

Institut für Humangenetik, Universität Ulm

Leiter: Prof. Dr. Christian Kubisch

Untersuchungen zur Induktion von genotoxischen Effekten durch Therapie mit Immunsuppressiva

Dissertation

zur Erlangung des Doktorgrades der Medizin
der Medizinischen Fakultät der Universität Ulm

Anna Grecksch

Würzburg

2013

Amtierender Dekan: Prof. Dr. Thomas Wirth

1. Berichterstatter: Prof. Dr. Günter Speit

2. Berichterstatter: Prof. Dr. Holger Barth

Tag der Promotion: 18.12.2014

Meinen Eltern

Inhaltsverzeichnis

Abkürzungsverzeichnis	III
1. Einleitung	1
1.1 Chronisch-entzündliche Darmerkrankungen, rheumatische Erkrankungen und deren Therapie	2
1.2 Genotoxizität von Immunsuppressiva	5
1.3 Genotoxizitätstests	7
1.3.1 Der Comet Assay	7
1.3.2 Der Mikronukleustest (MNT)	8
1.4 Fragestellung	9
2. Material und Methoden	11
2.1 Chemikalien, Reagenzien	11
2.2 Puffer, Lösungen, Medien	12
2.3 Geräte	14
2.4 Materialien	15
2.5 Genotoxizitätstests	16
2.5.1 Testsubstanzen	16
2.5.2 Induktion von DNA-Schäden durch Gammastrahlung	16
2.5.3 Der Comet Assay	17
2.5.4 Der Mikronukleustest (MNT)	18
2.6 Blutproben	22
2.7 Bei Patienten eingesetzte Immunsuppressiva	24
2.8 Statistik	26

3. Ergebnisse	27
3.1 Induktion von DNA-Schäden <i>in vitro</i>	27
3.1.1 Die Effekte von Azathioprin und Infliximab <i>in vitro</i> im Comet Assay	27
3.1.2 Der Effekt von Gammastrahlung im Comet Assay	29
3.1.3 Die Effekte von Azathioprin und Infliximab im <i>in vitro</i> MNT	30
3.2 Genotoxische Effekte im Blut von Patienten nach immunsuppressiver Therapie	36
3.2.1 Comet Assay mit Blut von Patienten unter Therapie mit Azathioprin und Infliximab	36
3.2.2 Comet Assay mit Blut von Kontrollpersonen	36
3.2.3 Comet Assay mit Blut von Patienten unter Therapie mit Cyclophosphamid	37
3.2.4 MNT mit Blut von Patienten unter Therapie mit Azathioprin und Infliximab	37
3.2.5 MNT mit Blut von Kontrollpersonen	40
3.2.6 MNT mit Blut von Patienten unter Therapie mit Cyclophosphamid	43
4. Diskussion	45
4.1 Genotoxizität von Azathioprin und Infliximab <i>in vitro</i> und <i>in vivo</i>	46
4.2 Genotoxische Effekte nach immunsuppressiver Therapie	49
5. Zusammenfassung	57
6. Literaturverzeichnis	59
Danksagung	64
Lebenslauf	65

Abkürzungsverzeichnis

Aza	Azathioprin
CED	chronisch-entzündliche Darmerkrankungen
CO ₂	Kohlendioxid
Cyt B	Cytochalasin B
DCARD	disease controlling antirheumatic drugs
dH ₂ O	destilliertes steriles Wasser
DMARD	disease modifying antirheumatic drugs
DMSO	Dimethylsulfoxid
EDTA	ethylene diamine tetraacetic acid/ Ethylendiamintetraessigsäure
EMA	European Medicines Agency
F _{ab} - Teil	antigenbindender Teil eines Antikörpers
F _c - Teil	Teil der konstanten Kette eines Antikörpers
FCS	fetal calf serum (fötales Kälberserum)
FDA	Food and Drug Administration (USA)
Gy	Gray
HBSS	Hanks Balanced Salt Solution
HCl	Chlorwasserstoff/ Salzsäure
HLA	human leucocyte antigen
HSTCL	hepatosplenaes T- Zell- Lymphom
IARC	International Agency for Research on Cancer
IL- 2	Interleukin- 2
Inh.	Inhibitor
KCl	Kaliumchlorid
Ko	Kontrolle
Komb.	Kombination
Li Heparin	Lithium Heparin
LMP Agarose	low melting temperature agarose
Lsg.	Lösung
MN	Mikronukleus/ Mikronuklei
MNT	Mikronukleustest

Abkürzungsverzeichnis

mS	Millisiemens
MW	Mittelwert
NaCl	Natriumchlorid
NaOH	Natriumhydroxid/Natronlauge
NDI	nuclear division index
NR	Nichtraucher
NSAID	non steroidal anti inflammatory drugs (Nichtsteroidale Antiphlogistika)
Pat.	Patient
PBS	phosphate buffered saline/Phosphatgepufferte Salzlösung
PHA	Phytohämagglutinin
RA	Rheumatoide Arthritis
RPMI	Roswell Park Memorial Institute Blutkulturmedium
SAPHO	Synovitis, Akne, Pustulosis, Hyperostose, Osteitis
SD	standard deviation/Standardabweichung
SCE	sister chromatid exchange/Schwesterchromatidaustausch
S- Phase	Synthesephase
TNF- α	Tumor-Nekrose-Faktor- α
TNFR	Tumor-Nekrose-Faktor- α -Rezeptor
Tris	Tris(hydroxymethyl)-aminomethan
U/min.	Umdrehungen pro Minute
V	Versuch
ZK	Zellkern/Zellkerne
6- MP	6- Mercaptopurin

1. Einleitung

Die US Food and Drug Administration (FDA), die in den USA unter anderem dafür zuständig ist die Sicherheit von Arzneimitteln zu überprüfen, veröffentlichte 2008 eine Studie die besagt, dass Kinder, die mit Tumor-Nekrose-Faktor- α -Inhibitoren (TNF- α -Inhibitoren) behandelt wurden, ein erhöhtes Risiko haben an einem malignen Lymphom zu erkranken (FDA, 2008). Manche der betroffenen Patienten wurden zusätzlich mit Azathioprin therapiert. Die FDA wollte sich, was die Stärke des Zusammenhangs zwischen der immunsuppressiven Therapie und dem Auftreten der Malignome betrifft, nicht festlegen, forderte aber die pharmazeutische Industrie auf, im Beipackzettel von TNF- α -Inhibitoren ausdrücklich vor schweren Nebenwirkungen zu warnen. Besonders das hepatosplenale T-Zell-Lymphom (HSTCL), welches normalerweise sehr selten ist, wird bei Patienten mit chronisch-entzündlichen Darmerkrankungen (CED) unter Therapie mit TNF- α -Inhibitoren und, wie 2011 bekannt wurde, auch bei Patienten, die sich wegen Psoriasis und Rheumatoider Arthritis (RA) in Therapie befinden, häufiger diagnostiziert als in der Normalbevölkerung (Mackey et al., 2007; Parakkal et al., 2011). Im April 2011 wurde deshalb die Warnung der FDA vor dem kanzerogenen Potenzial immunsuppressiver Medikamente ausgeweitet. Die FDA stellte außerdem fest, dass das HSTCL nicht nur unter einer Therapie mit TNF- α -Inhibitoren, sondern auch unter Monotherapie mit Azathioprin, besonders häufig aber unter einer Kombinationstherapie aus mehreren Immunsuppressiva auftritt (FDA, 2011). Gerade für die Kombinationstherapie aus Azathioprin und TNF- α -Inhibitoren konnte aber gezeigt werden, dass diese Behandlung bei CED die bestmögliche Therapie ist, um eine Remission zu erreichen (Cottone et al., 2010). Es wurde zusätzlich darauf hingewiesen, dass möglicherweise die Grunderkrankungen der Patienten, die letztendlich alle chronisch-entzündliche Prozesse sind die zu oxidativem Stress führen, mit einem erhöhten Risiko für maligne Neoplasien einhergehen können (Horneff, 2010; Aslan et al., 2011; Kupcova et al., 2012). Generell ist das vermehrte Auftreten von Malignomen eine bekannte Nebenwirkung immunsuppressiver Therapien, da ein supprimiertes Immunsystem transformierte Zellen schwerer erkennen und eliminieren kann und so die maligne Entartung begünstigt wird. Abgesehen davon stehen einige immunsuppressive

Medikamente schon länger im Verdacht möglicherweise kanzerogen zu sein. Ob die Suppression des Immunsystems der entscheidende Mechanismus ist, der zu erhöhten Krebsrisiken führt, welche Bedeutung genotoxische Effekte als Folge des Entzündungsprozesses haben, oder welchen Beitrag genotoxische Effekte der eingesetzten Medikamente zum Krebsrisiko leisten, konnte bisher nicht abschließend geklärt werden.

1.1 Chronisch-entzündliche Darmerkrankungen, rheumatische Erkrankungen und deren Therapie

Unter dem Begriff chronisch-entzündliche Darmerkrankungen (CED) werden Morbus Crohn und Colitis ulcerosa zusammengefasst. Bei beiden Erkrankungen spielen sich im Verdauungstrakt an jeweils typischen Lokalisationen entzündliche Prozesse ab, die in Schüben verlaufen und zu Durchfällen führen, was die Darmwand auf Dauer schädigt. Deshalb ist es das primäre Ziel der Behandlung, den Entzündungsprozess, der durch T-Lymphozyten vermittelt wird, durch eine Suppression des Immunsystems zu unterbinden. Je nach Schwere der Entzündung und Ausdehnung des Befalls kommen verschiedene Medikamente zum Einsatz. Bei hoher Entzündungsaktivität und einem Nichtansprechen auf Steroide, wird gemäß den Leitlinien eine zusätzliche Therapie mit Azathioprin empfohlen. Erweist sich der Krankheitsverlauf dann weiterhin als therapierefraktär, sind TNF- α -Inhibitoren indiziert.

Zu den Erkrankungen des rheumatischen Formenkreises gehören alle Erkrankungen des Bewegungsapparates die durch Entzündungen hervorgerufen werden, degenerativ oder psychosomatisch bedingt sind. Die entzündlichen rheumatischen Erkrankungen werden eingeteilt in Arthritiden, Spondylarthropathien, Kollagenosen und Vaskulitiden. Die RA ist wohl die bekannteste rheumatische Erkrankung und ist ebenfalls gekennzeichnet durch einen chronisch-entzündlichen Prozess durch autoreaktive T-Lymphozyten, der sich in diesem Fall v. a. an der Synovia der Fingergrund- und proximalen Interphalangengelenke abspielt. Es kann aber auch zu extraartikulären

1. Einleitung

Manifestationen kommen. Wie bei den CED ist der Schaden an Gelenken und betroffenen Organen wie z. B. Herz oder Lunge so gravierend, dass es das Ziel einer jeden Therapie sein muss, den Entzündungsprozess zu kontrollieren. Für die Pharmakotherapie der RA stehen mehrere Substanzklassen zur Verfügung, die nach Bedarf eingesetzt und kombiniert werden können. Ähnlich wie bei den CED kommen Azathioprin und TNF- α -Inhibitoren bei schweren Krankheitsverläufen zum Einsatz, wenn Nichtsteroidale Antiphlogistika (NSAID) und die sogenannten „disease modifying antirheumatic drugs“ (DMARD) nicht ausreichen. Cyclophosphamid findet in der Therapie der RA nur bei sehr aggressiven Verläufen mit extraartikulärer Beteiligung Anwendung, wird aber häufig zur Therapie von Kollagenosen und Vaskulitiden eingesetzt. (Herold, 2011, Karow, 2012).

Die immunsuppressiven Medikamente, die heute zur Therapie von CED und rheumatischen Erkrankungen zur Verfügung stehen, gehören verschiedenen Stoffklassen mit ganz unterschiedlichen Wirkmechanismen an. Ihnen allen gemeinsam ist, dass sie das Immunsystem schwächen, was zur Therapie von Autoimmunerkrankungen nötig und gewünscht ist. Bekannte Nebenwirkungen einer immunsuppressiven Therapie sind ein erhöhtes Risiko für Infektionen und eine erhöhte Inzidenz was maligne Neoplasien angeht. Das gilt v. a. dann, wenn die Medikamente hochdosiert verabreicht werden müssen, wie beispielsweise nach Organtransplantationen. Die Dosierungen, die zur Therapie von Autoimmunerkrankungen benötigt werden, sind niedriger und folglich auch mit geringeren Nebenwirkungen verbunden.

Im Folgenden werden die Substanzen vorgestellt, die im Hinblick auf die Fragestellung in dieser Arbeit untersucht wurden. Azathioprin wird als Zytostatikum, und relativ häufig auch als Immunsuppressivum eingesetzt. Es hemmt die Interleukin-2-induzierte Zellproliferation. Interleukin-2 (IL-2) ist ein proinflammatorisches Zytokin, das bei der Entwicklung von immunkompetenten Lymphozyten aus lymphoiden Vorläuferzellen für mehrere Entwicklungsschritte von besonderer Bedeutung ist. Azathioprin ist ein Purinantagonist, welche zur Gruppe der sogenannten Antimetabolite gezählt werden. Es kann entweder als Azathioprin (Prodrug) oder als 6-Mercaptopurin (Wirkform) verabreicht werden. Im Körper

1. Einleitung

geschieht die Umwandlung von Azathioprin zu 6-Mercaptopurin (6-MP) v. a. durch die Metabolisierung in der Leber, sie ist aber prinzipiell in jeder Zelle möglich. 6-MP wird enzymatisch in 6-Thioguaninnukleotide umgewandelt. Diese werden an Stelle von Purinen in die DNA eingebaut und verhindern so die T-Zell-Proliferation. Man bezeichnet Azathioprin als „phasenspezifisch“, weil es nur in der Synthese-Phase (S-Phase) des Zellzykluses wirkt. Wenn Azathioprin als Immunsuppressivum eingesetzt wird, werden wesentlich niedrigere Konzentrationen benötigt als zur Zytostase. Azathioprin ist ein relativ häufig verordnetes Medikament. Folglich sind mögliche Nebenwirkungen auch schon länger Gegenstand der Forschung.

Infliximab gehört zur Gruppe der „Biologicals“ oder „immunologischen Immunsuppressiva“ und ist ein chimärer monoklonaler Antikörper gegen den humanen TNF- α . Der F_c-Teil ist human, um zu verhindern, dass der Antikörper eine gegen sich gerichtete Immunantwort auslöst, der F_{ab}-Teil ist murin und bindet den humanen TNF- α . TNF- α ist genau wie IL-2 ein proinflammatorisches Zytokin, dem bei Autoimmunerkrankungen wie CED oder RA eine Schlüsselrolle zukommt. Adalimumab und Golimumab sind ebenfalls monoklonale Antikörper gegen TNF- α , allerdings im Gegensatz zu Infliximab vollständig human, ohne murinen Anteil. Der Vorteil gegenüber Infliximab liegt darin, dass Immunantworten gegen den Antikörper selbst deshalb viel seltener sind. TNF- α -Inhibitoren sind relativ neue Medikamente. Die Markteinführung von Infliximab, dem ersten Wirkstoff dieser Substanzklasse, war 1999. Die Zulassung für die Therapie der RA erfolgte wenig später. Sie bedeuteten in der Therapie von rheumatischen Erkrankungen, wie auch in der Therapie von CED, eine Zeitenwende (Cottone, 2011). Man bezeichnet TNF- α -Inhibitoren als „disease controlling antirheumatic drugs“ (DCARD). Diese sind im Gegensatz zu den „disease modifying antirheumatic drugs“ (DMARD) oder „Basismedikamenten“, zu denen u. a. Methotrexat gehört, in der Lage, die Erkrankung vollständig zu kontrollieren, d. h. zum Stillstand zu bringen (Karow, 2012). Gerade weil TNF- α -Inhibitoren so häufig eingesetzt werden, ist die Warnung der FDA besonders ernst zu nehmen. Sollte sich der Verdacht erhärten, dass das gehäufte Auftreten bestimmter Malignome in einem kausalen Zusammenhang mit der Anwendung von TNF- α -Inhibitoren steht, müsste ihr Einsatz im Sinne einer Nutzen-Risiko-Überlegung neu bedacht, und

gegebenenfalls eingeschränkt werden. Das wäre sowohl in der Therapie von rheumatischen Erkrankungen, als auch in der von CED, ein schwerer Rückschlag. Die definitive Klärung der Kanzerogenität wird erst in ein paar Jahren möglich sein, wenn geeignete Langzeitstudien ausgewertet sind.

1.2 Genotoxizität von Immunsuppressiva

Zur Genotoxizität von Azathioprin wurden schon einige Untersuchungen durchgeführt. Sein mögliches genotoxisches Potenzial wurde sowohl in *in vitro* als auch in *in vivo* Genotoxizitätstests untersucht. Außerdem liegen Ergebnisse von Genotoxizitätsstudien mit Patienten vor, die mit Azathioprin oder 6-MP behandelt worden waren. In einer menschlichen Zelllinie induzierte Azathioprin keine GammaH2AX Foci, die einen empfindlichen Indikator für DNA-Doppelstrangbrüche darstellen (Zhou et al., 2006). Im Comet Assay, der sowohl DNA-Einzelstrangbrüche als auch DNA-Doppelstrangbrüche nachweist, lieferte eine Studie mit menschlichen Fibroblasten positive Ergebnisse. Ein deutlicher Effekt ergab sich insbesondere in der Modifikation des Comet Assays mit dem Enzym OGG1, welches oxidativ geschädigte DNA-Basen nachweist (Cooke et al., 2008). 6-MP führte jedoch in einer anderen Arbeit nicht zur Induktion von DNA-Strangbrüchen in Maus-Lymphom-Zellen (Miyamae et al., 1998). In kultivierten menschlichen Lymphozyten induzierte Azathioprin weder Chromosomenaberrationen noch Schwesterchromatidaustausche (SCE) (Apelt et al., 1981). Im Gegensatz zu diesem Ergebnis induzierte Azathioprin in einer späteren Studie an kultivierten menschlichen Lymphozyten Mikronuklei (MN) (Vian et al., 1993). Ein positives Ergebnis zeigte sich sowohl in Versuchen mit metabolischer Aktivierung als auch in Abwesenheit eines exogenen Metabolisierungssystems (S9-Mix). Im *in vivo* Mikronukleustest (MNT) mit dem Knochenmark von Mäusen und Ratten ließ sich für Azathioprin in hoher Dosierung eine dosisabhängige Induktion von MN nachweisen (van Went, 1979). Dieses positive Ergebnis wurde in einer späteren Studie bestätigt, in der neben einer akuten Exposition auch eine subchronische Exposition untersucht wurde (Henderson et al., 1993). In einer modernen Variante des *in vivo* MNT in

1. Einleitung

Kombination mit Durchflusszytometrie wurde für Azathioprin ebenfalls ein positives Ergebnis gezeigt (Torous et al., 2003). Auch der Metabolit 6-MP induzierte MN im Knochenmark und in Retikulozyten von Ratten nach subchronischer Exposition (Asanami et al., 1995). Neben diesen chromosomalen Effekten wurde auch die Induktion von Genmutationen durch Azathioprin in der transgenen „MutaMouse“ untersucht (Smith et al., 1999). Eine hohe Azathioprin-Dosis bewirkte einen eindeutigen Anstieg der Mutationsrate im Knochenmark und in der Leber. Insgesamt zeigen diese Studien, dass Azathioprin über ein mutagenes Potenzial verfügt, das in Standardgenotoxizitätstests *in vitro* und *in vivo* nachgewiesen wurde.

Untersuchungen an Patienten, die mit Azathioprin behandelt wurden, ergaben bisher kein einheitliches Bild. In einer frühen Studie fand man bei Kindern nach längerer Azathioprintherapie erhöhte Raten von Chromosomenaberrationen in kultivierten peripheren Lymphozyten (van Went, 1979). Im Unterschied dazu wurden im Blut von 28 Patienten mit Multipler Sklerose nach Azathioprintherapie keine erhöhten Raten an Chromosomenbrüchen gemessen (Apelt et al., 1981). Andererseits zeigten Kinder mit Colitis ulcerosa unter Therapie mit 6-MP erhöhte MN-Häufigkeiten in kultivierten Lymphozyten (Holland et al., 2007). Andere Studien berichteten über erhöhte Raten an chromosomalen Aberrationen und MN im Blut von Patienten mit Colitis ulcerosa, wobei die Therapie nicht genau beschrieben wurde (Aslan et al., 2011; Karaman et al., 2012). Es ist in diesem Zusammenhang zu bedenken, dass die Grunderkrankung selbst, d. h. der chronische Entzündungsprozess zu genotoxischen Effekten führen kann. In Experimenten mit Mäusen wurde eindeutig nachgewiesen, dass Entzündungsprozesse im Darm über den TNF- α /Tumornekrosefaktorrezeptor-Signalweg (TNF- α /TNFR-Signalweg) zu systemischen genotoxischen Effekten führen können (Westbrook et al., 2011; 2012).

Für Infliximab wurden bisher keine systematischen Studien zur Genotoxizität und Mutagenität publiziert. Für diese Art von Substanzen besteht grundsätzlich auch keine Besorgnis im Hinblick auf eine genotoxische Wirkung. Dennoch wurden im Rahmen des Zulassungsverfahrens die üblichen Genotoxizitätstests durchgeführt (EMA, 2005). In Lymphozytenkulturen führte Infliximab zu einer Reduktion

methotrexatinduzierter SCE, was als protektiver Effekt interpretiert wurde (Jarmalaite et al., 2008). In einer anderen Studie zeigten Patienten mit Morbus Crohn erhöhte SCE-Raten, die nach Therapie mit Infliximab erniedrigt waren (Danaloglu, 2009).

In mehreren Studien wurde über eine apoptosebeeinflussende Wirkung von Infliximab berichtet (ten Hove et al., 2002; Ringheanu et al., 2004; Bedini et al., 2007; Coury et al., 2008). Diese Daten werden jedoch nicht im Zusammenhang mit einer möglichen toxischen Wirkung von Infliximab gesehen und im Hinblick auf die therapeutische Wirkung werden sie kontrovers diskutiert (ten Hove et al., 2002; Ringheanu et al., 2004; Coury et al., 2008).

1.3 Genotoxizitätstests

Es stehen zahlreiche verschiedene Genotoxizitätstests zur Verfügung, um DNA-schädigende und mutagene Wirkungen von Substanzen nachzuweisen. Der Comet Assay ist ein sensitiver Indikatorntest zum Nachweis von DNA-Strangbrüchen in Einzelzellen. Er wird sowohl als *in vitro* Suchtest (screening test) als auch als *in vivo* Test zum Nachweis organspezifischer Genotoxizität in Genotoxizitätsprüfungen eingesetzt. Der Mikronukleustest (MNT) ist eine etablierte Methode um chromosomale Mutationen und Aneuploidien *in vitro* und *in vivo* zu erfassen.

1.3.1 Der Comet Assay

Der Comet Assay ist ein sensitiver Test um DNA-Schäden nachzuweisen (Speit und Rothfuss, 2012). Es handelt sich um eine Einzelzellgelelektrophorese unter alkalischen Bedingungen. DNA-Strangbrüche führen dazu, dass sich die DNA entspannt und in Schleifen und Fragmenten in Richtung Anode wandert. Nach Anfärbung mit Ethidiumbromid können die so entstandenen Kometen mit einem Bildanalysesystem unter dem Fluoreszenzmikroskop vermessen werden. Länge

1. Einleitung

und Intensität des Kometen verhalten sich direkt proportional zum Ausmaß der DNA-Schädigung.



Abb. 1: Leukozyten nach Durchführung des Comet Assay; (a) unbehandelte Zellen ohne nachweisbare DNA-Schäden; (b) bestrahlte Zellen (2 Gy) mit sichtbaren DNA-Schäden

1.3.2 Der Mikronukleustest (MNT)

Der MNT ist ein Test zum Nachweis struktureller und numerischer Chromosomenmutationen. Als Marker für die mutagene Wirkung eines Agens dient die Häufigkeit von Zellen mit Mikronuklei (MN). MN entstehen bei der Zellteilung, wenn Chromosomenfragmente oder ganze Chromosomen nicht in die Tochterkerne integriert werden und einen zusätzlichen kleinen Zellkern in der Tochterzelle bilden (Fenech, 2007). Sie können also das Ergebnis eines klastogenen oder aneugenen Effekts sein. Um sicher zu stellen, dass die Zellen, die zur Auswertung herangezogen werden, sich nach der Exposition gegenüber dem potenziell mutagenen Agens geteilt haben, wird den Zellkulturen Cytochalasin B (Cyt B) zugesetzt, welches die Zellteilung nach erfolgter Kernteilung verhindert und zur Ausbildung binukleärer Zellen führt (Fenech, 2007). MN werden dann in diesen binukleären Zellen gezählt. Der MNT wird im Rahmen des Biomonitoring häufig mit Lymphozytenkulturen von Personen durchgeführt, die potenziell gegenüber einem Mutagen exponiert waren. MN können in diesem Fall als Folge der Mutagenexposition bereits *in vivo* gebildet werden oder erst *in vitro*, als Folge *in vivo* induzierter DNA-Schäden. Die Analyse von MN in binukleären Zellen erlaubt keine Aussage über den Entstehungszeitpunkt der MN (*in vitro* oder *in vivo*). Bereits *in vivo* gebildete MN können in mononukleären Lymphozyten bestimmt werden, die sich *in vitro* noch nicht geteilt haben (Speit et

al., 2011). Der MNT gewinnt immer mehr Bedeutung im humanen Biomonitoring zum Nachweis mutagener Expositionen und genomischer Instabilität (Kirsch-Volders et al., 2001; 2011). Es gibt sogar Hinweise darauf, dass die MN-Häufigkeit in Lymphozyten mit dem Krebsrisiko des jeweiligen Individuums korreliert, weswegen sich der MNT diesbezüglich möglicherweise als prädiktiver Test eignet (Bonassi et al., 2007).



Abb. 2: Lymphozyten nach Durchführung des Mikronukleustests (MNT); (a) mono- und (b) binukleäre Zellen mit jeweils einem Mikronukleus

1.4 Fragestellung

Aufgrund der Warnung der FDA von 2011 ist es von Interesse, welche Rolle Azathioprin und TNF- α -Inhibitoren bei der Entstehung von Malignomen bei Patienten mit chronisch-entzündlichen Erkrankungen spielen.

Es konnte bisher keine abschließende Aussage dazu gemacht werden,

- welchen Anteil die Grunderkrankungen selbst im Zusammenhang mit der malignen Entartung möglicherweise haben,
- welchen Beitrag die pharmakotherapeutisch induzierte Immunsuppression zum Krebsrisiko leistet und
- ob ein mutagenes/kanzerogenes Potenzial der immunsuppressiven Medikamenten zur Krebsentstehung beiträgt.

Diese Arbeit konzentriert sich auf die therapeutisch eingesetzten Substanzen und deren mögliche Genotoxizität / Mutagenität. Es sollte untersucht werden, ob sich, in Leukozyten des peripheren Blutes von Patienten unter Kombinationstherapie

1. Einleitung

mit Azathioprin und einem TNF- α - Inhibitor, DNA-Schäden und chromosomale Veränderungen nachweisen lassen, die für die Entstehung von malignen Neoplasien verantwortlich sein könnten. Zu diesem Zweck sollte das Blut von Patienten mit zwei geeigneten Genotoxizitätstests untersucht werden, dem Comet Assay und dem MNT. Der Comet Assay weist primäre DNA-Schäden (DNA-Strangbrüche) nach, der MNT dient dem Nachweis struktureller und numerischer chromosomaler Veränderungen. Im Falle einer Induktion von MN erlauben spezielle Testprotokolle eine Aussage darüber, ob die chromosomalen Veränderungen bereits *in vivo* gebildet wurden oder erst *in vitro*, im Verlauf der Kultivierung von Lymphozyten, als Folge *in vivo* induzierter DNA-Schäden.

Um das genotoxische Potenzial der eingesetzten Medikamente zu charakterisieren, sollten ergänzende *in vitro* Experimente ebenfalls mit dem Comet Assay und dem MNT durchgeführt werden. Über die Anwendung verschiedener Testprotokolle sollten zusätzliche Informationen über den möglichen genotoxischen Wirkmechanismus gewonnen werden.

Frühere Untersuchungen hatten schon auf ein genotoxisches /mutagenes Potenzial von Azathioprin hingewiesen. TNF- α -Inhibitoren stehen bisher nicht im Verdacht genotoxische / mutagene Eigenschaften zu haben. Da aber das HSTCL gerade bei Patienten mit Kombinationstherapie vermehrt beobachtet wurde, sollte in diesen Experimenten auch der Frage nachgegangen werden, ob TNF- α -Inhibitoren die genotoxische Wirkung von Azathioprin in irgendeiner Weise verstärken.

2. Material und Methoden

2.1 Chemikalien, Reagenzien

Acridinorange	Merck, Darmstadt
Agarose NEEO Ultra-Qualität	Roth, Karlsruhe
Azathioprin	Sigma-Aldrich, Steinheim
Cytochalasin B (Cyt B)	Sigma-Aldrich, Steinheim
Dimethylsulfoxid (DMSO)	Sigma-Aldrich, Steinheim
Essigsäure 100 %	VWR Prolabo, Fontenay-sous-Bois, Frankreich
Ethanol (absolut)	Sigma-Aldrich, Steinheim
Ethidiumbromid	Sigma-Aldrich, Steinheim
fetal calf serum (FCS)	Biochrom, Berlin
Gentamycin	Biochrom, Berlin
Hanks Balanced Salt Solution (HBSS)	PAN Biotech GmbH, Aidenbach
Chlorwasserstoff (HCl)	Merck, Darmstadt
Kaliumchlorid (KCl)	Merck, Darmstadt
Lithium-Heparin Monovetten 7,5 ml	Sarstedt, Nümbrecht
Low melting temperature (LMP)	
Sea Plaque GTG Agarose	Cambrex, Rockland, USA
Methanol	Sigma- Aldrich, Steinheim
Natriumchlorid (NaCl) 0,9 %	Braun, Melsungen
Natrium-EDTA (Na ₂ EDTA)	Applichem, Darmstadt
Natriumhydroxid (NaOH)	Applichem, Darmstadt

2. Material und Methoden

phosphate buffered saline (PBS)	Biochrom, Berlin
Phytohämagglutinin (PHA)	Invitrogen, Carlsbad, USA
Remicade (Infliximab)	Janssen Biologics B.V. Leiden, Niederlande
RPMI 1640-Medium	Gibco, Karlsruhe
Tris(hydroxymethyl)-aminomethan (Tris)	Affymetrix, USB Products Cleveland, USA
Triton X-100	Sigma-Aldrich, Steinheim

2.2 Puffer, Lösungen, Medien

Acridinorange-Färbelösung	125 µg/ml Acridinorange, 10 ml Sörensenpuffer Lösung A, 10 ml Sörensenpuffer Lösung B, ad 100 ml mit dH ₂ O
Azathioprin-Lösung	5 mg/ml in DMSO; Weiterverdünnung mit HBSS
Elektrophoresepuffer für Comet Assay	600 ml NaOH, 100 ml Na ₂ EDTA, mit dH ₂ O auf 20 l auffüllen, pH 13, Leitfähigkeit 60-65 mS/cm
Ethidiumbromid-Färbelösung	10 µg/ml in dH ₂ O

2. Material und Methoden

Fixierlösung für MNT	Methanol/Eisessig 5+1
Hypotone Lösung für MNT	0,56 g KCl in 100 ml dH ₂ O
LMP-Agarose 0,5 %	0,5 g in 100 ml PBS-Puffer
Lyselösung für Comet Assay	7,5 ml DMSO, 66,75 ml Lysepuffer, 750 µl Triton X-100
Lysepuffer für Comet Assay	2,5 M NaCl, 100 mM Na ₂ EDTA 10 mM Tris, durch NaOH- Plätzchen auf pH 10 eingestellt
NEEO-Agarose 1,5 %	1,5 g in 100ml PBS
PBS-Puffer	95,5 g PBS in 1000 ml dH ₂ O
RPMI-Medium	500 ml + 20ml FCS, 1,2 ml PHA, 1,2ml Gentamycin
Sörensenpuffer Lsg. A	0,33 M Na ₂ HPO ₄
Sörensenpuffer Lsg. B	0,33 M KH ₂ PO ₄
Remicade-Lösung	10 mg/ml in dH ₂ O Weiterverdünnung mit dH ₂ O
Tris(hydroxymethyl)-aminomethan (Tris)	48,5g Tris auf 900 ml mit dH ₂ O aufgefüllt

2. Material und Methoden

Vorfixierlösung für MNT

Methanol/Eisessig 5+1;
1:1 mit 0,9%igem NaCl
gemischt

2.3 Geräte

Absaugpumpe KNF Typ N86 KN.18

KNF Neuberger, Freiburg

Air Flow Laminar HB 2448K

Heraeus, Hanau

Bestrahlungsgerät Gammacell 2000

Nuclear Data, Frankfurt

Kohlendioxid (CO₂)– Brutschrank Typ B6200

Heraeus, Hanau

Comet – Assay Messsystem

Perceptive Instruments,
Haverhill, UK

Elektrophoresekammer Sub-cell GT
für Comet Assay

Bio RAD Laboratories GmbH
München

Fluoreszenzmikroskop Axiophot 451887
und 451889

Zeiss, Oberkochen

Fluoreszenzmikroskop Axio Imager AZ

Zeiss, Oberkochen

Heizplatte

Medax, Kiel

Lichtmikroskop 467065-9905

Zeiss, Oberkochen

Microcomputer Electrophoresis
Power Supply, Consort E 425

Labortechnik Fröbel GmbH,
Lindau

2. Material und Methoden

Pipetten	Gilson, Middleton, USA
Thermomixer 5436	Eppendorf, Hamburg
Wasserbad	Gesellschaft für Labortechnik, Burgwedel
Zentrifuge Rotanta Typ 3500	Hettich, Tuttlingen
Zentrifuge Laborfuge 400	Heraeus, Hanau

2.4 Materialien

Blutkulturröhrchen	Greiner, Nürtingen
Deckgläser	Menzel, Braunschweig
Objektträger mit Mattrand Menzelgläser, geschnitten	Thermo Scientific Waltham, USA
Pasteurpipetten aus Glas	Brand, Wertheim
Plastikpipetten	Costar, Corning, USA
Reaktionsgefäße	Roth, Karlsruhe
Transferpipetten	Sarstedt, Nümbrecht

2.5 Genotoxizitätstests

2.5.1 Testsubstanzen

Azathioprin lag als Pulver vor. Es wurde in DMSO gelöst und eine Stammkonzentration (5mg/ml) hergestellt. Diese wurde tiefgefroren, für die Versuche einmalig aufgetaut und mit HBSS weiterverdünnt. Für die Versuche wurden folgende Konzentrationen hergestellt: 2, 5, 10, 20, 40, 80 und 120 µg/ml.

Auch Infliximab lag in Pulverform vor, so wie es zur Herstellung einer Infusionslösung für die Behandlung von Patienten handelsüblich ist. Es wurde für die *in vitro* Versuche in sterilem destilliertem Wasser gelöst und weiterverdünnt. Die Stammlösung (10mg/ml) wurde tiefgefroren gelagert und für die Versuche einmalig aufgetaut. Es wurden die Konzentrationen 1, 10, 100 und 1000 µg/ml getestet.

2.5.2 Induktion von DNA-Schäden durch Gammastrahlung

Gammastrahlung wurde als Positivkontrolle eingesetzt, um die Sensitivität des Comet Assays zu demonstrieren. Gammastrahlung erzeugt überwiegend DNA-Einzel- und Doppelstrangbrüche, die im Comet Assay eine DNA-Migration hervorrufen. Im Rahmen der mit Gammastrahlung durchgeführten Versuche wurden jeweils 500 µl Blut mit einem Bestrahlungsgerät (Gammacell 2000, Dosisleistung 3,5 Gy/ min.) 17 bzw. 34 Sekunden lang bestrahlt (entspricht 1 und 2 Gy), die Proben danach sofort auf Eis gestellt und auf die Objektträger für den Comet Assay aufgetragen.

2.5.3 Der Comet Assay

Der Comet Assay wurde eingesetzt, um eventuelle DNA-Strangbrüche nachzuweisen. Die Objektträger für den Comet Assay wurden mit einer Basalschicht versehen, die aus 1,5 %-iger Agarose besteht (500µg Agarose in 100 ml PBS aufgekocht). In diese wurden die Objektträger bei 60 °C eingetaucht. Zur besseren Haftung der Agarose wurden die Objektträger vorher einige Millimeter vom schmalen Rand entfernt mit einem Diamantstift eingeritzt. Nach dem Trocknen können die so vorbereiteten Objektträger einige Zeit aufbewahrt, und nach Bedarf verwendet werden. Zur Vorbereitung des Tests wurde LMP-Agarose bei 80 °C geschmolzen und danach bei 37 °C flüssig gehalten. Die Lyselösung, bestehend aus 7,5 ml DMSO, 66,75 ml Lysepuffer und 750 µl Triton X-100 wurde am Versuchstag hergestellt und für mindestens 1 h im Kühlschrank (4 °C) aufbewahrt. Zur Herstellung der Präparate für den Comet Assay wurden 5 µl Blut in einem Eppendorfgefäß mit 120 µl LMP-Agarose vorsichtig gemischt, auf die vorbeschichteten Objektträger gegeben, mit einem Deckglas versehen und auf Eis gelegt, damit die zellhaltige Agaroseschicht geliert. Das Deckglas wurde nach dem Gelieren vorsichtig abgezogen. Danach wurden die Präparate für mindestens 1 h bei 4 °C in einem abgedunkelten Gefäß in die Lyselösung gestellt. Dieser Schritt dient dazu, die Zell- und Kernmembranen aufzulösen und chromosomale Proteine zu entfernen, um die DNA freizulegen. Die Elektrophoresekammer wurde in einem Eiswasserbad genau waagrecht platziert, die Objektträger mit der Gelschicht nach oben in die Kammer gelegt und mit Elektrophoresepuffer übergossen. Ab dem Zeitpunkt zu dem alle Objektträger mit Puffer bedeckt waren, wurde die Alkalidenaturierung für exakt 25 min. durchgeführt. Danach startete sofort die Elektrophorese bei 25 Volt und 300 Milliampere. Diese Bedingungen wurden durch Zugabe bzw. Abpipettieren des Puffers erreicht. Die Elektrophorese dauerte ebenfalls genau 25 min. Sowohl bei der Alkalidenaturierung als auch bei der Elektrophorese ist darauf zu achten, dass die Präparate vor direkter Lichteinstrahlung geschützt werden, um die Induktion von DNA-Strangbrüchen durch Lichteinwirkung zu verhindern. Nach der Elektrophorese wurden die Objektträger auf ein Abtropfgestell gelegt und dreimal vorsichtig für jeweils 5 min. mit Neutralisationspuffer (Tris) übergossen. Nach dem dritten Übergießen folgten

2. Material und Methoden

noch weitere 5 min. in 100%igem Ethanol, bevor die Objektträger bei Raumtemperatur getrocknet wurden. Zum Anfärben der Präparate wurde eine Ethidiumbromidlösung (10 µg/ml) verwendet. Auf jeden Objektträger wurden 50 µl pipettiert und dieser dann mit einem Deckglas versehen. Die Auswertung erfolgte mittels Bildanalyzesystem unter einem Fluoreszenzmikroskop mit 40-facher Vergrößerung. Aus jeder Blutprobe wurden zwei Präparate hergestellt und jeweils 50 nacheinander ins Gesichtsfeld kommende Zellen pro Präparat ausgewertet. Für die Auswertung mittels PC-gestütztem Bildanalyzesystem wurden die Softwareversionen „Comet II“ und „Comet IV“ verwendet. Als Parameter für die Darstellung der Ergebnisse wurde das „Tailmoment“ (TM) gewählt. Es errechnet sich wie folgt:

$$TM = \frac{\text{(Intensität des Kometenkopfes)}}{\text{(Intensität des gesamten Kometen)}} \times \text{(Entfernung Schwerezentrum Schweif} \rightarrow \text{Kopf)}$$

Im Verlauf der Studie wurde das Auswertesystem (Comet II) durch ein aktualisiertes (Comet IV) ersetzt. Die Objektträger der Pat. 1 bis 20, die der Kontrollen 1 bis 10 und V1, Tab. 4, wurden mit „Comet II“ ausgewertet, die der Pat. 21 bis 25, sowie alle anderen *in vitro* Versuche mit „Comet IV“. Die Einstellungen am Mikroskop und am Bildanalyzesystem wurden so angepasst, dass eine direkte Vergleichbarkeit der Ergebnisse gewährleistet war.

2.5.4 Der Mikronukleustest (MNT)

Der MNT wurde eingesetzt, um genotoxische Effekte der bei den Patienten eingesetzten Medikamente *in vitro* und *in vivo* zu untersuchen. Pro Ansatz wurden 500 µl Probanden- bzw. Patientenblut in ein Flachbodenröhrchen mit 4,5 ml RPMI-Medium (mit HEPES-Puffer) pipettiert. Den Kulturen wurde 1 % PHA zugesetzt, um die T-Lymphozyten zur Proliferation anzuregen. Bei den *in vitro* Versuchen wurde für jede Konzentration eine Kultur angesetzt. Aus den Patientenproben wurde ein 3-fach-Ansatz hergestellt, um sicher zu stellen, dass nach der Kultivierung ausreichend Lymphozyten zur Auswertung vorhanden waren. Dies war nötig, da

2. Material und Methoden

zum Zeitpunkt des Ansatzes, der zeitnah nach der Blutentnahme erfolgte, die aktuellen Laborwerte noch nicht zur Verfügung standen, aber aufgrund der Medikation bei manchen Patienten von einer Leukozytopenie auszugehen war. War das der Fall, ließen sich die Lymphozyten ungleich schwerer anzüchten als bei Blutproben mit einem normwertigen „Weißen Blutbild“. Im Sinne von standardisierten Testbedingungen wurde bei allen Patientenproben ein 3-fach-Ansatz durchgeführt. Bei den Proben der Kontrollgruppe war ein Doppelansatz ausreichend. Die Proben wurden im Brutschrank (5 % CO₂, 37 °C) je nach Versuchsprotokoll für 24 h bzw. für 72 h inkubiert. Folgende Versuchsprotokolle wurden verwendet:

Protokoll A: Präparation nach 24 h, Analyse von MN in mononukleären Zellen

Protokoll B: Zugabe von Cyt B nach 48 h, Präparation nach 72 h, Analyse von MN in mononukleären Zellen.

Protokoll C: Zugabe von Cyt B nach 48 h, Präparation nach 72 h, Analyse von MN in binukleären Zellen, Bestimmung des „nuclear division index“ (NDI).

Protokoll B und C wurden auf dem selben Objektträger hintereinander ausgewertet.

Präparation:

Die Flachbodenröhrchen wurden aus dem Brutschrank genommen und 10 min. lang bei 900 U/min. zentrifugiert. Auch bei allen folgenden Zentrifugierschritten war die Zentrifuge so eingestellt. Nach Absaugen des Überstandes bis knapp über dem Pellet wurden die Zellen in Transferpipetten aufgenommen und in 5 ml einer 4 °C kalten 0,56%igen KCl-Lösung gegeben. Da der osmotische Druck dieser Lösung geringer ist als der in den Zellen, kommt es zu einem Wassereinstrom in die Zellen und das Zytoplasma quillt auf. Dieser Schritt ist wichtig, da die Zellen eine bestimmte Größe erreichen sollen, um sie unter dem Mikroskop adäquat beurteilen zu können. Bleibt das Zytoplasmavolumen zu klein, besteht die Gefahr, dass MN übersehen werden. Dieses Problem ist in den Vorversuchen bei den 24h-Präparaten aufgetreten, weshalb die Präparation bei Protokoll A insofern abgeändert wurde, dass die 0,56%ige KCl-Lösung im Wasserbad auf 37 °C

2. Material und Methoden

erwärmt wurde. Das Zytoplasmavolumen konnte dadurch so vergrößert werden, dass eine Beurteilung der Zellen unter dem Mikroskop möglich war. Sofort nach der KCl-Zugabe wurden die Proben wieder 10 min. zentrifugiert, da die Zellen bei zu lange bestehender Hypotonie platzen würden. Im nächsten Schritt wurden nach Absaugen des Überstands, Resuspendierung und Aufnahme in die Transferpipetten 5 ml eiskalte Vorfixierlösung (Methanol/Eisessig 5+1, 1:1 mit 0,9%iger NaCl-Lösung) auf die Zellen gegeben. Das Aufnehmen in die Transferpipetten dient dazu, dass die Zellen nicht durch die Zugabe der Fixierlösung am Boden des Kulturröhrchens haften bleiben, sondern vorsichtig mit dieser gemischt werden können. Danach wurden die Proben für 10 min. bei Raumtemperatur inkubiert und wieder 10 min. abzentrifugiert. Es folgten drei Fixierungsschritte analog zur Vorfixierung, mit dem Unterschied, dass die Proben im Fixativ (Methanol/Eisessig 5+1) vor dem Zentrifugieren 15 min. statt 10 min. bei Raumtemperatur inkubiert wurden. Nach den drei Fixierungsschritten und dem erneuten Absaugen des Überstandes folgte das Auftropfen der Suspension auf die Objektträger. Es wurden mit einer Pipette jeweils 200 µl Suspension auf einem Objektträger verteilt. Das Präparat wurde dann bei Raumtemperatur unter vorsichtigem Schwenken kurz angetrocknet und danach auf einer Heizplatte (ca. 60 °C) vollständig getrocknet. Die Qualität der Präparate wurden unter einem Lichtmikroskop überprüft und die besten Präparate für die Auswertung ausgewählt. Qualitätskriterien waren Zellgröße, Zelldichte, Zellkonturen und Hintergrund. Die ausgewählten Objektträger wurden für die Auswertung unter dem Fluoreszenzmikroskop erst kurz in Acridinorangelösung getaucht, dann in Wasser gespült und mit einem Deckglas versehen.

Auswertung:

Es wurden pro Versuch 1000 Zellen auf das Vorhandensein von MN hin analysiert. In den Versuchen nach Protokoll A und B wurden mononukleäre Zellen ausgewertet. In den Versuchen nach Protokoll C wurden binukleäre Zellen ausgewertet. Gezählt wurden die ersten 1000 Zellen die ins Gesichtsfeld kamen, sofern sie ein intaktes Zytoplasma hatten und sich nicht berührten. MN erscheinen als extranukleäre Körperchen, die bestimmte Kriterien erfüllen müssen (Fenech, 1993):

2. Material und Methoden

- 1) MN-haltige (binukleäre) Zellen haben zwei ähnlich große Hauptkerne.
- 2) MN sind morphologisch identisch zum Hauptkern.
- 3) Der Durchmesser der MN liegt zwischen 1/16 und 1/3 des Hauptkernvolumens.
- 4) MN sind nicht über Plasmabrücken mit dem Hauptkern verbunden.

Beim Zählen der MN für die vorliegende Arbeit kamen diese Kriterien zur Anwendung.

In Protokoll C wurde außerdem der „nuclear division index“ (NDI) ermittelt, welcher ein Maß für das Wachstum der Lymphozyten darstellt. Hierfür wurden die ersten 500 Zellen im Gesichtsfeld, mit intaktem Zytoplasma bzw. Zellkernen, gewertet. Es wurde die Anzahl der Zellen mit einem Zellkern (1 ZK), mit zwei Zellkernen (2 ZK), mit drei Zellkernen (3 ZK) usw. ermittelt und der NDI dann nach folgender Formel berechnet:

$$NDI = \frac{(1 \times 1 \text{ ZK}) + (2 \times 2 \text{ ZK}) + (3 \times 3 \text{ ZK}) + (4 \times 4 \text{ ZK}) \text{ usw.}}{\text{Anzahl der gewerteten Zellen (= 500)}}$$

Für die *in vitro* Tests wurden Blutkulturen von gesunden Spendern angesetzt und unter den oben beschriebenen Standardbedingungen für 72 h kultiviert und anschließend präpariert (Protokoll B und C). Die Exposition erfolgte bei den Versuchen mit Azathioprin für 28 h und 72 h, bei den Versuchen mit Infliximab und in den Kombinationsversuchen für 72 h. Die Auswertung umfasste jeweils 1000 mononukleäre und 1000 binukleäre Zellen (Protokoll B und C).

2.6 Blutproben

Den Patienten und Probanden wurden 10 ml Vollblut aus einer peripheren Vene entnommen. Es wurden Li-Heparin-Monovetten verwendet um zu verhindern, dass das Blut koaguliert. In dieser Studie wurden ein Patientenkollektiv und eine Kontrollgruppe untersucht.

Die Patienten waren zum Zeitpunkt der Blutentnahme zwischen 21 und 78 Jahre alt (Altersdurchschnitt 46,8 Jahre) und befanden sich aufgrund von CED oder rheumatischen Erkrankungen in Behandlung in der Klinik für Innere Medizin am Universitätsklinikum Ulm. Diese Erkrankungen werden u. a. mit Azathioprin und TNF- α -Inhibitoren behandelt. Die Patienten wurden aufgrund ihrer Therapieschemata in die Studie aufgenommen. Ausschlusskriterien waren stattgehabte Bestrahlungen oder eine Therapie mit Zytostatika. Für die Kontrollgruppe wurde Blut von gesunden Probanden gewonnen. Diese waren zum Zeitpunkt der Blutentnahme zwischen 26 und 64 Jahre alt (Altersdurchschnitt 45,3 Jahre). Alle Kontrollpersonen waren Nichtraucher. Die Studie wurde vorab von der Ethikkommission der Universität Ulm geprüft und genehmigt. Für die Aufklärung der Patienten und Probanden wurden Informationsblätter und Einwilligungserklärungen angefertigt, auf denen die Teilnehmer ihr schriftliches Einverständnis gaben. Die Auswertung der Proben erfolgte kodiert und anonymisiert.

2. Material und Methoden

Tab. 1: Patienten, kodiert nach Nummern mit Geschlecht, Alter, Grunderkrankung und Raucherstatus

Patient	Geschlecht	Alter	Erkrankung	Raucherstatus
1	m	54	SAPHO-Syndrom	25/d
2	m	38	Morbus Crohn	10-15/d
3	m	50	Spondylitis ankylosans	NR seit 8 Jahren
4	m	34	Colitis ulcerosa	NR seit 3 Monaten
5	m	48	HLA-B27-assoziierte Spondylarthropathie	10/d
6	w	35	Rheumatoide Arthritis	NR
7	m	50	Colitis ulcerosa	NR
8	m	59	Morbus Wegener	NR
9	w	75	Jo 1-Syndrom, Polymyositis	NR
10	m	33	Enteropathieassoziierte Spondylarthropathie	10/d
11	m	78	Colitis ulcerosa	NR
12	w	24	Morbus Crohn	NR
13	m	60	Colitis ulcerosa	NR
14	m	46	Colitis ulcerosa	NR
15	w	47	Morbus Crohn	10-15/d
16	m	23	Morbus Crohn	NR
17	w	42	Colitis ulcerosa	NR seit 2 Jahren
18	w	43	Morbus Crohn	NR
19	m	49	Morbus Crohn	NR seit 4 Jahren
20	m	21	Colitis ulcerosa	3/d
21	m	46	Morbus Wegener	NR seit 1 Jahr
22	w	49	Churg-Strauss-Syndrom	NR seit 7 Jahren
23	m	23	Wegenergranulomatose	NR
24	w	74	Rheumatoide Arthritis	NR
25	m	69	Purpura Schoenlein-Henoch	8/d

m=männlich; w=weiblich; NR=Nichtraucher; d=Tag

2.7 Bei den Patienten eingesetzte Immunsuppressiva

In die Studie wurden Patienten mit verschiedenen immunsuppressiven Therapien aufgenommen.

Gruppe 1: Monotherapie mit Azathioprin

Gruppe 2: Monotherapie mit einem TNF- α -Inhibitor

Gruppe 3: Kombinationstherapie mit Azathioprin und einem TNF- α -Inhibitor

Gruppe 4: Monotherapie mit Cyclophosphamid

Gruppe 1 und 2 setzten sich jeweils aus 5 Patienten zusammen. Gruppe 3 umfasste 10 Patienten, da die Kombinationstherapie aus Azathioprin und TNF- α -Inhibitor von besonderem Interesse war. Auf Gruppe 4 entfallen weitere 5 Patienten. Cyclophosphamid wird bei CED und rheumatischen Erkrankungen als Reservetherapeutikum eingesetzt, da es ein bekanntes Mutagen ist. Es hat für diese Arbeit als mutagene Referenzsubstanz einen besonderen Stellenwert.

Tab. 2: Patienten, kodiert nach Nummern, mit aktueller Therapie , Zeitpunkt der Erstexposition gegenüber der Medikation und Therapiedauer zum Zeitpunkt der Blutentnahme

Patient	Therapie	Erstexposition gegenüber der Medikation	Therapiedauer zum Zeitpunkt der Blutentnahme
Gruppe 1 (Monotherapie Azathioprin)			
8	Azathioprin 50 mg 1-1-1 ¹⁾	März 11	7 Monate
9	Azathioprin 50 mg 1-0-1 ¹⁾	Dezember 07	46 Monate
11	Azathioprin 50 mg 1-0-0 ¹⁾	Januar 11	9 Monate
13	Azathioprin 50 mg 4-0-0 ¹⁾	Dezember 96	179 Monate
14	Azathioprin 50 mg 2-0-0 ¹⁾	Februar 04	93 Monate
Gruppe 2 (Monotherapie TNF-α-Inhibitor)			
1	Infliximab 5 mg/kg KG 1x/Monat ²⁾	Dezember 10	8 Monate
3	Infliximab 5 mg/kg KG 1x/Monat ²⁾	Dezember 07	45 Monate
5	Golimumab 50 mg 1x/Monat	Februar 04	92 Monate
6	Adalimumab 40 mg alle 14 d	April 11	5 Monate
10	Golimumab 50 mg 1x/Monat	August 07	50 Monate
Gruppe 3 (Kombinationstherapie)			
2	Azathioprin 150 mg 0-0-1 ¹⁾ + Infiximab 5 mg/kg KG 1x /Monat ²⁾	Februar 07	54 Monate
4	Azathioprin 50 mg 0-0-1 ¹⁾ + Infiximab 5 mg/kg KG 1x/Monat ²⁾	Juli 11	3 Monate
7	Azathioprin 150 mg 0-0-1 ¹⁾ + Infiximab 5 mg/kg KG 1x/Monat ²⁾	Juli 11	2 Monate
12	Azathioprin+ Infiximab 5 mg/kg KG 1x/Monat ²⁾	September 11	3 Monate
15	Azathioprin 50 mg 1,5-0-0 ¹⁾ + Adalimumab 40 mg alle 14 d	Juni 11	4 Monate
16	Azathioprin 50 mg 3-0-0 ¹⁾ + Adalimumab 40 mg alle 14 d	Mai 11	7 Monate
17	Azathioprin 125 mg 0-0-1 ¹⁾ + Infiximab 5 mg/kg KG 1x/Monat ²⁾	Oktober 11	2 Monate
18	Azathioprin 150 mg 0-0-1 ¹⁾ + Adalimumab 40 mg alle 14 d	September 11	3 Monate
19	Azathioprin 100 mg 1-0-1 ¹⁾ + Infiximab 5 mg/kg KG 1x/Monat ²⁾	November 11	1 Monat
20	Azathioprin 125 mg 0-0-1 ¹⁾ + Infiximab 5 mg/kg KG 1x/Monat ²⁾	November 11	1 Monat
Kumulativdosis Cyclophosphamid			
Gruppe 4 (Monotherapie Cyclophosphamid)			
21	Cyclophosphamid 6x 750mg/qm, z.Z. 100 mg/d		ca. 23g
22	Cyclophosphamid 6x 750mg/qm		ca. 8g
23	Cyclophosphamid 100 mg/d		ca. 15g
24	Cyclophosphamid 3x 750 mg absolut		ca. 2g
25	mehrfache Therapieschübe zwischen 2004 und 2012		ca. 28g

¹⁾ Einnahmeschema für Medikamente; Beispiel: 1-1-1 = morgens, mittags, abends 1 Tablette; ²⁾ KG=Körpergewicht

2.8 Statistik

Die *in vitro* Versuche wurden jeweils dreimal unabhängig von einander durchgeführt. Die Ergebnisse der Versuche mit Gammastrahlung (Comet Assay) und die der Versuche mit Azathioprin (MNT) wurden mit dem t-Test auf ihre statistische Signifikanz geprüft. Ein signifikanter Unterschied zwischen den exponierten Proben und den Kontrollen wurde für $p \leq 0,05$ angenommen.

Mit den Ergebnissen des MNT für die einzelnen Patientengruppen wurde der „Zwei-Stichproben-Wilcoxon-Test“ für den paarweisen Vergleich der Patientengruppen mit der Kontrollgruppe durchgeführt. Auch hier wurde von einem statistisch signifikanten Unterschied ausgegangen wenn $p \leq 0,05$ betrug.

3. Ergebnisse

3.1 Induktion von DNA-Schäden *in vitro*

3.1.1 Die Effekte von Azathioprin und Infliximab im *in vitro* Comet Assay

Es wurde Blut gesunder Kontrollpersonen gegenüber Azathioprin und/oder Infliximab in verschiedenen Konzentrationen über verschiedene Zeiträume exponiert, und danach die DNA-Migration im Comet Assay als Tailmoment gemessen. Für jede Konzentration wurden drei Werte aus unabhängigen Wiederholungsversuchen (V1 bis V3 bzw. V1 bis V5) bestimmt. Die Ergebnisse sowie der Mittelwert aus drei Versuchen und die Standardabweichung (SD) sind in den Tab. 3 bis 6 dargestellt.

Tab. 3: Der Effekt von Azathioprin auf die DNA-Migration [Tailmoment] im *in vitro* Comet Assay mit humanen Leukozyten nach Behandlung für 4 h

Konzentration	V 1 ¹⁾	V 2 ¹⁾	V 3 ¹⁾	MW ²⁾	SD ³⁾
Ko ⁴⁾	0,56	0,83	0,41	0,60	0,21
40 µg/ml	0,45	0,75	0,51	0,57	0,16
60 µg/ml	0,52	0,65	0,30	0,49	0,18
80 µg/ml	0,57	0,50	0,48	0,52	0,05
120 µg/ml	0,36	0,36	0,18	0,30	0,10

¹⁾ V=Versuch; ²⁾ MW=Mittelwert; ³⁾ SD=Standardabweichung; ⁴⁾ Ko=Kontrolle

3. Ergebnisse

Tab. 4: Der Effekt von Azathioprin auf die DNA-Migration [Tailmoment] im *in vitro* Comet Assay mit humanen Leukozyten nach Behandlung für 24 h

Konzentration	V 1 ¹⁾	V 2 ¹⁾	V 3 ¹⁾	V 4 ¹⁾	V 5 ¹⁾	MW ²⁾	SD ³⁾
Ko ⁴⁾	0,50	0,68	0,69	— ⁵⁾	1,34	0,80	0,37
20 µg/ml	0,66	— ⁵⁾	0,56	0,67	— ⁵⁾	0,63	0,06
40 µg/ml	1,11	0,99	— ⁵⁾	— ⁵⁾	1,18	1,09	0,10
60 µg/ml	— ⁵⁾	1,26	0,44	— ⁵⁾	0,81	0,84	0,41
80 µg/ml	n.a. ⁶⁾	0,93	0,74	— ⁵⁾	0,85	0,84	0,10

¹⁾ V=Versuch; ²⁾ MW=Mittelwert; ³⁾ SD=Standardabweichung; ⁴⁾ Ko=Kontrolle; ⁵⁾ — =nicht durchgeführt;

⁶⁾ n.a. =nicht auswertbar

Tab. 5: Der Effekt von Infliximab auf die DNA-Migration [Tailmoment] im *in vitro* Comet Assay mit humanen Leukozyten nach Behandlung für 24 h

Konzentration	V 1 ¹⁾	V 2 ¹⁾	V 3 ¹⁾	MW ²⁾	SD ³⁾
Ko ⁴⁾	1,91	0,78	0,90	1,20	0,62
1 µg/ml	1,24	0,62	0,61	0,82	0,36
10 µg/ml	1,09	0,64	0,73	0,82	0,24
100 µg/ml	1,10	0,51	0,80	0,80	0,30
1000 µg/ml	1,11	0,43	0,94	0,83	0,35

¹⁾ V=Versuch; ²⁾ MW=Mittelwert; ³⁾ SD=Standardabweichung; ⁴⁾ Ko=Kontrolle

Tab. 6: Der Effekt von Azathioprin und Infliximab in Kombination auf die DNA-Migration [Tailmoment] im *in vitro* Comet Assay mit humanen Leukozyten nach Behandlung für 24 h

Konzentration	V 1 ¹⁾	V 2 ¹⁾	V 3 ¹⁾	MW ²⁾	SD ³⁾
Ko ⁴⁾	0,61	0,37	0,45	0,48	0,12
2+ 10 ⁵⁾	1,15	0,44	1,11	0,90	0,40
5+ 10 ⁶⁾	0,62	0,49	0,62	0,58	0,08
10+ 10 ⁷⁾	0,86	0,42	0,64	0,64	0,22
2+ 100 ⁸⁾	0,59	1,13	1,18	0,97	0,33
5+ 100 ⁹⁾	0,70	0,53	1,30	0,84	0,40
10+ 100 ¹⁰⁾	0,61	0,40	1,19	1,10	0,41

¹⁾ V=Versuch; ²⁾ MW=Mittelwert; ³⁾ SD=Standardabweichung; ⁴⁾ Ko=Kontrolle

⁵⁾ 2+ 10 = 2µg/ ml Azathioprin + 10 µg/ ml Infliximab;

⁶⁾ 5+ 10 = 5 µg/ml Azathioprin + 10 µg/ml Infliximab;

⁷⁾ 10+ 10 = 10 µg/ml Azathioprin + 10 µg/ml Infliximab;

⁸⁾ 2+ 100 = 2 µg/ml Azathioprin + 100 µg/ml Infliximab;

⁹⁾ 5+ 100 = 5 µg/ml Azathioprin + 100 µg/ml Infliximab;

¹⁰⁾ 10+ 100 = 10 µg/ml Azathioprin + 100 µg/ml Infliximab

3. Ergebnisse

Die Exposition von Blutproben für 4 h gegenüber Azathioprin-Konzentrationen bis 120 µg/ml führte nicht zu einer Induktion von DNA-Schäden. Das gemessene Tailmoment lag bei allen Versuchen auf dem Niveau der Negativkontrolle. Bei einer Exposition für 24 h wurden Versuche bis zu einer Konzentration von 80 µg/ml durchgeführt, höhere Konzentrationen hatten sich in den Vorversuchen aufgrund der Toxizität als nicht auswertbar erwiesen. Die Tailmomentwerte lagen auch hier auf dem Niveau der Negativkontrolle.

Auch die Exposition von Blutkulturen gegenüber Infliximab führte nicht zu einer Induktion von DNA-Schäden. Alle Tailmomentwerte lagen unterhalb des Mittelwertes für die Negativkontrolle. Der Mittelwert der Negativkontrolle ist, bedingt durch den ungewöhnlich hohen Wert in V1, etwas erhöht. Üblicherweise liegen Kontrollwerte für das Tailmoment unter diesen Versuchsbedingungen unter 1,0.

Die Kombinationsbehandlung führte ebenfalls nicht zu einer eindeutigen Induktion von DNA-Schäden. Alle gemessenen Werte lagen zwar etwas über denen der Negativkontrolle, aber noch im Rahmen von Negativkontrollen unter diesen Versuchsbedingungen. Keiner der gemessenen Unterschiede zwischen exponierten Proben und der Negativkontrolle war statistisch signifikant.

3.1.2 Der Effekt von Gammastrahlung im *in vitro* Comet Assay

Um zu zeigen, dass mit dem verwendeten Comet-Assay-Protokoll DNA-Schädigungen zuverlässig und sensitiv nachgewiesen werden können, wurden einige Proben von Patienten und Kontrollpersonen unmittelbar vor der Durchführung des Comet Assays mit 1 und 2 Gy bestrahlt (Positivkontrolle). Die Blutproben für diese Experimente wurden zufällig ausgewählt. Die Ergebnisse (Tab. 7) zeigen, dass die DNA-schädigende Wirkung von Gammastrahlen im Comet Assay eindeutig sichtbar wird. In jedem der vier Experimente zeigte sich ein dosisabhängiger Anstieg des Tailmoments. Zwischen den einzelnen

3. Ergebnisse

Experimenten gab es jedoch eine gewisse Variabilität in der Ausprägung der DNA-Schädigung. Die Mittelwerte aus den vier Experimenten zeigen einen deutlichen, dosisabhängigen Anstieg des Tailmoments. Die Unterschiede zwischen den bestrahlten und den unbestrahlten Proben waren statistisch signifikant.

Tab. 7: Der Effekt von Gammastrahlung auf die DNA-Migration [Tailmoment] im *in vitro* Comet Assay mit humanen Leukozyten nach Bestrahlung mit 1 und 2 Gy

Probe	Medikation	Unbestrahlt	1 Gy	2 Gy
Probe 1 (Ko 9) ¹⁾	/	0,37	1,28	3,00
Probe 2 (Pat 10) ²⁾	TNF- α -Inhibitor ³⁾	0,62	2,82	5,31
Probe 3 (Pat 14) ²⁾	Azathioprin	0,45	3,74	5,87
Probe 4 (Pat 16) ²⁾	Kombination	0,34	2,39	4,41
Mittelwert		0,45	2,56	4,65
Standardabweichung		0,13	1,02	1,25
p- Wert ⁴⁾			0,012	0,003

¹⁾ Ko=Kontrolle; ²⁾ Pat=Patient; ³⁾ TNF- α -Inhibitor=Tumor-Nekrose-Faktor- α -Inhibitor; ⁴⁾ t-Test

3.1.3 Die Effekte von Azathioprin und Infliximab im *in vitro* MNT

Um das mutagene Potenzial der zur Behandlung der Patienten eingesetzten Substanzen weiter zu charakterisieren, wurde der *in vitro* MNT mit peripheren Lymphozyten durchgeführt. Das Blut von gesunden Kontrollpersonen wurde gegenüber Azathioprin und/oder Infliximab in verschiedenen Konzentrationen über verschiedene Zeiträume exponiert, und danach die Rate MN-haltiger Lymphozyten analysiert. In Vorversuchen wurden die Testkonzentrationen bestimmt. Azathioprin wurde bis in den Konzentrationsbereich getestet, der die Proliferation der Lymphozyten so stark hemmte, dass eine Auswertung nicht mehr möglich war.

Für Azathioprin wurden zwei verschiedene Expositionsprotokolle verwendet. Zunächst wurde ein Standardprotokoll des MNT durchgeführt, bei dem die Testsubstanzen 44 h nach Kulturbeginn zugegeben werden, und bis zur

3. Ergebnisse

Präparation nach 72 h (d. h. für 28 h) in den Kulturen verbleiben. Die Mittelwerte der pro Konzentration jeweils drei unabhängigen Versuche sind in Tab. 8 zusammengefasst und in Abb. 3 graphisch dargestellt. Bei einer Konzentration von 80 µg/ml war nur ein Versuch auswertbar, sodass hier keine Standardabweichung berechnet, und der t-Test nicht durchgeführt werden konnte.

Tab. 8: Der Effekt von Azathioprin auf die MN¹⁾-Häufigkeit im *in vitro* MNT²⁾ mit humanen Lymphozyten (Standardprotokoll)

Protokoll B ³⁾

	Ko ⁶⁾	5 µg/ml	10 µg/ml	20 µg/ml	40 µg/ml	80 µg/ml	120 µg/ml
MW [%] ⁷⁾	5,20	6,30	9,00	9,80	12,20	12,00	n.a. ¹⁰⁾
SD ⁸⁾	2,30	6,10	4,40	4,10	5,50	— ¹¹⁾	— ¹¹⁾
p-Wert ⁹⁾		0,391	0,133	0,036	0,022	— ¹¹⁾	— ¹¹⁾

Protokoll C ⁴⁾

	Ko ⁶⁾	5 µg/ml	10 µg/ml	20 µg/ml	40 µg/ml	80 µg/ml	120 µg/ml
MW [%] ⁷⁾	10,00	12,30	12,00	12,40	23,30	25,00	n.a. ¹⁰⁾
SD ⁸⁾	2,10	5,50	5,20	6,70	20,60	— ¹¹⁾	— ¹¹⁾
p-Wert ⁹⁾		0,272	0,29	0,24	0,189	— ¹¹⁾	— ¹¹⁾

NDI ⁵⁾

	Ko ⁶⁾	5 µg/ml	10 µg/ml	20 µg/ml	40 µg/ml	80 µg/ml	120 µg/ml
MW [%] ⁷⁾	1,80	1,68	1,55	1,48	1,28	1,16	n.a. ¹⁰⁾
SD ⁸⁾	0,10	0,20	0,10	0,20	0,20	— ¹¹⁾	— ¹¹⁾
p-Wert ⁹⁾		0,228	0,006	0,004	0,003	— ¹¹⁾	— ¹¹⁾

¹⁾ MN=Mikronuklei; ²⁾ MNT=Mikronukleustest

³⁾ Protokoll B=Zugabe von Cytochalasin B nach 48h, Präparation nach 72h, Analyse von mononukleären Zellen;

⁴⁾ Protokoll C=Zugabe von Cytochalasin B nach 48h, Präparation nach 72h, Analyse von binukleären Zellen;

⁵⁾ NDI=nuclear division index; ⁶⁾ Ko=Kontrolle; ⁷⁾ MW=Mittelwert; ⁸⁾ SD=Standardabweichung; ⁹⁾ t-Test;

¹⁰⁾ n.a.= nicht auswertbar; ¹¹⁾ — =nicht durchgeführt

3. Ergebnisse

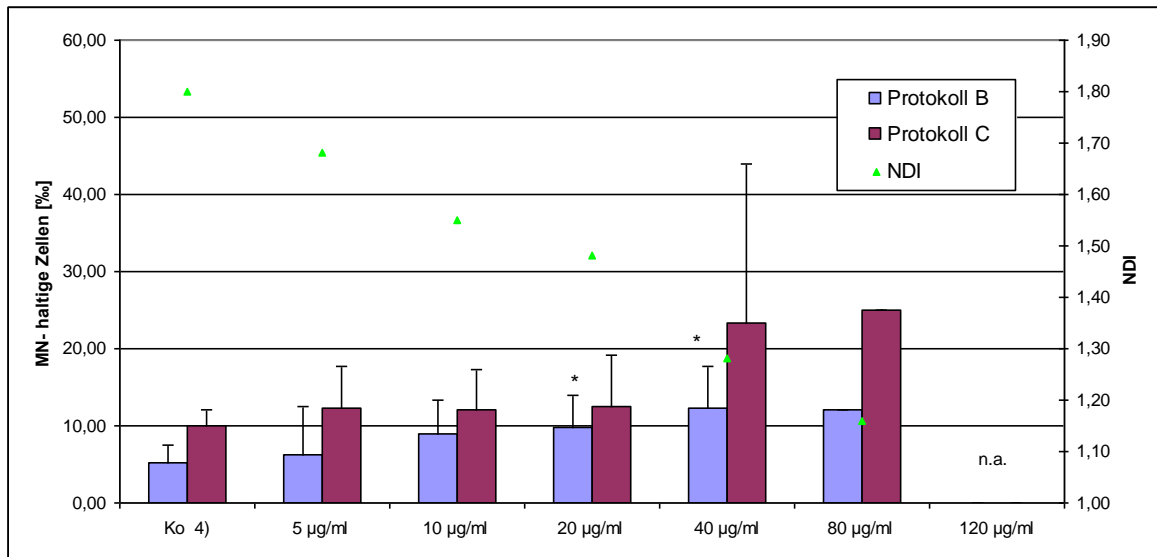


Abb. 3: Der Effekt von Azathioprin auf die MN-Häufigkeit im *in vitro* MNT mit humanen Lymphozyten (Standardprotokoll)

MNT=Mikronukleustest; MN=Mikronuklei;

Protokoll B=Zugabe von Cytochalasin B nach 48h, Präparation nach 72h, Analyse von mononukleären Zellen;

Protokoll C=Zugabe von Cytochalasin B nach 48h, Präparation nach 72h, Analyse von binukleären Zellen;

NDI=nuclear division index; Ko=Kontrolle; n.a.=nicht auswertbar; *=statistisch signifikant

Im diesem Standardprotokoll des MNT induzierte Azathioprin MN in mono- und binukleären Zellen. Etwa eine Verdoppelung der Rate an Zellen mit MN wurde für die beiden höchsten analysierbaren Konzentrationen gemessen. Was die mononukleären Zellen betrifft, war der Unterschied zwischen diesen Werten und der MN-Häufigkeit der Negativkontrolle für die Konzentrationen 20 und 40 µg/ml statistisch signifikant. Die Exposition gegenüber Azathioprin führte zu einer konzentrationsabhängigen Hemmung der Proliferation der Lymphozyten, angezeigt durch die Abnahme des NDI.

Darüber hinaus wurden Versuche durchgeführt, bei denen die Zellen für die gesamte Kulturdauer von 72 h exponiert wurden (Tab. 9 und Abb. 4). Hier waren bereits die Konzentrationen von 40 µg/ml bzw. bei den binukleären Zellen 20 µg/ml nicht mehr auswertbar, sodass für diese Werte die Standardabweichung nicht berechnet, und der t-Test nicht durchgeführt wurde. Die Exposition der Lymphozytenkulturen gegenüber Azathioprin während der gesamten Kulturdauer führte ebenfalls zu einer konzentrationsabhängigen Hemmung der Proliferation. Die zytotoxische Wirkung von Azathioprin war unter diesen Bedingungen stärker

3. Ergebnisse

ausgeprägt. Die Präparate waren nur bis zu einer Konzentration von 20 µg/ml auswertbar. Ab 40 µg/ml Azathioprin war die Proliferationshemmung so stark, dass sich zu wenige binukleäre, und teilweise auch zu wenige mononukleäre Zellen auf den Objektträgern befanden. Bei den auswertbaren Konzentrationen wurde unter diesen Expositionsbedingungen weder eine Induktion von MN in mononukleären noch in binukleären Lymphozyten gemessen.

Tab. 9: Der Effekt von Azathioprin auf die MN¹⁾-Häufigkeit im *in vitro* MNT²⁾ mit humanen Lymphozyten nach Behandlung für 72 h

Protokoll B ³⁾

	Ko ⁶⁾	2 µg/ml	5 µg/ml	10 µg/ml	20 µg/ml	40 µg/ml	80 µg/ml	120 µg/ml
MW [%] ⁷⁾	5,20	6,30	7,80	4,60	3,60	2,00	n.a. ¹⁰⁾	n.a. ¹⁰⁾
SD ⁸⁾	2,50	3,20	5,60	2,60	3,40	— ¹¹⁾	— ¹¹⁾	— ¹¹⁾
p-Wert ⁹⁾		0,308	0,217	0,361	0,208	— ¹¹⁾	— ¹¹⁾	— ¹¹⁾

Protokoll C ⁴⁾

	Ko ⁶⁾	2 µg/ml	5 µg/ml	10 µg/ml	20 µg/ml	40 µg/ml	80 µg/ml	120 µg/ml
MW [%] ⁷⁾	16,30	9,60	9,00	7,60	7,00	n.a. ¹⁰⁾	n.a. ¹⁰⁾	n.a. ¹⁰⁾
SD ⁸⁾	9,20	5,10	7,40	9,40	9,60	— ¹¹⁾	— ¹¹⁾	— ¹¹⁾
p-Wert ⁹⁾		0,103	0,101	0,079	— ¹¹⁾	— ¹¹⁾	— ¹¹⁾	— ¹¹⁾

NDI ⁵⁾

	Ko ⁶⁾	2 µg/ml	5 µg/ml	10 µg/ml	20 µg/ml	40 µg/ml	80 µg/ml	120 µg/ml
MW [%] ⁷⁾	1,81	1,57	1,46	1,29	1,22	1,03	n.a. ¹⁰⁾	n.a. ¹⁰⁾
SD ⁸⁾	0,20	0,10	0,10	0,10	0,20	— ¹¹⁾	— ¹¹⁾	— ¹¹⁾
p-Wert ⁹⁾		0,018	0,006	0,001	— ¹¹⁾	— ¹¹⁾	— ¹¹⁾	— ¹¹⁾

¹⁾ MN=Mikronuklei; ²⁾ MNT=Mikronukleustest

³⁾ Protokoll B=Zugabe von Cytochalasin B nach 48h, Präparation nach 72h, Analyse von mononukleären Zellen;

⁴⁾ Protokoll C=Zugabe von Cytochalasin B nach 48h, Präparation nach 72h, Analyse von binukleären Zellen;

⁵⁾ NDI=nuclear division index; ⁶⁾ Ko=Kontrolle; ⁷⁾ MW=Mittelwert; ⁸⁾ SD=Standardabweichung; ⁹⁾ t-Test;

¹⁰⁾ n.a.= nicht auswertbar; ¹¹⁾ — =nicht durchgeführt

3. Ergebnisse

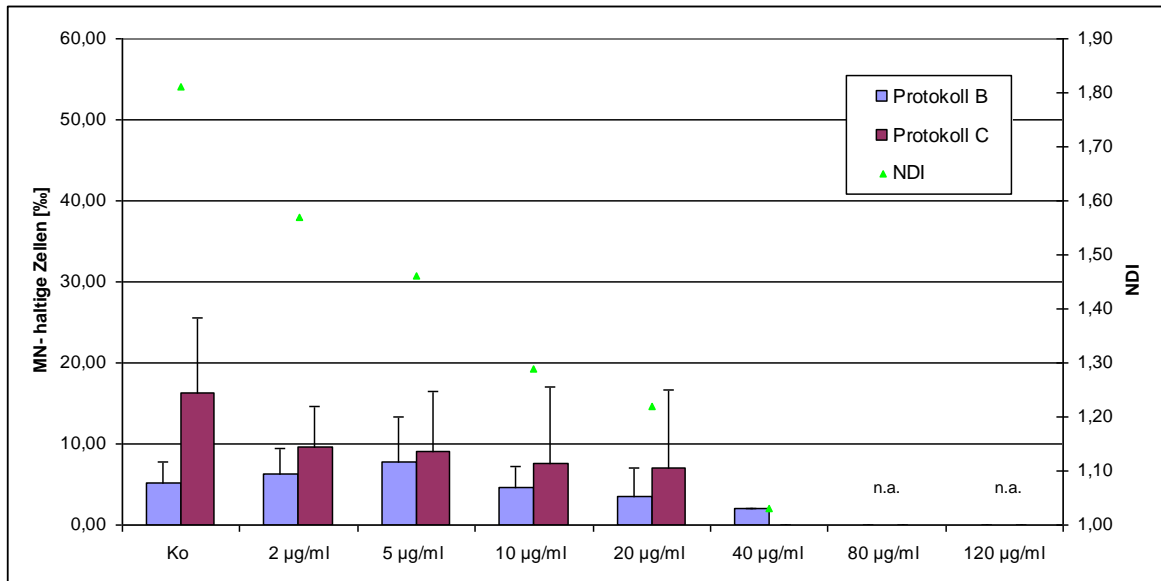


Abb. 4: Der Effekt von Azathioprin auf die MN-Häufigkeit im *in vitro* MNT mit humanen Lymphozyten nach Behandlung für 72h

MNT=Mikronukleustest; MN=Mikronuklei;

Protokoll B=Zugabe von Cytochalasin B nach 48h, Präparation nach 72h, Analyse von mononukleären Zellen;

Protokoll C=Zugabe von Cytochalasin B nach 48h, Präparation nach 72h, Analyse von binukleären Zellen;

NDI=nuclear division index; Ko=Kontrolle; n.a.=nicht auswertbar

Für die Versuche mit Infliximab und der Kombination von Azathioprin und Infliximab erfolgte die Exposition immer über die gesamte Kulturdauer von 72h.

Die getesteten Infliximabkonzentrationen basierten auf Konzentrationen, die laut Literatur verwendet worden waren, um den Einfluss von Infliximab auf die Induktion von Apoptose zu untersuchen (Bedini et al., 2007). Die Ergebnisse sind in Tab. 10 zusammengefasst. Infliximab induzierte keine MN in Konzentrationen bis 1000 µg/ml. Nur die höchste Konzentration (1000 µg/ml) führte zu einer Hemmung der Lymphozytenproliferation. Der NDI war mit 1,31 deutlich gegenüber dem der Kontrolle (1,9) reduziert.

Die nichttoxischen Infliximabkonzentrationen 10 und 100 µg/ml wurden in Kombination mit Azathioprin (2, 5 und 10 µg/ml) getestet (Tab. 11). Die kombinierte Behandlung zeigte einen zytotoxischen Effekt, der am stärksten bei der höchsten Azathioprinkonzentration (10 µg/ml) ausgeprägt war. Die kombinierte Behandlung führte nicht zur Induktion von MN. Die Häufigkeit der MN war tendenziell eher niedriger als in der Kontrolle, wobei dieser Effekt in mononukleären Lymphozyten deutlicher ausgeprägt war.

3. Ergebnisse

Tab. 10: Der Effekt von Infliximab auf die MN¹⁾-Häufigkeit im *in vitro* MNT²⁾ mit humanen Lymphozyten nach Behandlung für 72h

Konzentration	Protokoll B ³⁾ (MW) ⁶⁾	Protokoll C ⁴⁾ (MW) ⁶⁾	NDI ⁵⁾ (MW) ⁶⁾
Ko ⁷⁾	8,00	12,60	1,90
1 µg/ml	3,00	11,00	1,64
10 µg/ml	3,60	11,00	1,71
100 µg/ml	3,30	11,00	1,78
1000 µg/ml	2,00	13,00	1,31

¹⁾ MN=Mikronuklei; ²⁾ MNT=Mikronukleustest

³⁾ Protokoll B=Zugabe von Cytochalasin B nach 48h, Präparation nach 72h, Analyse von mononukleären Zellen;

⁴⁾ Protokoll C=Zugabe von Cytochalasin B nach 48h, Präparation nach 72h, Analyse von binukleären Zellen;

⁵⁾ NDI=nuclear division index; ⁶⁾ MW=Mittelwert; ⁷⁾ Ko=Kontrolle;

Tab. 11: Der Effekt von Azathioprin und Infliximab in Kombination auf die MN¹⁾-Häufigkeit im *in vitro* MNT²⁾ mit humanen Lymphozyten nach Behandlung für 72h

Konzentration	Protokoll B ³⁾ (MW) ⁶⁾	Protokoll C ⁴⁾ (MW) ⁶⁾	NDI ⁵⁾ (MW) ⁶⁾
Ko ⁷⁾	6,33	12,00	2,28
2+10 ⁸⁾	3,33	7,67	1,56
5+10 ⁹⁾	2,33	6,33	1,54
10+10 ¹⁰⁾	2,33	13,00	1,33
2+100 ¹¹⁾	1,00	5,33	1,51
5+100 ¹²⁾	2,67	6,33	1,50
10+100 ¹³⁾	1,33	5,00	1,32

¹⁾ MN=Mikronuklei; ²⁾ MNT=Mikronukleustest

³⁾ Protokoll B=Zugabe von Cytochalasin B nach 48h, Präparation nach 72h, Analyse von mononukleären Zellen;

⁴⁾ Protokoll C=Zugabe von Cytochalasin B nach 48h, Präparation nach 72h, Analyse von binukleären Zellen;

⁵⁾ NDI=nuclear division index; ⁶⁾ MW=Mittelwert; ⁷⁾ Ko=Kontrolle; ⁸⁾ 2+ 10 = 2 µg/ml Azathioprin + 10 µg/ml Infliximab;

⁹⁾ 5+ 10 = 5 µg/ml Azathioprin + 10 µg/ml Infliximab; ¹⁰⁾ 10+ 10 = 10 µg/ml Azathioprin + 10 µg/ml Infliximab;

¹¹⁾ 2+ 100 = 2 µg/ml Azathioprin + 100 µg/ml Infliximab; ¹²⁾ 5+ 100 = 5 µg/ml Azathioprin + 100 µg/ml Infliximab;

¹³⁾ 10+ 100 = 10 µg/ml Azathioprin + 100 µg/ml Infliximab

3.2 Genotoxische Effekte im Blut von Patienten nach immunsuppressiver Therapie

3.2.1 Comet Assay mit Blut von Patienten unter Therapie mit Azathioprin und Infliximab

Der Comet Assay wurde mit Blut von 20 Patienten durchgeführt. Bei Pat. 2 und Pat. 18 waren die Objektträger wegen starker Hintergrundfärbung nicht auswertbar. Das Tailmoment der einzelnen Proben ist in Tab. 12 dargestellt.

Tab. 12: Comet Assay [Tailmoment] mit Leukozyten von Patienten (Pat) unter Therapie mit Azathioprin, Tumor-Nekrose-Faktor- α -Inhibitor (TNF- α -Inhibitor) und mit Kombinationstherapie

Azathioprin

Pat 8	Pat 9	Pat 11	Pat 13	Pat 14	MW ¹⁾	SD ²⁾
1,78	0,51	0,51	0,43	0,45	0,74	0,58

TNF- α -Inhibitor

Pat 1	Pat 3	Pat 5	Pat 6	Pat 10	MW ¹⁾	SD ²⁾
0,53	0,30	0,61	0,67	0,62	0,55	0,15

Kombination

Pat 2	Pat 4	Pat 7	Pat 12	Pat 15	Pat 16	Pat 17	Pat 18	Pat 19	Pat 20	MW ¹⁾	SD ²⁾
n.a. ³⁾	0,45	0,58	0,55	0,50	0,34	0,55	n.a. ³⁾	0,90	0,36	0,53	0,17

¹⁾ MW=Mittelwert; ²⁾ SD=Standardabweichung; ³⁾ n.a. =nicht auswertbar

3.2.2 Comet Assay mit Blut von Kontrollpersonen

Die Tailmomentwerte der Kontrollpersonen sind in Tab. 13 zusammengefasst.

Tab. 13: Comet Assay [Tailmoment] mit Leukozyten von Kontrollpersonen (Ko)

Ko 1	Ko 2	Ko 3	Ko 4	Ko 5	Ko 6	Ko 7	Ko 8	Ko 9	Ko 10	MW ¹⁾	SD ²⁾
0,48	0,45	0,50	0,65	0,74	0,42	0,51	0,44	0,37	0,66	0,52	0,12

¹⁾ MW=Mittelwert; ²⁾ SD=Standardabweichung

3. Ergebnisse

Die Ergebnisse des Comet Assays zeigen, dass es keine eindeutigen Unterschiede hinsichtlich vorhandener DNA-Schäden im Blut der Patienten und der Kontrollpersonen gibt. Ein auffällig hoher Wert wurde nur für Pat. 8 gemessen, alle anderen Werte liegen im Bereich üblicher Kontrollwerte für diese Versuchsbedingungen.

3.2.3 Comet Assay mit Blut von Patienten unter Therapie mit Cyclophosphamid

Es wurden 5 Patienten in die Studie eingeschlossen, bei denen Cyclophosphamid zur Therapie der Grunderkrankung eingesetzt wurde. Auch mit dem Blut dieser Patienten wurde der Comet Assay durchgeführt. Die Tailmomentwerte können Tab. 14 entnommen werden. Alle Werte liegen im Bereich üblicher Kontrollwerte und unterscheiden sich nicht von den anderen untersuchten Patientengruppen und der Kontrollgruppe.

Tab. 14: Comet Assay [Tailmoment] mit Leukozyten von Patienten (Pat) unter Therapie mit Cyclophosphamid

Pat 21	Pat 22	Pat 23	Pat 24	Pat 25	MW ¹⁾	SD ²⁾
0,47	0,35	0,64	0,49	0,87	0,56	0,20

¹⁾ MW=Mittelwert; ²⁾ SD=Standardabweichung

3.2.4 MNT mit Blut von Patienten unter Therapie mit Azathioprin und Infliximab

Der MNT wurde mit dem Blut der 20 Patienten durchgeführt und ausgewertet. Lediglich bei Pat. 12 lag zum Zeitpunkt der Blutentnahme eine Leukozytopenie vor, sodass die Proliferationsrate der Lymphozyten zu gering war um die Objektträger auszuwerten. Es waren nur mononukleäre Zellen vorhanden, sodass die Rate an MN-haltigen Zellen zum Präparationszeitpunkt nach 72 h (Protokoll B und C) und der NDI nicht bestimmt werden konnten. Um die Daten mit denen der

3. Ergebnisse

anderen Patienten vergleichen zu können, wurde eine erneute Blutentnahme bei diesem Patienten durchgeführt, zu der dieser auch bereit war und die einige Wochen später erfolgte. Da sich das Blutbild bis dahin normalisiert hatte, konnte diese wie gewohnt ausgewertet werden. Die MN-Raten der einzelnen Patienten, der NDI und die Mittelwerte zu den Präparationszeitpunkten nach Protokoll A, B und C sind in Tab. 15 und Abb. 5 dargestellt.

3. Ergebnisse

Tab. 15: MNT¹⁾ [MN²⁾-haltige Zellen in %] mit Lymphozyten von Patienten (Pat) unter Therapie mit Azathioprin, Tumor-Nekrose-Faktor- α -Inhibitor (TNF- α -Inhibitor) und mit Kombinationstherapie

Azathioprin

Patient	Protokoll A ³⁾	Protokoll B ⁴⁾	Protokoll C ⁵⁾	NDI ⁶⁾
Pat 8	4	6	24	1,89
Pat 9	1	25	42	1,57
Pat 11	1	9	9	1,60
Pat 13	1	2	9	1,80
Pat 14	3	10	16	1,78
MW: ⁷⁾	2,00	10,40	20,00	1,73

TNF- α -Inhibitor

Patient	Protokoll A ³⁾	Protokoll B ⁴⁾	Protokoll C ⁵⁾	NDI ⁶⁾
Pat 1	5	10	28	2,04
Pat 3	8	8	30	2,25
Pat 5	1	10	38	1,68
Pat 6	0	6	24	1,71
Pat 10	2	2	5	1,60
MW: ⁷⁾	3,20	7,20	25,00	1,86

Kombination

Patient	Protokoll A ³⁾	Protokoll B ⁴⁾	Protokoll C ⁵⁾	NDI ⁶⁾
Pat 2	0	11	23	2,09
Pat 4	0	7	41	1,47
Pat 7	1	12	24	1,40
Pat 12	4	14	27	2,17
Pat 15	2	9	20	2,20
Pat 16	2	8	11	1,92
Pat 17	0	7	24	1,82
Pat 18	5	12	18	2,35
Pat 19	7	13	23	1,80
Pat 20	1	7	14	2,00
MW: ⁷⁾	2,20	10,00	22,50	1,92
MW ⁷⁾ gesamt:	2,50	9,20	22,50	1,80

¹⁾ MNT=Mikronucleustest; ²⁾ MN=Mikronuklei; ³⁾ Protokoll A=Präparation nach 24h, Analyse von mononukleären Zellen;

⁴⁾ Protokoll B=Zugabe von Cytochalasin B nach 48h, Präparation nach 72h, Analyse von mononukleären Zellen;

⁵⁾ Protokoll C=Zugabe von Cytochalasin B nach 48h, Präparation nach 72h, Analyse von binukleären Zellen;

⁶⁾ NDI=nuclear division index; ⁷⁾ MW=Mittelwert

3. Ergebnisse

3.2.5 MNT mit Blut von Kontrollpersonen

Um eine Aussage zur Bedeutung der MN-Häufigkeit in den Lymphozyten der Patienten machen zu können, wurden sie mit den MN-Häufigkeiten in Lymphozyten von Kontrollpersonen (10 gesunde Nichtraucher) verglichen. Die Ergebnisse sind in Tab. 16 zusammengefasst. Die Raten an MN-haltigen Lymphozyten sind in den Protokollen A, B und C vergleichbar mit den historischen Werten der Kontrollen in unserem Labor.

Tab. 16: MNT¹⁾ [MN²⁾-haltige Zellen in %] mit Lymphozyten von Kontrollpersonen (Ko)

Kontrollperson	Protokoll A ³⁾	Protokoll B ⁴⁾	Protokoll C ⁵⁾	NDI ⁶⁾
Ko 1	0	14	22	1,98
Ko 2	1	16	38	1,47
Ko 3	0	14	29	1,90
Ko 4	1	8	16	1,75
Ko 5	0	3	25	1,53
Ko 6	0	9	22	2,00
Ko 7	0	9	13	2,18
Ko 8	1	4	9	2,00
Ko 9	2	5	9	2,00
Ko 10	1	9	29	1,88
MW: ⁷⁾	0,60	9,10	21,20	1,87

¹⁾ MNT=Mikronukleustest; ²⁾ MN=Mikronuklei

³⁾ Protokoll A=Präparation nach 24h, Analyse von mononukleären Zellen;

⁴⁾ Protokoll B=Zugabe von Cytochalasin B nach 48h, Präparation nach 72h, Analyse von mononukleären Zellen;

⁵⁾ Protokoll C=Zugabe von Cytochalasin B nach 48h, Präparation nach 72h, Analyse von binukleären Zellen;

⁶⁾ NDI=nuclear division index; ⁷⁾ MW=Mittelwert

3. Ergebnisse

Tab. 17: Statistische Analyse der Ergebnisse des MNT¹⁾ für die einzelnen Patientengruppen im Vergleich zu den Kontrollen

Protokoll A ²⁾

	Kontrolle	Azathioprin	TNF α -Inhibitor	Kombination
MW [%] ⁶⁾	0,60	2,00	3,20	2,20
SD ⁷⁾	0,70	1,41	3,27	2,39
p-Wert ⁸⁾		0,031	0,074	0,118

Protokoll B ³⁾

	Kontrolle	Azathioprin	TNF α -Inhibitor	Kombination
MW [%] ⁶⁾	9,10	10,40	7,20	10,00
SD ⁷⁾	4,43	8,73	3,35	2,71
p-Wert ⁸⁾		0,973	0,615	0,780

Protokoll C ⁴⁾

	Kontrolle	Azathioprin	TNF α -Inhibitor	Kombination
MW [%] ⁶⁾	21,20	20,00	25,00	22,50
SD ⁷⁾	9,50	13,77	12,29	8,15
p-Wert ⁸⁾		0,704	0,466	0,782

NDI ⁵⁾

	Kontrolle	Azathioprin	TNF α -Inhibitor	Kombination
MW [%] ⁶⁾	1,87	1,73	1,86	1,92
SD ⁷⁾	0,22	0,14	0,30	0,31
p-Wert ⁸⁾		0,205	1,000	0,616

¹⁾ MNT=Mikronukleustest; ²⁾ Protokoll A=Präparation nach 24h, Analyse von mononukleären Zellen;

³⁾ Protokoll B=Zugabe von Cytochalasin B nach 48h, Präparation nach 72h, Analyse von mononukleären Zellen;

⁴⁾ Protokoll C=Zugabe von Cytochalasin B nach 48h, Präparation nach 72h, Analyse von binukleären Zellen;

⁵⁾ NDI=nuclear division index; ⁶⁾ MW=Mittelwert; ⁷⁾ SD=Standardabweichung; ⁸⁾ Wilcoxonstest

3. Ergebnisse

Abb. 5 fasst die Ergebnisse des MNT für Patienten und Kontrollpersonen und die statistischen Berechnungen zusammen.

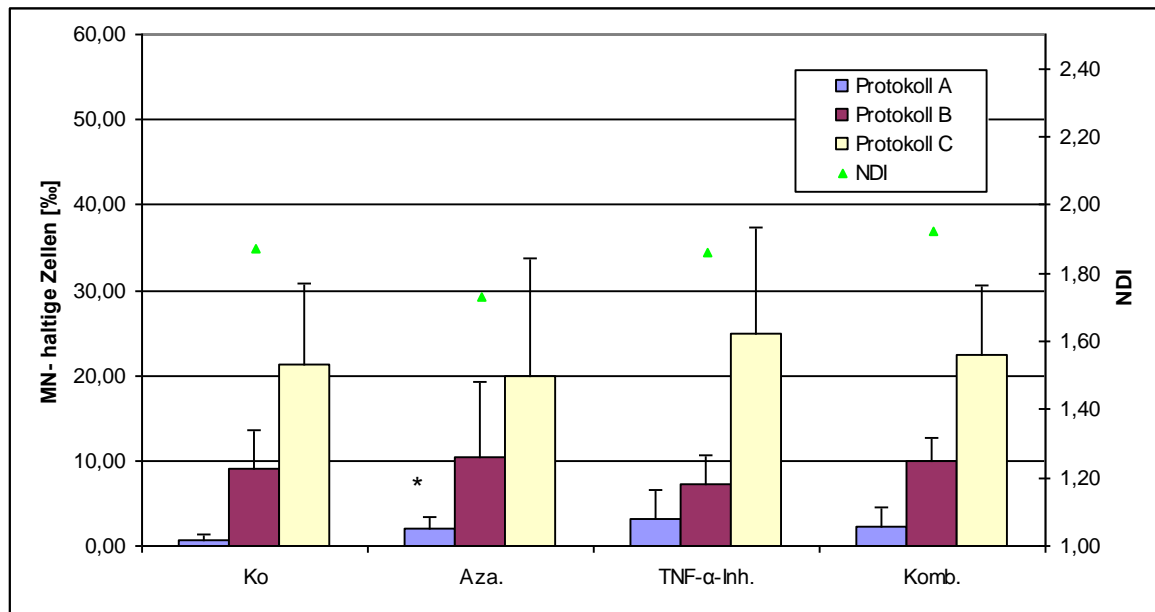


Abb. 5: MNT [MN-haltige Zellen ‰] mit Lymphozyten von Kontrollpersonen und Patienten unter Therapie mit Azathioprin und TNF- α -Inhibitor, jeweils als Monotherapie und in Kombination; n=20

MNT=Mikronukleustest; MN=Mikronuklei;

Protokoll A=Präparation nach 24h, Analyse von mononukleären Zellen;

Protokoll B=Zugabe von Cytochalasin B nach 48h, Präparation nach 72h, Analyse von mononukleären Zellen;

Protokoll C=Zugabe von Cytochalasin B nach 48h, Präparation nach 72h, Analyse von binukleären Zellen;

NDI=nuclear division index; Ko=Kontrolle; Aza.=Azathioprin; TNF- α -Inh.=Tumornekrosefaktor- α -Inhibitor;

Komb.=Kombination; *= statistisch signifikant

Im Vergleich zu den Kontrollpersonen wurden bei allen drei Patientengruppen leicht erhöhte Raten an MN-haltigen mononukleären Lymphozyten nach 24 h (Protokoll A) gemessen. Während die Werte der Kontrollen konstant niedrig waren (0-2 ‰), zeigte sich bei den Patienten eine deutlich höhere Variabilität mit Werten zwischen 0 und 8 ‰. Patienten mit eindeutig erhöhten Werten wurden in allen drei Patientengruppen gemessen. Statistisch signifikant war nur der Unterschied zwischen Gruppe 1 (Azathioprin) im Vergleich zur Kontrollgruppe in Protokoll A. Die Häufigkeit der MN-haltigen mononukleären Lymphozyten zum Präparationszeitpunkt nach 72 h (Protokoll B) zeigte keine deutlichen Unterschiede zwischen Kontrollen und Patienten. Lediglich Pat. 9 wies mit 25 ‰ einen ungewöhnlich hohen Wert auf. Die Mittelwerte für die Häufigkeiten von binukleären Zellen mit MN nach 72 h Kultur (Protokoll C) wiesen ebenfalls keine

3. Ergebnisse

auffälligen Unterschiede zwischen den Kontrollen und den drei Patientengruppen auf. Für die Kontrollen wurden, mit einer Ausnahme, Werte unter 30 ‰ gemessen. Nur Kontrolle 2 wies einen Wert von 38 ‰ auf. Ein Wert über 30 ‰ wurde in allen Patientengruppen gemessen (Pat. 4, 5 und 9). Insgesamt ergaben sich bei den Patienten keine höhere Raten an binukleären Lymphozyten mit MN im Vergleich zu den Kontrollen. Nur bei den mit Azathioprin behandelten Patienten war die Proliferation der Lymphozyten im Vergleich zu den anderen Patientengruppen und den Kontrollen leicht vermindert. Der Unterschied war jedoch statistisch nicht signifikant.

3.2.6 MNT mit Blut von Patienten unter Therapie mit Cyclophosphamid

Das Blut der Patienten unter Therapie mit Cyclophosphamid wurde nach den üblichen Protokollen A-C kultiviert und dann die Rate MN-haltiger Lymphozyten bestimmt. Die Ergebnisse sind in Tab. 18 zusammengefasst.

Tab. 18: MNT¹⁾ [MN²⁾-haltige Zellen in ‰] mit Lymphozyten von Patienten (Pat.) unter Therapie mit Cyclophosphamid

Patient	Protokoll A ³⁾	Protokoll B ⁴⁾	Protokoll C ⁵⁾	NDI ⁶⁾
Pat 21	22	14	52	1,84
Pat 22	13	13	36	1,85
Pat 23	3	4	8	1,53
Pat 24	11	4	n.a. ⁷⁾	1,03
Pat 25	2	7	n.a. ⁷⁾	1,03

¹⁾ MNT=Mikronukleustest; ²⁾ MN=Mikronukleij;

³⁾ Protokoll A=Präparation nach 24h, Analyse von mononukleären Zellen

⁴⁾ Protokoll B=Zugabe von Cytochalasin B nach 48h, Präparation nach 72h, Analyse von mononukleären Zellen;

⁵⁾ Protokoll C=Zugabe von Cytochalasin B nach 48h, Präparation nach 72h, Analyse von binukleären Zellen;

⁶⁾ NDI=nuclear division index; ⁷⁾ n.a. = nicht auswertbar

Die Raten MN-haltiger Lymphozyten im Blut der Cyclophosphamidpatienten waren sehr variabel. Pat. 21 und 22 wiesen in allen Protokollen mehr Zellen mit MN auf als die Kontrollen (siehe Tab. 16). Bei Pat. 23 fiel auf, dass er in allen Protokollen niedrige MN-Raten zeigte. In Protokoll A lag sein Wert etwas über dem

3. Ergebnisse

Kontrollniveau, in Protokoll B und C aber deutlich unterhalb. Bei Pat. 24 zeigte sich in Protokoll A ein erhöhter Wert, in Protokoll B lagen Pat. 24 und 25 beide unter dem Niveau der Kontrollen. Was Protokoll C betrifft, so waren die Proben der Pat. 24 und 25 nicht auswertbar, da sich zu wenig binukleäre Zellen auf dem Objektträger befanden. Die Leukozyten- und Lymphozytenwerte der Pat. 21 bis 25 sowie der NDI sind in Tab. 19 dargestellt. Der NDI, der bereits in Tab. 18 abgebildet ist, wurde in Tab. 19 noch einmal aufgenommen um seinen Bezug zu den Lymphozytenwerten im Blutbild zu veranschaulichen. Es fällt auf, dass, alle Patienten außer Pat. 25 zum Zeitpunkt der Blutentnahme zwar normwertige bis leicht erhöhte Leukozytenwerte hatten, die Absolutzahl an Lymphozyten (eine Subgruppe der Leukozyten) aber bei Pat. 21 und Pat. 23 erniedrigt war. Eine Leukozytose ist auf dem Boden einer chronisch-entzündlichen Erkrankung nicht ungewöhnlich. Pat. 22 hatte eine relative Lymphozytopenie, d. h. seine Lymphozyten waren bezogen auf die anderen zellulären Blutbestandteile erniedrigt. Da der MNT mit Lymphozyten durchgeführt wurde, haben sich die absolut bzw. relativ erniedrigten Lymphozytenwerte auf die Proliferation während der Kulturzeit zum Teil negativ ausgewirkt, wie der NDI der einzelnen Proben zeigt. Bei Pat. 24 und Pat. 25 wurde zum Zeitpunkt der Blutentnahme für die Studie kein Differenzialblutbild ermittelt, da aber bei diesen Patienten der NDI besonders niedrig war, kann man mutmaßen, dass auch bei ihnen eine Lymphozytopenie vorlag.

Tab. 19: NDI¹⁾ und Blutwerte von Patienten (Pat) unter Therapie mit Cyclophosphamid

Patient	NDI ¹⁾	Leukozyten [Giga/l] ²⁾	Lymphozyten [Giga/l] ³⁾
Pat 21	1,84	6,80	0,60
Pat 22	1,85	12,20	1,40
Pat 23	1,53	9,50	0,60
Pat 24	1,03	14,90	— ⁴⁾
Pat 25	1,03	3,30	— ⁴⁾

¹⁾ NDI=nuclear division index; ²⁾ Normwerte: 4,4- 11,3 Giga/l; ³⁾ Normwerte: 1,2- 3,5 Giga/l;

⁴⁾ — =nicht durchgeführt

4. Diskussion

Patienten unter immunsuppressiver Therapie entwickeln häufiger maligne Neoplasien als die Normalbevölkerung. Als mögliche Ursachen werden die Grunderkrankung selbst, die Immunsuppression oder ein genotoxischer Wirkmechanismus der immunsuppressiven Medikamente diskutiert (Horneff, 2010).

In meiner Arbeit wurden die Auswirkungen zweier häufig eingesetzter Immunsuppressiva, Azathioprin und Infliximab (ein TNF- α -Inhibitor), *in vitro* im Comet Assay und im Mikronukleustest (MNT) getestet. Darüber hinaus wurde das Blut von Patienten unter immunsuppressiver Therapie mit diesen Genotoxizitätstests untersucht. Die Tests wurden an humanen Leukozyten bzw. Lymphozyten des peripheren Blutes durchgeführt. Lymphozyten eignen sich besonders gut für zytogenetische Untersuchungen da sie leicht zu gewinnen sind, zahlreich im Blut vorkommen und in einer Kultur relativ einfach zur Teilung angeregt werden können. Zytogenetische Biomarker gelten als sensitiver Nachweis von Expositionen gegenüber genotoxischen Agenzien (Bonassi et al., 2005).

Mit dem MNT wurden zwei Fragestellungen bearbeitet. Es wurde einerseits untersucht, ob den Medikamenten ein DNA-schädigendes Potenzial nachgewiesen werden kann und ob andererseits durch die Therapie Mikronuklei (MN) bereits *in vivo* gebildet werden, oder erst *in vitro* als Folge *in vivo* induzierter DNA-Schäden entstehen.

4.1 Genotoxizität von Azathioprin und Infliximab *in vitro* und *in vivo*

Der alkalische Comet Assay erfasst sowohl DNA-Einzelstrangbrüche als auch DNA-Doppelstrangbrüche. Frühere Untersuchungen mit Azathioprin an einer humanen Amnionzelllinie gaben keinen Hinweis auf die Bildung von gammaH2AX Foci (Zhou et al., 2006) und damit auf die Induktion von DNA-Doppelstrangbrüchen. Cooke et al. (2008) untersuchten Azathioprin im Comet Assay in Kombination mit UV-A-Strahlung an humanen Fibroblasten. Die Kombination Azathioprin/UV-A-Strahlen führte im Comet Assay mit hOGG1-Inkubation zur Induktion oxidativer DNA-Basenschäden. Azathioprin allein schien keine Effekte hervorzurufen. Es fehlte bei diesen Experimenten jedoch die Negativkontrolle (völlig unbehandelte Zellen). Bei Untersuchungen an murinen Lymphomzellen konnte im Comet Assay keine Induktion von DNA-Schäden durch 6-Mercaptopurin (6-MP) nachgewiesen werden (Miyamae et al., 1998).

Auch in den im Rahmen dieser Arbeit durchgeführten Experimenten induzierte Azathioprin keine genotoxischen Effekte im Comet Assay. Sowohl eine Exposition von Blutproben für 4 h, als auch für 24 h rief in Leukozyten keine DNA-Migration hervor. Dieses negative Ergebnis kann mit dem Wirkmechanismus von Azathioprin erklärt werden, das die DNA-Synthese stört, aber in nichtreplizierenden Zellen keine DNA-Schäden hervorruft. Die durch Gammastrahlung induzierten dosisabhängigen Schäden in Leukozyten konnten mit dem Comet Assay eindeutig nachgewiesen werden. Diese Ergebnisse bestätigten die Sensitivität des verwendeten Comet Assay Protokolls.

Im Unterschied zu den negativen Ergebnissen im Comet Assay gibt es in der Literatur Hinweise auf die Induktion von Chromosomenaberrationen und MN in proliferierenden Zellen. In menschlichen Lymphozyten induzierte Azathioprin MN in An- und Abwesenheit eines metabolischen Aktivierungssystems (S9-Mix) (Vian et al., 1993). Dieses Ergebnis zeigt, dass auch Lymphozyten in einer Blutkultur Azathioprin zu einer genotoxisch wirksamen Substanz aktivieren können, und die metabolische Aktivität von Leberzellen dafür nicht erforderlich ist. In diesen

4. Diskussion

Versuchen wurde Azathioprin den Lymphozytenkulturen 44 h nach der PHA-Stimulation zugegeben und bis zur Präparation nach 72 h belassen. Diese positiven Ergebnisse *in vitro* wurden durch *in vivo* Tests bestätigt. In polychromatischen Erythrozyten des Knochenmarks von Ratten und Mäusen führte Azathioprin zu einer Induktion von MN bei Dosierungen ab 50 bzw. 25 mg/kg (van Went, 1979).

Die Ergebnisse unserer *in vitro* Experimente zeigen positive Ergebnisse im MNT, die jedoch vorsichtig zu bewerten sind. Im Standardprotokoll des MNT (d .h. Zugabe der Testsubstanz nach 44 h für den Rest der Kulturdauer) zeigte sich in binukleären Zellen bei hohen Konzentrationen ein Anstieg der Häufigkeit von Zellen mit MN (Tab.8). Auf Grund der hohen Variabilität der Ergebnisse der einzelnen Versuche war dieser Unterschied bei Konzentrationen bis 40 µg/ml nicht statistisch signifikant. Bei der höheren Konzentration (80 µg/ml) konnte aufgrund der starken zytotoxischen Wirkung, die durch eine konzentrationsabhängige Abnahme des NDI angezeigt wird, nur ein Versuch ausgewertet werden. Auch hier wurde eine gegenüber der Kontrolle deutlich erhöhte Rate an Zellen mit MN gemessen. Interessant ist, dass in mononukleären Zellen ein Anstieg der Häufigkeit MN-haltiger Lymphozyten gemessen wurde, der bei 40 µg/ml auch statistisch signifikant war. Ein solcher Effekt kann auf ein aneugenes Potenzial der Testsubstanz hinweisen (Elhajouji et al., 1998). Dieser Frage wurde jedoch in der vorliegenden Arbeit nicht weiter nachgegangen. In einer weiteren Versuchsserie wurden die Lymphozytenkulturen für die gesamte Kulturdauer von 72 h gegenüber Azathioprin exponiert. Dieses Protokoll wurde in Anlehnung an die *in vivo* Situation durchgeführt, da bei behandelten Patienten mit erhöhten Azathioprinspiegeln im Blut zu rechnen ist, die potenziell zu genotoxischen und mutagenen Effekten führen können. Die Behandlung der Lymphozytenkulturen mit Azathioprin für die gesamte Versuchsdauer verstärkte den zytotoxischen Effekt und führte dazu, dass Konzentrationen über 20 µg/ml nicht mehr auswertbar waren. Die Konzentrationen, die die Proliferation der Lymphozyten nicht so stark hemmten und eine Auswertung der Präparate ermöglichten, führten nicht zu einer Induktion von MN. Eine Zunahme von Zellen mit MN wurde weder in mononukleären noch in binukleären Zellen gemessen. Diese Ergebnisse zeigen, dass die zytotoxische Wirkung von Azathioprin unter diesen Versuchsbedingungen im Vordergrund

steht, und genotoxische bzw. mutagene Effekte im *in vitro* MNT nicht induzierbar sind. Insgesamt bestätigen die für diese Arbeit durchgeführten *in vitro* Untersuchungen ein genotoxisches Potenzial von Azathioprin. Die Ergebnisse sind mit einem indirekten Wirkmechanismus plausibel zu erklären. Azathioprin induziert nicht direkt DNA-Schäden, sondern entfaltet sein genotoxisches Potenzial über die Störung der DNA-Synthese. In nichtproliferierenden Zellen tritt kein genotoxischer Effekt auf.

Für Infliximab ergaben die Standardgenotoxizitätstests im Rahmen des Zulassungsverfahrens keinen Anhaltspunkt für eine DNA-schädigende Wirkung dieser Substanz. Die Forschung mit TNF- α -Inhibitoren beschäftigt sich eher mit Apoptoseinduktion und möglichen teratogenen Effekten (EMA, 2005). In Studien von Jarmalaite et al. (2008) und Danaloglu (2009) konnte gezeigt werden, dass Infliximab SCE-Raten reduziert und somit eher eine antigenotoxische Wirkung hat. Es gibt bisher keine Studie, in der Infliximab *in vitro* im Comet Assay untersucht wurde. Meine Experimente erbrachten ein eindeutig negatives Ergebnis. Nach Expositionen von Blutkulturen gegenüber Infliximab für 24 h wurde keine Zunahme der DNA-Migration in Leukozyten gemessen. Die getesteten Konzentrationen von 1-100 $\mu\text{g/ml}$ werden als physiologisch relevant angenommen. Sie wurden in früheren Untersuchungen verwendet, um den Einfluss von Infliximab auf die Apoptoseinduktion zu untersuchen (Bedini et al., 2007). In meinen Versuchen wurde darüber hinaus die Konzentration 1000 $\mu\text{g/ml}$ getestet, die aber auch zu einem negativen Ergebnis führte. Die Ergebnisse meiner Versuche bestätigen, dass Infliximab im *in vitro* Comet Assay mit menschlichen Leukozyten keinen genotoxischen Effekt zeigt. Offensichtlich induziert Infliximab weder direkt noch indirekt DNA-Strangbrüche, welche Voraussetzung für eine verstärkte DNA-Migration im Comet Assay sind.

Infliximab induzierte im MNT mit kultivierten humanen Lymphozyten keine MN nach einer Exposition über die gesamte Kulturdauer. Die höchste getestete Konzentration von 1000 $\mu\text{g/ml}$ führte zu einer leichten Hemmung der Lymphozytenproliferation, induzierte jedoch keine MN.

In dieser Arbeit wurde zum ersten Mal untersucht, ob die Kombination von Azathioprin und Infliximab zu einer Induktion von genotoxischen Effekten führt. In diesen Versuchen wurden Azathioprinkonzentrationen bis zu 10 µg/ml in Kombination mit 10 bis 100 µg/ml Infliximab getestet. In keinem dieser Versuche wurde ein statistisch signifikanter Effekt auf die DNA-Migration gemessen. Mit den gleichen Konzentrationen wurde auch der MNT mit Exposition für 72 h durchgeführt. Es wurde in keinem dieser Ansätze eine erhöhte Rate an MN in mono- oder binukleären Zellen gemessen. Es zeigte sich aber auch hier bei einer Azathioprinkonzentration von 10 µg/ml eine verminderte Teilungsaktivität. Die Kombinationsversuche mit den beiden Genotoxizitätstests ergaben unter diesen Versuchsbedingungen keinerlei Hinweise darauf, dass bei der Kombinationsbehandlung mit Azathioprin und Infliximab ein genotoxischer Effekt auftritt. Infliximab scheint unter diesen Bedingungen auch nicht zu einer Verstärkung der genotoxischen Wirkung von Azathioprin zu führen. Aus den Ergebnissen dieser *in vitro* Versuche kann man schließen, dass Infliximab kein relevantes genotoxisches Potenzial besitzt und die indirekte genotoxische Wirkung von Azathioprin nicht verstärkt.

4.2 Genotoxische Effekte nach immunsuppressiver Therapie

Es gibt in der Literatur Hinweise darauf, dass Azathioprin unter therapeutischen Bedingungen im MNT genotoxische Effekte auf Lymphozyten von Patienten hat. Bei Untersuchungen am Blut von Kindern, welche nach Nierentransplantation unter einer Dauertherapie mit Azathioprin standen, wurde ein dosisabhängiger Anstieg der Rate MN-haltiger Zellen gemessen (van Went., 1979). Auch in einer anderen Studie, in der die Auswirkung einer Folsäuresubstitution (1 mg/d über 1 Monat) auf den Verlauf von CED bei pädiatrischen Patienten untersucht wurde, wurden erhöhte MN-Raten im Vergleich zu den Kontrollen beobachtet. Bei den Patienten mit Morbus Crohn lagen die MN-Häufigkeiten vor der Substitution etwas über dem Kontrollwert. Patienten mit Colitis ulcerosa, welche zu Beginn der Studie sogar Werte unterhalb des Kontrollniveaus aufwiesen, zeigten nach der

Substitutionstherapie eine deutlich erhöhte Zahl an Zellen mit MN. Alle Patienten wurden u. a. mit Azathioprin therapiert (Holland et al., 2007). Eine Studie, die die Lymphozyten von Patienten mit Multipler Sklerose unter Therapie mit Azathioprin auf Chromosomenaberrationen und SCE hin untersuchte, kam zu dem Ergebnis, dass bei den mit Azathioprin behandelten Patienten mehr „gaps“ vorkamen als in der Kontrollgruppe, allerdings nicht mehr als bei den unbehandelten Patienten. Ein genotoxischer Effekt der Therapie wurde nicht nachgewiesen. Man muss auch hier den eventuellen Einfluss der Grunderkrankung berücksichtigen (Apelt et al., 1981). Dies gilt insbesondere auch für eine Studie mit Colitis-ulcerosa-Patienten bei denen im Vergleich zu den Kontrollen signifikant erhöhte Raten MN-haltiger Zellen gefunden wurden, aber nicht beschrieben wird, ob sich die Patienten zum Zeitpunkt der Blutentnahme unter einer Therapie befanden (Karaman et al., 2012).

Die Ergebnisse dieser Arbeit zeigten ein negatives Ergebnis im Comet Assay. Das lässt den Schluss zu, dass die Therapie mit Azathioprin bei den untersuchten Patienten nicht zu DNA-Strangbrüchen in Leukozyten geführt hat. Der Mittelwert des Tailmoments ist in dieser Gruppe im Vergleich zur Kontrollgruppe zwar leicht erhöht, jedoch wird dieser Unterschied durch den Wert von Pat. 8 verursacht, der mit 1,78 ungewöhnlich hoch ist. Es ist unklar, welche Bedeutung dieser Wert hat. Man kann ebenfalls davon ausgehen, dass bei diesen Patienten die Grunderkrankung nicht zu genotoxischen Effekten geführt hat, die mit dem Comet Assay nachgewiesen werden können.

Der MNT mit Lymphozyten der Patienten lieferte ein komplexes Ergebnis. Es wurde keine erhöhte Rate MN-haltiger binukleären Zellen gemessen. Dieses Ergebnis weist darauf hin, dass die Therapie nicht zu DNA-Schäden in den Lymphozyten geführt hat, die in proliferierenden Zellen *in vitro* zur Bildung von MN führen. Es wurden jedoch sowohl in den Lymphozyten der Patienten unter Azathioprintherapie, als auch in denen von Patienten unter Kombinationstherapie mit Azathioprin und Infliximab erhöhte Häufigkeiten MN-haltiger mononukleärer Lymphozyten nach 24 h Kultur gemessen. Dieser Befund ist ein Hinweis darauf, dass es bei diesen Patienten *in vivo* zur Induktion von MN kam. Diese MN persistieren in peripheren Lymphozyten und können in mononukleären Zellen, die sich *in vitro* noch nicht geteilt haben, nachgewiesen werden. Ob dieser Effekt eine

4. Diskussion

Auswirkung der Grunderkrankung oder der Immunsuppression ist, oder durch genotoxische Effekte der Therapie verursacht wird, kann auf der Basis dieser Daten nicht entschieden werden.

Was die TNF- α -Inhibitoren betrifft, so hat die Forschung in den letzten Jahren gerade erst begonnen. In einer Studie mit Morbus-Crohn-Patienten konnte gezeigt werden, dass die SCE-Frequenz, die in den Lymphozyten von Patienten im Vergleich zu den Kontrollen erhöht war, durch eine Behandlung mit Infliximab gesenkt wurde (Danalioglu, 2009). Infliximab ist ein Antikörper, der den humanen TNF- α im Blut neutralisiert. Speziell was CED betrifft, ist aber auch ein anderer Wirkmechanismus interessant. Es ist erwiesen, dass Infliximab auf aktivierte T-Lymphozyten der gastrointestinalen Mukosa apoptoseinduzierend wirkt (ten Hove et al., 2002). Es wurde auch untersucht, wie sich Infliximab auf Monozyten auswirkt die TNF- α produzieren. Zwar induziert Infliximab in den Monozyten keine Apoptose, aber sowohl bei Patienten als auch bei Kontrollen produzierten die Monozyten nach der Infliximabgabe weniger TNF- α (Ringheanu, 2004). Um der Frage nachzugehen, ob Infliximab auch *in vitro* apoptoseinduzierend wirkt, wurde eine Studie an Lymphozyten des peripheren Blutes von Patienten mit RA durchgeführt. Die apoptoseinduzierende Wirkung konnte jedoch nur für eine Subgruppe des Patientenkollektivs nachgewiesen werden, sodass zum besseren Verständnis der Vorgänge weitere Untersuchungen nötig sind (Coury, 2008). Um die Wirkung von TNF- α -Inhibitoren richtig einzuschätzen, ist es unerlässlich, die Wirkung von TNF- α selbst zu verstehen. Eine neuere Studie beschäftigte sich mit der Rolle von TNF- α , dem TNF- α /TNFR-Signalweg und der entzündungsassoziiert erhöhten Genotoxizität in Lymphozyten des peripheren Blutes von Mäusen mit Colitis. Es konnte sowohl im Comet Assay als auch im MNT gezeigt werden, dass TNF- α *in vivo* in physiologisch relevanten Konzentrationen in verschiedenen Zellen DNA-Schäden verursacht. Für die *in vitro* Versuche wurden murine T-Lymphozyten mit TNF- α behandelt. Auch hier zeigte sich ein dosisabhängiger Effekt. Sowohl *in vivo* als auch *in vitro* waren die Schäden 24 h nach Gabe der Einzeldosis TNF- α aber wieder repariert (Westbrook et al., 2011). Bei chronischen Entzündungen ist TNF- α systemisch hochreguliert. Eine Therapie mit TNF- α -Inhibitoren müsste sich also protektiv auswirken (Westbrook, 2009). Allerdings ist zu bedenken, dass TNF- α pleiotrope Effekte hat. Die Vermittlung entzündlicher

4. Diskussion

Reaktionen ist nur eine davon. Auch Zellproliferation, Überlebenssignale oder Apoptoseinduktion gehören dazu. Wie TNF- α wirkt, ergibt sich deshalb immer erst im Gesamtkontext der zellulären Vorgänge. Was beispielsweise die Apoptoseinduktion angeht, so kann diese in maligne entarteten Zellen ein wünschenswerter Effekt sein, in gesunden Körperzellen jedoch nicht. So wirkt TNF- α und genauso seine Hemmung durch TNF- α -Inhibitoren u. U. protektiv und toxisch zugleich (Erickson et al., 2012).

In den Versuchen dieser Arbeit wurden im Comet Assay mit dem Blut von Patienten keine genotoxischen Effekte nachgewiesen. Die Tailmomentmittelwerte der mit TNF- α -Inhibitoren behandelten Patientengruppe und die der Patientengruppe mit Kombinationstherapie lagen auf dem Niveau der Kontrollgruppe. Eine Therapie mit TNF- α -Inhibitoren - allein oder in Kombination mit Azathioprin - führte bei den untersuchten Patienten nicht zu einer Induktion von DNA-Schäden, die mit dem Comet Assay nachgewiesen werden können. Auch die Grunderkrankungen dieser Patienten scheinen nicht zu systemischen genotoxischen Effekten zu führen, die im Comet Assay mit peripheren Leukozyten zu DNA-Schäden geführt hätten. Bei Patienten mit Colitis ulcerosa wurden kürzlich in einer Studie signifikant erhöhte DNA-Schäden in Lymphozyten festgestellt, allerdings wird die Therapie nicht näher beschrieben (Aslan et al., 2011). Ein solcher Effekt trat in dieser Studie nicht auf. Die Tailmomentwerte der Patienten mit Colitis ulcerosa (Pat. 4, 7, 11, 13, 14, 17 und 20, Tab. 1) heben sich nicht von den Durchschnittswerten der Kontrollen, oder denen von Patienten mit anderen Erkrankungen ab.

Bei den Ergebnissen im MNT fällt auf, dass zum Präparationszeitpunkt nach Protokoll A die mittlere MN-Rate bei der Patientengruppe nach Behandlung mit TNF- α -Inhibitoren (Gruppe 2) gegenüber der Kontrollgruppe ebenfalls erhöht ist. Der Mittelwert von 3,2 ist höher als bei allen anderen Gruppen. Jedoch war der Unterschied zur Kontrollgruppe (0,6 ‰) aufgrund der großen Unterschiede zwischen den einzelnen Patienten und der kleinen Patientenzahl statistisch nicht signifikant. Da die Lymphozyten während der ersten 24 h Kulturzeit noch keine Zellteilung *in vitro* durchlaufen haben, eine Zellteilung aber obligatorisch für die MN-Entstehung ist, sind die in den Patientenproben gemessenen MN bereits *in*

4. Diskussion

in vivo entstanden (Fenech et al., 1997). Da man den TNF- α -Inhibitoren kein genotoxisches Potenzial unterstellen kann, wird dieser Effekt wahrscheinlich eine Folge der Grunderkrankungen sein. Hierzu ist anzumerken, dass alle Patienten der Gruppe 2 an Erkrankungen des rheumatischen Formenkreises leiden (Tab. 1 und Tab. 2).

Zwischen August und Dezember 2011 wurden in der Crohn-/Colitisambulanz der Klinik für Innere Medizin I am Universitätsklinikum Ulm nur wenige Patienten mit einer Kombinationstherapie aus Azathioprin und TNF- α -Inhibitor behandelt (Pat. 2, 4, 7, 12 und 15 bis 20, Tab. 2). Gerade diese war im Hinblick auf die Fragestellung aber von besonderem Interesse. Die Zeiträume, in denen die Patienten der Gruppe 3 gegenüber beiden Substanzen exponiert waren, waren in den meisten Fällen relativ kurz (1 bis 7 Monate). Nur Pat. 2 war deutlich länger exponiert (54 Monate), zeigte jedoch in den Genotoxizitätstests keinerlei auffällige, oder von denen der anderen Patienten abweichende Werte. Insgesamt erbrachten die Ergebnisse der durchgeführten Untersuchungen keinen Hinweis auf einen spezifischen genotoxischen Effekt der Kombinationstherapie. Die leicht erhöhte Rate MN-haltiger mononukleärer Lymphozyten trat bei allen drei Patientengruppen auf. Dieser *in vivo* Effekt könnte mit den Grunderkrankungen im Zusammenhang stehen. Zur definitiven Abklärung seiner biologischen Bedeutung sind weitere Studien mit einem größeren Patientenkollektiv erforderlich.

Im Unterschied zu den Ergebnissen der Patientengruppen 1 bis 3, können die genotoxische Wirkung von Cyclophosphamid (Patientengruppe 4) und die Persistenz *in vivo* induzierter DNA-Schäden in kultivierten Lymphozyten erklärt werden. Insbesondere die Werte von Pat. 21 und 22 zeigen sehr deutlich, dass die Therapie mit Cyclophosphamid zu stark erhöhten Raten an MN-haltigen binukleären Lymphozyten führt (Protokoll C), welche *in vivo* induzierten DNA-Schäden abbilden, die in kultivierten Lymphozyten zur Bildung von MN führen. Patienten die mit Cyclophosphamid behandelt wurden, wurden in diese Arbeit zusätzlich aufgenommen, da es sich bei Cyclophosphamid um ein starkes systemisches Mutagen handelt, das insbesondere Chromosomenaberrationen induziert. Cyclophosphamid gehört zur Gruppe der Alkylantien, weil es Nukleinsäuren alkyliert und somit zu veränderten Basen oder Vernetzungen

(„crosslinks“) in der DNA führt. Es ist ein bekanntes Kanzerogen, das von der IARC (International Agency for Research on Cancer) als humankanzerogen eingeschätzt wird (IARC, 2012). Cyclophosphamid wird zur Therapie von Leukämien, Lymphomen und zahlreichen Karzinomen als Zytostatikum eingesetzt, oder eben bei schweren Autoimmunerkrankungen als Immunsuppressivum (Karow, 2012).

Im Comet Assay mit Blut der Cyclophosphamidpatienten (Pat. 21 bis 25) waren die Tailmomentwerte auf dem Niveau des Durchschnittswertes der Kontrollen. Dies kann darauf beruhen, dass die durch Cyclophosphamid induzierten „crosslinks“ zu einer Hemmung der DNA-Migration führen und einer Zunahme der DNA-Migration durch DNA-Strangbrüche entgegenwirken. Eine frühere Studie hat eine verstärkte DNA-Migration im Blut von Patienten nachgewiesen, die mit Cyclophosphamid behandelt worden waren. Diese Patienten waren einer tägliche Cyclophosphamiddosis von 50mg bis 200 mg ausgesetzt gewesen. Die gemessene Zunahme der DNA-Migration war sehr variabel und zeigte keine Dosis-Effekt-Beziehung. *In vitro* Tests mit menschlichen Blutproben zeigten ebenfalls, dass nur nach akuter Behandlung mit hohen Cyclophosphamidkonzentrationen DNA-Effekte im Comet Assay induziert werden (Hartmann et al., 1995).

Die Ergebnisse des MNT mit Blut der hier untersuchten Patienten unter Cyclophosphamidtherapie zeigen eine hohe Variabilität. Nur die oben bereits erwähnten Pat. 21 und 22 wiesen im Vergleich zum Durchschnittswert der Kontrollen in Protokoll A und C stark erhöhte Werte auf. Die Werte von Pat. 23 lagen auf dem Kontrollniveau, was bei Berücksichtigung der täglichen Dosis von 100 mg und der kumulativen Dosis von ca. 15 g nicht erklärt werden kann. Bei Pat. 24 und 25 waren die Objektträger für Protokoll C aufgrund einer starken Proliferationshemmung der Lymphozyten während der Kultur nicht auswertbar. Auch in der Arbeit von Arsoy et al. (2009) war aufgefallen, dass im Blut von Patienten, auch nach langer Behandlung mit Cyclophosphamid, kein Effekt im MNT nachzuweisen war. Der NDI war bei den in meiner Studie untersuchten Patienten sehr verschieden beeinflusst. Die Lymphozytenkulturen der Patienten mit den eindeutigen Effekten im MNT (Pat. 21 und 22) wiesen praktisch keine

Einschränkung der Proliferation auf. Der NDI von Pat. 23 war deutlich reduziert und bei den Pat. 24 und 25 war die Proliferationshemmung so stark, dass keine ausreichende Zahl an binukleären Zellen für die Auswertung des MNT zur Verfügung stand. Das „Weiße Blutbild“ der Pat. 21 bis 25 (Gruppe 4) ist in Tab. 19 zusammen mit dem NDI dargestellt. Die Lymphozytenzahlen sind bei Pat. 21 und Pat. 23 deutlich erniedrigt, was sich aber nur bei Pat. 21 auf das Wachstum der Zellen ausgewirkt hat. Pat. 21, Pat. 23 und Pat. 25 haben im Vergleich zu Pat. 22 und Pat. 24 relativ hohe Kumulativdosen Cyclophosphamid erhalten. Bei den Pat. 24 und 25 wurde zum Zeitpunkt der Blutentnahme kein Lymphozytenwert ermittelt. Pat. 24 hatte ca. 4 Wochen vor der Blutentnahme eine leichte Leukozytose bei gleichzeitiger Lymphozytopenie. Da sich an der Medikation in diesem Zeitraum nichts Wesentliches geändert hat, und auch sonst nichts bekannt ist, was sich auf den Wert hätte auswirken können, kann man annehmen, dass der Lymphozytenwert zum Zeitpunkt der Blutentnahme auch in etwa diesem in Bereich lag, also leicht erniedrigt war. Um trotz eines möglicherweise reduzierten Zellwachstums zu aussagekräftigen Ergebnissen zu kommen, wurde für den MNT bei den Patienten der Gruppe 4 immer ein 6-fach- Ansatz gemacht. Warum die Lymphozyten der Patienten 24 und 25 so schlecht zu kultivieren waren, kann insbesondere für Pat. 24 nicht erklärt werden, da das Blutbild in etwa mit dem von Pat. 22 vergleichbar war.

In einer Untersuchung zur Entstehung von MN in kultivierten Lymphozyten von Patienten nach Zytostatikatherapie konnte gezeigt werden, dass MN nach *in vivo* Exposition gegenüber Zytostatika zum größten Teil erst während der Proliferation der Lymphozyten *in vitro* entstehen. Die Häufigkeit von MN, die bereits *in vivo* entstanden waren und in mononukleären Lymphozyten nach 24 h Kultur nachgewiesen wurden, war nur leicht erhöht. *In vivo* induzierte DNA-Schäden, die bis zur Zellteilung *in vitro* persistieren, schienen die Hauptursache für die MN-Entstehung zu sein (Arsoy et al. 2009). Bei den im Rahmen dieser Arbeit untersuchten Patienten unter Cyclophosphamidtherapie zeigte sich ein ähnliches Ergebnis, allerdings war auch die Rate an MN-haltigen mononukleären Zellen nach 24 h Kultur (Protokoll A) eindeutig erhöht. Im Unterschied dazu hatten die Lymphozyten der hier untersuchten Patienten nach immunsuppressiver Therapie mit Azathioprin und/oder TNF- α -Inhibitor offensichtlich keine DNA-Schäden, die zu

MN in binukleären Zellen hätten führen können. Da die Patientengruppen 1 bis 3 alle leicht erhöhte Häufigkeiten MN-haltiger Lymphozyten vor der ersten Zellteilung aufwiesen, ist es eher unwahrscheinlich, dass es sich dabei um einen genotoxischen Effekt der Therapie handelt. Zumindest was die Gruppe der nur mit TNF- α -Inhibitor behandelten Patienten betrifft (Gruppe 2), kann man nicht von einem genotoxischen Effekt der Testsubstanz ausgehen. Wahrscheinlich handelt es sich bei diesen *in vivo* entstandenen MN um eine durch die Grunderkrankung oder die Immunsuppression verursachte genomische Instabilität. Es würde sich lohnen, dieser Frage in weiteren Studien gezielt nachzugehen.

Ob die Grunderkrankungen bzw. die Immunsuppression eine mögliche Erklärung für die gehäuften Fälle von Lymphomen bei Patienten mit chronisch-entzündlichen Erkrankungen sind, müsste in geeigneten epidemiologischen Studien untersucht werden. Die Tatsache, dass die Fallzahlen von Lymphomen seit der Markteinführung der TNF- α -Inhibitoren angestiegen sind, spricht gegen die Theorie, dass allein die chronisch-entzündlichen Erkrankungen an sich mit einem erhöhten Risiko für bestimmte Krebserkrankungen behaftet sind. Es wäre denkbar, dass eine immunsuppressive Therapie, gerade wenn sie wie bei einer Kombination aus Azathioprin und TNF- α -Inhibitoren an verschiedenen Punkten der Immunantwort angreift, und besonders wenn der TNF- α inhibiert wird, das Entstehen von Krebserkrankungen begünstigt. Welchen Anteil die Grunderkrankung und welchen die Immunsuppression, speziell die Suppression von TNF- α an der Krebsentstehung hat und warum gerade die lymphatischen Organe so häufig betroffen sind, bedarf weiterer Forschung.

5. Zusammenfassung

Bei Patienten mit chronisch-entzündlichen Erkrankungen unter immunsuppressiver Therapie mit Azathioprin oder einem Tumor-Nekrose-Faktor- α -Inhibitor (TNF- α -Inhibitor) treten, besonders wenn beide Substanzen gleichzeitig eingesetzt werden, relativ häufig maligne Neoplasien auf. Besonders das Risiko für ein hepato-spenales T-Zell-Lymphom (HSTCL), das normalerweise sehr selten vorkommt, ist bei diesen Patienten deutlich erhöht. Die US Food and Drug Administration (FDA) hat im Jahr 2011 eine frühere Warnung vor dieser schweren Nebenwirkung von TNF- α -Inhibitoren noch einmal bekräftigt. Als mögliche Risikofaktoren werden die chronisch-entzündlichen Grunderkrankungen selbst, die Immunsuppression, die Ziel der Therapie und somit unumgänglich ist, oder mögliche genotoxische Effekte der eingesetzten Medikamente diskutiert. Die Immunsuppressiva, die zur Therapie chronisch-entzündlicher Erkrankungen (CED) eingesetzt werden, gehören unterschiedlichen Substanzklassen an und haben unterschiedliche Angriffspunkte im Ablauf der Immunantwort. Entsprechend der Warnung der FDA besteht v. a. Klärungsbedarf, ob tatsächlich eine Kombination aus Azathioprin und TNF- α -Inhibitoren als für die Patienten risikoreicher eingestuft werden muss als die jeweilige Monotherapie.

Ziel dieser Arbeit war es, bei Patienten, die mit diesen verschiedenen Therapieansätzen behandelt werden, Hinweise auf mögliche genotoxische Effekte zu finden. Darüber hinaus sollte das genotoxische Potenzial der eingesetzten Medikamente mittels *in vitro* Tests charakterisiert werden. Als Genotoxizitätstests kamen der Comet Assay und der Mikronukleustest (MNT) zum Einsatz. Mit dem Comet Assay können DNA-Strangbrüche nachgewiesen werden, der MNT erfasst Chromosomenbrüche und Aneuploidie. Potenzielle genotoxische Effekte von Azathioprin und Infliximab wurden sowohl *in vitro* durch Exposition von Blutproben, als auch *in vivo* im Blut von Patienten mit chronisch-entzündlichen Erkrankungen (CED oder Erkrankungen des rheumatischen Formenkreises) mit beiden Methoden und verschiedenen Versuchsprotokollen untersucht.

In den *in vitro* Versuchen zeigte sich, dass Azathioprin in hohen Konzentrationen zu indirekten genotoxischen Effekten führt, die in proliferierenden Zellen Mikronuklei (MN) induzieren können. Frühere Untersuchungen zum genotoxischen Potenzial von Azathioprin wurden durch diese Ergebnisse bestätigt. Bei einer Exposition der Zellen während der Synthese-Phase (S-Phase) des Zellzyklus war eine ausgeprägte Proliferationshemmung zu beobachten. Die Exposition der Blutproben gegenüber Infliximab und der Kombination aus beiden Substanzen lieferte keinen Hinweis auf genotoxische Effekte unter diesen Versuchsbedingungen, insbesondere nicht auf eine Verstärkung bei kombinierter Exposition.

Die Untersuchung der Blutproben von Patienten zeigte keine DNA-Schäden im Comet Assay. Auch eine Induktion von MN in binukleären Zellen konnte im MNT nicht nachgewiesen werden. Allerdings war die Zahl der MN-haltigen mononukleären Lymphozyten bei allen Patientengruppen erhöht. Diese MN sind bereits *in vivo* entstanden, da sich die Zellen zu diesem Zeitpunkt *in vitro* noch nicht geteilt haben. Da dieser Effekt auch in der Patientengruppe zu beobachten war, die nur mit einem TNF- α -Inhibitor behandelt wurde, ist er wahrscheinlich unabhängig von der Therapie, sondern eher eine Folge der chronisch-entzündlichen Grunderkrankung. Auch in den Blutproben der Patienten ergab sich kein Hinweis darauf, dass TNF- α -Inhibitoren die indirekt genotoxische Wirkung von Azathioprin verstärken.

Aus diesen Ergebnissen lässt sich folgern, dass Azathioprin in hohen Konzentrationen und bei Exposition der Zellen während der S-Phase durch die Hemmung der DNA-Synthese indirekte genotoxische Effekte induziert und stark zytotoxisch wirkt. Es verursacht keine Induktion von persistierenden DNA-Schäden. Die indirekte genotoxische Wirkung von Azathioprin wird durch TNF- α -Inhibitoren nicht verstärkt. Die beschriebenen erhöhten Tumorrisiken nach Kombinationstherapie lassen sich auf dem momentanen Stand der Forschung nicht über eine genotoxische Wirkung der Medikamente erklären.

6 . Literaturverzeichnis

1. **Apelt F, Kolin-Gerresheim J, Bauchinger M:** Azathioprine, a clastogen in human somatic cells? Analysis of chromosome damage and SCE in lymphocytes after exposure in vivo and in vitro. *Mutat Res* 88: 61-72 (1981)
2. **Arsoy N S, Neuss S, Wessendorf S, Bommer M, Viardot A, Schuetz P Speit G:** Micronuclei in peripheral blood from patients after cytostatic therapy mainly arise ex vivo from persistent damage. *Mutagenesis* 24: 351-357 (2009)
3. **Asanami S, Shimono K, Sawamoto O, Kurisu K, Uejima M:** The suitability of rat peripheral blood in subchronic studies for the micronucleus assay. *Mutat Res* 347: 73-78 (1995)
4. **Aslan M, Nazligu Y, Bolukbas C, Bolukbas F F, Horoz M, Dulger A C, Erdur F M, Celik H, Kocyigit A:** Peripheral lymphocyte DNA damage and oxidative stress in patients with ulcerative colitis. *Pol Arch Med Wewn* 121: 223-229 (2011)
5. **Bedini C, Nasorri F, Girolomoni G, Pita O, Cavani A:** Antitumour necrosis factor-alpha chimeric antibody (infliximab) inhibits activation of skin-homing CD4+ and CD8+ T lymphocytes and impairs dendritic cell function. *Br J Dermatol* 157: 249-258 (2007)
6. **Bonassi S, Ugolini D, Kirsch-Volders M, Strömberg U, Vermeulen R, Tucker J D:** Human Population Studies With Cytogenetic Biomarkers: Review of the Literature and Future Prospectives. *Environ Mol Mutagen* 45: 258-270 (2005)
7. **Bonassi S, Znaor A, Ceppi M, Lando C, Chang W P, Holland N, Kirsch-Volders M, Zeiger E, Ban S, Barale R, Bigatti M P, Bolognesi C, Cebulska-Wasilewska A, Fabianova E, Fucic A, Hagmar L, Joksic G, Martelli A, Migliore L, Mirkova E, Scarfi M R, Zijno A, Norppa H, Fenech M:** An increased micronucleus frequency in peripheral blood lymphocytes predicts the risk of cancer in humans. *Carcinogenesis* 28: 625-631 (2007)
8. **Cooke M S, Duarte T L, Cooper D, Chen J, Nandagopal S, Evans M D:** Combination of azathioprine and UVA irradiation is a major source of cellular 8-oxo-7,8-dihydro-2'-deoxyguanosine. *DNA Repair. Amst* 7: 1982-1989 (2008)
9. **Cottone M, Papi C, Orlando A:** Infliximab, azathioprine or combination therapy in the treatment of active Crohn's disease. *Expert Rev Gastroenterol Hepatol* 4: 709-712 (2010)

10. **Cottone M, Criscuoli V:** Infliximab to treat Crohn's disease: an update. *Clin Exp Gastroenterol* 4: 227-238 (2011)
11. **Coury F, Ferraro-Peyret C, Le Cam S, Guerin S, Tebib J, Sibilia J, Biennu J, Fabien N:** Peripheral blood lymphocytes from patients with rheumatoid arthritis are differentially sensitive to apoptosis induced by anti-tumour necrosis factor-alpha therapy. *Clin Exp Rheumatol* 26: 234-239 (2008)
12. **Danalioglu A:** The frequency of sister chromatid exchanges in patients with Crohn's disease and the effect of therapy with "anti-tumor necrosis factor" on this frequency. *Hepatogastroenterology* 56: 729-733 (2009)
13. **EMA:** Remicade: EPAR-Scientific Discussion. http://www.ema.europa.eu/docs/en_GB/document_library/EPAR_-_Scientific_Discussion/human/000240/WC500050885.pdf, download-Datum 07.01.2013 (2005)
14. **Elhajouji A, Cunha M, Kirsch-Volders M:** Spindle poisons can induce polyploidy by mitotic slippage and micronucleate mononucleates in the cytokinesis-block assay. *Mutagenesis* 13: 193-198 (1998)
15. **Erickson R I, Tarrant J, Cain G, Lewin-Koh S C, Dybdal N, Wong H, Blackwood E, West K, Steigerwalt R, Mamounas M, Flygare J A, Amemiya K, Dambach D, Fairbrother W J, Diaz D:** Toxicity Profile of Small-Molecule IAP Antagonist GDC-0152 Is Linked to TNF-alpha Pharmacology. *Toxicol Sci* 131: 247-258 (2012)
16. **FDA:** Early Communication About an Ongoing Safety Review of Tumor Necrosis Factor (TNF) Blockers (marketed as Remicade, Enbrel, Humira, and Cimzia). <http://www.fda.gov/Drugs/DrugSafety/PostmarketDrugSafetyInformationforPatientsandProviders/DrugSafetyInformationforHealthcareProfessionals/ucm070725.htm>, download-Datum 07.01.2013 (2008)
17. **FDA:** FDA Drug Safety Communication: Safety Review update on reports of Hepatosplenic T-Cell Lymphoma in adolescents and young adults receiving tumor necrosis factor (TNF) blockers, azathioprine and/or mercaptopurine. <http://www.fda.gov/Drugs/DrugSafety/ucm250913.htm>, download-Datum 07.01.2013 (2011)
18. **Fenech M:** The cytokinesis-block micronucleus technique: A detailed description of the method and its application to genotoxicity studies in human populations. *Mutat Res* 285: 35-44 (1993)

19. **Fenech M, Perepetskaya G, Mikhalevich L:** A more comprehensive application of the micronucleus technique for biomonitoring of genetic damage rates in human populations-experiences from the Chernobyl catastrophe. *Environ Mol Mutagen* 30: 112-118 (1997)
20. **Fenech M:** Cytokinesis-block micronucleus cytome assay. *Nat Protoc* 2: 1084-1104 (2007)
21. **Hartmann A, Herkommer K, Gluck M, Speit G:** DNA-damaging effect of cyclophosphamide on human blood cells in vivo and in vitro studied with the single-cell gel test (comet assay). *Environ Mol Mutagen* 25: 180-187 (1995)
22. **Henderson L, Fedyk J, Windebank S, Smith M:** Induction of micronuclei in rat bone marrow and peripheral blood following acute and subchronic administration of azathioprine. *Mutat Res* 291: 79-85 (1993)
23. **Herold G und Mitarbeiter:** *Innere Medizin* 2011. 467-474, 637-672 (2011)
24. **Holland N, Harmatz P, Golden D, Hubbard A, Wu Y Y, Bae J, Chen C, Huen K, Heyman M B:** Cytogenetic damage in blood lymphocytes and exfoliated epithelial cells of children with inflammatory bowel disease. *Pediatr Res* 61: 209-214 (2007)
25. **Horneff G:** [Malignancy and tumor necrosis factor inhibitors in juvenile idiopathic arthritis]. *Z Rheumatol* 69: 516-526 (2010)
26. **IARC:** PHARMACEUTICALS, A Review of Human Carcinogens, IARC Monogr Eval Carcinog Risks Hum 100A: 63-90 (2012)
27. **Jarmalaite S, Dedonyte V, Mierauskiene J, Simkute L, Ranceva J, Butrimiene I:** Cytogenetic effects of treatment with methotrexate and infliximab in rheumatoid arthritis patients. *Biologija* 54: 7-11 (2008)
28. **Karaman A, Hamurcu Z, Donmez H, Bitken N, Karaman H, Baskol M, Gursoy S, Guven K, Ozbakir O, Yucesoy M:** Investigation of genome instability in exfoliated colonic epithelial cells and in mitogen-stimulated lymphocytes of patients with ulcerative colitis. *Digestion* 85: 228-235 (2012)
29. **Karow T, Lang-Roth R:** *Allgemeine und Spezielle Pharmakologie und Toxikologie, 20. Auflage:* 408-411, 605-616, 869-876, 907-908 (2012)
30. **Kirsch-Volders M, Fenech M:** Inclusion of micronuclei in non-divided mononuclear lymphocytes and necrosis/apoptosis may provide a more comprehensive cytokinesis block micronucleus assay for biomonitoring purposes. *Mutagenesis* 16: 51-58 (2001)

31. **Kirsch-Volders M, Plas G, Elhajouji A, Lukamowicz M, Gonzalez L, Vande L K, Decordier I:** The in vitro MN assay in 2011: origin and fate, biological significance, protocols, high throughput methodologies and toxicological relevance. *Arch Toxicol* 85: 873-899 (2011)

32. **Kupcova M, Turecky L, Uhlikova E:** The role of oxidative stress in anti-tumor necrosis factor antibody treatment in Crohn's disease. *Curr Med Chem* 19: 5226-5231 (2012)

33. **Mackey A C, Green L, Liang L C, Dinndorf P, Avigan M:** Hepatosplenic T cell lymphoma associated with infliximab use in young patients treated for inflammatory bowel disease. *J Pediatr Gastroenterol Nutr* 44: 265-267 (2007)

34. **Miyamae Y, Zaizen K, Ohara K, Mine Y, Sasaki Y F:** Detection of DNA lesions induced by chemical mutagens by the single cell electrophoresis (Comet) assay. 1. Relationship between the onset of DNA damage and the characteristics of mutagens. *Mutat Res* 415: 229-235 (1998)

35. **Parakkal D, Sifuentes H, Semer R, Ehrenpreis E D:** Hepatosplenic T-cell lymphoma in patients receiving TNF-alpha inhibitor therapy: expanding the groups at risk. *Eur J Gastroenterol Hepatol* 23: 1150-1156 (2011)

36. **Ringheanu M, Daum F, Markowitz J, Levine J, Katz S, Lin X, Silver J:** Effects of infliximab on apoptosis and reverse signaling of monocytes from healthy individuals and patients with Crohn's disease. *Inflamm Bowel Dis* 10: 801-810 (2004)

37. **Smith C C, Archer G E, Forster E J, Lambert T R, Rees R W, Lynch A M:** Analysis of gene mutations and clastogenicity following short-term treatment with azathioprine in MutaMouse. *Environ Mol Mutagen* 34: 131-139 (1999)

38. **Speit G, Rothfuss A:** The comet assay: a sensitive genotoxicity test for the detection of DNA damage and repair. *Methods Mol Biol* 920: 79-90 (2012)

39. **Speit G, Zeller J, Neuss S:** The in vivo or ex vivo origin of micronuclei measured in human biomonitoring studies. *Mutagenesis* 26: 107-110 (2011)

40. **ten Hove T, van Montfrans C, Peppelenbosch M P, van Deventer S J:** Infliximab treatment induces apoptosis of lamina propria T lymphocytes in Crohn's disease. *Gut* 50: 206-211 (2002)

41. **Torous D K, Hall N E, Murante F G, Gleason S E, Tometsko C R, Dertinger S D:** Comparative scoring of micronucleated reticulocytes in rat peripheral blood by flow cytometry and microscopy. *Toxicol Sci* 74: 309-314 (2003)
42. **van Went G F:** Investigation into the mutagenic activity of azathioprine (Imuran) in different test systems. *Mutat Res* 68: 153-162 (1979)
43. **Vian L, Bichet N, Gouy D:** The in vitro micronucleus test on isolated human lymphocytes. *Mutat Res* 291: 93-102 (1993)
44. **Westbrook A M, Wie B, Braun J, Schiestl R H:** More damaging than we think: systemic effects of intestinal inflammation. *Cell Cycle* 8: 2482-2483 (2009)
45. **Westbrook A M, Wie B, Braun J, Schiestl R H:** Intestinal inflammation induces genotoxicity to extraintestinal tissues and cell types in mice. *Int J Cancer* 129: 1815-1825 (2011)
46. **Westbrook A M, Wie B, Hacke K, Xia M, Braun J, Schiestl R H:** The role of tumour necrosis factor-alpha and tumour necrosis factor receptor signalling in inflammation-associated systemic genotoxicity. *Mutagenesis* 27: 77-86 (2012)
47. **Zhou C, Li Z, Diao H, Yu Y, Zhu W, Dai Y, Chen F F, Yang J:** DNA damage evaluated by gammaH2AX foci formation by a selective group of chemical/physical stressors. *Mutat Res* 604: 8-18 (2006)

Danksagung

Mein Dank gilt allen, die zum Gelingen dieser Arbeit beigetragen haben.

Bei Prof. Dr. Christian Kubisch bedanke ich mich für die Aufnahme als Doktorandin im Institut für Humangenetik.

Ganz besonders möchte ich mich bei Prof. Dr. Günter Speit dafür bedanken, dass er sich bereiterklärt hat diese Arbeit zu betreuen. Er war mir jederzeit ein verlässlicher Ansprechpartner, was ich ganz besonders zu schätzen weiß. Ich durfte vieles von ihm lernen und danke ihm für all seine Unterstützung!

Außerdem danke ich mich ganz herzlich Petra Schütz, die mich in die Laborarbeit eingewiesen hat und die mir so oft mit Rat und Tat zur Seite stand. Auch Stefanie Kühner, Regina Linsenmeyer, Giang Duong und Julia Bausinger waren hilfsbereite Kolleginnen an die ich mich jederzeit wenden konnte. Vor allem aber danke ich ihnen für ihre Freundschaft und dafür, dass sie in schweren Zeiten für mich da waren.

Ohne die Unterstützung durch die Ärztlichen Leiter der Rheuma- und Crohn-/Colitis-Ambulanz der Universitätsklinik Ulm wäre die Studie nicht möglich gewesen. Ich bedanke mich dafür bei PD Dr. Andreas Viardot, und bei PD Dr. Jochen Klaus, sowie Ihren Mitarbeitern, allen voran Dr. Mark Hänle, ohne dessen Hilfe die Suche nach geeigneten Patienten wesentlich länger gedauert hätte.

Ein herzliches Dankeschön an alle Patienten und Probanden, die sich bereiterklärt haben an der Studie mitzuwirken.

Ich möchte es nicht versäumen, an dieser Stelle auch meinen Eltern zu danken-für alles!

Lebenslauf

Der Lebenslauf wurde aus Gründen des Datenschutzes entfernt.