wurden 96-well-Platten bestückt. Jedes Tetrazoliumsals wurde mit und ohne Diaphorase und in gleicher Weise in Anwesenheit von Metallionen in unterschiedlichen Konzentrationen untersucht (siehe Abb. 2).



Abb. 2: Das Diagramm zeigt alle untersuchten Kombinationen der Tetrazoliumsalsze (TZS).

Zunächst wurde das Absorptionsverhalten in einem Bereich von 250-850 nm zu den Zeitpunkten  $t=0$  min,  $t=60$  min,  $t=120$  min untersucht. Diese Messreihe erlaubte die Bestimmung der Absorptionsmaxima der jeweiligen Formazane ohne Zusatz von Metallionen und in Anwesenheit von Diaphorase. In einem zweiten Schritt wurde in dem zuvor für das jeweilige Tetrazoliumsalz bestimmten Absorptionsmaximum eine Kinetikstudie mit einem Intervall von 2,5 Minuten über eine Dauer von 2 Stunden durchgeführt. Die Zusammensetzung der Lösungen ist der Tabelle 2 zu entnehmen; es wurde die Methode nach Tada (42) angewandt.

| Lösung                                       | Blank                               | Dia                                 |
|--|-------------------------------------|-------------------------------------|
| 0,23 mM NADH                                 | 140 $\mu$ l                         | 140 $\mu$ l                         |
| 12 mM MTT oder 1,2 mM MTS,WST1,XTT           | 10 $\mu$ l                          | 10 $\mu$ l                          |
| 0,272 mM FMN                                 | 10 $\mu$ l                          | -----                               |
| Diaphorase                                   | -----                               | 10 $\mu$ l                          |
| Nickelionen 2 mg/l<br>(aus 0,333 g/l Lsg.)   | 1 $\mu$ l+ 7 $\mu$ l Tris-Puffer    | 1 $\mu$ l+ 7 $\mu$ l Tris-Puffer    |
| Nickelionen 5 mg/l<br>(aus 0,333 g/l Lsg.)   | 1,7 $\mu$ l+ 7 $\mu$ l Tris-Puffer  | 1,7 $\mu$ l+ 7 $\mu$ l Tris-Puffer  |
| Nickelionen 10 mg/l<br>(aus 0,5 g/l Lsg.)    | 1,7 $\mu$ l+ 7 $\mu$ l Tris-Puffer  | 1,7 $\mu$ l+ 7 $\mu$ l Tris-Puffer  |
| Nickelionen 50 mg/l<br>(aus 0,5 g/l Lsg.)    | 8,4 $\mu$ l                         | 8,4 $\mu$ l                         |
| Kupferionen 0,2 mg/l<br>( aus 0,01 g/l Lsg.) | 3,4 $\mu$ l + 5 $\mu$ l Tris-Puffer | 3,4 $\mu$ l + 5 $\mu$ l Tris-Puffer |
| Kupferionen 0,4 mg/l<br>( aus 0,01 g/l Lsg.) | 6,7 $\mu$ l + 2 $\mu$ l Tris-Puffer | 6,7 $\mu$ l + 2 $\mu$ l Tris-Puffer |
| Kupferionen 0,5 mg/l<br>( aus 0,01 g/l Lsg.) | 8,4 $\mu$ l                         | 8,4 $\mu$ l                         |
| Kupferionen 1 mg/l<br>( aus 0,1 g/l Lsg.)    | 1,7 $\mu$ l + 7 $\mu$ l Tris-Puffer | 1,7 $\mu$ l + 7 $\mu$ l Tris-Puffer |

Tab. 2: Auflistung der verwendeten Substanzen mit Mengenangabe für die zellfreien Versuche mit (Dia) und ohne (Blank) Diaphorase.

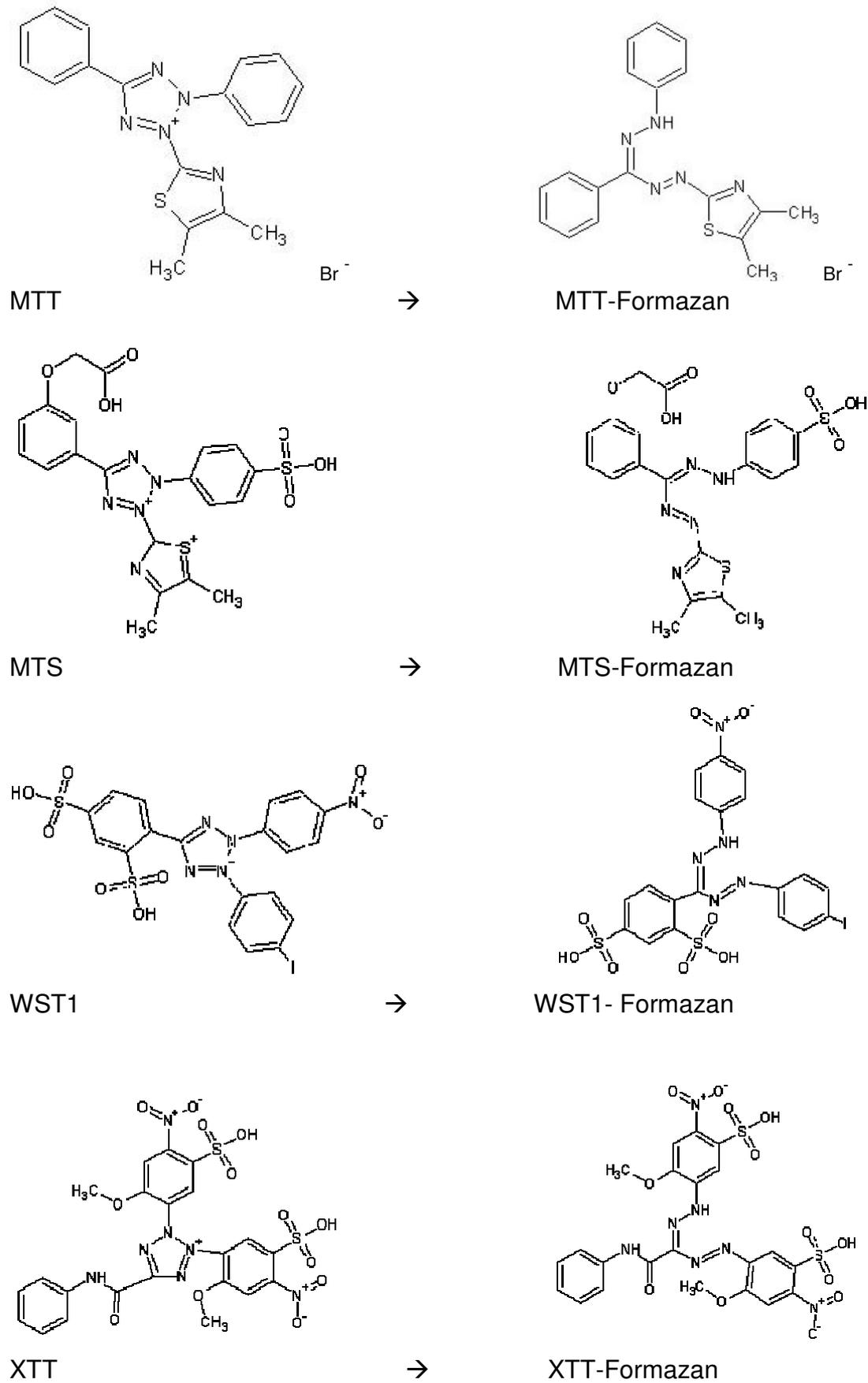


Abb. 3: Strukturformeln der verwendeten Tetrazoliums Salze und ihrer Formazane.

## **2.3 Versuche mit humanen Fibroblasten**

Ein Zytotoxizitätstest dient der Untersuchung bestimmter Substanzen bzw. ihrer Wirkung auf vitale Zellen. Vitale Zellen werden mit der zu untersuchenden Substanz versetzt und nachfolgend durch einen quantitativ-analytischen Test, wie den MTT-Test ausgewertet. Die Auswertung findet immer im Vergleich zu einem Kontrollversuch ohne die zu untersuchende Substanz statt.

Der MTT-Test liefert eine quantitative Auswertung eines Zytotoxizitätstests. Das gelbe und wasserlösliche MTT wird durch Enzyme, wie z.B. mitochondriale Dehydrogenasen, zu einem violetten und wasserunlöslichen Formazan reduziert (siehe Abb. 1). Der MTT-Umsatz ist ein Maß für die Zellvitalität.

### **2.3.1 Zellkultur: Anzucht, Passagen und Zellzählung**

Um eine Zellkultur zu erhalten, werden Gewebestücke mechanisch und enzymatisch aufgeschlossen. Die Zellen werden aus einem Zellverband gelöst und einzeln ausgesät. Die Aussaat erfolgt z.B. in Plastikflaschen. Hier setzen sich die Zellen am Boden ab und beginnen zu proliferieren. Durch eine Hemmung, die bei Kontakt zwischen benachbarten Zellen eintritt, wird die Proliferation eingestellt (26). Es entsteht ein einschichtiger Zellverband. Die Zellen lassen sich z.B. mit Trypsin vom Flaschenboden lösen. Sie werden anschließend verdünnt erneut ausgesät, so dass man die benötigte Anzahl an Zellen erhält, die man für Zytotoxizitätstests verwenden kann.

Die Zellen brauchen bestimmte Bedingungen, damit sie proliferieren können (26).

- Zellkulturen wachsen in Medien. Diesen sind diverse Substanzen beigefügt. Eine Basis aus destilliertem Wasser enthält Salze, Vitamine, Glucose und Aminosäuren, sowie Nukleotide. Antibiotika und Antimykotika werden zugefügt, um einen Wachstum von Bakterien und Pilzen zu verhindern. Fetales Kälberserum wird ebenfalls zugesetzt, es bietet der Zellkultur zusätzliche Proteine, Hormone, Wachstumsfaktoren und Spurenelemente. Auch Phenolrot als Indikator und Bikarbonat als Puffer werden beigefügt.

- Der optimale pH-Wert für Zellkulturen liegt in der Regel bei 7,2-7,4 (26). Die Kohlenstoffdioxid-Konzentration steht im Gleichgewicht mit der Bikarbonat-Konzentration, dieses Puffersystem kann den pH-Wert des Mediums in gewissen Grenzen ausgleichen. Eine Kohlenstoffdioxid-Begasung des Brutschrankes sorgt für die Anreicherung des Mediums, Bikarbonat wird dem Medium zugegeben. Die Zellen produzieren durch ihren Stoffwechsel Säuren und Kohlenstoffdioxid und geben diese Substanzen an das Medium ab, durch den Stoffwechsel der Zellen sinkt der pH-Wert. Durch das Puffersystem kann der anfallende Kohlenstoffdioxid-Anteil für eine gewisse Zeit abgefangen werden indem die Bikarbonatkonzentration steigt.

Ein Indikator wird zugesetzt, der anzeigt, wenn der pH-Wert sich verändert. Phenolrot als Indikator ist bei einem pH-Wert von 7,4 rot. Im sauren Milieu wird er zunächst orange (bei einem pH-Wert von 7,0) und dann gelb (pH-Wert von 6,5). Im alkalischen Milieu ist der Farbton bläulich rot bis violett.

Wenn das Puffersystem die steigende Kohlenstoffdioxidkonzentration nicht mehr ausgleichen kann, so kommt es zu einem Farbumschlag, der einen benötigten Mediumwechsel deutlich macht.

Für die Versuche mit Zellen wurden primäre, humane Gingivafibroblasten der 3. Passage verwendet.

Die Arbeit mit den Zellen erfolgte unter einer Sterilbank mit vertikalem Luftfiltersystem, um eine Kontamination der Zellen mit Bakterien oder Pilzen zu vermeiden. Die Inkubation erfolgte in einem Brutschrank unter wassergesättigter Atmosphäre bei einer Temperatur von 37 °C und einem Kohlenstoffdioxidgehalt von 5 %. Alle 2 bis 3 Tage erfolgte ein Wechsel des Mediums.

Für die Zellanzucht wurde das Primärmaterial mit einem Skalpell in ca. 1 mm<sup>3</sup> große Gewebeproben geteilt und auf Petrischalen verteilt. 3 bis 4 Gewebeproben wurden in eine Petrischale gelegt. Die Schalen wurden mit 3 ml Nährmedium aufgefüllt. Nach einer Woche Inkubation im Brutschrank bei 37 °C wurde das Nährmedium alle 2 Tage gewechselt.

3 Wochen nach der Zellanzucht wurden die Fibroblasten zum ersten Mal passagiert. Zunächst wurde das Nährmedium aus den Schalen abgesaugt und die Zellen wurden mit 3 ml PBS-Lösung gespült, die anschließend ebenfalls abgesaugt wurde. Jeder Petrischale wurde 1ml Trypsinlösung zugefügt und es folgte eine Inkubation im Brutschrank bei 37 °C für 5 min.

Die Suspension aus Zellen und Trypsin wurde mit einer Pipette aufgenommen und in Zentrifugations-Röhrchen überführt. In den Röhrchen war bereits FCS-Medium vorhanden, das dem Gesamtvolumen der verwendeten Trypsinlösung entsprach. Die Suspension wurde bei Raumtemperatur und 1800 U/min neun Minuten lang zentrifugiert, so dass sich die Zellen am Boden des Röhrchens als Pellet absetzen konnten und der Überstand aus Trypsin und Medium wegpipettiert wurde. Das Zellpellet wurde in 5 ml Medium resuspendiert.

Für die Bestimmung der Zellzahl in der Suspension mit FCS-Medium wurden 14 µl der Suspension mit 14 µl Trypanblau-Lösung gemischt. Hiervon wurden wiederum 14 µl entnommen und in einer Neubauerzählkammer ausgezählt.

Prinzip der Neubauerzählkammer

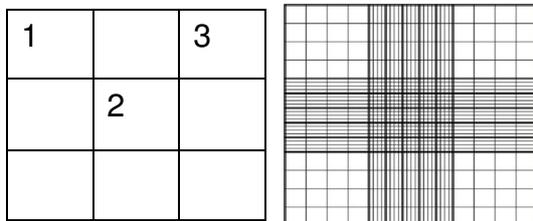


Abb. 4: Skizze einer Neubauerzählkammer

Es werden die Felder 1, 2 und 3 unter einem Lichtmikroskop ausgezählt (siehe Abb. 4). Jedes Feld besteht aus kleineren Feldern, die von links nach rechts und von oben nach unten ausgezählt werden. Zellen, die auf dem L-Rand (linke und untere Grenzlinie) der besagten Felder liegen, werden mitgezählt. Zellen, die doppelt oder mehrfach zusammen bzw. aufeinander liegen, werden als einzeln gewertet. Vitale Zellen zeichnen sich im Unterschied zu toten Zellen durch eine fehlende Blaufärbung aus, tote Zellen oder Zellfragmente werden bei der Zählung nicht berücksichtigt.

Anschließend konnte bestimmt werden in welchem Volumen der Suspension  $3 \cdot 10^5$  Zellen enthalten sind. Dieses Volumen wurde in 250 ml Flaschen gegeben und mit  $\alpha$ MEM-Medium auf 10 ml Gesamtvolumen aufgefüllt. Die gefüllten Flaschen wurden mit Datum, Zellzahl und der Passage versehen und im Brutschrank bei 37 °C gelagert. Das Medium wurde alle zwei Tage gewechselt und nach sieben Tagen erfolgte die 2. Passage in gleicher Weise, sowie die 3. Passage weitere 7 Tage danach.

### **2.3.2 Photometrie**

Für die Auswertung wurden jeweils 50  $\mu$ l Zellsuspension in MEM-Medium ohne Phenolrot mit  $10^4$  Zellen pro Well ausgesät. Diese wurden 90 Minuten bei 37 °C inkubiert. Den entsprechenden Wells wurden 50  $\mu$ l der jeweiligen Nickel- oder Kupfer-Ionen-Lösung doppelt konzentriert zugefügt und es folgte eine weitere Inkubation für 24 Stunden. Jedem Well wurde 25  $\mu$ l des jeweiligen Tetrazoliums Salzes zugesetzt und es folgte eine dreistündige Inkubation. Anschließend wurden alle Wells mit 100  $\mu$ l 10 % SDS-Lösung versetzt und für weitere 24 Stunden im Brutschrank belassen. Am Tag der photometrischen Messung wurden die Lösungen in neue 96-Well-Platten überführt, wobei ein Volumen von 175  $\mu$ l für jedes Well entnommen wurde.

Es wurden 96-Well-Platten verwendet. Jedes Tetrazoliums Salz wurde zum einen ohne Zusatz von Metallionen und zum anderen mit den verschiedenen Konzentrationen der Metallionen untersucht. Die Kontrolllösungen enthielten keine Zellen. Es erfolgte zunächst eine Messung im Bereich des Absorptionsmaximums des jeweiligen Tetrazoliums Salzes, anschließend wurde das Absorptionsverhalten in einem Bereich von 250-850 nm untersucht.

Die Zusammensetzung der Lösungen ist der Tabelle 3 zu entnehmen.

| <b>Lösung</b>                         | <b>MED</b> | <b>Zellen</b>                           |
|---------------------------------------|------------|---|
| Zellsuspension                        | -----      | 50 µl mit 10 <sup>4</sup> Zellen in MEM |
| 12 mM MTT oder<br>1,2 mM MTS,WST1,XTT | 25 µl      | 25 µl                                   |
| 10 % SDS                              | 100 µl     | 100 µl                                  |
| MEM-Med. phenolrotfrei                | 100 µl     | 50 µl                                   |
| Nickelionen                           | 50 µl      | 50 µl                                   |
| Kupferionen                           | 50µl       | 50µl                                    |

Tab. 3: Übersicht über die Zusammensetzung der Lösungen für die Versuche mit humanen Fibroblasten (=Zellen) und ohne humane Fibroblasten (=MED).

### **2.3.3 Morphologische Untersuchung mittels inversem Mikroskop: MTT und humane Fibroblasten**

Für die Untersuchungsreihe wurden die Zellkulturen in 6-Well-Platten angelegt. Das Bestücken der 6-Well-Platten erfolgte analog zum Hauptversuch, die Mengen wurden in Anpassung an die größere Fläche erhöht. Es wurden  $2,4 \times 10^5$  Zellen pro Well in 6-Well-Platten ausgesät. Nach 90 Minuten Inkubationsdauer wurden in die entsprechenden Wells 1,2 ml der jeweiligen Nickel- und Kupfer-Lösung doppelt konzentriert zugefügt. Es folgten weitere 24 Stunden Inkubation.

Jedem Well wurden 600 µl 12 mM MTT-Lösung zugefügt und es folgten weitere drei Stunden Inkubation. Die Wells wurden anschließend einzeln in vierfacher und in zwanzigfacher Vergrößerung fotografiert.

### **2.4 Versuche zur Charakterisierung von MTT-Formazan in Anwesenheit von Nickel**

MTT-Formazan wurde zunächst in verschiedenen Lösungsmitteln untersucht. Dazu zählten Ethanol, Tris-Puffer, SDS/ HCl, A.dest. und Aceton. Die beste Löslichkeit wies das MTT-Formazan allerdings in Aceton auf. Es wurde eine Lösung des MTT-Formazans in Aceton mit einer Konzentration von 1 mg/ml angesetzt und für die folgenden Versuche verwendet.

MTT-Formazan wurde zunächst in einer metallfreien Lösung und anschließend in Anwesenheit von Nickel untersucht (siehe Tab. 4). Das Gesamtvolumen pro Well betrug 170  $\mu\text{l}$ . Es wurde jeweils eine entsprechende Kontrolllösung ohne MTT-Formazan angesetzt. Die Lösungen wurden zu den Zeitpunkten  $t=0$  min,  $t=60$  min,  $t=120$  min und  $t=180$  min im Photometer gemessen.

Es wurde zusätzlich eine Raman-Analyse durchgeführt. Für die Raman-Analyse wurde das Aqua dest. (siehe Tab. 4) durch DMF ersetzt. Ein Tropfen der jeweiligen Lösung wurde dafür auf Hochglanz-gewalzte Aluminiumplatten mit einer Reinheit von 99,5 % gebracht. Die Raman-Untersuchung erfolgte in einem Raman-Gerät der Firma Bruker (Senterra). Die Wellenlänge der verwendeten Laser betrug 532 nm. Die Messungen erfolgten in einem Bereich von  $70\text{-}4000\text{ cm}^{-1}$  und  $70\text{-}1500\text{ cm}^{-1}$ .

|                                     | MTT-Formazan      | MTT-Formazan mit Nickel |
|-------------------------------------|-------------------|-------------------------|
| Aqua dest.                          | 163 $\mu\text{l}$ | 143 $\mu\text{l}$       |
| MTT-Formazan in Aceton<br>(1 mg/ml) | 7 $\mu\text{l}$   | 7 $\mu\text{l}$         |
| Nickelionen-Lsg. (50 mg/l)          | -                 | 20 $\mu\text{l}$        |

Tab. 4: Zusammensetzung der Lösungen im Versuch mit MTT-Formazan gelöst in Aceton mit Nickel.

## ***2.5 Datenerfassung und –verarbeitung***

### **2.5.1 Photometrische Analyse**

Die Photometrie wird u.a. in der biochemischen Analyse zum qualitativen und quantitativen Nachweis genutzt. Das Absorptionsverhalten und die Farbe einer Flüssigkeit sind von der stofflichen Zusammensetzung und der Konzentration abhängig. Die Wechselwirkung zwischen elektromagnetischen Strahlen und Atomen bzw. Molekülen einer untersuchten Probe wird in der Photometrie genutzt, um Informationen zu Stoffeigenschaften der Probe zu erhalten (15).

Jedes Molekül absorbiert auf Grund seines charakteristischen Aufbaus einen bestimmten Energiebetrag  $\Delta E$  der zugeführten Strahlung (15). Valenzelektronen der bestrahlten Teilchen werden dabei in ein höheres Energieniveau angeregt und

absorbieren dabei die entsprechende Frequenz (15). Die absorbierte Energie hängt ab von Anzahl und Bindung der Elektronen in den untersuchten Teilchen (15).

Diesen Aspekt macht sich die qualitative Analyse zunutze, um über die Planck-Einstein'sche Beziehung auf die Molekülart in der Probe zu schließen (15).

$$\Delta E = \frac{h \cdot c}{\lambda}$$

$h$  = Plancksches Wirkungsquantum =  $6,63 \cdot 10^{-34}$  Js  
 $c$  = Lichtgeschwindigkeit im Vakuum =  $2,99 \cdot 10^8$  m/s  
 $\lambda$  = Wellenlänge in nm  
 $E$  = Energie in kJ

Die zu untersuchende Lösung wird mit monochromatischem Licht bestrahlt und das transmittierte Licht wird gemessen.

Lambert und Beer entdeckten einen Zusammenhang zwischen der Molekülkonzentration in Lösung und der Lichtabsorption.

$$\lg(I_0 / I) = \epsilon \cdot c \cdot d = A$$

$d[\text{cm}]$  = Schichtdicke der Küvette  
 $c[\text{mol/L}]$  = Konzentration der Farbverbindung  
 $\epsilon[\text{L/mol} \times \text{cm}]$  = molarer dekadischer Extinktionskoeffizient

Das Lambert-Beer'sche Gesetz gilt unter den Bedingungen, dass streng monochromatische Strahlung der Intensität  $I_0$  nach Durchgang durch eine Küvette mit der Schichtdicke  $d$  auf den Betrag  $I$  geschwächt wird (15). Die Probe der zu untersuchenden Moleküle muss so stark verdünnt sein, dass sich die Moleküle nicht gegenseitig beeinflussen können, das Lösungsmittel darf nicht oder nur vernachlässigbar wenig absorbieren (15).

Um die Wellenlänge herauszufinden, in der ein zu untersuchender Stoff am stärksten absorbiert, kann zunächst eine Messung über einen breiten Wellenlängenbereich durchgeführt werden. Danach kann man das ermittelte Absorptionsmaximum einsetzen, um gezielt die Intensität der Absorption bei der Prüfung verschiedener Proben mit dem Stoff zu untersuchen.

In dieser Studie wurden die Lösungen zunächst mit einer Messung der Absorption in einem Bereich zwischen 250-850 nm untersucht. In den zellfreien Versuchen fand

anschließend eine Kinetikstudie statt, bei der mit der Wellenlänge des jeweils ermittelten Absorptionsmaximums die Lösung zwei Stunden lang im Intervall von 2,5 min gemessen wurde. Im Versuch mit humanen Fibroblasten fand eine einmalige Messung mit der Wellenlänge des Absorptionsmaximums nach einer Inkubationsdauer von drei Stunden statt.

Die UV/Vis Spektroskopie erfolgte mit dem Photometer  $\mu$ Quant von Bio-Tek Instruments. Die Daten wurden mit dem Software Programm MicroWin 3.0.Ink erfasst. Die Daten sind anschließend mit dem Software Programm MicroCal<sup>TM</sup> Origin<sup>®</sup> 7.5G ausgewertet worden. Es erfolgte eine Blindwertkorrektur, um den Anteil des Lösungsmittels und weiterer Reagenzien an der Gesamtaborption, die nicht zur Absorption des MTT-Formazans gehören, aus der weiteren Auswertung auszuschließen.

Aus den Datensätzen der Messungen mit der Wellenlänge des Absorptionsmaximums des jeweiligen Formazans wurde der Mittelwert errechnet. Anhand der Datensätze aus den Messungen in einem Bereich von 250 bis 850 nm konnten die Absorptionsmaxima der einzelnen Absorptionsspektren und die dazugehörigen Extinktionen ermittelt werden.

### **2.5.2 Raman-Spektroskopie**

Die Raman-Spektroskopie beruht auf der Wechselwirkung zwischen elektromagnetischer Strahlung und Materie (37). Dabei wird eine Probe mit monochromatischem Licht bestrahlt und ein Teil dieser Strahlung wird gestreut (37). In dem gestreuten Anteil des Lichts finden sich neben der eingestrahlten Frequenz auch weitere Frequenzen, die den Molekülschwingungen zugeordnet werden können (37). Es lassen sich somit Rückschlüsse auf die in der Probe vorhandenen Teilchen ziehen (37).

In dieser Arbeit wurde zum einen MTT-Formazan gelöst in DMF und zum anderen MTT-Formazan mit Nickelionen gelöst in DMF untersucht. Dabei wurden die Lösungen mit einem monochromatischen Licht der Wellenlänge 532 nm bestrahlt. Eine Blende der Größe  $25 \times 1000 \mu\text{m}^2$  wurde verwendet. Es wurden Messungen mit jeweils 10 Zyklen á 10 Sekunden durchgeführt.

### **2.5.3 Graphische Darstellung**

Für die graphische Darstellung wurde das Software Programm MicroCal™ Origin® 7.5G verwendet. Die Darstellung der Messungen im Bereich zwischen 250 und 850 nm erfolgte als Extinktion gegen die Wellenlänge. Die gewonnenen Daten aus den Kinetikstudien wurden als Extinktion gegen die Zeit dargestellt. Die Messungen der Absorption mit der Wellenlänge der jeweiligen Absorptionsmaxima wurden als Säulendiagramm graphisch erfasst.

Der Versuch 2.4 wurde mit der Lorentzfunktion und anschließender nicht-linearer Kurvenanpassung ausgewertet.

Die Fotografien der Zellen erfolgten im inversen Mikroskop Reichert-Jung BioStar und wurden mit dem Software Programm WinTV 2000.Ink erfasst. Die Fotografien wurden in vierfacher und in zwanzigfacher Vergrößerung durchgeführt.

### 3. Ergebnisse

#### 3.1 Vorversuche

In den Vorversuchen wurde anhand von Messungen das Absorptionsverhalten der einzelnen verwendeten Substanzen festgestellt. Diese wiesen in dem Bereich von 440 bis 800 nm nur vernachlässigbar geringe OD auf (siehe Abb. 5, Tab. 20 i.A.). Es konnte somit eine Überlagerung mit den aus der Literatur (28), (31) bekannten Absorptionsmaxima der Formazane (siehe Tab. 5) ausgeschlossen werden.

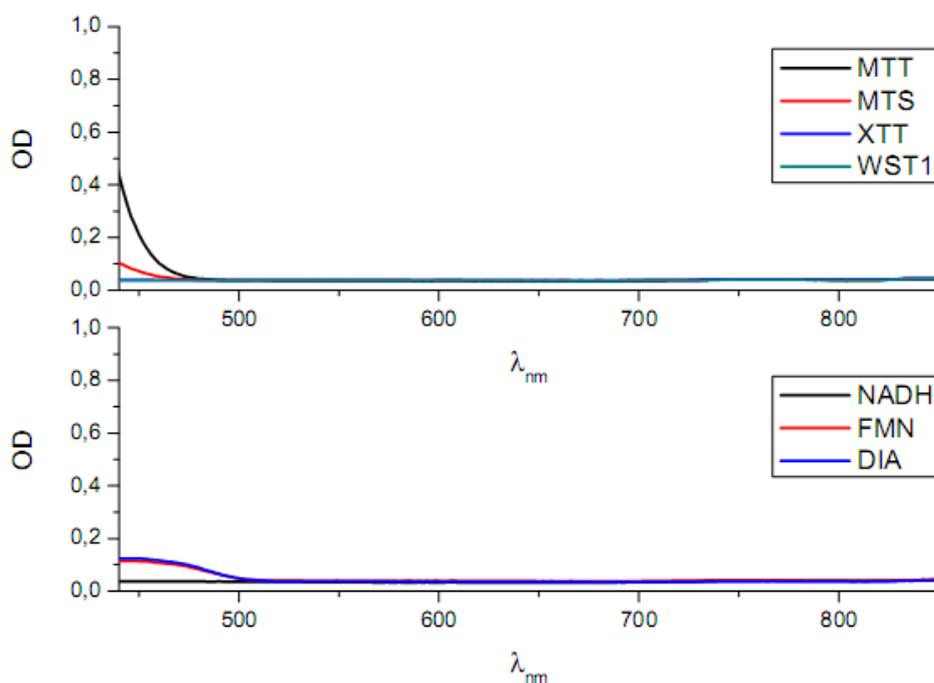


Abb. 5: Absorptionsverhalten der verwendeten Substanzen in Tris-Puffer.

|                |        |
|----------------|--------|
| MTT-Formazan   | 570 nm |
| MTS-Formazan   | 480 nm |
| XTT-Formazan   | 470 nm |
| WST-1-Formazan | 440 nm |

Tab. 5: Erwartete Absorptionsmaxima der unterschiedlichen Formazane der verwendeten Tetrazoliumsalze (28),(31).

### 3.2 Versuche in einem zellfreien System unter Verwendung von Diaphorase

Die verwendeten Tetrazoliumsalze wurden in einem zellfreien System mit dem Enzym Diaphorase und  $\beta$ NADH in Lösung gebracht.

Mit photometrischen Messungen in einem Bereich von 250 nm bis 850 nm wurden die Veränderung des Absorptionsspektrums zu den Zeitpunkten  $t=0$  min,  $t=60$  min und  $t=120$  min festgehalten.

#### a) Versuche mit MTT und Diaphorase

In dem Versuch mit MTT und Diaphorase ohne Zusatz von Metallionen lag das Absorptionsmaximum bei einer Wellenlänge von 572 nm und veränderte sich während der Messungen zu den Zeitpunkten  $t=0$  min,  $t=60$  min und  $t=120$  min nicht. Die Extinktion nahm dabei kontinuierlich bis zum letzten Messzeitpunkt bei  $t=120$  min zu und betrug 0,503 OD (siehe Abb. 6, Tab. 21 i.A.).

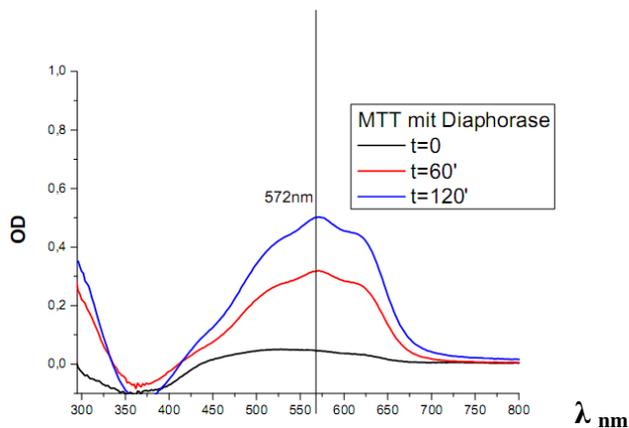
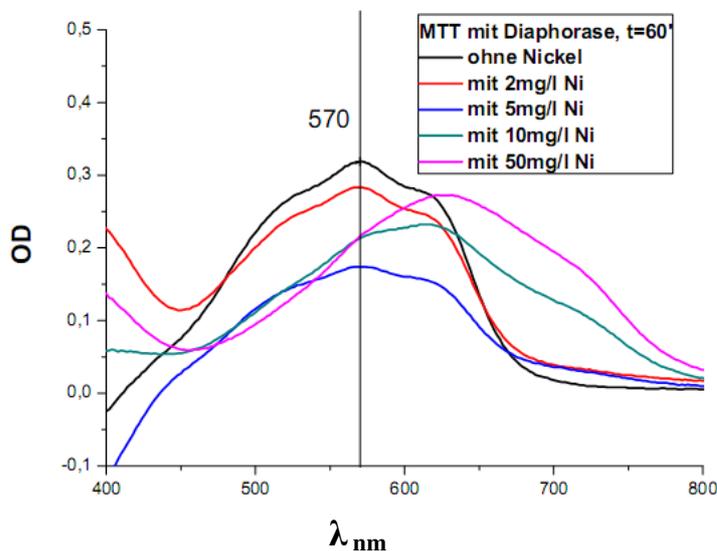


Abb. 6: MTT mit Diaphorase, Vergleich der Absorptionsspektren zu den Zeitpunkten  $t=0$  min,  $t=60$  min und  $t=120$  min. Das Absorptionsmaximum liegt bei  $\lambda_{\text{max}} = 572$  nm.

Durch die Diaphorase und in Anwesenheit von  $\beta$ NADH wurde das Tetrazoliumsalz MTT zum MTT-Formazan reduziert. Der positiv geladene Ring des Tetrazoliumsalzes wurde geöffnet (siehe Abb. 3),  $\beta$ NADH diente als Elektronenakzeptor.

Das Formazan unterscheidet sich optisch deutlich von dem Tetrazoliumsalz. Während das Tetrazoliumsalz gelblich erscheint, zeichnet sich das Formazanprodukt durch eine tiefe violette Farbe aus. Je mehr Formazanprodukt entsteht, desto mehr steigt die Extinktion im Bereich des Absorptionsmaximums  $\lambda_{\text{max}} = 570$  nm  $\pm$  2 nm.

Im nächsten Schritt wurde MTT in Anwesenheit von Nickelionen untersucht. Es wurden 4 Konzentrationen gewählt, diese lagen bei 2, 5, 10 und 50 mg/l Nickelionen. Im Vergleich dazu wurde ein Kontrollversuch ohne Zusatz von Nickelionen angesetzt. Diese Untersuchung ergab, dass sich das Absorptionsmaximum von MTT-Formazan in einer nickelfreien Lösung deutlich von dem Absorptionsmaximum in Anwesenheit von Nickelionen unterscheidet (siehe Abb. 7). Wie zuvor beschrieben, liegt das Absorptionsmaximum von MTT-Formazan bei einer Wellenlänge von 570 nm  $\pm$  2 nm. Bei Zusatz von Nickelionen verschiebt sich das Absorptionsmaximum zu höheren Wellenlängen. Die Absorptionsmaxima der verschiedenen Nickelkonzentrationen unterschieden sich untereinander ebenfalls. Das Absorptionsmaximum lag somit bei einer Nickelionen-Konzentration von 2 mg/l zum Zeitpunkt  $t=120$  min bei 572 nm mit einer Extinktion von 0,476 OD und im Vergleich dazu bei einer Nickelionen-Konzentration von 50mg/l zum gleichen Zeitpunkt bei 636 nm und einer Extinktion von 0,356 OD (siehe Tab. 21 i.A.). Optisch unterschieden sich die Lösungen mit Nickel durch ihren bläulichen Farbton von der nickelfreien, violetten MTT-Formazan-Lösung.



| Lösung      | Extinktion bei |                  |
|-------------|----------------|------------------|
|             | 570 nm         | $\lambda_{\max}$ |
| ohne Nickel | 0,319 OD       | 0,319 OD         |
| 2 mg/l Ni   | 0,283 OD       | 0,283 OD         |
| 5 mg/l Ni   | 0,174 OD       | 0,174 OD         |
| 10 mg/l Ni  | 0,213 OD       | 0,232 OD         |
| 50 mg/l Ni  | 0,216 OD       | 0,273 OD         |

Abb. 7: MTT mit Diaphorase in Anwesenheit von Nickelionen, Vergleich der Nickelkonzentrationen untereinander zum Zeitpunkt  $t=60$  min. 570 nm kennzeichnet das Absorptionsmaximum des MTT-Formazans in einer nickelfreien Lösung (links). Übersicht der Extinktionen der Lösungen mit MTT bei 570 nm und dem jeweiligen Absorptionsmaximum  $\lambda_{\max}$  (rechts).

Analog zu den Versuchen mit Nickel wurde MTT in Anwesenheit von Kupferionen untersucht. Hier lagen die Konzentrationen bei 0,2 mg/l, 0,4 mg/l, 0,5 mg/l und 1,0 mg/l. Zunächst wurden die gleichen Konzentrationen wie bei den Versuchen mit Nickel gewählt, jedoch schien sich hier eine so schnelle Reaktion abzuspielen, dass sie mit den festgelegten Messzeitpunkten nicht festgehalten werden konnte (siehe Tab. 21 i.A. und Abb. 9). Die niedrigeren Konzentrationen wurden so gewählt, dass die Extinktionen mit den Versuchen mit Nickel vergleichbar waren (siehe Abb. 8). In diesem Versuch stellte sich ebenfalls heraus, dass sich das Absorptionsmaximum bei einer Lösung mit Kupferionen von der metallfreien Lösung unterschied. Bei einer Konzentration von 1,0 mg/l Kupferionen verschob sich das Absorptionsmaximum zum Zeitpunkt  $t=120$  min zu einer Wellenlänge von 610 nm bei einer Extinktion von 0,150 OD (siehe Tab. 21 i.A.).

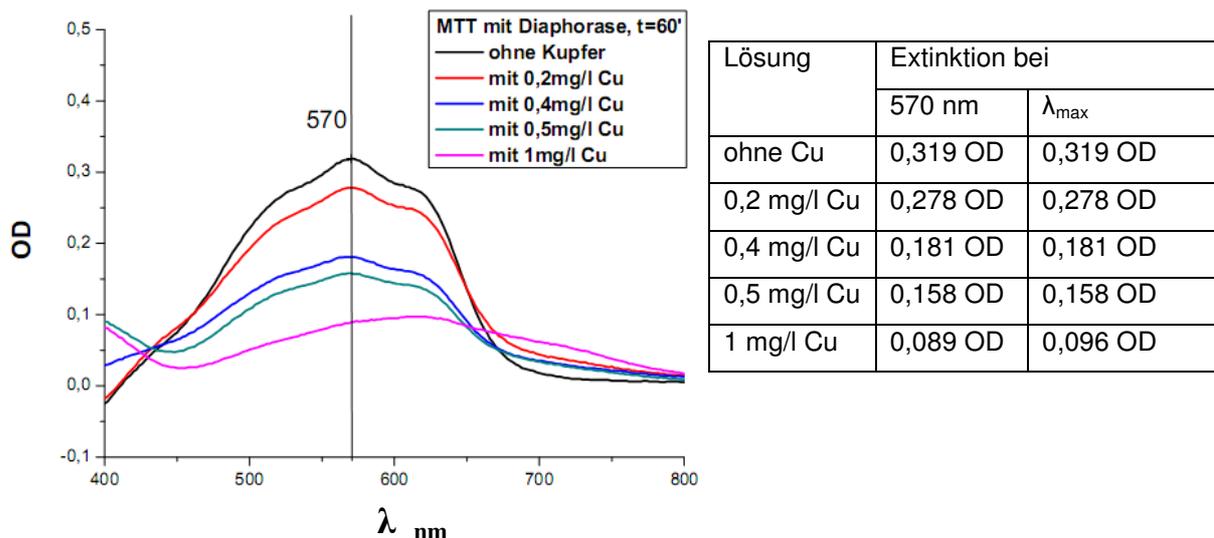


Abb. 8: MTT mit Diaphorase und Kupfer mit den Konzentrationen 0,2 mg/l, 0,4 mg/l, 0,5 mg/l und 1 mg/l zum Zeitpunkt  $t=60$  min. 570 nm kennzeichnet das Absorptionsmaximum der kupferfreien MTT-Lösung (links). Übersicht der Extinktionen der Lösungen mit MTT bei 570 nm und den jeweiligen Absorptionsmaxima  $\lambda_{\max}$  (rechts).

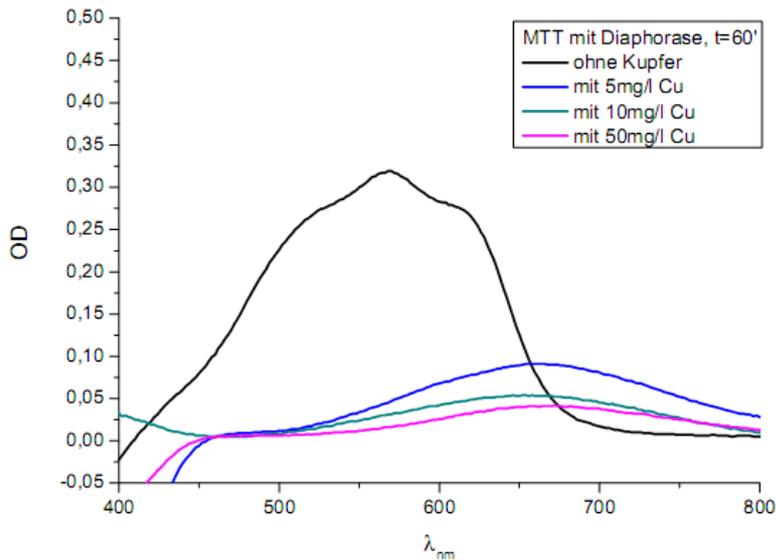


Abb. 9: MTT mit Diaphorase und Kupfer mit den Konzentrationen 5 mg/l, 10 mg/l und 50 mg/l.

Mit den gleichen Versuchslösungen wurde eine Kinetikstudie durchgeführt. Die Lösungen wurden hierbei zwei Stunden lang mit einem Intervall von 2,5 min bei einer Wellenlänge von 570 nm untersucht.

Die Kinetikstudie zeigt im Versuch mit Nickel und im Versuch mit Kupfer, dass die Extinktion mit Zunahme der Metallkonzentration abnimmt (siehe Abb. 10, Abb. 11). Diese Abnahme kann zum Teil aus der Verschiebung des Absorptionsmaximums, die man in den vorhergegangenen Messungen in einem Bereich von 250 nm bis 850 nm feststellen konnte, resultieren (siehe Abb. 7, Abb. 8).

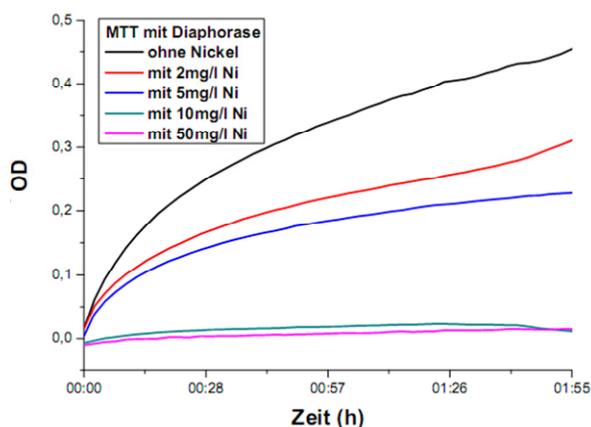


Abb. 10: Kinetikstudie mit MTT im zellfreien Versuch mit verschiedenen Nickelkonzentrationen.

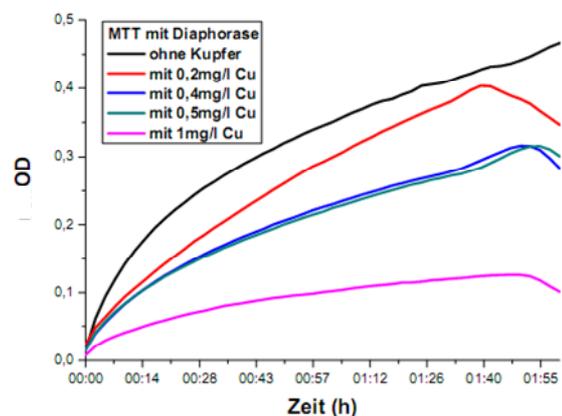


Abb. 11: Kinetikstudie mit MTT im zellfreien Versuch mit verschiedenen Kupferkonzentrationen.

## b) MTS und Diaphorase

MTS verhielt sich in den zellfreien Versuchen ähnlich wie das MTT. Das Absorptionsmaximum lag hier bei 492 nm und nach 120 Minuten bei 0,545 OD (siehe Abb. 49 i.A., Tab. 22 i.A.). Optisch veränderte sich die Lösung vom Zeitpunkt  $t=0$  min zum Zeitpunkt  $t=120$  min und nahm einen rötlichen Farbton an, während die Kontrolllösung ohne Diaphorase unverändert gelblich blieb. Der rote Farbton zeigte an, dass eine Reaktion stattgefunden hatte und sich MTS-Formazan gebildet hat.

Die Absorptionsmaxima der Lösungen, die Nickelionen enthielten, unterschieden sich deutlich von der nickelfreien Kontrolllösung und lagen in einem höheren Wellenlängenbereich. Die Kontrolllösung hatte zum Zeitpunkt  $t=120$  min ein Absorptionsmaximum bei einer Wellenlänge von 492 nm und einer Extinktion von 0,545 OD. Bei einer Nickelionen-Konzentration von 50 mg/l lag das Absorptionsmaximum bei 652 nm (siehe Tab. 22 i.A.). Die Lösung mit Nickelionen veränderte sich optisch und nahm einen bläulichen Farbton an, während die nickelfreie Kontrolllösung rötlich blieb.

Die Kinetikstudie mit MTS und Nickel zeigt eine Abnahme der Extinktion mit Zunahme der Metallsalzkonzentration (siehe Abb. 12). Wie auch im Versuch mit MTT kann die Abnahme der Extinktion aus der Verschiebung des Absorptionsmaximums in Anwesenheit von Nickel resultieren (siehe Abb. 12, Tab. 6).

In der Untersuchung mit MTS und Kupfer nahm die Extinktion bei 492 nm mit Zunahme der Kupferionen-Konzentration ab (siehe Abb. 50 i.A.). Eine deutliche Verschiebung des Absorptionsmaximums wie in dem vorhergehenden Versuch mit Nickel konnte nicht festgestellt werden. Die Kinetikstudie zeigt ebenfalls deutlich die Abnahme der Extinktion (siehe Abb. 51 i.A.). Die Lösungen mit Kupferionen veränderten sich optisch kaum. Der rötliche Farbton blieb erhalten, mit Zunahme der Kupfer-Konzentration verlor er an Intensität.

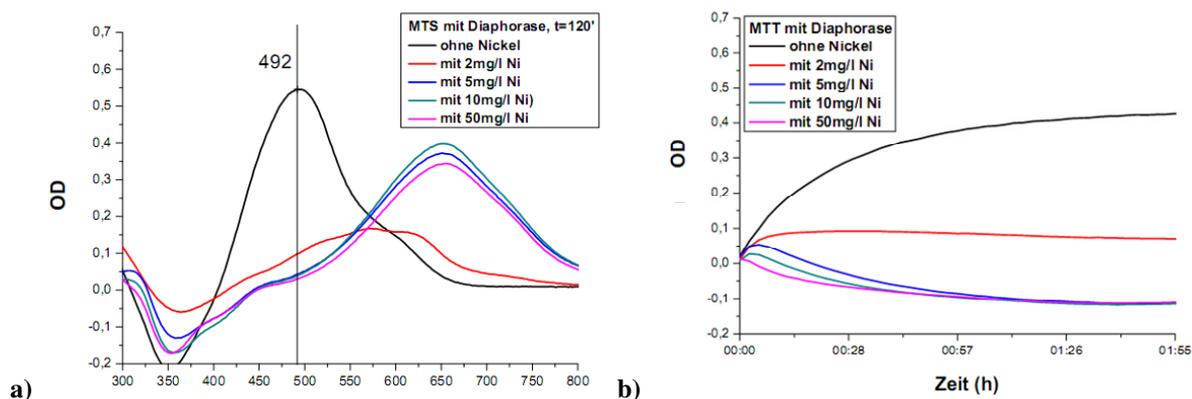


Abb. 12: a) Messung des Absorptionsverhaltens von MTS mit Nickel zum Zeitpunkt  $t= 120$  min b) Kinetikstudie mit MTS im zellfreien Versuch mit Nickel

| Lösung         | Extinktion bei |                  | Lösung          | Extinktion bei |                  |
|----------------|----------------|------------------|-----------------|----------------|------------------|
|                | 492 nm         | $\lambda_{\max}$ |                 | 492 nm         | $\lambda_{\max}$ |
| ohne Nickel    | 0,545 OD       | 0,545 OD         | ohne Kupfer     | 0,545 OD       | 0,545 OD         |
| mit 2 mg/l Ni  | 0,099 OD       | 0,167 OD         | mit 0,2 mg/l Cu | 0,267 OD       | 0,269 OD         |
| mit 5 mg/l Ni  | 0,043 OD       | 0,372 OD         | mit 0,4 mg/l Cu | 0,142 OD       | 0,142 OD         |
| mit 10 mg/l Ni | 0,039 OD       | 0,389 OD         | mit 0,5 mg/l Cu | 0,040 OD       | 0,041 OD         |
| mit 50 mg/l Ni | 0,030 OD       | 0,343 OD         | mit 1 mg/l Cu   | 0,004 OD       | 0,012 OD         |

Tab. 6: Extinktionen der Lösungen mit MTS bei 492 nm und den jeweiligen Absorptionsmaxima  $\lambda_{\max}$  (siehe Tab. 22 i.A.).

### c) WST-1 und Diaphorase

Die Untersuchung des Tetrazoliumsalses WST-1 ergab, dass dieses durch Diaphorase zum WST-1-Formazan reduziert wird, welches ein Absorptionsmaximum bei einer Wellenlänge von 440 nm  $\pm$  2 nm hat (siehe Abb. 53 i.A.). Im Versuch mit Diaphorase blieb das Absorptionsmaximum bei allen Messzeitpunkten ( $t=0$  min,  $t=60$  min und  $t=120$  min) unverändert, die Extinktion nahm dabei bis zum letzten Messzeitpunkt auf 0,500 OD zu (siehe Tab. 23 i.A.). Optisch ließ sich die Reaktion als Farbänderung der Lösung von einem fast farblosen zu einem deutlich gelben Farbton wahrnehmen. Die Kontrolllösung ohne Diaphorase blieb auch nach 120 Minuten farblos.

Im Versuch mit WST-1, Diaphorase und Nickelionen der bekannten Konzentrationen veränderte sich das Absorptionsmaximum im Vergleich zur nickelfreien Lösung nicht. Das Maximum lag bei einer Wellenlänge von 438 nm (siehe Tab. 23 i.A.).

Die Extinktion war jedoch im Vergleich zur nickelfreien Lösung geringer. Während die Extinktion z.B. in der nickelfreien Lösung zum Zeitpunkt  $t=120$  min bei 0,500 OD lag, betrug sie bei einer Konzentration von 50 mg/l Nickelionen zum gleichen Zeitpunkt 0,209 OD (siehe Abb. 13, Tab. 7).

In Anwesenheit von Kupferionen verhielt sich WST-1 ähnlich. Das Absorptionsmaximum blieb auch hier konstant, jedoch war die Extinktion vergleichsweise geringer (siehe Abb. 54 i.A.). Zum Zeitpunkt  $t=120$  min betrug sie für eine Kupferionenkonzentration von 1 mg/l 0,030 OD. Die Kinetikstudie lieferte dementsprechend mit Kupfer geringe Extinktionen (siehe Abb. 55 i.A.).

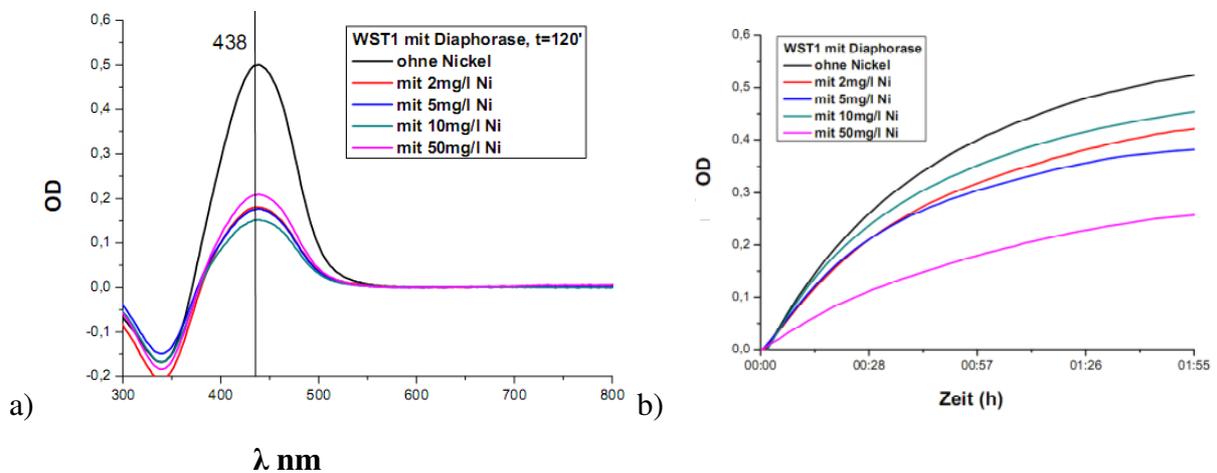


Abb. 13: a) Absorptionsspektren von WST-1 und WST-1 mit Nickel in verschiedenen Konzentrationen zum Zeitpunkt  $t=120$  min. 438 nm kennzeichnet das Absorptionsmaximum der metallfreien WST-1-Lösung. b) Kinetikstudie mit WST-1 und Nickel in verschiedenen Konzentrationen

| Lösung         | Extinktion bei 438 nm | Lösung          | Extinktion bei 438 nm |
|----------------|-----------------------|-----------------|-----------------------|
| ohne Nickel    | 0,500 OD              | ohne Kupfer     | 0,500 OD              |
| mit 2 mg/l Ni  | 0,180 OD              | mit 0,2 mg/l Cu | 0,065 OD              |
| mit 5 mg/l Ni  | 0,176 OD              | mit 0,5 mg/l Cu | 0,061 OD              |
| mit 10 mg/l Ni | 0,152 OD              | mit 0,4 mg/l Cu | 0,038 OD              |
| mit 50 mg/l Ni | 0,209 OD              | mit 1 mg/l Cu   | 0,030 OD              |

Tab. 7: Extinktionen der Lösungen mit WST-1 bei 438 nm.

In der Kinetikstudie mit WST-1 und Nickel bzw. Kupfer ist die Extinktion in Anwesenheit von Metallionen im Vergleich zur metallfreien Lösung geringer. Aus der vorhergegangenen Messung ist bekannt, dass sich das Absorptionsmaximum in Anwesenheit von Metallionen nicht verschiebt.

#### d) XTT und Diaphorase

Das Tetrazoliumsalz XTT wurde ebenfalls zunächst nur mit Diaphorase untersucht und zu den Zeitpunkten  $t=0$  min,  $t=60$  min und  $t=120$  min gemessen. Das farblose XTT reagierte zum gelben XTT-Formazan, welches ein Absorptionsmaximum bei 466 nm aufwies (siehe Abb. 56 i.A.). Die Extinktion lag zum Zeitpunkt  $t=120$  min bei 0,434 OD.

In Anwesenheit von Nickelionen veränderte sich das Absorptionsmaximum nicht (siehe Abb. 14), die Extinktion schwankte zwischen 0,354 OD und 0,444 OD (siehe Tab. 24 i.A.). Auch die Kinetikstudie zeigte nur geringe Unterschiede in Bezug auf die Extinktion bei unterschiedlichen Nickelkonzentrationen.

Im Versuch mit Kupfer veränderte sich das Absorptionsmaximum nicht und lag bei 464 nm (siehe Abb. 57 i.A.). Die Extinktion lag bei einer Konzentration von 0,2 mg/l Kupfer noch bei 0,325 OD und betrug bei einer Konzentration von 1mg/l Kupfer nur noch 0,057 OD (siehe Tab. 8). Auch in der Kinetikstudie war die Abnahme der Extinktion deutlich (siehe Abb. 58 i.A.).

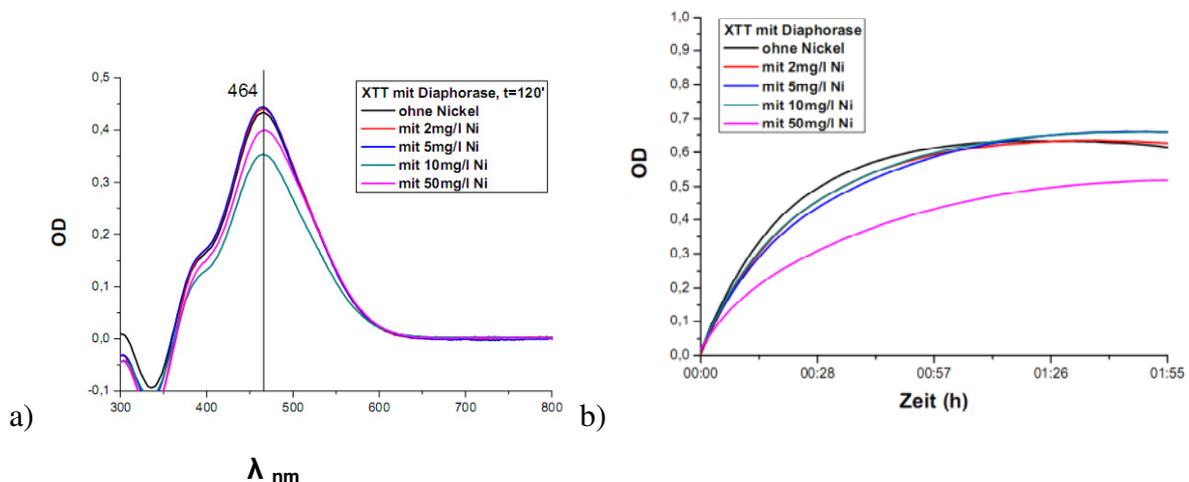


Abb. 14: a) Absorptionsspektren von XTT und XTT mit verschiedenen Nickelkonzentrationen zum Zeitpunkt  $t=120$  min. 464 nm kennzeichnet das Absorptionsmaximum der metallfreien XTT-Lösung b) Kinetikstudie mit XTT und verschiedenen Nickelkonzentrationen

| Lösung         | Extinktion bei 464 nm | Lösung          | Extinktion bei 464 nm |
|----------------|-----------------------|-----------------|-----------------------|
| ohne Nickel    | 0,434 OD              | ohne Kupfer     | 0,434 OD              |
| mit 2 mg/l Ni  | 0,440 OD              | mit 0,2 mg/l Cu | 0,325 OD              |
| mit 5 mg/l Ni  | 0,444 OD              | mit 0,5 mg/l Cu | 0,189 OD              |
| mit 10 mg/l Ni | 0,354 OD              | mit 0,4 mg/l Cu | 0,136 OD              |
| mit 50 mg/l Ni | 0,400 OD              | mit 1 mg/l Cu   | 0,057 OD              |

Tab. 8: Extinktionen der Lösungen mit XTT bei 464 nm.

Zusammenfassend ließ sich feststellen, dass die Tetrazoliumsalze MTT und MTS in Anwesenheit von Nickelionen ein verändertes Absorptionsverhalten aufwiesen. Die Veränderung machte sich bei MTT ab einer Konzentration von 10 mg/l Nickelionen bemerkbar. Bei MTS veränderte sich das Absorptionsverhalten ab einer Konzentration von 2 mg/l Nickelionen. Die Anwesenheit von Kupferionen führte in den Versuchen mit MTT und MTS zu einer Abnahme der Extinktion; eine deutliche Veränderung des Absorptionsmaximums konnte nur im Versuch mit MTT und Kupfer ab einer Konzentration von 1 mg/l Kupfer festgestellt werden. Im Vergleich zu der Verschiebung in Anwesenheit von Nickel wurde eine Veränderung im Versuch mit MTS und Kupfer nicht deutlich. Das Absorptionsverhalten der Tetrazoliumsalze WST-1 und XTT in Anwesenheit von Nickel- und Kupferionen blieb dagegen unverändert.

### ***3.3 Versuche mit humanen Fibroblasten***

Die verwendeten Tetrazoliumsalze wurden mit humanen Fibroblasten untersucht, die mit ihren eigenen Enzymen die Tetrazoliumsalze zu den jeweiligen Formazanen zu reduzieren vermögen.

#### **a) MTT und humane Fibroblasten**

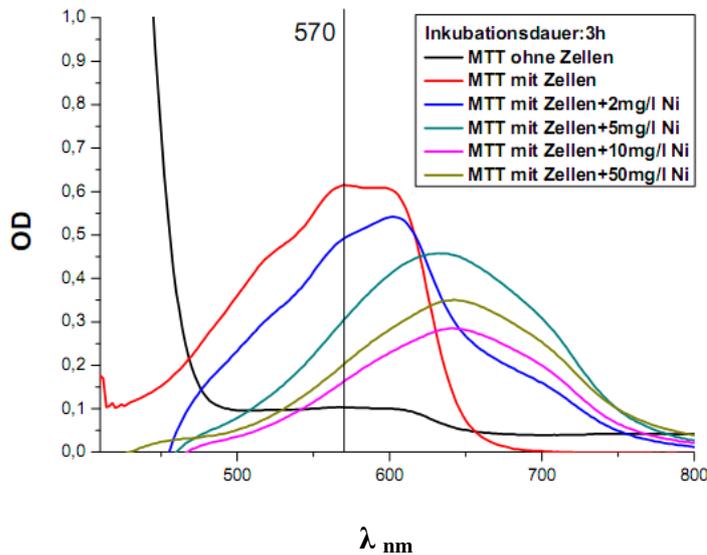
MTT wurde zunächst mit Zellen ohne Zusatz an Metallionen untersucht.

Das Absorptionsmaximum lag nach einer Inkubationsdauer von 3 Stunden bei einer Wellenlänge von 570 nm und die Extinktion betrug 0,615 OD (siehe Tab. 9).

Im nächsten Schritt wurden die Zellen mit MTT und Nickelionen untersucht. In diesem Versuch wurden die gleichen Konzentrationen wie im Versuch 3.2 mit Diaphorase angewendet. Das Absorptionsmaximum verschob sich bei Zusatz von Nickelionen zu höheren Wellenlängen und lag bei einer Nickelionen-Konzentration von 2 mg/l bei 602 nm und 0,542 OD sowie bei 50 mg/l Nickelionen bei 642 nm und 0,351 OD (siehe Tab. 9 und Abb. 15).

Die Lösungen, die Nickelionen enthielten, unterschieden sich optisch deutlich von dem violetten Farbton der Vergleichslösung, die nur Zellen und MTT enthält.

Je höher die Nickelionen-Konzentration war, desto stärker tendierte der Farbton zu blaugrün (siehe Abb. 17).

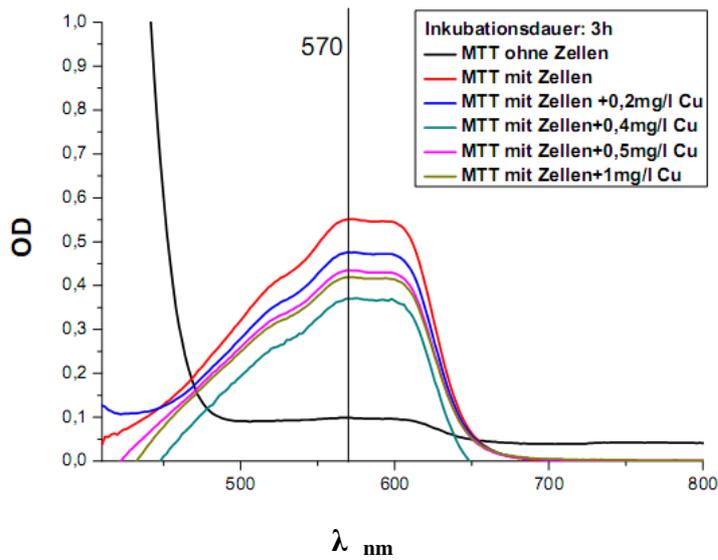


| Lösung     | Extinktion bei |                  |
|------------|----------------|------------------|
|            | 570 nm         | $\lambda_{\max}$ |
| ohne Ni    | 0,615 OD       | 0,615 OD         |
| 2 mg/l Ni  | 0,492 OD       | 0,542 OD         |
| 5 mg/l Ni  | 0,305 OD       | 0,458 OD         |
| 10 mg/l Ni | 0,163 OD       | 0,258 OD         |
| 50 mg/l Ni | 0,202 OD       | 0,351 OD         |

Abb. 15: Absorptionsspektren von MTT im Versuch mit humanen Fibroblasten und in Anwesenheit verschiedener Nickelkonzentrationen nach 3 Stunden Inkubationsdauer (links). Übersicht der Extinktionen der Lösungen mit MTT bei 570 nm und der jeweiligen Absorptionsmaxima  $\lambda_{\max}$  (rechts).

Im Anschluss erfolgte der Versuch mit Zellen, MTT und Kupfer. Bei der optischen Betrachtung fiel auf, dass sich die Lösungen mit Zellen, MTT und Kupferionen farblich nicht von dem violetten Ton der Vergleichslösung ohne Kupfer unterschieden (siehe Abb. 18).

Die photometrische Untersuchung ergab, dass hier das Absorptionsmaximum auch bei Zusatz der oben genannten Kupferionen-Konzentrationen bei einer Wellenlänge von 570 nm blieb und sich damit nicht von dem Absorptionsmaximum des MTT-Formazans ohne Zusatz von Metallionen unterschied (siehe Abb. 16). Die Extinktion nahm umso mehr ab je größer die Kupferionen-Konzentration wurde und lag z.B. bei einer 1 mg/l-Lösung bei 0,419 OD (siehe Tab. 10).



| Lösung      | Extinktion bei 570 nm |
|-------------|-----------------------|
| ohne Cu     | 0,615 OD              |
| 0,2 mg/l Cu | 0,476 OD              |
| 0,4 mg/l Cu | 0,371 OD              |
| 0,5 mg/l Cu | 0,434 OD              |
| 1 mg/l Cu   | 0,419 OD              |

Abb. 16: Absorptionsspektren von MTT mit humanen Fibroblasten und in Anwesenheit verschiedener Kupferkonzentrationen nach einer Inkubationsdauer von 3 Stunden (links). Übersicht der Extinktionen der Lösungen bei 570 nm (rechts).

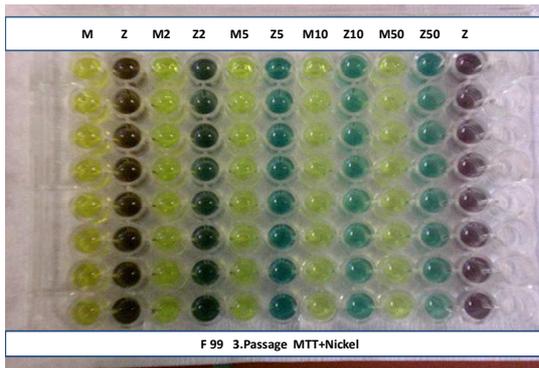


Abb. 17: 96-Well-Platte mit humanen Fibroblasten, MTT und Nickel nach 180 min Inkubation. (M=MED, Z=Zellen)

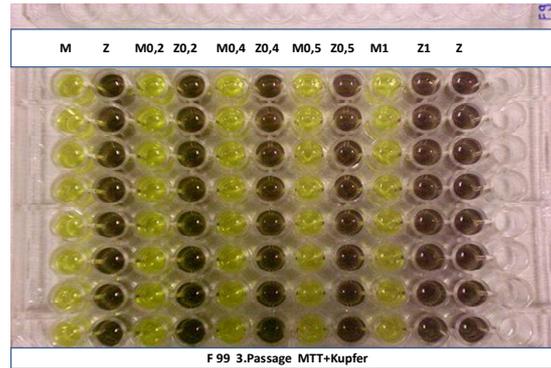


Abb. 18: 96-Well-Platte mit humanen Fibroblasten, MTT und Kupfer nach 180 min Inkubation. (M=MED, Z=Zellen)

| Lösung      | Zellen    | Zellen    | MED       | MED       |
|-------------|-----------|-----------|-----------|-----------|
|             | <i>nm</i> | <i>OD</i> | <i>nm</i> | <i>OD</i> |
| ohne Nickel | 570       | 0,615     | 568       | 0,104     |
| 2 mg/l Ni   | 602       | 0,542     | 606       | 0,104     |
| 5 mg/l Ni   | 632       | 0,458     | 614       | 0,098     |
| 10 mg/l Ni  | 640       | 0,258     | 622       | 0,095     |
| 50 mg/l Ni  | 642       | 0,351     | 636       | 0,086     |

Tab. 9: Absorptionsmaxima der Versuche mit MTT, Nickelionen und humanen Fibroblasten.

| Lösung      | Zellen    | Zellen    | MED       | MED       |
|-------------|-----------|-----------|-----------|-----------|
|             | <i>nm</i> | <i>OD</i> | <i>nm</i> | <i>OD</i> |
| ohne Kupfer | 568       | 0,550     | 568       | 0,099     |
| 0,2 mg/l Cu | 570       | 0,476     | 556       | 0,084     |
| 0,4 mg/l Cu | 570       | 0,371     | 596       | 0,139     |
| 0,5 mg/l Cu | 570       | 0,434     | 558       | 0,086     |
| 1 mg/l Cu   | 570       | 0,419     | 560       | 0,086     |

Tab. 10: Absorptionsmaxima der Versuche mit MTT, Kupferionen und humanen Fibroblasten.

### Ergebnisse der morphologischen Untersuchung im inversen Mikroskop

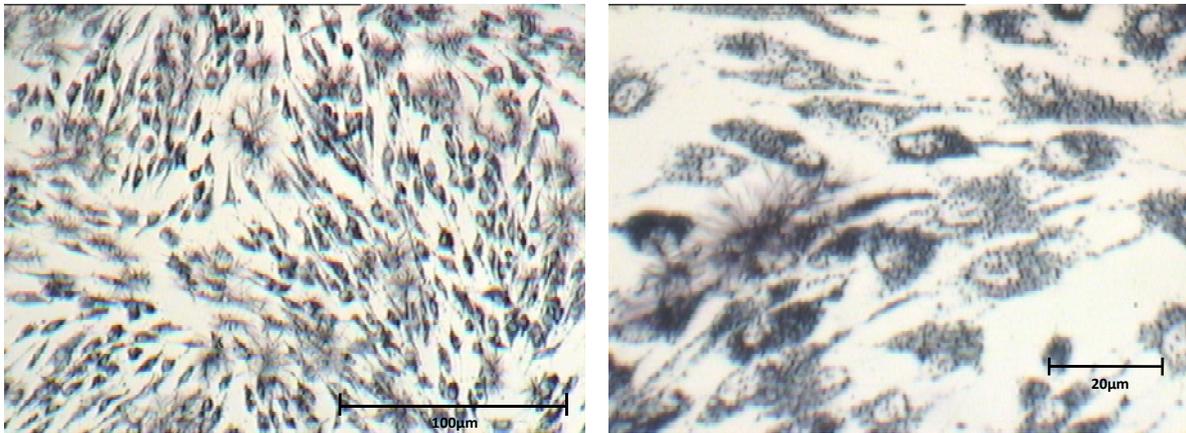


Abb. 19: a.NK\_4fache Vergrößerung

b. NK\_20fache Vergrößerung

Die Abbildungen 19 a. und b. zeigen einen einschichtigen Zellverband vitaler humaner Fibroblasten. In der 20fachen Vergrößerung kann man sehr gut die kristalline nadel-förmige Formation des MTT-Formazans erkennen. Die Zellen zeichnen sich durch große helle Kerne aus und bilden untereinander Kontakte durch Zellausläufer.

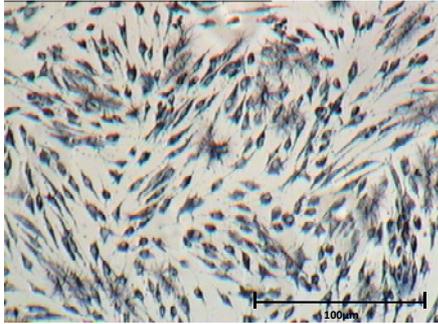
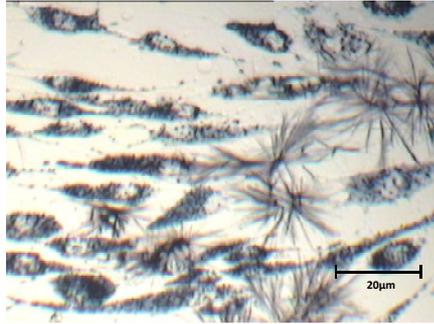


Abb. 20: a.2mg/l Ni\_4fach Vergrößerung



b.2mg/l Ni\_20fache Vergrößerung

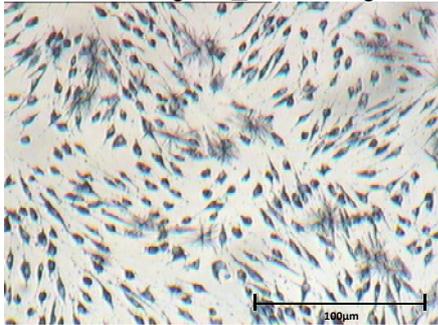
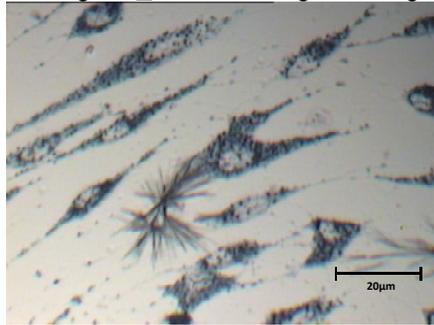


Abb. 21: a.5mg/l Ni\_4fache Vergrößerung



b.5mg/l Ni\_20fache Vergrößerung

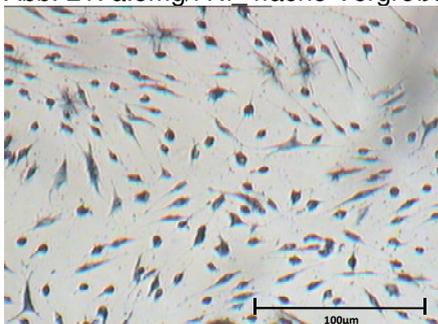


Abb. 22: a.10mg/l Ni\_4fache Vergrößerung



b.10mg/l Ni\_20fache Vergrößerung

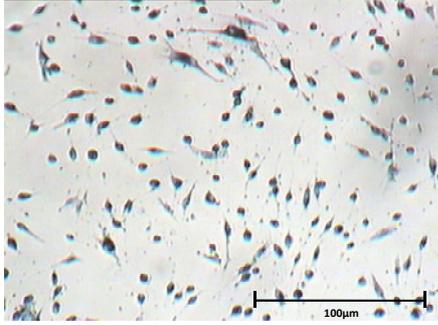
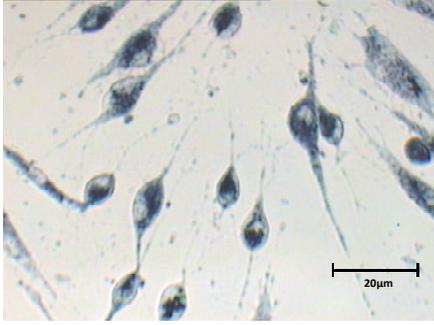


Abb. 23: a.50mg/l Ni\_4fache Vergrößerung



b.50mg/l Ni\_20fache Vergrößerung

Die Abbildungen 20 bis 23 zeigen das Verhalten humaner Fibroblasten in Anwesenheit von Nickel. Mit Zunahme der Nickelkonzentration löst sich der dichte Zellverband auf, die Zellen werden rundlicher und kleiner. Die Kerne werden pyknotisch. Die Zellausläufer sind rar und die Zellen haben kaum Kontakt untereinander.

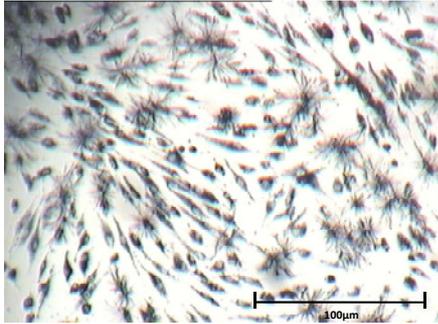
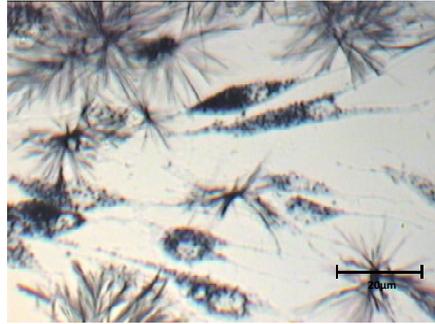


Abb. 24: a.0,2mg/l Cu\_4fache Vergrößerung



b.0,2mg/l Cu\_20fache Vergrößerung

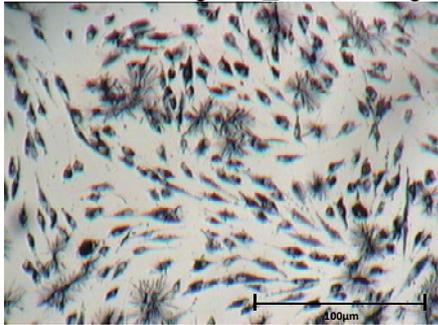
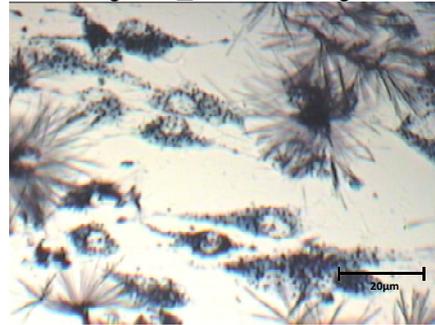


Abb. 25: a.0,4mg/l Cu\_4fache Vergrößerung



b.0,4mg/l Cu\_20fache Vergrößerung

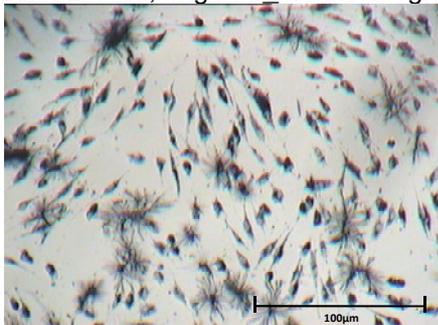
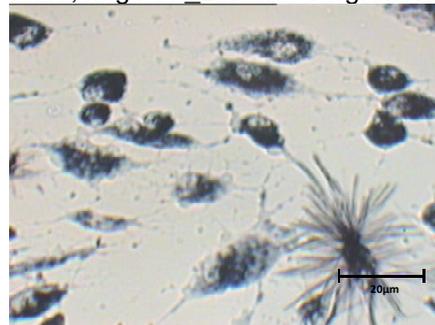


Abb. 26: a.0,5mg/l Cu\_4fache Vergrößerung



b.0,5mg/l Cu\_20fache Vergrößerung

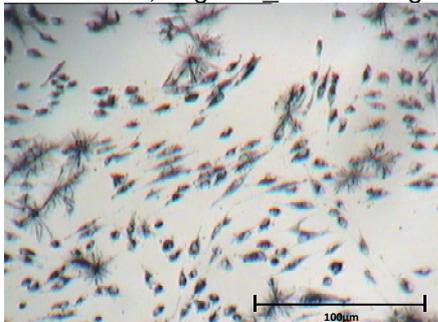


Abb. 27: a.1mg/l Cu-4fache Vergrößerung



b.1mg/l Cu\_20fache Vergrößerung

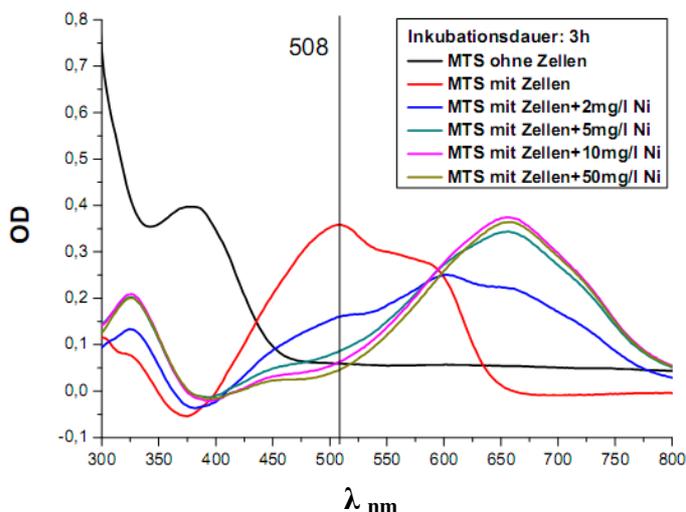
Die Abbildungen 24 bis 27 zeigen das Verhalten humaner Fibroblasten in Anwesenheit von Kupfer. Der Zellverband löst sich nicht im gleichen Maße auf wie in Anwesenheit von Nickel, jedoch werden hier auch geringere Konzentrationen verwendet. Einige Zellen weisen dennoch Zeichen des Zelltodes auf. Die Kerne werden pyknotisch, die Zellen werden rund und ziehen ihre Ausläufer ein.

## b) MTS und humane Fibroblasten

Die Versuche mit MTS und humanen Fibroblasten lieferten vergleichbare Ergebnisse wie mit MTT. In diesem Versuch mit Zellen und MTS ohne Zusatz an Metallionen konnte nach einer Inkubationsdauer von 3 Stunden ein Absorptionsmaximum bei 508 nm und 0,359 OD festgestellt werden. Die Lösung dominierte optisch mit einem rötlichen bis violetten Farbton (siehe Abb. 30).

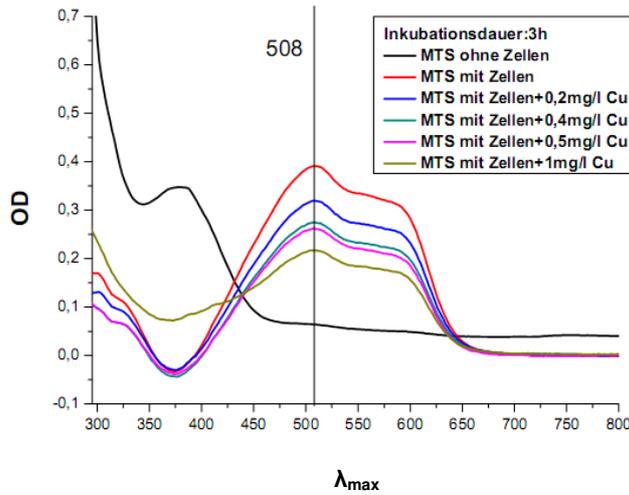
In Anwesenheit von Nickel verschoben sich die Absorptionsmaxima mit zunehmender Nickelionen-Konzentration zu höheren Werten (siehe Abb. 28 und Tab. 11). Bei einer Konzentration von 2 mg/l Nickelionen lag das Absorptionsmaximum bei 600 nm und 0,250 OD, während es bei 50 mg/l Nickelionen 656 nm und 0,364 OD betrug. Die Lösungen, die Nickelionen enthielten, nahmen einen bläulichen Farbton an (siehe Abb. 30).

Bei dem Versuch mit MTS und Kupfer veränderte sich das Absorptionsmaximum im Vergleich zur kupferfreien Lösung nicht und lag bei einer Wellenlänge von 506 nm +/- 2 nm (siehe Abb. 29). Die Extinktion sank jedoch mit Zunahme der Kupferionen-Konzentration (siehe Abb. 52 i.A.). Sie betrug bei 0,2 mg/l Kupferionen 0,319 OD und bei 1mg/l Kupferionen nur noch 0,217 OD (siehe Tab. 12). Der rötliche Farbton der Lösungen blieb auch in Anwesenheit von Kupfer erhalten, verlor aber an Intensität (siehe Abb. 31).



| Lösung     | Extinktion bei |                  |
|------------|----------------|------------------|
|            | 508 nm         | $\lambda_{\max}$ |
| ohne Ni    | 0,359 OD       | 0,359 OD         |
| 2 mg/l Ni  | 0,160 OD       | 0,250 OD         |
| 5 mg/l Ni  | 0,086 OD       | 0,344 OD         |
| 10 mg/l Ni | 0,063 OD       | 0,374 OD         |
| 50 mg/l Ni | 0,045 OD       | 0,364 OD         |

Abb. 28: Absorptionsspektren von MTS im Versuch mit humanen Fibroblasten und in Anwesenheit verschiedener Nickelkonzentrationen nach einer Inkubationsdauer von 3 Stunden (links). Übersicht der Extinktionen der Lösungen mit MTS bei 508 nm und den jeweiligen Absorptionsmaxima  $\lambda_{\max}$  (rechts).



| Lösung      | Extinktion bei 508 nm |
|-------------|-----------------------|
| ohne Cu     | 0,359 OD              |
| 0,2 mg/l Cu | 0,314 OD              |
| 0,4 mg/l Cu | 0,275 OD              |
| 0,5 mg/l Cu | 0,262 OD              |
| 1 mg/l Cu   | 0,217 OD              |

Abb. 29: Absorptionsspektren von MTS im Versuch mit humanen Fibroblasten und in Anwesenheit verschiedener Kupferkonzentrationen nach einer Inkubationsdauer von 3 Stunden (links) . Übersicht der Extinktionen der Lösungen mit MTS bei 508 nm (rechts).

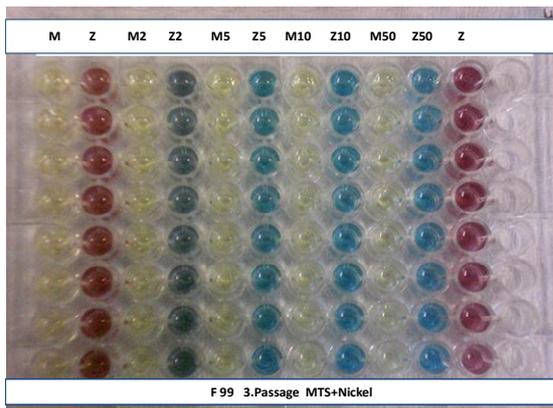


Abb. 30: 96-Well-Platte mit humanen Fibroblasten, MTS und Nickel, t=180' (M=MED, Z=Zellen)

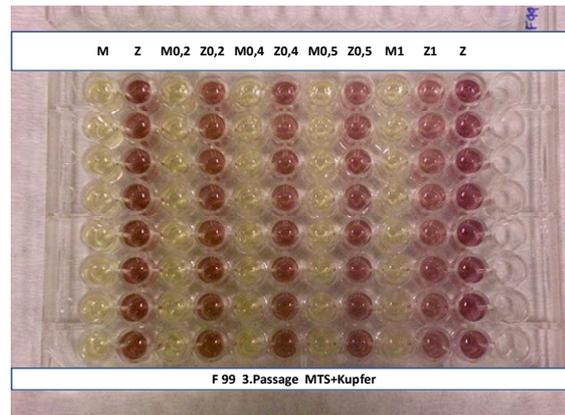


Abb. 31: 96-Well-Platte mit humanen Fibroblasten, MTS und Kupfer, t=180' (M=MED, Z=Zellen)

| Lösung      | Zellen    | Zellen    | MED       | MED       |
|-------------|-----------|-----------|-----------|-----------|
|             | <i>nm</i> | <i>OD</i> | <i>nm</i> | <i>OD</i> |
| ohne Nickel | 508       | 0,359     | 510       | 0,068     |
| 2 mg/l Ni   | 600       | 0,250     | 600       | 0,054     |
| 5 mg/l Ni   | 656       | 0,344     | 658       | 0,049     |
| 10 mg/l Ni  | 654       | 0,374     | 632       | 0,065     |
| 50 mg/l Ni  | 656       | 0,364     | 634       | 0,068     |

Tab. 11: Absorptionsmaxima der Versuche mit MTS, Nickelionen und humanen Fibroblasten.

| Lösung      | Zellen    | Zellen    | MED       | MED       |
|-------------|-----------|-----------|-----------|-----------|
|             | <i>nm</i> | <i>OD</i> | <i>nm</i> | <i>OD</i> |
| ohne Kupfer | 508       | 0,359     | 504       | 0,071     |
| 0,2 mg/l Cu | 506       | 0,319     | 508       | 0,066     |
| 0,4 mg/l Cu | 508       | 0,275     | 502       | 0,066     |
| 0,5 mg/l Cu | 506       | 0,262     | 504       | 0,064     |
| 1 mg/l Cu   | 504       | 0,217     | 504       | 0,056     |

Tab. 12: Absorptionsmaxima der Versuche mit MTS, Kupferionen und humanen Fibroblasten.

### c) WST-1 und humane Fibroblasten

Im Versuch mit WST-1 und humanen Fibroblasten ergab sich ein Absorptionsmaximum von 438 nm mit einer Extinktion von 0,227 OD nach einer Inkubationszeit von 3 Stunden. Bei Zugabe der verschiedenen Nickelionenkonzentrationen änderte sich das Absorptionsmaximum im Vergleich zur metallfreien Lösung nicht (siehe Abb. 32), auch die Extinktion veränderte sich kaum bis zu einer Konzentration von 50 mg/l Nickelionen, hier betrug sie 0,177 OD (siehe Tab. 13).

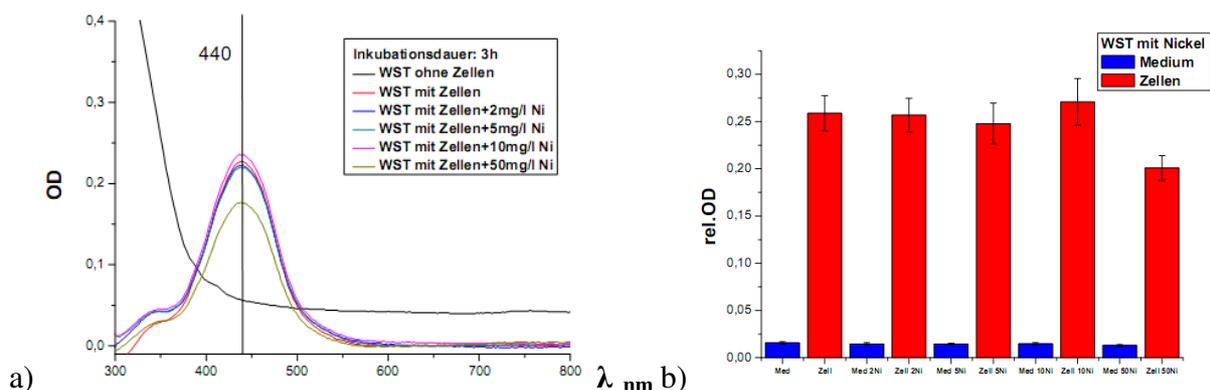


Abb. 32: a) Absorptionsspektren von WST-1 im Versuch mit humanen Fibroblasten und in Anwesenheit verschiedener Nickelkonzentrationen nach einer Inkubationsdauer von 3 Stunden b) zugehöriges Säulendiagramm mit der relativen OD bei  $\lambda_{\max} = 440$  nm.

Ähnliche Ergebnisse lieferte der Versuch mit Kupferionen. Das Absorptionsmaximum veränderte sich nicht (siehe Abb. 33), die Extinktion nahm mit Zunahme der Konzentration an Kupferionen ab und lag bei 1 mg/l Kupferionen bei 0,149 OD (siehe Tab. 14).

Der Farbton der Versuchslösung veränderte sich optisch im Vergleich zur metallfreien Lösung nicht und blieb gelb (siehe Abb. 34).

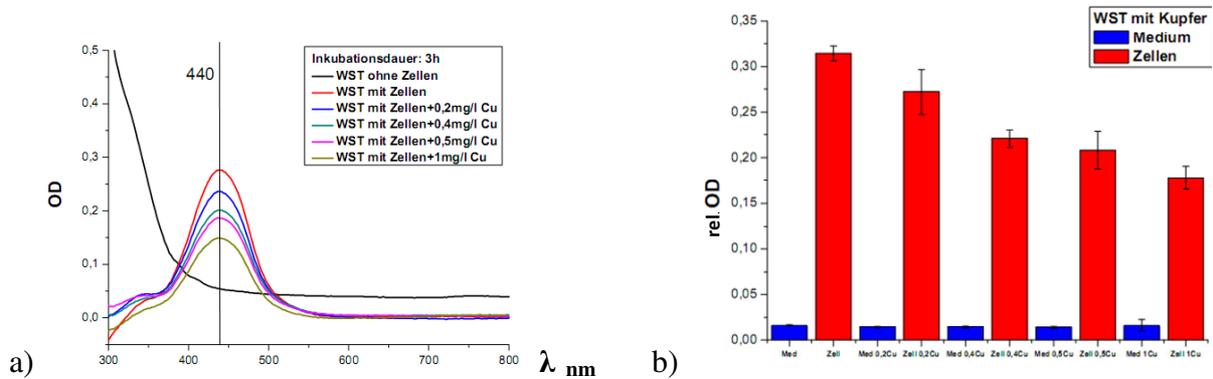


Abb. 33: a) Absorptionsspektren von WST-1 im Versuch mit humanen Fibroblasten und in Anwesenheit unterschiedlicher Kupferkonzentrationen nach einer Inkubationsdauer von 3 Stunden b) zugehöriges Säulendiagramm mit der relativen OD bei  $\lambda_{\max} = 440$  nm.

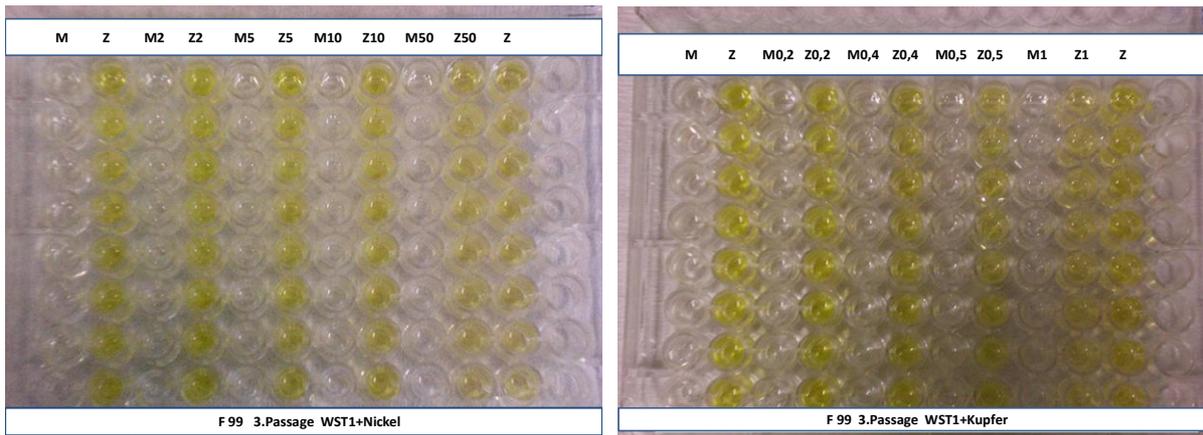


Abb. 34: 96-Well-Platte mit humanen Fibroblasten, WST-1 und Nickel (links) bzw. Kupfer (rechts) nach 180 min Inkubation. (M=MED, Z=Zellen)

| Lösung      | Zellen    | Zellen    | MED       | MED       |
|-------------|-----------|-----------|-----------|-----------|
|             | <i>nm</i> | <i>OD</i> | <i>nm</i> | <i>OD</i> |
| ohne Nickel | 438       | 0,227     | 434       | 0,058     |
| 2 mg/l Ni   | 440       | 0,223     | 434       | 0,054     |
| 5 mg/l Ni   | 438       | 0,222     | 434       | 0,055     |
| 10 mg/l Ni  | 440       | 0,236     | 434       | 0,058     |
| 50 mg/l Ni  | 438       | 0,177     | 438       | 0,052     |

Tab. 13: Absorptionsmaxima der Versuche mit WST-1, Nickelionen und humanen Fibroblasten.

| Lösung      | Zellen    | Zellen    | MED       | MED       |
|-------------|-----------|-----------|-----------|-----------|
|             | <i>nm</i> | <i>OD</i> | <i>nm</i> | <i>OD</i> |
| ohne Kupfer | 438       | 0,276     | 436       | 0,055     |
| 0,2 mg/l Cu | 436       | 0,236     | 432       | 0,054     |
| 0,4 mg/l Cu | 436       | 0,201     | 434       | 0,054     |
| 0,5 mg/l Cu | 436       | 0,187     | 432       | 0,053     |
| 1 mg/l Cu   | 436       | 0,149     | 438       | 0,052     |

Tab. 14: Absorptionsmaxima der Versuche mit WST-1, Kupferionen und humanen Fibroblasten.

#### d) XTT und humane Fibroblasten

XTT lieferte zusammen mit humanen Fibroblasten in einer metallfreien Lösung ein Absorptionsmaximum von 470 nm +/-2 nm mit einer Extinktion von 0,194 OD.

Die Zugabe von Nickelionen verschiedener Konzentrationen zu den Zellen mit dem XTT veränderte das Absorptionsmaximum nicht (siehe Abb. 35). Die Extinktion sank mit Zunahme der Nickelionenkonzentration (siehe Abb. 59 i.A.). Sie lag bei einer Konzentration von 2 mg/l Nickelionen bei 0,156 OD und bei 50 mg/l Nickelionen nur noch bei 0,001 OD (siehe Tab. 15).

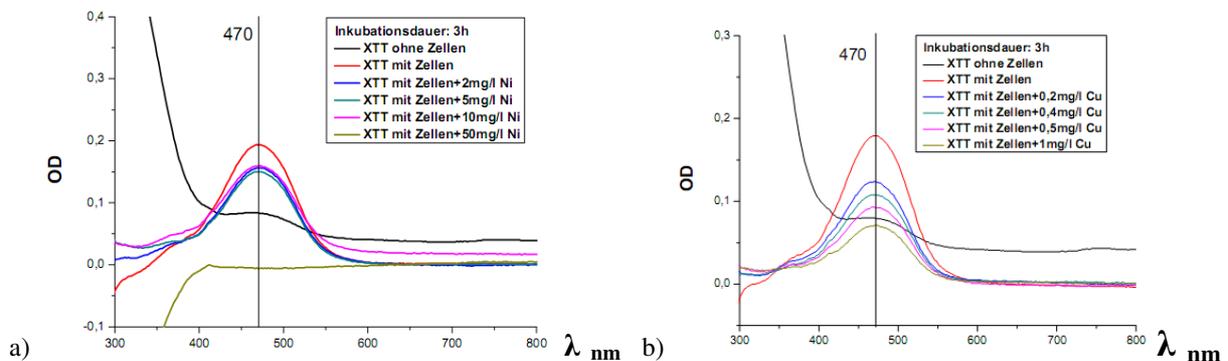


Abb. 35: a) Absorptionsspektren von XTT im Versuch mit humanen Fibroblasten und in Anwesenheit verschiedener Nickelkonzentrationen und b) Absorptionsspektren von XTT im Versuch mit humanen Fibroblasten und in Anwesenheit Kupferkonzentrationen nach einer Inkubationsdauer von 3 Stunden.

Der Versuch mit Kupferionen und humanen Fibroblasten lieferte ähnliche Ergebnisse. Das Absorptionsmaximum blieb unverändert bei 470 nm +/- 2 nm. Die Extinktion sank auf 0,071 OD bei einer Konzentration von 1mg/l Kupferionen (siehe Tab. 16, Abb. 60 i.A.). In Anwesenheit von Metallionen zeigte sich die Lösung auch optisch unverändert und behielt den gelben Farbton.

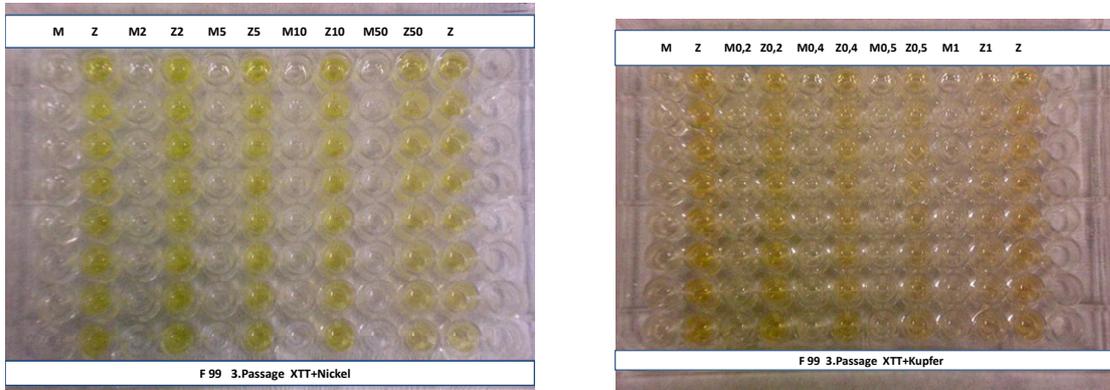


Abb. 36: 96-Well-Platte mit humanen Fibroblasten, XTT und Nickel (links) und Kupfer (rechts) nach 180 min Inkubation. (M=MED, Z=Zellen)

| Lösung      | Zellen    | Zellen    | MED       | MED       |
|-------------|-----------|-----------|-----------|-----------|
|             | <i>nm</i> | <i>OD</i> | <i>nm</i> | <i>OD</i> |
| ohne Nickel | 472       | 0,194     | 468       | 0,084     |
| 2 mg/l Ni   | 468       | 0,156     | 468       | 0,079     |
| 5 mg/l Ni   | 466       | 0,150     | 468       | 0,077     |
| 10 mg/l Ni  | 472       | 0,160     | 464       | 0,076     |
| 50 mg/l Ni  | 468       | 0,001     | 460       | 0,079     |

Tab. 15: Absorptionsmaxima der Versuche mit XTT, Nickelionen und humanen Fibroblasten.

| Lösung      | Zellen    | Zellen    | MED       | MED       |
|-------------|-----------|-----------|-----------|-----------|
|             | <i>nm</i> | <i>OD</i> | <i>nm</i> | <i>OD</i> |
| ohne Kupfer | 468       | 0,179     | 466       | 0,080     |
| 0,2 mg/l Cu | 470       | 0,124     | 468       | 0,075     |
| 0,4 mg/l Cu | 466       | 0,108     | 464       | 0,071     |
| 0,5 mg/l Cu | 466       | 0,093     | 468       | 0,072     |
| 1 mg/l Cu   | 470       | 0,071     | 466       | 0,073     |

Tab. 16: Absorptionsmaxima der Versuche mit XTT, Kupferionen und humanen Fibroblasten.

Zusammenfassend lässt sich sagen, dass die Versuche mit humanen Fibroblasten ähnliche Ergebnisse wie die Versuche mit zellfreien Systemen liefern. Die Tetrazoliumsalze MTT und MTS verhielten sich vergleichbar und hatten ein verändertes Absorptionsverhalten in Anwesenheit von Nickelionen. In Anwesenheit von Kupferionen kam es nur zu einer Abnahme der Extinktion ohne eine Veränderung des Absorptionsmaximums. Auf das Absorptionsverhalten der Tetrazoliumsalze WST-1 und XTT im Versuch mit humanen Fibroblasten zeigten weder Nickel- noch Kupferionen einen Einfluss.

### ***3.4 Versuche zur Charakterisierung von MTT-Formazan in Anwesenheit von Nickel***

Der Versuch mit MTT-Formazan und Nickelionen wurde durchgeführt um eine mögliche Komplexbildung besser untersuchen zu können. MTT-Formazan und Nickelionen lagen bei diesem Versuch im Verhältnis eins zu eins vor.

Das Absorptionsspektrum des MTT-Formazans zeigt ein Absorptionsmaximum bei 572 nm (siehe Tab. 25 i.A.). Die Kurve weist außerdem drei weitere charakteristische Merkmale auf: ein weiteres Absorptionsmaximum bei 308 nm und zwei Schultern in der Kurve bei 513 nm und 623 nm (siehe Abb. 38). In Anwesenheit von Nickelionen verändert sich das Absorptionsspektrum deutlich. Zum Zeitpunkt  $t=180$  min verbreitert sich das Maximum bei 308 nm. Die Schulter im Bereich von 513 nm ist kaum noch zu sehen, auch das Maximum bei 572 nm wird kleiner. Demgegenüber dominiert ein Absorptionsmaximum bei 618 nm. Es fällt zudem auf, dass sich im Bereich bei 403 nm und bei 720 nm neue Erhebungen andeuten (siehe Abb. 40).

Farblich lassen sich die Lösungen schon mit dem bloßen Auge unterscheiden.

Die MTT-Formazan Lösung erscheint in der 96-Well-Platte blass violett (siehe Abb. 37 a)), während der Ansatz mit Nickelionen deutlich blau geworden ist, im Reaktionsgefäß ist der farbliche Unterschied noch deutlicher (siehe Abb. 37 b)).

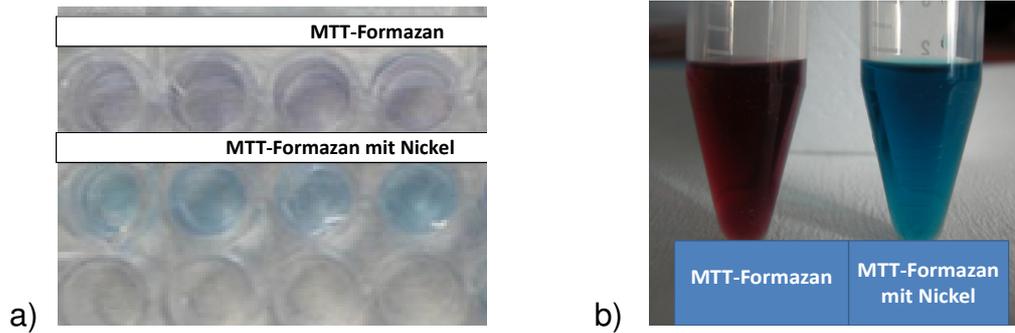


Abb. 37: a) Ausschnitt einer 96-Well-Platte b) Reaktionsröhrchen

Im Verlauf des Versuches fällt auf, dass sich das Absorptionsspektrum mit zunehmender Reaktionszeit mit dem Maximum zu größeren Wellenlängen verlagert und seine Gestalt verändert.

Mit einer nicht-linearen Kurvenanpassung nach der Lorentzfunktion lassen sich die Veränderungen des Absorptionsspektrums deutlich machen. Die nicht-lineare Kurvenanpassung lässt darauf schließen, dass sich das Absorptionsspektrum des reinen MTT-Formazans aus vier einzelnen Absorptionsbanden zusammensetzen lässt. Die Maxima dieser Absorptionsbanden liegen bei 308 nm, 513 nm, 572 nm und 623 nm. Am auffälligsten sind die beiden Banden bei 308 nm mit einer Amplitude von 115 und bei 572 nm mit einer Amplitude von 86, während die Amplitude der Schulter bei 513 nm 44 und bei 623 nm 27 beträgt.

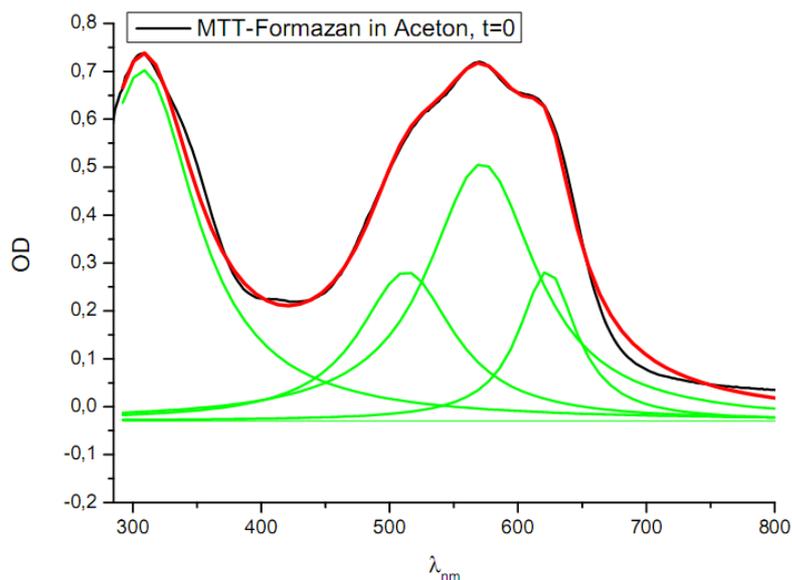


Abb. 38: Absorptionsbande des MTT-Formazans gelöst in Aceton (1mg/ml) zum Zeitpunkt t=0. Die grünen Banden stellen die einzelnen Kurven dar, aus denen das rote Gesamtspektrum zusammengesetzt werden kann.

Um das Absorptionsspektrum der Lösung mit MTT-Formazan und Nickel zu erstellen benötigt man fünf weitere Absorptionsbande. Von diesen fünf sind drei als bathochrom (siehe Abb. 39) wandernde Bande der Ausgangsbande des reinen MTT-Formazans zu verstehen und zwei als neu entstandene und zu einer anderen Struktur zugehörige Absorptionsbande.

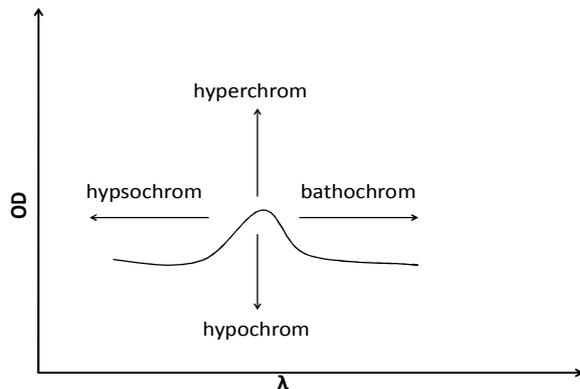


Abb. 39: Effekte der Absorption bei Elektronenübergängen.

Die vier Absorptionsbande des MTT-Formazans sind auch zum Zeitpunkt  $t=180$  min noch in der Gesamtkurve erhalten, aber sie betragen nur noch einen Bruchteil der Ausgangsextinktion. Die Amplitude der Bande bei 308 nm liegt nun bei 54,45 und der Bande bei 572 nm bei 40,91. Alle vier Bande, die schon ursprünglich in der Absorptionskurve des reinen MTT-Formazans vorhanden waren, lassen sich in der Lösung mit Nickel wiederfinden und haben alle 47 % der jeweiligen Ausgangsamplitude. Die zwei neuen Absorptionsbande haben sich stark vergrößert und die Amplituden liegen bei 403 nm bei 14 und bei 730 nm bei 40. In der Tabelle 17 sind die zugehörigen Amplituden und Halbwertsbreiten der Banden aufgelistet. Zusammenfassend lässt sich sagen, dass die Auswertung mit einer nicht-linearen Kurvenanpassung nach der Lorentzfunktion das Entstehen einer Verbindung zwischen Nickel und MTT-Formazan durch das Auftreten neuer Absorptionsbande deutlich macht.

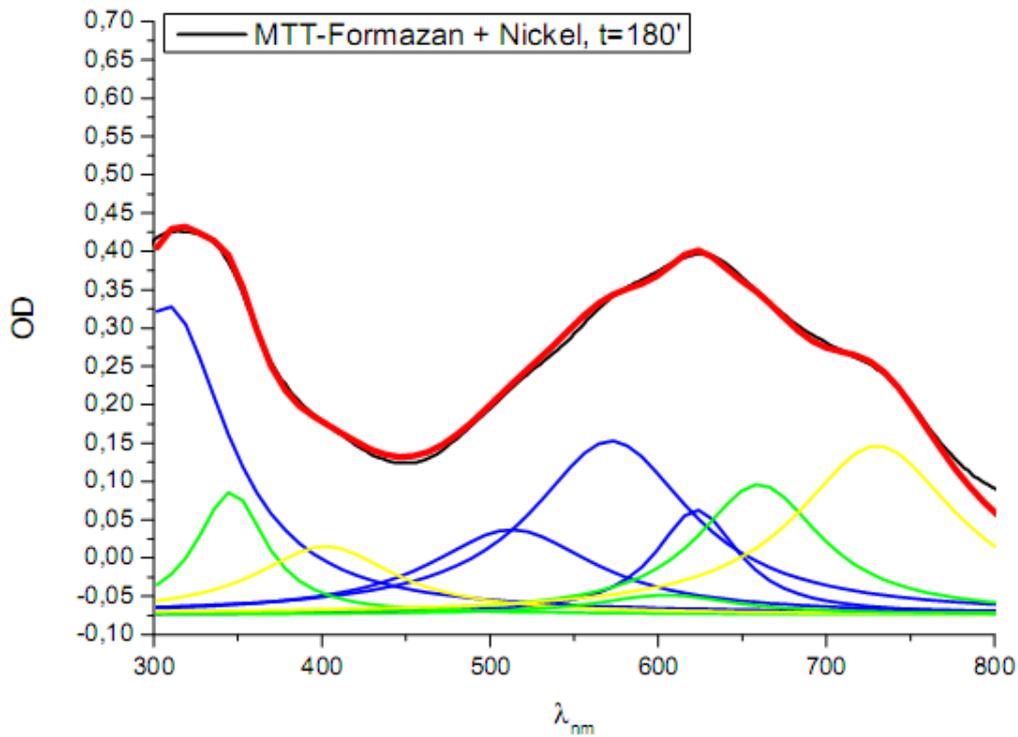


Abb. 40: Absorptionsbande des MTT-Formazans gelöst in Aceton (1 mg/ml) in Anwesenheit von Nickel zum Zeitpunkt t=180 min. Die blauen, grünen und gelben Bande lassen sich zu der roten Hauptkurve zusammenfügen.

|              |   | Peak1<br>308<br>nm | Peak2<br>513<br>Nm | Peak3<br>572<br>nm | Peak4<br>623<br>nm | Peak1'<br>     | Peak3'<br>   | Peak4'<br>   | Peak5<br>403<br>nm | Peak 6<br>730<br>nm |
|--------------|---|--------------------|--------------------|--------------------|--------------------|----------------|--------------|--------------|--------------------|---------------------|
| MF<br>t0     | H | 100                | 90                 | 102                | 55                 | -              | -            | -            | -                  | -                   |
|              | A | 115                | 44                 | 86                 | 27                 | -              | -            | -            | -                  | -                   |
| MFNi<br>t0   | H | 100                | 87                 | 102                | 50                 | 340nm<br>66    | 574nm<br>75  | 632nm<br>100 | 121                | 100                 |
|              | A | 93                 | 35,6               | 69,9               | 21,97              | 6,5            | 3            | 8,5          | 3                  | 2,78                |
| MFNi<br>t60  | H | 101                | 104                | 107                | 55                 | 341nm<br>55    | 595nm<br>60  | 653nm<br>55  | 80                 | 127                 |
|              | A | 71,47              | 27,39              | 53,69              | 16,88              | 11,9           | 3,15         | 10,5         | 4,5                | 26,25               |
| MFNi<br>t120 | H | 95                 | 112                | 111                | 60                 | 343nm<br>60,77 | 607nm<br>87  | 654nm<br>63  | 96                 | 140                 |
|              | A | 61,41              | 23,53              | 46,13              | 14,51              | 12             | 3,8          | 11           | 8,4                | 38,85               |
| MFNi<br>t180 | H | 86<br>47 %         | 120<br>47 %        | 115<br>47 %        | 60<br>47 %         | 50             | 605nm<br>100 | 660nm<br>90  | 100                | 115,7               |
|              | A | 54,45              | 20,86              | 40,91              | 12,86              | 12,57          | 4            | 24           | 14                 | 40                  |

Tab. 17: Werte aus der nicht-linearen Kurvenanpassung für MTT-Formazan (MF), MTT-Formazan mit Nickel (MFNi) zu den Zeitpunkten t=0 min, t=60 min, t=120 min und t= 180 min. (H=Halbwertsbreite, A=Amplitude, Shift Peak X=Verschiebung des Peaks X(X=1,3 oder 4) des MTT-Formazans)

Die Lösungen mit MTT-Formazan, sowie MTT-Formazan und Nickel wurden für die Raman-Analyse in DMF gelöst. Zunächst erfolgte ein Vergleich der Raman-Spektren von DMF und DMF mit  $\text{NiSO}_4$ . Durch den direkten Vergleich ließ sich hierbei feststellen, dass sich die einzelnen Banden überlagerten und  $\text{NiSO}_4$  in Lösung keine zusätzlichen Peaks verursachte (siehe Abb. 41).

Im nächsten Schritt wurden die Raman-Spektren von DMF (siehe Abb. 42) und MTT-Formazan in DMF (siehe Abb. 43) verglichen. Die dem DMF zugehörigen Banden im Spektrum des MTT-Formazans konnten als solche charakterisiert werden, die übrigen Banden wurden dem MTT-Formazan zugeordnet. Es war somit bekannt, welche Banden dem MTT-Formazan allein zuzuordnen sind. Diese wurden anschließend mit dem Raman-Spektrum des MTT-Formazans mit Nickel verglichen (siehe Abb. 44, Abb. 45). Einige Banden waren zwar vergleichbar, hatten aber eine Verschiebung erfahren. Es tauchten außerdem neue Banden auf, die nur der MTT-Formazan-Nickel-Lösung zugeordnet werden konnten.

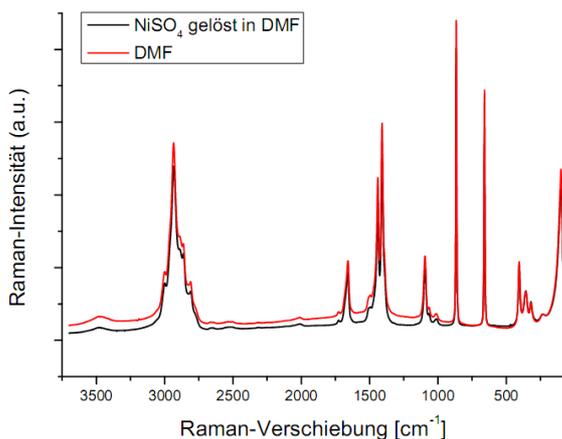


Abb. 41: Raman-Spektren des DMF und  $\text{NiSO}_4$  in DMF.

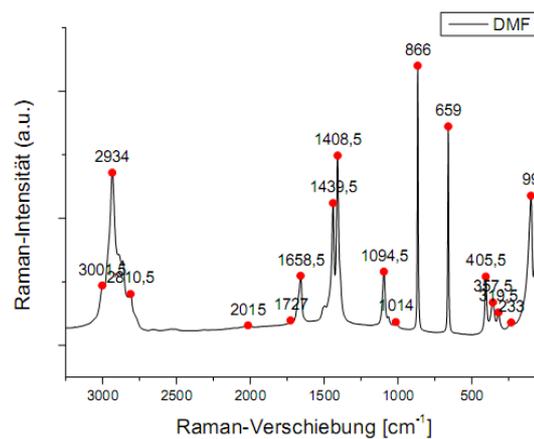


Abb. 42: Raman-Spektrum des DMF mit Markierung der einzelnen Banden.

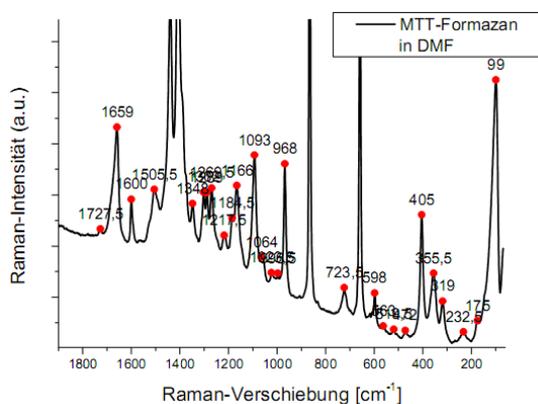


Abb. 43: Raman-Spektrum des MTT-Formazans in DMF mit Markierung der einzelnen Banden.

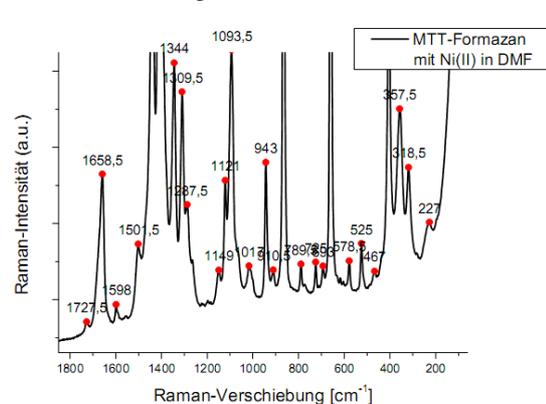


Abb. 44: Raman-Spektrum des MTT-Formazans mit Nickel in DMF mit Markierung der Banden.

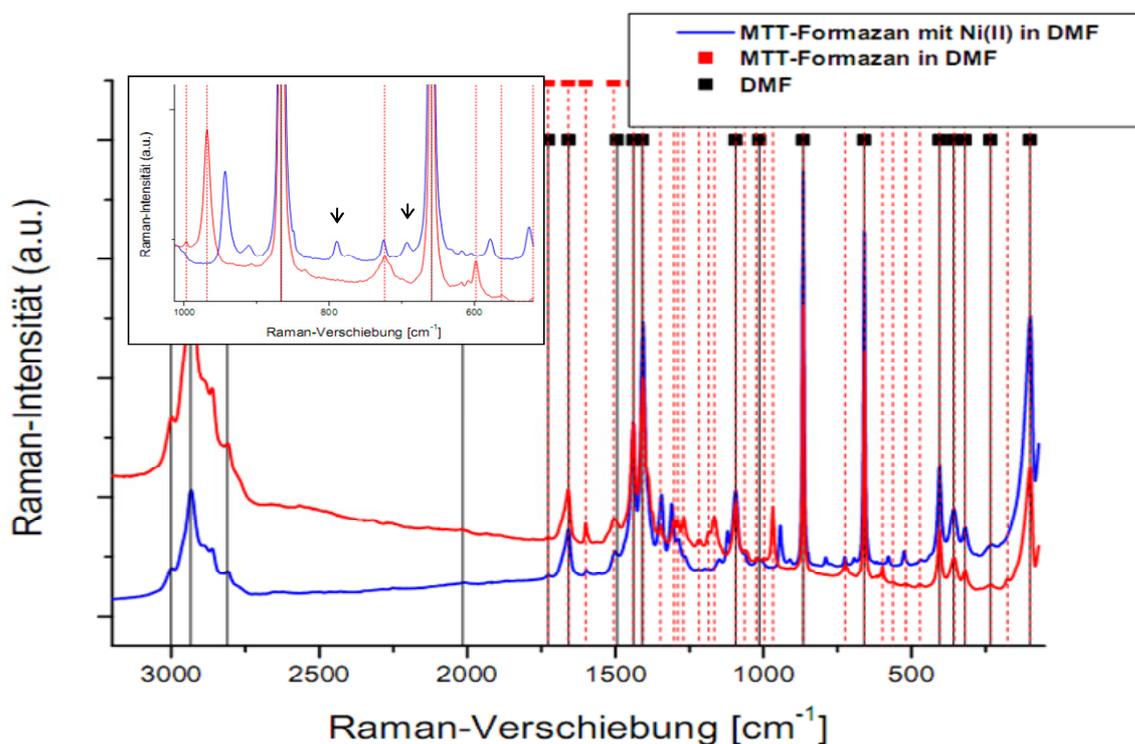


Abb. 45: Raman-Spektren des MTT-Formazans (rot) und des MTT-Formazans mit Nickel (blau). Die vertikalen Linien stellen die einzelnen Banden des DMF (schwarze Linien) und des MTT-Formazans (rote Linien) dar. Oben links deuten die Pfeile auf die neuen Banden, die nur in der MTT-Formazan-Nickel-Lösung auftauchen.

Charakteristische Banden im Raman-Spektrum für das MTT-Formazan finden sich bei  $598\text{ cm}^{-1}$ ,  $968\text{ cm}^{-1}$ ,  $1166\text{ cm}^{-1}$ ,  $1217\text{ cm}^{-1}$ ,  $1302\text{ cm}^{-1}$ ,  $1348\text{ cm}^{-1}$ ,  $1600\text{ cm}^{-1}$ .

Die Analyse des Raman-Spektrums des MTT-Formazans mit Nickel zeigt Banden, die zwar verschoben sind, sich aber denen des MTT-Formazans zuordnen lassen (siehe Tab. 18). Das Raman-Spektrum des MTT-Formazans mit Nickel liefert zudem zusätzliche Banden bei  $693\text{ cm}^{-1}$  und  $798\text{ cm}^{-1}$  (siehe Abb. 45). Die Raman-Analyse liefert ähnliche Ergebnisse wie die nicht-lineare Kurvenanpassung nach der Lorentzfunktion. Die neu entstandenen Banden lassen sich einer Verbindung zwischen Nickel- und MTT-Formazan-Molekülen zuordnen.

| <b>Banden des MTT-Formazans</b> | <b>Banden des MTT-Formazans mit Ni(II)</b> |
|---------------------------------|--|
| 598 cm <sup>-1</sup>            | 578,5 cm <sup>-1</sup>                     |
| 968 cm <sup>-1</sup>            | 943 cm <sup>-1</sup>                       |
| 1166 cm <sup>-1</sup>           | 1121 cm <sup>-1</sup>                      |
| 1217 cm <sup>-1</sup>           | 1149 cm <sup>-1</sup>                      |
| 1302 cm <sup>-1</sup>           | 1309 cm <sup>-1</sup>                      |
| 1600 cm <sup>-1</sup>           | 1598 cm <sup>-1</sup>                      |

Tab. 18: Banden des MTT-Formazans und zugehörige Banden des MTT-Formazans mit Nickel im Raman-Spektrum.

### ***3.5 Zusammenfassung der Resultate***

Im zellfreien Versuch ließ sich feststellen, dass die Zugabe von Nickelionen ab einer bestimmten Konzentration einen Einfluss auf das Absorptionsmaximum der Tetrazoliumsalze MTT und MTS hat. Die Zugabe von Kupferionen führte nur im zellfreien Versuch mit MTT zu einer Verschiebung des Absorptionsmaximums, im Versuch mit MTS kam es nur zu einer Abnahme der Extinktion in Anwesenheit von Kupfer. Die Absorptionsmaxima der Tetrazoliumsalze WST-1 und XTT wurden durch die Zugabe von Nickel- und Kupfer-Ionen nicht beeinflusst.

Die Versuche mit humanen Fibroblasten zeigten einen Einfluss auf das Absorptionsmaximum der Tetrazoliumsalze MTT und MTS bei Zugabe von Nickelionen. Die Zugabe von Kupferionen in den verwendeten Konzentrationen hatte keinen Einfluss auf das Absorptionsmaximum der genannten Tetrazoliumsalze, es kam jedoch zum Extinktionsabfall. Die Tetrazoliumsalze WST-1 und XTT zeigten weder im zellfreien Versuch noch im Versuch mit humanen Fibroblasten eine Veränderung der Absorptionsmaxima bei Zugabe von Nickel- oder Kupfer-Ionen.

Aus dem Versuch mit MTT-Formazan und Nickel geht deutlich hervor, dass das MTT-Formazan mit Nickelionen eine Reaktion eingeht. Die nicht-lineare Kurvenanpassung deutet darauf hin, dass eine neue Verbindung entsteht, deren Anteil an der Gesamtabsorption mit der Zeit zunimmt. Die Raman-Analyse liefert vergleichbare Ergebnisse, auch hier entstehen neue Banden in Anwesenheit von Nickel. Diese können einer neu entstehenden Verbindung zwischen den Formazanmolekülen und den Nickelionen zugeordnet werden.

## 4. Diskussion

Der MTT-Test wurde 1983 von Mosmann (31) beschrieben und ist seither eine beliebte, schnelle und preisgünstige Methode zum Nachweis von Zytotoxizität, Proliferation und Aktivität. Das Tetrazoliumsalz MTT wird von Enzymen zum farbigen Formazan reduziert und kann mittels einer photometrischen Untersuchung eine quantitative Aussage über die Anzahl vitaler Zellen liefern (31). Zahlreiche weitere Tetrazoliumsalze lassen sich in gleicher Weise für Zytotoxizitätstests verwenden (7).

Eine bekannte Eigenschaft der Formazane ist ihre Fähigkeit mit Metallionen Komplexe zu bilden (4), (22). Durch die Komplexierung verändert sich das Absorptionsverhalten des Formazanproduktes (4). Diese Eigenschaft kann die Aussagekraft von Zytotoxizitätsassays in Anwesenheit von Metallionen möglicherweise verändern.

Ziel dieser Arbeit war es das Verhalten von vier Tetrazoliumsalzen (MTT, MTS, WST-1 und XTT) in Anwesenheit von Nickel- und Kupferionen zu untersuchen und dabei vor allem durch Unterschiede in Bezug auf das Absorptionsverhalten die Anwendbarkeit in Zytotoxizitätsassays festzustellen. Die Tetrazoliumsalze wurden zunächst in einem zellfreien System unter Verwendung von Diaphorase und anschließend mit humanen Fibroblasten untersucht.

In den Vorversuchen wurden alle verwendeten Tetrazoliumsalze, alle verwendeten Nickel- und Kupferionen-Konzentrationen und alle beteiligten Stoffgruppen jeweils einzeln photometrisch untersucht. Ziel dieser Versuche war der Ausschluss einer Überlagerung mit den erwarteten Absorptionsmaxima der Formazane, die in den folgenden Versuchen entstehen würden. Die Absorptionsmaxima der verwendeten Tetrazoliumsalze waren aus der Literatur bekannt (8), (28) und konnten mit den eigenen Ergebnissen bestätigt werden (siehe Tab. 21-24 i.A.).

### a) MTT

Wie aus den Ergebnissen in Kapitel 3.2 a und 3.3 a deutlich wird, kann MTT sowohl im zellfreien System als auch in den Zellkulturversuchen in Anwesenheit

entsprechender Kofaktoren ( $\beta$ NADH) zu MTT-Formazan reduziert werden. Das entstandene MTT-Formazan hatte in beiden Testreihen ein Absorptionsmaximum von  $570 \pm 2$  nm. Die Zugabe von Nickel- und Kupferionen veränderte das Absorptionsspektrum deutlich.

Messungen des MTT mit Metallionen ohne Anwesenheit von Diaphorase wiesen dagegen keine Veränderungen des Absorptionsspektrums auf.

Es muss eine Reaktion zwischen dem entstandenen MTT-Formazan und den Metallionen stattgefunden haben. Diese Reaktion, die vermutlich zur Entstehung eines Chelatkomplexes führt, lässt sich zum einen als Änderung der Lösungsfarbe, zum anderen als verändertes Absorptionsspektrum erkennen (siehe Abb. 7).

Die Komplexbildung zwischen Schwermetallionen und Formazanverbindungen wurden schon von Kuhn und Jerchel 1941 beschrieben (25). In Anlehnung daran ist zu vermuten, dass die entstehenden Chelatkomplexe aus Nickel und MTT-Formazan folgende Struktur aufweisen:

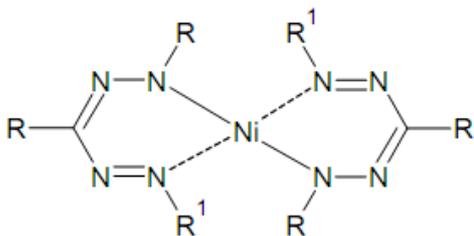


Abb. 46: Allgemeine Struktur eines Formazan-Nickel-Komplexes (25), bei dem 2 Formazan-Moleküle mit einem Nickelmolekül chelatieren.

Aus der Literatur ist bekannt, dass Komplexe bereits farbiger organischer Verbindungen mit Metallionen auch zu farbigen Metallkomplexen mit entsprechend charakteristischem Absorptionsspektrum führen (15). In dieser Studie reagiert das violette MTT-Formazan z.B. mit Nickelionen zu einem blauen Formazan-Nickel-Chelatkomplex (siehe Abb. 37 b).

In der Kinetikstudie mit MTT kommt es zur Abnahme der Extinktion mit Zunahme der Metallsalzkonzentration (siehe Abb. 47 a). Diese Abnahme ist auf eine hemmende Wirkung der Metallsalze auf die Enzyme zurückzuführen.

Um die Behauptung zu belegen, dass die verwendeten Metallionen einen schädigenden Einfluss auf humane Fibroblasten in dieser Studie haben, wurde der Versuch mit MTT und humanen Fibroblasten fotografisch festgehalten. Die Zellen zeigten ohne Nickel- oder Kupferzugabe einen vitalen, dichten, einschichtigen Zellverband mit spindelförmigen Zellkörpern, hatten viele Ausläufer und große helle Kerne. Die Zugabe der Metallionen wirkte auf die Zellen toxisch (siehe Abb. 20 bis Abb. 27). Der Zellverband löste sich auf. Die Zellkerne wurden pyknotisch. Die Zellen zogen ihre Ausläufer ein und wurden rundlich. Auch die Zellzahl schien sich mit Zunahme der Metallsalzkonzentration zu verringern.

Es ist bekannt, dass Nickel pathophysiologische Reaktionen des menschlichen Körpers auslöst (9), (23), (44). Auf zellulärer Ebene induziert Nickel Apoptose, die morphologisch beobachtet werden kann (24).

Man kann also davon ausgehen, dass eine hohe Nickelkonzentration auch zu einer starken Beeinflussung der Fibroblasten führt. Die Fibroblasten sind nicht mehr in der Lage das komplette Angebot an MTT mit ihrem Enzymapparat umzusetzen. Es entsteht weniger MTT-Formazan, je mehr Metallionen im Versuch vorhanden sind. Es kommt zur Abnahme der Extinktion.

Auch das verwendete Schwermetall Kupfer hat eine hemmende Wirkung auf Enzyme. Diese scheint viel stärker als die des Nickels zu sein, da es trotz niedrigerer Kupferkonzentrationen zu einem höheren Extinktionsabfall kommt. Es ist aus der Literatur bekannt, dass Schwermetalle wie Kupfer schon in geringen Konzentrationen als Inhibitoren auf diverse Enzyme wirken (11), (36). Gertrude et al. (12) fanden heraus, dass Kupfer mit einer Konzentration von  $1 \times 10^{-4}$  M eine hemmende Wirkung auf die 6-P- und 6-PG-Dehydrogenase hat.

Beim Vergleich des Absorptionsspektrums (siehe Abb. 47 b) mit der Kinetikstudie (siehe Abb. 47 a) fällt auf, dass es durch Zunahme der Metallsalzkonzentration zu einer Verschiebung des Absorptionsmaximums kommt. Die Extinktion in der Kinetikstudie findet jedoch beim Absorptionsmaximum des reinen Formazans statt, d.h. bei 570 nm. Die Extinktion des Spektrums einer Formazan-Nickel-Lösung ist dagegen bei dieser Wellenlänge zusammengesetzt. Sie besteht zum einen aus dem reinen MTT-Formazan, zum anderen aus den Chelatkomplexen aus Formazan und Metallsalz. Die Messung einer metallhaltigen Lösung beim Absorptionsmaximum des

reinen Formazans liefert nicht die Extinktion des Absorptionsmaximums der metallhaltigen Lösung. Daraus resultiert, dass die Extinktion der Lösungen mit Metallionen im Vergleich zur metallfreien Lösung in der Kinetikstudie abnimmt. Es besteht keine zuverlässige Aussage über die Konzentration des entstandenen MTT-Formazans.

In der Tabelle 19 werden die Unterschiede deutlich. Ermittelt man die Extinktion einer Lösung mit 50 mg/l Nickel zum Zeitpunkt  $t=120$  min bei 572 nm, so erhält man einen prozentualen Anteil von 51,5 % im Vergleich zur nickelfreien Kontrolllösung. Man geht davon aus, dass man im Absorptionsmaximum des MTT ermittelt und diese Nickelkonzentration eine toxische Dosis von nahezu 50 % hat. Im Vergleich dazu ermittelt man im eigentlichen Absorptionsmaximum des Spektrums einen Anteil von 70,8 % und damit eine toxische Dosis von ca. 30 %. Man kann jedoch nicht davon ausgehen, dass man nur die Extinktion des MTT-Formazans oder nur des Chelatkomplexes mit Nickel ermittelt, es ist eine Überlagerung beider Stoffe. Diese Überlagerung erschwert eine eindeutige Aussage.

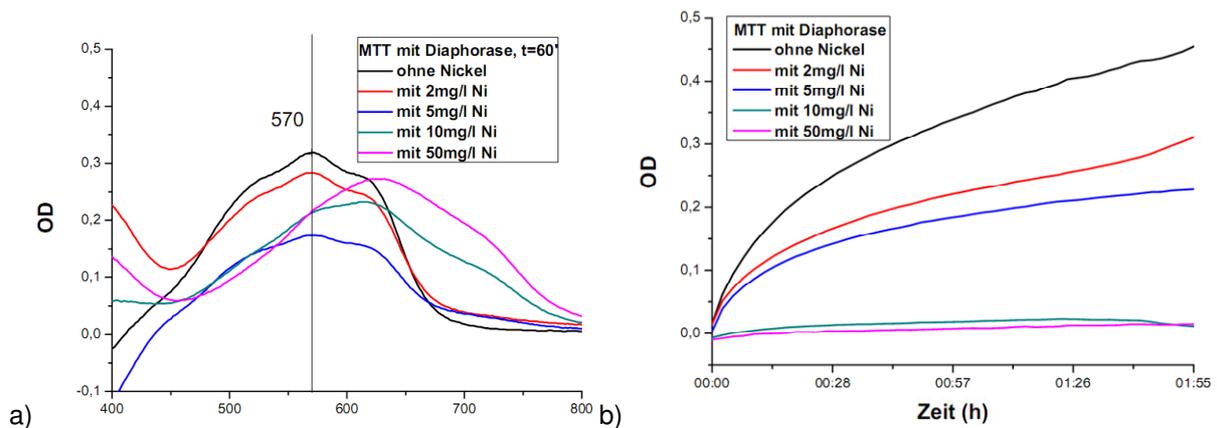


Abb. 47: a) Messung der Absorption im Bereich 250-850 nm b) Kinetik mit einer Wellenlänge von 570 nm aus dem zellfreien Versuch mit MTT und Nickel.

| Lösung         | Extinktion bei 570 nm |           | Extinktion bei $\lambda_{\max}$ |           |
|----------------|-----------------------|-----------|---------------------------------|-----------|
|                | t=60 min              | t=120 min | t=60 min                        | t=120 min |
| ohne Nickel    | 0,319 OD              | 0,503 OD  | 0,319 OD                        | 0,503 OD  |
| mit 2 mg/l Ni  | 0,283 OD              | 0,475 OD  | 0,283 OD                        | 0,476 OD  |
| mit 5 mg/l Ni  | 0,174 OD              | 0,282 OD  | 0,174 OD                        | 0,284 OD  |
| mit 10 mg/l Ni | 0,213 OD              | 0,284 OD  | 0,232 OD                        | 0,330 OD  |
| mit 50 mg/l Ni | 0,216 OD              | 0,259 OD  | 0,273 OD                        | 0,356 OD  |

Tab. 19: Extinktionen der Lösungen mit MTT und Diaphorase in Anwesenheit verschiedener Nickelkonzentrationen bei 570 nm und beim jeweiligen Absorptionsmaximum  $\lambda_{\max}$  (siehe Tab. 21).

MTT-Formazan wurde im Hinblick auf die Fragestellungen näher mit Nickelionen untersucht. Die Verschiebung des Absorptionsmaximums deutet darauf hin, dass eine neue Verbindung entsteht, deren Anteil an der Gesamtextinktion mit der Zeit zunimmt, während der Anteil des reinen MTT-Formazans immer geringer wird. Das MTT-Formazan reagiert mit den Nickel- und Kupferionen zu einem Chelatkomplex. In mehreren Studien wird die Komplexierung von Formazanen mit Metallionen beschrieben (25), (35). Dabei reagieren abhängig von der Formazanstruktur jeweils 2 Moleküle des Formazans mit einem Metallsalzmolekül zu einem Komplex (22). Mit der Zeit nimmt der Anteil des Komplexes zu und damit auch sein Anteil am Absorptionsspektrum.

Beim MTT-Formazan handelt es sich um ein Molekül, das aus mehreren Chromophoren zusammengesetzt ist und somit ist auch sein Absorptionsspektrum zusammengesetzt. Durch die Komplexierung mit Nickel oder Kupfer finden Umlagerungen im Molekül statt, was zu einer Veränderung des Absorptionsspektrums führt. Beffa et. al. zeigen eine vergleichbare Verschiebung des Maximums und Veränderung des Absorptionsspektrums eines Metallkomplexes im Vergleich zu dem Absorptionsspektrum des Formazans (4). Hirsch und Jauer beschreiben ebenfalls die Veränderung der Spektren durch Komplexierung mit Nickel und weisen auf die Zusammensetzung der Spektren aus mehreren Absorptionsmaxima hin (19). Sie fanden heraus, dass Formazylwasserstoff und seine Derivate jeweils drei Absorptionsmaxima aufweisen (19). Die Spektren der Nickelkomplexe hatten dagegen vier Absorptionsmaxima (19). Die Absorptionsmaxima in der Nähe des UV-Bereichs erfuhren durch die Komplexierung kaum eine Veränderung, während es bei den restlichen Maxima zu einer deutlichen bathochromen Verschiebung um 40 bis 65 m $\mu$  kam (19).

Diese Veränderung ließ sich in dieser Studie mit einer nicht-linearen Kurvenanpassung nach der Lorentzfunktion darstellen. Das Absorptionsspektrum des Formazans ließ sich aus vier Kurven zusammensetzen. Die charakteristische Absorption des MTT-Formazans ließ sich auch in den Spektren der untersuchten MTT-Formazan-Nickel-Lösung wiederfinden und entsprach hier dem Anteil des nicht chelatierten Formazans. Zusätzlich tauchten weitere Absorptionsmaxima auf. Diese Kurven ließen sich dem chelatierten Formazan zuordnen, welches durch die

Komplexierung mit Nickel geringe Veränderungen im Molekül erfährt. Das Entstehen neuer Verbindungen konnte durch die neu auftretenden Kurven bestätigt werden, die mit der Zeit einen größeren Anteil an der Gesamtabsorption einnahmen.

Die Raman-Analyse lieferte ähnliche Ergebnisse. Charakteristische Banden des MTT-Formazans konnten auch hier beobachtet werden, welche in der Untersuchung der MTT-Formazan-Nickel-Lösung ebenfalls vorhanden waren. Die MTT-Formazan-Nickel-Lösung zeigte auch in der Raman-Analyse Banden, die nur neu auftretenden Verbindungen zwischen dem Formazanmolekül und dem Nickel zugeordnet werden konnten.

Durch die Studien von Petersen (34) und Cunningham (10) ließen sich die einzelnen charakteristischen Banden des MTT-Formazans bestimmten Bindungen des Moleküls zuordnen (siehe Abb. 48). Cunningham (10) ordnet die Banden bei  $1601\text{ cm}^{-1}$  und  $1598\text{ cm}^{-1}$  Phenylgruppen zu, die Bande bei  $1413\text{ cm}^{-1}$  einer Stickstoff-Stickstoff-Doppelbindung, die Bande bei  $1145\text{ cm}^{-1}$  einer Stickstoff-Stickstoff-Einfachbindung und die Banden bei  $1321\text{ cm}^{-1}$ ,  $1315\text{ cm}^{-1}$ ,  $1306\text{ cm}^{-1}$  einer Stickstoff-Kohlenstoff-Bindung. Er arbeitet in seiner Studie mit einem anderen Formazan (3-methyl-1,5-diphenylformazan), aber es lassen sich Vergleiche zu den Strukturen des MTT-Formazans ziehen.

Die neu auftretenden Banden bei der MTT-Formazan-Nickel-Lösung deuten auf neue Bindungen hin, die sich zwischen dem MTT-Formazan und Nickel ausbilden. Die charakteristischen Banden des MTT-Formazans erfahren kleine Verschiebungen. Auch Petersen (34) weist auf kleine Verschiebungen der Banden von C=N und N=N Bindungen bei der Chelatierung von Formazanen mit Metallen hin, bedingt durch eine Konformationsänderung.

Zusammenfassend lässt sich sagen, dass sich in beiden durchgeführten Analysen (NLCF, Raman) charakteristische Strukturen des MTT-Formazans in Form von Banden oder Maxima feststellen lassen, die in einer Lösung mit Nickel geringe Veränderungen durchmachen. Ebenfalls lassen sich in beiden Analysen neue Strukturen ausfindig machen, die einer neuen Verbindung, mit großer

Wahrscheinlichkeit einem Chelatkomplex aus MTT-Formazan und Nickel, zuzuordnen sind.

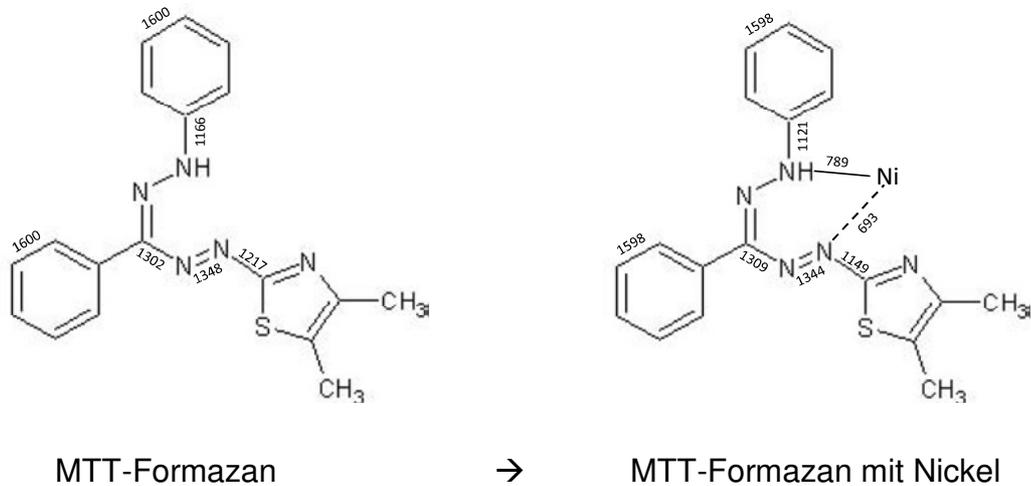


Abb. 48: Strukturformeln des MTT-Formazans (links) und des MTT-Formazan-Nickel-Komplexes (rechts). Der Komplex ist der Übersicht wegen nur mit einem Formazanmolekül dargestellt. Die Zahlen an den Verbindungen entsprechen den Raman-Banden [ $\text{cm}^{-1}$ ]. (10), (34).

Eine Ausnahme in dieser Versuchsreihe bildete jedoch der Versuch mit humanen Fibroblasten und Kupfer. Die Anwesenheit von Kupferionen veränderte das Absorptionsspektrum nicht. Es könnte an den geringeren Konzentrationen liegen oder an einer Bindung zwischen Enzym und Kupfer. Kupfer steht durch die Bindung zum einen nicht mehr zur Chelatierung bereit, zum anderen wird durch die hemmende Wirkung des Kupfers auf die Enzyme weniger MTT zu MTT-Formazan reduziert. Es resultiert eine starke Abnahme der Extinktion mit Zunahme der Metallsalzkonzentration, das Absorptionsmaximum bleibt jedoch unverändert. Wie zuvor erwähnt, ist eine Enzymhemmung durch Schwermetalle (11) wie Kupfer bekannt und könnte hier zu den abweichenden Ergebnissen im Vergleich zu den Versuchen mit Nickel führen.

In dieser Arbeit wurde deutlich die Veränderung des Absorptionsspektrums in Anwesenheit von Metallionen gezeigt. Die Extinktion einer metallhaltigen Lösung setzt sich zusammen aus der Extinktion des MTT-Formazans beim bekannten Absorptionsmaximum und einer Überlagerung mit dem Spektrum der Extinktion der Chelatkomplexe. In Anwesenheit von Metallionen ist der Gebrauch von MTT im Sinne eines Biotoxizitätsassays nicht aussagekräftig.

## **b) MTS**

MTS verhält sich in den Versuchen vergleichbar wie MTT. In den zellfreien Versuchen wird MTS durch Diaphorase zum Formazan reduziert. Ähnlich wie im Versuch mit MTT verändert sich das Absorptionsspektrum bei Zugabe von Nickelionen. MTS-Formazan geht mit Nickel eine Chelatierung ein. Die Entstehung der Chelatkomplexe weist zum einen eine andere Farbe der Lösung auf, zum anderen ein verändertes Absorptionsspektrum mit einem anderen Absorptionsmaximum als das MTS-Formazan. Kupfer führte im zellfreien Versuch nicht zur Verschiebung des Absorptionsmaximums, jedoch zu einer starken Abnahme der Extinktion. Die Extinktion sank trotz der geringeren Kupferkonzentrationen im Vergleich zum Versuch mit Nickel viel stärker ab. Es ist zu vermuten, dass Kupfer entweder zu einer Hemmung der Diaphorase führt, so dass zum einen weniger MTS zum Formazan umgesetzt werden kann und zum anderen alle Kupfermoleküle gebunden sind und einer Chelatierung nicht mehr zur Verfügung stehen oder dass es keine Chelatkomplexe mit MTS-Formazan eingeht. Da MTS strukturell dem MTT sehr ähnlich ist, ist es wahrscheinlicher, dass es zu einer hemmenden Wirkung des Kupfers auf die reduzierenden Enzyme kommt.

In den Versuchen mit humanen Fibroblasten zeigt MTS eine deutliche Veränderung des Absorptionsverhaltens in Anwesenheit von Nickel. Die Zugabe von Kupfer hatte dagegen keine vergleichbare Wirkung. Wie auch in den Versuchen mit MTT könnte das an den geringen Konzentrationen und an einer hemmenden Wirkung des Kupfers liegen.

## **c) WST-1 und XTT**

Auch WST-1 und XTT werden durch die zugegebenen Enzyme zu den jeweiligen Formazanprodukten umgesetzt. Das macht sich optisch bei beiden Tetrazoliumsalzen durch einen gelben Farbton und photometrisch durch charakteristische Absorptionsspektren bemerkbar.

Die Zugabe von Nickel und Kupfer hat jedoch keinen Einfluss auf das Absorptionsmaximum bzw. das Absorptionsspektrum. Daraus lässt sich schließen,

dass WST-1-Formazan keine Komplexe mit Nickel- oder Kupferionen bildet, auch XTT-Formazan chelatiert nicht mit den beigefügten Metallsalzen. Die Extinktionen die bei dem zugehörigen Absorptionsmaximum gemessen werden, lassen sich auch in der Kinetikstudie bestätigen. Dadurch dass keine Chelatkomplexe entstehen, verändert sich das Absorptionsspektrum nicht. Eine Abnahme der Extinktion liefert bei diesen Tetrazoliumsalzen eine Aussage über die toxische Wirkung der Proben. Es entsteht weniger Formazan, dadurch sinkt die Extinktion. In Zytotoxizitätsassays kann mit WST-1 und XTT auch in Anwesenheit von Nickel- und Kupferionen eine zuverlässige Aussage getroffen werden.

WST-1 und XTT sind in Anwesenheit von Metallionen wie Nickel und Kupfer für Zytotoxizitätsassays geeignet. Beim Gebrauch von Proben, in denen andere Metalle enthalten sind, sollten diese Tetrazoliumsalze dennoch vor dem Gebrauch kritisch geprüft werden.

Die Untersuchung der vier verwendeten Tetrazoliumsalze MTT, MTS, WST-1 und XTT in einem zellfreien System unter Verwendung von Diaphorase führte zu dem Ergebnis, dass die Formazane der Tetrazoliumsalze MTT und MTS mit Nickelionen Komplexe bilden. Diese Komplexe weisen ein verändertes Absorptionsverhalten im Vergleich zu den Formazanprodukten auf und können somit zu einer verfälschten Aussage in Zytotoxizitätsassays führen. Die Anwesenheit von Kupferionen führte in Versuchen mit MTT und MTS zu einer stärkeren Abnahme der Extinktionen trotz geringerer Konzentrationen als in vergleichbaren Versuchen mit Nickel. Im Versuch mit MTT ließ sich bei höheren Konzentrationen auch eine Verschiebung des Absorptionsmaximums beobachten. Es ist anzunehmen, dass Kupfer an die Enzyme bindet und diese hemmt. Die Formazane von WST-1 und XTT bilden dagegen keine Komplexe mit Nickel- und Kupferionen. Das Absorptionsspektrum blieb auch in Anwesenheit dieser Metallionen unverändert. WST-1 und XTT lieferten verlässliche Aussagen in Zytotoxizitätsassays.

Die Schlussfolgerung aus dieser Arbeit ist, dass in einem Zytotoxizitätsassay in dem Metallsalze enthalten sein können, auf die Auswahl der Tetrazoliumsalze geachtet werden muss. In dieser Studie waren die Tetrazoliumsalze MTT und MTS nicht für Zytotoxizitätstests in Anwesenheit der Metallionen von Nickel und Kupfer geeignet.

## 5. Zusammenfassung und Schlussfolgerung

In der Kieferorthopädie kommen unterschiedliche metallische Werkstoffe zum Einsatz. Vor dem Gebrauch muss sichergestellt sein, dass diese keine toxische Wirkung auf den menschlichen Organismus haben. Hierfür gibt es zahlreiche Zytotoxizitätsverfahren, zu denen auch der MTT-Test zählt. Bei dem MTT-Test werden Zellen in vitro mit dem Tetrazoliumsalz 3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-2,5-Diphenoltetrazoliumbromid (MTT) behandelt. Hierbei handelt es sich um einen gelben und wasserlöslichen Farbstoff, der durch Enzyme und in Anwesenheit der Cofaktoren Nikotinamidadenindinukleotid (NADH) oder Nikotinamidadenindinukleotidphosphat (NADPH), zu einem violetten und wasserunlöslichen Formazan reduziert wird. Die Formazanbildung lässt sich photometrisch bestimmen, womit die Zellaktivität in Anwesenheit bzw. Abwesenheit des Prüfkörpers festgestellt werden kann. Dieses Testverfahren lässt sich auch mit anderen Tetrazoliumsalzen, wie z.B. 2,3-Bis(2-methoxy-4-nitro-5-sulfo-phenyl)-5-((phenylamino)carbonyl)-2H-tetrazoliumhydroxid (XTT), 3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-5-(3-carboxymethoxyphenyl)-2-(4-sulfo-phenyl)-2H-tetrazolium (MTS), 2-(4-Iodophenyl)-3-(4-nitrophenyl)-5-(2,4-disulfo-phenyl)-2H-tetrazolium (WST-1) durchführen. Die Tetrazoliumsalze können jedoch mit Metallionen, wie z.B. Nickel- oder Kupfer-Ionen zu Komplexen chelatieren. Es entsteht ein andersfarbiges Produkt mit einem anderen Absorptionsspektrum, das die Aussagekraft des Zytotoxizitätstests unter Umständen verfälschen kann. Das Ziel dieser Studie war daher die Untersuchung des Einflusses von Nickel- und Kupferionen auf das Absorptionsvermögen der vier Tetrazoliumsalze MTT, MTS, WST-1 und XTT und die Anwendbarkeit dieser Tetrazoliumsalze in Biotoxizitätsassays in Anwesenheit dieser Metallionen.

In dieser Studie wurden MTT, MTS, WST-1, XTT in einem zellfreien System unter Verwendung von Diaphorase und mit humanen Fibroblasten untersucht. Jedes der vier Tetrazoliumsalze wurde mit Nickel- und Kupfer-Ionen in verschiedenen Konzentrationen getestet. Anschließend wurde MTT-Formazan mit Nickel untersucht. Im zellfreien Versuch ließ sich feststellen, dass sowohl die Zugabe von Nickel- als auch von Kupferionen einen Einfluss auf das Absorptionsmaximum der Tetrazoliumsalze MTT und MTS hat. Die Versuche mit humanen Fibroblasten zeigten einen Einfluss auf das Absorptionsmaximum der Tetrazoliumsalze MTT und MTS bei Zugabe von Nickelionen. Aus dem Versuch mit MTT-Formazan und Nickel

ging hervor, dass das Formazan mit Nickel eine neue Verbindung eingeht. Nickel- und Kupferionen bilden mit MTT- und MTS-Formazanen einen Chelatkomplex, dessen Absorptionsspektrum nicht mit dem des Formazans vergleichbar ist. Es ist zu vermuten, dass hierbei zwei Moleküle Formazan mit einem Metallion einen Chelatkomplex bilden. Die Versuche mit den Tetrazoliumsalzen WST-1 und XTT zeigten keine Veränderung des Absorptionsspektrums in Anwesenheit von Metallionen. WST-1 und XTT gehen keine Chelatierung mit den verwendeten Metallionen ein. Die Verwendung der Tetrazoliumsalze MTT und MTS in Anwesenheit von Metallionen kann zu einer Verfälschung der Aussage von Zytotoxizitätstests führen.

### *Schlussfolgerung*

In dieser Studie konnte festgestellt werden, dass die Formazane einiger Tetrazoliumsalze (MTT und MTS) mit Metallionen Chelatkomplexe eingehen können. Die Chelatkomplexe haben ein anderes Absorptionsspektrum im Vergleich zu den Formazanen und können möglicherweise die Aussagekraft von Zytotoxizitätsassays beeinträchtigen.

Bei Durchführung eines Zytotoxizitätsassays mit Tetrazoliumsalzen sollte man daher kritisch prüfen, ob diese mit Metallionen der zu untersuchenden Proben chelatieren könnten. Kann man eine Komplexbildung nicht ausschließen, sollte man entweder auf Tetrazoliumsalze bei denen keine Chelatbildung nachgewiesen wurde (z.B. XTT, WST-1) oder auf andere Assays, wie z.B. den Brd-U Test zurückgreifen.

## 6. Literaturverzeichnis

1. Abdul Rahim, A. K., Jahfar, M., Krishnankutty, K. (2009). Synthesis and characterization of metal chelates with 1,5-diaryl-3- (2-hydroxyphenyl) formazans. *Int. J. Chem. Sci.*, 7(2), S. 644-654
2. Altman, F. P. (1976). Tetrazolium salts and formazans. *Prog Histochem Cytochem*, 9(3) , S. 1-56.
3. Bamberger, E., & Wheelwright, E. W. (1892). Ueber die Einwirkung von Diazobenzol auf Acetessigäther. *Ber dtsch chem Ges*, 25(2) , S. 3201–3213.
4. Beffa, F., Lienhard, P., Steiner, E., & Shetty, G. (1963). Über isomere 1:2-Kobaltkomplexe der Formazan-Reihe. *Helv Chim Acta*, 46(4) , S. 1369-1376.
5. Bernas, T., & Dobrucki, J. (2002). Mitochondrial and nonmitochondrial reduction of MTT: interaction of MTT with TMRE, JC-1, and NAO mitochondrial fluorescent probes. *Cytometry*, 47(4) , S. 236-42.
6. Berridge, M. V., & Tan, A. S. (1993). Characterization of the cellular reduction of 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide (MTT): subcellular localization, substrate dependence, and involvement of mitochondrial electron transport in MTT reduction. *Arch Biochem Biophys*, 303(2) , S. 474-482.
7. Berridge, M. V., Petries, M., Herst, P. M., & Tan, A. S. (2005). Tetrazolium dyes as tools in cell biology: new insights into their cellular reduction. *Biotechnol Annu Rev*, 11 , S. 127-152.
8. Berridge, M. V., Tan, A. S., McCoy, K. D., & Wang, R. (1996). The biochemical and cellular basis of cell proliferation assays that use tetrazolium salts. *Biochem*, 4 , S. 14-19.
9. Ciubar, R., Mitran, V., Bonoiu, A., Cimpean, A. O., & Chescu, D. I. (2006). The effect of nickel on the fibroblast-mediated collagen matrix contraction. *J Biophys*, 2 , S. 125-133.
10. Cunningham, C. W. (1988). Formazans: a structural and spectroscopic study of 3-substituted-1,5-diphenylformazans. Wellington.
11. Edlbacher, S., Baur, H., & Becker, M. (1940). Enzymhemmung und Enzymblockierung. *Hoppe-Seyler's Zeitschrift für physiologische Chemie*, 265(2-3) , S. 61-71.
12. Gertrude, E., Glock, E., & McClean, P. (1953). Further Studies on the Properties and Assay of Glucose 6-Phosphate Dehydrogenase and 6-Phosphogluconate Dehydrogenase of Rat Liver. *Biochem J*, 55(3) , S. 400-408.

13. Gilroy, J.B., Patrick, B.O., McDonald, R., Hicks, R.G. (2008). Transition metal complexes of 3-cyano- and 3-nitroformazans. *Inorg Chem*, 47(4), S. 1287-1294
14. Grün, F., & Freiesleben, W. (1958). Nickelkomplexe von Formazylen mit 3 Liganden. *Helv Chim Acta*, 41(2) , S. 574-582.
15. Hesse, M., Meier, H., & Zeeh, B. (2005). *Spektroskopische Methoden in der organischen Chemie*, 7.Auflage. Stuttgart/ New York: Georg Thieme Verlag.
16. Hirsch, B. (1960). Metallkomplexe von Formazylverbindungen, I. *Justus Liebigs Ann Chem*, 637(1) , S. 167-172.
17. Hirsch, B. (1960). Metallkomplexe von Formazylverbindungen, II. *Justus Liebigs Ann Chem*, 637(1) , S. 173-188.
18. Hirsch, B. (1960). Metallkomplexe von Formazylverbindungen, III. *Justus Liebigs Ann Chem*, 637(1) , S. 189-203.
19. Hirsch, B., Jauer, E. A. (1965). Metallkomplexe von Formazylverbindungen, V. *Justus Liebigs Ann Chem*, 682(1) , S. 99-112.
20. Horobin, R. (1982). Selection of optimum tetrazolium salts for use in histochemistry: the value of structure-staining correlations. *Histochem J*, 14(2) , S. 301-310.
21. Huet, O., Petit, J. M., Retinaud, M. H., & Julien, R. (1992). NADH-dependent dehydrogenase activity estimation by flow cytometric analysis of 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide (MTT) reduction. *Cytometry*, 13(5) , S. 532-539.
22. Jerchel, D., & Fischer, H. (1949). Diphenyl-substituierte Formazane und Tetrazoliumsalsze. *Justus Liebigs Ann Chem*, 563(2) , S. 200-207.
23. Kao, C.T., Ding, S.J., He, H., Chou, M.Y., Huang, T.H. (2007). Cytotoxicity of orthodontic wire corroded in fluoride solution in vitro. *Angle Orthod*, 77(2), S. 349-354
24. Kim, K., Lee, S. H., Seo, Y. R., Perkins, S. N., & Kasprzak, K. S. (2002). Nickel(II)-induced apoptosis in murine t cell hybridoma cells is associated with increased fas ligand expression. *Toxicol Appl Pharmacol*, 185 , S. 41-47.
25. Kuhn, R., & Jerchel, D. (1941). Über Invertseifen. VII.Mitteil.: Tetrazoliumsalsze. *Ber Dtsch Chem Ges*, 74(6) , S. 941-948.
26. Lindl, T., & Gstraunthaler, G. (2008). *Zell- und Gewebekultur*. Heidelberg: Spektrum Akademischer Verlag.

27. Liu, Y., Peterson, D. A., Kimura, H., & Schubert, D. (1997). Mechanism of cellular 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide (MTT) reduction. *J Neurochem*, 69(2) , S. 581-593.
28. McCluskey, C., Quinn, J. P., & McGrath, J. W. (2005). An evaluation of three new-generation tetrazolium salts for the measurement of respiratory activity in activated sludge microorganisms. *Microb Ecol*, 49(3) , S. 379-387.
29. Mester, L. (1958). Schwermetall-Komplexe der Polysaccharidformazane. *J Polym Sci*, 30(121) , S. 239-245.
30. Morgan, D. M. (1998). Tetrazolium (MTT) assay for cellular viability and activity. *Meth Mol Biol*, 79(4) , S. 179-184.
31. Mosmann, T. (1983). Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays. *J Immunol Methods*, 65(1-2) , S. 55-63.
32. Pechmann, H. v. (1892). Ueber die Constitution des Acetessigäthers und des sogenannten Formylessigäthers. *Ber Dtsch Chem Ges*, 25 , S. 1040-1054.
33. Pechmann, H.v., & Runge, P. (1894). Oxydation der Formazyilverbindungen. *Ber Dtsch Chem Ges*, 27 , S. 323-324.
34. Petersen, R. L., McFarland, J. T., & Watters, K. L. (1978). Resonance raman study of metal-formazans: a model for complexes of metalloenzymes with chelate inhibitors. *Bioorg Chem*, 9(4) , S. 355-367.
35. Ried, W. (1952). Formazane und Tetrazoliumsalze, ihre Synthesen und ihre Bedeutung als Reduktionsindikatoren und Vitalfarbstoffe. *Angew Chem*, 64 , S. 391-396.
36. Riley, M.R., Boesewetter, D.E., Kim, A.M., Sirvent, F.P. (2003). Effects of metals Cu, Fe, Ni, V, and Zn on rat lung epithelial cells. *Toxicology*, 190(3), S. 171-184
37. Schnepel, F. M. (1980). Physikalische Methoden in der Chemie: Raman-Spektroskopie. *Chemie in unserer Zeit*, 14(5) , S. 158-167.
38. Sedov, Y. A., & Postovskii, I. Y. (1968). Formazans containing sulfamide groups. *Pharm Chem J*, 2(7) , S. 365-367.
39. Seidler, E. (1980). New nitro-monotetrazolium salts and their use in histochemistry. *Histochem J*, 12 , S. 619-630.
40. Seidler, E. (1968). Zur Analytik histochemisch gebräuchlicher Tetrazoliumsalze. *Fresenius' Journal of Analytical Chemistry* 237(1) , S. 60-73.

41. Seyhan, M., & Ocakeioglu, B. (1969). Über Metallkomplexe heterocyclisch substituierter Formazane und Azomethine. *Monatshefte für Chemie* 101(3), S. 829-833.
42. Tada, H., Shiho, O., Kuroshima, K., Koyama, M., & Tsukamoto, K. (1986). An improved colorimetric assay for interleukin 2. *J Immunolog Methods*, 93, S. 157-165.
43. Tezcan, H., Levent, M. (2010). Electrochemical properties of 1- (o-, m-, p-nitrophenyl)-3-(m-nitrophenyl)-5-phenylformazans and their nickel complexes. *Turk J Chem*, S. 465-479.
44. Trombetta, D., Mondello, M. R., Cimino, F., Cristani, M., Pergolizzi, S., Saija, A. (2005). Toxic effect of nickel in an in vitro model of human oral epithelium. *Toxicology Letters*, 159 (3), S. 219-225.

## 7. Anhang

### 7.1 Material

#### 7.1.1 Chemikalien

|  |   |
|--|---|
| Aceton                                 | Merck KGaA, Dortmund                    |
| A.dest.                                | DeltaSelect GmbH, Dreieich              |
| Amphotericin B                         | PAA-Laboratories GmbH, Pasching/Austria |
| BSA                                    | Sigma-Aldrich, St.Louis/Steinheim       |
| Citrate Buffer Solution, 0,09M         | Sigma-Aldrich, St.Louis/Steinheim       |
| CuSO <sub>4</sub>                      | Merck KGaA, Dortmund                    |
| Diaphorase                             | Sigma-Aldrich, St.Louis/Steinheim       |
| Penicillin/ Streptomycin               | PAA-Laboratories GmbH, Pasching/Austria |
| FCS                                    | PAA-Laboratories GmbH, Pasching/Austria |
| FMN                                    | Sigma-Aldrich, St.Louis/Steinheim       |
| N,N-Dimethylformamid                   | Sigma, St.Louis/ Steinheim              |
| MEM                                    | Sigma-Aldrich, St.Louis/Steinheim       |
| MTS                                    | Promega, Madison/ U.S.A.                |
| MTT                                    | Serva, Heidelberg                       |
| MTT-Formazan                           | Sigma-Aldrich, St.Louis/Steinheim       |
| NiSO <sub>4</sub> x 6 H <sub>2</sub> O | Riedel-de Haën                          |
| PBS                                    | PAA-Laboratories GmbH, Pasching/Austria |
| Peroxidase                             | Serva, Heidelberg                       |
| PMS                                    | Serva, Heidelberg                       |
| Salzsäure                              | Roth, Karlsruhe                         |
| SDS                                    | BioRad                                  |
| Tris                                   | Sigma-Aldrich, St.Louis/Steinheim       |
| Trypan Blue                            | Serva, Heidelberg                       |
| Trypsin/EDTA                           | PAA-Laboratories GmbH, Pasching/Austria |
| WST1                                   | Serva, Heidelberg                       |
| XTT                                    | Serva, Heidelberg                       |
| αMEM                                   | Sigma-Aldrich, St.Louis/Steinheim       |
| βNADH                                  | Sigma-Aldrich, St.Louis/Steinheim       |

### 7.1.2 Gebrauchswaren

|                  |  |
|------------------|--|
| Pipetten:        | Eppendorf Research pro 50-1000µl<br>Eppendorf Research pro 500-5000µl<br>Eppendorf Reference 100-1000µl<br>Eppendorf Reference 10-100µl<br>Eppendorf Research 0,5-10µl<br>ACCU-JET von BRAX<br>U.S.A.Sarstedt Serological Pipette 10ml von Sarstedt /<br>Numbrecht |
| Pipettenspitzen: | von Sarstedt / Numbrecht<br>von Eppendorf AG / Hamburg   |
| Reagenzgläser:   | 14 ml, 119*15,5 mm, PS von Sarstedt / Numbrecht  |
| Küvetten:        | 96Well Mikrotest Plate, Flat Bottom von Sarstedt /Newton<br>Neubauer improved, Marienfeld (Neubauerzählkammer)   |

### 7.1.3 Geräte

Begasungsbrutschrank, Heraeus Instruments  
 Biofuge stratos, Heraeus (Zentrifuge)  
 Lamin Air HB 2472 K, Heraeus Instruments (Sterilbank)  
 µQuant Bio-Tek Instruments, Inc. (Photometer)  
 Senterra Bruker (Raman Spektroskop)  
 Nikon Optoshot-2 (Mikroskop)  
 Reichert-Jung BioStar (Inverses Mikroskop)

### 7.1.4 Stammlösungen, Gebrauchslösungen, Puffer und Medien

#### 7.1.4.1 Metallsalz-Lösungen

##### Stammlösungen

- a) Ni(II)-Stammlösung: 1 g/l mit 0,44782 g NiSO<sub>4</sub> \* 6 H<sub>2</sub>O  
 in 100 ml A.dest. (doppelt dest.)
- b) Cu(II)-Stammlösung.: 1 g/l mit 0,251156 g CuSO<sub>4</sub> in 100 ml A.dest. (doppelt dest.)

Gebrauchslösungen für die zellfreien Versuche

- a) 0,5 g/l Ni(II)-Lösung: 100 µl Ni(II)-Stammlösung in 100 µl A.dest. (doppelt dest.)
- b) 0,333 g/l Ni(II)-Lösung: 100 µl Ni(II)-Stammlösung in 200 µl A.dest. (doppelt dest.)
- c) 0,1 g/l Cu(II)-Lösung: 10 µl Cu(II)-Stammlösung in 90 µl A.dest. (doppelt dest.)
- d) 0,01 g/l Cu(II)-Lösung: 10 µl Cu(II)-Stammlösung in 900 µl A.dest. (doppelt dest.)

Gebrauchslösungen für die Versuche mit humanen Fibroblasten

Alle Lösungen sind doppelt konzentriert

- a) 4 mg/l Ni(II)-Lösung: 10 µl Ni(II)-Stammlösung in 2490 µl Medium
- b) 10 mg/l Ni(II)-Lösung: 25 µl Ni(II)-Stammlösung in 2475 µl Medium
- c) 20 mg/l Ni(II)-Lösung: 50 µl Ni(II)-Stammlösung in 2450 µl Medium
- d) 100 mg/l Ni(II)-Lösung: 250 µl Ni(II)-Stammlösung in 2250 µl Medium
- e) 0,4 mg/l Cu(II)-Lösung: 1 µl Cu(II)-Stammlösung in 2499 µl Medium
- f) 0,8 mg/l Cu(II)-Lösung: 2 µl Cu(II)-Stammlösung in 2498 µl Medium
- g) 1 mg/l Cu(II)-Lösung: 2,5 µl Cu(II)-Stammlösung in 2498 µl Medium
- h) 2 mg/l Cu(II)-Lösung: 5 µl Cu(II)-Stammlösung in 2495 µl Medium
- i) 4 mg/l Cu(II)-Lösung: 10 µl Cu(II)-Stammlösung in 2490 µl Medium
- j) 10 mg/l Cu(II)-Lösung: 25 µl Cu(II)-Stammlösung in 2475 µl Medium
- k) 20 mg/l Cu(II)-Lösung: 50 µl Cu(II)-Stammlösung in 2450 µl Medium

**7.1.4.2 Lösungen und Puffer**

Stammlösungen für die zellfreien Versuche

- a) 20 mM Tris/HCL-Puffer: 1,21 g Tris  
7,7 ml 1N HCL ad 500 ml A.dest., pH-Wert auf 7,5 bei 25 °C
- b) 200 mM Tris/HCL-Puffer: 12,1 g Tris mit 10,96 g KCL und 88 ml 1N HCL  
ad 500 ml A.dest., ph-Wert auf 7,5 bei 25 °C
- c) βNADH-Stammlösung: 10 mg in 6 ml 20 mM Tris/HCL
- d) FMN-Stammlösung: 13 mg FMN in 10 ml 200 mM Tris/HCL/KCL
- e) Diaphorase-Stammlösung: 2 mg Diaphorase in 1 ml 200 mM Tris/HCL/KCL
- f) MTT: 0,1 g MTT in 20 ml PBS
- g) MTS: 0,0293 g MTS in 10 ml PBS
- h) WST1: 0,0156 g in 2 ml PBS

i) XTT: 0,00486 g in 2 ml PBS

Stammlösungen für die Versuche mit humanen Fibroblasten

- a) 12 mM MTT: 0,1 g MTT in 20 ml PBS
- b) 3,6 mM MTS: 0,01755 g MTS in 10 ml PBS
- c) 5 mM WST-1: 0,03257 g WST-1 in 10 ml PBS
- d) 1,4 mM XTT: 0,0188 g XTT in 20 ml PBS
- e) 0,12 mM PMS: 0,1838 µg PMS in 5 µl PBS
- f) 0,02 mM PMS: 30,6 ng PMS in 5 µl PBS
- g) SDS-Lösung: 5 g SDS in 50 ml 0,01 N HCl
- h) Medium: αMEM Trockenmedium, Sigma M0644 in 1000 ml A.dest.,  
2,2 g NaHCO<sub>3</sub>  
ph-Wert mit NaOH auf 7,2 eingestellt, Sterilfiltration

Gebrauchslösungen für die zellfreien Versuche

- a) 0,23 mM : 0,5 ml -Stammlösung in 4,5 ml 20 mM Tris/HCL
- b) 0,272 mM FMN: 1 ml FMN-Stammlösung mit 13 mg BSA in  
9 ml 200 mM Tris/KCL/HCL
- c) Diaphorase: 50 µl Diaphorase-Stammlösung in 5 ml Gebrauchslösung  
Enzymdiluent
- d) 12 mM MTT: direkt aus der Stammlösung
- e) 1,2 mM MTS: 100 µl der Stammlösung in 400 µl PBS
- f) 1,2 mM WST1: 100 µl Stammlösung in 900 µl PBS
- g) 1,2 mM XTT: 100 µl Stammlösung in 200 µl PBS

Gebrauchslösungen für die Versuche mit humanen Fibroblasten

- a) 12 mM MTT
- b) 1,2 mM MTS + 0,12 mM PMS: 500 µl 3,6 mM MTS mit 1000 µl PBS,  
375 µl 0,12 mM PMS
- c) 1,25 mM WST1 + 0,12 mM PMS: 400 µl 5 mM WST1 mit 1200 µl PBS,  
400 µl 0,12 mM PMS
- d) 1,4 mM XTT + 0,02 mM PMS: 1500 µl 1,4 mM XTT mit 375 µl 0,02 mM PMS

e) Gebrauchsmedium: 440 ml  $\alpha$ MEM Medium steril mit 50 ml FCS Medium,  
5 ml Penicillin/ Streptomycin, 5 ml Amphotericin B (250  $\mu$ g/ml)

f) Trypsinlösung: 1 ml Trypsin in 9 ml PBS

g) Trypanblaulösung: 14  $\mu$ l Trypanblaulösung mit 14  $\mu$ l Zellsuspension nach Zentrifugation für Zellzählung

#### Gebrauchslösungen für die Versuche mit MTT-Formazan in Aceton und Nickel

a) MTT-Formazan-Lösung in Aceton: 10 mg MTT-Formazan in 10 ml Aceton

### 7.1.5 Verwendete eukaryontische Zelllinien und Medien

a) Humane Fibroblasten der 3. Passage: Name der Zelllinie - F99

b)  $\alpha$ MEM-Medium (siehe 2.4.5 e))

## 7.2 Tabellen

| Substanz | Wellenlänge des Absorptionsmaximums (nm) | OD $_{\lambda_{max}}$ |
|----------|--|-----------------------|
| NADH     | 338                                      | 0,556                 |
| FMN      | 364                                      | 0,120                 |
| DIA      | 364                                      | 0,126                 |
| Ni       | 414                                      | 0,042                 |
| Cu       | 388                                      | 0,041                 |
| MTT      | 376                                      | 2,969                 |
| MTS      | 380                                      | 0,296                 |
| WST1     | 660                                      | 0,036                 |
| XTT      | 738                                      | 0,041                 |

Tab. 20: Absorptionsmaxima der einzelnen Substanzen im Vorversuch.

|                   | <b>Dia</b>              | <b>Dia</b>              | <b>Dia</b>               | <b>Dia</b>               | <b>Dia</b>                | <b>Dia</b>                |
|-------------------|-------------------------|-------------------------|--------------------------|--------------------------|---------------------------|---------------------------|
| <b>C(Ni/Cu)</b>   | <b>t=0</b><br><b>nm</b> | <b>t=0</b><br><b>OD</b> | <b>t=60</b><br><b>nm</b> | <b>t=60</b><br><b>OD</b> | <b>t=120</b><br><b>nm</b> | <b>t=120</b><br><b>OD</b> |
| <b>0</b>          | 528                     | 0,051                   | 570                      | 0,319                    | 572                       | 0,503                     |
| <b>2mg/l Ni</b>   | 530                     | 0,048                   | 570                      | 0,283                    | 572                       | 0,476                     |
| <b>5mg/l Ni</b>   | 514                     | 0,029                   | 570                      | 0,174                    | 574                       | 0,284                     |
| <b>10mg/l Ni</b>  | 552                     | 0,032                   | 610                      | 0,232                    | 630                       | 0,330                     |
| <b>50mg/l Ni</b>  | 570                     | 0,033                   | 622                      | 0,273                    | 636                       | 0,356                     |
| <b>0,2mg/l Cu</b> | 554                     | 0,033                   | 570                      | 0,278                    | 570                       | 0,513                     |
| <b>0,4mg/l Cu</b> | 554                     | 0,027                   | 570                      | 0,181                    | 570                       | 0,316                     |
| <b>0,5mg/l Cu</b> | 546                     | 0,020                   | 570                      | 0,158                    | 570                       | 0,284                     |
| <b>1mg/l Cu</b>   | 608                     | 0,017                   | 608                      | 0,096                    | 610                       | 0,150                     |
| <b>5mg/l Cu</b>   | 664                     | 0,029                   | 654                      | 0,091                    | 662                       | 0,150                     |
| <b>10mg/l Cu</b>  | 658                     | 0,012                   | 646                      | 0,054                    | 646                       | 0,084                     |
| <b>50mg/l Cu</b>  | 618                     | 0,009                   | 672                      | 0,042                    | 656                       | 0,071                     |
|                   | <b>Bl</b>               | <b>Bl</b>               | <b>Bl</b>                | <b>Bl</b>                | <b>Bl</b>                 | <b>Bl</b>                 |
| <b>C(Ni/Cu)</b>   | <b>t=0</b><br><b>nm</b> | <b>t=0</b><br><b>OD</b> | <b>t=60</b><br><b>nm</b> | <b>t=60</b><br><b>OD</b> | <b>t=120</b><br><b>nm</b> | <b>t=120</b><br><b>nm</b> |
| <b>0</b>          | 520                     | 0,083                   | 566                      | 0,081                    | 564                       | 0,095                     |
| <b>2mg/l Ni</b>   | 516                     | 0,053                   | 568                      | 0,061                    | 584                       | 0,069                     |
| <b>5mg/l Ni</b>   | 590                     | 0,076                   | 610                      | 0,089                    | 616                       | 0,116                     |
| <b>10mg/l Ni</b>  | 602                     | 0,075                   | 614                      | 0,090                    | 624                       | 0,104                     |
| <b>50mg/l Ni</b>  | 604                     | 0,073                   | 624                      | 0,088                    | 630                       | 0,114                     |
| <b>0,2mg/l Cu</b> | 524                     | 0,045                   | 570                      | 0,051                    | 570                       | 0,054                     |
| <b>0,4mg/l Cu</b> | 522                     | 0,044                   | 570                      | 0,052                    | 570                       | 0,068                     |
| <b>0,5mg/l Cu</b> | 528                     | 0,041                   | 570                      | 0,045                    | 568                       | 0,048                     |
| <b>1mg/l Cu</b>   | 542                     | 0,054                   | 612                      | 0,046                    | 612                       | 0,049                     |
| <b>5mg/l Cu</b>   | 664                     | 0,041                   | 654                      | 0,091                    | 570                       | 0,093                     |
| <b>10mg/l Cu</b>  | 658                     | 0,062                   | 598                      | 0,070                    | 610                       | 0,076                     |
| <b>50mg/l Cu</b>  | 618                     | 0,093                   | 620                      | 0,101                    | 624                       | 0,102                     |

Tab. 21: Absorptionsmaxima im zellfreien Versuch mit MTT mit Diaphorase (=Dia) und ohne Diaphorase (=Blank) zum Zeitpunkt t=0', 60' , 120'.

|                   | <b>Dia</b>              | <b>Dia</b>              | <b>Dia</b>               | <b>Dia</b>               | <b>Dia</b>                | <b>Dia</b>                |
|-------------------|-------------------------|-------------------------|--------------------------|--------------------------|---------------------------|---------------------------|
| <b>C( Ni /Cu)</b> | <b>t=0</b><br><b>nm</b> | <b>t=0</b><br><b>OD</b> | <b>t=60</b><br><b>nm</b> | <b>t=60</b><br><b>OD</b> | <b>t=120</b><br><b>nm</b> | <b>t=120</b><br><b>OD</b> |
| <b>0</b>          | 498                     | 0,032                   | 494                      | 0,454                    | 492                       | 0,545                     |
| <b>2 mg/l Ni</b>  | 492                     | 0,035                   | 648                      | 0,289                    | 570                       | 0,167                     |
| <b>5 mg/l Ni</b>  | 498                     | 0,033                   | 650                      | 0,293                    | 650                       | 0,372                     |
| <b>10 mg/l Ni</b> | 496                     | 0,025                   | 652                      | 0,321                    | 652                       | 0,398                     |
| <b>50 mg/l Ni</b> | 502                     | 0,010                   | 652                      | 0,276                    | 652                       | 0,343                     |
| <b>0,2mg/l Cu</b> | 564                     | 0,008                   | 494                      | 0,188                    | 494                       | 0,269                     |
| <b>0,4mg/l Cu</b> | 502                     | 0,008                   | 498                      | 0,094                    | 492                       | 0,142                     |
| <b>0,5mg/l Cu</b> | 500                     | 0,006                   | 480                      | 0,034                    | 498                       | 0,041                     |
| <b>1 mg/l Cu</b>  | 620                     | 0,006                   | 646                      | 0,019                    | 622                       | 0,012                     |
|                   | <b>BI</b>               | <b>BI</b>               | <b>BI</b>                | <b>BI</b>                | <b>BI</b>                 | <b>BI</b>                 |
| <b>C( Ni /Cu)</b> | <b>t=0</b><br><b>nm</b> | <b>t=0</b><br><b>OD</b> | <b>t=60</b><br><b>nm</b> | <b>t=60 OD</b>           | <b>t=120</b><br><b>nm</b> | <b>t=120</b><br><b>OD</b> |
| <b>0</b>          | 510                     | 0,068                   | 510                      | 0,068                    | 510                       | 0,068                     |
| <b>2 mg/l Ni</b>  | 512                     | 0,053                   | 598                      | 0,080                    | 614                       | 0,092                     |
| <b>5 mg/l Ni</b>  | 516                     | 0,055                   | 602                      | 0,084                    | 608                       | 0,099                     |
| <b>10 mg/l Ni</b> | 606                     | 0,063                   | 620                      | 0,099                    | 626                       | 0,097                     |
| <b>50 mg/l Ni</b> | 606                     | 0,060                   | 632                      | 0,089                    | 636                       | 0,081                     |
| <b>0,2mg/l Cu</b> | 520                     | 0,042                   | 616                      | 0,053                    | 610                       | 0,057                     |
| <b>0,4mg/l Cu</b> | 510                     | 0,047                   | 598                      | 0,050                    | 598                       | 0,052                     |
| <b>0,5mg/l Cu</b> | 510                     | 0,046                   | 632                      | 0,050                    | 584                       | 0,053                     |
| <b>1 mg/l Cu</b>  | 510                     | 0,045                   | 598                      | 0,058                    | 600                       | 0,054                     |

Tab. 22: Absorptionsmaxima im zellfreien Versuch mit MTS mit Diaphorase (=Dia) und ohne Diaphorase (=Blank) zum Zeitpunkt t=0', 60', 120'.

|                    | <b>Dia</b> | <b>Dia</b> | <b>Dia</b>  | <b>Dia</b>  | <b>Dia</b>   | <b>Dia</b>   |
|--------------------|------------|------------|-------------|-------------|--------------|--------------|
| <b>C(Ni/Cu)</b>    | <b>t=0</b> | <b>t=0</b> | <b>t=60</b> | <b>t=60</b> | <b>t=120</b> | <b>t=120</b> |
|                    | <b>nm</b>  | <b>OD</b>  | <b>nm</b>   | <b>OD</b>   | <b>nm</b>    | <b>OD</b>    |
| <b>0</b>           | 764        | 0,004      | 438         | 0,306       | 440          | 0,500        |
| <b>2 mg/l Ni</b>   | 440        | 0,003      | 438         | 0,145       | 436          | 0,180        |
| <b>5 mg/l Ni</b>   | 726        | 0,003      | 438         | 0,101       | 438          | 0,176        |
| <b>10 mg/l Ni</b>  | 558        | 0,001      | 436         | 0,085       | 438          | 0,152        |
| <b>50 mg/l Ni</b>  | 732        | 0,003      | 436         | 0,135       | 438          | 0,209        |
| <b>0,2 mg/l Cu</b> | 512        | 0,003      | 424         | 0,017       | 428          | 0,065        |
| <b>0,4 mg/l Cu</b> | 508        | 0,004      | 430         | 0,023       | 438          | 0,061        |
| <b>0,5 mg/l Cu</b> | 620        | 0,005      | 426         | 0,013       | 436          | 0,038        |
| <b>1 mg/l Cu</b>   | 742        | 0,003      | 424         | 0,004       | 436          | 0,030        |
|                    | <b>BI</b>  | <b>BI</b>  | <b>BI</b>   | <b>BI</b>   | <b>BI</b>    | <b>BI</b>    |
| <b>C(Ni/Cu)</b>    | <b>t=0</b> | <b>t=0</b> | <b>t=60</b> | <b>t=60</b> | <b>t=120</b> | <b>t=120</b> |
|                    | <b>nm</b>  | <b>OD</b>  | <b>nm</b>   | <b>OD</b>   | <b>nm</b>    | <b>OD</b>    |
| <b>0</b>           | 444        | 0,155      | 440         | 0,153       | 442          | 0,155        |
| <b>2 mg/l Ni</b>   | 444        | 0,132      | 442         | 0,132       | 444          | 0,144        |
| <b>5 mg/l Ni</b>   | 444        | 0,141      | 442         | 0,136       | 444          | 0,134        |
| <b>10 mg/l Ni</b>  | 444        | 0,137      | 442         | 0,134       | 442          | 0,132        |
| <b>50 mg/l Ni</b>  | 442        | 0,134      | 442         | 0,133       | 442          | 0,129        |
| <b>0,2 mg/l Cu</b> | 444        | 0,143      | 444         | 0,143       | 442          | 0,135        |
| <b>0,4 mg/l Cu</b> | 444        | 0,131      | 444         | 0,132       | 444          | 0,125        |
| <b>0,5 mg/l Cu</b> | 444        | 0,127      | 444         | 0,127       | 444          | 0,122        |
| <b>1 mg/l Cu</b>   | 442        | 0,134      | 444         | 0,134       | 444          | 0,126        |

Tab. 23: Absorptionsmaxima im zellfreien Versuch mit WST1 mit Diaphorase (=Dia) und ohne Diaphorase (=Blank) zum Zeitpunkt t=0', 60', 120'.

|                     | Dia           | Dia           | Dia            | Dia            | Dia             | Dia             |
|---------------------|---------------|---------------|----------------|----------------|-----------------|-----------------|
| <b>C( Ni / Cu )</b> | <b>t=0 nm</b> | <b>t=0 OD</b> | <b>t=60 nm</b> | <b>t=60 OD</b> | <b>t=120 nm</b> | <b>t=120 OD</b> |
| <b>0</b>            | 482           | 0,034         | 466            | 0,389          | 466             | 0,434           |
| <b>2 mg/l Ni</b>    | 470           | 0,042         | 466            | 0,433          | 468             | 0,440           |
| <b>5 mg/l Ni</b>    | 474           | 0,028         | 466            | 0,396          | 464             | 0,444           |
| <b>10 mg/l Ni</b>   | 494           | 0,019         | 464            | 0,299          | 466             | 0,354           |
| <b>50 mg/l Ni</b>   | 484           | 0,035         | 466            | 0,376          | 466             | 0,400           |
| <b>0,2mg/l Cu</b>   | 444           | 0,132         | 464            | 0,226          | 464             | 0,325           |
| <b>0,4mg/l Cu</b>   | 444           | 0,134         | 466            | 0,084          | 464             | 0,189           |
| <b>0,5mg/l Cu</b>   | 442           | 0,128         | 466            | 0,112          | 464             | 0,136           |
| <b>1 mg/l Cu</b>    | 442           | 0,128         | 468            | 0,025          | 464             | 0,057           |
|                     | <b>BI</b>     | <b>BI</b>     | <b>BI</b>      | <b>BI</b>      | <b>BI</b>       | <b>BL</b>       |
| <b>C( Ni / Cu )</b> | <b>t=0 nm</b> | <b>t=0 OD</b> | <b>t=60nm</b>  | <b>t=60OD</b>  | <b>t=120 nm</b> | <b>t=120 OD</b> |
| <b>0</b>            | 444           | 0,122         | 454            | 0,171          | 456             | 0,226           |
| <b>2 mg/l Ni</b>    | 444           | 0,143         | 450            | 0,186          | 456             | 0,246           |
| <b>5 mg/l Ni</b>    | 444           | 0,134         | 448            | 0,159          | 454             | 0,199           |
| <b>10 mg/l Ni</b>   | 444           | 0,146         | 450            | 0,174          | 454             | 0,210           |
| <b>50 mg/l Ni</b>   | 446           | 0,145         | 448            | 0,157          | 452             | 0,210           |
| <b>0,2mg/l Cu</b>   | 442           | 0,123         | 444            | 0,121          | 444             | 0,123           |
| <b>0,4mg/l Cu</b>   | 442           | 0,122         | 442            | 0,124          | 442             | 0,121           |
| <b>0,5mg/l Cu</b>   | 444           | 0,140         | 444            | 0,143          | 442             | 0,134           |
| <b>1 mg/l Cu</b>    | 446           | 0,132         | 444            | 0,133          | 444             | 0,123           |

Tab. 24: Absorptionsmaxima im zellfreien Versuch mit XTT mit Diaphorase (=Dia) und ohne Diaphorase (=Blank) zum Zeitpunkt t=0', 60' , 120'.

|                                  | <b>t=0</b> |           | <b>t=60'</b> |           | <b>t=120'</b> |           | <b>t=180'</b> |           |
|----------------------------------|------------|-----------|--------------|-----------|---------------|-----------|---------------|-----------|
|                                  | <i>nm</i>  | <i>OD</i> | <i>nm</i>    | <i>OD</i> | <i>nm</i>     | <i>OD</i> | <i>nm</i>     | <i>OD</i> |
| <b>MTT-Formazan</b>              | 570        | 0,759     | 574          | 0,472     | 574           | 0,475     | 574           | 0,345     |
| <b>MTT-Formazan und Ni (1:1)</b> | 570        | 0,618     | 614          | 0,483     | 618           | 0,432     | 624           | 0,397     |

Tab. 25: Absorptionsmaxima der Versuche mit MTT-Formazan gelöst in Aceton allein und in Anwesenheit von Nickel.

### 7.3 Abbildungen

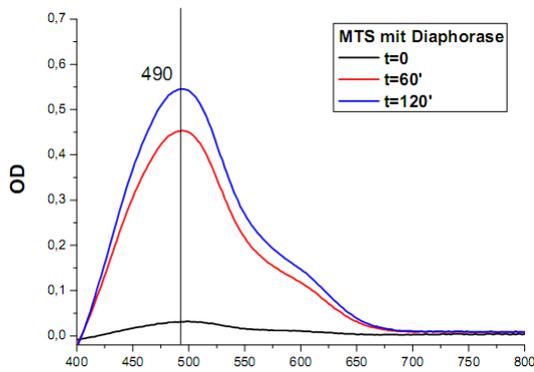


Abb. 49: Absorptionsspektrum von MTS in Anwesenheit von Diaphorase zum Zeitpunkt  $t=0$ ,  $t=60'$  und  $t=120'$

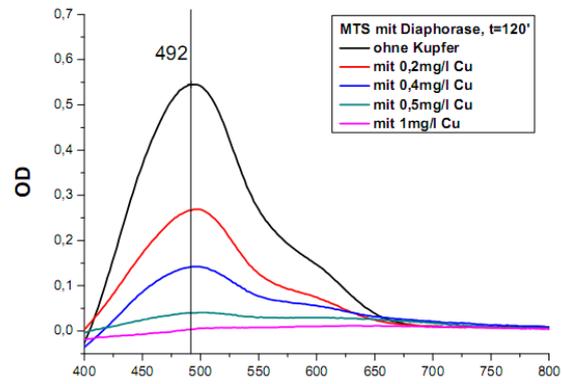


Abb. 50: Absorptionsspektrum von MTS mit Diaphorase und in Anwesenheit unterschiedlicher Kupferkonzentrationen zum Zeitpunkt  $t=120'$

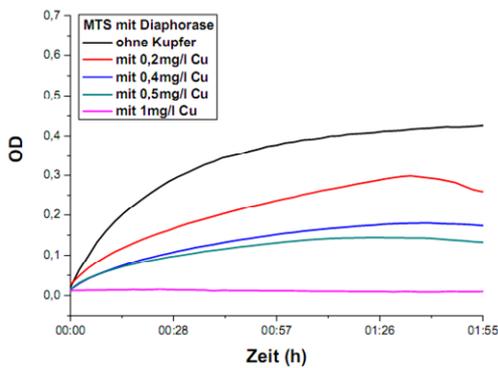


Abb. 51: Kinetik von MTS mit Diaphorase und unterschiedlichen Kupferkonzentrationen bei einer Wellenlänge von 490 nm.

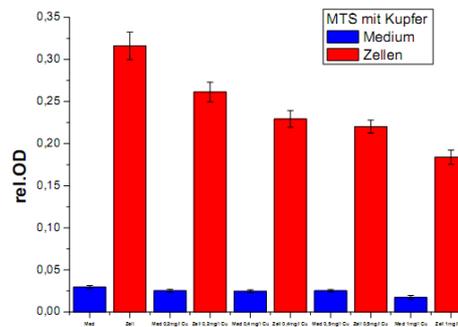


Abb. 52: Säulendiagramm von MTS, Zellen und in Anwesenheit von Kupfer, Darstellung der relativen OD bei  $\lambda_{\max} = 490$  nm.

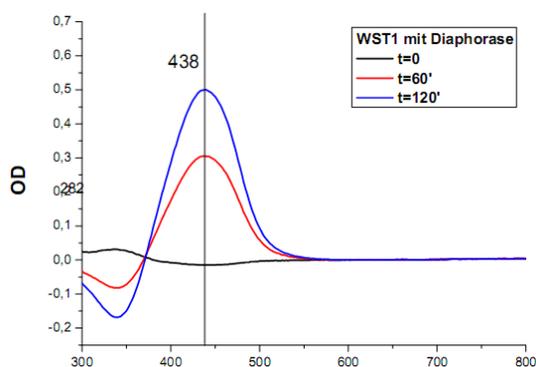


Abb. 53: Absorptionsspektrum von WST1 in Anwesenheit von Diaphorase zum Zeitpunkt  $t=0$ ,  $t=60'$  und  $t=120'$ .

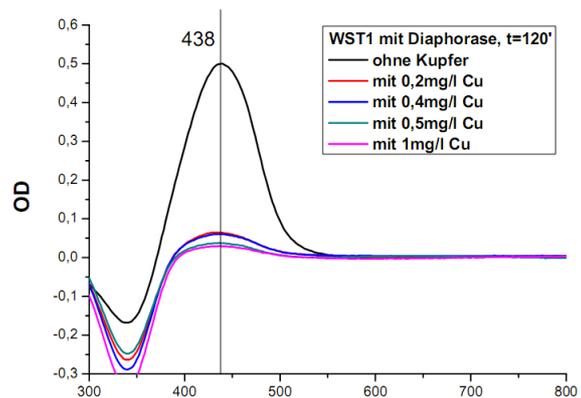


Abb. 54: Absorptionsspektrum von WST1 mit Diaphorase und in Anwesenheit unterschiedlicher Kupferkonzentrationen zum Zeitpunkt  $t=120'$ .

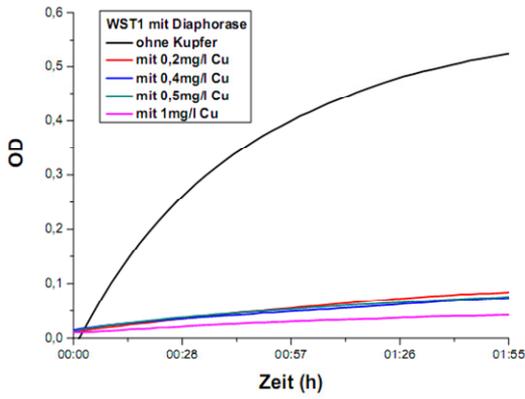


Abb. 55: Kinetik von WST1 mit Diaphorase und in Anwesenheit unterschiedlicher Kupferkonzentrationen bei einer Wellenlänge von 438 nm.

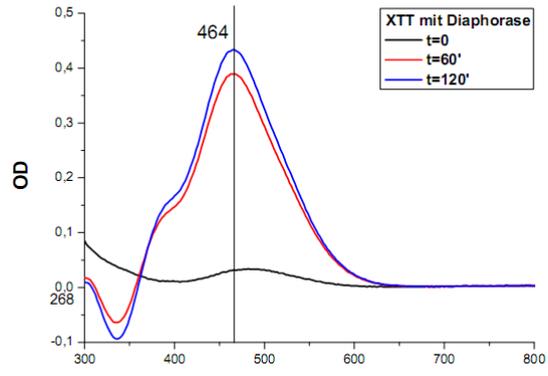


Abb. 56: Absorptionsspektrum von XTT in Anwesenheit von Diaphorase zum Zeitpunkt t=0', t=60' und t=120'.

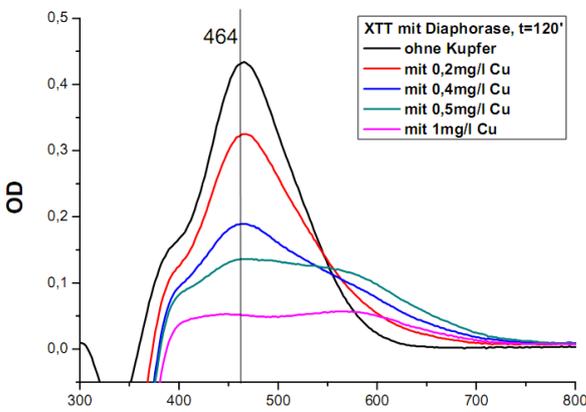


Abb. 57: Absorptionsspektrum von XTT mit Diaphorase und in Anwesenheit unterschiedlicher Kupferkonzentrationen zum Zeitpunkt t=120'.

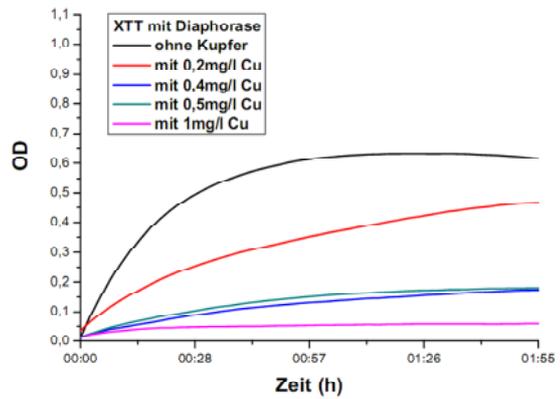


Abb. 58: Kinetik von XTT mit Diaphorase und in Anwesenheit unterschiedlicher Kupferkonzentrationen bei einer Wellenlänge von 464 nm.

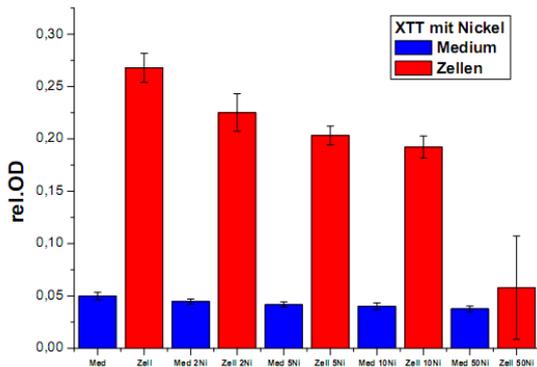


Abb. 59: Säulendiagramm von XTT, Zellen und in Anwesenheit von Nickel, Darstellung der relativen OD bei  $\lambda_{max} = 464$  nm.

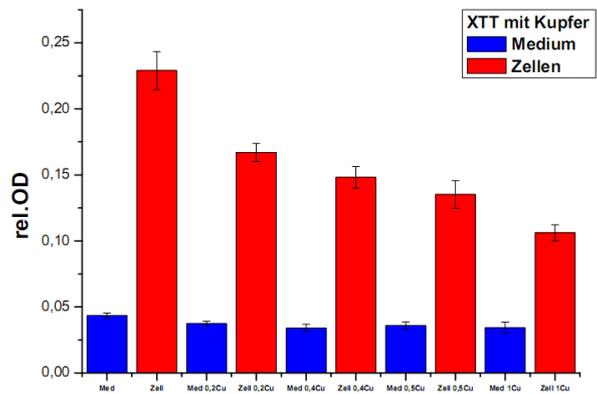


Abb. 60: Säulendiagramm von XTT, Zellen und in Anwesenheit von Kupfer, Darstellung der relativen OD bei  $\lambda_{max} = 464$  nm.

## Lebenslauf

### Persönliche Daten

---

Name: Julia Ott

Geburtsdatum und -ort: 30.12.1984 in Stepnogorsk, Kasachstan

Familienstand: ledig

### Ausbildung

---

August 1996 – Juni 2005 Auguste-Viktoria-Schule, Gymnasium in Itzehoe

Oktober 2005 – Dezember 2010 Christian-Albrecht-Universität zu Kiel  
Studiengang: Zahnmedizin

07.Dezember 2010 Approbation als Zahnärztin

### Promotion

---

Januar 2009 – Oktober 2011 Doktorandin in der Klinik für Kieferorthopädie ,  
Universitätsklinikum Schleswig-Holstein, Campus  
Kiel

### Berufliche Tätigkeiten

---

September – Dezember 2010 Studentische Hilfskraft im Universitätsklinikum  
Schleswig-Holstein, Campus Kiel in der Abteilung für  
Kieferorthopädie

Januar - März 2011 Wissenschaftliche Mitarbeiterin im  
Universitätsklinikum Schleswig-Holstein, Campus  
Kiel in der Abteilung für Kieferorthopädie

seit Juli 2011 Assistenz Zahnärztin in der Praxis Dres. Fuchs und  
Haberkorn in Neckarsulm

## **Eigene Veröffentlichungen**

1. Ott, J., Es-Souni, M., Fischer-Brandies, H. (2010). Vergleich der Anwendbarkeit unterschiedlicher Tetrazoliumsalze in Biotoxizitätsassays in Anwesenheit von Nickel- und Kupferionen. *Posterpräsentation 83. Jahrestagung DGKFO Frankfurt/Main, 10.11.-13.11.2010, ID 723*

## **Ethik-Kommission Antrag**

Diese Studie gehört zum Studienplan „Optimierung der Bioverträglichkeit medizinischer/ zahnmedizinischer Produkte durch geeignete Oberflächenbehandlung“.

Es bestehen keine berufs-ethischen und berufsrechtlichen Bedenken durch die Ethik-Kommission zur Durchführung des Studienplans.

Der Antrag läuft unter der Nummer AZ: D 457/11.

## **Danksagung**

Ich danke Prof. Dr. Fischer-Brandies für die freundliche Überlassung des Themas und die Möglichkeit die Arbeit in seiner Abteilung durchzuführen.

Mein besonderer Dank gilt Frau Dr. Es-Souni für die ausgezeichnete Betreuung und Martina Schneeberg für die hilfreiche Unterstützung im Labor.

Ein herzliches Danke auch meinen lieben Eltern .



