

Herausgeber: N. Henning, 852 Erlangen, Fichtestraße 7  
Schriftleitung: K. Heinkel, 7 Stuttgart-S, Leonberger Straße 220  
E. Schmid, 24 Lübeck, Kronsforder Allee 71-73  
R. Berchtold, CH-4500 Solothurn, Chirurg. Abt. d. Bürgerspitals  
U. Ritter, 24 Lübeck, Kronsforder Allee 71-73  
Fr. Wewalka, A-1070 Wien, Kellermannngasse 5-9  
Verlag: Karl Demeter, 8032 Gräfelfing/München, Würmstraße 13

---

Jahrgang 9 (1971)

Heft 1

47-51

---

Aus der Gastroenterologischen Abteilung (Leiter: Prof. Dr. K. E. Hampel)  
der Medizinischen Klinik und Poliklinik der Freien Universität Berlin  
(Direktor: Prof. Dr. G. A. Neuhaus)  
und der Chirurgischen Klinik und Poliklinik der Freien Universität Berlin  
(Direktor: Prof. Dr. E. S. Bücherl)

## **Chromosomenmutationen durch Azathioprin bei menschlichen Leukozyten in vitro**

Von K. E. HAMPPEL, A. LACKNER, G. SCHULZ und V. BUSSE

Chromosomenaberrationen durch Azathioprin-Therapie wurden von *Jensen* (3) in Knochenmarkszellen bei 6 Patienten beschrieben, während *Eberle* u. Mitarb. (1) in peripheren Blutkulturen von 15 Patienten die Mutagenität der Substanz nicht nachweisen konnten. Da Azathioprin als immunsuppressives Pharmakon ein breites Indikationsgebiet u. a. auch bei gastroenterologischen Krankheiten umfaßt, erschien es wichtig zu prüfen, ob die Substanz auch in vitro Chromosomenmutationen induziert, wie dies bei mehreren Zytostatika bereits nachgewiesen wurde (*Hampel*, 2).

## Methodik

Kulturen peripherer Leukozyten wurden serienweise nach der von *Moorhead* (4) angegebenen, jedoch geringfügig modifizierten Methode angesetzt und bearbeitet. Die Testsubstanzen Azathioprin und 6-Merkaptopurin<sup>1)</sup> wurden unter verschiedenen Bedingungen 24 Std. vor Abbruch zugesetzt. Pro Kultur wurden 100 Metaphasen bewertet.

## Ergebnisse

Die Spontanmutationen (Tab. 1) in unbehandelten Kontrollkulturen lagen zwischen 0 und 3, im Mittel bei 1 % Metaphasen mit Aberrationen. Durch Zusatz der Lösungsvermittler Oximazon<sup>2)</sup> und Butanol und durch Plasma unbehandelter Ratten allein wurden keine höheren Aberrationsraten erzielt. Weder durch Azathioprin allein (Tab. 2) in alkalischem Milieu noch in Azeton oder Polyäthylenglykol wurden Chromosomenmutationen erzielt, die das Ausmaß der unbehandelten Kontrollen überstiegen. Wurde jedoch Azathioprin in den Lösungsvermittlern Oximazon bzw. Butanol zugesetzt, lag der Prozentsatz der geschädigten Metaphasen zwischen 60 und 73 bzw. zwischen 12 und 19. Durch die reduzierten Mitoseindices konnten in den Kulturen Nr. 19, 20 und 22 nur jeweils 51, 71 bzw. 91 Metaphasen bewertet werden. Erhielten Wistar-Inzuchtratten 125 mg/kg Azathioprin in physiologischer Kochsalzlösung mit

---

<sup>1)</sup> Azathioprin-Reinsubstanz und das handelsübliche Präparat Imurel®, Imuran® (Deutsche Wellcome GmbH, Großburgwedel), 6-Merkaptopurin-Reinsubstanz (Schuchardt, München).

<sup>2)</sup> Fa. Asta-Werke, Brackwede.

Natronlauge, pH  $\approx$  8 intravenös injiziert und wurde das durch Herzpunktion nach 1 Std. gewonnene Plasma den Leukozytenkulturen zugesetzt, so war der Prozentsatz der geschädigten Metaphasen mit 12—14 ebenfalls deutlich gegenüber den Kontrollen erhöht. Zur weiteren Kontrolle der Ergebnisse wurden Tabletten des handelsüblichen Präparates Imurel<sup>®</sup> zerkleinert, homogenisiert und in einer Konzentration entsprechend 7  $\mu$ g/ml in die Kulturen gegeben. Bei Verwendung einer wäßrigen Suspension mit Natronlauge (pH  $\approx$  8) ließen sich wiederum keine Chromosomenveränderungen erzielen, jedoch bei Suspension in Oximazon wurden 31 bzw. 48 % der Metaphasen geschädigt. Ähnlich waren die Ergebnisse bei Verwendung des in vivo entstehenden Spaltprodukts 6-Merkaptopurin, bei dem 6  $\mu$ g/ml nur in Verbindung mit Oximazon in 20 bzw. 28 % der Zellen Chromosomenmutationen induzierte.

Tabelle 1:

Nr.	Kultur (Dosen pro ml Medium)	% Metaphasen mit Chromosomenmutationen	
1— 6	Kontrollen — unbehandelt	0—3, $\bar{x}$ = 1	
7— 8	Kontrollen + 0,02 ml Oximazon	0	3
9—10	Kontrollen + 0,01 ml Butanol : H <sub>2</sub> O 1 : 1	1	1
11—12	Kontrollen + 0,1 ml Rattenplasma	1	2

Tabelle 2

Nr.	Kultur (Dosen pro ml Medium)	% Metaphasen mit Chromosomenmutationen	
13—14	Azathioprin 0,01 mg in H <sub>2</sub> O + NaOH, pH $\approx$ 8	1	6
15—16	Azathioprin 0,01 mg in Azeton	2	3
17—18	Azathioprin 0,01 mg in Polyäthylenglykol	0	6
19—20	Azathioprin 0,01 mg in Oximazon	60	73
21—22	Azathioprin 0,01 mg in Butanol	12	19
23—24	0,1 ml Plasma von Ratten mit 125 mg/kg Azathioprin i.v. Entnahme nach 1 Stunde	12	14
25—26	6-Merkaptopurin 0,006 mg in H <sub>2</sub> O + NaOH, pH $\approx$ 8	3	3
27—28	6-Merkaptopurin 0,006 mg in Oximazon	20	28

n = 100 außer in den Kulturen Nr. 19: n = 51  
 20: n = 71  
 22: n = 91

Entsprechend den früheren Ergebnissen bei anderen zytostatischen Substanzen stieg der Prozentsatz der durch Azathioprin geschädigten Metaphasen annähernd exponentiell mit der Konzentration (Abb. 1).

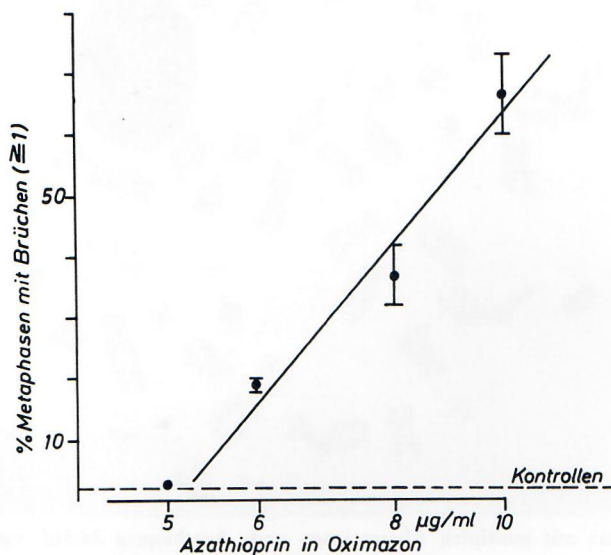


Abb. 1: Chromosenschädigung durch Azathioprin bei menschlichen Leukozyten in vitro Dosis-Wirkungs-Beziehung.

Die bewerteten Aberrationstypen waren folgende nach ihrer Häufigkeit geordnete:

Chromatidbrüche, azentrische Fragmente, Isochromatidbrüche sowie vereinzelt Interchanges, gaps und dizentrische Chromosomen. Die Abb. 2 zeigt eine Metaphase mit multiplen Aberrationen.

### Diskussion

Es konnte gezeigt werden, daß Azathioprin auch in vitro Chromosomenmutationen induziert. Dieser Effekt tritt jedoch nur in Verbindung mit Lösungsvermittlern auf, die die Lipoidlöslichkeit und damit das Eindringen der Testsubstanzen in die Zelle und Entstehung der aktiven Metabolite beeinflussen. Die Reaktion von Azathioprin mit den Lösungsvermittlern war weder zu erwarten noch ergab die Spektralanalyse einen entsprechenden Anhalt. Die in vivo bei der Ratte zu erwartenden aktiven Metabolite verursachten an menschlichen Leukozyten ohne Zugabe von Lösungsvermittlern ebenfalls Chromosomenmutationen. Die Möglichkeit der Anwendung höherer Konzentrationen als sie in vivo möglich sind, ist bei der quantitativen Bewertung chromosomaler Veränderungen in vitro von Vorteil. Erweist sich jedoch eine Substanz in vitro als nicht mutagen, so können daraus noch keine Schlüsse für das Verhalten in vivo gezogen werden.



Abb. 2: Metaphase mit multiplen Aberrationen nach Azathioprin 24 Std. vor Abbruch der Leukozytenkultur.



Abb. 3: Metaphase mit einem Chromatidbruch (Pfeil) nach Azathioprin.

#### Zusammenfassung:

Durch Zusatz von Azathioprin in Oximazon oder Butanol als Lösungsvermittler wurden bei menschlichen Leukozytenkulturen chromosomale Veränderungen in 60—73 bzw. 12—19 0/0 der bewerteten Metaphasen beobachtet (spontane Aberrationsrate = 0—3 0/0). Chromosomenmutationen wurden auch durch die im Plasma behandelter Ratten vorhandenen Azathioprinmetabolite sowie durch das homogenisierte handelsübliche Präparat Imurel® und durch 6-Merkaptopurin — beide in Oximazon — nachgewiesen. Bei Kulturen jedoch, die lediglich wäßrige Suspensionen von Azathioprin und 6-MP erhielten, blieb das Ausmaß der chromosomalen Aberrationen in dem Bereich von unbehandelten Kontrollen. Die Ergebnisse lassen erkennen, daß einige Faktoren in vitro — vermutlich die Passage von Azathioprin durch die Zellmembran — für die negativen Resultate einer anderen Arbeitsgruppe verantwortlich sein dürften.

#### Literatur:

1. Eberle, P., W. Hunstein u. E. Perings: *Humangenetik* 6 (1968) 69. — 2. Hampel, K. E.: *Int. J. clin. Pharmacol.* 1 (1968) 322. — 3. Jensen, M. K.: *Acta med. Scand.* 182 (1967) 445. — 4. Moorhead, P. S., P. C. Nowell, W. J. Mellman, D. M. Battips u. D. A. Hungerford: *Exp. Cell Res.* 20 (1960) 613.

*Anschrift der Verfasser: K. E. Hampel, A. Lackner und G. Schulz, Gastroenterolog. Abt. Med. Klinik u. Poliklinik der FU, und V. Busse, Chirurg. Klinik u. Poliklinik der FU im Klinikum Westend, 1 Berlin 19, Spandauer Damm 130.*