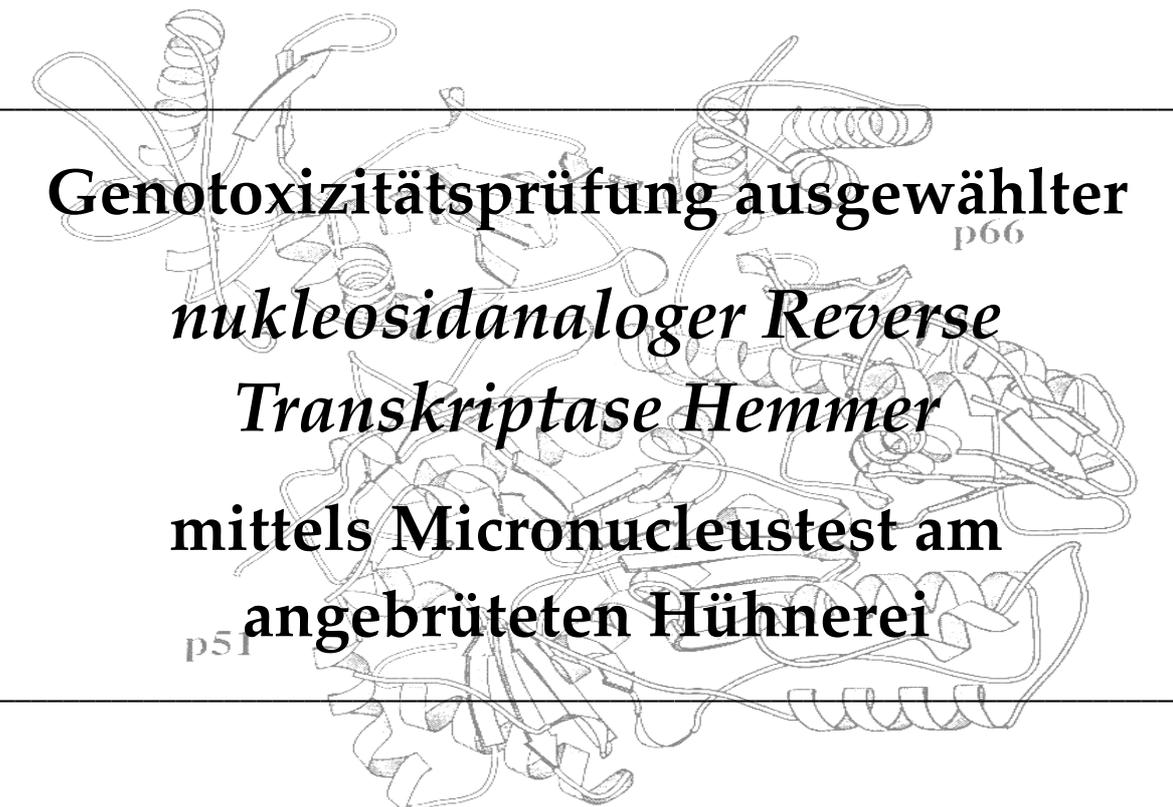


Universität Osnabrück
Fachbereich Humanwissenschaften



Genotoxizitätsprüfung ausgewählter
*nukleosidanaloger Reverse
Transkriptase Hemmer*
mittels Micronucleustest am
angebrüteten Hühnerei

The background features a detailed line drawing of protein structures. Two specific subunits are labeled: 'p66' is located near the top right of the protein complex, and 'p51' is located near the bottom left. The drawing shows various alpha-helices, beta-sheets, and loops, representing the complex three-dimensional structure of the proteins.

Inaugural-Dissertation
zur Erlangung des doctor rerum medicinalium (Dr. rer. medic.)

vorgelegt von
Katharina Bogdanow

2009

Meinen Eltern

3	EXPERIMENTELLER TEIL	57
	3.1 MATERIAL	57
	3.1.1 PRÜFMATERIAL	57
	3.1.2 PRÜFSUBSTANZEN	57
	3.1.3 GERÄTE	57
	3.1.4 PROGRAMME	58
	3.2 METHODE	58
	3.2.1 INKUBATION	58
	3.2.2 APPLIKATION DER PRÜFSUBSTANZEN ÜBER DIE LUFTKAMMER	59
	3.2.3 BLUTENTNAHME	59
	3.2.4 BLUTAUSSTRICHPRÄPARATE	62
	3.2.5 AUSWERTUNG („SCORING“) DER BLUTAUSSTRICHPRÄPARATE	62
	3.2.6 SELBSTKALIBRIERUNG	64
	3.2.7 HET-MN-STANDARD OPERATING PROCEDURE (SOP)	65
4	ERGEBNISSE	69
	4.1 PYRIMIDINANALOGA	69
	4.1.1 ZIDOVUDIN (AZT)	69
	4.1.2 STAVUDIN (D4T)	70
	4.1.3 ZALCITABIN (DDC)	71
	4.1.4 LAMIVUDIN (3TC)	72
	4.2 PURINANALOGA	74
	4.2.1 DIDANOSIN	74
	4.3 KOMBINATIONSVERSUCH	75
	4.3.1 ZIDOVUDIN (AZT) – DIDANOSIN (DDI)	75
	4.4 INTERNE SELBSTKONTROLLE	76
	4.5 HISTORISCHE KONTROLLEN	77
	4.5.1 NEGATIVKONTROLLE	77
	4.5.2 POSITIVKONTROLLE	79
5	DISKUSSION	81

5.1	PYRIMIDINANALOGA	82
5.1.1	ZIDOVUDIN (AZT)	82
5.1.2	STAVUDIN (D4T)	88
5.1.3	ZALCITABIN (DDC)	93
5.1.4	LAMIVUDIN (3TC)	97
5.1.4.1	Epivir®, Lösung zum Einnehmen, 10 mg/ml	98
5.1.4.2	Epivir®, Tabletten, 300 mg	99
5.2	PURINANALOGA	102
5.2.1	DIDANOSIN	102
5.3	KOMBINATIONSVERSUCH	106
5.3.1	ZIDOVUDIN (AZT) – DIDANOSIN (DDI)	106
5.4	INTERNE SELBSTKONTROLLE	110
5.5	ZUSATZ	112
5.5.1	ZIDOVUDIN UND STAVUDIN (AZT-D4T)	112
6	ZUSAMMENFASSUNG	113
6.1	PYRIMIDINANALOGA	114
6.1.1	Zidovudin (AZT)	114
6.1.2	Stavudin (d4T)	114
6.1.3	Zalcitabin (ddC9)	115
6.1.4	Lamivudin (3TC)	116
6.2	PURINANALOGA	116
6.2.1	Didanosin (ddI)	116
6.3	KOMBINATIONSVERSUCH	116
6.3.1	Zidovudin (AZT) – Didanosin (ddI)	116
7	LITERATURVERZEICHNIS	118
8	ANHANG	140
9	DANKSAGUNG	171

Abbildungsverzeichnis

- Abb. 2.1:** Metabolisierung von Fremdstoffen. (WEHKING-BRÖKER 2000)
- Abb. 2.2:** Wirkungsmechanismus von CP als Beispiel eines bifunktionellen Alkylans. (SLADEK, 1988).
- Abb. 2.3:** HIV-Zellbindung (Quelle: www.critpath.org/aric/library/img005.htm)
- Abb. 2.4:** Der Replikationszyklus von HIV-1. (Quelle: FIELDS VIROLOGY)
- Abb. 2.5:** Schematisches Diagramm des heterodimeren Proteins Reverse Transcriptase von HIV-1. (Quelle: FIELDS VIROLOGY)
- Abb. 2.6:** Zidovudin und Stavudin (d4T) im Vergleich mit Thymidin.
- Abb. 2.7:** Zalcitabin(ddC) und Lamivudin (3TC) im Vergleich mit Cytidin.
- Abb. 2.8:** Didanosin (ddI) im Vergleich zu Adenosin.
- Abb. 2.9:** Intrazelluläre Phosphorylierung von Zidovudin (AZT, hier mit ZDV bezeichnet) und Stavudin (d4T) durch endogene Enzyme. (BALZARINI 1994)
- Abb. 2.10:** Die unterschiedlichen metabolischen Wege von Zidovudin (AZT, hier mit ZDV bezeichnet). (VEAL & BACK 1995)
- Abb. 2.11:** Die metabolischen Wege von Zalcitabin (ddC) und Lamivudin. (aus: BALZARINI, 1994).
- Abb. 2.12:** Die metabolischen Wege von Didanosin (ddI) und ddA (BALZARINI 1994).
- Abb. 2.13:** Struktur eines Mitochondriums. (KAKUDA, 2000)
- Abb. 3.1:** Applikation der Prüfsubstanz über die Luftkammer.
- Abb. 3.2:** Eröffnetes Ei mit Blick auf die *Arteria umbilicalis*.
- Abb. 3.3:** Die *Arteria umbilicalis* über einen pH-Messstreifen gelegt.
- Abb. 3.4:** Punktion und Blutentnahme.
- Abb. 4.9:** Micronucleusfrequenzen in ‰ der historischen Negativkontrolle im zeitlichen Verlauf.
- Abb. 4.10:** Micronucleusfrequenzen in ‰ der historischen Positivkontrolle im zeitlichen Verlauf.

- Abb. 5.1:** Beobachtungen MNE-II/1000 Zellen der Versuchsreihen zu Zidovudin (AZT).
- Abb. 5.2:** Beobachtungen MN-EII/1000 Zellen der Versuchsreihen zu Stavudin (d4T).
- Abb. 5.3:** Beobachtungen MN-EII/1000 Zellen der Versuchsreihen zu Zalcitabin (ddC).
- Abb. 5.4:** Beobachtungen MN-EII/1000 Zellen der Versuchsreihen zu Lamivudin (3TC).
- Abb. 5.5:** Beobachtungen MN-EII/1000 Zellen der Versuchsreihen zu Didanosin (ddl).
- Abb. 5.6:** Bestimmung der Micronucleusfrequenz in ‰ bei Kombination der Substanzen Didanosin und Zalcitabin.
- Abb. 5.7:** Bestimmung der Micronucleusfrequenz in ‰ bei Kombination der Substanzen Zidovudin und Didanosin.
- Abb. 5.8:** Darstellung der internen Selbstkontrolle.

Tabellenverzeichnis

Tab. 1.1: Anzahl der zu wissenschaftlichen Zwecken verwendeten Tiere, gegliedert nach Tierarten, in Abhängigkeit vom Versuchsjahr. (TIER-SCHUTZBERICHT 2007, BUNDESMINISTERIUM FÜR ERNÄHRUNG, LANDWIRTSCHAFT UND VERBRAUCHERSCHUTZ)

Tab. 2.1: Übersicht über die antiretroviralen Stoffklassen.

Tab. 2.2: Übersicht über die unterschiedlichen Eigenschaften von NRTHs, NtRTHs und NNRTTHs. (BALZARINI 2004)

Tab. 2.3: Lokalisation und Funktion wichtiger DNA-Polymerasen

Tab. 3.1: Merkmale zur Differenzierung der Zellen in peripheren Blutausstrichpräparaten (May-Grünwald-GIEMSA-Färbung). (WOLF 2003)

Tab. 5.1: Genotoxizitäts- und Kanzerogenitätsdaten ausgewählter nucleosidanaloger Reverse Transkriptase Hemmer.

Abkürzungsverzeichnis

α-KDH	Alpha-Ketoglutaratdehydrogenase	ddA	Dideoxyadenosin
3TC	Lamivudin	ddAMP	Dideoxyadenosin-monophosphat
ABC	Abacavir	ddATP	Dideoxyadenosintriphosphat
AIDS	Aquired immunodeficiency syndrome	ddC	Zalcitabin
AMT	3'-amino-3'-deoxythymidin	ddl	Didanosin
Apaf-1	Apoptotischer Protease Aktivierungsfaktor-1	ddNTP	Dideoxynukleosidtriphosphat
ATP	Adenosintriphosphat	dGK	Deoxyguanosin Kinase
AZT	Zidovudin	DNA	Desoxyribonukleinsäure
CAS	Chemical Abstract Service	dNTP	Deoxyribonukleosidtriphosphat
CD4	Cluster of differentiation	DP	Diphosphat
CMP	Cytidinmonophosphatkinase	E I	Primärer Erythrocyt
CoA	Coenzym A	E II	Definitiver Erythrocyt
CoQ	Coenzym Q	FTC	Emtricitabin
CP	Cyclophosphamid	GAZT	5'-glucuronyl-Zidovudin
CYP450	Cytochrom-P450	gp	Glycoprotein
Cyto c	Cytochrom c	GTP	Guanosintriphosphat
d	Bebrütungstag (engl.: day = Tag). Einlegetag ist d0, d1 entspricht 24 h Bebrütung	HAART	Hochaktive antiretrovirale Therapie
D4T	Stavudin	HET	Hen's egg test
dATP	Deoxyadenosintriphosphat	HET-CAM	Hen's egg test – Chorioallantoic membrane
dC	2'-deoxycytidin	HET-MN	Hen's egg test – micronuclei induction
dCK	2'-deoxycytidin Kinase	RNA	Ribonukleinsäure
HET-OS	Hen's egg test – osteogenesis	RT	Reverse Transkriptase
HIV	Humanes Immundefizienzvirus	sdNVP	<i>single dose</i> Nevirapin
i.v.	Intravenös	SOP	Standard operating procedure
IARC	International Agency for Research on Cancer	TDF	Tenofovir

IUPAC	International Union of Pure and Applied Chemistry	TK1	Cytosolische Thymidinkinase
KG	Körpergewicht	TK-2	Thymidinkinase-2
KOF	Körperoberfläche	TP	Triphosphat
LD₅₀	Mittlere letale Dosis (bei 50% der beobachteten Population)	TSchG	Tierschutzgesetz
LDH	Laktatdehydrogenase	UDP	Uridintriphosphat
MDH	Malatdehydrogenase	UDPGT	Uridintriphosphat-glucuronyltransferase
MN	Micronucleus/Micronuclei		
MNE	Micronucleierte Erythrocyten		
MP	Monophosphat		
mtDNA	Mitochondriale DNA		
NAD⁺	Nicotinamidadenosindinukleotid		
NCE	Normochromatische Erythrocyten		
NCI	National Cancer Institute		
nDNA	Nucleic DNA		
NDP	Nukleosiddiphosphat		
NDPK	Nukleosiddiphosphatkinase		
NNRTH	Nichtnukleosidanaloge Reverse Transkriptase Hemmer		
NRTH	Nukleosidanaloge Reverse Transkriptase Hemmer		
NtRTH	Mukleotidanaloge reverse Transkriptase Hemmer		
p.o.	<i>Per oral</i>		
PBMC	Peripheral blood mononuclear cell		
PBS	Phosphatgepufferte Kochsalzlösung		
PCE	Polychromatische Erythrocyten		
PDH	Pyruvatdehydrogenase		
PG-12	1,2-Propylenglykol		
PH	Protease Hemmer		

Einleitung

Um die Gesundheit von Mensch und Tier vor den toxischen Auswirkungen chemischer Stoffe, wie z. B. Arzneimittel, zu schützen, werden in Deutschland Prüfungen für neue chemische Substanzen gefordert, bevor diese für den Markt freigegeben werden.

Umfangreiche Studien zur gesundheitlichen Unbedenklichkeit von Arzneimitteln und Zusatzstoffen sowie die Anmeldung und Registrierung neuer Chemikalien und Pflanzenschutzmittel sind vom Gesetzgeber festgelegt.

Um das gesundheitsschädliche Potenzial von Chemikalien für Organismen einschätzen zu können, sind nicht nur chemisch-physikalische Versuche notwendig, sondern auch solche an Tieren.

Diese Bestimmungen, die dem Schutz des Menschen dienen, stehen dem Schutz des Tieres gegenüber.

So schreibt der Grundsatz des deutschen Tierschutzgesetzes (TSchG) dem Bürger vor, „(...) aus der Verantwortung des Menschen für das Tier als Mitgeschöpf dessen Leben und Wohlbefinden zu schützen. Niemand darf einem Tier ohne vernünftigen Grund Schmerzen, Leiden oder Schaden zufügen.“ (§1, TSchG).

Sollte der verfolgte Zweck also durch andere Verfahren erreichbar sein, ist auf Tierversuche zu verzichten.

„Tierversuche im Sinne dieses Gesetzes sind Eingriffe oder Behandlungen zu Versuchszwecken

1. an Tieren, wenn sie mit Schmerzen, Leiden oder Schäden für diese Tiere oder
2. am Erbgut von Tieren, wenn sie mit Schmerzen, Leiden oder Schäden für die erbgutveränderten Tiere oder deren Trägartiere verbunden sein können.“ (§ 7, Abs. 2, TSchG).

Der Grundsatz des deutschen Tierschutzgesetzes, der dem Menschen die moralische Verantwortung für das Tier als Mitgeschöpf überträgt, spiegelt sich auch in dem von RUSSEL & BURCH (1959) aufgestellten Grundsatz der „*Three Rs*“ (*Refinement, Reduction, Replacement*).

Neben Ansätzen zur Verfeinerung (*Refinement*) von Tierversuchen durch verringerte Belastung des Tieres, die z. B. durch modifizierte Versuchsprotokolle und verbesserte Haltungsbedingungen erreicht werden können, kommt auch der Reduktion (*Reduction*) verwendeter Tierzahlen eine besondere Bedeutung zu. Modifizierte Versuchsprotokolle, international anerkannte Prüfergebnisse sowie Zweitanmelderegeln von Doppel- oder Mehrfachversuchen können zu einer Reduzierung der Versuchstierzahlen führen.

Die Forderung nach Ersatz (*Replacement*) wird seit Jahren durch die Entwicklung von Ersatz- und Ergänzungsmethoden zu Tierversuchen Rechnung getragen. Einige dieser Ersatz- und Ergänzungsmethoden sind mittlerweile behördlich anerkannt und werden als Alternativmethoden eingesetzt. Beispiele hierfür sind Untersuchungen an Säugerzell- und Gewebekulturen, subzellulären Bestandteilen sowie Bakterien- oder Hefezellen.

Der im Tierschutzbericht aus dem Jahr 2007 dargestellte Anstieg des Tierversuchs zu wissenschaftlichen Zwecken in den Jahren 2001 bis 2005 macht deutlich, wie wichtig die Entwicklung von Ersatz- und Ergänzungsmethoden ist.

Tab. 1.1: Anzahl der zu wissenschaftlichen Zwecken verwendeten Tiere, gegliedert nach Tierarten, in Abhängigkeit vom Versuchsjahr (TIERSCHUTZBERICHT 2007, Bundesministerium für Ernährung, Landwirtschaft und Verbraucherschutz).

Art der Versuchstiere	2001	2002	2003	2004	2005
Mäuse	1.024.413	1.151.053	1.180.355	1.316.628	1.432.492
Ratten	512.393	519.575	501.228	493.885	571.257
Meerschweinchen	41.138	43.906	42.012	41.533	40.297
Hamster	8.562	12.052	10.142	10.903	8.581
andere Nager	10.712	12.446	5.242	5.923	7.919
Kaninchen	117.890	133.446	104.418	104.491	105.293
Katzen	648	771	653	628	1.023
Hunde	4.430	5.305	4.886	4.306	4.892
Frettchen	40	139	222	372	560
andere Fleischfresser	250	274	176	275	235
Pferde, Esel, Maultiere und Maulesel	1.144	1.239	718	999	755
Schweine	11.661	15.761	12.250	14.954	14.004
Ziegen	223	234	325	246	283
Schafe	2.308	2.470	2.968	2.649	3.652
Rinder	2.402	3.320	3.005	2.276	2.909
Halbaffen	484	506	156	169	99
Neuweltaffen	215	324	452	530	421
Altweltaffen	1.416	1.059	1.315	972	1.585
Menschenaffen	0	0	0	0	0
andere Säugetiere	579	1.281	623	717	123
Wachteln	2.594	2.384	2.848	2.800	4.159
andere Vogel	63.665	76.963	81.154	78.070	93.858
Reptilien	702	757	171	63	153
Amphibien	15.102	25.507	19.342	14.865	16.577
Fische	303.590	201.604	137.680	167.235	101.551
Gesamt	2.126.561	2.212.376	2.112.341	2.265.489	2.412.678

Ein vollständiger Verzicht auf den Einsatz von Tieren für die Ermittlung toxikologischer und pharmakologischer Wirkprofile scheint jedoch nach dem heutigen Kenntnisstand nicht realisierbar. Daher werden, neben den gängigen *in-vitro*-Methoden, auch die Entwicklungen von Prüfsystemen an „niederen“ Spezies forciert.

Daneben bietet gerade das Modell des angebrüteten Hühnereis ein großes Spektrum an Einsatzmöglichkeiten zu verschiedenen Fragestellungen.

Bereits seit dem 19. Jahrhundert ist das Hühnerei Gegenstand wissenschaftlicher Forschung und zeigte in den sechziger Jahren des letzten Jahrhunderts, dass es sich als Alternativmodell zu Tierversuchen eignet, als man mit seiner Hilfe die teratogene Wirkung von Thalidomid nachweisen konnte (KEMPER 1963).

Auf europäischer Ebene werden Tiere im Sinne der Tierschutzgesetzgebung definiert als „(...) alle Wirbeltiere außer dem Menschen, einschließlich frei lebender und/oder fortpflanzungsfähiger Larven, jedoch keine Foeten oder Embryos.“ (Artikel 1; RICHTLINIE DES RATES 86/609/EWG der Europäischen Union). Im britischen ANIMAL WELFARE BILL (Artikel 1, Absatz 2; 2006) werden embryonale Stadien bei der Definition „Tier“ eindeutig ausgeschlossen; jedoch findet sich im ANIMALS (SCIENTIFIC PROCEDURES) ACT (Artikel 1.6; 1986) der Hinweis auf den Schutz unreifer Stadien von Säugetieren, Vögeln und Reptilien ab der Hälfte der Tragzeit oder Bebrütung.

Im US-amerikanischen ANIMAL WELFARE ACT (Section 1; 1970) wird der Terminus „Tier“ auf lebende oder tote Hunde, Katzen Affen, Meerschweinchen, Hamster, Kaninchen oder andere warmblütige Tiere bezogen.

In Deutschland unterliegt der Einsatz bebrüteter Hühnereier bis zum Ende der Brutperiode keinerlei tierschutzrechtlicher Einschränkungen.

Das Modell des angebrüteten Hühnereis lässt sich demnach auch nach internationalen Rechtsvorschriften als „*in-vitro*-System“ einstufen.

Da in den verwendeten Stadien der Embryonalentwicklung noch kein ausdifferenziertes Nervensystem vorliegt und cerebrale Aktivitäten in der zweiten Hälfte der Brutperiode das erste Mal auftreten (PETERS *et al.* 1956), scheinen Versuche, wie sie in dieser Arbeit dargestellt werden, auch unabhängig von rechtlichen Vorschriften ethisch akzeptabel.

Manipulationen, wie die Blutentnahme, finden zudem an nicht innervierten Membranen statt.

Aufgrund der fortschreitenden Entwicklung des Embryos finden wir im Modell des angebrüteten Hühnereis zunehmend komplexe Bedingungen vor, so dass in ihm, trotz des „*in-vitro*-Status“ *in-vivo*-ähnliche Zustände herrschen.

Klassisch liegt die Verwendung des Hühnereis als Experimentalmodell in der Kultivierung von Viren (MAYER *et al.* 1974) und zellparasitischen Prokaryoten (WINKLER 1982; SCHLACHTER & CALDWELL 1980) sowie der Embryotoxizitäts- und Teratogenitätsprüfung (BARON-RUPPERT 1992; LÜPKE 1982; KUCERA 1987; VERRET 1980).

Bislang wurden etwa 900 verschiedene Substanzen auf Embryotoxizität und Teratogenität in dem von LÜPKE (1987) entwickelten Hühner-Ei-Test (HET) durchgeführt.

Daneben wurde der Test an der Chorioallantoismembran des angebrüteten Hühnereis (Hen's egg test – chorioallantoic membrane: HET-CAM) als Alternative zum Draize-Test am Kaninchenauge und Screeningverfahren für Schleimhautverträglichkeitsprüfungen validiert (LÜPKE 1985; SPIELMANN *et al.* 1996).

Prüfungen zur antiphlogistischen Wirksamkeit von Arzneistoffen (LÜPKE *et al.* 1990), Untersuchungen zu Bio-Transformationsprozessen (LÜPKE 1992; NEUGEBAUER 1995; WEHKING-BRÖKER 2000) sowie Einflüsse knochenwirksamer Substanzen auf die Osteogenese des Embryos (Hen's egg test – osteogenesis: HET-OS, HÖSCHELE 2000) sind weitere Verwendungsmöglichkeiten des Modells Hühnerei.

Eine Verwendung dieses Modells für die Prüfung auf Genotoxizität wurde 1997 von WOLF & LÜPKE vorgestellt.

Zielsetzung

Trotz der vielfältigen *in-vitro*-Modelle lassen sich nicht alle Tierversuche ersetzen. Untersuchungen, die erforderlich sind, um die Einflüsse der verschiedenen physiologischen Vorgänge auf eine Fremdsubstanz zu erfassen und damit die komplexe Wirkung der Substanz auf den Gesamtorganismus zu ermitteln, bleiben erforderlich.

Studien zum kinetischen Verhalten von Substanzen werden deshalb an einem lebenden Organismus durchgeführt, um ein möglichst umfassendes Bild über die Kinetik beeinflussenden Faktoren, wie Resorption, Verteilung, Metabolisierung und Ausscheidung zu erhalten, da diese Parameter mitbestimmend sind für das toxische Potenzial einer Substanz.

Der Hühnerembryo als tierversuchsfreies Modell ist ein komplexes, vom maternalen Organismus unabhängiges System, das eine einfache Applikation von Fremdsubstanzen auf verschiedenen Wegen ermöglicht, außerdem zur Fremdstoff- Metabolisierung befähigt ist und überdies ein Ausscheidungsmedium besitzt, das leicht zugänglich ist und daher sowohl qualitative als auch quantitative Untersuchungen erlaubt.

Nucleosidanaloge Reverse Transkriptase Hemmer waren die ersten antiretroviralen Medikamente, die entwickelt und klinisch eingesetzt wurden. Auch heute noch sind sie ein wichtiger Bestandteil der HIV-Therapie und bilden das Grundgerüst für die HAART (hochaktive antiretrovirale Therapie). Sie zielen auf die Hemmung des viral codierten, retroviralen Enzyms Reverse Transkriptase ab, welches ein RNA-Pendant zur DNA-Polymerase ist und dafür Sorge trägt, dass die wirtseigenen Nucleotide in das virale Genom eingebaut werden.

Sie stören aufgrund ihrer Struktur, auf deren Beschreibung an anderer Stelle genauer eingegangen wird, den Prozess der viralen Replikation und damit den Replikations-prozess im Wirtsorganismus (SHINAZI *et al.* 2004; KAKUDA 2000).

Dieses ist Bestandteil ihrer Wirksamkeit gegenüber Reverse Transkriptase, aber auch Ursache für das genotoxische Potenzial dieser Wirkstoffgruppe.

In der vorliegenden Arbeit wurden ausgewählte nucleosidanaloge Reverse Transkriptase Hemmer anhand des von WOLF und LÜPKE entwickelten Hen's egg test – for micnuclei induction (HET-MN) (WOLF & LÜPKE 1997) auf ihr genotoxisches Potenzial hin untersucht und die so ermittelten Ergebnisse mit den in der Literatur verfügbaren Daten verglichen.

2 Theoretische Grundlagen

2.1 *Der Micronucleustest am angebrüteten Hühnerei*

2.1.1 Der Micronucleusbegriff

Micronuclei sind zellkernähnliche Strukturen, die getrennt und zusätzlich zum Zellkern in einer Zelle vorhanden sind und während der Mitose oder Meiose durch fehl verteilte Chromosomen oder Chromosomenfragmente entstehen (WOLF 2003). Durch DNA-spezifische Färbungen konnten BOLLER & SCHMID (1970) zeigen, dass es sich bei den von ihnen beobachteten Microkernen wirklich um DNA-haltige Strukturen handelt.

2.1.2 Die Entstehung von Micronuclei

Micronuclei können mitoseabhängig zum Beispiel durch numerische oder strukturelle Chromosomenaberrationen und nachfolgende Zellteilung oder mitoseunabhängig durch Apoptose und Phagocytose entstehen.

Ein Doppelstrangbruch der chromosomalen DNA kann zum Beispiel dazu führen, dass eines der entstehenden Chromosomenfragmente, da es kein Kinetochor mehr besitzt, in einen der entstehenden Tochterkerne oder in einen separaten Micronucleus eingeschlossen wird.

Kleinere Fragmente werden mit größerer Wahrscheinlichkeit in einen der Tochterkerne eingeschlossen, wohingegen in relativ großen Zellen die Wahrscheinlichkeit größer ist, dass auch kleine azentrische Fragmente einen Micronucleus bilden (HEDDLE *et al.* 1991).

Störungen in der Funktion des Spindelapparates oder beschädigte Kinetochore, sowie multizentrische oder verwickelte Chromosomen können die Verteilung auf die Tochterzellen verhindern und so dafür sorgen, dass die nicht verteilten Chromosomen in separate Kerne eingeschlossen werden (HEDDLE *et al.* 1991; WOLF 2003).

Apoptose und Phagocytose sind Mechanismen der Micronucleusbildung, die, anders als die oben genannten Mechanismen, unabhängig von der Zellteilung ablaufen und so zu Strukturen führen können, die man morphologisch als Micronuclei ansprechen kann (HEDDLE *et al.* 1991; WOLF 2003).

Apoptose ist der genetisch gesteuerte „programmierte“ Zelltod, der sich von der Nekrose dadurch unterscheidet, dass sich der Vorgang der Apoptose nur auf einzelne Zellen eines Zellverbandes erstreckt.

Apoptotische Prozesse sind dort von Bedeutung, wo Zellen oder Gewebe ab- oder umgebaut werden, wie z. B. während der Embryogenese und der Organogenese.

Da vom Organismus initiierte apoptotische Prozesse für die Blutzellen des Hühnerembryos in der Literatur nicht beschrieben sind und Kernfragmentierungen nur behandlungsbezogen beobachtet werden können, kann man diese Prozesse als Folge einer genotoxischen Wirkung betrachten. Phagozytose als Ursache für das Auftreten kernmaterialhaltiger Strukturen spielt bei erythroiden Zellen keine Rolle.

So betrachtet sind Micronuclei dann tatsächlich Ausdruck und Folge von numerischen und strukturellen Chromosomenaberrationen, deren Entstehungsmechanismus stark von den äußeren Bedingungen, wie Proliferationsgeschwindigkeit der Zellen, Zellgröße und Art der einwirkenden genotoxischen Noxe, bestimmt wird.

Die Apoptose, zu der keine vorangegangene Mitose erforderlich ist, muss abhängig von der Ausgangssituation nicht zwingend Folge einer genetischen Schädigung sein.

2.1.3 Der Micronucleustest

Die Bewertung der Häufigkeit micronucleierter Zellen in einer wachsenden Zellkultur bietet eine einfache, schnelle und indirekte Messung induzierter struktureller und numerischer Chromosomenaberrationen (HEDDLE *et al.* 1991; MÜLLER & STREFFER 1994). Seit BOLLER & SCHMID (1970), SCHMID (1975) und HEDDLE (1973) den Micronucleustest eingeführt haben, hat er sich als einer der am häufigsten eingesetzten Genotoxizitätstests bei Säugetieren etabliert. Das Standardprotokoll, wie es von diesen Autoren vorgeschlagen wurde, verwendet die Formierung micronucleierter polychromatischer Erythrocyten (PCE) im Knochenmark von Nagern als Endpunkt. Einen Überblick über eine Auswahl weiterer Testsysteme, die die Bildung von Micronuclei als Maß für ein genotoxisches Potenzial nutzen, bieten MÜLLER & STREFFER (1994).

Eine wichtige Voraussetzung für die Genotoxizitätstestung ist die Möglichkeit der Aktivierung von Promutagenen. *In vivo* geschieht dies überwiegend durch die Leber, die eine zentrale Rolle in der Metabolisierung spielt. Die Metabolisierung von Fremdstoffen verläuft in zwei Phasen:

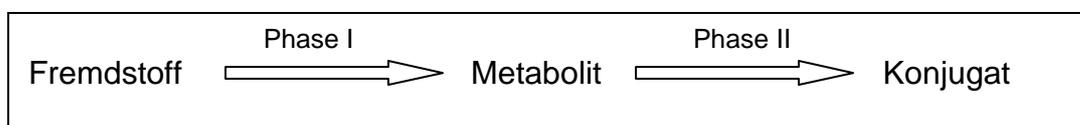


Abb. 2.1: Metabolisierung von Fremdstoffen. (Quelle: WEHKING-BRÖKER 2000)

In der Phase-I-Reaktion wird die Substanz chemisch soweit verändert, dass funktionelle Gruppen innerhalb des Moleküls entstehen, die eine anschließende Reaktion in der Phase II ermöglichen. Die entstandenen Metabolite werden in der Phase-II-Reaktion mit körpereigenen Substanzen gekoppelt (durch Transferasen aus dem Intermediärstoffwechsel übertragene Stoffe), dadurch stärker wasserlöslich und somit renal besser ausscheidbar (WEHKING-BRÖKER 2000). Für einige Substanzklassen kann Phase II auch zur Bildung von Mutagenen führen (MILLER 1994; GIBSON & SKETT 1994).

Um *in vitro* eine metabolische Aktivierung zu erhalten, wurden verschiedene Ansätze verfolgt. Besonders in Bakterien-Mutagenitätstests wurden Arochlor 1254-induzierte Rattenleber-Microsomen-Aufbereitungen (S9 Mix) oder genetisch manipulierte Säugerzelllinien, die CYP450 cDNA aus der Rattenleber oder humane CYP450 cDNA, verwendet (AMES *et al.* 1975; CROFTON-SLEIGH *et al.* 1993). Die letzteren beiden werden für die *in-vitro*-Micronucleustestung herangezogen. Aufgrund ihrer hohen Metabolisierungskapazität bezüglich Xenobiotica finden hauptsächlich Zellkulturen von Hepatocyten eine weit verbreitete Anwendung (BLAAUBOER *et al.* 1994; MÜLLER-TEGETHOFF *et al.* 1995).

Im Gegensatz zu Säugerembryonen entwickeln Vogelembryonen schon in frühen embryonalen Phasen eine große Bandbreite an metabolischen Aktivitäten, was unter Umständen mit der frühen Differenzierung der Leber und der relativen Autonomie von Vogelembryonen zusammenhängt (SINCLAIR & SINCLAIR 1992). Die Isozyme des CYP-450-Systems, sowie deren Induktion in der embryonalen Leber, dem gesamten Embryo, primären Zellkulturen oder dem Dottersack während unterschiedlicher Entwicklungsstadien (HEINRICH-HIRSCH 1990), als auch die Phase-II-Reaktionen wurden von mehreren Autoren ausführlich untersucht. Hierbei konnten Reaktionen wie die Glucoronidierung (BANJO & NEMETH 1976; JACKSON *et al.* 1986), Sulfatierung (SPENCER & RAFTERY 1966), Methylierung (IGNARRO & SHIDEMAN 1968), Acetylierung sowie die Konjugation mit Ornithin (WOLFE & HUANG 1956) beobachtet werden.

Im Gegensatz zu konventionellen *in-vitro*-Systemen ist der Vogelembryo in der Lage, Fremdstoffe zu detoxifizieren und sie in den Allantoissack auszuscheiden, wo die Produkte der Niere akkumulieren (ROMANOFF 1960).

2.1.4 Das embryonale Blut im Micronucleustest

Das periphere Blut von Hühnerembryonen enthält bis zum Schlupf fast ausschließlich Erythrocyten und Thrombocyten.

Andere Zelltypen wie Leucocyten kommen allenfalls sporadisch vor (LUCAS & JAMROZ 1961; LEMEZ 1964). Ihre Bildung setzt an d4 in der *Area vasculosa* ein, (ROMANOFF 1960) doch werden sie bis zum Schlupf in den hämatopoietischen

Organen festgesetzt (LUCAS & JAMROZ 1961) und sind daher für den Untersuchungszeitraum des HET-MN ohne Bedeutung.

Thrombocyten werden ab d3 gebildet und sind präparationsbedingt in unregelmäßigen Anteilen in Ausstrichpräparaten des peripheren Blutes zu finden (LUCAS & JAMROZ 1961).

Die Erythrocyten des embryonalen Blutes bestehen aus zwei morphologisch unterscheidbaren Zelllinien, den primären oder „primitiven“ Erythrocyten (E I) sowie den definitiven Erythrocyten (E II).

Die Bildung der primären Erythrocyten setzt 36 Stunden nach Bebrütungsbeginn in der *Area vasculosa* ein und macht bis zu Tag 5 der Bebrütung den einzigen erythroiden Zelltyp aus. Primäre Erythrocyten erreichen ihren Reifezustand nach 6 – 7 Tagen, so dass an d11, wenn die Blutentnahme stattfindet, alle normochromatisch erscheinen.

Von Zellen der definitiven Zelllinie lassen sie sich durch ihren größeren Umfang, das geringere Nucleus-Cytoplasma-Verhältnis und ihre kreisrunde Form unterscheiden. LEMEZ (1964) gibt ihre durchschnittliche Lebensdauer mit 8 Tagen an. An d7 endet die Produktion von E I-Zellen.

An d4 (ROMANOFF 1960) beginnt im Dottersack die Produktion der definitiven Erythrocyten, die an d11 den Großteil der Elemente des embryonalen Blutes ausmachen. Da sie kontinuierlich gebildet werden, sind sie in unterschiedlichen Entwicklungsstadien im Blut vorhanden. Ihre durchschnittliche Lebensdauer im embryonalen Blut ist verglichen mit denen im Blut geschlüpfter Hühner extrem kurz: 5 – 6 Tage im Gegensatz zu 30 Tagen bei Hühnern (LEMEZ 1964).

Die definitiven Erythrocyten entwickeln sich aus großen, runden und basophilen Erythroblasten mit großem Nucleus zu ovalen, reifen normochromatischen Zellen mit kleinem und dichtem Nucleus. Als Konsequenz daraus werden reife Erythrocyten nicht ausschließlich durch ihre polychromatische Anfärbe-Reaktion definiert, sondern ebenfalls durch morphologische Kriterien wie Zellgröße und –form, Nucleus-Cytoplasma-Verhältnis als auch durch die Beschaffenheit des Zellkerns (LUCAS & JAMROZ 1961; BRUNS & INGRAM 1973).

Das Blutbild von 11 Tage alten Embryonen zeigt unter normalen Bedingungen frühe, mittlere und späte Stadien polychromatischer Erythrocyten sowie definitive und primäre normochromatische Erythrocyten als auch in geringem Maße, Thrombocyten (LUCAS & JAMROZ 1961; BRUNS & INGRAM 1973).

Eine ausführlichere Darstellung zum Micronucleustest am angebrüteten Hühner-
ei findet sich bei WOLF (2003).

2.1.5 Cyclophosphamid – Metabolismus und Wirkungsweg

Cyclophosphamid gehört zur Gruppe der alkylierenden Cytostatika, deren Wirkung durch Alkylierung der DNA erreicht wird, so dass die Mitose in der S- oder der G2-Phase gehemmt wird (DINNENDAHL & FRICKE 1997). Die cytostatische Wirkung von Cyclophosphamid kommt erst während der Mitose zum Tragen, während die Alkylierung unabhängig von der Phase des Zellzyklusses stattfindet. Sie stellt einen wichtigen Teil des Wirkungsprinzips dar, da sie die clastogenen Eigenschaften von Cyclophosphamid bedingt. Therapieziel ist die Hemmung proliferierender Zellen und Induzierung von Apoptose in diesen Zellen. Darüber hinaus wurde das Auftreten von Riesenzellen während der Cyclophosphamid-Therapie beschrieben (ABDA 2003; DINNENDAHL & FRICKE 1997).

Der Einsatz von Alkylanzien reicht bis zum Ersten Weltkrieg zurück, wo diese in Chemiewaffen Verwendung fanden (Senfgas oder Schwefel-Lost). Aufgrund der beobachteten Auswirkungen dieser Alkylanzien auf proliferierende Gewebe wurde die Synthese von weniger toxischen Substanzen angestrebt, um diese in der Behandlung von malignen Erkrankungen einzusetzen. 1942 wurden erste klinische Studien mit Stickstoff-Lost (Chlorethamin) durchgeführt. Jedoch wiesen diese ersten Verbindungen mit Stickstoff-Lost nur eine geringe Selektivität auf, das hieß, dass sie sowohl gesundes Gewebe als auch Tumorgewebe schädigten. Die Ursache bestand in der hohen Reaktivität und Basizität des Stickstoffatoms, so dass bei der weiteren Entwicklung die Methylgruppe durch aromatische (Chlorambucil) oder heterocyclische (Cyclophosphamid) Ringe ersetzt wurde. Viele Tumore besitzen eine erhöhte Phosphoramidase-Aktivität, im Gegensatz zu gesundem Gewebe, welche zu einer Spaltung von Phosphat-Stickstoffverbindungen führt. Der Stickstoff-Lost wurde mit einer elektronegativ-substituierten Phosphorylgruppe konjugiert, die dann, nach Aktivierung in der Leber, die Transportform darstellt und bevorzugt im Tumor in die endgültige Wirkform, das Phosphorsäureamidlost, umgesetzt wird. Die erste nach diesem Prinzip tumorselektiv wirkende Substanz war Cyclophosphamid. Allerdings stellte sich heraus, dass Tumore *in vitro* nicht sensitiv gegenüber Cyclophosphamid sind (SLADEK 1988).

Die Bildung von Phosphorsäureamidlost setzt die Ringöffnung von Cyclophosphamid voraus, die in der Leber durch Hydroxylierung von Cyclophosphamid zu 4-Hydroxy-Cyclophosphamid, das mit dem ringoffenen Aldophosphamid im Gleichgewicht steht, ermöglicht wird. Die erforderliche Oxazaphosphorin-4-Hydroxylase-Aktivität wird hauptsächlich durch CYP-2B6 vermittelt (ROY *et al.* 1999).

Im Zielgewebe tritt die oben beschriebene nicht-enzymatische Spaltung in Acrolein und dem bifunktionalen Phosphorsäureamidlost, dem endgültigen Alkylans, ein. Acrolein wirkt stark urotoxisch und kann Cystitis und Hämaturie auslösen. In der Cyclophosphamid-Therapie wird zur Prävention dieser unerwünschten Wirkungen Mesna eingesetzt (DINNENDAHL & FRICKE 1997).

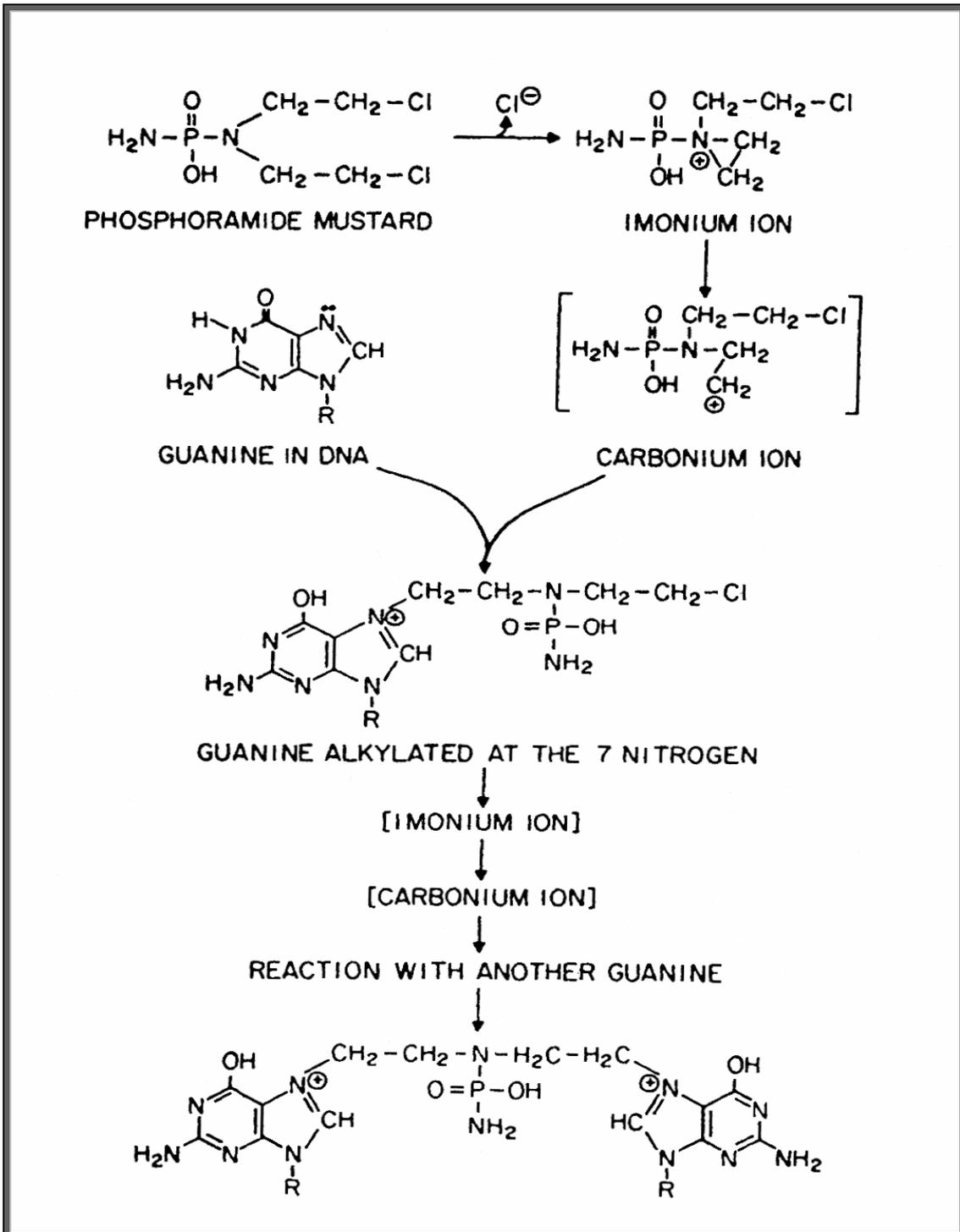
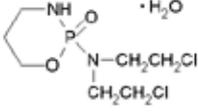


Abb. 2.2: Wirkungsmechanismus von CP als Beispiel eines bifunktionellen Alkylans:
 Quervernetzung beider DNA-Stränge an Guaninresten durch Phosphorsäureamidost.
 (aus: Sladek, 1988)

Substanzdaten und Toxizität – Cyclophosphamid (CP)

Chemisch physikalische Daten	
Struktur	
Molekulargewicht	261.11
IUPAC	(RS)-2-[Bis(2-chlorethyl)amino]-2H-1,3,2-oxazaphosphinan-2-oxid
CAS-Nr.	50-18-0
Toxikologie	
LD ₅₀ (NIOSH)	i.p. 40 mg/kg KG (Ratte) i.v. 148 mg/kg KG (Ratte) p.o. >100 mg/kg KG (Ratte) i.p. 110 g/kg KG (Maus) i.v. 140 g/kg KG (Maus) p.o. >137 g/kg KG (Maus)
Berufliche Exposition/ Einstufungen	TRGS 905: K1/k2 (2.1: krebserzeugender Arzneistoff)
HET-MN	Positiv
GeneTox (Auswahl relevanter Prüfsysteme)	
Genmutationstest an Bakterien	Positiv
Chromosomenaberrationstest oder Micronucleustest an Säugerzellkulturen	Positiv
Genmutationstest an Säugerzellkulturen	Positiv
In-vivo-Micronucleustest oder Chromosomenaberrationstest	Positiv
Zelltransformation BALB/c3T3	Negativ
Cancerogenität (NTP, 2000)	„known to be human cancerogen“
Cancerogenität (NCI, USA, NIOSH, 2003)	„clear evidence: mouse, rat“
WHO/ IARC	„CP is carcinogenic to humans“ (group 1)

2.1.5.1 Cyclophosphamid als Prüfsubstanz der historischen Positivkontrolle

Cyclophosphamid wurde bereits 1958 in die Tumorthherapie eingeführt. Nach wie vor stellt es eines der wichtigsten Alkylanzien dar, insbesondere im Rahmen der adjuvanten Tumorthherapie und, in Kombination mit anderen Cytostatika, bei der Behandlung von Mamma- und Ovariakarzinomen, Weichteilkarzinomen, kleinzelligen Bronchialkarzinomen, Morbus Hodgkin, Non-Hodgkin-Lymphomen, sowie zur Konsolidierung der akuten lymphatischen Leukämie des Erwachsenen (DINNENDAHL & FRICKE 1997). Darüber hinaus wird Cyclophosphamid als Immunsuppressivum bei Organtransplantationen eingesetzt (SLADEK 1988).

CP induzierte in HET-MN dosisabhängig die Bildung von MNE. Seine Wirkung ist durch vielfache Versuche belegt worden, die z. T. sogar mehrfach reproduziert werden konnten. Anhand unterschiedlicher Applikationsschemata konnte mit CP als Modellmutagen die SOP modifiziert und untermauert werden. Darüber hinaus konnte für CP gezeigt werden, dass die Applikation über die Luftkammerroute zu deutlich stärkeren Antworten im HET-MN führt, als die Albumenroute. In Versuchen zur gezielten cytotoxischen Behandlung des Embryos mit hohen Dosen CP traten Zellen auf, die aufgrund ihrer Morphologie als Blasten angesprochen wurden. Es ist aber auch denkbar, dass sie der Gruppe der zum Wirkungsbild von CP gehörenden Riesenzellen angehören.

Als Modellmutagen für den HET-MN wurde Cyclophosphamid daher aus folgenden Gründen gewählt:

- hervorragende Datenlage und eindeutig nachgewiesene promutagene und cancerogene Eigenschaften (über 10.000 Originalschriften)
- metabolische Aktivierung durch CYP450-abhängige Hydroxylierung und damit modellhaft für zahlreiche weitere Promutagene
- gute Wasserlöslichkeit und leichte Handhabung (verfügbar als Fertigarzneimittel im geschlossenen System)
- Der HET-MN reagiert – dosisabhängig – außerordentlich sensitiv gegenüber CP.

Aufgrund der zahlreichen Ergebnisse zu CP und der Konstanz der Testantwort wird das Behandlungsschema „CP 0.05 mg/Ei d8 ac“ als Standardpositivkontrolle für wasserlösliche Prüfsubstanzen verwendet (WOLF 2003).

2.2 Das humane Immundefizienzvirus (HIV) – Überblick

Das humane Immundefizienzvirus (HIV) gehört zu den Lentiviren, einer Untergruppe der Retroviren. Es ist derzeit bekannt als Humanpathogen und gilt als Auslöser der Immunschwächekrankheit AIDS (*acquired immunodeficiency syndrome*).

Außer HIV-1 gibt es einen weiteren humanen Retrovirus: HIV-2. Er ist immunologisch verschieden und weniger pathogen als HIV-1 (FIELDS 1996).

Ein Großteil der in der Literatur erhältlichen Informationen bezieht sich auf das HI-Virus 1, deshalb wird sich auch in der vorliegenden Arbeit, wenn nicht anders angemerkt, auf HIV-1 bezogen.

Wie alle bekannten Retroviren ist das HI-Virus von einer Hüllmembran umgeben, die von der Cytoplasmamembran der Wirtszelle stammt. In dieser Hüllmembran sind die viralen Glycoproteine gp 120 und gp 41 verankert. Sie vermitteln Erkennen, Anheften und Eindringen des Virus in die Zielzelle.

Im Inneren des Virus befindet sich das konisch geformte Viruscapsid, welches zwei Moleküle einzelsträngiger RNA mit gleicher Polarität enthält und über das Link-Protein mit der Hüllmembran verbunden ist. Die RNA wird von dem Nukleocapsid umgeben.

Zusätzlich zu seinem Erbgut bringt das Virus die Enzyme Reverse Transkriptase, Integrase und Protease mit in die Wirtszelle.

Wirtszellen sind eine Subpopulation der T-Lymphocyten, die Helferzellen (auch CD4⁺-Zellen), sowie Zellen des Monocyten-Makrophagen-Systems, mukosale Langerhans-Zellen, dendritisch lymphatische Zellen und Mikrogliazellen.

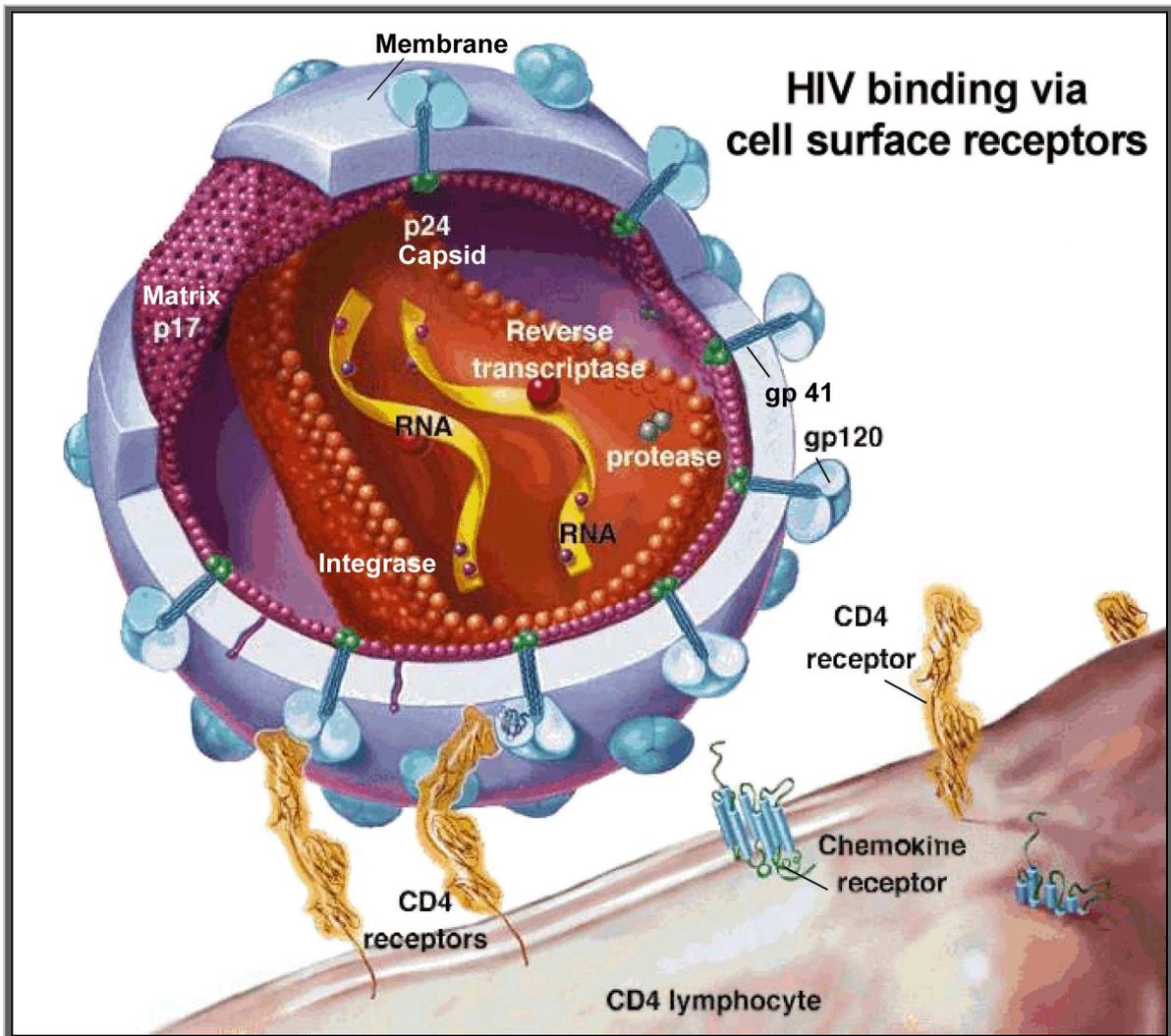


Abb. 2.3: HIV-Zellbindung. Die initiale Phase der HIV-Infektion ist die Zellbindung. Der Virus bindet an der Wirtszelle, in diesem Fall eine CD4-Lymphocyte (oder T-4-Zelle) über das Anheften an verschiedenen Zelloberflächenrezeptoren. Neben den bekannten CD4+-Rezeptoren spielen auch Chemokin-Corezeptoren eine Rolle bei der Infektion der Zelle.
(Quelle: <http://www.critpath.org/aric/library/img005.htm>)

2.2.1 Der Replikationszyklus von HIV-1

Der erste Schritt der Replikation ist die Interaktion zwischen dem Glycoprotein gp 120 des HI-Virus und spezifischen Oberflächen-Rezeptoren, den CD-4 Rezeptoren, der Wirtszelle. Zusätzlich benötigt das Virus die Chemokin-Co-Rezeptoren CCR5 und CXCR4, um in die Zelle zu gelangen (KILBY & ERON, 2003).

Die Interaktion von HIV mit den Co-Rezeptoren verursacht eine Konformationsänderung in den Membranproteinen, was zu einer Annäherung von Virushülle und Cytoplasmamembran führt und letztlich zu einer Verschmelzung beider. Dadurch gelangt das Viruscapsid in das Cytoplasma der Zielzelle, wo eine Übersetzung der viralen RNA in virale DNA stattfindet, katalysiert durch das Enzym Reverse Transkriptase. Diese provirale DNA gelangt in den Zellkern und wird dort durch das Enzym Integrase in das Erbgut der Wirtszelle integriert.

Die Integration erfolgt in drei Schritten (CRAIGIE 2001).

Der erste Schritt beinhaltet die Abspaltung von zwei endständigen Nukleotiden vom 3'-Ende der viralen DNA; im nächsten Schritt, dem DNA-Transfer, werden die viralen DNA-Enden in die Wirts-DNA eingefügt, dazu spaltet die Integrase die Wirts-DNA und vermittelt die Anbindung der viralen DNA in die Wirts-DNA (AGARWAL *et al.* 2006).

Im dritten Schritt, bei dem die zwei ungepaarten Nukleotide an den 5'-Enden der viralen DNA entfernt werden, werden die einzelsträngigen Lücken aufgefüllt und verbunden.

Die HIV-Integrase katalysiert die ersten beiden Schritte der Integration, der dritte Schritt der Integration wird vermutlich durch zelluläre Enzyme katalysiert (TEMESGEN *et al.* 2006).

Ist das Virusgenom in die Wirts-DNA eingebaut, katalysieren die wirtseigenen Mechanismen der Proteinbiosynthese die Translation in Polypeptidketten, oder Proteinvorstufen. Diese Proteinvorstufen sowie die virale RNA sammeln sich an der Cytoplasmamembran, um als neue Viruspartikel die Zelle mittels Knospung zu verlassen. Während dieses Reifungsprozesses (Maturation) erhalten sie ihre Hüllmembran und die virale Protease spaltet die großen Proteinvorstufen in kleinere, funktionsfähige Proteine. Ohne diesen letzten Schritt im Replikationszyklus sind die neu entstandenen Viruspartikel nicht infektiös oder in der Lage einen neuen Replikationszyklus zu beginnen.

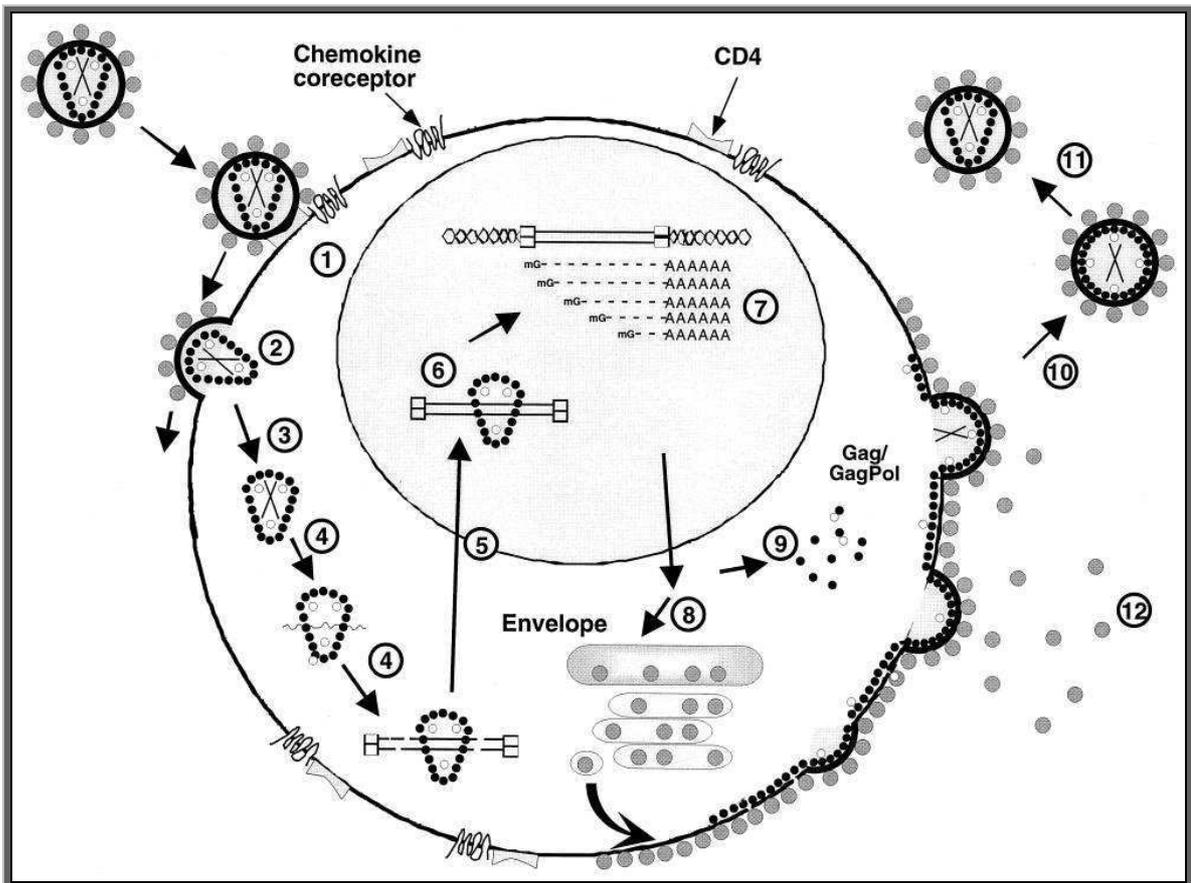


Abb. 2.4: Der Replikationszyklus von HIV-1.

Die HIV-1-Infektion beginnt mit der Adsorption von zellfreien Virionen und deren Interaktion sowohl mit den CD4-Rezeptoren und Chemokinrezeptoren (1). Der Eintritt des Virus in die Zelle (2) geschieht durch eine Fusion der Virus- mit der Zellmembran und anschließendes partielles sogenanntes „uncoating“ (3) des eindringenden Virus. Die Reverse Transkription findet innerhalb subviraler Partikel im Cytoplasma infizierter Zellen statt (4); das doppelsträngige DNA-Produkt wird in den Nucleus transportiert (5), wo die Integration in die chromosomale DNA (6) durch die viral kodierte Integrase vermittelt wird. Die integrierte Virus-DNA dient als Matrize für die DNA-abhängige RNA-Polymerase und führt zur Produktion von mRNAs (7) die im Cytoplasma der infizierten Zelle in virale Proteine übersetzt werden. Hüll- (8) sowie Gag- und Gag/Pol-Polyproteine (9) werden zur Zellmembran transportiert, wo das „budding“ der nachkommenden Viruspartikel beginnt und sie als unreife Partikel aus der Zelle entlassen werden (10). Nachträgliche Proteolyse durch das viruskodierte Enzym Protease führt zu reifen Partikeln (11). Nicht viralkodierte gp120 Hüllproteine werden ebenfalls von der Zelle gelöst (12). (Quelle: FIELDS 1996)

2.2.2 Reverse Transkriptase (RT)

Die Reverse Transkriptase (RT) ist ein entscheidendes Enzym für den Replikationszyklus von HIV. Sie ist das (RNA-)Pendant zur DNA-Polymerase und wandelt die einzelsträngige virale RNA in doppelsträngige DNA um, die in die Wirts-DNA integriert wird (SHALKA 1993).

Die Reverse Transkriptase hat zwei verschiedene enzymatische Aufgabenbereiche und wirkt als:

- RNA- und DNA- abhängige DNA-Polymerase
- RNA-spezifische Endonuklease.

Die RNA- und DNA-abhängige DNA-Polymeraseaktivität ist dafür verantwortlich, dass die Reverse Transkriptase sowohl RNA als auch DNA als Matrize nutzen kann.

Die RNA-spezifische Endonukleaseaktivität sorgt dafür, dass der RNA-Strang aus dem RNA/DNA-Hybridstrang entfernt wird (WAIN-HOBSON 1993; SLUIS-CREMER *et al.* 2004).

Die Reverse Transkriptase (RT) stellt ein heterodimeres Protein dar, bestehend aus den Untereinheiten p66 und p51, welches wiederum durch Protease-vermittelte Spaltung aus p66 entsteht.

Die strukturellen Komponenten der Polymerasedomänen von p66 und p51 wurden verglichen mit Finger, Handfläche und Daumen der rechten Hand (PAINTER *et al.* 2004).

Der RT fehlt das Enzym 3'-Exonuklease, das wesentlich für das „Korrekturlesen“ transkribierter Sequenzen ist, daher werden Fehler in der Sequenz beim Einbau der NRTHs nicht erkannt (ROBERTS *et al.* 1988). RT ist jedoch zur Pyrophosphorolyse fähig, einer der Polymerisation entgegengesetzten Reaktion, die eine Weiterführung der DNA-Synthese ermöglicht (GÖTTE *et al.* 2000).

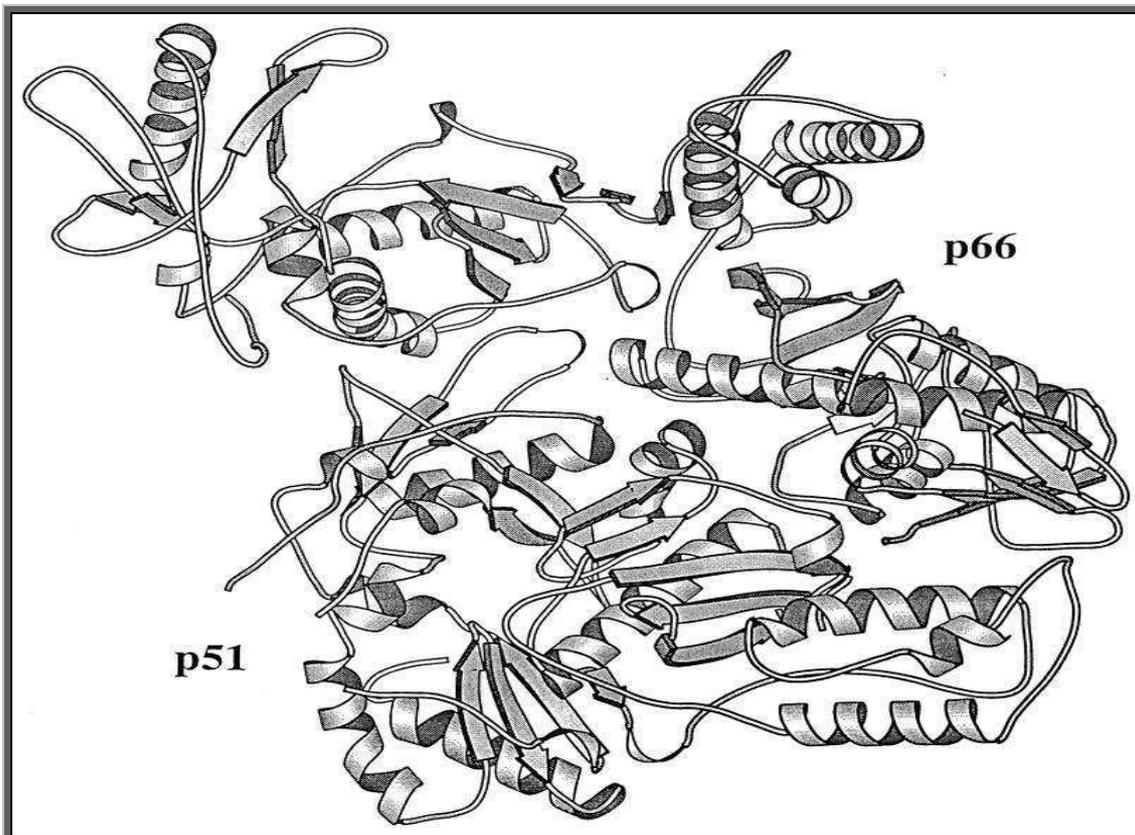


Abb. 2.5: Schematisches Diagramm des heterodimeren Proteins Reverse Transkriptase von HIV-1. Es zeigt die Untereinheiten p66 (*oben*) und p51 (*unten*). Das Molekül ist in der konventionellen Orientierung angeordnet, um die Ähnlichkeit mit der rechten Hand des Menschen, Handfläche nach oben, zu verdeutlichen. (Quelle: FIELDS 1996)

2.2.3 Resistenzentwicklung bei HIV

Aufgrund der Fehleranfälligkeit der Reversen Transkriptase ist das HI-Virus ein sich schnell veränderndes Virus. Der Fehleinbau von Nukleotiden durch die HIV-RT liegt bei 10^{-4} bis 10^{-5} pro Base, pro Replikationszyklus. HIV besitzt daher keine feste Genomsequenz, sondern besteht praktisch aus einem Schwarm von Mutanten. In diesem Zusammenhang wird auch der Begriff „Quasi-Spezies“ benutzt (WAIN-HOBSON 1993).

Mit Blick auf die Replikationsdynamik von HIV wird der vorher existierende replikationskompetente Virus mit einer einzigen Mutation in Richtung einer reduzierten Sensitivität für einen bestimmten HIV-Wirkstoff der vorherrschende Genotyp unter dem Selektionsdruck dieses Arzneistoffs.

Statistisch ist es sehr unwahrscheinlich, dass sich drei oder mehr Resistenzmutationen in einem Virus der ursprünglichen genetischen Population ausprägen. Folglich ist die Resistenzentwicklung langsamer, wenn eine große Anzahl an Mutationen notwendig ist, um eine gleichzeitige Resistenz gegenüber verschiedenen, in Kombination benutzten Arzneimitteln zu entwickeln (VANDAMME *et al.* 1999).

Nukleosidanaloge Reverse Transkriptase Hemmer (NRTIs) fungieren, einmal eingebaut, als Replikationsblocker. Wie alle anderen antiretrovirale Wirkstoffe ist ihre Wirksamkeit durch das Auftauchen resistenter Viren begrenzt. Studien zur Resistenz gegenüber NRTIs weisen auf zwei deutliche ausschließliche Mechanismen hin: Entweder wird die Effizienz der NRTI-Integration gesenkt oder deren Entfernung aus dem entstehenden DNA-Strang intensiviert (ISEL *et al.* 2001).

Studien zeigten, dass die Effizienz der Entfernung durch Pyrophosphorolyse in Anwesenheit eines NRTIs ein Schlüsselfaktor für die Ausprägung des einen oder anderen Resistenzpfades ist (SHARMA *et al.* 2004).

Auf die Mechanismen der Resistenzentwicklung wird in einem gesonderten Kapitel eingegangen.

2.2.4 Die Hochaktive Antiretrovirale Therapie (HAART)

Die Hochaktive antiretrovirale Therapie (HAART) wurde Mitte der 1990er Jahre eingeführt und beinhaltet drei oder mehr Arzneistoffe, die in Kombination verabreicht werden (AGARWAL *et al.* 2006).

Die aktuell zugelassenen Antiretrovirale Arzneistoffe umfassen 20 Substanzen in 4 Wirkstoffgruppen. Dies ermöglicht eine Vielzahl an Kombinationen (FAUCI 2003).

Tab. 2.1: Übersicht über die antiretroviralen Stoffklassen und deren wichtigste Nebenwirkungen.

Für die in dieser Arbeit untersuchten Substanzen sind die Häufigkeiten Nebenwirkungen in den Kategorien „sehr häufig“ (1; >1/10), „häufig“ (2; >1/100, <1/10) und „gelegentlich“ (3; >1/1000, <1/100) aufgeführt. (TEMESGEN *et al.* 2006, ergänzt durch FACHINFORMATION: EPIVIR 2007, HIVID 2004, RETROVIR 2008, VIDEX 2008, ZERIT 2007).

Substanzgruppe	Substanz	Wichtigste Nebenwirkungen***
Nukleosidanalogue/Nukleotidanalogue Reverse Transkriptase Hemmer (NRTH)	Alle NRTHs werden mit den folgenden Nebenwirkungen in Verbindung gebracht: Hepatomegalie mit hepatischer Steatose, Laktatazidose, Lipodystrophiesyndrom	
	Zidovudin	1 Kopfschmerzen, Übelkeit; 2 Neutropenie, Anämie, Schwindel, Myalgie, Erbrechen, Durchfall, Bauchschmerzen
	Didanosin	1 Diarrhoe; 2 Periphere Neuropathie, Kopfschmerzen, Übelkeit, Erbrechen, Bauchschmerzen, Ausschlag, Erschöpfung; folgende Ereignisse wurden nach der Markteinführung beobachtet (Häufigkeit nicht bekannt): Pankreatitis, Anämie, Hepatitis, Leberversagen, Myalgie
	Zalcitabin *	1 Fieber, Periphere Neuropathie, Übelkeit, Muskelschmerzen, Kopfschmerzen, Müdigkeit, Hautausschlag 2 Angst, Krampfanfälle, Flatulenz, Leberfunktionsstörungen, Asthenie, Gelenkschmerzen; 3 Pankreatitis Kardiomyopathie
	Stavudin	1 Lipoatrophie, Lipodystrophie, 2 Diarrhoe, Bauchschmerzen, Übelkeit, Dyspepsie, Erschöpfung, Periphere Neuropathie, Kopfschmerzen Depression, Ausschlag, Juckreiz; 3 Pankreatitis, Erbrechen, Hepatitis Angst
	Lamivudin	2 Kopfschmerzen, Husten, Schlaflosigkeit, Übelkeit, Erbrechen, Bauchschmerzen, Durchfall, Hautausschlag, Muskelbeschwerden, Müdigkeit, Fieber; 3 Neutropenie, Anämie
	Abacavir	Hypersensitivitätssyndrom
	Emtricitabin	Kopfschmerzen, Anämie
	Tenofovir (NtRTH)	Gastrointestinale Beschwerden (Durchfall, Übelkeit), selten Nierenfunktionsstörungen
Nichtnukleosidanalogue Reverse Transkriptase Hemmer (NtRTH)	Alle: Laktatazidose, Hepatomegalie mit hepatischer Steatose	
	Nevirapin	Arzneiexanthem, Hepatotoxizität
	Delavirdin	Arzneiexanthem
	Efavirenz	Psychotrope Nebenwirkungen, Arzneiexanthem
Protease Hemmer (PH)	Alle: Glukoseintoleranz, Fettstoffwechselstörungen, Lipodystrophiesyndrom, gastrointestinale Beschwerden	
	Indinavir	Nephrolithiasis, Hyberbilirubinämie, trockene Haut und Schleimhäute, Onychodystrophie
	Nelfinavir	Übelkeit, Diarrhoe
	Fosamprenavir	Diarrhoe
	Atazanavir	Hyperbilirubinämie, Diarrhoe, Kopfschmerzen

Fortsetzung Tabelle 2.1		
Protease Hemmer (PH)	Saquinavir	Diarrhoe, Übelkeit (meist mild)
	Ritonavir	Diarrhoe, Übelkeit, Hypertriglyceridämie
	Lopinavir und Ritonavir	Fettstoffwechselstörungen, Übelkeit, Diarrhoe
	Amprenavir **	Diarrhoe, Asthenie, Übelkeit, Müdigkeit
Fusionshemmer	Enfuviritid (T-20)	Lokale Induration an der Einstichstelle

* Die Produktion von Zalcitabin sollte 2006 eingestellt werden.

** Amprenavir wurde vom Hersteller eingestellt.

*** Laktatazidose und ernste Hepatomegalie mit Steatose wurden für alle NRTH/NtRTHs berichtet und werden durch NRTH/NtRTH- induzierte Schäden an den Mitochondrien verursacht. Die deoxynukleosidanalogen Reverse Transkriptase Hemmer (Zalcitabin, Stavudin und Didanosin) haben ein höheres Potenzial, die mitochondriale DNA zu schädigen als andere NRTH/NtRTHs (TEMESGEN *et al.* 2006).

Seit Einführung von HAART ist die Morbidität und Mortalität durch AIDS-bedingte Erkrankungen stark zurückgegangen. Studien zeigten, dass bei einer frühzeitigen und ohne Unterbrechung verabreichten HAART die Chance der Patienten, fünf Jahre zu überleben, bei mindestens 90 % liegt (AGARWAL *et al.* 2006). HAART hat jedoch auch schwere Nebenwirkungen, wie z. B. Laktatazidose, Diabetes mellitus, Lipodystrophie (durch Störung des Fettstoffwechsels, verursacht durch unter anderem Protease-Hemmer) und Pankreatitis. Hinzu kommt, dass HAART eine hohe Therapie-Adhärenz erfordert, da mit ihr eine hohe Tablettenzahl bei mehrmaliger Einnahme pro Tag und mit unterschiedlichen Einnahmevergaben verbunden ist (POMMERANTZ & HORN 2003).

2.2.4.1 Nukleosidanaloge Reverse Transkriptase Hemmer (NRTH)

NRTHs sind Analoga der natürlich vorkommenden Nukleotide und unterscheiden sich von diesen durch den Austausch einer Hydroxylgruppe in der 3'-Position durch eine Gruppe, die nicht in der Lage ist, die 5'-zu-3'-Phosphodiesterbindung herzustellen. NRTHs konkurrieren mit ihren endogenen Analoga um einen Einbau in die Kette und verhindern so eine Verlängerung der viralen DNA. Die Folge ist ein Kettenabbruch.

Um ihre Aktivität zu erlangen, müssen sie intrazellulär zu ihren 5'-Triphosphat-Derivaten umgeformt werden.

Auf die NRTHs wird in einem gesonderten Kapitel explizit eingegangen.

2.2.4.2 Nukleotidanaloge Reverse Transkriptase Hemmer (NtRTH)

Anders als die NRTHs besitzen die NtRTHs bereits eine Phosphatgruppe und benötigen nur zwei Phosphorylierungsschritte, um in ihre aktive Form umgewandelt zu werden, die als alternatives Substrat für die Reverse Transkriptase dient. Sind sie eingebaut, erfolgt ein Kettenabbruch bei der Synthese der viralen DNA (AGARWAL *et al.* 2006).

Tenofovir (TDF) ist der einzige zurzeit zugelassene Wirkstoff dieser Gruppe (AGARWAL *et al.* 2006; TEMESGEN *et al.* 2006; SAMUEL *et al.* 2006).

2.2.4.3 Nichtnukleosidanaloge Reverse Transkriptase Hemmer (NNRTH)

Ebenso wie die NRTHs und NtRTHs zielen die NNRTHs auf eine Hemmung der Reversen Transkriptase ab. Sie bestehen aus einer großen Anzahl unterschiedlicher Wirkstofffamilien, die keine Nukleoside sind und speziell die Replikation von HIV-1 behindern (AGARWAL *et al.* 2006).

NNRTHs hemmen die Reverse Transkriptase, indem sie direkt und unabhängig von Deoxynukleosidtriphosphaten, mit der allosterischen (nichtsubstratbindenden) Seite des Enzyms interagieren (REN *et al.* 1998; AGARWAL *et al.* 2006). Durch diese Interaktion bewirken sie eine Konformationsänderung der Reversen Transkriptase und verlangsamen so die virale DNA-Synthese von HIV-1 (ESNOUF *et al.* 1995; TEMESGEN *et al.* 2006). Sie benötigen keine intrazelluläre Aktivierung.

Virusstämme, die resistent gegenüber NRTHs oder NtRTHs sind, behalten für gewöhnlich ihre Sensitivität gegenüber NNRTHs und umgekehrt. Toxische Nebeneffekte von NRTHs/NtRTHs und NNRTHs verstärken sich für gewöhnlich nicht gegenseitig, was ein weiteres Argument für eine Kombination von NRTHs, NtRTHs und NNRTHs ist (BALZARINI 1999).

Die zurzeit zugelassenen NNRTHs sind Nevirapine, Delavirdine und Efavirenz (SAMUEL *et al.* 2006).

Tab. 2.2: Überblick über die unterschiedlichen Eigenschaften von NRTNs, NtRNs und NNRTNs.
(Quelle: BALZARINI 2004)

Eigenschaften	NRTNs /NtRNs	NNRTNs
Struktur	Nucleosidische Struktur	Nichtnucleosidische Struktur
Metabolismus	Intrazellulärer Umbau in aktiven Metabolit durch zelluläre Enzyme	Benötigen keine metabolische Aktivierung, sondern wirken direkt gegen ihr Ziel
Antivirales Spektrum	Antiretroviraler Wirkstoff mit breitem Spektrum und geringer Spezifität für HIV-1 RT	Wirkstoff mit hoher Spezifität für HIV-1 (ausschließlich HIV-1 Reverse Transkriptase)
Angriffspunkt bei Reverse Transkriptase	Interagiert mit der katalytischen (substratbindenden) Seite von Reverse Transkriptase	Interagiert mit der allosterischen (nichtsubstratbindenden) Seite von Reverse Transkriptase (lipophile Tasche)
Wirkungsart	Einbau in viralen DNA-Strang, induziert DNA-Kettenabbruch. Konkurriert mit endogenen Substraten	Wird nicht in viralen DNA-Strang eingebaut, verlangsamt aber die katalytische Aktivität von Reverse Transkriptase. Keine Konkurrenz mit endogenen Substraten
Kreuzresistenz	Resistente Virenstämme behalten eine ausgeprägte (bei NtRNs: volle) Sensitivität gegenüber NNRTNs	Resistente Virenstämme behalten eine ausgeprägte Sensitivität gegenüber NRTNs

2.2.4.4 Protease Hemmer (PH)

Protease Inhibitoren binden direkt am aktiven Zentrum der Protease und verhindern so eine Spaltung der Vorläuferproteine in ihre eigentlichen funktionsfähigen Proteine. Das Resultat ist die Knospung strukturell unorganisierter und nichtinfektiöser Viruspartikel aus der Zelle (PILLAY *et al.* 1995).

Protease Inhibitoren werden durch das Cytochrom P 450-System (CYP450-System) metabolisiert und sind, in unterschiedlichem Ausmaß, ebenfalls Hemmer dieses Systems (TEMESGEN *et al.* 2006).

Zurzeit sind sechs Protease Hemmer zugelassen (ERON 2000).

2.2.4.5 Entry- oder Fusionshemmer

Enfuvirtide (auch T-20) ist der bisher einzige zugelassene Entry- oder Fusionshemmer. Er besteht aus einem linearen 36-Aminosäurepeptid, welches homolog zu einer Untereinheit (*heptad repeat-2*, HR-2) des gp 41 ist. Es bindet an diese Region, blockiert die Konformationsänderung des gp 41 und verhindert so die Fusion der Membranen von Virus und Zelle.

T-20 ist nicht aktiv gegenüber HIV-2 (TEMESGEN *et al.* 2006; SAMUEL *et al.* 2006; AGARWAL *et al.* 2006).

2.2.4.6 In der Entwicklung befindliche HIV-Therapeutika

TEMESGEN *et al.* (2006), AGARWAL *et al.* (2006) und STELLBRINK (2008) geben einen Überblick über die zurzeit in der Entwicklung befindlichen HIV-Therapeutika, darunter Integrasehemmer, CD4-„Downmodulators“, Transkriptionshemmer, Reifungshemmer, Ribonukleotid-Reduktase-Hemmer (RRH), Cytokine als Immunregulatoren, sowie neue NRTIs, NNRTIs und Protease Hemmer.

Mögliche Präparate, die als Integrasehemmer agieren könnten, beinhalten unter anderem Polyamide, Bisdistamycin, Lextropsine und einige Thiazolothiazepin-Derivate (POMMIER *et al.* 2000). Einige Diketosäuren haben sich als Hemmer des Integrase-vermittelten Strangtransfers erwiesen (HAZUDA *et al.* 2000).

2.2.5 HIV-Therapie in der Schwangerschaft

Die vertikale HIV-Transmission von Mutter zu Kind kann *in utero*, *intrapartum* sowie *postnatal* durch Stillen geschehen (DABIS *et al.* 1993). Ohne therapeutische Intervention beträgt während dieser Zeit die vertikale Transmissionsrate 15 – 40%. Die meisten Kinder, auf die HIV durch vertikale Transmission von der Mutter übertragen wird, leben in Afrika südlich der Sahara. Dort beträgt die *antenatale* Seroprävalenz mehr als 30 % (2006 REPORT ON THE GLOBAL AIDS EPIDEMIC).

Die antiretrovirale Prophylaxe reduziert das Transmissionsrisiko, indem sie die retrovirale Replikation vermindert und so die Viruslast im Plasma der Schwangeren reduziert. Postexpositionelle Prophylaxe des Kindes durch plazentagängige antiretrovirale Substanzen vermindern zusätzlich die vertikale Transmission (THORNE & NEWELL 2005).

Die Mutter-Kind-Transmission kann fast vollständig durch eine Kombination von antiretroviraler Therapie, Kaiserschnitt und dem Verzicht auf das Stillen verhindert werden (98 – 99 %). Antiretrovirale Prophylaxe (wie z. B. HAART) verhindert ebenso einen Großteil der Transmission während der Geburt, auch wenn auf einen Kaiserschnitt verzichtet wird (DORENBAUM *et al.* 2002; EUROPEAN COLLABORATIVE STUDY 2005).

Die vertikal erworbene HIV-Infektion wurde mit Einführung von HAART in Industrieländern so gut wie eliminiert und eine Reduzierung der Transmissionsrate auf unter 1 – 2 % erreicht (THORNE & NEWELL 2005).

Allerdings gibt es Berichte über ungünstige Schwangerschaftsverläufe und Toxizitäten, die mit *antenataler* HAART in Zusammenhang gebracht werden, sowie Bedenken über die kurz- und langfristigen Auswirkungen von antiretroviralen Kombinationstherapien auf Föten und Neugeborene, die nicht mit HIV infiziert sind. Die Risiken, die sich für das Kind durch eine lange *intrauterine* Exposition gegenüber Kombinationstherapien ergeben, sind aufgrund fehlender

Daten zu Pharmakokinetik, -dynamik, Embryo- und Fetotoxizität und zu Langzeitfolgen einer *intrauterinen* Medikamentenexposition nicht kalkulierbar (POIRIER *et al.* 2003; BARRET *et al.* 2003; BLANCHE *et al.* 1999; POIRIER *et al.* 1999; MENG *et al.* 2000; SCALFARO *et al.* 1998; EUROPEAN COLLABORATIVE STUDY 2003).

In ärmeren Ländern ist die Effektivität von einfacheren und kostengünstigeren antiretroviralen Strategien, wie zum Beispiel kurzzeitige Gabe von Zidovudin und Nevirapin als Einzeldosis (sdNVP), immerhin akzeptabel. Als gängige Methode für eine Prävention der Mutter-zu-Kind-Transmission hat sich sdNVP bei Einsetzen der Wehen und nach der Geburt für das Neugeborene entwickelt, da sie den Vorteil geringer Kosten und der leichten Abgabemöglichkeiten in den Gesundheitssystemen der ärmeren Länder hat.

Die hohe Prävalenz von Resistenzen gegen Monotherapien, besonders die Prävalenz von Resistenzen, die mit sdNVP assoziiert werden, hat die Aufmerksamkeit auf die Anwendung von bezahlbaren Kombinationstherapien in diesen Ländern gelenkt (THORNE & NEWELL 2005).

In den Industrieländern erhalten viele HIV-positive Frauen bereits HAART, wenn sie schwanger werden. So waren in der EUROPEAN COLLABORATIVE STUDY (2005) 85% der untersuchten Frauen HAART-erfahren. Der *antenatale* Gebrauch von HAART war unabhängig für einen 85 %igen Rückgang der Transmissionsrate verantwortlich, im Gegensatz zu keiner antiretroviralen Prophylaxe (EUROPEAN COLLABORATIVE STUDY 2005). Die Mutter-zu-Kind-Transmissionsrate bei Beginn einer HAART kurz vor und während der frühen Schwangerschaftsphase lag bei unter 1 % (EUROPEAN COLLABORATIVE STUDY 2005 A).

Trotz des großen Erfolgs einer Prävention der Mutter-zu-Kind-Transmission durch HAART bleibt die größte Herausforderung für eine optimale Prävention die rechtzeitige Identifizierung HIV-positiver schwangerer Frauen. Die Deutsch-Österreichische Empfehlung zur HIV-Therapie in der Schwangerschaft und bei HIV-exponierten Neugeborenen empfiehlt, jeder schwangeren Frau einen HIV-Test anzubieten.

Wichtig bei der Prävention einer HIV-Transmission von Mutter zu Kind ist die enge Zusammenarbeit zwischen HIV-Behandlern, Geburtshelfern und Pädiatern (AWMF 2005).

2.3 Die Wirkstoffgruppe der nukleosidanalogen Reverse Transkriptase Hemmer

Die viral codierte RT ist ein (RNA-)Pendant zur DNA-Polymerase und wandelt die virale RNA in doppelsträngige DNA um, die in die Wirts-DNA integriert wird (SHALKA 1993).

Als entscheidendes Enzym im Replikationszyklus von HIV ist die Reverse Transkriptase der Angriffspunkt für zwei Gruppen antiretroviraler Wirkstoffe:

- nichtnukleosidische Reverse Transkriptase Hemmer (NNRTH)
- nukleosidanaloge/nukleotidanalogue Reverse Transkriptase Hemmer (NRTH/ NtRTH).

In diesem Kapitel werden ausschließlich die in dieser Arbeit untersuchten nukleosidanalogen Reverse Transkriptase Hemmer behandelt.

NRTHs waren die ersten antiretroviralen Medikamente, die entwickelt und klinisch eingesetzt wurden. Sie sind auch heute noch wichtig für die HIV-Therapie und bilden das Grundgerüst für die HAART. Sie imitieren die natürlichen Pyrimidin- und Purinnukleoside.

Alle NRTHs sind inaktiv, wenn sie in die Zelle gelangen (sog. Proharmaka) und werden erst durch eine Reihe komplexer Phosphorylierungsschritte, die durch zelluläre Kinasen katalysiert werden, in ihre aktiven Triphosphate (2',3'-dideoxynukleosid(analoges)Triphosphat (ddNTP)) umgewandelt. Diese werden durch die HIV-Reverse Transkriptase in die virale DNA eingebaut. Normalerweise stellt die 3'-Hydroxy-Gruppe (3'-OH-Gruppe) der Nukleoside die 5- zu 3-Phosphoresterbindung mit der nächsten Nukleinsäure her. Das Fehlen der 3'-OH-Gruppe am Ribosering der NRTHs führt zu einem vorzeitigen Abbruch der viralen DNA-Synthese, was somit die Hemmung der viralen Replikation verursacht (LANGTRY & CAMPOLI-RICHARDS 1989; YARCHORAN *et al.* 1989; SHARMA *et al.* 2004; KAKUDA 2000).

Die NRTHs konkurrieren mit den natürlich in der Zelle vorkommenden 2'-deoxyribonukleosid Triphosphate (dNTP) um die Substratbindung zur HIV-Reverse Transkriptase und den Einbau in die virale DNA. Ebenso können die NRTHs durch DNA-Polymerasen anstelle der endogenen Nukleotide in das Wirtszellgenom eingebaut werden (KAKUDA 2000).

Die zelluläre Regulation der NRTHs hängt davon ab, ob die Zelle in einem ruhenden (postmitotischen) oder einem aktiven Stadium ist. Postmitotische Zellen phosphorylieren bevorzugt Zalcitabin, Didanosin und Lamivudin, während aktive Zellen bevorzugt Thymidin Analoga wie Stavudin und Zidovudin phosphorylieren (KAKUDA 2000).

Die derzeit therapeutisch eingesetzten NRTHs sind:

Pyrimidinanaloga

- 3'-acido-3'-deoxythymidin, oder **Zidovudin (AZT)**
- 3'-deoxy-2',3'-didehydrothymidin, oder **Stavudin (d4T)**
- 2',3'-dideoxycytidin, oder **Zalcitabin (ddC)***
- (-)- β -2',3'-dideoxy-3'-thiacytidin, oder **Lamivudin (3TC)**
- (-)-2',3'-dideoxy-5-fluoro-3'-thiacytidin, oder **Emtricitabin (FTC)**

* Die Produktion von Zalcitabin wurde 2006 eingestellt

Purinanaloga

- 2',3'-dideoxyinosin, oder **Didanosin (ddI)**
- (-)-(1S,4R)-4-(2-amino-6-(cyclopropylamino)-9H-purine-9-yl)-2-cyclopenten-1-methanol succinat, oder **Abacavir (ABC)**

Emtricitabin und Abacavir sind in dieser Arbeit nicht untersucht worden.

*Pyrimidinanaloga**Deoxythymidinanaloga Zidovudin (AZT) und Stavudin (d4T)*

Zidovudin und Stavudin sind strukturelle [2',3'-dideoxy] Analoga des Pyrimidins Thymidin, bei Zidovudin ist die Hydroxylgruppe in der 3'-Position des Riboseringes durch eine Azidogruppe ersetzt, bei Stavudin liegt von der 2'- zu 3'-Position des Riboseringes eine Doppelbindung vor.

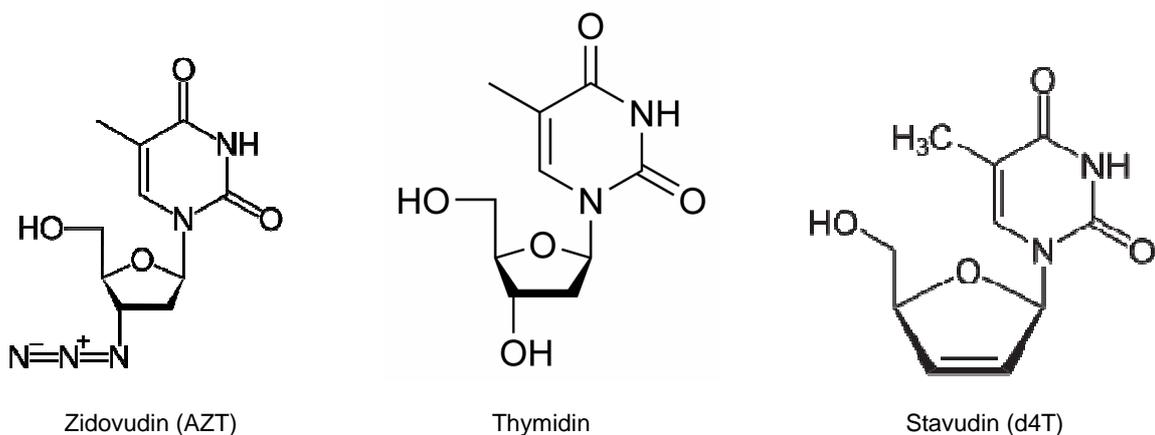


Abb. 2.6 : Zidovudin (AZT) und Stavudin (d4T) im Vergleich mit Thymidin.

Zidovudin ist der erste Wirkstoff aus der Gruppe der nukleosidanalogen Reverse Transkriptase Hemmer, der in der HIV-Therapie eingesetzt wurde. Seine Effektivität in der Behandlung von HIV beruht hauptsächlich auf seiner selektiven

Affinität für HIV-Reverse Transkriptase (VEAL & BACK 1995, SOMMADOSSI *et al.* 1989, SIMPSON *et al.* 1989).

Zidovudin ist lipophiler als die anderen Nukleosidanaloga (COLLINS *et al.* 1988), deshalb ist es in der Lage, die Blut-Hirn-Schranke zu überwinden. Es passiert die Zellmembran via passiven Transport (ZIMMERMAN *et al.* 1987). Seine Bioverfügbarkeit liegt zwischen 54 und 74 % und wird nicht durch Mahlzeiten beeinträchtigt. Zidovudin wird schnell verstoffwechselt (ca. innerhalb einer Stunde) und über die Nieren ausgeschieden, der Großteil in Form seiner Metabolite (ACOSTA *et al.* 1996; SHARMA *et al.* 2004; SAMUEL *et al.* 2006).

Stavudin ist zugelassen für die Behandlung von Patienten mit einer fortgeschrittenen HIV-Infektion, die intolerant geworden sind gegenüber Zidovudin, Didanosin oder Zalcitabin bzw. die nicht auf einer Behandlung mit diesen Substanzen ansprechen (RANA & DUDLEY 1997). Stavudin ist weniger toxisch als Zidovudin.

Stavudin gelangt durch passive Diffusion in die Zelle, bei oraler Verabreichung erreicht es seine maximale Plasma-Konzentration nach 2 Stunden und nimmt linear mit der Dosis zu. Die absolute Bioverfügbarkeit beträgt annähernd 100 % (RANA & DUDLEY 1997) und wird nicht durch Mahlzeiten beeinflusst. Stavudin wird nach 3 bis 4 Stunden unverändert durch die Nieren ausgeschieden (RANA & DUDLEY 1997; SAMUEL *et al.* 2006)

Deoxycytidinanaloga Zalcitabin (ddC) und Lamivudin (3TC)

Zalcitabin und Lamivudin sind strukturelle [2',3'-dideoxy] Analoga zu 2'-Deoxycytidin. Bei Zalcitabin ist die 3'-OH-Gruppe am Ribosering durch ein Wasserstoffatom ersetzt. Lamivudin ist das negative Isomer, dessen 3'-Kohlenstoffatom am Ribosering durch ein Schwefelatom ausgetauscht ist.

Als Cytidinanaloga werden sie über andere enzymatische Wege metabolisiert als die Thymidinanaloga.

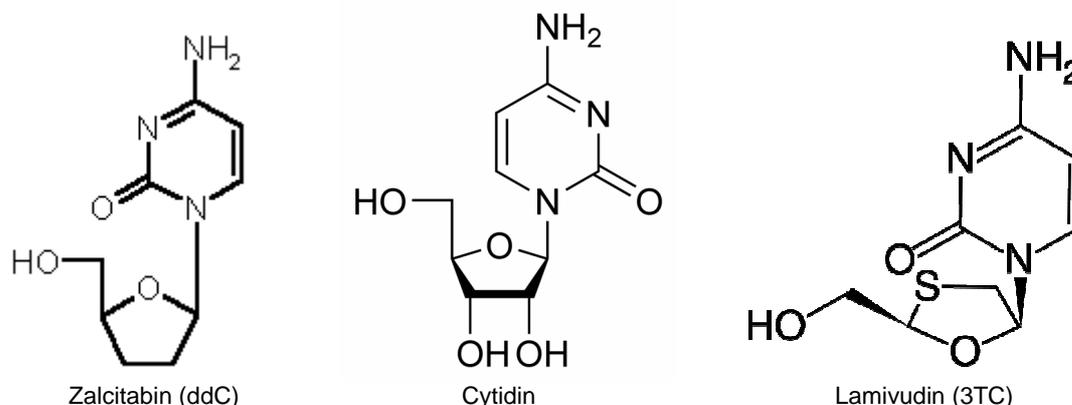


Abb.2.7: Zalcitabin (ddC) und Lamivudin (3TC) im Vergleich mit Cytidin.

Der Transport von **Zalcitabin** in die Zelle wird durch Carrier-Proteine vermittelt (COONEY *et al.* 1986; ULLMAN *et al.* 1988).

Seine Bioverfügbarkeit liegt zwischen 70 und 90 % und wird durch Mahlzeiten signifikant herabgesetzt. Zalcitabin wird nach einer Halbwertszeit von 1 bis 3 Stunden unverändert durch die Nieren ausgeschieden.

Die Produktion von Zalcitabin wurde 2006 auf Grund der Schwere der Nebenwirkungen eingestellt (SAMUEL *et al.* 2006).

Lamivudin passiert die Zellmembran mittels passiver Diffusion. Die Bioverfügbarkeit liegt zwischen 80 und 90 % und wird nicht durch Mahlzeiten beeinflusst. Lamivudin wird bei einer Halbwertszeit von 3 bis 4 Stunden unverändert durch die Nieren ausgeschieden (SAMUEL *et al.* 2006; PERRY & FAULDS 1997).

Purinanaloga

Das Deoxyadenosinanalogon Didanosin (ddI)

Didanosin ist ein Analogon zum Purin Inosin. Es kann sowohl mittels Carrier als auch durch passive Diffusion in die Zelle gelangen (DOMIN *et al.* 1993). Seine Bioverfügbarkeit liegt zwischen 30 und 54 % (SHARMA *et al.* 2004). Bei gleichzeitiger Verabreichung mit Nahrung oder bis zu zwei Stunden nach der Mahlzeit wird die Bioverfügbarkeit um annähernd 50 % gesenkt (PERRY & BALFOUR 1996). Didanosin ist sehr instabil bei niedrigen pH-Werten und wird bei einer Halbwertszeit von 2 bis 3 Stunden schnell durch die Nieren ausgeschieden (SAMUEL *et al.* 2006).

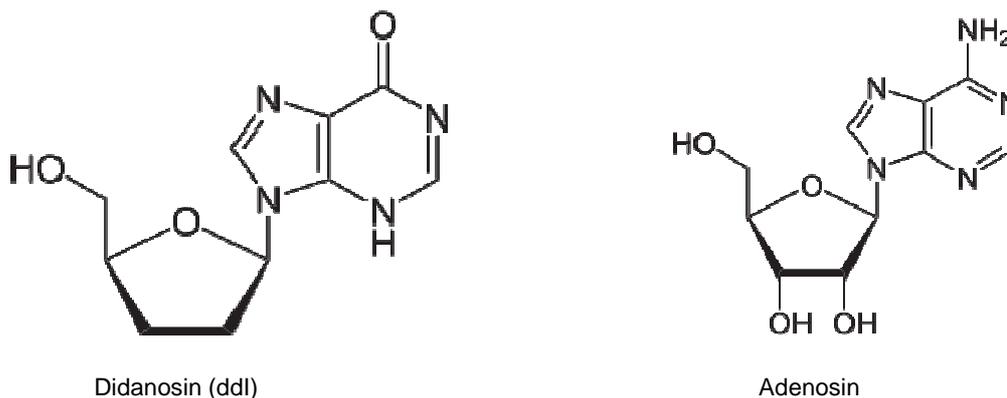


Abb. 2.8: Didanosin (ddI) im Vergleich zu Adenosin.

2.3.1 Aktivierung durch Phosphorylierung

2.3.1.1 Pyrimidinanaloga

Die Deoxythymidinanaloga Zidovudin (AZT) und Stavudin (d4T)

Als Thymidinanaloga sind sich Zidovudin und Stavudin strukturell sehr ähnlich, unterscheiden sich jedoch in der Kinetik ihrer Phosphorylierung (BALZARINI *et al.* 1989; VEAL & BACK 1995).

Obwohl die einzelnen Phosphorylierungsschritte für Stavudin noch nicht vollständig geklärt sind, wird angenommen, dass beide die gleichen enzymatischen Wege benutzen (CONNOLLY & HAMMER 1992; HO & HITCHCOCK 1989; TURRIZIANI *et al.* 1998).

Sowohl Zidovudin als auch Stavudin werden in ihrem ersten Phosphorylierungsschritt durch das Enzym cytosolische Thymidinkinase (TK1) in ihr Monophosphat (MP) umgewandelt (HO & HITCHCOCK 1989; STEIN & MOORE 2001).

Diese erste Phosphorylierung ist für Stavudin der limitierende Schritt, da es ein schlechtes Substrat für die Thymidinkinase ist. Die Affinität von Thymidinkinase für Zidovudin ist annähernd so gut wie für das natürliche Substrat Thymidin (HO & HITCHCOCK 1989; BALZARINI *et al.* 1989; FURMAN *et al.* 1986).

Der zweite Schritt der Phosphorylierung vom Monophosphat (MP) zum Diphosphat (DP) wird bei Stavudin und Zidovudin durch Thymidilatkinase vermittelt.

HO & HITCHCOCK (1989) zeigten, dass die Phosphorylierung von Zidovudin-MP zu Zidovudin-DP in Lymphozyten und *peripheral blood mononuclear cells* (PBMCs) ineffizient ist. Zidovudin übt gegenüber Thymidilatkinase eine negative Feedback-Hemmung aus, da es dessen Umsetzungsrate reduziert und die Substratbindung von Adenosintriphosphat (ATP), dem Phosphatlieferanten von Reverse Transkriptase, hemmt (BALZARINI *et al.* 1991; STEIN & MOORE 2001). Das beeinflusst nicht nur den eigenen (Zidovudin-MP) Metabolismus, sondern auch den des natürlichen zelleigenen Deoxythymidinmonophosphats (dTMP), was in einer Anhäufung von Zidovudin-MP und einer geringeren Umwandlung in Zidovudin-DP und Zidovudin-TP resultiert (SHARMA *et al.* 2004; BALZARINI 1994; STEIN & MOORE 2001).

Folglich akkumuliert Zidovudin in der Zelle als Zidovudin-MP und macht in etwa 95 % aller phosphorylierten Formen aus (BALZARINI *et al.* 1989).

Die Konzentrationen an Zidovudin-DP und Zidovudin-TP sind annähernd ähnlich und liegen bei 0,5 – 3 % in aktiven und ruhenden PBMCs (STEIN & MOORE

2001). Die Phosphorylierung von Zidovudin-MP zu Zidovudin-DP ist somit der limitierende Schritt in der Umsetzung von Zidovudin.

Den letzten Schritt zur Bildung der Triphosphate katalysiert das Enzym Nucleosiddiphosphat (NDP) Kinase, welches vermutlich bei allen NRTHs die Umwandlung vermittelt.

Der größte Teil des wenigen phosphorylierten Stavudin, das in die Zelle gelangt, ist Stavudin-TP (HO & HITCHCOCK 1989).

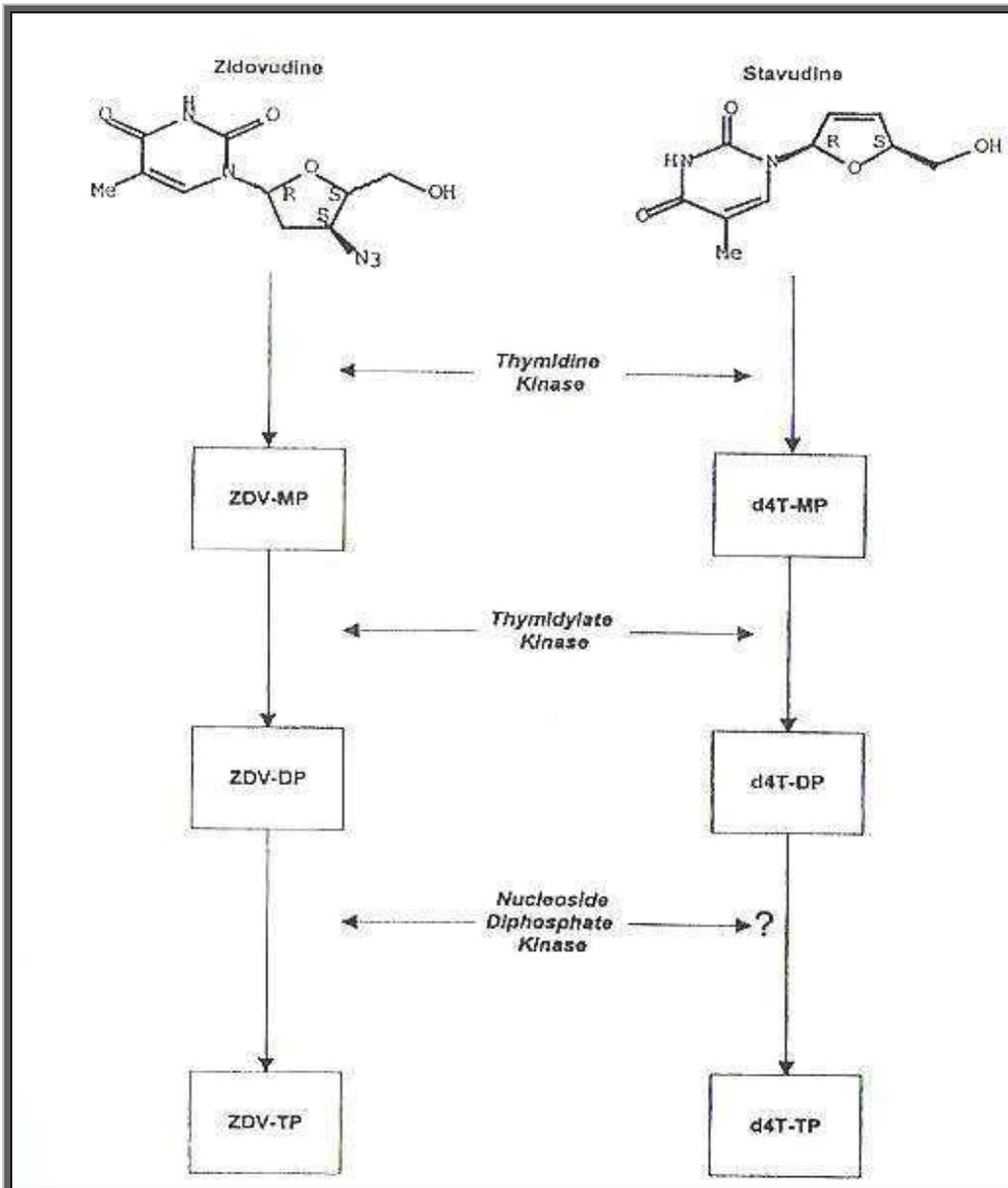


Abb. 2.9: Intrazelluläre Phosphorylierung von Zidovudin (AZT, hier mit ZDV bezeichnet) und Stavudin (d4T) durch endogene Enzyme. DP, -diphosphat; MP, -monophosphat; TP, -triphosphat. (BALZARINI 1994)

Die Phosphorylierung als Aktivierungsreaktion für Zidovudin konkurriert mit weiteren metabolischen Wegen, wie der Glucuronidierung und die 3'-Amino-3'-deoxythymidin-Bildung (AMT).

Die Glucuronidierung ist der dominante Pfad Elimination von Zidovudin, bei der das Enzym UDP-glucuronyl-transferase (UDPGT) beteiligt ist und die zur Bildung von 3'-azido-3'-deoxy-5'- β -D-glucopyranuronosylthymidin (5'-glucuronyl Zidovudin oder GAZT) führt. Glucuronyl Zidovudin ist ein inaktiver und mit 60 – 70% der häufigste Metabolit von Zidovudin (VEAL & BACK 1995).

Bei der AMT-Bildung wird die Azidogruppe am Ribosering von Zidovudin reduziert, was zur Bildung von 3'-amino-3'-deoxythymidin (AMT) führt. Es wird angenommen, dass AMT annähernd 5 bis 7 mal toxischer für menschliche hämatopoietische Vorläuferzellen ist als Zidovudin, was darauf hindeutet, dass AMT eine große Rolle bei der klinisch beobachteten Cytotoxizität von Zidovudin spielt (CRETTON *et al.* 1991; VEAL & BACK 1995).

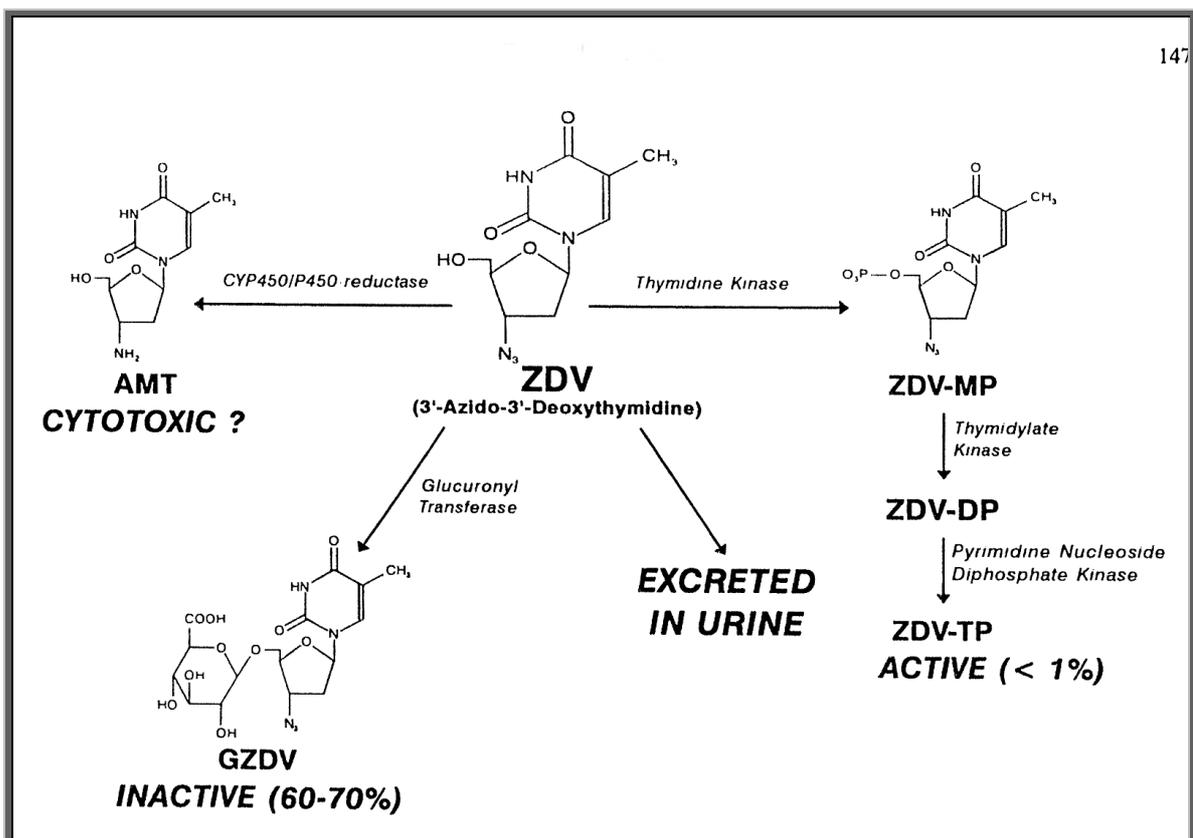


Abb. 2.10: Die unterschiedlichen metabolischen Wege von Zidovudin (AZT, hier mit ZDV bezeichnet). (VEAL & BACK 1995)

Die Deoxycytidinanaloga Zalcitabin (ddC) und Lamivudin (3TC)

Obwohl noch nicht alle enzymatischen Wege für Lamivudin restlos geklärt sind, wird angenommen, das Zalcitabin und Lamivudin durch die gleichen Enzyme phosphoryliert werden (STEIN & MOORE 2001).

Der erste Schritt in der Phosphorylierung von Zalcitabin und Lamivudin ist die Bildung des Monophosphatderivats durch das Enzym Deoxycytidinkinase (COONEY *et al.* 1986; STARNES & CHENG 1987; CATE & CHENG 1987; BALZARINI *et al.* 1988; CHANG *et al.* 1992; STEIN & MOORE 2001).

Der zweite Schritt zu Zalcitabindiphosphat (-DP) bzw. Lamivudindiphosphat wird durch Cytidinmonophosphatkinase (CMP) katalysiert (KAKUDA 2000; BALZARINI 1994).

Cytidyltransferase kann Cholin oder Ethanolamin an Zalcitabin-DP binden und so die Liponukleotide Zalcitabin-DP-Cholin und Zalcitabin-TP-Ethanolamin bilden. Diese Metabolite scheinen einzigartig für ddC zu sein (KAKUDA 2000) und werden in signifikantem Ausmaß gebildet (COONEY *et al.* 1986).

Der vorherrschende Metabolit von Lamivudin ist Lamivudin-DP, was die Vermutung nahe legt, das der limitierende Schritt in der Phosphorylierung von Lamivudin bei der Umwandlung von Lamivudin-DP zu Lamivudin-TP liegt (AHLUWALIA *et al.* 1996; MOORE *et al.* 1999).

Der letzte Schritt zu Zalcitabin-TP wird, wie wahrscheinlich bei allen NRTHs, durch NDP katalysiert (KAKUDA 2000).

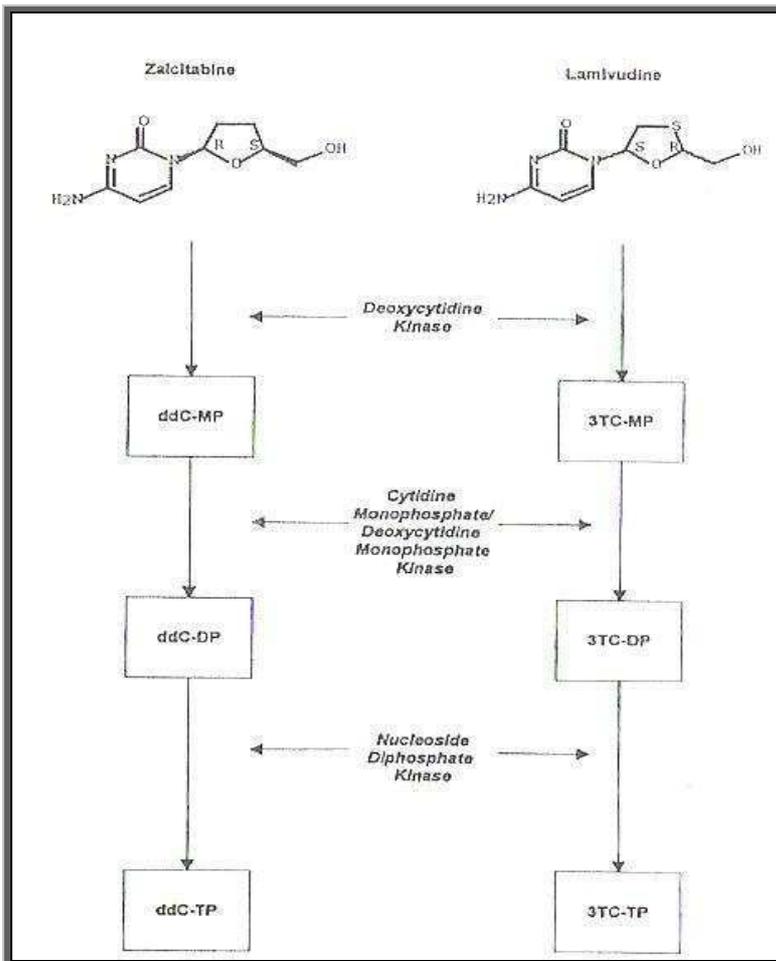


Abb. 2.11: Die metabolischen Wege von Zalcitabin (ddC) und Lamivudin. DP, -diphosphat; MP, -monophosphat; TP, -triphosphat. (aus: BALZARINI, 1994).

2.3.1.2 Purinanaloga

Deoxyadenosinanalogon Didanosin (ddI)

Im ersten Phosphorylierungsschritt wird Didanosin durch 5'-Nukleotidase in Didanosin-MP umgewandelt. Für eine weitere Phosphorylierung in Didanosin-DP und Didanosin-TP gibt es keine Hinweise (BALZARINI 1994). Mittels Adenylsuccinatsynthase und -lyase wird Didanosin-MP zu Dideoxyadenosin-MP aminiert (AHLUWALIA *et al.* 1987; JOHNSON *et al.* 1988; JOHNSON *et al.* 1989; CONNEY *et al.* 1987) und dann weiter in dem Metabolismus von Dideoxyadenosin zu Dideoxyadenosin-DP und Dideoxyadenosin-TP phosphoryliert.

Wird Didanosin durch Purinnucleosidphosphorylase hydrolysiert, so entsteht der Metabolit Hypoxanthin, dieser wird durch Hypoxanthin-Guanin-Phosphoribosyltransferase zu Inosin-MP katalysiert. Im weiteren Verlauf werden über die klassischen Purin-Nucleotid-Biosynthese ATP und GTP synthetisiert.

Mehrere Enzyme, die an der Phosphorylierung von ddI und am Umbau zu ddAMP beteiligt sind, konnten identifiziert werden, wie zum Beispiel 5'-nukleotidase und Adenylsuccinatsynthase bzw. -lyase (NAVÉ *et al.* 1994; GAO *et al.* 1993). Die meisten der Enzyme, die an der Phosphorylierung von ddA zu ddATP beteiligt sind, sind jedoch noch nicht vollständig bekannt.

Sowohl Adenosin Kinase als auch 2'-deoxycytidin Kinase (dCK) können den ersten Schritt in der Phosphorylierung von ddA hin zu ddAMP katalysieren (COONEY *et al.* 1987). Allerdings beträgt die Effizienz von Adenosin Kinase nur etwa 10 % der von dCK, und in menschlichen Thymocyten wurde nachgewiesen, dass die Effizienz von dCK bei der Phosphorylierung von ddA zu ddAMP deutlich (500 mal) geringer ist als bei der Phosphorylierung von 2'-deoxycytidin (dC) (JOHNSON *et al.* 1988; JOHNSON *et al.* 1989).

Welche Enzyme an den nächsten Schritten der Phosphorylierung von ddAMP beteiligt sind, ist noch nicht geklärt; doch nimmt man an, dass Adenylatkinase und, wie bei allen NRTHs postuliert, NDP-Kinase eine Rolle spielen (NAVÉ *et al.* 1994).

Die Phosphorylierung von ddA kann über zwei verschiedene Wege ablaufen. Einmal direkt über die 5'-phosphorylierung zu ddAMP, -DP und -TP oder indirekt über Desaminierung zu ddI mittels Adenosin Deaminase.

Die Umwandlung zu ddI verläuft sehr schnell und leicht, wohingegen die direkte Bildung von ddATP aus ddA durch L-Alanosin behindert und gedrosselt wird. L-Alanosin bedingt also eine überwiegende Phosphorylierung von ddA über den indirekten Weg via ddI (AHLUWALIA *et al.* 1987).

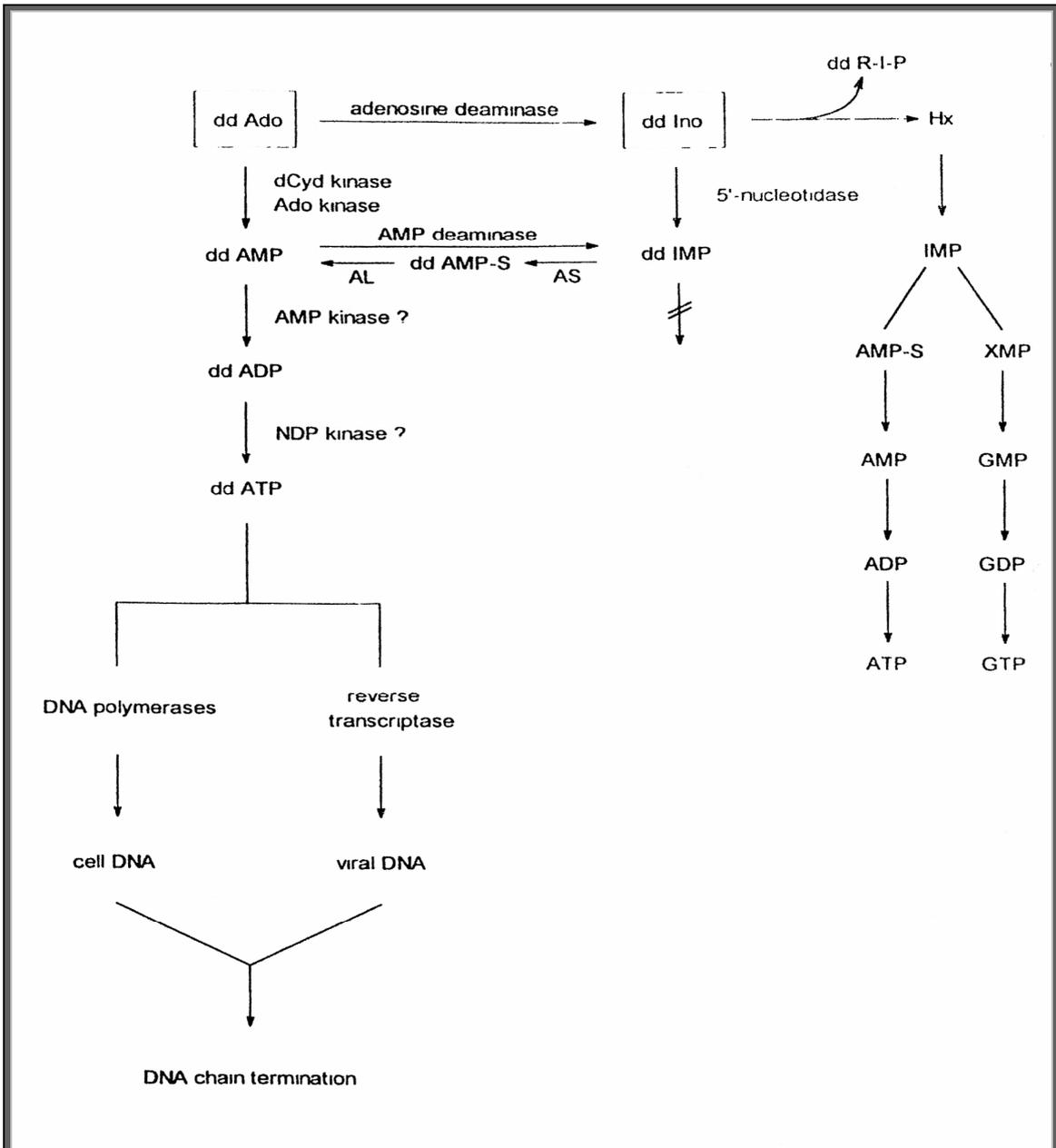


Abb. 2.12: Die metabolischen Wege von Didanosin (ddI) und ddA (BALZARINI 1994).

2.3.2 Mitochondriale Toxizität

Mitochondrien sind Organellen, die in allen Zellen, mit Ausnahme von roten Blutkörperchen, existieren. Sie besitzen eine doppelte Membran, zirkuläre DNA-Moleküle und spezifische Transkription-, Translation- und Proteinbiosynthese-Systeme. Die primäre Aufgabe der Mitochondrien ist es, der Zelle Energie in Form von Adenosintriphosphat (ATP) zu liefern. Die Zahl der Mitochondrien pro Zelle hängt vom Energiebedarf dieser Zelle ab. Leber-, Muskel- oder Fettzellen können mehrere tausend Mitochondrien besitzen, während Thrombocyten nur einige wenige aufweisen. Fettzellen kann man histologisch durch die Anzahl an

Mitochondrien, die sie enthalten, differenzieren. So tragen braune Fettzellen mehr Mitochondrien als weiße (KAKUDA 2000).

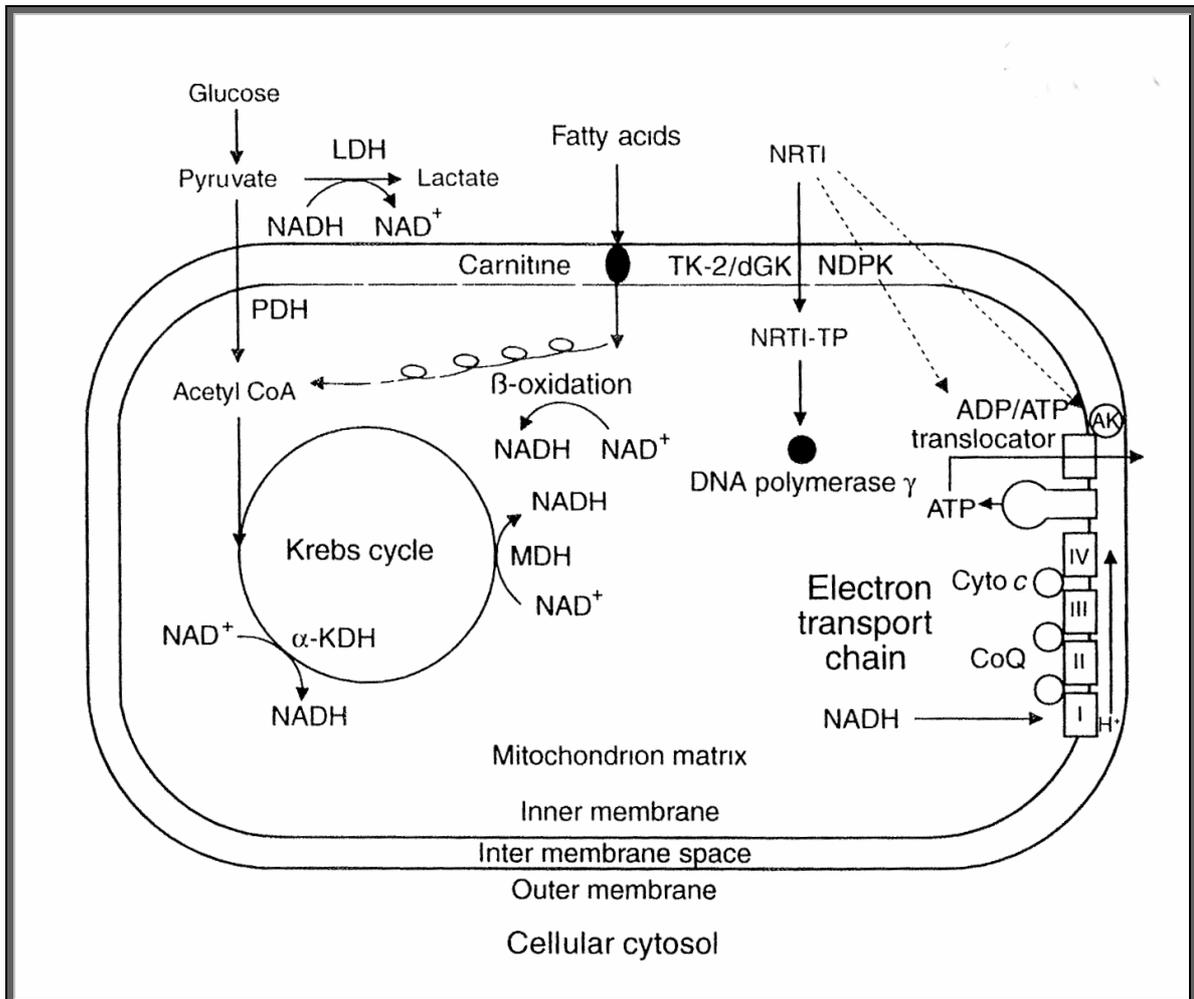


Abb. 2.13: Struktur eines Mitochondriums.

Glucose und Fettsäuren sind die für die Produktion von Energie wichtigen Grundstoffe. Glucose wird durch die Glycolyse in Pyruvat umgewandelt, welches dann in das Mitochondrium gelangt und zur Energiegewinnung durch die oxidative Phosphorylierung beiträgt. Langkettige Fettsäuren gelangen mit Hilfe von Carnitin in das Mitochondrium und werden, nach der β -Oxidation, ebenfalls zur Energiegewinnung durch die oxidative Phosphorylierung genutzt. Bei der oxidativen Phosphorylierung wird NADH zur Gewinnung von ATP herangezogen.

Aktivierte NRTIs können die DNA-Polymerase γ , ein Enzym, das verantwortlich für die mtDNA-Replikation ist, blockieren. Ebenso ist es möglich, dass die NRTIs hemmend auf Adenylatkinase und den ADP/ATP-Translokator einwirken. Ein Verlust mitochondrialer Aktivität führt zu einem Energieverlust, zu intrazellulären Fettsammlungen und zur Produktion von Laktat durch anaerobe Atmung.

Acetyl CoA, Acetyl Coenzym A; **α -KDH**, Alpha-Ketoglutaratdehydrogenase; **CoQ**, Coenzym Q; **cyto c**, Cytochrom c; **dGK**, Deoxyguanosin Kinase; **LDH**, Laktatdehydrogenase; **MDH**, Malatdehydrogenase; **NAD⁺**, Nicotinamidadeninukleotid; **NDPK**, Nukleosiddiphosphatkinase; **PDH**, Pyruvatdehydrogenase; **TK-2**, Thymidinekinase-2. (Quelle: KAKUDA, 2000)

Die primäre Rolle der Mitochondrien ist die Bereitstellung von Energie für die Zelle in Form von ATP. Das ATP wird in einem Zusammenspiel aus Citronensäurezyklus, oxidativer Phosphorylierung und Elektronentransportkette gewonnen.

Außerdem regulieren die Mitochondrien den programmierten Zelltod (Apoptose) und sind auch für eine Reihe weiterer wichtiger biochemischer Vorgänge

verantwortlich, wie z. B. Ammoniakentgiftung, Cholesterinmetabolismus, Östrogen- und Testosteronsynthese und das zelluläre Calciumgleichgewicht. Jedes Mitochondrium enthält 2 bis 10 Kopien der mitochondrialen DNA (mtDNA) und die notwendigen Proteine für die Nukleinsäuresynthese, die Phosphorylierung, Transkription und Translation. Anders als die Kern-DNA (nDNA) enthält mtDNA wenige nicht kodierende Sequenzen. Die Replikation von mtDNA ist teilweise unabhängig von der Replikation der nDNA. Das für die Replikation verantwortliche Enzym ist DNA-Polymerase γ , ein nDNA-kodiertes Enzym, das stark fehleranfällig ist, verglichen mit nuklearen DNA-Polymerasen.

Zellen mit geschädigten Mitochondrien enthalten meist intrazelluläre Fetttröpfchen aufgrund der ungenutzten Fettsäuren. Außerdem kann eine Laktat-Azidose auftreten sowie eine Verschiebung der Zellatmung von der (aeroben) oxidativen Phosphorylierung zur anaeroben Glycolyse. Gewöhnlich treten Beeinträchtigungen auf, wenn die mitochondriale Aktivität zu etwa >85 % eingestellt ist. Dieser Schwellenwert ist gewebsspezifisch, wobei Zellen mit höherem Energiebedarf eher betroffen sind als solche mit niedrigem Energiebedarf. Mitochondriale Schäden sind normalerweise genetischer Herkunft, doch können sie auch chemisch induziert sein. NRTHs sind bekannte mitochondriale Toxine (KAKUDA 2000).

Es gibt fünf wichtige Polymerasen in menschlichen Zellen: α -, β -, σ -, ε - und γ -Polymerase. Die DNA-Polymerase γ ist in den Mitochondrien lokalisiert, die übrigen im Kern. Die primäre Aufgabe von β - und σ -Polymerase ist DNA-Reparatur, während α - und ε -Polymerase für die Transkription der nDNA zuständig sind. Jede dieser Polymerasen kann NRTHs einbauen. Bei AZT konnte ein Einbau in zelluläre DNA sowohl *in vitro* als auch *in vivo* beobachtet werden (COPELAND *et al.* 1992; OLIVERO *et al.* 1999). Wie oben schon erwähnt, ist die γ -Polymerase besonders fehleranfällig; sie hat sowohl DNA- als auch RNA-abhängige DNA-Polymerase-Aktivität. Wobei die letztere Funktion große Ähnlichkeit mit der HIV-RT-Aktivität hat und daher möglicherweise die Anfälligkeit von DNA-Polymerase γ für NRTHs erhöht (KAKUDA 2000).

NRTH-induzierte mitochondriale Toxizität beinhaltet den Einbau von NRTHs in mtDNA und damit die vorzeitige Beendigung der Replikation, Beeinträchtigungen der mitochondrialen Enzyme (z. B. Enzyme der Elektronentransportkette), Entkopplung der oxidativen Phosphorylierung und Triggerung der mitochondrial induzierten Apoptose (ROSSI *et al.* 1999; STARNES & CHENG 1987; MARTIN *et al.* 1994; NAVIAUX *et al.* 1999; IZUTA *et al.* 1991; KUKHANOVA *et al.* 1996; BARILE *et al.* 1994; MODICA-NAPOLITANO 1993; CHEN & CHENG 1992; HOBBS *et al.* 1995; BENBRIK *et al.* 1997; CUI *et al.* 1997).

Tab. 2.3: Lokalisation und Funktion wichtiger DNA-Polymerasen

Polymerasen	Lokalisation	primäre Aufgabe
α	Zellkern	Transkription
ϵ	Zellkern	Transkription
σ	Zellkern	DNA-Reparatur
β	Zellkern	DNA-Reparatur
γ	Mitochondrium	Replikation von mtDNA

Es gibt zahlreiche Hinweise für eine Schädigung der mtDNA durch noch nicht ausreichend untersuchte Mechanismen der NRTHs. HAYAKAWA *et al.* (1991) schlagen die Bildung freier Radikale, die Deoxyguanosin angreifen, als Grund für die Mutation mitochondrialer DNA vor

Eine mögliche andere Erklärung für die durch NRTHs induzierte mitochondriale Toxizität könnte sein, dass die NRTHs Veränderungen an anderen mitochondrialen Enzymen außer γ -Polymerase verursachen. So fanden BARILE *et al.* (1994) heraus, dass AZT auch an die Adenylat Kinase binden kann, was einen 30 %igen Abfall der ATP-Bildung zur Folge hat.

Die Entkopplung der Elektronentransportkette von der ATP-Synthese kommt als weitere Ursache in Frage. AZT zeigt eine stark dosisabhängige, hemmende Wirkung auf NADH-gebundene Atmung und die NADH-Cytochrom *c* Reduktase Aktivität (MODICA-NAPOLITANO 1993).

NRTHs können die mitochondrial gesteuerte Apoptose triggern. Einer dieser Apoptosepfade beinhaltet die Stimulation von „apoptotische Protease Aktivierungsfaktor -1“ (Apaf-1) durch Cytochrom *c* und dATP. Dadurch werden initiale Caspasen aktiviert (Caspase 9), was wiederum zur Aktivierung nachgeschalteter Caspasen (Caspase 3) und letztendlich zum Zelltod führt (THORNBERRY & LAZEBNIK 1998).

LEWIS & DALAKAS (1995) führten den Begriff „DNA Pol- γ Hypothese“ ein, der, bezogen auf die Polymerasen im Allgemeinen, bedeutet, dass die Polymerasen unterschiedlich empfindlich auf die NRTHs reagieren:

HIV-RT $\gg \gamma > \beta > \alpha = \epsilon$

Die NRTHs können bezüglich ihrer Wirkung auf die γ -Polymerase wie folgt eingestuft werden:

ddC \geq ddi \geq D4T $>$ 3TC $>$ AZT $>$ ABC

(LEWIS & DALAKAS 1995; KAKUDA 2000)

2.3.2.1 Pyrimidinanaloga

Deoxythymidinanaloga Zidovudin (AZT) und Stavudin (d4T)

Die Effektivität von Zidovudin in der HIV-Therapie hängt ab von seiner selektiven Affinität für HIV-Reverse Transkriptase im Gegensatz zu humanen DNA-Polymerasen (FURMAN *et al.* 1986; ST. CLAIR *et al.* 1987). Die zellulären DNA-Polymerasen α und β , wichtig bei Synthese und Reparatur der zellulären DNA, sind 50 bis 100 mal weniger sensitiv für Zidovudin als die Reverse Transkriptase. Die mitochondriale DNA-Polymerase γ hingegen wird durch klinisch relevante Zidovudin-Konzentrationen gehemmt. Dies wird als Grund für die hämatologische Toxizität von Zidovudin *in vivo* angenommen (SOMMADOSSI *et al.* 1989).

Es gibt verschiedene Effekte, die der Einbau von Zidovudin in die mitochondriale DNA auslösen kann. So wurden in Zellkulturen zum Beispiel Anhäufungen von Lipiden im Cytoplasma festgestellt sowie ein konzentrationsabhängiger Anstieg der Milchsäureproduktion (HOBBS *et al.* 1995; CHEN *et al.* 1991) und Schwund mitochondrialer DNA (CHEN *et al.* 1991; MARTIN *et al.* 1994).

Stavudin induziert eine vergleichbare konzentrationsabhängige Abnahme der mitochondrialen DNA, benötigt dazu aber geringere Dosen als Zidovudin (MARTIN *et al.* 1994; CUI *et al.* 1997). Die benötigte Konzentration an Stavudin, um in CEM-Zellen den mitochondrialen DNA-Gehalt um 50 % zu senken, beträgt 3 μM , bei Zidovudin beträgt sie 19 μM (MARTIN *et al.* 1994). Die größere Wahrscheinlichkeit für mitochondriale Toxizität durch Stavudin spiegelt die stärkere Wirkung von StavudinTP, verglichen mit ZidovudinTP, auf die Polymerase- γ wider (MARTIN *et al.* 1994).

Deoxycytidinanaloga Zalcitabin (ddC) und Lamivudin (3TC)

Zalcitabin hat sich in Untersuchungen (Starnes & Cheng 1987) als ein potenter Hemmstoff der DNA-Polymerase γ herausgestellt. Hauptsächlich beruht seine Toxizität auf dem Triphosphat-Rest und dessen Fähigkeit, Polymeraseaktivitäten zu blockieren (Chen & Cheng 1992). CUI *et al.* (1997) fanden heraus, dass Zalcitabin den mitochondrialen DNA-Gehalt in Zellkulturen signifikant reduzieren kann. Dieselbe Studie fand heraus, dass in isolierten Mitochondrien zwar Zalcitabin-MP-Derivate vorkommen, aber keine TP-Derivate. Das legt die Vermutung nahe, dass Zalcitabin-TP im Cytoplasma gebildet und in das Mitochondrium transportiert wird, wo es durch die Polymerase γ in die mitochondriale DNA eingebaut wird. Ebenso fanden ROSSI *et al.* (1999) heraus, dass die Zalcitabin-Liponukleotide bevorzugt in die Mitochondrien geschleust werden und so als Reservoir für phosphoryliertes Zalcitabin dienen können.

KUKHANOVA *et al.* (1996) stellten fest, dass Zalcitabin die mitochondriale DNA-Polymerase γ mehr beeinträchtigt als sein eigentliches Ziel HIV-Reverse Transkriptase, was die schlechte Verträglichkeit von Zalcitabin erklären würde. Klinische Studien (MOYLE & SADLER 1998) haben periphere Neuropathie, die ebenfalls bei Didanosin und Stavudin als Nebenwirkung auftritt, als wichtigsten dosislimitierenden Effekt beschrieben.

Lamivudin bewirkt *in vitro* kaum oder gar keine mitochondriale Toxizität (MARTIN *et al.* 1994). Lamivudin-TP hat keinen Effekt und konnte in isolierten Mitochondrien nicht nachgewiesen werden (CUI *et al.* 1997).

2.3.2.2 Purinanaloga

Deoxyadenosinanalogen Didanosin (ddI)

In enzymatischen Untersuchungen (MARTIN *et al.* 1994) an Dideoxyadenosin-TP und Zidovudin-TP zeigte sich, dass beide gleichermaßen Polymerase γ hemmen. Bei Zellen jedoch, die entweder mit Didanosin oder Zidovudin behandelt wurden, zeigte Zidovudin die größere mitochondriale Toxizität (MARTIN *et al.* 1994 ; CHEN *et al.* 1991 ; CUI *et al.* 1997). Annähernd 10 % von Zalcitabin werden in Zalcitabin-TP umgewandelt, während von Didanosin nur ungefähr 3 % in Dideoxyadenosin-TP umgesetzt werden. Retinale Läsionen, dosisabhängige Entzündungen der Bauchspeicheldrüse und periphere Nervenleiden sowie Diabetes und Hypertriglyceridemie werden auf die mitochondriale Toxizität von Didanosin zurückgeführt. Der genaue Mechanismus der durch Didanosin verursachten Bauchspeicheldrüsen-Entzündung ist nicht bekannt, doch wird er auf mitochondriale Toxizität zurückgeführt (PERRY & BALFOUR *et al.* 1996; DASSOPOULOS & EHRENPREIS 1999).

2.3.3 Resistenzentwicklung

Während der asymptomatischen Phase einer unbehandelten HIV-Infektion finden eine fortwährende Replikation in den Lymphknoten und ein rapider Anstieg freier Viren im Plasma und den CD4⁺-Zellen statt (VANDAMME *et al.* 1999; HO *et al.* 1995; WEI *et al.* 1995; WOLTHERS *et al.* 1998). Die relativ stabile Viruslast und CD4⁺-Zellzahl im peripheren Blut ist das Ergebnis eines dynamischen Gleichgewichts. Dieses wird durch die tägliche Produktion von 10⁸ bis 10¹⁰ Virionen sowie das Einfangen und Zerstören von 10⁹ CD4⁺-Zellen auf der einen Seite und der täglichen Neuproduktion der CD4⁺-Zellen, verbunden mit einer Elimination der Viren, auf der anderen Seite erreicht.

Da die Mutationsrate von HIV, mangels Korrekturlesefunktion der Reversen Transkriptase, bei 10^{-4} bis 10^{-5} Fehleinbauten pro Base, pro Strang, pro Replikationszyklus liegt, ist jede Base des HIV-Genoms anfällig für eine Mutation (DOMINGO *et al.* 1997).

Aufgrund der Dynamik des HIV-Replikationszyklusses wird ein existierendes Virus mit einer einzigen Punktmutation und einer geringeren Sensitivität gegenüber HIV-Arzneimitteln zum vorherrschenden Genotyp, wenn die Virusreplikation dem Selektionsdruck dieses Medikaments ausgesetzt ist.

Die Zeit, die für diese Verschiebung in der Quasispezies HIV benötigt wird, ist abhängig von Faktoren, wie

- Mutationsfrequenz zum Zeitpunkt des Therapiebeginns,
- Fitness der Mutante,
- Ausmaß des Selektionsdrucks durch den Wirkstoff.

Diese Faktoren können von Patient zu Patient unterschiedlich sein (DE JONG *et al.* 1996), so kann zum Beispiel die Mutante M184V unter einer Lamivudin-Monotherapie bei Patienten innerhalb von zwei Wochen entstehen (SCHUURMAN *et al.* 1995).

Statistisch betrachtet ist es unwahrscheinlich, dass drei oder mehr Resistenzmutationen in einem Virus aus dem ursprünglichen Schwarm auftreten. Findet also nicht wenigstens eine Restreplikationsaktivität unter dem Selektionsdruck des Arzneistoffes statt, kann sich die Mutante nicht halten. Die Restreplikation, die sich während einer Behandlung abspielt, ist ein weiterer Faktor für die Zeit, die benötigt wird, um eine Resistenz zu entwickeln. Jede Restreplikation resultiert in einer allmählichen Ausprägung einer Mutation nach der anderen, was letztendlich zu einer *high-level*-Resistenz gegenüber den HIV-Medikamenten führt. Davon sind sowohl Monotherapien als auch Kombinationstherapien betroffen.

Diese *high-level*-Resistenz entwickelt sich langsamer, wenn mehrere Mutationen für die Resistenzentwicklung nötig sind und wenn die Restreplikation aufgrund einer höheren Potenz der Arzneistoffe geringer ist (VANDAMME *et al.* 1999).

Die Reverse Transkriptase ist ein Heterodimer, bestehend aus zwei Untereinheiten: p66 und p51. Da die nukleosidanalogen Reverse Transkriptase Hemmer mit den endogenen deoxynukleosidanalogen Triphosphaten (dNTP) um den Einbau in dem entstehenden proviralen Strang konkurrieren, müssen sie an den Enzym-Template-Primer-Komplex binden, der sich an der katalytischen Seite befindet. Die natürlichen Substrate (dNTPs) haben eine höhere Affinität für diesen Komplex.

Die meisten Resistenzmutationen scheinen die enzymatische Spezifität für natürliches dNTP zu steigern, wobei die Sensibilität der Reversen Transkriptase gegenüber ddNTPs (dideoxynukleosidanalogen Triphosphaten) gesenkt wird

(TANTILLO *et al.* 1994; ARTS & WAINBERG 1996). Dieser Mechanismus kann zum Teil als Erklärung für die in einigen Mutanten beobachtete Entwicklung von Kreuzresistenzen gegenüber NRTHs dienen (WILSON *et al.* 1996; GU *et al.* 1994; MAYERS *et al.* 1994).

Reverse Transkriptase ist aufgrund der fehlenden 3'-Exonuklease nicht in der Lage, Sequenzfehler beim Einbau der NRTHs zu erkennen, verfügt aber über den Mechanismus der Pyrophosphorolyse. Bei der Pyrophosphorolyse werden die eingebauten Triphosphat-Derivate der NRTHs aus dem Strang entfernt, was zu einem ungeblockten DNA-Strang führt, dessen Synthese ungehindert fortgesetzt werden kann (GÖTTE *et al.* 2000).

Biochemische Studien bieten einen Anhaltspunkt dafür, dass die Resistenzmutationen sowohl

1. die Einbaueffizienz der NRTH-TP Formen senken können

und

2. deren Ausbau aus dem entstehenden proviralen DNA-Strang fördern (SHARMA *et al.* 2004).

1.

Die meisten Resistenzmutationen die mit anderen NRTHs als Zidovudin assoziiert sind, beruhen auf einem Mechanismus, bei dem der Erwerb der Mutation den Einbau der Nukleosidanaloga in die DNA stört.

Eine Resistenz gegenüber Lamivudin zum Beispiel ist höchstwahrscheinlich mit einer räumlichen, strukturellen Veränderung verbunden, die sowohl das Anbinden von Lamivudin (FENG & ANDERSON 1999; WILSON *et al.* 1996) als auch dessen Einbau in den Strang verhindert (KREBS *et al.* 1997).

2.

ARION *et al.* (1998) und GÖTTE *et al.* (2000) berichteten, dass Zidovudin-Resistenzmutationen zu einer erhöhten Ausmerzungen von Zidovudin aus dem entstehenden Strang durch Pyrophosphorolyse führt. Diese Beobachtungen konnten jedoch nicht durch andere Arbeitsgruppen unterstützt werden (CARROLL *et al.* 1994; MEYER *et al.* 1999).

Neuere Studien zeigen, dass Zidovudinresistente Enzyme den geblockten DNA-Strang „befreien“ können, indem sie, in einer der Pyrophosphorolyse ähnlichen Reaktion, Zidovudin zu einem anderen Nukleosidtriphosphat umformen. Meistens ist dieses *in vivo* ATP (GÖTTE *et al.* 2000).

Einige Medikamente benötigen nur eine Mutation, um ihre antivirale Wirkung zu verlieren, andere dagegen werden nur inaktiv, wenn mehrere Mutationen vorliegen.

Wird zum Beispiel Methionin durch Valin am Codon 184 des *pol*-Genes (Reverse Transkriptase) ausgetauscht, führt das zu einer Resistenz gegenüber Emtricitabin und Lamivudin (SCHUURMAN *et al.* 1995; GAO *et al.* 2000). Zidovudin und Stavudin dagegen benötigen drei oder mehr Mutationen ([M41L, L210W und T215Y] oder [D67N, K70R, T215F, K219Q/E *]) (MARCELIN *et al.* 2004), die als Thymidinanaloge Mutationen (TAMs) bezeichnet werden (SAMUEL *et al.* 2006). Zur Systematik der Mutationen siehe Fußnote.

NRTH-Mutationen im *pol*-Gen tendieren in ihrer Funktion zu einer Verminderung des Einbaus von NRTHs bzw. in einer erhöhten Entfernung der bereits eingebauten NRTHs aus dem entstehenden proviralen DNA-Strang.

M184V* blockiert den Einbau von Lamivudin und Emtricitabin aus dem entstehenden Strang, der Q151M-Komplex behindert die Anbindung der meisten NRTHs an Reverse Transkriptase. Lamivudin und Tenofovir bilden dabei eine Ausnahme (IVERSEN *et al.* 1996; KOSALARAKSA *et al.* 1999; FENG *et al.* 2006). Die Mutation K65R kann auftreten, wenn Patienten Abacavir oder Tenofovir erhalten und verursacht eine Blockade des Einbaus der meisten NRTHs mit Ausnahme von Zidovudin (WHITE *et al.* 2005).

Die TAMs erhöhen die Entfernung der NRTHs aus dem DNA-Strang und weisen eine breite Kreuzreaktivität mit anderen NRTHs auf.

Die Mutationen M184V und K65R vermindern die Fähigkeit von Reverse Transkriptase, die schon eingebauten NRTHs aus dem Strang zu entfernen und können damit möglicherweise die Effizienz von Zidovudin erhöhen (LARDER & KEMP 1989; PICARD *et al.* 2001).

***Beispiel M184V** entspricht: Ausgangsaminosäure X – Codon - veränderte Aminosäure Y
Abkürzungen der Aminosäuren: **D**, Asparaginsäure; **E**, Glutaminsäure; **F**, Phenylalanin; **K**, Lysin; **M**, Methionin; **N**, Asparagin; **Q**, Glutamin; **R**, Arginin; **T**, Threonin; **V**, Valin; **W**, Tryptophan; **Y**, Tyrosin; **L**, Leucin

2.3.4 Interaktionen und Wechselwirkungen

Die NRTTHs können miteinander um gemeinsame Phosphorylierungsschritte konkurrieren, so wie z. B. Zidovudin mit Stavudin oder Zalcitabin mit Lamivudin. Durch Manipulationen des zelleigenen Nukleosidpools, wie es mit Hydroxyurea, Methotrexat und Mycophenolsäure beobachtet werden kann, können die NRTTHs ebenfalls beeinflusst werden (MARGOLIS *et al.* 1999).

Während bestimmte NRTTHs als Einzelpräparat eine geringere Effektivität besitzen, können andere in Kombination pharmakologische Antagonisten sein. Verschiedene NRTTH-Kombinationen, z. B. Zidovudin-Stavudin, Zidovudin-Lamivudin und Zalcitabin-Lamivudin, sind bekannt für ihre intrazellulären Interaktionen (VEAL & BACK 1995; HO & HITCHCOCK 1989, TURRIZIANI *et al.* 1995).

Da Zidovudin und Stavudin über die gleichen metabolischen Wege phosphoryliert werden, sorgt die höhere Affinität von Zidovudin als Substrat für TK1 für eine Beeinträchtigung der Stavudin-Phosphorylierung. Jedes phosphorylierte Stavudin wird jedoch mit der Umsetzung von Zidovudin-MP zu Zidovudin-DP interferieren, da Zidovudin die Umsetzungsrate von Thymidilatkinase und damit seine eigenen Metabolismus hemmt.

Folglich wird bei einer Kombination dieser Präparate Zidovudin, als Substrat mit der höheren Affinität, die Phosphorylierung von Stavudin blockieren; jedes phosphorylierte Stavudin wird jedoch mit der Umsetzung von Zidovudin-MP zu Zidovudin-DP interferieren (STEIN & MOORE *et al.* 2001), wenn auch nur leicht (HO & HITCHCOCK 1989; LAVIE *et al.* 1997).

Klinische Tests bestätigten die antagonistische Wirkung dieser beiden Medikamente. Patienten, denen beide Präparate in Kombination verabreicht wurden, hatten deutlich schlechtere virologische und immunologische Werte als Patienten, die nur eines der beiden Präparate erhalten hatten (HAVLIR *et al.* 2000).

In Kombinationsstudien zu Zidovudin und Lamivudin konnte keinerlei Effekt von Lamivudin auf die Phosphorylierung von Zidovudin festgestellt werden. Es wurde jedoch vermutet, dass Zidovudin in einer Konzentration von 100 μM die Produktion von Lamivudin-TP verringert (KEWN *et al.* 1997). Zusätzlich hat sich diese Kombination in klinischen Tests als synergistisch erwiesen (STEIN & MOORE 2001).

Eine Kombination dieser beiden Substanzen wird daher nicht empfohlen (FACHINFORMATION, RETROVIR 2008).

VEAL *et al.* (1994) gaben in einer Studie an, dass weder Zalcitabin noch Didanosin die Phosphorylierung von Zidovudin beeinflussen. Eine neuere Untersuchung von BISHOP *et al.* (2004) an trächtigen Mäusen ergab jedoch, dass es bei gleichzeitiger Exposition mit Zidovudin und Didanosin während der Schwangerschaft und Laktationsperiode zu einem Anstieg chromosomaler Schäden bei den Nachkommen kommen kann.

Stavudin und Lamivudin beeinflussen sich in keiner Weise in ihren Phosphorylierungen (BALFOUR *et al.* 1998).

Andere Arzneimittel können ebenfalls mit der Phosphorylierung der NRTHs interferieren, so z. B. Ribavirin (HOGGARD *et al.* 1995; HOGGARD *et al.* 1996; VOGT *et al.* 1987; BALZARINI *et al.* 1990; VAN DYKE *et al.* 1998), Methotraxat (AHLUWALIA *et al.* 1996; TOSI *et al.* 1992) und Doxorubicin (VEAL *et al.* 1995).

Bei Ribavirin, einem Guanodin-Analogon, wird vermutet, dass es die antiretrovirale Effizienz von Didanosin steigert.

Vorangegangene *in-vitro*-Studien hatten gezeigt, dass Ribavirin die antivirale Wirkung sowohl von Didanosin als auch von anderen Purinnukleosid-Analoga steigert (BABA *et al.* 1987). Klinische Tests einer Kombination von Didanosin mit Ribavirin, im Gegensatz zu einer Didanosin-Einzeltherapie, zeigten jedoch nur eine geringe Wirkung. Ribavirin verursachte außerdem einen signifikanten Abfall der CD4⁺-Lymphozytenzahl (STEIN & MOORE 2001; JAPOUR *et al.* 1996).

In-vitro-Studien zu Ribavirin mit Zidovudin oder Stavudin zeigten, dass Ribavirin die Phosphorylierung von Zidovudin bzw. Stavudin hemmt, indem es den Deoxynukleosidtriphosphatpool (dNTP) anhebt (HOGGARD *et al.* 1997; VOGT *et al.* 1987).

Doxorubicin hemmt die Phosphorylierung von Zalcitabin und Zidovudin (VEAL *et al.* 1995; HOGGARD *et al.* 1995).

Die gleichzeitige Anwendung von Zidovudin und Rifampicin sollte vermieden werden, da eine Kombination die AUC (Fläche unter der Plasma-Konzentrations-Zeit-Kurve) von Zidovudin senken kann (48 % ± 34 %), was einen Verlust der Wirksamkeit von Zidovudin zur Folge hätte. Probenecid wiederum erhöht die AUC von Zidovudin um 106% (Streuung 100 bis 170%), was das Risiko für hämatologische Toxizität erhöht (FACHINFORMATION, RETROVIR 2008).

Das Risiko von Nebenwirkungen durch Zidovudin kann ansteigen, wenn gleichzeitig potenziell nephrotoxische oder knochenmarkschädigende Arzneimittel, insbesondere in einer Akuttherapie, angewendet werden. Dazu gehören u. a. systemisch angewendetes Pentamidin, Co-trimoxazol, Ganciclovir, Interferon, Vincristin und Doxorubicin (FACHINFORMATION, RETROVIR 2008).

5-Fluorouracil kann *in vitro* die antivirale Aktivität von Stavudin und Zidovudin steigern, indem es den dNTP-Pool senkt (GAO *et al.* 1999).

Hydroxyurea, ein Ribonukleotidreduktase Hemmer (YARBRO 1992), vermindert den dNTP-Pool und steigert gleichzeitig die ddNTP:dNTP-Ratio. Eine Verminderung des dNTP-Pools kann zu einer Hochregulierung zellulärer Kinasen führen, was wiederum in einer vermehrten Phosphorylierung von NRTHs führt (BACK *et al.* 1998).

In-vitro-Studien zeigten, dass die Phosphorylierung von Stavudin, Zidovudin und Lamivudin gesteigert werden kann, wenn diese Substanzen mit Hydroxyurea kombiniert werden. Allerdings gibt es *in vitro* auch Anhaltspunkte dafür, dass Hydroxyurea die Mutationsraten anheben kann, was zu einer Ausprägung von Resistenzen führen könnte (JULIAS & PATHAK 1998).

Für Didanosin sind die Ergebnisse bezüglich einer Steigerung der Phosphorylierungsrate widersprüchlich (AHLUWALIA *et al.* 1996; BACK *et al.* 1998; PALMER & COX 1997; GIACCA *et al.* 1996; GAO *et al.* 1995; RANA *et al.* 1999).

Neuere Studien berichteten von einer Potenzierung der antiretroviralen Aktivität von Abacavir, einem Guanosinanalogen, das sich antagonistisch zu Zidovudin und Stavudin verhält (MARGOLIS *et al.* 1999; CHAPUIS *et al.* 2000; SCHIMURA & LEVY 1995).

Laut FACHINFORMATION (EPIVIR 2007) sollte Lamivudin in Kombination mit hohen Dosen Co-trimoxazol zur Behandlung von *Pneumocystis-carinii*-Pneumonie und Toxoplasmose vermeiden werden.

Die Möglichkeit von Wechselwirkungen mit anderen gleichzeitig angewandten Arzneimitteln besteht vermehrt dann, wenn diese durch aktive Nierensekretion über das Transportsystem für organische Kationen ausgeschieden werden, wie z.B. Trimethoprim (FACHINFORMATION, EPIVIR 2007).

Lamivudin und Zalcitabin werden in Kombination nicht empfohlen, da Lamivudin die Phosphorylierung von Zalcitabin hemmt (FACHINFORMATION, EPIVIR 2007, FACHINFORMATION, HIVID 2004).

Zalcitabin sollte nicht mit Arzneimitteln gemeinsam verabreicht werden, die im Verdacht stehen periphere Neuropathie verursachen zu können; das sind außer den antiretroviralen Nucleosidanaloga unter anderem: Chloramphenicol, Ribavirin und Vincristin. Amphotericin B und Foscarnet stehen ebenfalls in diesem Verdacht, da sie die renale Clearance von Zalcitabin beeinflussen und damit die systemische Verfügbarkeit erhöhen.

Arzneimittel wie Pentadimin, die im möglicherweise Pankreatitis verursachen können, sollten nicht gemeinsam mit Zalcitabin verabreicht werden.

Die gleichzeitige Anwendung von Probenecid, Cimetidin oder Trimethoprim mit Zalcitabin führt, wahrscheinlich bedingt durch eine Inhibition der renalen tubulären Sekretion, zu einer verminderten Ausscheidung von Zalcitabin.

Die Einnahme Magnesium-/Aluminiumhaltiger Antazida kann die Resorption von Zalcitabin vermindern (25 %), daher sollte eine Kombination vermieden werden. Bei gleichzeitiger Verabreichung mit Metoclopramid kann die Bioverfügbarkeit von Zalcitabin herabgesetzt werden (10 %) (FACHINFORMATION, HIVID 2004).

Die gleichzeitige Anwendung von Didanosin und Tenofovir, einem nucleotidanalogen Reverse Transkriptase Hemmer, führt zu einem Anstieg der systemischen Exposition von Didanosin um 40 – 60 %, wodurch sich das Risiko

für durch Didanosin bedingte Nebenwirkungen erhöhen könnte. Eine Reduzierung der Didanosindosis kann jedoch zu einer hohen Rate an virologischem Versagen führen und schon in einem frühen Stadium das Auftreten von Resistenzen begünstigen. Eine Kombination dieser beiden Präparate ist also nicht zu empfehlen (FACHINFORMATION, VIDEX 2008).

Die Kombination mit Allopurinol führt ebenfalls zu einer erhöhten systemischen Exposition von Didanosin, wodurch in diesem Fall eine Didanosin-assoziierte Toxizität auftreten kann. Das gleiche gilt für Ganciclovir und Valganciclovir.

Die Kombination von Didanosin mit Stavudin und Hydroxycarbamid kann zu Pankreatitis, peripherer Neuropathie, Hepatotoxizität und Leberversagen mit tödlichem Ausgang führen (FACHINFORMATION, VIDEX 2008; FACHINFORMATION, ZERIT 2007).

3 Experimenteller Teil

3.1 Material

3.1.1 Prüfmateriale

Die Untersuchungen wurden an Bruteier von *Gallus gallus domesticus* der Rasse *White Leghorn, strain Lohmann Selected Leghorn (LSL)* (durchschnittliches Eigewicht 65g ± 5g) durchgeführt. Bezogen wurden sie am Ablagetag vom Geflügelzuchtbetrieb Gudendorf in 49577 Anklam.

Bis zum Einlegetag wurden sie aufrecht stehend bei Kühlschranktemperatur gelagert.

3.1.2 Prüfsubstanzen

Substanz	Code	CAS-Nr.	Darreichungsform	Hersteller	Diskussion, Seite
Zidovudin	AZT	305116-87-1	Retrovir® Injektionslösungs-konzentrat 10 mg/ml	GlaxoSmithKline	
Stavudin	d4T	3056-17-5	Zerit® 40 mg Hartkapseln	Bristol-Myers Squibb	
Lamivudin	3TC	134678-17-4	+ Epivir® 10 mg/ml Lösung zum Einnehmen + Epivir® 300 mg Filmtablette	GlaxoSmithKline	
Zalcitabin	ddC	7481-89-2	Reinsubstanz	Sigma-Aldrich	
Didanosin	ddI	69655-05-6	Videx®-Pulver	Bristol-Myers Squibb	
Cyclophosphamid	CP	50-18-0	Endoxan® 100 mg Injektionsflasche Trockensubstanz	Baxter	

3.1.3 Geräte

Inkubation

- Kleinmotorbrüter, Typ KMB 6 und KMB 2 der Firma Ehret Apparatebau GmbH, Emmendingen
- Quecksilberdampfschierlampe der Firma K. Blohm Apparatebau, Hamburg

Aufbereitung der Prüfsubstanzen und Beimpfung

- Tischzentrifuge UNIVERSAL der Firma Hettich Zentrifugen, Tuttlingen
- Vortexer REAX 2000 der Firma Heidolph, Kelheim
- Multipette® plus der Firma Eppendorf, Hamburg

Blutentnahme und Auswertung

- Schwanenhalslampe KL1500 der Firma Schott, Wiesbaden
- Mikroskop BX 60 der Firma Olympus, Hamburg
- Mikroskop Axioplan der Firma Zeiss, Oberkochen

3.1.4 Programme

Datenauswertung, Bildbearbeitung und Schreibearbeit

- Microsoft Excel2000
- SPSS® 14.0
- SigmaPlot® 9.0
- Adobe® Photoshop® CS2 Version 9.0
- ACD/ ChemSketch Freeware
- Microsoft Word

3.2 Methode

3.2.1 Inkubation

Nach Aussonderung der Eier mit Schalendefekten wurde die Bebrütung spätestens sieben Tage nach Eiablage begonnen. Bis zu diesem Zeitpunkt wurden die Eier bei 8 – 10 °C gelagert. Die Bebrütung erfolgte unter optimierten Bedingungen in Klein-motorbrütern (KMB2/ KMB6, Ehret Apparatebau GmbH, Emmendingen) mit kontinuierlicher Luftumwälzung bei 37,5 °C ($\pm 0,5$ °C) und einer relativen Luftfeuchtigkeit von 75 % ($\pm 7,5$ %). Bis zur Applikation der Testsubstanzen wurden die Eier im Brüter auf Rollentablets horizontal gelagert und, schaltuhrgesteuert, alle drei Stunden gewendet. Vitalität und Entwicklungsstand wurden in regelmäßigen Abständen per Durchleuchtung (Quecksilberdampfschierlampe der Fa. K. Blohm Apparatebau, Hamburg) überprüft.

Vor Applikation der Prüfsubstanzen wurden die Eier, mit dem spitzen Eipol nach unten weisend, in Vertikallage gebracht. Der Zeitpunkt der Substanzapplikation(en) war variabel zwischen dem achten (d8, 192 Std. ± 1 Std.), neunten (d9, 216 Std. ± 1 Std.) und zehnten (d10, 240 Std. ± 1 Std.) Tag nach Bebrütungsbeginn (d = day). Die Probenentnahme fand an statt d11 (Gesamtbebrütungsdauer: 10 Tage, 19 Stunden ± 1 Std.).

3.2.2 Applikation der Prüfsubstanzen über die Luftkammer

Unter Zuhilfenahme einer Feinpinzette wurde in die Eier am stumpfen Pol ein kleines Fenster eröffnet, ohne dabei die innere Eihaut zu verletzen. Die Prüfsubstanzen wurden in gelöster Form mittels Eppendorf Multipipette® plus oder Tuberkulinspritze (1 ml, Lauer; Kanüle: 0,4 x 21 mm) auf die innere Eihaut aufgebracht. Nach Verteilung der Lösung mittels manueller Rollbewegung wurde die Öffnung mit Tesafilm® verschlossen, und die Eier in vertikaler Position weiter inkubiert.

Mittels der Quecksilberdampfampe (s. o.) konnte der Zustand und die Vitalität des Embryos kontrolliert werden.



Abb. 3.1: Applikation der Prüfsubstanz über die Luftkammer.

3.2.3 Blutentnahme

Die Probenentnahmen und damit der Abschluss des Versuchs fanden an d11 statt. Als Zugang zum extraembryonalen Blutgefäßsystem diente die bei der Beimpfung angefertigte Öffnung. Um die Entfernung der inneren Eimembran in der Luftkammer zu erleichtern, wurde für mindestens 3 Minuten physiologische Kochsalzlösung aufgebracht, die dann, kurz vor der Blutentnahme, entfernt wurde. Nach Erweiterung der Öffnung und Entfernung der inneren Eimembran

wurde ein Bereich der CAM gewählt, der wenig von Gefäßen durchzogen war, so dass ein Einschnitt in die Membran keine übermäßigen Hämorrhagien auslöste. Durch die entstandene Öffnung ergab sich ein Zugang zur *Arteria umbilicalis*. Diese wurde vorsichtig, unter Zuhilfenahme einer gebogenen Pinzette, aus dem Ei gehoben und als Schlinge über einen Kunststoffstreifen (hier ein pH-Messstreifen) gelegt, der dann quer über den Schalenrand gelegt wurde. Nach Entfernung von Geweberesten und anhaftenden Flüssigkeiten wurde das Blutgefäß punktiert. Das erste austretende Blut wurde verworfen, die nächsten Tropfen mittels Pipette als Probe aufgefangen. Pro Ei wurden auf drei Objektträgern (Glasobjektträger, 76 x 26 mm, von Omnilab) jeweils 5 µl Blut ausgestrichen.



Abb. 3.2: Eröffnetes Ei mit Blick auf die *Arteria umbilicalis* (Pfeil). Die Punktion der Arterie erfolgte kurz vor der Gabelung.

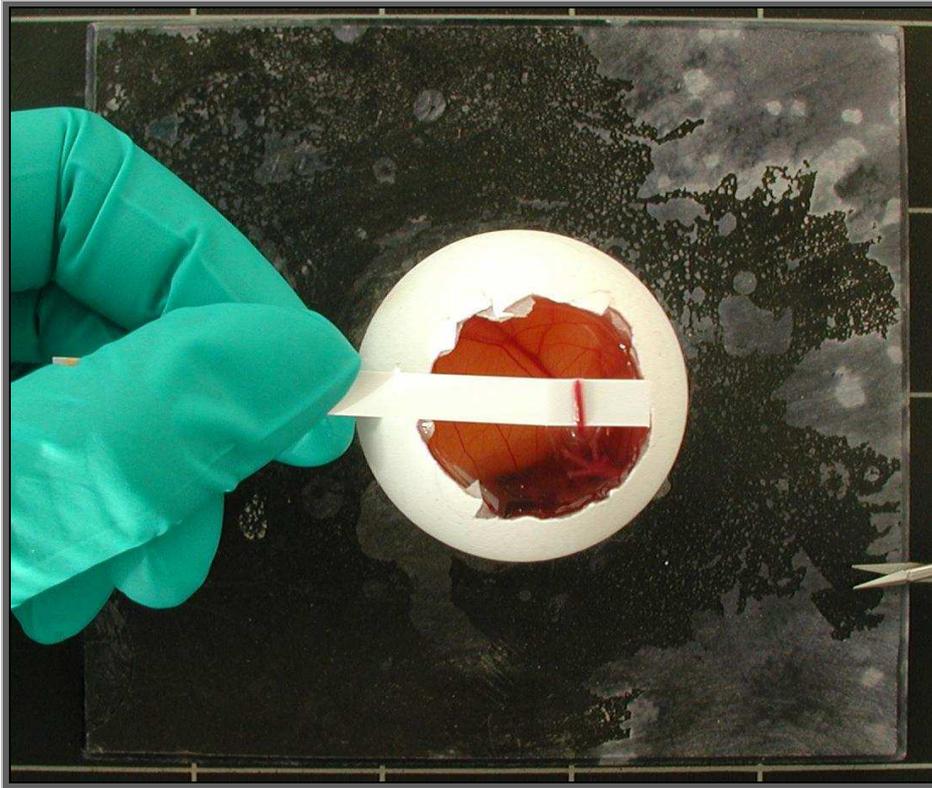


Abb. 3.3: Die *Arteria umbilicalis* über einen pH-Messstreifen gelegt.



Abb. 3.4: Punktion und Blutentnahme.

3.2.4 Blutausstrichpräparate

Panoptische May-Grünwald-GIEMSA (MGG-) Färbung

Die in der Humanhämatologie üblicherweise zur Anwendung kommende panoptische Färbung nach Pappenheim (siehe z. B. RICK, 1977) wurde hinsichtlich der Verwendung der Puffer und der Einwirkzeiten modifiziert, um Färbeergebnisse zu erzielen, die eine eindeutige Identifizierung der vorhandenen Zelltypen und Entwicklungsstufen ermöglichen.

Die luftgetrockneten Ausstrichpräparate wurden unter Verwendung einer Färbekbank zunächst mit filtrierter May-Grünwald-Lösung (Eosin-Methylenblau-Lösung, modifiziert für die Mikroskopie, Merck 1424) fixiert und gefärbt. Nach drei Minuten wurde Dinatriumcitrat/NaOH-Puffer (pH 5,2; 0,1 M) überschichtet, der nach Sichtbarwerden eines Metallschimmers, spätestens aber nach fünf Minuten, mit destilliertem Wasser abgespült wurde. Nachdem alle sichtbaren Farbniederschläge abgespült worden waren, wurden die Objektträger mit verdünnter und ebenfalls filtrierter GIEMSA-Lösung überschichtet. Nach zwanzig Minuten wurde wieder gründlich mit destilliertem Wasser nachgespült, die Farbreste unter den Objektträgern entfernt und die Präparate, nach vorsichtigem Trocknen mit Zellstoff, an der Luft nachgetrocknet. Nach einem Tag wurden sie für weitere zwanzig Minuten in ein Xylol-Bad gegeben, um anschließend, nach längerer Trocknung, mit Deckgläsern (ungeschliffen, 24 x 40 mm, von Omnilab) und DePex® (Serva) eingedeckt zu werden.

3.2.5 Auswertung („Scoring“) der Blutausstrichpräparate

Die gefärbten Ausstriche wurden unter Durchlicht-Hellfeld-Beleuchtung an einem Olympus BX60 Mikroskop mit einem 100x-Objektiv untersucht.

Die Klassifikation der Zellen erfolgte nach einem Schema, das in Tabelle 3.1 dargestellt ist. Das Schema beruht auf der Arbeit von WOLF (2003).

Die Laufrichtung der Zählung verlief mäanderförmig von links nach rechts. Berücksichtigt wurden ausschließlich freiliegende intakte Erythrocyten im Auszählungsfeld, in deren Nähe keine Farbniederschläge zu erkennen waren.

Pro Objektträger wurden 1000 Zellen gezählt.

Da die in dieser Arbeit gewonnenen Daten nicht parametrisch verteilt und die Stichproben zudem recht klein sind, wurde für die statistische Auswertung der parameterfreier Mann-Whitney-U-Test, als statistischer Test für kleine Stichproben, herangezogen.

Tab. 3.1: Merkmale zur Differenzierung der Zellen in peripheren Blutausstrichpräparaten (May-Grünwald-GIEMSA-Färbung) (Quelle: WOLF 2003).

	Erythroblasten	E II-PCE _{früh}	E II-PCE _{mittel}	E II-PCE _{spät}	E II-NCE	E I
Form und Fläche der Zelle	morphologisch noch nicht differenzierte Zellen; größer als die übrigen, im Ausstrich vorhandenen Zellen; unregelmäßige äußere Form	rund, z.T. mit Unregelmäßigkeiten	rund bis oval	oval	oval (wie E II-PCEs _{spät})	kreisrund
Anfärbbarkeit des Cytoplasmas	basophil	basophil bis polychromatisch	polychromatisch	poly- bis normochromatisch	acidophil/normochromatisch	streng acidophil
Nucleus-Cytoplasmaverhältnis	>>> 1; größtes Nucleus-Cytoplasmaverhältnis aller im Ausstrich vorhandenen Zellen	≥ 1	ca. 1:1	< 1	<< 1; niedrigstes Nucleus-Cytoplasmaverhältnis aller E II-Zellen	<<< 1; kleinstes Nucleus-Cytoplasmaverhältnis aller im Ausstrich vorhandenen Zellen
Form des Nucleus	sehr unregelmäßig; häufig, besonders in jüngeren Stadien, gelappt	rund	rund	rund	rund	rund, mit leicht buchtigen Ausformungen
Position des Nucleus	unterschiedlich; der Nucleus füllt einen großen Teil der Zelle aus	häufig exzentrisch	zentral	zentral	zentral	zentral
Kern-/Chromatinstruktur, Anfärbbarkeit	feinmaschig bis homogen, basophil; Cytoplasma häufig ähnlich basophil wie der Kern, dann nur schwache Abgrenzung zwischen Cytoplasma und Nucleus	sehr dicht, gröbere Struktur des Chromatins	ähnlich E II-PCE _{früh}	beginnend pyknotisch	pyknotisch, streng basophil	dicht, nicht völlig homogen, streng basophil
Weitere Merkmale	unter normalen Bedingungen extrem selten im peripheren Blut	frühe unreife periphere Form in unbehandelten Eiern				

3.2.6 Selbstkalibrierung

Um die Schwankungsbreite der Ergebnisse zu ermitteln, die entstehen können, wenn man unterschiedliche Mikroskope benutzt, oder die untersuchenden Personen über ein unterschiedliches Erfahrungsspektrum im Auszählen von Erythrocyten verfügen, wurde eine Selbstkalibrierung vorgenommen. Ebenso sollten die Schwankungen innerhalb der Auszählung einer einzelnen Person ermittelt werden.

Zu diesem Zweck wurden gleiche Präparate durch zwei verschiedene Personen an zwei unterschiedlichen Mikroskopen untersucht. Die in Auszählung und Differenzierung erfahrene Untersucherin benutzte das im hiesigen Labor standardmäßig verwendete Mikroskop Olympus BX60, die ungeübte Untersucherin benutzte ein Axioplan Mikroskop von Zeiss. Die ungeübte Untersucherin mikroskopierte im Anschluss an die erste Auszählung ein weiteres Mal.

Als Präparate dienten die positive (CP; 0,05 mg/ 0,1 ml/Ei) und negative Kontrolle (H₂O bidest; 1 ml/Ei) des Versuchs AZT/ddI-3, deren Anfertigung den üblichen Prozeduren von Beimpfung, Blutentnahme und Färbung unterlag. Pro Objektträger wurden 1000 Zellen gezählt, 10 Objektträger pro Gruppe.

Verglichen wurden dann die Ergebnisse der geübten Untersucherin mit dem Olympus BX60 mit denen der ungeübten Untersucherin am Zeiss Axioplan Mikroskop, sowie die erste und zweite Auszählung der Präparate durch die ungeübte Untersucherin.

3.2.7 HET-MN-Standard Operating procedure (SOP)

Micronuclei	Micronuclei sind kleine Kerne in der betroffenen Zelle, die zusätzlich zum Hauptkern während der Mitose durch zurückgebliebene Chromosomenteile oder ganze Chromosomen gebildet werden.
Merkmale	<ul style="list-style-type: none"> • Alle morphologischen Merkmale entsprechen denjenigen des Zellkerns, der MN ist lediglich von geringerem Durchmesser. • MN sind DNA-spezifisch anfärbbar. • Maximaler Durchmesser: ca. 2/3 –3/4 des Hauptkerns. Bei Überschreiten dieser Größe kann die Zelle als hypoploid oder heteronucleiert, binucleiert oder amitotisch klassifiziert werden. • Form: rund bis oval, mit klarer Abgrenzung gegen das Cytoplasma. • Position: Coplanar mit dem Cytoplasma, im Falle einer fehlenden Trennung vom Hauptkern muss eine Einschnürung zwischen beiden Objekten erkennbar sein. Ist dies nicht der Fall, wird die betroffene Zelle als kernaberrant klassifiziert. • Sind mehrere nucleäre Objekte in der Zelle vorhanden, ohne das ein Hauptzellkern erkennbar ist, wird die betreffende Zelle ebenfalls als kernaberrant klassifiziert. <p>(BOLLER & SCHMID 1970; HEDDLE <i>et al.</i> 1983; HEDDLE <i>et al.</i> 1991; MÜLLER & STREFFER 1994; WOLF <i>et al.</i> 2002; WOLF 2003)</p>
Kernaberrationen	Eine Zelle wird als kernaberrant klassifiziert, wenn der Zellkern irregulär geformt ist, und/oder die Zelle mehrere nucleäre Objekte ohne erkennbaren Hauptkern aufweist (WOLF 2003).
Relevante Zelltypen des peripheren Blutes im Untersuchungszeitraum	Kennzeichnung durch vorangestellte Buchstabenkombinationen: „ MN..xx “ kennzeichnet den jeweiligen Zelltyp als micronucleiert (Bsp.: MNE I, MNE II).
E I (primäre Erythrocyten)	Erythrocyten der ersten Generation im Hühnerembryo, kreisrund, mit zentral gelegenen, ebenfalls rundem Kern. Geringeres Cytoplasmaverhältnis als E II; nach d6/d7 ausschließlich normochromatisch (Neubildung sistiert nach d7). Anteil an Erythrocytengesamtpopulation an d11: ca. 5 %.
E II (definitive Erythrocyten)	Erythrocyten aller nachfolgenden Generationen mit gemeinsamen morphologischen Merkmalen. Kommen in verschiedenen Reifungsstadien vor.

NCE (normochromatische Erythrocyten)	Umfassen alle ausgereiften Erythrocyten, einschließlich E I.
PCE (polychromatische Erythrocyten)	Umfassen alle in der Reifung befindlichen Erythrocyten. Zum Zeitpunkt der Blutentnahme (d11) erscheint ausschließlich ein Teil der E II-Population polychromatisch. Polychromatische E I sind zu diesem Zeitpunkt nicht mehr vorhanden. PCE lassen sich in Abhängigkeit vom Reifungsgrad weiter in frühe (PCE _f), mittlere (PCE _m) und späte (PCE _s) unterteilen.
PCE/NCE- Ratio	Verhältnis polychromatischer (junger) Erythrocyten zu normochromatischen (ausgereiften) Erythrocyten als Proliferationsmarker. $r = \frac{\text{[prozentualer Anteil an PCE]}}{\text{[prozentualer Anteil an NCE einschließlich E I]}}$

(aus: WOLF 2003; LUCAS & JAMROZ 1961)

Eier	Fertile <i>Lohman Selected White Leghorn</i> , mindestens fünf überlebende Eier pro Gruppe.									
Brutbedingungen	Brutschrank mit kontinuierlicher Luftumwälzung bei 37,5 °C (± 0,5 °C); relative Luftfeuchtigkeit 17 % (± 7,5 %); horizontale Lagerung, Wenden der Eier alle drei Stunden; ab d7 aufrechte Lagerung mit dem stumpfen Eipol nach oben.									
Solvent/Vehikel	Demineralisiertes Wasser; für lipophile Prüfsubstanzen Isopropylmyristat (IPM, CAS 110-27-0), maximal applizierbares Volumen ≤ 1 ml/kg Eigewicht (entspr. maximal ca. 50 µl /Ei). In begründeten Ausnahmefällen (nach Priorität geordnet): <table border="0"> <tr> <td>1,2-Propandiol in Wasser max.</td> <td>25 % v/v, max.</td> <td>100 µl/Ei</td> </tr> <tr> <td>Ethanol in Wasser max.</td> <td>17 % v/v, max.</td> <td>100 µl/Ei</td> </tr> <tr> <td>Aceton in Wasser max.</td> <td>70 % v/v, max.</td> <td>40 µl/Ei</td> </tr> </table>	1,2-Propandiol in Wasser max.	25 % v/v, max.	100 µl/Ei	Ethanol in Wasser max.	17 % v/v, max.	100 µl/Ei	Aceton in Wasser max.	70 % v/v, max.	40 µl/Ei
1,2-Propandiol in Wasser max.	25 % v/v, max.	100 µl/Ei								
Ethanol in Wasser max.	17 % v/v, max.	100 µl/Ei								
Aceton in Wasser max.	70 % v/v, max.	40 µl/Ei								
Dosierung	Liegt Toxizität vor, so sind an d8 drei Dosierungsstufen zu verwenden. Die Dosierungsstufen sollten den Bereich vom Höchstwert bis zu geringer oder nicht vorhandener Toxizität umfassen. Als Höchstdosis wird diejenige Dosierung angesehen, die zum betreffenden Applikationszeitpunkt eine Absterberate von 60-70 % (TT ₆₀₋₇₀) erzeugt. Ersatzweise wird diejenige Dosis als Höchstdosis definiert, die andere Anzeichen einer Toxizität hervorruft (z. B. cytotoxische Effekte oder eine Senkung der PCE/NCE-Ratio).									
Route	Luftkammer, oder gegebenenfalls Albumen.									
Positivkontrolle	Folgende Substanzen, für die eine ausreichende historische Kontrolle existiert, werden für eine Positivkontrolle empfohlen:									

<p>Negativkontrolle</p>	<p>hydrophile Prüfsubstanzen: Cyclophosphamid, gelöst in <i>Aqua bidest.</i> (CP, CAS 50-18-0)</p> <p>0,05 mg/Ei d8 ac (Air chamber, Luftkammer). Maximales Alter der CP-Lösung (Lagerung bei 8 °C): 8 – 10 Wochen (< 3% Aktivitätsverlust)</p> <p>Lipophile Prüfsubstanzen: 7,12-Cimethyl-benz[a]anthracen (DMBA, CAS 57-97-6), gelöst in Isopropylmyristat (IPM, CAS 110-27-0)</p> <p>0,04 mg/Ei d8 ac. Maximales Alter der DMBA-Lösung (Lagerung bei 8°C): 5 Wochen.</p> <p>Behandlung mit dem Vehikel; Volumen und Zeitpunkt der Applikation orientieren sich am Dosierungsschema der höchsten verabreichten Dosis.</p>
<p>Scoring</p>	<p>Codierte Objektträger; 1000 Erythrocyten pro Ei, ca. 100 – 200 Zellen/ Ei für PCE/NCE-Ratio (in Abhängigkeit von der Fragestellung und Rahmenbedingungen des Versuchs). Alle erythroiden Zellen gehen in die Bewertung ein. Das Ergebnis wird als <i>micronucleierte definitive Erythrocyten (MNE) pro 1000 erythroider Zellen</i> angegeben. Micronucleierte primäre Erythrocyten E I werden erfasst und dokumentiert gehen aber nicht in die Berechnung der MNE-Frequenz ein.</p>
<p>Testvalidität</p>	<p>Negativkontrolle:</p> <ul style="list-style-type: none"> • Die MNE II-Frequenz der mitgeführten Negativkontrolle muss kleiner sein als die der historischen Negativkontrolle plus Standardabweichung (1,7 ‰; Stand März 2007) • UND die Standardabweichung der mitgeführten Negativkontrolle (s. d.) muss geringer sein als 150 % der S.D. der historischen Negativkontrolle (S.D. \leq 1,2; Stand März 2007) <p>Positivkontrolle (obsolet bei eindeutig positivem Ergebnis):</p> <ul style="list-style-type: none"> • die MNE II-Frequenz muss mehr als das 3-fache der Standardabweichung der historischen Negativkontrolle betragen (2,4 ‰; Stand März 2007). Literatur: „[...] gefordert ist ein moderater Anstieg. Beispiel: Bei einer Negativkontrolle 1 – 2 ‰ sollte die Positivkontrolle ca. 10 ‰ nicht übersteigen [...]“ (MAVOURNIN <i>et al.</i> 1990). • Bei vorliegender Positivkontrolle: MNE II-Frequenz muss innerhalb der S.D. der historischen Positivkontrolle liegen (12,4 \pm 5,0; 7,4 – 17,4 ‰ für 0,05 mg CP d8 ac, Stand März 2007). (HAYASHI <i>et al.</i> 1990)
<p>Positivkriterien</p>	<ul style="list-style-type: none"> • Testvalidität ist sichergestellt. • Die MNE II-Frequenz in den Behandlungsgruppen ist biologisch relevant erhöht. • Aufgrund der bisherigen experimentellen Erfahrungen ist die MNE II-Frequenz als relevant erhöht anzusehen, wenn sie – reproduzierbar – mehr als das 3-fache der Standardabweichung der historischen Negativkontrolle (2,4 ‰; Stand März 2007) beträgt. ALTERNATIV IST EINE Dosisabhängigkeit auch im darunter liegenden Wirkungsbereich ein Hinweis auf eine genotoxische Wirkung.

Negativkriterien

Hilfsweise können zur Berechnung der Signifikanz nichtparametrische Verfahren herangezogen werden.

- Testvalidität ist sichergestellt.
- Positivkriterien werden nicht erfüllt.
- In keiner der Behandlungsgruppen ergibt sich eine biologisch relevant erhöhte MNE II-Frequenz:
d8 high, middle und low dose (mit Wiederholungsversuch)
d9 high dose
d10 high dose

Warnhinweise

- reduzierte PCE/NCE- Ratio
- anämische Effekte
- erhöhter Anteil an E I-Erythrocyten
- erhöhtes Auftreten von Zellen in Metaphase (historische Kontrolle, kumulierte Einzeleier: $0,2 \pm 0,5 \text{ ‰}$; Einzelversuche $0,2 \pm 0,3 \text{ ‰}$)
- Auftreten von multinucleierten und heteronucleierten Zellen
- Auftreten von auffälligen großen oder weniger differenzierten Zellen
- Substanzreste auf der Eimembran erkennbar
- ausgeprägte nekrotische Erscheinungen auf der CAM

(aus: WOLF 2003)

4 Ergebnisse

Alle Substanzen der Versuchsreihen wurden, soweit nicht anders erwähnt, an d8 in wässriger Lösung appliziert, die Versuchsauflösung fand an d11 statt. In die Auswertung der Daten gingen nur die Versuchsgruppen ein, für die mindestens 5 Eier ausgewertet werden konnten. Genauere Angaben zu den eingesetzten Eiern in den Dosisgruppen können den einzelnen Versuchstabellen im Anhang entnommen werden.

Als begleitende Negativkontrolle wurde das jeweilige Lösungsmittel verwendet, die begleitenden Positivkontrollen wurden mit 0.05 mg Cyclophosphamid (CP)/Ei behandelt.

Die graphischen Darstellungen der Versuchsreihen finden sich im Diskussionsteil.

4.1 Pyrimidinanaloga

Deoxythymidinanaloga

4.1.1 *Zidovudin (AZT)*

In zwei Dosisfindungsversuchen (AZT-1 und AZT-2) wurde der zu prüfende Dosisbereich eingegrenzt. In diesen Versuchen wurde Zidovudin an d8 als Reinsubstanz (3'-Azido-3'-deoxythymidin, SigmaAldrich) in wässriger Lösung appliziert. Beide Versuche konnten im Weiteren nicht berücksichtigt werden, da Probleme mit der Löslichkeit der Reinsubstanz auftraten.

In den folgenden Versuchen (AZT-3 bis AZT-5) wurde Zidovudin in Form von Retrovir® (Injektionslösung 10 mg/ml) an d8 appliziert (s. Anhang, Tab. AZT-3 bis AZT-5).

In dem Versuch AZT-3 wurde der obere Dosisbereich von 10 mg/Ei bis 20 mg/Ei geprüft. Während bei 10 mg/Ei die Viabilität noch nicht beeinträchtigt war, lag sie bei 15 mg/Ei bei 80 %. Von einer Auszählung der dritten Dosisgruppe (20 mg/Ei) wurde abgesehen, da die Micronucleusfrequenz bei 15 mg/Ei schon bei $30.5\% \pm 9.9$ lag.

Im darauf folgenden Versuch AZT-4 wurde der Dosisbereich von 0.5 mg/Ei bis 10 mg/Ei überprüft (s. Anhang, Tab. AZT-4). Die Viabilität lag, bis auf die Dosisgruppe 1 mg/Ei (Viabilität 86 %), durchgehend bei 100 %. Die Auswertung der Daten zeigt einen dosisabhängigen Anstieg der Micronucleusfrequenz mit einem Wert von $2.8\% \pm 2.1$ bei der niedrigsten getesteten Dosisgruppe und $33.2\% \pm 6.4$ bei der höchsten.

Im letzten Versuch (AZT-5) wurden die Dosierungen aus dem mittleren und niedrigen Dosisbereich überprüft. Die Viabilität war gleichbleibend bei 100 %. Auch hier konnte eine dosisabhängige Wirkung gezeigt werden.

Die Negativkontrollen zeigten keine relevanten Abweichungen zu den historischen Werten, Positivkontrollen zeigten bei AZT-5 mit $22.6 \text{ ‰} \pm 4.6$ im Vergleich mit den historischen Daten eine erhöhte Micronucleusfrequenz (Vergleich: positive Testvalidität bei $12.3 \text{ ‰} \pm 5.0$; $7.3 - 17.5 \text{ ‰}$).

Auffallend bei Zidovudin war das starke Auftreten von Amitosen im hohen und mittleren Dosisbereich. Die Werte liegen hier bei $25.8 \text{ ‰} \pm 9.4$ für 15 mg/Ei (AZT-3) bzw. $19.2 \text{ ‰} \pm 14.2$ (AZT-3) und $48.0 \text{ ‰} \pm 31.2$ (AZT-4) für 10 mg/Ei.

Mit einer Amitose wird eine direkte Kernteilung beschrieben, nach welcher die Teilung der gesamten Zelle ausbleibt, sodass als Resultat eine zwei- oder mehrkernige Zelle entsteht. Als amitotisch wird hier daher eine Zelle beschrieben, die zwei oder mehr gleich große Kerne aufweist.

Eine sichere Differenzierung zwischen Amitosen und Micronuclei unter Anwendung bisheriger Kriterien (Größe des Micronuclei entspricht maximal 2/3 der Größe des Hauptkerns) war zum Teil nicht möglich.

4.1.2 Stavudin (d4T)

Stavudin wurde in allen Versuchen als Fertigarzneimittel Zerit® von Bristol-Myers Squibb in einer phosphatgepufferten Kochsalzlösung (PBS) verabreicht. Für d4T-1, d4T-2, d4T-4 und d4T-5 wurde eine Konzentration von 10 mg/ml gewählt, für d4T-3 wurde eine Konzentration von 20 mg/ml festgelegt.

In allen Versuchen zu Stavudin konnte weder ein dosisabhängiger Anstieg der Micronucleusfrequenz noch eine dosisabhängige Abnahme der Viabilität festgestellt

werden. Wobei deutlich wurde, dass ab einer Dosis von 5 mg/Ei die Viabilität beeinträchtigt ist.

Die hohen Dosierungen der Versuche d4T-2, d4T-3, d4T-4 und d4T-6 wurden schrittweise appliziert (s. Anhang: Tab. d4T-2, ddi-ddC-2_d4T-3_3TC-1, d4T-4_3TC-2, d4T-6).

Die niedrigste Dosis bei der ein positives Ergebnis erzielt werden konnte war 2.5 mg/Ei.

Im Dosisfindungsversuch d4T-1 wurde der zu prüfende Dosisbereich festgelegt. Dazu wurden Dosierungen von 1.25 mg/Ei bis 10 mg/Ei appliziert, wobei die Dosierungen jeweils um den Faktor 2 angehoben wurden. Die Daten der

Dosisgruppe 10 mg/Ei gingen aufgrund der geringen Viabilität von 10 % nicht in die Auswertung ein.

In der Versuchsreihe d4T-2 sollten die Ergebnisse aus dem Dosisfindungsversuch bestätigt werden.

Im Vergleich mit der negativen Kontrolle zeigen die Daten zwar eine Anhebung der Micronucleusfrequenz, diese ist jedoch dosisunabhängig.

Aufgrund der geringen Viabilität bei den Dosisgruppen 10 mg/Ei und 15 mg/Ei (22%, bzw. 11 %) sind diese Daten nicht in die Auswertung eingegangen.

Bei der in Versuch d4T-3 gewählten Dosierung von 20 mg/Ei lag die Viabilität bei 0%, wodurch der Versuch nicht beendet werden konnte.

Die Versuchsreihen d4T-4 bis d4T-6 folgen weiter dem Trend der dosisunabhängigen Wirkung von Stavudin und der beeinträchtigten Viabilität ab einer Dosis von 5 mg/Ei.

Die positiven Kontrollen aus den Versuchsreihen zeigten im Vergleich mit den historischen Werten keine Auffälligkeiten.

Bei den negativen Kontrollgruppen zeigte sich bei d4T-4 mit $2.2 \text{ ‰} \pm 0.8$ ein zu hoher Wert. Dieser Wert liegt außerhalb des zulässigen Bereichs für die Negativkontrollen (vergleiche negative Testvalidität: 1.8 ‰).

Deoxycytidinanaloga

4.1.3 Zalcitabin (ddC)

In allen Versuchen wurde Zalcitabin (2',3'-Dideoxycytidin, Sigma-Aldrich) in wässriger Lösung mit einer Konzentration von 5 mg/ml (ddC-2) und 1mg/ml (ddC-3 und ddC-4) appliziert.

Aufgrund der schlechten Verträglichkeit von Zalcitabin wurde im Dosisfindungsversuch ddC-2, eine Dosierung von 5 mg/Ei als höchste Dosierung gewählt, mit einer Dosisreduktion um den Faktor 2 bis auf 0.625 mg/Ei. Aufgrund der fehlenden Viabilität bei 5 mg/Ei und 2.5 mg/Ei (Viabilitätsrate 0 %) ließ sich lediglich eine Tendenz für eine dosisabhängige Micronucleiinduzierung vermuten. Die Viabilität bei 1.25 mg/Ei und 0.625 mg/Ei lag bei 62 %, bzw. bei 75%.

Alle untersuchten Eier zeigten eine erhöhte Herzfrequenz und abgestorbene Extremitäten bzw. Phalangen.

Im folgenden Versuch (ddC-3) wurden Dosierungen von 1 mg, 0.6 mg, 0.5 mg, 0.4 mg und 0.2 mg/Ei gewählt. Die vorher nur als Tendenz festzustellende

dosisabhängige Wirkung von Zalcitabin zeigte sich in dieser Versuchsreihe deutlich. Auch bei einer Dosierung von 0.2 mg/Ei konnte noch ein positives Ergebnis erzielt werden.

Die Viabilität lag durchgehend bei 100 %.

In der nachfolgenden Versuchsreihe ddC-4 sollten die Ergebnisse aus ddC-3 bestätigt werden, dazu wurden die Dosierungen von 0.6 mg/Ei bis 0.2mg/Ei wiederholt. Die dosisabhängige Wirkung konnte auch in dieser Versuchsreihe bestätigt werden.

Die Viabilitätsrate blieb, bis auf die Dosisgruppe 0.6 mg/Ei (Viabilitätsrate 80 %) unverändert bei 100 %.

Die niedrigste Dosis, bei der ein positives Ergebnis erzielt wurde, war 0.2 mg/Ei.

Die begleitenden negativen und positiven Kontrollgruppen zeigten im Vergleich mit den historischen Werten keine Auffälligkeiten.

4.1.4 Lamivudin (3TC)

In allen Versuchsreihen zu Lamivudin wurde das Fertigarzneimittel Epivir® von GlaxoSmithKline verwendet. In den Versuchen 3TC-1 bis 3TC-3 wurde Epivir®, Lösung zum Einnehmen (10 mg/ml), appliziert, in den Versuchen 3TC-4 bis 3TC-6 wurden Epivir® Tabletten (300 mg) in einer phosphatgepufferten Kochsalzlösung (PBS) verabreicht.

Für die Epivir®-Lösung wurde mittels HET-CAM das Reizpotenzial ermittelt, das sich mit einem Reizindex von 1 als nicht reizend zeigte.

Im Dosisfindungsversuch 3TC-1 konnte bei einer Dosierung von 10 mg/Ei keine Viabilität festgestellt werden.

In der anschließenden Versuchsreihe 3TC-2 wurden Dosierungen von 8 mg/Ei bis 2 mg/Ei gewählt, wobei die Dosisreduktion um den Faktor 2 erfolgte. Auch hier zeigte sich eine schlechte Verträglichkeit. Die Viabilitätsrate betrug bei 8 mg/Ei 0% und bei 4 mg/Ei lediglich 50 %. Ein dosisabhängiger Anstieg der Micronucleusfrequenz konnte nicht festgestellt werden.

Im folgenden Versuch (3TC-3) wurden aufgrund der schlechten Viabilitätsraten bei höheren Dosierungen Dosisgruppen von 5 mg/Ei bis 2 mg/Ei getestet, wobei die Dosierungen stufenweise um 1 mg reduziert wurden.

In den Gruppen 5 mg/Ei und 3 mg/Ei waren die Viabilitätsraten so gering, dass diese Werte in der Auswertung nicht berücksichtigt wurden.

Im Vergleich zur negativen Kontrolle war ein Anstieg der Micronucleusfrequenz zu beobachten.

Da die vorangegangenen Versuche gezeigt hatten, dass die Epivir®-Lösung von den Eiern schlecht vertragen wurde und die hohe Zahl an abgestorbenen Eiern an d9 eine Embryotoxizität nahe legte, wurden in den folgenden Versuchen (3TC-4 bis 3TC-6) Epivir®-Tabletten verwendet. Zusätzlich wurden die Dosierungen angehoben.

Darüber hinaus wurde ein Versuch mit 1,2-Propylenglykol (PG-12), einem Zusatzstoff der Epivir®-Lösung, durchgeführt, bei dem die Verträglichkeit dieses Stoffes untersucht werden sollte.

Die Viabilität im PG-12-Versuch betrug an d9 bei allen Dosisgruppen 0 %, bzw. 10% (35 % PG-12, 200 µl).

Im Versuch 3TC-4, bei dem ein Wechsel zu Epivir®-Tabletten stattfand, wurde eine Dosierung von 30 mg/Ei gewählt. Die Frequenz an Micronuclei lag bei $6.2 ‰ \pm 2.6$, die Viabilität betrug 95 %.

In dem folgenden Versuch (3TC-5) wurde die höchste Dosierung an das Löslichkeitslimit für Lamivudin (70 mg/ml, HÖSCHELE 2007) angenähert und bei 60 mg/Ei festgelegt. Die weiteren Dosierungen wurden von dort aus stufenweise um 1 mg reduziert, bis zu 30 mg/Ei. In allen Dosisgruppen wurden positive Ergebnisse erzielt, mit einer dosisabhängigen Tendenz, wobei die Standardabweichungen einiger Werte den eigentlichen Wert überstiegen (siehe hierzu die Versuchstabelle 3TC-5 im Anhang). Die Viabilität lag bei allen Dosisgruppen über 50 %.

Im Versuch 3TC-6 sollten die Ergebnisse aus dem vorangegangenen Versuch bestätigt werden. Dazu wurden identische Dosierungen gewählt. Auch hier zeigte sich ein Anstieg der Micronucleusfrequenz in allen Dosisgruppen, wobei keine dosisabhängige Wirkung zu erkennen war. Bis auf eine Viabilität von nur 47 % bei einer Dosierung von 50 mg/Ei lagen alle Viabilitätsraten über 50 %.

Die positiven Kontrollgruppen zeigten keine Auffälligkeiten im Vergleich mit den historischen Werten.

Bei 3TC-2 zeigte die negative Kontrollgruppe mit $2.2 ‰ \pm 0.8$ einen Wert, der außerhalb des für die negative Kontrolle zulässigen Bereichs liegt (vergleiche negative Testvalidität: 1.8 ‰).

4.2 Purinanaloga

Deoxyadenosinanaloga

4.2.1 Didanosin (ddI)

In allen Versuchen wurde Didanosin als Videx®-Pulver (Bristol-Myers Squibb) in wässriger Lösung appliziert.

Im Dosisfindungsversuch ddI-1 sollte der zu prüfende Bereich festgestellt werden, dazu wurden Dosierungen von 20 mg/Ei, 10 mg/Ei und 5 mg/Ei gewählt.

Durch die niedrige Zahl der eingesetzten Eier, und die niedrige Viabilität von 20 % bei 20 mg/Ei wurde dieser Versuch nicht in die Auswertung einbezogen. Es konnte jedoch bei 10 mg/Ei mit $44.3 \% \pm 6.0$ eine hohe Micronucleusfrequenz beobachtet werden, ebenso bei 5 mg/Ei ($12,5 \% \pm 2,1$).

Um die Ergebnisse für 5 mg/Ei aus dem Dosisfindungsversuch zu bestätigen, wurde im folgenden Versuchen (ddI-2) der Bereich von 5 mg/Ei bis 0.6 mg/Ei abgedeckt, die Dosierung wurde stufenweise um den Faktor 2 verringert.

Die Ergebnisse zeigten einen dosisabhängigen Anstieg der Micronucleusfrequenz, wobei 1.2 mg/Ei die niedrigste Dosis war, bei der ein positives Ergebnis erzielt werden konnte ($5.5 \% \pm 3.3$).

Die Viabilitätsrate lag in allen Dosisgruppen über 70 %.

Im anschließenden Versuch (ddI-3) sollten die in ddI-2 erzielten Ergebnisse bestätigt sowie die Abgrenzung in den negativen Wirkungsbereich verfeinert werden. Daher wurden die Dosen wie folgt gewählt: 5 mg/Ei, 2.5 mg/Ei, 1.25 mg/Ei, 0.8 mg/Ei, 0.6 mg/Ei und 0.4 mg/Ei.

Auch hier zeigten die Ergebnisse einen dosisabhängigen Anstieg der Frequenz an Micronuclei. Die niedrigste Dosis, bei der ein Anstieg der Micronucleusfrequenz zu erkennen war, lag bei 1.25 mg/Ei.

Die Viabilität war in den Gruppen vergleichbar (86 % bei 2.5 mg/Ei).

Auffallend waren bei ddI-3 die konzentrationsabhängig in allen Dosisgruppen auftretenden großen Zellkerne mit *budding*.

Die Negativkontrollen zeigten keine relevanten Abweichungen zu den historischen Werten.

Bei den Positivkontrollen trat bei ddI-2 mit $22.2 \% \pm 2.5$ ein zu hoher Wert auf.

4.3 Kombinationsversuche

In allen Kombinationsversuchen wurden die kombinierten Substanzen in gleicher Weise wie in den Einzelversuchen gelöst und aufbereitet.

Jede für die kombinierte Gabe gewählte Dosierung wurde zusätzlich als Einzeldosis appliziert. Für jeweils eine der kombinierten Substanzen wurde eine stationäre Dosis festgelegt, während die Dosierung der anderen Substanz variiert wurde.

4.3.1 Zidovudin (AZT) – Didanosin (ddI)

Im ersten Kombinationsversuch (AZT-ddI-1) wurde für Didanosin eine Dosierung gewählt, bei der das Ergebnis in der Einzeldosierung negativ ausgefallen war (0.4 mg/Ei). Für Zidovudin wurden Dosierungen gewählt, die in den Einzelversuchen noch nicht getestet worden waren (0.05 mg/Ei; 0.025 mg/Ei), da sich Zidovudin in den Einzelversuchen auch in niedrigen Dosierungen als positiv erwiesen hatte.

Zidovudin und Didanosin zeigten in Kombination einen Anstieg der Micronucleusfrequenz, im Vergleich mit den Ergebnissen der Einzeldosen allerdings keinen additiven.

In der zweiten Versuchsreihe von Zidovudin und Didanosin (AZT-ddI-2) wurde die Dosierung für Zidovudin auf 1 mg bzw. 3 mg/Ei heraufgesetzt, Didanosin wurde weiter in einer Dosierung von 0.4 mg/Ei appliziert. Auch hier zeigte sich, verglichen mit den Einzeldosen, kein additiver Anstieg der Micronucleusfrequenz.

Im dritten Kombinationsversuch (AZT-ddI-3) wurden für beide Substanzen eine Dosierung von 2.5 mg/Ei gewählt. In diesem Versuch konnte ein deutlich überadditiver Anstieg der Micronucleusfrequenz beobachtet werden.

Aufgrund von Zeitmangel konnte ein Wiederholungsversuch für AZT-ddI-3 nicht durchgeführt werden.

Die Viabilität lag in allen Versuchsreihen und Dosisgruppen über 85 %.

Die Kontrollgruppen zeigten im Vergleich mit den historischen Werten keine Besonderheiten.

4.4 Interne Selbstkontrolle

Zur internen Selbstkontrolle der ungeübten Untersucherin (KB) wurden die positive und negative Kontrollgruppe des Kombinationsversuchs AZT/ddI-3 herangezogen. Cyclophosphamid (CP) als positive Kontrollgruppe und bidestilliertes Wasser (H₂O) als negative Kontrollgruppe.

Beide Kontrollgruppen wurden zweimal von KB ausgezählt und mit den Auszählungen der erfahrenen Untersucherin (CN) verglichen. Für Informationen zum genauen Versuchsaufbau siehe die Beschreibung der Kombinationsversuche Zidovudin/Didanosin (AZT/ddI).

Bei den ersten Auszählungen von KB, sowohl bei Cyclophosphamid (CP) als auch der negativen Kontrollgruppe (H₂O), ergaben sich höhere Werte als bei der zweiten Auszählung der gleichen Gruppe.

18.0 ‰ ± 3.8 bei der ersten Auszählung von CP und 16.3 ‰ ± 2.8 bei der zweiten, sowie 1.7 ‰ ± 0.8 bei der ersten und 1.5 ‰ ± 0.8 bei der zweiten Auszählung zu H₂O.

Zum Vergleich: Die Werte von CN liegen bei 15.8 ‰ ± 5.0 (CP) und 1.3 ‰ ± 1.2 (H₂O).

Damit liegen die Werte von KB zwar über denen von CN, sind aber nicht signifikant verschieden ($\alpha > 0,1$).

4.5 Historische Kontrollen

Die Ergebnisse aller positiven und negativen Kontrollgruppen wurden in die parallel geführte Datenbank der historischen Kontrolle eingepflegt, um Veränderungen im Verlauf der historischen Kontrollen beobachten zu können. Dargestellt sind alle Kontrollgruppen die bis zum Abschluss der Versuchsphase angefallen sind.

Die historischen Negativkontrollen beziehen sich jeweils auf ein Lösungsmittel, die Positivkontrollen wurden mit 0.05 mg Cyclophosphamid (CP) durchgeführt.

4.5.1 Negativkontrolle

Die hier beschriebenen negativen historischen Kontrollen basieren auf den Versuchen, die im Zeitraum von September 1997 bis Dezember 2005 vorgenommen wurden.

Die nachfolgende Graphik zeigt neben den Micronucleusfrequenzen den Mittelwert, die Standardabweichung und die Regressionsgrade der historischen Negativkontrollen.

Im Versuch d4T-4/3TC-2 liegt der Wert der negativen Kontrollgruppe mit $2.2\% \pm 0.8$ außerhalb des in der SOP festgelegten zulässigen Bereichs für die Sicherstellung der Testvalidität bezüglich der Negativkontrolle.

Der Mittelwert der historischen Negativkontrolle hat sich von $0.8\% \pm 0.7$ (Werte aus dem Datensatz vor der hier dargestellten Arbeit) auf $0.9\% \pm 0.8$ verschoben, die Varianz beträgt 0.14.

Bei den Viabilitäten konnten keine Auffälligkeiten festgestellt werden.

Historische Negativkontrolle

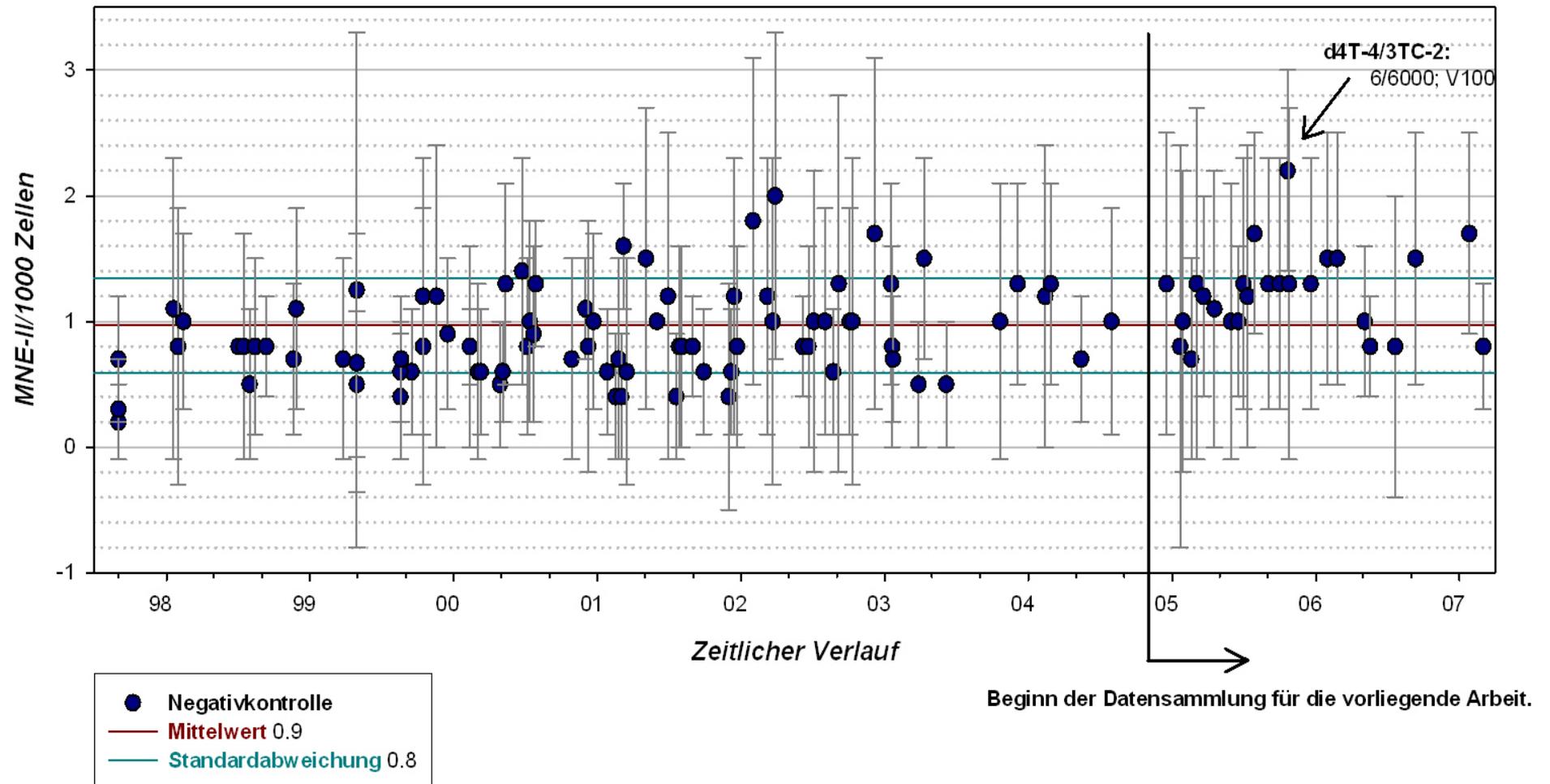


Abb. 4.1: Micronucleusfrequenzen in ‰ der historischen Negativkontrolle im zeitlichen Verlauf. 6/6000: Eier/Zellen. V: Viabilität (%).

4.5.2 Positivkontrolle

Die vorliegenden historischen Positivkontrollen beruhen auf Daten aus einem Zeitraum von August 1998 bis Dezember 2005.

In der nachfolgenden Graphik sind außer den einzelnen Micronucleusfrequenzen Mittelwert und Standardabweichung sowie Regressionsgrade der historischen Positivkontrolle berücksichtigt.

Die in der SOP beschriebene Grenze für die Testvalidität im positiven Bereich liegt bei 12.4 ± 5.0 : 7.4 – 17.4 ‰ (Stand: März 2007). Dieser Grenzbereich wird in den Versuchen AZT-5 und ddi-2 überschritten. So liegt bei AZT-5 eine Micronucleusfrequenz von 22.6 ± 4.6 vor, bei ddi-2 eine von 22.2 ± 2.5 .

Der Mittelwert der historischen Positivkontrolle hat sich im Zeitraum von Dezember 2004 bis März 2007 nicht verändert und beträgt 12.4 ‰. Die Standardabweichung hat sich in diesem Zeitraum von ± 5.6 auf 5.0 reduziert.

Die Varianz beträgt 14.33.

Die Viabilitäten zeigten in den Versuchen keine Auffälligkeiten.

Historische Positivkontrolle

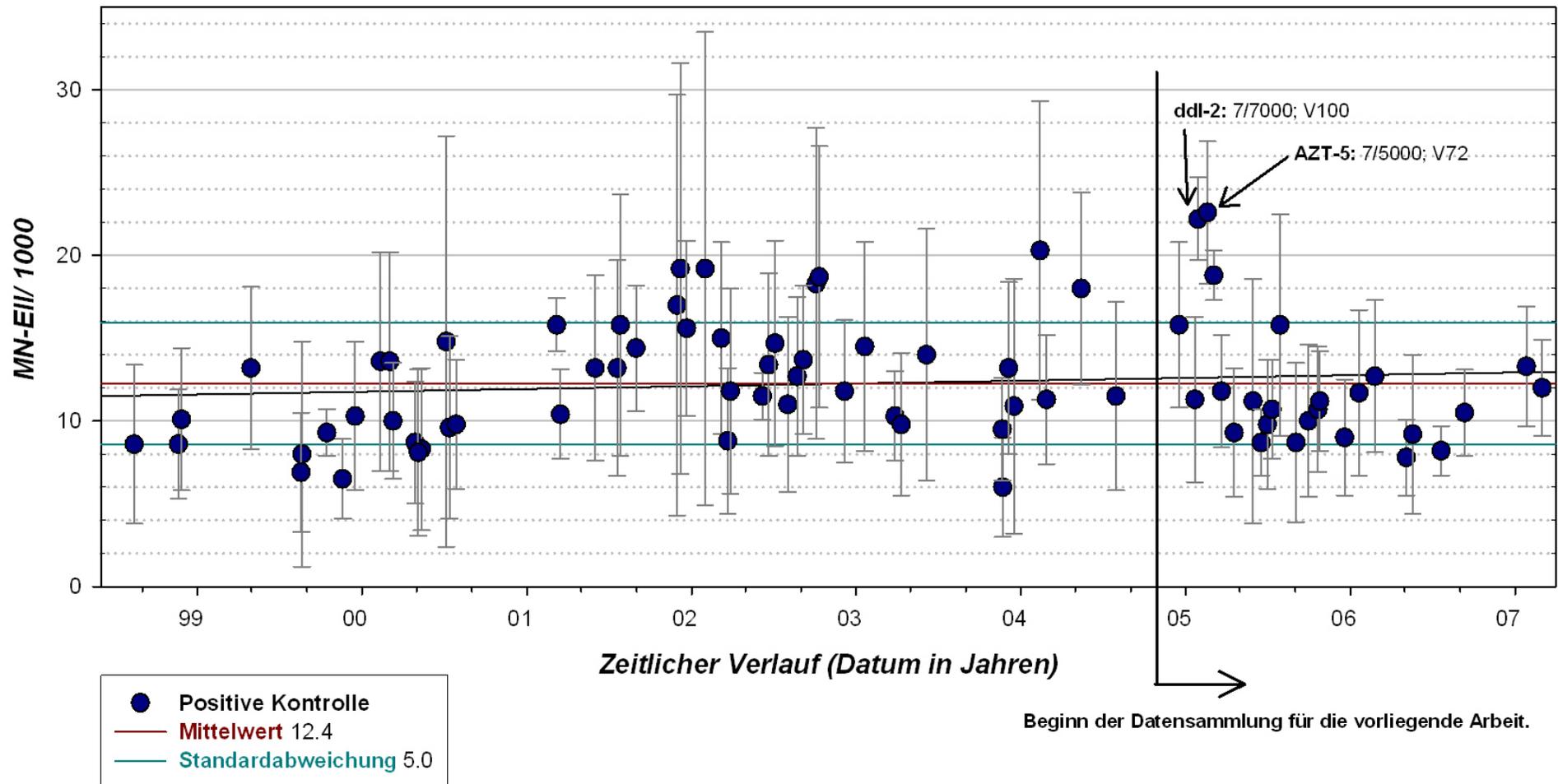


Abb. 4.2: Micronucleusfrequenzen in ‰ der historischen Positivkontrolle im zeitlichen Verlauf. 7/7000: Eier/Zellen V: Viabilität (%).

5 Diskussion

Als erster nucleosidanaloger Reverse Transkriptase Hemmer wurde 1987 Zidovudin von der FDA (Federal Drug and Food Administration, USA) für die antiretrovirale Therapie zugelassen. Seitdem sind sowohl Zidovudin als auch die anschließend entwickelten nukleosidanalogen Reverse Transkriptase Hemmer integraler Bestandteil der HIV-Therapie. Noch heute sind sie das Rückgrat der HAART-Regime, die aus einem oder zwei NRTHs sowie ein bis zwei weiteren Präparaten aus anderen Wirkstoffgruppen, wie den nichtnucleosidanalogen Reverse Transkriptase Hemmern oder Protease Hemmern, bestehen.

Als älteste der antiretroviralen Wirkstoffe sind die NRTHs umfassend untersucht worden; so sind bei PUBMED (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>) zum Thema „NRTI“ über 700 Artikel verzeichnet und allein über Zidovudin sind bei PUBMED über 3400 Veröffentlichungen registriert.

Zu allen momentan verfügbaren NRTHs sind Daten zu Genotoxizitätsprüfungen in der Literatur vorhanden, sowohl durch *in-vitro*- als auch *in-vivo*-Testsysteme ermittelt.

Tab. 5.1: Genotoxizitäts- und Karzinogenitätsdaten ausgewählter nucleosidanaloger Reverse Transkriptase Hemmer. +: positiv; -: negativ; ?: hierfür liegen keine Daten vor. Vereinfacht zitiert aus WUTZLER & THUST (2001)

Substanz	Bacterial gene mutation	Mammalian gene mutation	Clastogenicity assay	Micronucleus assay	Cell transformation in vitro	Carcinogenicity
Zidovudin	-	+	+	+ / - *	+	+
Stavudin	-	-	+	+	+	-
Lamivudin	-	?	+	-	-	-
Zalcitabin	-	-	+	+	+	+
Didanosin	-	-	+	+	+	-

* positiv bei PHILLIPS *et al.* (1991) und DERTINGER *et al.* (1996) und negativ bei MOTIMAYA *et al.* (1994).

Die Ähnlichkeit der NRTHs mit den endogenen Pyrimidin- und Purinnukleosiden ist nicht Basis ihrer Wirksamkeit gegen Reverse Transkriptase, sondern auch Ursache für das genotoxische Potenzial dieser Wirkstoffgruppe. Bedingt durch ihre Ähnlichkeit zu den endogenen Pyrimidin- und Purinnukleosiden werden die NRTHs sowohl von der Reversen Transkriptase in den viralen DNA-Strang eingebaut als auch von den DNA-Polymerasen der Wirtszelle als Substrat genutzt und so auch in die Wirts-DNA eingebaut. Besonders die DNA-Polymerase γ hat eine hohe Spezifität für die NRTHs (SHARMA *et al.* 2004; KAKUDA 2000).

Das Fehlen der 3'-OH-Gruppe am Ribosering der NRTHs führt sowohl bei der viralen als auch der endogenen DNA-Synthese zu einem vorzeitigen Abbruch dieser Reaktion. Die Folge dieser Schädigung der DNA sind genotoxische Manifestationen wie Mutagenität, Chromosomenaberrationen und Telomerverkürzungen (IARC, OLIVERO 2005).

Der Schaden für die Wirtszelle beruht zu einem Großteil auf der Anfälligkeit der DNA-Polymerasen für die NRTHs. Besonders die DNA-Polymerase γ ist da betroffen, was womöglich auf der Ähnlichkeit der RNA-abhängigen DNA-Polymerase-Aktivität mit der HIV-RT-Aktivität zu tun hat (KAKUDA 2000). NRTHs sind bekannt als mitochondriale Toxine (KAKUDA 2000).

Das Ziel dieser Arbeit war der Abgleich der für diese Substanzen im HET-MN erzielten Micronucleusfrequenzen mit denen in der Literatur durch den Nager-Knochenmarkstest ermittelten Daten. Dazu wurden ausgewählte NRTHs als beispielhafte Auswahl der zur Zeit verfügbaren NRTHs im HET-MN unter Zugrundelegung der von WOLF (2003) festgelegten SOP untersucht (siehe hierzu das Kapitel 3 Experimenteller Teil).

Aufgrund der nicht parametrischen Verteilung der Daten und der kleinen Stichprobengröße wurde für die Signifikanzbestimmung der Mann-Whitney-U-Test verwendet.

5.1 Pyrimidinanaloga

Deoxythymidinanaloga

5.1.1 Zidovudin (AZT)

Mit Zidovudin wurde 1987 von der FDA (Federal Drug and Food Administration, USA) der erste der nucleosidanalogen Reverse Transkriptase Hemmer für die antiretrovirale Therapie zugelassen. Es ist das am besten untersuchte Präparat aus dieser Wirkstoffgruppe.

Für Zidovudin wurde in mehreren Untersuchungen ein Einbau in die zelleigene DNA nachgewiesen. So konnten OLIVERO *et al.* (1994), OLIVERO *et al.* (1997) und OLIVERO *et al.* (1999) den Einbau von Zidovudin in Kern- und mitochondrialer DNA bei Mäusen, Affen und Menschen nachweisen, sowie in DNA in Zellkultur befindlicher Zellen (OLIVERO *et al.* 2005).

In Lymphocyten Zidovudin-exponierter Patienten konnten Chromosomenaberrationen festgestellt werden (SHAFIK *et al.* 1991), ebenso wie im Knochenmark von mit Zidovudin behandelten Mäusen (OLIVERO *et al.* 1994a).

In Untersuchungen an adulten Mäusen (AYERS *et al.* 1996) als auch an Mäusen, die *in utero* Zidovudin ausgesetzt waren (OLIVERO *et al.* 1997, DIWAN *et al.* 1999), zeigte sich Zidovudin karzinogen.

In Tier- und Zellkulturmodellen ist Zidovudin clastogen (OLIVERO *et al.* 1994a, DERTINGER *et al.* 1996, GONZALES & LARRIPA 1994). Die Inkorporation von

Zidovudin in die Wirts-DNA konnte in verschiedenen Zellkultur- und Tiermodellen gezeigt werden (OLIVERO *et al.* 1997; OLIVERO *et al.* 1994a; SOMMADOSSI *et al.* 1989; OLIVERO *et al.* 1994b).

Die gebräuchliche Dosierung in der Klinik für Zidovudin, als Teil einer Kombinationstherapie, ist 500 – 600 mg/Tag, aufgeteilt in 2 – 3 Einzeldosen, oder 1 – 2 mg/kg KG alle 4 Stunden (6 – 12 mg/kg KG/ Tag) als Regeldosierung für Erwachsene, wenn Zidovudin nicht im Rahmen einer Kombinationstherapie verabreicht wird.

Im Nager-Knochenmarksmicronucleustest wurde Zidovudin von PHILLIPS *et al.* (1991) sowie MOTIMAYA *et al.* (1994) getestet. DERTINGER *et al.* (1996) untersuchte das genotoxische Potenzial von Zidovudin an *peripheral blood mononuclear cells* (PBMCs).

Bei PHILLIPS *et al.* (1991) zeigte sich bei Dosierungen von 200, 500, 100 und 2000 mg/kg KG ein hochsignifikanter, dosisabhängiger Anstieg der Micronucleusfrequenz für PCEs. MOTIMAYA *et al.* (1994) injizierten Zidovudin im Maus-Micronucleustest in den Dosen 14.286 mg/g KG, 17.143 mg/g KG, 21.429 mg/g KG und 28. 571 mg/g KG. Sie konnten bei diesen Dosierungen keine signifikante Erhöhung der Micronucleusfrequenz durch Zidovudin im Vergleich zur Negativkontrolle feststellen.

DERTINGER *et al.* (1996) erzielten bei einer Dosierung von 17 mg/kg KG eine Micronucleusfrequenz von 494 ± 180 , verglichen mit einem Wert von -10 ± 130 bei der negativen Kontrolle (physiologische Kochsalzlösung, 0.9 % NaCl). Die Daten wurden mittels Durchflusscytometrie erhoben und beziehen sich auf 1.000.000 gezählte Erythrocyten. Umgerechnet auf unsere Auszählungen von micronucleierten Zellen pro 1000 gezählten Erythrocyten, ergibt das einen Wert von 0.494 ± 0.18 .

In dieser Arbeit wurden die Ergebnisse dieser drei Untersuchungen mit Hilfe des HET-MN überprüft und die erzielten Ergebnisse diesen gegenübergestellt.

Da Zidovudin als Reinsubstanz (3'-Azido-3'-deoxythymidine, Sigma Aldrich) nicht in Lösung gebracht werden konnte, wurde auf das Fertigarzneimittel Retrovir® der Firma GlaxoSmithKline zurückgegriffen, welches in einer Konzentration von 20 mg Zidovudin pro ml erhältlich ist.

Aufgrund des beschränkten Volumens in der Luftkammer des Hühnereis konnten die Dosierungen von PHILLIPS *et al.* (1991) nicht übernommen werden. Alternativ wurde mit 1 ml (20 mg/ml/Ei) Retrovir® als Höchstdosis ein Volumen und eine Dosierung gewählt, bei denen das Hühnerei keinerlei Einschränkungen unterliegt. Diese Dosis entspricht ~ 300 mg/kg EG und liegt damit deutlich unter der von PHILLIPS *et al.* (1991) sowie der in der Klinik gebräuchlichen Regeldosis von

Zidovudin in Kombination mit anderen antiretroviralen Wirkstoffen. Bei 15 mg/Ei (entspricht ~ 230 mg/kg EG) konnte ein eindeutig positives Ergebnis erzielt werden, weshalb die Dosisgruppe mit 20 mg/Ei nicht mehr in die Auswertung einbezogen wurde.

Die durch den HET-MN ermittelten Daten konnten die von PHILLIPS *et al.* (1991) und DERTINGER *et al.* (1996) beschriebene Induktion von Micronuclei durch Zidovudin bestätigen; so konnten bei einer 10-fach geringeren Dosierung als bei PHILLIPS *et al.* (1991) vergleichbare positive Ergebnisse erzielt werden ($30.5\% \pm 9.9$ bei 230 mg/kg EG zu 35.4 ± 3.34 , bzw. 53.4 ± 12.75 bei 2000 mg/kg KG)

Bei vergleichbarer Dosierung trat im HET-MN eine doppelt so hohe Micronucleusfrequenz auf ($30.5\% \pm 9.9$ bei 230 mg/kg EG zu $15.1\% \pm 3.13$ bzw. $15.2\% \pm 1.10$ bei 200 mg/kg KG).

In der von MOTIMAYA *et al.* (1994) durchgeführten Untersuchung konnte bei Dosierungen von 28.571 mg/g KG als höchster und 14.286 mg/g KG als niedrigster Dosis eine Micronucleusfrequenz von $2.4\% \pm 0.45$ bzw. $2.3\% \pm 0.29$ für Höchst- bzw. Niedrigstdosis beobachtet werden. Da ihre begleitende Negativkontrolle bei $1.9\% \pm 0.48$ lag wurde dieses Ergebnis als statistisch nicht signifikant eingestuft und Zidovudin damit in dieser Untersuchung als negativ bewertet.

Bei vergleichbarer Dosierung im HET-MN von 30 mg/kg EG (2 mg/Ei) bzw. 15.4 mg/kg EG (1 mg/Ei) konnte mit einer Micronucleusfrequenz von $2.6\% \pm 1.8$, bzw. $2.7\% \pm 1.2$ ein vergleichbares Ergebnis ermittelt werden.

Wo die durch den HET-MN gewonnenen Daten im Sinne der SOP als biologisch relevante Steigerung der Micronucleusfrequenz angesehen werden, werten MOTIMAYA *et al.* (1994) die Daten aus ihren Untersuchungen als negativ.

Zwar lassen sich die Ergebnisse auch für den HET-MN statistisch nicht stützen doch spricht der biologisch relevante Anstieg micronucleierter Zellen für eine tendenziell positive Wirkung von Zidovudin in diesem Dosisbereich.

Bei der von DERTINGER *et al.* (1996) ermittelten Micronucleusfrequenz von umgerechnet $0.494\% \pm 0.18$ konnte im HET-MN bei vergleichbarer Dosierung eine Resonanz von $2.7\% \pm 1.2$ erzielt werden (15.4 mg/kg EG im HET-MN [entspricht 1 mg/Ei] zu 17 mg/kg KG im Tierversuch). Dieses Ergebnis ist um das 5-fache höher als die von DERTINGER *et al.* (1996) erzielte Micronucleusfrequenz, beträgt aber lediglich das 3-fache der begleitenden Negativkontrolle.

Im Vergleich mit dem von DERTINGER *et al.* (1996) verwendeten Testmodell und dem von Ihnen gewählten Auswertungsverfahren reagierte der HET-MN sensitiver.

Die Ergebnisse unserer Untersuchungen zeigen, dass der HET-MN sensitiver auf die Induktion von Micronuclei durch Zidovudin reagiert, als bislang für den Micronucleustest am Tier belegt.

In der AZT-5 begleitenden Positivkontrolle ist mit $22.6 \% \pm 4.6$ eine unüblich hohe Micronucleusfrequenz aufgetreten. Die Negativkontrolle dieses Versuchs, sowie die Werte der Prüfsubstanzen zeigen keine Auffälligkeiten. Da die Positivkontrolle mittels einer Tuberkulinspritze appliziert wird ist eine Möglichkeit für Applikationsfehler gegeben, was möglicherweise die Ursache für diesen Extremwert ist. Die Viabilität war mit 75% nicht auffällig.

Zidovudin

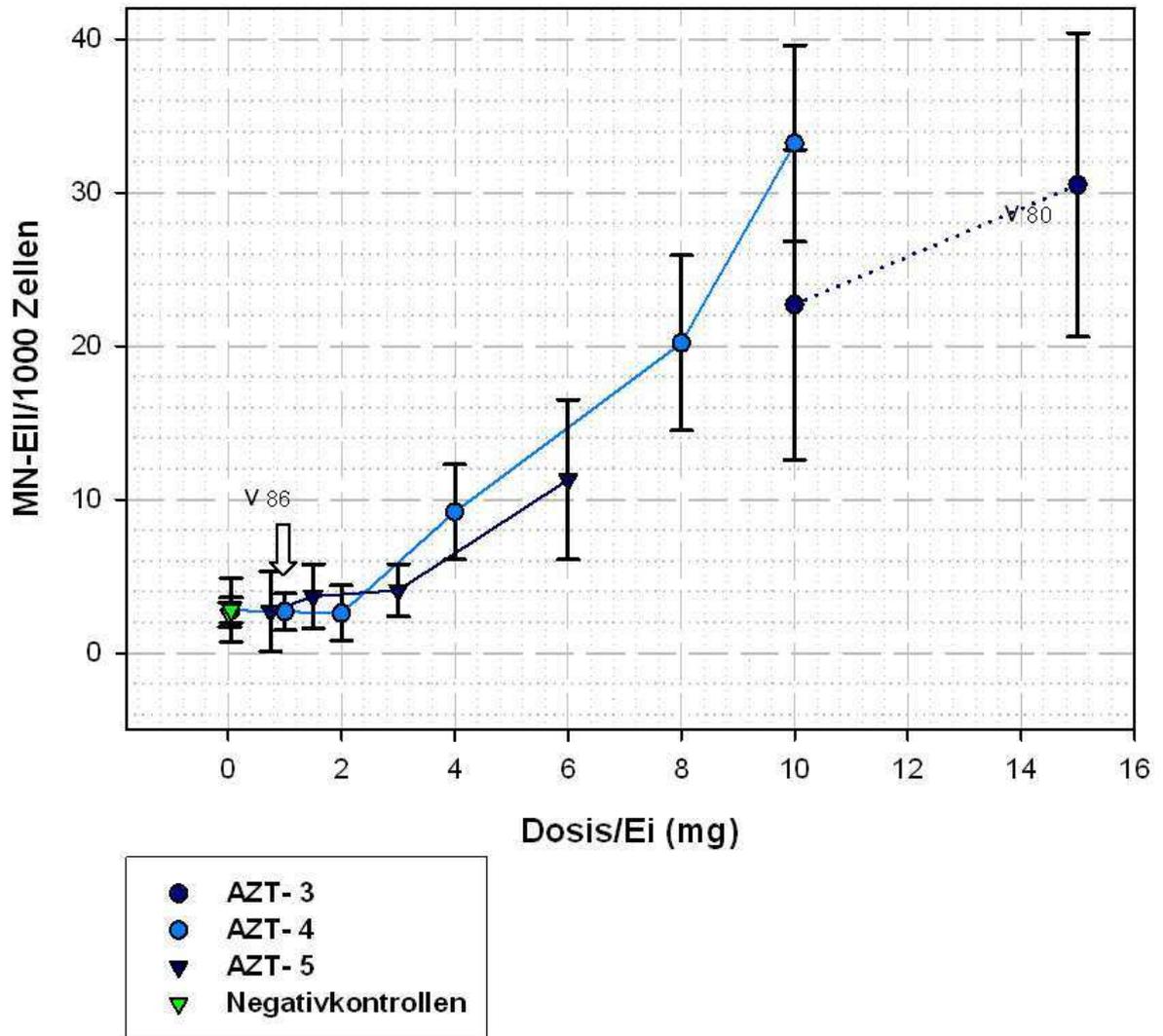
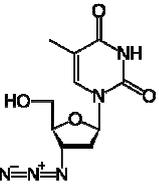


Abb. 5.1: Beobachtungen MNE-II/1000 Zellen der Versuchsreihen zu Zidovudin (AZT). Pro Ei wurden 6000 Zellen ausgewertet. Die Micronucleusfrequenz der mitgeführten positiven Kontrollgruppe zeigte keinerlei Auffälligkeiten. V: Viabilitätsrate in %.

Substanzdaten und Toxizität – Zidovudin (AZT)

Chemisch-physikalische Daten	
Struktur	
Summenformel	C ₁₀ H ₁₃ N ₅ O ₄
Molekulargewicht	267.28 g/mol
IUPAC	1-(3-Azido-2,3-dideoxy-beta-D-ribofuranosyl)-5-methylpyrimidine-2,4-(1H,3H)-dione
Beschreibung	Nucleosidanaloger Reverse Transkriptase Hemmer (NRTI)
Synonyme	3'-Azido-3'-deoxythymidine 3'-Deoxy-3'-azidothymidine 3'-azido-3-deoxythymidine AZT Azidothymidin BW-A 509U Retrovir® ZDV Zidovudin
CAS-Nr.	30516-87-1
Toxikologie	
LD₅₀ (NIOSH)	p.o. 3084 mg/kg (Ratte) i.v. >70 mg/kg (Ratte) p.o. 3062 mg/kg (Maus) i.v. >70 mg/kg (Maus)
GeneTox (Auswahl relevanter Prüfsysteme)	
Micronucleustest * (NIOSH)	i.p. 170 mg/kg/2W (Maus) – diskontinuierlich
Cytogenetische Analyse ** (NIOSH)	p.o. 6000 mg/kg/3d (Maus) – kontinuierlich
HET-MN	i.o. 7.7 mg/kg (Ei)
WHO/ IARC	Animal Sufficient Evidence. Human Inadequate Evidence. Group 2B (IARC)

* 17 mg/kg/Tag (5 Tage / Woche über 2 Wochen). Untersucht wurde die Anzahl der MN in den Erythrocyten von Mäusen vor und nach der intraperitonealen Injektion von AZT, als auch der negativen Kontrolle (K_n) (K_n: 0.9 %-ige NaCl-Lösung). Entnommen wurde peripheres Blut aus dem Schwanz. Der durchschnittliche ΔMN (MN-Frequenz nach Injektion minus MN-Frequenz vor Injektion) betrug für AZT 494 ± 180, für die negative Kontrolle -10 ± 130 (bezogen auf 1.000.000 Erythrocyten, gezählt mittels Durchflusscytometrie) (DERTINGER *et al.* 1996).

** 500, 1000 und 2000 mg/kg/Tag (Initialversuch) und 200, 1000 und 2000 mg/kg/Tag (Wiederholungsversuch) über 3 Tage p.o. Untersucht wurde die MN-PCE-Frequenz pro 1000 PCE im peripheren Blut von Mäusen sowie die PCE-Frequenz pro Maus. Pro Maus wurden 1000 PCEs und 1000 NCEs gezählt. Als negative Kontrolle wurde das Lösungsmittel gewählt (Carboxy-methylcellulose; CMC). Für die niedrigste AZT-Dosis beträgt der Mittelwert an MN-PCE/1000 PCE 15.1 ± 3.13 (Initialversuch) bzw. 15.2 ± 1.10 (Wiederholungsversuch). Die höchste AZT-Dosis ergab einen Mittelwert an MN-PCE/1000 PCE von 35.4 ± 3.34 (Initialversuch) bzw. 53.4 ± 12.75 (Wiederholungsversuch). Für die negative Kontrolle beträgt der Mittelwert an MN-PCE /1000 PCE 2.1 ± 0.71 (Initialversuch) bzw. 2.6 ± 0.19 (Wiederholungsversuch) (PHILLIPS *et al.* 1991).

5.1.2 Stavudin (d4T)

Stavudin gehört wie Zidovudin in die Gruppe der Desoxythymidinanaloga und wurde 1996 für die Therapie einer HIV-Infektion mit progressiver oder fortgeschrittener Immunschwäche (ABDA 2006) zugelassen. Stavudin findet hauptsächlich in der Behandlung von Patienten mit einer Intoleranz oder Resistenz gegenüber Zidovudin, Didanosin oder Zalcitabin Anwendung (RANA & DUDLEY 1997).

Laut ABDA-Datenbank (2006) hat sich Stavudin als genotoxisch in *in-vitro*-Tests an Human-Lymphocyten und Fibroblasten von Mäusen erwiesen, ebenso wie in *in-vivo*-Tests zur Chromosomenaberration.

PHILLIPS *et al.* (1991) untersuchten Stavudin auf seine genotoxische Wirkung anhand des Micronucleustests an Mäusen. Die Ergebnisse dieser Untersuchung zeigten einen signifikanten dosisabhängigen Anstieg micronucleierter Zellen sowie eine signifikante Reduzierung von PCEs im Knochenmark. Im peripheren Blut konnten keine signifikanten Veränderungen festgestellt werden. Als niedrigste Dosis wurde 200 mg/kg KG appliziert, als höchste 2000 mg/kg KG.

Laut rtecs-Datenbank liegt der LD₅₀ bei 4 g/kg KG p.o. bzw. 1200 g/kg KG i.v. bei Ratten und 1g/kg KG p.o und i.v. bei Mäusen.

Aus Kostengründen wurde auf den Einsatz der Reinsubstanz verzichtet und stattdessen das Fertigarzneimittel Zerit® verwendet. Die in dieser Untersuchung verwendeten Dosierungen von Stavudin liegen deutlich unter denen von PHILLIPS *et al.* (1991), da die physiologischen Gegebenheiten des Hühnereis ein maximales Applikationsvolumen von 2 ml vorgeben und die Löslichkeit von Stavudin auf 6.6 mg/ml eingeschränkt ist (CHEMIDPLUS LITE).

Im Dosisfindungsversuch d4T-2 wurde eine möglichst hohe Dosis von Stavudin verabreicht; zum einen um eine möglichst hohe Toxizität zu erzielen und damit eine direkte Einwirkung und Bioverfügbarkeit der Substanz auf den Embryo zeigen zu können, zum anderen, um möglichst noch im unteren Dosisbereich von PHILLIPS *et al.* (1991) zu liegen.

Die höchste auswertbare Dosierung von 12 mg/Ei entspricht 184,5 mg/kg EG und liegt demnach noch unter der niedrigsten von PHILLIPS *et al.* (1991) getesteten von 200 mg/kg KG.

Dosierungen von mehr als 12 mg/Ei konnten aufgrund geringer Viabilität nicht in die Auswertung einbezogen werden.

Bei der niedrigsten von PHILLIPS *et al.* (1991) getesteten Dosis von 200 mg/kg KG ergab sich eine Micronucleusfrequenz von 3.7 ‰ ± 0.62. Im Vergleich dazu konnte im HET-MN bei vergleichbarer Dosis (12 mg/Ei oder 184.5 mg/kg EG; d4T-6) eine

signifikant erhöhte Micronucleusfrequenz von $3.3\% \pm 1.5$ ($\alpha < 0.05$) beobachtet werden.

PHILLIPS *et al.* (1991) konnten in ihren Untersuchungen bis zu einer Dosis von 2000 mg/kg KG keine Mortalitäten oder Knochenmarkstoxizitäten aufzeichnen. Im HET-MN ist die Viabilität schon bei 10 mg/Ei (153.7 mg/kg EG) stark eingeschränkt und liegt unterhalb von 50%. Eine mögliche Ursache dafür könnten die Hilfsstoffe des Fertigarzneimittels sein.

Spuren dieser Hilfsstoffe in der Stammlösung als mögliche Ursache für die in einer Versuchsreihe nicht dosisabhängigen Viabilitäten können nicht als Erklärung herangezogen werden, da man eher Unterschiede zwischen den einzelnen Versuchsreihen und nicht innerhalb einer Versuchsreihe erwarten würde.

Die statistischen Signifikanzen der einzelnen Dosierungen variieren innerhalb der einzelnen Versuchsreihen stark, so ist zum Beispiel die Micronucleusfrequenz im Versuch d4T-6 bei 4 mg/Ei (61.4 mg/kg EG) signifikant positiv ($\alpha < 0.01$; $3.3\% \pm 0.8$), wohingegen bei 8 mg/Ei und 12 mg/Ei lediglich leicht signifikante Ergebnisse erzielt werden konnten ($\alpha > 0.01$; $4.1\% \pm 3.5$ und $2.8\% \pm 1.2$ bei 8 Mg/Ei und $3.3\% \pm 1.5$ bei 12 mg/Ei). Bei 5 mg/Ei lässt sich keine Signifikanz feststellen ($\alpha > 0.05$), im Sinne der SOP ist die Micronucleusfrequenz mit $2.8\% \pm 1.3$ allerdings biologisch relevant erhöht.

Trotz umfangreicher Versuchsreihen mit bis zu 26 eingesetzten Eiern ließ sich ein dosisabhängiger Anstieg der Micronucleusfrequenz aufgrund einer relativ hohen akuten Toxizität in den oberen Dosisbereichen nicht reproduzieren (Viabilität $< 30\%$). Nachweise für eine besondere Cyto- oder Embryotoxizität ließen sich in der Literatur nicht finden. Der fast ausschließliche Verlust eingesetzter Eier an d9 ist ein Hinweis auf eine embryotoxische Wirkung von Stavudin oder eines der eventuell noch in der Lösung befindlichen Hilfsstoffe.

Der Grund für die hohen Standardabweichungen, die zum Teil mehr als der Hälfte der Micronucleusfrequenz betragen, könnte in einer Beeinträchtigung des Metabolismus des Hühnerembryos oder in einer behinderten Verteilung des Wirkstoffs im Organismus zu suchen sein. PHILLIPS *et al.* (1991) schlagen dies als mögliche Ursachen der fehlenden Dosisabhängigkeit vor. Da Stavudin über Diffusion in die Zellen gelangt (RANA & DUDLEY 1997) scheint aber die Verteilung der Substanz im Organismus als Ursache nicht in Frage zu kommen. Die Bioverfügbarkeit von Stavudin liegt bei $86 \pm 18\%$ (FACHINFORMATION, ZERIT 2007).

Die enzymatische Aktivierung von Stavudin dürfte keine Rolle bei der dosisabhängigen Bildung von Micronuclei spielen, da angenommen wird, das Stavudin über die gleichen enzymatischen Wege wie Zidovudin phosphoryliert wird (CONNOLLY & HAMMER 1992; HO & HITCHCOCK 1989; TURRIZIANI *et al.* 1998)

und Zidovudin in unseren Untersuchungen eine deutlich dosisabhängige Wirkung zeigte. Die für die Aktivierung nötigen Enzyme scheinen also vorhanden zu sein. Aus dem Fertigarzneimittel Zerit® musste in einem aufwendigen Verfahren der Wirkstoff von den Hilfsstoffen getrennt werden, hierbei ist es möglich, dass nicht alle vollständig herausgelöst werden konnten, was möglicherweise eine Verteilung der Substanz im Ei negativ beeinflusst haben könnte. Als Ursache für die hohen Standardabweichungen können mögliche Spuren der Hilfsstoffe nicht herangezogen werden, das das eher zu Unterschieden zwischen den einzelnen Versuchsreihen und nicht zwischen den Eiern in einem Versuch führen würde.

Eine exakte Erklärung für die nicht dosisabhängige Wirkung von Stavudin im HET-MN lässt sich an dieser Stelle nicht nennen. Eine weitere Untersuchung dieses Phänomens, gegebenenfalls mit der Reinsubstanz, scheint ratsam und könnte Aufschluss geben.

Im Versuch d4T-4 (3TC-2) zeigte die begleitende Negativkontrolle einen unüblich hohen Wert und liegt außerhalb der in der SOP festgelegten Negativkriterien. Bei der begleitenden Positivkontrolle lassen sich keine Auffälligkeiten feststellen, die Micronucleusfrequenzen für Stavudin und das in dieser Versuchsreihe gleichzeitig geprüfte Lamivudin weisen ebenfalls keine auffällig hohen Werte auf. Die Viabilität ist mit 100% auch unauffällig. Möglicherweise liegt hier ein Applikationsfehler vor. Unsaubere Arbeit bei der Beimpfung und daraus resultierende Kontaminierung mit der Prüfsubstanz ist eine weitere mögliche Erklärung für die erhöhte Micronucleusfrequenz.

Stavudin

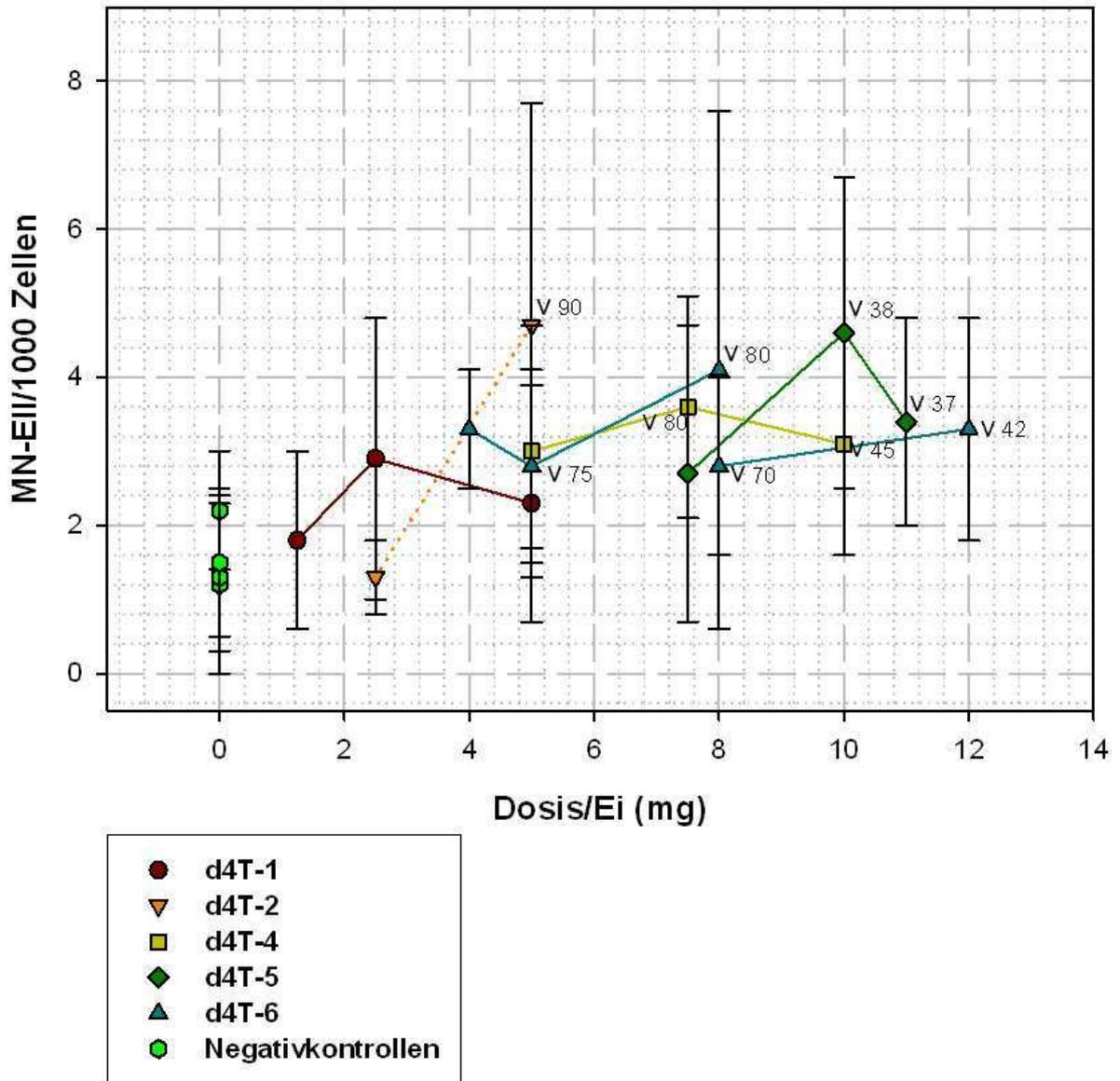
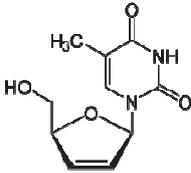


Abb. 5.2: Beobachtungen MN-EII/1000 Zellen der Versuchsreihen zu Stavudin (d4T).
 Pro Ei wurden 6000 Zellen ausgewertet. Die Micronucleusfrequenz der mitgeführten positiven Kontrollgruppe zeigte keinerlei Auffälligkeiten. V; Viabilitätsrate in %.

Substanzdaten und Toxizität – Stavudin (d4T)

Chemisch-physikalische Daten	
Struktur	
Summenformel	C10-H12-N2-O4
Molekulargewicht	224.21 g/mol
IUPAC	1-(2,3-dideoxy-beta-D-glycero-pent-2-enofuranosyl)-Thymine
Beschreibung	Drug Mutagen
Synonyme	2',3'-Didehydro-3'-deoxythymidine 2',3'-Dideoxy-2',3'-didehydrothymidine BMY 27857 d4T Estavudina (INN-Spanisch) Stavudin Zerit®
CAS-Nr.	3056-17-5
Toxikologie	
LD ₅₀ (NIOSH)*	p.o. 4 g/ kg (Ratte) i.v. >1200 mg/ kg (Ratte) p.o. 1 g/ kg (Maus) i.v. 1 g/ kg (Maus)
GeneTox (Auswahl relevanter Prüfsysteme)	
<i>in-vitro</i> -Test an Human-Lymphocyten **	genotoxisch
<i>in-vitro</i> -Test an Fibroblasten von Mäusen **	genotoxisch
<i>in-vivo</i> -Test zur „Chromosomenaberration“ **	genotoxisch
Cytogenetische Analyse (NIOSH) ***	p.o. 600 mg/kg/3d (Maus) - kontinuierlich
HET-MN	i.o. 2.5 mg/Ei
WHO/ IARC*	bisher keine Informationen

* GEKKAN YAKUJI, Pharmaceuticals Monthly, 1998, 40: 1944

Artikel nicht in Englisch verfügbar, zitiert nach rtcs-Datenbank, Stand: September 2007

** zitiert nach ABDA-Datenbank, Stand: 30.08.2006

*** LISS, ALAN R., Environmental and Molecular Mutagenesis, 1991, 18: 168 Artikel nicht verfügbar, zitiert nach rtcs-Datenbank, Stand: September 200.

Deoxycytidinanaloga

5.1.3 Zalcitabin (ddC)

Zalcitabin wurde 1992 von der FDA für die HIV-Therapie zugelassen, hauptsächlich im Rahmen der HAART in Kombination mit Zidovudin (MORSE *et al.* 1993).

2006 sollte Zalcitabin aufgrund der Schwere der Nebenwirkungen, insbesondere ist hier die periphere Neuropathie zu nennen, vom Markt genommen werden (TEMESGEN *et al.* 2006). Alle NRTHs sind bekannte mitochondriale Toxine, Zalcitabin hemmt die mitochondriale DNA jedoch effizienter als andere NRTHs oder die HIV-Reverse Transkriptase (KUKHANOVA *et al.* 1996), was die besondere schwere der Nebenwirkungen erklären würde.

In Studien zur akuten Toxizität zeigte sich, dass Versuchstiere, speziesabhängig, weniger sensitiv auf Zalcitabin reagieren als Menschen. So liegen die niedrigsten Plasmakonzentrationen von Zalcitabin, bei denen unerwünschte Effekte auftraten, bei Ratten 462-fach höher als beim Menschen (ABDA).

Im Ames-Test an sieben verschiedenen Bakterienstämmen, mit und ohne metabolische Aktivierung, konnte kein Hinweis auf Mutagenität festgestellt werden, ebenso wenig in Chromosomenaberrationstests an Lungenzellen chinesischer Hamster und Lymphomzellen von Mäusen. DNA-Synthesetests an Ratten-Hepatocyten zeigten keine Zunahme an DNA-Reparaturaktivitäten (ABDA). In Chromosomenaberrationstests an Human-Lymphocyten zeigte sich jedoch eine dosisabhängige Erhöhung der Chromosomenaberration (bei Zalcitabin-Dosen von 1,5 mg/ml und höher). Bei oralen Dosen von 2500 und 4500 mg/kg KG erwies sich Zalcitabin im Micronucleustest an Mäusen als clastogen (ABDA).

PHILLIPS *et al.* (1991) untersuchten Zalcitabin im Maus-Mikronucleustest, wobei sie weder eine erhöhte Mortalität noch eine erhöhte Knochenmarkstoxizität feststellen konnten. Allerdings verursachte Zalcitabin in ihren Untersuchungen eine leichte, aber signifikante Unterdrückung von PCEs in Ausstrichen des peripheren Blutes sowie im Knochenmark. Sie konnten für Zalcitabin einen signifikanten, dosisabhängigen, nicht linearen Anstieg micronucleierter PCE aufzeigen.

Zalcitabin in den Dosierungen 200, 500, 1000 und 2000 mg/kg KG appliziert.

In der Klinik ist bei Erwachsenen eine Gesamttagesdosis von 2,25 mg/Tag üblich (ABDA).

Bei einer Limitierung durch die Löslichkeit der Substanz und einer Beschränkung des Volumens durch das Versuchsobjekt Ei, konnte die von PHILLIPS *et al.* (1991) verwendete Höchstdosis von 2000 mg/kg KG nicht nachvollzogen werden.

Aufgrund der schweren Nebenwirkungen, der hohen mitochondrialen Toxizität und der allgemein schlechten Verträglichkeit wurde für den Dosisfindungsversuch als Höchstdosis 5 mg/Ei (77 mg/kg EG) angesetzt. Sowohl bei dieser Dosierung als auch bei 2.5 mg/Ei (38.5 mg/kg EG) betrug die Viabilität 0%. Erst bei einer Dosis von 1.25 mg/Ei (19 mg/kg EG) konnte eine Viabilität von 64 % erreicht werden. Auffallend waren bei allen Präparaten erhöhte Herzfrequenzen sowie abgestorbene Zehen und Flügelspitzen. Letzteres könnte möglicherweise ein Hinweis auf periphere Neuropathie sein.

Für das Versuchsmodell des angebrüteten Hühnereis kann festgehalten werden, dass es sensitiver bezüglich der Toxizität von Zalcitabin reagiert als von PHILLIPS *et al.* (1991) publiziert. Auch die in der ABDA-Datenbank angegebenen Werte werden unterschritten. Selbst bei einer Dosis von 2.5 mg/Ei, die nur 0.25 mg über der, in der Klinik gebräuchlichen, Tagesdosis für Erwachsene liegt, konnte in diesem Testmodell keine Viabilität erreicht werden.

Der Einfachheit halber wurde in den an den Dosisfindungsversuch anschließenden Versuchen 1 mg/Ei (15.4 mg/kg EG) als Höchstdosis gewählt. Damit liegt die hier geprüfte Höchstdosis etwa 129-mal niedriger als die von PHILLIPS *et al.* (1991) angegebene. Mit einer hochsignifikanten Micronucleus-frequenz von $52\% \pm 11.7$ ($\alpha = 0.002$) konnte im HET-MN eine um das 10-fach höhere Frequenz als bei PHILLIPS *et al.* (1991) erzielt werden (2000 mg/kg KG; $5.2\% \pm 1.31$, bzw. $4.5\% \pm 0.5$ [$p < 0.05$]).

Mit der niedrigsten im HET-MN eingesetzten Dosis von 0.2 mg/Ei (3.1 mg/kg EG), die um das 64-fache niedriger ist als die von PHILLIPS *et al.* (1991) untersuchte, konnte eine vergleichbare Micronucleusfrequenz von $3.4\% \pm 2.1$ in der Versuchsreihe ddC-2 bzw. $4.7\% \pm 4.2$ in der Versuchsreihe ddC-3 (PHILLIPS *et al.* (1991): $3.7\% \pm 0.62$) erreicht werden. Im Vergleich mit der begleitenden Negativkontrolle erweisen sich die im HET-MN gewonnenen Werte als leicht signifikant ($\alpha < 0.05$).

Die Ergebnisse zur akuten Toxizität von PHILLIPS *et al.* (1991), sowie die in der ABDA-Datenbank dargestellten Untersuchungen konnten im HET-MN für Zalcitabin nicht bestätigt werden. Ein dosisabhängiger biologisch und statistisch relevanter Anstieg der Micronucleusfrequenz konnte im HET-MN jedoch gezeigt werden. Der HET-MN reagierte dabei sensitiver auf Zalcitabin und zeigt bei deutlich niedrigeren Dosierungen höhere Micronucleusfrequenzen als der Micronucleustest an Mäusen.

Zalcitabin

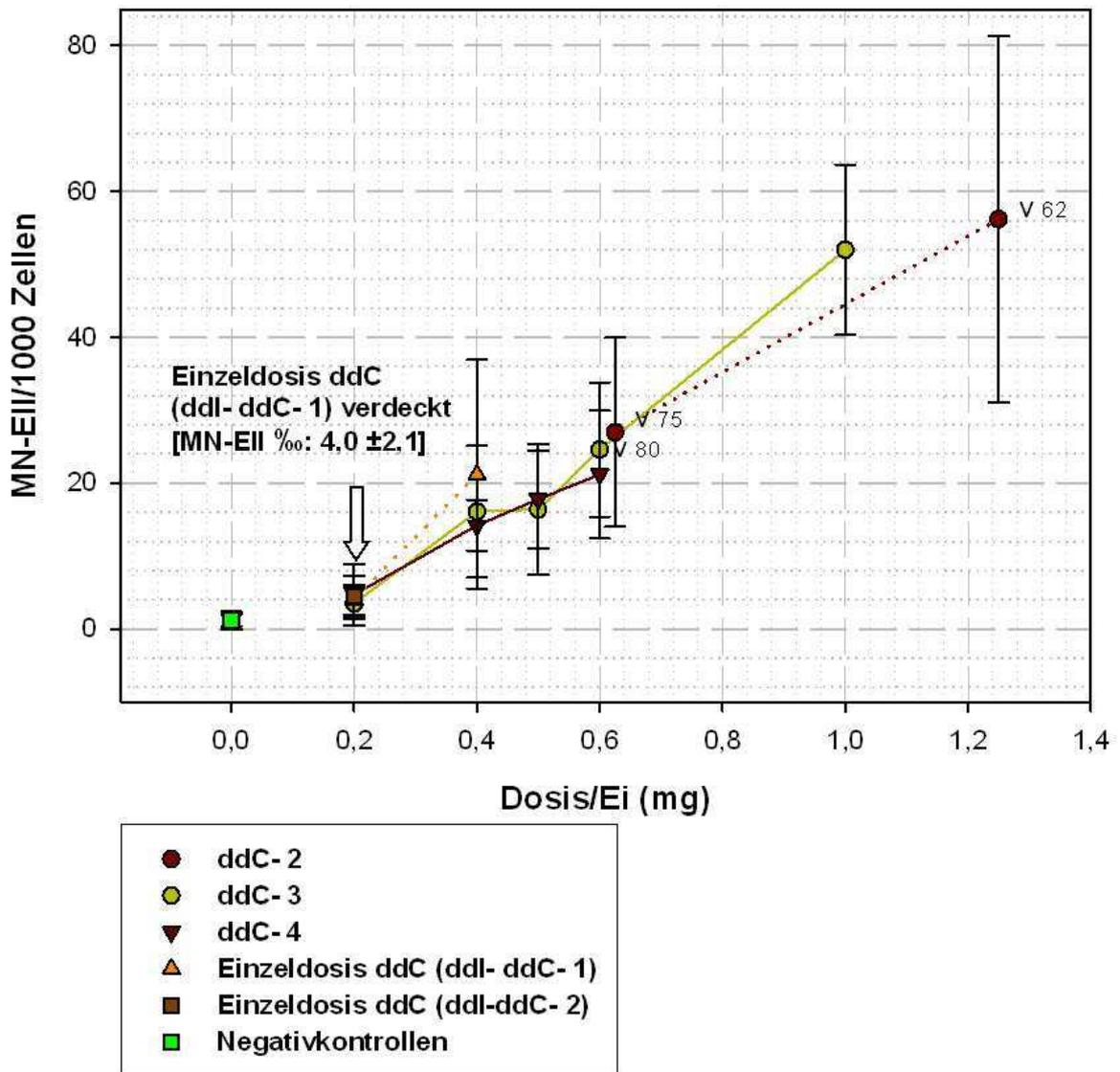
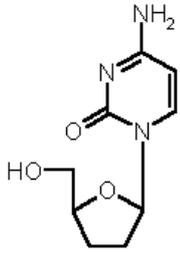


Abb. 5.3: Beobachtungen MN-EII/1000 Zellen der Versuchsreihen zu Zalcitabin (ddC). Pro Ei wurden 6000 Zellen ausgewertet. Die Micronucleusfrequenz der mitgeführten positiven Kontrollgruppe zeigte keinerlei Auffälligkeiten. V; Viabilitätsrate in %.

Substanzdaten und Toxizität – Zalcitabin (ddC)

Chemisch-physikalische Daten	
Struktur	
Summenformel	C ₉ H ₁₃ N ₃ O ₃
Molekulargewicht	211.22 g/mol
IUPAC	4-amino-1-[5-(hydroxymethyl)tetrahydrofuran-2-yl]-1H-pyrimidin-2-one
Beschreibung	Nucleosidanaloger Reverse Transkriptase Hemmer (NRTH)
Synonyme	D 2C ddC Hivid® NSC 606170 Ro 24-2027/000 Zalcitabin Dideoxycytidine 2',3'-Dideoxycytidine
CAS-Nr.	7481-89-2
Toxikologie	
LD₅₀ (NIOSH)	p.o. >2 g/kg (Ratte) p.o. >4 g/kg (Maus) i.v. >0,5 g/kg (Maus)
GeneTox (Auswahl relevanter Prüfsysteme)	
Cytogenetische Analyse * (NIOSH)	p.o. 6000 mg/kg/3d (Maus) – kontinuierlich
HET-MN	i.o. 0.2 mg/Ei
WHO/ IARC	Animal Sufficient Evidence. Human Inadequate Evidence. Group 2B (IARC)

* 200, 1000 und 2000 mg/kg/d (über 3 Tage), oral verabreicht. Untersucht wurde die MN-PCE-Frequenz im peripheren Blut pro 1000 PCE und die PCE-Frequenz pro Maus. Pro Maus wurden 1000 PCEs und 1000 NCEs gezählt. Als negative Kontrolle wurde das Lösungsmittel gewählt (Carboxymethylcellulose; CMC). Der Mittelwert an MN-PCE/1000 PCE beträgt für die negative Kontrolle 2.6 ± 0.19 , für die niedrigste ddC-Dosis (500 mg/kg/d) 5.0 ± 0.69 und für die höchste ddC-Dosis (2000 mg/kg/d) 4.5 ± 0.50 (PHILLIPS *et al.* 1991).

5.1.4 Lamivudin (3TC)

Lamivudin wurde 2001 in Europa für die HIV-Therapie zugelassen (FACHINFO, Stand Juli 2006). Es ist ein sehr verträglicher Wirkstoff, sowohl in Kombination mit anderen antiretroviralen Wirkstoffen als auch als Einzelpräparat (PERRY & FAULDS 1997). Mit der sehr geringen Affinität von Lamivudin für DNA-Polymerase γ ist die mitochondriale Toxizität geringer als die von Zalcitabin. Als häufigste Nebenwirkungen sind gastrointestinale Störungen angegeben (PERRY & FAULDS 1997).

WUTZLER & THUST (2001) geben in ihrem Artikel einen Überblick über die für Lamivudin verfügbaren Testergebnisse zu Clastogenität und Mutagenität. Im Genmutationstest an Bakterien und im Micronucleustest an Mäusen erwies sich Lamivudin als negativ. Positive Resultate konnten im Clastogenitätstest (Chromosomenaberrationstest) gefunden werden. WUTZLER & THUST (2001) berufen sich dabei auf die Physicians Desk Reference, ein in den USA erhältliches Dokument ähnlich der rtecs-Datenbank.

In der ABDA-DATENBANK wird Lamivudin bei Bakterientests als nicht mutagen angegeben, in *in-vitro*-Zytogenitätstests und Genmutationstests an Mauszellen (Maus Lymphom-Assay) wird für Lamivudin ein mutagenes Potenzial angenommen. Lamivudin wirkte *in vivo* in Dosierungen, bei denen Plasmakonzentrationen erreicht wurden, die um den Faktor 40 – 50 höher lagen als die üblichen klinischen Plasmakonzentrationen, nicht genotoxisch (ABDA-DATENBANK). Da die *in vitro* gezeigte mutagene Wirkung von Lamivudin in *in-vivo*-Tests nicht bestätigt werden konnte, wird davon ausgegangen, dass Lamivudin keine genotoxische Gefahr für den Patienten darstellt (ABDA-DATENBANK).

In Langzeitstudien an Ratten und Mäusen zeigte Lamivudin kein für den Menschen relevantes karzinogenes Potenzial, ebenso ergaben Reproduktionsstudien bei Tieren keinen Hinweis auf eine teratogene Wirkung von Lamivudin. Allein bei Kaninchen fand sich ein Hinweis auf frühe Embryoletalität, wenn Lamivudin in Dosen, die den in der Humantherapie üblichen vergleichbar sind, verabreicht wird (ABDA-DATENBANK).

Da für Lamivudin keine ausführliche Literatur bezüglich des Micronucleustest an Nagern erhältlich war, konnten die Versuche der vorliegenden Arbeit nicht auf Basis der Dosierungen aus der Literatur durchgeführt werden.

Sowohl Lösung als auch Tabletten konnten aufgrund der Physiologie des Hühnereis nicht in der klinischen Dosierung von 300 mg/Tag für Erwachsene und Kinder über 12 Jahren ins Ei appliziert werden.

Für die Untersuchungen im HET-MN wurde auf das Fertigarzneimittel Epivir® zurückgegriffen, da Lamivudin als Reinsubstanz von GlaxoSmithKline nicht erhältlich war. Der Einfachheit halber wurde in den Versuchen 3TC-1 bis 3TC-3

zunächst Epivir®, Lösung zum Einnehmen (10 mg/ml) verwendet, in den darauf folgenden Versuchsreihen 3TC-4 bis 3TC-6 wurden die besser verträglichen Epivir®-Tabletten (300 mg) eingesetzt.

5.1.4.1 Epivir®, Lösung zum Einnehmen, 10 mg/ml

Die Lösung zum Einnehmen wurde in den Versuchen 3TC-1 bis 3TC-3 verwendet. Im Modell des angebrüteten Hühnereis zeigte sie eine embryotoxische Wirkung was sich aus einer deutlich verringerten Viabilität an d9 schließen lässt. So konnte für die Lösung bei einer Dosierung von 4 mg/Ei nur noch eine Viabilität von 50% erreicht werden.

Die Lösung beinhaltet mehr Zusatzstoffe als die Tabletten, unter anderem 1,2-Propylenglykol, das sich in einem Verträglichkeitsversuch als embryotoxisch herausstellte. Das lässt vermuten, das 1,2-Propylenglykol mitverantwortlich für die Unverträglichkeit der Lösung ist.

Für die auswertbaren Dosisgruppen der Versuchsreihen 3TC-2 und 3TC-3 (2mg/Ei und 4 mg/Ei) konnten zum Teil biologisch relevant positive Ergebnisse erzielt werden. Bei 3TC-2 ergab sich für die erste Auszählung der Dosisgruppe 2mg/Ei ein negatives Ergebnis, in der zweiten Auszählung ein positives. Statistisch ließen sich keine Signifikanzen aufzeigen ($\alpha > 0.1$), weshalb man lediglich eine positive Tendenz annehmen kann.

In der Versuchsreihe 3TC-3 zeigen die Ergebnisse bei 2 mg/Ei leicht signifikant positive ($\alpha < 0.05$) und bei 4 mg/Ei hochsignifikant positive ($\alpha = 0.002$) Ergebnisse.

Aussagen über die dosisabhängigen oder -unabhängigen Auswirkungen der Lösung auf die Micronucleusfrequenz lassen sich nur tendenziell treffen. So deutet die Auswertung der Versuchsreihe 3TC-2 eine dosisunabhängige Wirkung an, wohingegen bei 3TC-3 eher eine dosisabhängige Tendenz anzunehmen ist.

Im Versuch 3TC-2 (d4T-4) zeigte die begleitende Negativkontrolle einen unüblich hohen Wert und liegt außerhalb der in der SOP festgelegten Negativkriterien. Begleitende Positivkontrolle, sowie Lamivudin und das in dieser Versuchsreihe gleichzeitig mitgeführte Stavudin weisen ebenfalls keine auffällig hohen Werte auf. Die Viabilität ist mit 100% nicht beeinträchtigt. Wie weiter oben erwähnt liegt hier möglicherweise ein Applikationsfehler vor. Denkbar wäre auch eine Kontaminierung der Multipipette® mit der Prüfsubstanz und daraus resultierend die erhöhte Micronucleusfrequenz.

5.1.4.2 *Epivir®*, Tabletten, 300 mg

Die Versuche mit den Tabletten (3TC-4 bis 3TC-6) zeigen deutlich, dass die Tabletten in diesem Modell besser vertragen werden, was daran liegen könnte, dass in den Tabletten weniger Hilfsstoffe enthalten sind. Besonders 1,2-Propylenglykol scheint den Embryo zu schädigen, da selbst geringe Mengen, einer Lösung aus Epivir®-Tabletten zugefügt, zum Absterben der Embryos an d9 führte (3TC-5; 3TC in 5 %iger PG-12-Lösung; Viabilität 0 %. Siehe hierzu Versuchstabelle im Anhang).

In den Versuchen 3TC-4 bis 3TC-6 lässt sich eine dosisabhängige Wirkung erkennen. Die Standardabweichungen sind aufgrund hoher Divergenzen innerhalb der Dosisgruppen sehr groß. Besonders im Versuch 3TC-5 sind die Standardabweichungen zum Teil gleich groß oder größer als die dazugehörige Micronucleusfrequenz. Der genaue Grund für diese Schwankungen innerhalb der Gruppen lässt sich nicht genau ermitteln. Da die Dosisvariation über unterschiedliche Volumina erreicht wurde, kann ein methodischer Fehler beim Ansetzen der Lösung ausgeschlossen werden, ein Applikationsfehler würde eine besonders hohe Micronucleusfrequenz erklären, nicht aber eine hohe Standardabweichung; weshalb auch dies als Fehlerquelle ausgeschlossen werden kann.

Anders als bei den Versuchen mit der Lösung zum Einnehmen zeigte der HET-MN hier für alle Dosisgruppen ein reproduzierbar positives Ergebnis, das in den Dosisgruppen von 3TC-5 sowie der von 30 mg/Ei bei 3TC-6 signifikant ($\alpha \leq 0.01$), in denen von 3TC-4 und der hohen Dosisgruppe von 3TC-6 hochsignifikant ($\alpha \leq 0.002$) war. Auffallend sind die in 3TC-5, trotz hoher Standardabweichungen, erzielten hochsignifikanten Ergebnisse.

Die Ergebnisse des HET-MN zeigen reproduzierbar, dass Lamivudin, bezüglich der Bildung von Micronuclei, in diesem Testmodell als positiv zu bewerten ist. Das von WUTZLER & THUST (2001) aufgeführte negative Ergebnis im Nager-Micronucleustest konnte im HET-MN nicht bestätigt werden.

Die Lösung zum Einnehmen zeigte sich im HET-MN als:

- embryotoxisch, auch bei geringen Dosierungen
- positiv im Sinne der SOP
- nicht gesichert dosisabhängig.

Die Tabletten zeigten sich:

- gut verträglich
- statistisch und biologisch relevant positiv
- deutlich dosisabhängig.

Lamivudin

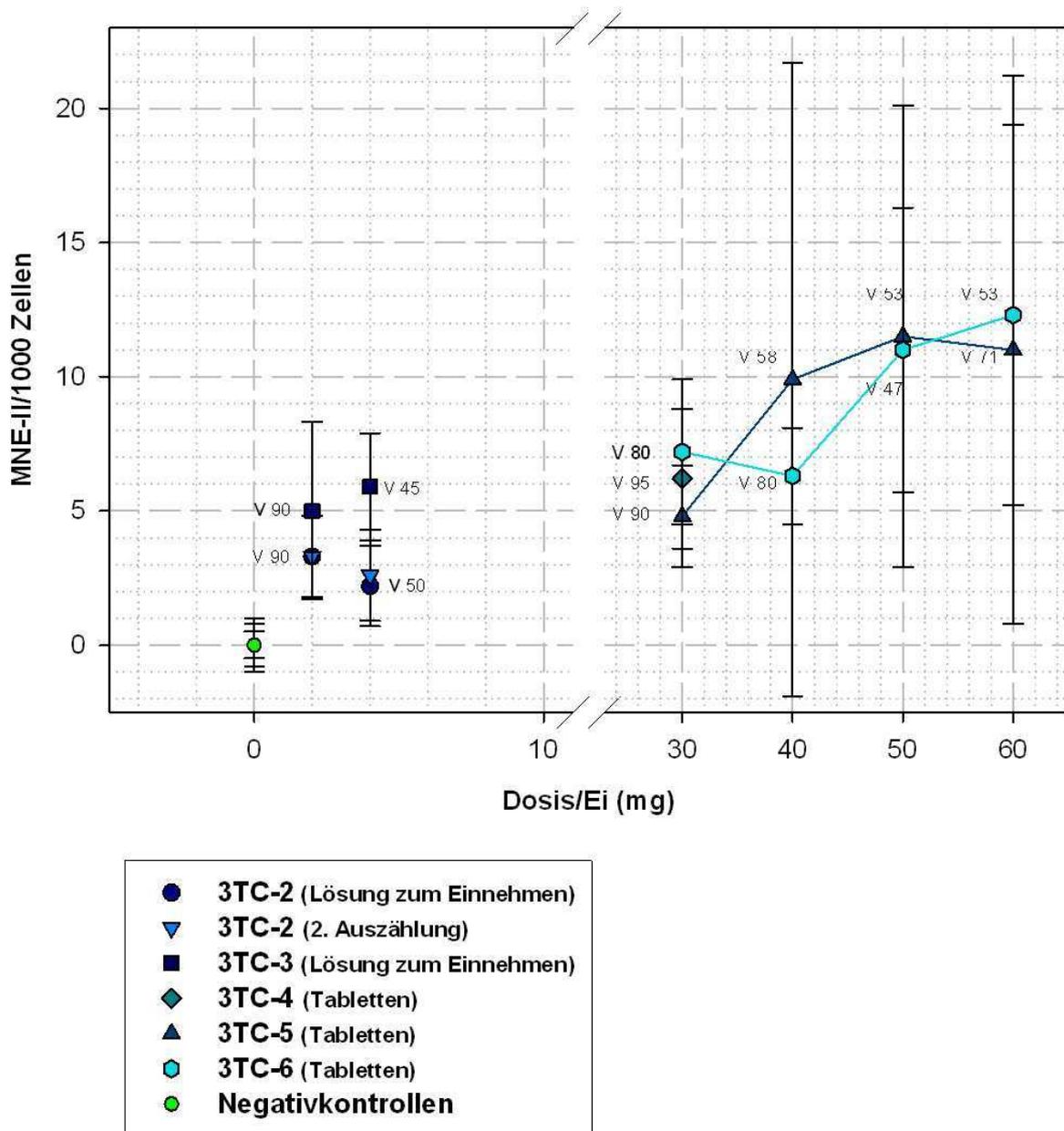
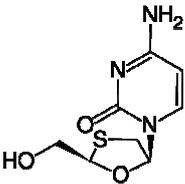


Abb. 5.4: Beobachtungen MN-EII/1000 Zellen der Versuchsreihen zu Lamivudin (3TC). Pro Ei wurden 6000 Zellen ausgewertet. Die Micronucleusfrequenz der mitgeführten positiven Kontrollgruppe zeigte keinerlei Auffälligkeiten. V; Viabilitätsrate in %.

Substanzdaten und Toxizität – Lamivudin (3TC)

Chemisch-physikalische Daten	
Struktur	
Summenformel	C ₈ H ₁₁ N ₃ O ₃ S
Molekulargewicht	229.28 g/mol
IUPAC	2(1H)-Pyrimidinone, 4-amino-1-((2R,5S)-2-(hydroxymethyl)-1,3-oxathiolan-5-yl)-
Beschreibung	Drug Reproductive Effector
Synonyme	BCH 189, (-)- (-)-BCH 189 Epivir® GR 109714X Lamivudin 3TC 3'-Thia-2',3'-dideoxycytidine
CAS-Nr.	134678-17-4
Toxikologie	
LD₅₀ (NIOSH) *	bisher keine Informationen
GeneTox (Auswahl relevanter Prüfsysteme)	
Bakterientests *	nicht mutagen
in-vitro Genmutationstest (Maus- Lymphom- Assay)*	mutagen
HET-MN	i.o. 2 mg/Ei – Lösung zum Einnehmen i.o. 30 mg/Ei – Tabletten
WHO/ IARC*	bisher keine Informationen

* Zitiert nach ABDA-DATENBANK. Stand: 30.08.2006. WUTZLER & THUST (2001) treffen zu diesem Test keine Aussage.

5.2 Purinanaloga

Deoxyadenosinanaloga

5.2.1 Didanosin (ddl)

Didanosin ist ein Analogon zum Purin Inosin. Die Zulassung für den deutschen Markt erfolgte 1992 (FACHINFORMATION, VIDEX 2008).

In Studien zur akuten Toxizität von Didanosin zeigte sich Didanosin gut verträglich. Laut ABDA-DATENBANK die LD_{low} bei über 2000 mg/kg KG für Mäuse, Ratten und Hunde. Bei PHILLIPS *et al.* (1991) wird eine LD₅₀ von 5000 mg/kg KG für Didanosin erwähnt, allerdings ohne weitere Angaben zu Route oder Spezies. Bei Studien mit Dosierungen die etwa dem 1.2 – 12-fachen der in der Humantherapie gebräuchlichen Dosierung entsprechen und über mehr als 90 Tage verabreicht wurden gibt es Hinweise für eine dosislimitierende Toxizität (FACHINFORMATION, VIDEX 2008).

In zahlreichen Testmodellen zur Mutagenität erwies sich, dass Didanosin in biologisch und pharmakologisch relevanten Dosierungen keine mutagene Wirkung aufweist. In hohen *in-vitro*-Dosierungen war Didanosin genotoxisch, und zwar in einer Größenordnung wie sie auch bei natürlichen DNA-Nucleosiden vorkommt (FACHINFORMATION, VIDEX 2008).

Phillips *et al.* (1991) haben Didanosin im Micronucleustest am Knochenmark und Blutaussstrichen des peripheren Blutes von Mäusen untersucht. In allen Versuchen in denen Didanosin oral verabreicht wurde, konnten keine signifikante Veränderung in der Anzahl micronucleierter PCEs oder der Anzahl an PCEs festgestellt werden. In einer Untersuchung der Blutaussstrichpräparate des ersten Versuchs, in dem Didanosin intraperitoneal verabreicht worden war, zeigte sich Didanosin jedoch positiv bezüglich der Induzierung von Micronuclei und in der Hemmung von PCEs im peripheren Blut. YARCHOAN *et al.* (1989) weisen darauf hin, dass Didanosin durch den pH-Wert im Magen inaktiviert werden kann, weswegen eine orale Gabe dieser Substanz zu einem negativen Ergebnis führen kann.

Bei lebenslangen Cancerogenitätsstudien an Ratten und Mäusen konnten während und nach der Behandlung keine arzneistoffbedingten Neoplasmen beobachtet werden (ABDA).

In der Klinik ist eine Dosierung von 400 mg/Tag bei einem Körpergewicht ≥ 60 kg und 250 mg/Tag bei einem Körpergewicht von < 60 kg üblich. Bei Kindern richtet sich die empfohlene Tagesdosis nach der Körperoberfläche (KOF) und beträgt 240

mg/m³ KOF/Tag bzw. 180 mg/m³ KOF/Tag, wenn es in Kombination mit Zidovudin verabreicht wird.

Im HET-MN sind nur Dosierungen unterhalb derer von PHILLIPS *et al.* (1991) eingesetzt worden, da das Versuchsobjekt Ei eine Beschränkung des Volumens erfordert und die Löslichkeit der Substanz limitiert ist.

In Anbetracht der in der Literatur beschriebenen guten Verträglichkeit von Didanosin wird im Dosisfindungsversuch eine Höchstdosis in Höhe von 20 mg/Ei (307 mg/kg EG) festgelegt. Die von PHILLIPS *et al.* (1991) getesteten hohen Dosierungen von bis zu 3000 mg/kg KG konnten aus den oben genannten Gründen nicht aufgegriffen werden.

Didanosin ist sehr anfällig gegenüber niedrigen pH-Werten. Bei der Applikation über die Luftkammer des Eis ist jedoch keine Exposition gegenüber Körperflüssigkeiten mit niedrigem pH-Wert zu erwarten, so dass nicht mit einer pH-bedingten Inaktivierung zu rechnen ist.

Der Dosisfindungsversuch ddI-1 ging nicht in die Auswertung und Darstellung der Ergebnisse ein, da die Zahl der eingesetzten und auswertbaren Eier zu gering war. Tendenziell ließ sich jedoch für 20 mg/Ei eine verminderte Viabilität und für 10 mg/Ei eine deutlich erhöhte Micronucleusfrequenz vermuten, so dass in den folgenden Versuchen 5 mg/Ei als Höchstdosis gewählt wurde.

Hier zeigte die begleitende Positivkontrolle mit 22.2 ‰ ± 2.5 einen auffällig hohen Wert, da jedoch keine der anderen Dosisgruppen oder die Negativkontrolle Auffälligkeiten zeigen könnte hier, wie schon oben erwähnt, ein Applikationsfehler durch unsaubere Arbeit mit der Tuberkulinspritze die Erklärung für diesen Wert sein.

Die von PHILLIPS *et al.* (1991) beschriebenen positiven Ergebnisse konnten im HET-MN reproduzierbar qualitativ bestätigt werden. Die niedrigste von PHILLIPS *et al.* (1991) positiv getestete Dosierung war 200 mg/kg KG (3.6 ‰ ± 0.73). Bei einer etwa 10-fach geringeren Dosis von 19.1 mg/kg EG (1.25 mg/Ei) wurde mit 3.8 ‰ ± 1.7 ein vergleichbares Ergebnis erzielt, das sich in Bezug auf die Negativkontrolle leicht signifikant positiv darstellt.

Mit der hier eingesetzten Höchstdosis von 5 mg/Ei (76.8 mg/kg EG) liegt der HET-MN etwa 2.5-mal niedriger als die niedrigste von PHILLIPS *et al.* (1991) eingesetzte Dosis. Die Testantwort von 17.2 ‰ ± 12.8 und 17.3 ‰ ± 10.1 bei dieser Dosierung liegt annähernd 5-mal so hoch bei PHILLIPS *et al.* (1991). Diese Werte sind signifikant verschieden von denen der negativen Kontrollgruppen.

Diese Werte lassen die Vermutung zu, dass der HET-MN bei gleicher Dosierung empfindlicher auf Didanosin reagiert als der Micronucleustest an Nagern.

Didanosin

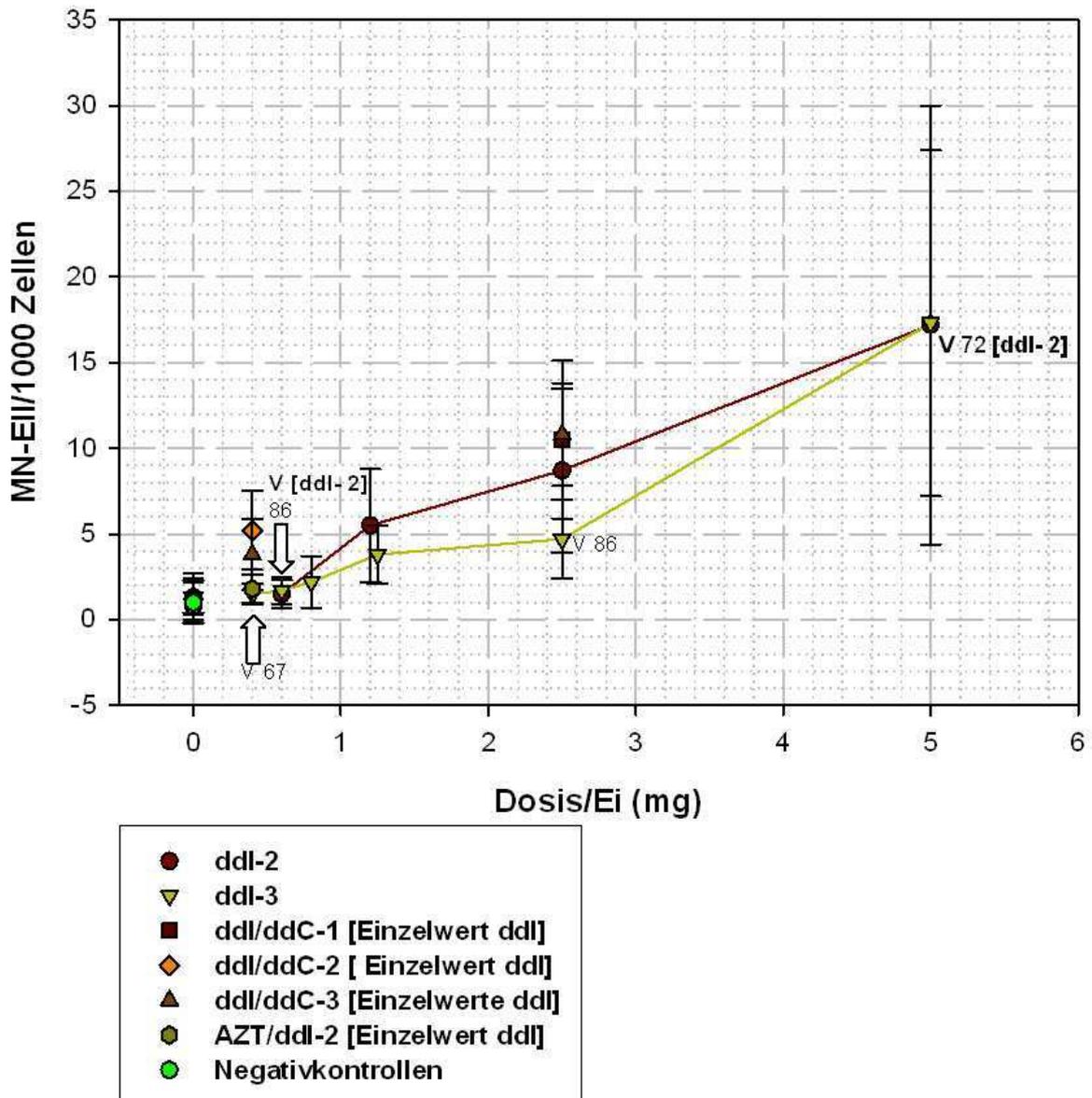
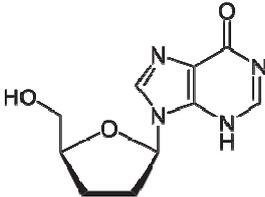


Abb. 5.5: Beobachtungen MN-EII/1000 Zellen der Versuchsreihen zu Didanosin (ddi). Pro Ei wurden 6000 Zellen ausgewertet. Die Micronucleusfrequenz der mitgeführten positiven Kontrollgruppe zeigte keinerlei Auffälligkeiten. V; Viabilitätsrate in %.

Substanzdaten und Toxizität – Didanosin (ddl)

Chemisch-physikalische Daten	
Struktur	
Summenformel	C ₁₀ H ₁₂ N ₄ O ₃
Molekulargewicht	236.23 g/mol
IUPAC	9-[5-(hydroxymethyl)tetrahydrofuran-2-yl]-3,9-dihydropurin-6-one
Beschreibung	Nucleosidanaloger Reverse Transkriptase Hemmer (NRTTH)
Synonyme	ddl Didanosine Dideoxyinosine 2',3'-Dideoxyinosine BMY 40900 NSC 612049 Videx®
CAS-Nr.	69655-05-6
Toxikologie	
LD₅₀ (NIOSH)	p.o. > 2 g/kg (Ratte) p.o. > 2 g/kg (Maus)
GeneTox (Auswahl relevanter Prüfsysteme)	
Cytogenetische (NIOSH) Analyse*	i.p. 6.000 mg/kg/3d (Maus) – in Abständen
HET-MN	i.o. 1.2 mg/Ei
WHO/ IARC	Animal Inadequate Evidence. Human Inadequate Evidence. Group 3. (IARC)

* 200, 1000 und 2000 mg/kg/d (über 3 Tage), intraperitoneal injiziert. Untersucht wurde die MN-PCE- Frequenz im peripheren Blut pro 1000 PCE und die PCE-Frequenz pro Maus. Pro Maus wurden 1000 PCEs und 1000 NCEs gezählt. Als negative Kontrolle wurde das Lösungsmittel gewählt (Carboxymethylcellulose; CMC). Der Mittelwert an MN-PCE/1000 PCE beträgt für die negative Kontrolle 1.6 ± 0.24 , für die niedrigste ddl-Dosis (200 mg/kg/d) 3.6 ± 0.73 und für die höchste ddl-Dosis (2000 mg/kg/d) 5.6 ± 1.23 (PHILLIPS *et al.* 1991).

5.3 Kombinationsversuch

5.3.1 Zidovudin-Didanosin (AZT-ddI)

Seit vermutet wird, dass die Effektivität von Monotherapien in der Behandlung einer HIV-Infektion durch das Auftreten von Resistenzen und Arzneimittelbedingten Toxizitäten eingeschränkt ist, sucht man nach sinnvollen Kombinationen mit antiretroviralen Substanzen.

Abhängig vom Aktivitätsstatus der Zielzelle sind Zidovudin und Didanosin in PBMCs unterschiedlich aktiv. Hat Didanosin in ruhenden Zellen die höhere Aktivität, so ist Zidovudin in replizierenden Zellen aktiver. Diese in der HIV-Therapie übliche Kombination von Wirkstoffen, von denen der eine in ruhenden, der andere in sich teilenden Zellen aktiv ist, ist ein Grund für den kombinierten Einsatz von Zidovudin und Didanosin bei HIV-positiven Patienten (PERRY & BALFOUR 1996).

Gründe für eine Kombinationstherapie lassen sich wie folgt zusammenfassen:

- additive oder synergistische Hemmung der Virusreplikation
- Reduktion der Einzeldosierungen, sollte eine Synergie zwischen den Wirkstoffen einer Kombinationstherapie bestehen
- verzögertes Auftreten resistenter Virusstränge.

In klinischen Studien konnte gezeigt werden, dass eine Behandlung mit Didanosin allein oder in Kombination mit Zidovudin – im Vergleich mit einer Zidovudin-Monotherapie – das Risiko des Fortschreitens einer HIV-Erkrankung, bzw. das Mortalitätsrisiko bei einer HIV-Infektion, reduzieren kann. In einer anderen Studie konnte durch eine Kombination von Zidovudin und Didanosin die Viruslast reduziert werden (FACHINFORMATION, VIDEX 2008).

Dagegen sprechen, dass Zidovudin und Lamivudin in die maternale und besonders die fötale DNA von Säugern (POIRIER *et al.* 1999 & OLIVERO *et al.* 2001) und Menschen (OLIVERO *et al.* 1999) eingebaut werden können. In einer Untersuchung von MENG *et al.* (2000) führte eine Kombination von Zidovudin mit Didanosin zu einem vermehrten Einbau von Zidovudin in die zelleigene DNA. Demzufolge besteht möglicherweise ein Potenzial für chromosomale Schäden. Eine erhöhte Chromosomenaberrationsrate ist wiederum ein anerkannter Indikator für ein canzerogenes Potenzial (BONASSI *et al.* 2000).

Zur Behandlung einer HIV-Infektion während der Schwangerschaft gehört eine Post-expositionelle Prophylaxe (PEP) durch plazentagängige antiretrovirale Substanzen und eine vertikale Transmission von HIV zu verhindern. Dies führt zu

einer indirekten Exposition des Fötus. Auf einen längeren Zeitraum betrachtet könnte dadurch die Gesundheit des Kindes beeinträchtigt werden.

BISHOP *et al.* (2004) untersuchten Zidovudin und Didanosin in Kombination an jungen und adulten Mäusen. Dazu wurden Mäuse während der Gestation und Laktationsphase mit einer Kombination der Substanzen behandelt. Beide Substanzen sind plazentagängig, das heißt die jungen Mäuse wurden während der Gestation und später auch während der Laktationsphase indirekt den Wirkstoffen ausgesetzt. Vier Tage nach der Geburt wurde die direkte Behandlung mit der gleichen Dosierung wie bei den adulten Tieren aufgenommen. Die Blutentnahmen fanden an PND (*postnatal day*) 1, 4, 8 und 21 statt.

Im Vergleich mit den begleitenden Negativkontrollen zeigten sowohl die infantilen als die adulten Mäuse dramatische genetische Schäden, eine Beobachtung, die auch von Untersuchungen durch PHILLIPS *et al.* (1991) an Nagern, bestätigt wurde.

Gesicherte Aussagen zu ähnlichen Beeinträchtigungen beim Menschen können aufgrund unzureichender cytogenetischer Studien nicht getroffen werden BISHOP *et al.* (2004).

Im HET-MN wurden Dosierungen gewählt, die sich in den Einzelversuchen zu diesen Substanzen als annähernd negativ erwiesen hatten. Verglichen wurde die an PND 1 mit geringster Dosierung untersuchte Gruppe von BISHOP *et al.* (2004) (50 mg Zidovudin/ 250 mg Didanosin/kg EG) erzielten Micronucleusfrequenzen der jungen Mäuse verglichen.

Zunächst wurden im Versuch AZT/ddI-1 0.05 und 0.025 mg Zidovudin/Ei in Kombination mit 0.4 mg Didanosin/ Ei als stationärer Dosis untersucht.

Verglichen mit der begleitenden Negativkontrolle und Einzelsubstanzen ergab sich mit $3.6\% \pm 2.4$ und $3.4\% \pm 1.4$ ein Anstieg der Micronucleusfrequenz; ein additiver Effekt bezüglich der Micronucleiinduktion ließ sich daraus jedoch nicht ableiten.

In der Versuchsreihe AZT/ddI-2 wurden die Dosierungen von Zidovudin auf 1 mg/Ei und 3 mg/Ei angehoben. Didanosin wurde als stationäre Dosisgruppe bei 0.4 mg/Ei belassen. Die Dosierung von 3 mg Zidovudin/Ei entspricht 46 mg/kg EG und damit in etwa der niedrigsten von BISHOP *et al.* (2004) gewählten Dosis (50 mg/kg KG).

Auch hier konnte ein Anstieg der Micronucleusfrequenz ohne additiven Effekt in der Induktion von Micronuclei beobachtet werden ($4.2\% \pm 1.2$ und $6.2\% \pm 1.9$).

Zu einem dramatischen Anstieg der Micronucleusfrequenz kommt es bei AZT/ddI-3. Hier wurde für Zidovudin und Didanosin jeweils nur eine Dosierung gewählt, 2.5 mg/Ei Zidovudin und 2.5 mg/Ei Didanosin (38 mg/kg EG). Damit liegt

Zidovudin etwas unter 50 mg/kg KG, Didanosin entspricht 1/6 der niedrigsten Dosierung von BISHOP *et al.* (2004) (250 mg/kg KG).

Die Frequenz schnellte von 6.2 ‰ ± 1.9 nach Monoapplikation auf 58.8 ‰ ± 38.8 in der Kombination hoch. BISHOP *et al.* (2004) erreichen an PND 1 eine Micronucleusfrequenz von 9.2 ‰ ± 1.03. Damit zeigte der HET-MN eine etwa 6-mal höhere Micro-nucleusfrequenz.

Da im vorangegangenen Versuch eine höhere Zidovudin-Dosis zwar zu einer erhöhten aber nicht additiven Micronucleusfrequenz geführt hat, liegt dieser deutlich überadditive Anstieg micronucleierter Zellen möglicherweise an der erhöhten Didanosin-Dosis. Diese Aussage konnte aus zeitlichen Gründen nicht durch einen Wiederholungsversuch gestützt werden und kann daher nur als Tendenz betrachtet werden.

Die von BISHOP *et al.* (2004) getroffenen Aussagen der erhöhten chromosomalen Schäden bei einer Kombination von Zidovudin und Didanosin können in allen Versuchsreihen durch die im HET-MN gewonnenen Daten bestätigt werden.

Eine Kombination von Zidovudin und Didanosin kann also zum einen die Viruslast als auch ein Voranschreiten der HIV-Erkrankung reduzieren, auf der anderen Seite kann bei einer Kombinationen antiretroviraler Substanzen ein vermehrter Einbau in die zelleigene DNA stattfinden. Letzteres ist besonders bei fötaler DNA ein Risiko, da sich viele Gewebe im Aufbau befinden und Schäden für die längerfristige Gesundheit nicht abzuschätzen sind.

Zidovudin – Didanosin

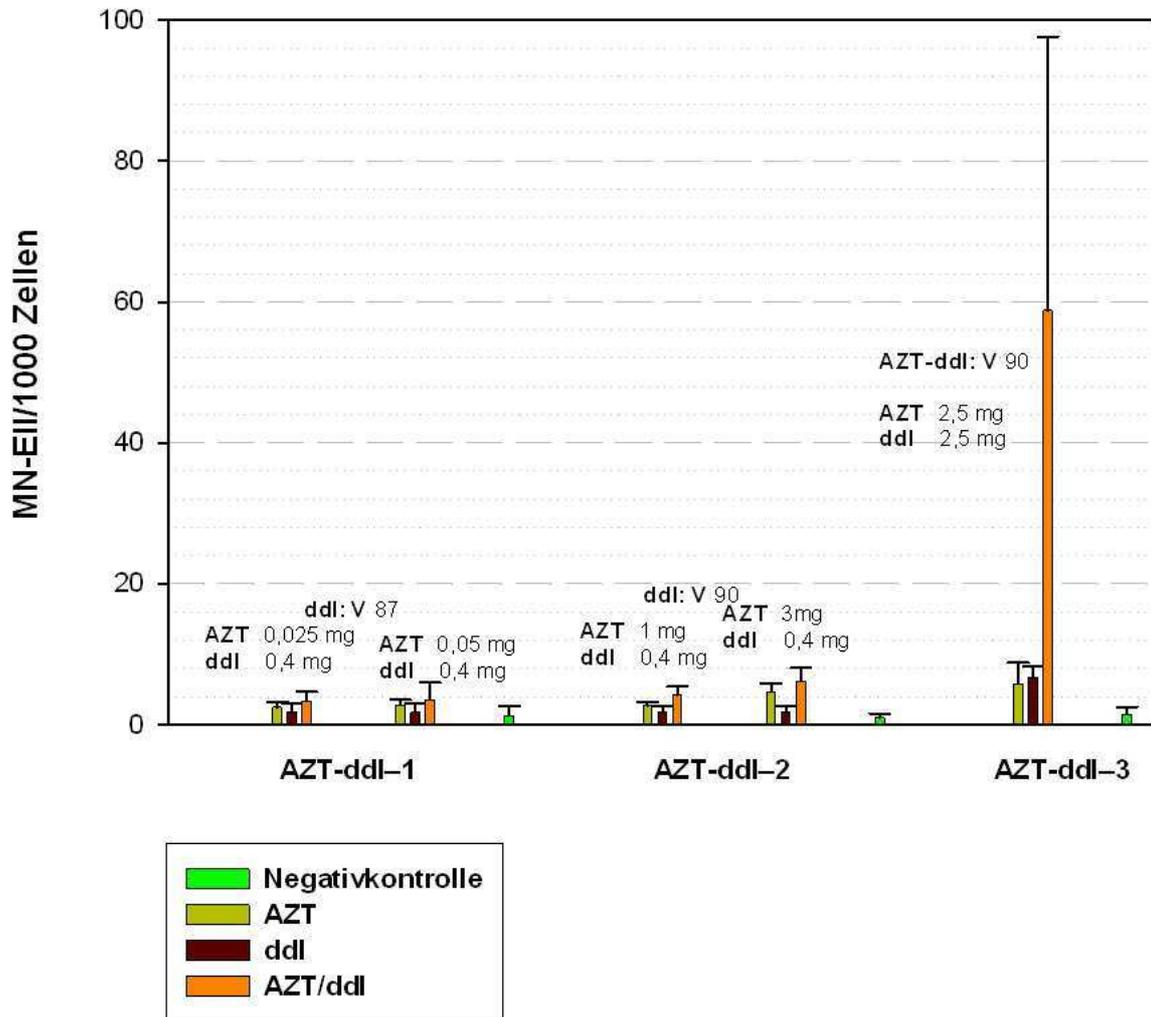


Abb. 5.7: Bestimmung der Micronucleusfrequenz in ‰ bei Kombination der Substanzen Zidovudin und Didanosin. Pro Ei wurden 6000 Zellen ausgewertet. Die Micronucleusfrequenz der mitgeführten positiven Kontrollgruppe zeigte keinerlei Auffälligkeiten. V; Viabilitätsrate in %.

5.4 Interne Selbstkontrolle

In der internen Selbstkontrolle wurden die positiven und negativen Kontrollgruppen des Versuchs AZT/ddI-3 nachträglich zweimal von der ungeübten Untersucherin KB ausgezählt und die Ergebnisse mit denen der geübten Untersucherin CN verglichen.

Die Ergebnisse zeigen deutlich höhere Micronucleusfrequenzen in den von KB ausgezählten Objektträgern, allerdings weisen die Unterschiede keine Signifikanzen zu den Ergebnissen von CN auf ($\alpha > 0,1$).

Die Ursache hierfür könnte darin liegen, dass die Parameter für eine sichere Auszählung der Zellen klar definiert sind und die ausgezählten Objektträger der positiven und negativen Kontrollgruppen keine Abweichungen von der Norm aufwiesen.

So kann es bei einigen Substanzen zu sehr kleinen Micronuclei kommen, die als Verschmutzung missdeutet werden können, oder aber, wie bei Zidovudin, können vermehrt Amitosen auftreten, bei denen wiederum die Abgrenzung zu großen Micronuclei schwierig ist.

Derartige Abweichungen erschweren eine korrekte Auszählung.

Es hat sich gezeigt, dass bei Zugrundelegung einheitlicher Kriterien und nach angemessener Einarbeitung Ergebnisse erzielt werden können, die weitestgehend unabhängig von der Person des Untersuchers sind.

Interne Selbstkontrolle

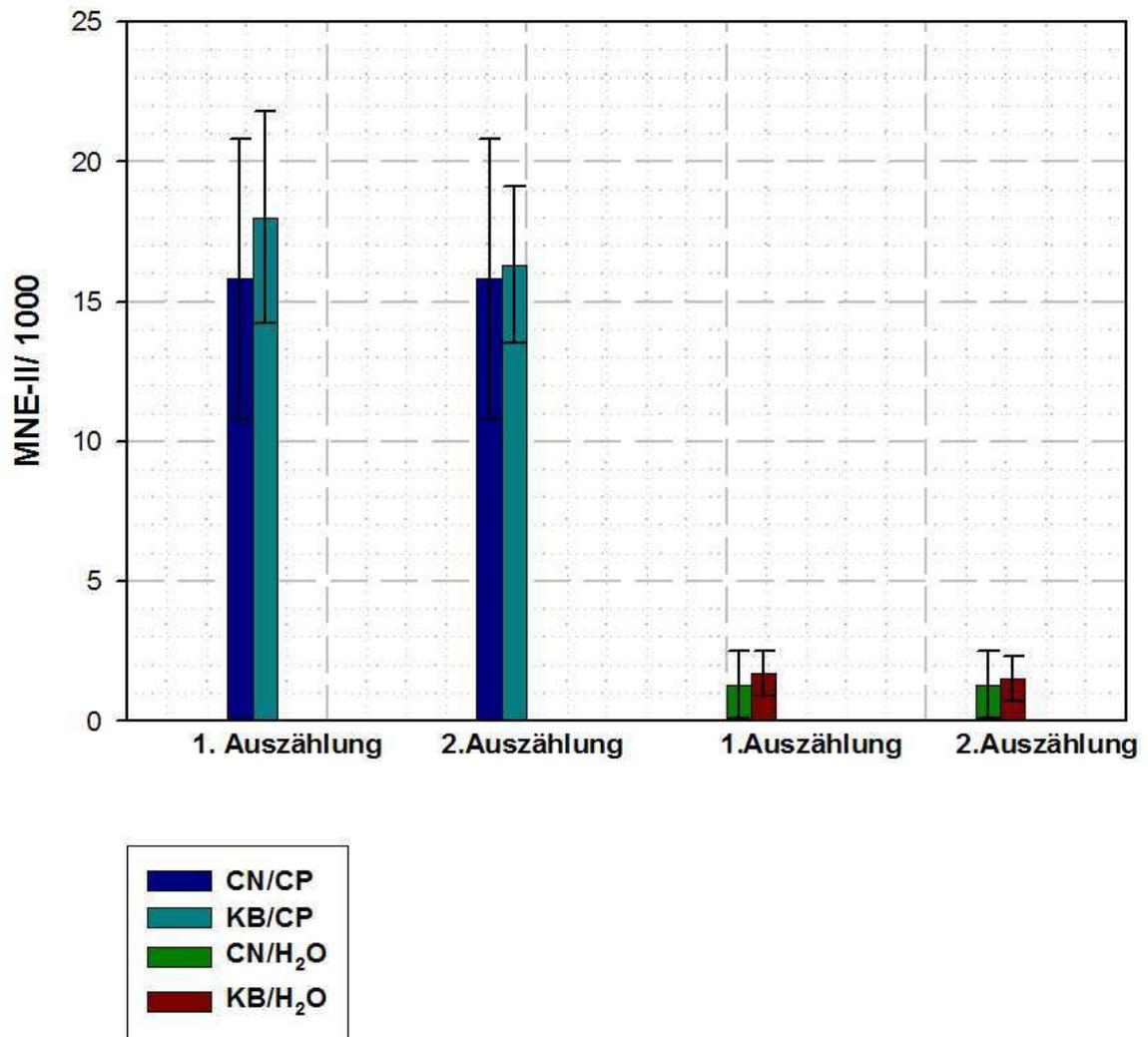


Abb. 5.8: Darstellung der internen Selbstkontrolle.

Verglichen wurden die Auszählungen der positiven und negativen Kontrollgruppen des Versuchs AZT/ddl-3 durch CN mit denen von KB. **CN**: geübte Untersucherin; **CP**: Cyclophosphamid; **H₂O**: bidestilliertes Wasser; **KB**: ungeübte Untersucherin.

5.5 Zusatz

5.5.1 Zidovudin und Stavudin (AZT-d4T)

Stavudin ist ein Analogon zu 2'-Deoxythymidin und gehört zu den NRTDs. Es hemmt die virale DNA-Synthese durch DNA-Kettenabbruch. Ebenso kann es die zellulären DNA-Polymerasen, speziell mitochondriale DNA-Polymerase γ , hemmen. Die Hemmung dieser Polymerase kann eine Ursache für periphere Neuropathie sein und stellt den Hauptlimitierungsgrund für Patienten bezüglich der Dosis dar. Stavudin hat eine geringe Affinität zu TK1, wohingegen AZT eine geringe Affinität zu TK2 aufweist. Diese antagonistischen Interaktionen sind die pharmakologische Begründung um sich gegen eine Kombination dieser beiden Substanzen auszusprechen (STEIN & MOORE 2001).

BISHOP *et al.* (2004) haben die Kombination Zidovudin und Stavudin untersucht und kamen zu dem Ergebnis, dass diese Kombination, verglichen mit der negativen Kontrolle, zu einer Erhöhung der chromosomalen Schäden führt.

Die Ergebnisse zum Kombinationsversuch Zidovudin und Stavudin (AZT/d4T-1) wurden bislang noch nicht in einem zweiten Versuch überprüft und können daher nur tendenziell bewertet werden.

Wie in dem vorangehend beschriebenen Kombinationsversuchen wurden Zidovudin und Stavudin in gleicher Weise wie in den Einzelversuchen gelöst und aufbereitet.

Jede Dosierung der Kombinationsgruppen wurde zusätzlich als Einzeldosis appliziert. Stavudin war in dieser Untersuchung mit 5 mg/Ei die stationäre Dosis. Zidovudin wurde einmal mit 4 und in einer zweiten Gruppe mit 6 mg/Ei geprüft.

Die Ergebnisse der Untersuchung lassen vermuten, dass die von BISHOP *et al.* (2004) aufgestellte Aussage der zunehmenden chromosomalen Schäden bei einer kombinierten Applizierung von Zidovudin und Stavudin im HET-MN bestätigt werden können.

Beide Kombinationsgruppen weisen im Vergleich mit der mitgeführten negativen Kontrolle hochsignifikant gestiegene Micronucleusfrequenzen auf ($\alpha = 0.002$).

Zidovudin in Kombination mit Stavudin bei 4 bzw. 5 mg/Ei ergibt eine Micronucleusfrequenz von 11.3 ± 2.3 , bei 6 mg Zidovudin und 5 mg Stavudin/Ei wird eine Micronucleusfrequenz von 18.7 ± 5.7 erreicht.

Hier besteht weiterer Klärungsbedarf.

6 Zusammenfassung

Die gesetzlich vorgeschriebenen Prüfungen neuer Chemikalien oder Arzneimittel auf ihr Gefahrenpotenzial sehen eine Reihe von nicht nur chemisch-physikalischen Untersuchungen, sondern auch solche an Tieren vor. Diesen, dem Verbraucherschutz dienenden Regelungen, steht der Schutz des Tieres gegenüber. So ist im Tierschutzgesetz (TSCHG) dem Bürger eine Verantwortung für das Tier als Mitgeschöpf übertragen, die es verbietet dem Tier Schmerzen oder Schaden zuzufügen (§1, TSCHG).

Wenn der verfolgte Zweck durch alternative Methoden erreicht werden kann soll daher auf Tierversuche verzichtet werden.

Ansätze dies zu erreichen sind eine geringere Belastung der Tiere durch verbesserte Haltung und modifizierte Versuchsprotokolle, eine Reduzierung verwendeter Tiere, zum Beispiel durch international anerkannte Prüfergebnisse, und ein Ersatz von Tierversuchen durch die Entwicklung alternativer Methoden ohne Tiereinsatz.

Als Prüfung auf das genotoxische Potenzial einer Substanz ist die Entstehung von Micronuclei in proliferierendem Gewebe als genetischer Endpunkt wissenschaftlich und behördlich anerkannt.

Zugrunde liegendes Experimentalmodell für diesen Test sind zumeist Mäuse und Ratten, deren Knochenmark das Zielgewebe dieses Tests darstellt. Da es zur Untersuchung entnommen wird, geht dieses Testmodell mit dem Tod der verwendeten Tiere einher.

Auch Ansätze, die die Verwendung von Knochenmark vermeiden, sind aus rechtlicher Sicht Tierversuche, da auch hier eine Behandlung der Tiere zu Versuchszwecken stattfindet.

Die vorliegende Arbeit greift den von WOLF & LÜPKE (1997) sowie WOLF (1999) vorgestellten HET-MN (Hen's Egg Test for MicroNucleus induction) auf, der angebrütete Hühnereier als Experimentalmodell verwendet (Bebrütungsdauer 11 Tage, d11). Zielorgan ist das periphere Blut der extraembryonalen Membranen. Das entnommene Blut wurde nach modifizierten hämatologischen Standardverfahren angefärbt und die Zellen im Hellfeld-Durchlicht-Mikroskop bei 1000-facher Vergrößerung ausgezählt.

Der HET-MN vereint in sich mehrere bedeutende Vorteile, die ihn sowohl zu einem Alternativmodell zu *in-vitro*-Mutagenitätstest, als auch zum Tierversuch machen, da er trotz der komplexen physiologischen Eigenschaften des angebrüteten Hühnereis rechtlich weltweit als *in-vitro*-Testsystem eingestuft wird

und weder ethisch noch rechtlich mit den einschlägigen Belangen des Tierschutzes kollidiert.

Anhand der nucleosidanalogen Reverse Transkriptase Hemmer Zidovudin, Stavudin, Zalcitabin, Lamivudin und Didanosin fand ein Abgleich mit den durch Tierversuche gewonnenen Daten statt.

6.1 Pyrimidinanaloga

Deoxythymidinanaloga

6.1.1 Zidovudin (AZT)

Die Ergebnisse unserer Untersuchungen zeigen, dass der HET-MN sensitiver auf die Induktion von Micronuclei durch Zidovudin reagiert, als bislang für den der Knochenmarksmicronucleustest am Säuger belegt.

Im HET-MN konnten die von PHILLIPS *et al.* (1991) und DERTINGER *et al.* (1996) publizierten Ergebnisse bezüglich einer Micronucleusinduktion durch Zidovudin bestätigt werden. Bei einer 10-fach geringeren Dosis als PHILLIPS *et al.* (1991) zeigte der HET-MN vergleichbare Micronucleusfrequenzen, bei vergleichbaren Dosierungen wurden doppelt so hohe Micronucleusfrequenzen erreicht.

Auch im Vergleich mit dem von DERTINGER *et al.* (1996) verwendeten Tierversuch und dem gewählten Auswertungsverfahren reagierte der HET-MN sensitiver, so konnte hier mit dem HET-MN eine 5-mal so hohe Micronucleusfrequenz erreicht werden.

Im Vergleich mit den von MOTIMAYA *et al.* (1994) durchgeführten Untersuchungen erwies sich der HET-MN als ähnlich sensitiv. Wo die durch den HET-MN gewonnenen Daten im Sinne der SOP als biologisch relevante Steigerung der Micronucleusfrequenz angesehen werden, werten Motimaya *et al.* (1994) die vergleichbaren Daten aus ihren Untersuchungen als statistisch nicht relevant und daher negativ. Statistische weisen auch die im HET-MN bei dieser Dosierung gewonnenen Daten keine Relevanz auf und können daher nur als tendenziell positiv angesehen werden.

6.1.2 Stavudin (d4T)

Für Stavudin konnten im HET-MN positive aber dosisunabhängige Resultate erzielt werden. Das bestätigt die von PHILLIPS *et al.* (1991) veröffentlichten Untersuchungen.

Micronucleusfrequenzen, Standardabweichungen und statistische Signifikanzen variierten innerhalb der Versuchsgruppen erheblich. Als Ursachen dafür könnten

unterschiedliche Faktoren in Frage kommen, von Einschränkungen im Metabolismus und der Verteilung im Organismus bis zu cyto- oder embryotoxischen Effekten der Substanz oder der Hilfsstoffe, die in der Stammlösung verblieben sein könnten. Letzteres würde auch die, anders als bei PHILLIPS *et al.* (1991), erheblich eingeschränkte Viabilität erklären

Ein Grund für diese große Streuung könnten Einschränkungen im Metabolismus der Hühnerembryos oder in der Verteilung des Wirkstoffs im Organismus zu sein. Da Stavudin über Diffusion in die Zellen gelangt (RANA & DUDLEY 1997) scheint die Verteilung der Substanz im Organismus als Ursache nicht in Frage zu kommen. Auch die enzymatische Aktivierung scheint als Ursache wegzufallen, da Stavudin über die gleichen enzymatischen Wege wie Zidovudin phosphoryliert wird (CONNOLLY & HAMMER 1992; HO & HITCHCOCK 1989; TURRIZIANI *et al.* 1998) und Zidovudin in unseren Untersuchungen eine deutlich dosisabhängige Wirkung zeigte. Als Ursache für die hohen Standardabweichungen können mögliche Spuren der Hilfsstoffe nicht herangezogen werden, das das eher zu Unterschieden zwischen den einzelnen Versuchsreihen und nicht zwischen den Eiern in einem Versuch führen würde.

Genauere Ursachen ließen sich nicht ermitteln und bedürfen der weiteren Untersuchungen.

Deoxycythinanaloga

6.1.3 Zalcitabin (ddC)

In dem von PHILLIPS *et al.* (1991) veröffentlichten Micronucleustest an Nagern wird Zalcitabin als dosisabhängig positiv beschrieben. Eine erhöhte Mortalität oder Knochenmarkstoxizität konnte nicht festgestellt werden.

Im HET-MN konnten die positiven Ergebnisse von PHILLIPS *et al.* (1991) biologisch und statistisch signifikant bestätigt werden, allerdings erwies sich das Testmodell des Hühnereis sensitiver bezüglich einer akuten Toxizität.

Der HET-MN reagiert dabei sensitiver auf Zalcitabin und zeigt bei deutlich niedrigeren Dosierungen höhere Micronucleusfrequenzen als der Micronucleustest an Mäusen.

Ab einer Dosierung von 1.25 mg/Ei lasen sich nekrotische Effekte an den distalen Enden der Extremitäten und erhöhte Herzfrequenzen beobachten. Die nekrotischen Effekte sind möglicherweise Folgen der hohen mitochondrialen Toxizität von Zalcitabin.

6.1.4 Lamivudin (3TC)

Die Datenlage zu genotoxischen oder toxikologischen Untersuchungen ist für diese Substanz sehr dünn. WUTZLER & THUST (2001) geben jedoch einen Überblick über die verfügbaren Testergebnisse. Für den Genmutationstest an Bakterien sowie im Micronucleustest an Mäusen wird Lamivudin von ihnen als negativ angegeben. Positive Resultate werden im Chromosomenaberrationstest angeführt, ebenso werden positive Resultate für *in-vitro*-Zytogenitätstests und den Maus-Lymphom-Assay angenommen. Da die *in vitro* gezeigte mutagene Wirkung von Lamivudin in *in-vivo*-Tests jedoch nicht bestätigt werden konnte, wird davon ausgegangen, dass Lamivudin keine genotoxische Gefahr für den Patienten darstellt (ABDA-DATENBANK).

Im HET-MN konnte reproduzierbar ein biologisch und statistisch relevantes, dosisabhängiges Ergebnis erzielt werden. Damit steht der HET-MN in Kontrast zu den in der Literatur verfügbaren Informationen.

6.2 Purinanaloga

Deoxyadenosinanaloga

6.2.1 Didanosin (ddl)

Die von PHILLIPS *et al.* (1991) für Didanosin beschriebenen positiven Ergebnisse konnten im HET-MN reproduzierbar qualitativ bestätigt werden. Bei annähernd gleicher Dosierung konnte eine um das vielfache höhere Testantwort erreicht werden, die alle Kriterien der biologischen und statistischen Relevanz erfüllt. Für Didanosin scheint der HET-MN empfindlicher zu reagieren als der Micronucleustest an Nagern.

6.3 Kombinationsversuch

6.3.1 Zidovudin (AZT) – Didanosin (ddl)

Es gibt unterschiedliche Gründe für eine Kombination antiretroviraler Substanzen; so kann das Auftreten resistenter Virenstämme verlangsamt werden oder die Wirkstoffbedingten Toxizitäten durch eine Reduzierung der Einzelsubstanzdosen eingeschränkt werden. Da für die Kombination antiviraler Substanzen der gesteigerte Einbau dieser in wirtseigene DNA nachgewiesen worden ist (MENG *et al.* 2000), bedeutet das die Möglichkeit chromosomaler Schäden, Chromosomenaberrationen und damit ein erhöhtes Krebsrisiko (BONASSI *et al.* 2000). Bei einer HIV-Therapie während der Schwangerschaft wird zur Vermeidung einer

vertikalen Transmission von der Mutter zum Kind eine postexpositionelle Prophylaxe durchgeführt, die den Fötus indirekt exponiert. BISHOP *et al.* (2004) untersuchten in diesem Zusammenhang die Kombination Zidovudin/Didanosin im Micronucleustest am Nager und konnten einen Anstieg chromosomaler Schäden feststellen; Beobachtungen, die von PHILLIPS *et al.* (1991) bestätigt werden konnten.

Im HET-MN konnten für annähernd gleiche Zidovudin-Dosen positive aber in ihrer Micronucleusfrequenz nicht additive Ergebnisse erzielt werden. Bei einer Anhebung der Didanosin-Dosis konnte ein deutlich überadditiver Effekt in der Bildung von Micronuclei verzeichnet werden. Aufgrund eines fehlenden Wiederholungsversuchs muss dieser Effekt als Tendenz betrachtet werden.

Die von BISHOP *et al.* (2004) getroffenen Aussagen der erhöhten chromosomalen Schäden bei einer Kombination von Zidovudin und Didanosin können in allen Versuchsreihen durch die im HET-MN gewonnenen Daten bestätigt werden.

Eine Kombination von Zidovudin und Didanosin kann also zum einen die Viruslast als auch ein Voranschreiten der HIV-Erkrankung reduzieren, auf der anderen Seite kann bei einer Kombinationen antiretroviraler Substanzen ein vermehrter Einbau in die zelleigene DNA stattfinden. Letzteres ist besonders bei fötaler DNA ein Risiko, da sich viele Gewebe im Aufbau befinden und Schäden für die längerfristige Gesundheit nicht abzuschätzen sind.

Die im HET-MN gewonnenen Daten ließen in allen Versuchsreihen auf vergleichbare oder höhere Sensitivität als im Micronucleustest an Nagern schließen. Damit stellt der HET-MN eine kostengünstige und methodisch leicht durchführbare Alternative zum Tierversuch dar und wird trotz seiner hohen Komplexität und den damit verbundenen *in-vivo*-ähnlichen Bedingungen allen Belangen des Tierschutzes gerecht.

7 Literaturverzeichnis

ABDA-DATENBANK. <http://www.abda.de>, 2006

ABDA-DATENBANK. <http://www.abda.de>, 2003

ACOSTA E, PAGE L, FLETCHER C. Clinical pharmacokinetics of zidovudine – an update. *Clinical Pharmacokinetics* 1996, 30(4): 251-262.

AGARWAL L, LU X, JIN Q, ALKHATIP G. Anti-HIV therapy: Current and future directions. *Current Pharmaceutical Design* 2006, 12: 2031-2055.

AGARWAL R, OLIVERO O. Genotoxicity and mitochondrial damage in human lymphocytic cells chronically exposed to 3'-acido-2',3'-dideoxythymidine. *Mutation Research* 1997, 390: 223-231.

AHLUWALIA G, GAO W-Y, MITSUYA H, JOHNS D. 2',3'-Didehydro-3'-deoxythymidine: Regulation of its Metabolic Activation by Modulators of Thymidine-5'-triphosphate Biosynthesis. *Molecular Pharmacology* 1996, 50: 160-165.

AHLUWALIA G, COONEY D, *et al.* Initial studies on the cellular pharmacology of 2', 3'-dideoxyinosine, an inhibitor of HIV infectivity. *Biochemical Pharmacology* 1987, 36(22): 3797-3800.

ALLISON A, KOWALSKI W, MULLER C, EUGUI E. Mechanisms of action of mycophenolic acid. *Ann NY Acad Sci* 1993, 696: 63-87.

AMES B, MCCANN J, YAMASAKI E. Methods for detecting carcinogens and mutagens with the Salmonella/mammalian-microsome mutagenicity test. *Mutation Research* 1975, 31: 347-364.

ANDERSON P, KAKUDA T, LICHTENSTEIN K. The cellular pharmacology of nucleoside- and nucleotide-analogue reverse-transcriptase inhibitors and its relationship to clinical toxicities. *Clinical Infectious Diseases* 2004, 38(5):743-53.

ANIMAL (SCIENTIFIC PROCEDURES) ACT (London) 1986.

ANIMAL WELFARE ACT (Washington, DC) 1970.

ANIMAL WELFARE BILL (London) 2006.

ARION D, KAUSHIK N, MCCORMICK S, et al. Phenotypic mechanism of HIV-1 resistance to 3'-azido-3'-deoxythymidine (AZT): Increased polymerization processivity and enhanced sensitivity to pyrophosphate of the mutant viral reverse transcriptase. *Biochemistry* **1998**, 37: 15908-15917.

ARTS E, WAINBERG M. Mechanisms of nucleoside analog anti-viral activity and resistance during human immunodeficiency virus reverse transcription. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* **1996**, 40: 527-540.

AWMF ONLINE. Leitlinie Antiretrovirale Therapie HIV-Infektion. <http://leitlinien.net/> **2007**.

AWMF ONLINE. Leitlinie Empfehlung zur HIV-Therapie in der Schwangerschaft und bei HIV-exponierten Neugeborenen. <http://leitlinien.net/> **2005**.

AYERS K, CLIVE D, TUCKER W, HAJIAN G, DE MIRANDA P. Nonclinical toxicology studies with zidovudine: Genetic toxicity tests and carcinogenicity bioassays in mice and rats. *Fundamental and Applied Toxicology* **1996**, 3: 148-158.

BABA M, PAUWELS J, BALZARINI P, HERDEWIJN E, DE CLERQ E, DESMYTER J. Ribavirin antagonizes inhibitory effects of pyrimidine 2',3'-dideoxynucleosides but enhances inhibitory effects of purine 2',3'-dideoxynucleosides on replication of human immunodeficiency virus in vitro. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* **1987**, 31: 1613-1617.

BACK D, KEWN S, HOGGARD P, HENRY-MOWATT J, BARRY M. Enhanced activation of nucleoside analogs in the presence of hydroxyurea in vitro [abstr.] In: *Programm and abstracts of the 12th world AIDS conference, Geneva, June 28-July 3, 1998*.

BALFOUR HH JR, ERICE A, REED NV, ALLMAN AR, LI W. Therapy with d4T plus 3TC produces sustained undetectable levels of plasma HIV RNA (pHIV) in patients treated with reverse transcriptase (RT) inhibitors for 10 years [Abstr.]. In: *Programm and abstracts of the 5th conference on retroviruses and opportunistic infections. Chicago: Foundation for Retrovirology and Human Health 1998*: 664.

BALZARINI J. Current status of the non-nucleoside reverse transcriptase inhibitors of human immunodeficiency virus type 1. *Current Topics in Medicinal Chemistry* **2004**, 4(9):921-44.

BALZARINI J. Suppression of resistance to drugs targeted to human immunodeficiency virus reverse transcriptase by combination therapy. *Biochem. Pharmacol.* **1999**, 58 (1): 1-27.

BALZARINI J. Metabolism and mechanism of antiretroviral action of purine and pyrimidine derivatives. *Pharm. World. Sci.* **1994**, 16(2): 113-126.

BALZARINI J, LEE CK, HERDEWIJN P, DE CLERCQ E. Mechanism of the potentiating effect of ribavirin on the activity of 2',3'-dideoxyinosine against human immunodeficiency virus. *The Journal of Biological Chemistry* **1991**, 266(32): 21509-21514.

BALZARINI J, NAESENS L, DE CLERCQ E. Mechanism of the potentiating effect of ribavirin on the activity of 2',3'-dideoxyinosine and 2',3'-dideoxy-2',6'-diaminopurine riboside. *Journal of Acquired Immune Deficiency Syndrome* **1990**, 3:1140-1147.

BALZARINI J, HERDEWIJN P, DE CLERCQ E. Differential patterns of intracellular metabolism of 2',3'-didehydro-2',3'-dideoxythymidine and 3'-azido-2',3'-dideoxythymidine, two potent anti-human immunodeficiency virus compounds. *The Journal of Biological Chemistry* **1989**, 264(11): 6127-6133.

BANJO A, NEMETH M. Proliferation of endoplasmatic reticulum with ist enzyme, UDP-Glucoronyltransferase, in chick embryo liver during culture/effects of phenobarbital. *Journal of Cell Biology* **1976**, 70: 319-325.

BARILE M, VALENTI D, HOBBS G, et al. Mechanisms of toxicity of 3'-azido-3'-deoxythymidine. Its interaction with adenylate kinase. *Biochemical Pharmacology* **1994**, 48 (7): 1405-1412.

BARON-RUPPERT G. Toxikologische und ultrastrukturelle Untersuchungen zur Beeinflussung der Embryonalentwicklung des Haushuhns durch Dihydrostreptomycin unter besonderer Berücksichtigung der Ototoxizität. *Dissertation, Westfälische Wilhelms-Universität Münster* **1992**.

BARRET B, TARDIEU M, RUSTIN P, LACROIX C, CHABROL B, DESGUERRE I, et al. Persistent mitochondrial dysfunction in HIV-1-exposed but uninfected infants: clinical screening in a large prospective cohort. *AIDS* **2003**, 17(12): 1769-1785.

BENBRIK E, CHARIOT P, BONAUAUD S, AMMI-SAÏD M, et al. Cellular and mitochondrial toxicity of zidovudine (AZT), didanosine (ddI) and zalcitabine(ddC) on cultured human muscle cells. *Journal of Neurological Science* **1997**, 149: 19-25.

BIALKOWSKA A, BIALKOWSKI K, GERSCHENSON M, DIWAN B, et al. Oxidative DNA damage in fetal tissues after transapental exposure to 3'-azido-3'-deoxythymidine (AZT). *Carcinogenesis* **2000**, 21(5): 1059-1062.

BIGBEE W, NESS R, BAS D, WELSH M, WALKERV. Glycophorin A (GPA) locus somatic mutations in umbilical cord blood erythroid cells of infants exposed *in utero* to NRTIs. *EMS Abstracts* **2001**, 22.

- BISHOP JB, WITT KL, TICE RR, WOLFE GW. Genetic damage detected in CD-1 mouse pups exposed perinatally to 3'-azido-3'-deoxythymidine and dideoxyinosine via maternal dosing, nursing, and direct gavage. *Environmental and Molecular Mutagenesis* **2004**, 43: 3-9.
- BLAAUBOER BJ, BOOBIS AR, CASTELL JV, COECKE S, GROOTHUIS GMM, *et al.* The practical applicability of hepatocyte cultures in routine testing. *ATLA* **1994**, 22: 231-241.
- BLANCHE S, TARDIEU M, RUSTIN P, SLAMA A, BARRET B, FIRTION G, *et al.* Persistent mitochondrial dysfunction and perinatal exposure to antiretroviral nucleoside analogues. *Lancet* **1999**, 354(9184): 1084-1089.
- BOHMANN C, ERIKSSON S. Deoxycytidine kinase from human leukemic spleen: Preparation and characterization of the homogeneous enzyme. *Biochemistry* **1988**, 27: 4258-4265.
- BOLLER K, SCHMID W. Chemische Mutagenese beim Säuger. Das Knochenmark des Chinesischen Hamsters als in vivo Testsystem, *Humangenetik* **1970**, 11: 35-54.
- BONASSI S, HAGMAR L, STROMBERG U, *et al.* Chromosomal aberrations in lymphocytes predict human cancer independently of exposure to carcinogens. *Cancer* **2000**, 60: 1619- 1625.
- BRINKMANN K, SMEITINK J, ROMIJN J, REISS P. Mitochondrial toxicity induced by nucleoside-analogue reverse-transcriptase inhibitors is a key factor in the pathogenesis of antiretroviral-therapy-related lipodystrophy. *The Lancet* **1999**, 354: 1112-1115.
- BRUNS GAP, INGRAM VM. The erythroid cells and haemoglobins of the chick embryo, *Phil. Trans. R. Soc.* **1973**, 266: 225-305.
- CAMMACK N, ROUSE P, MARR C, REID P, *et al.* Cellular metabolism of (-) enantiomeric 2'-Deoxy-3'-thiacytidine. *Biochem. Pharmacol.* **1992**, 42(10): 2059-2064.
- CARROLL S, GEIB J, OLSEN D, STAHLHUT M, SHAFER J, KUO L. Sensitivity of HIV-1 reverse transcriptase and its mutants to inhibition by azidothymidine triphosphate. *Biochemistry* **1994**, 33:2113-2120.
- CATE M, CHENG YC. Cellular metabolism of 2',3'-dideoxycytidine, a compound active against human immunodeficiency virus *in vitro*. *Journal of Biological Chemistry* **1987**, 262: 988-991.

CHAPUIS A, RIZZARDI P, D'AGOSTINO C, *et al.* Effects of mycophenolic acid on human immunodeficiency virus infection in vitro and in vivo. *Nature Medicine* 2000, 6: 762-768.

CHEMIDPLUS LITE <http://chem.sis.nlm.nih.gov/>

CHEN CH, CHENG YC. The role of cytoplasmic deoxy cytidine kinase in the mitochondrial effects of the anti-human immunodeficiency virus compound, 2',3'-dideoxycytidine. *Journal of Biological Chemistry* 1992, 267: 2856-2859.

CHEN C, VASQUEZ-PADUA M, CHENG YC. Effect of anti-human immunodeficiency virus nucleoside analogs on mitochondrial DNA and its implications for delayed toxicity. *Mol. Pharmacol.* 1991, 39: 625-628.

COLLINS J, KLECKER JR. R, KELLEY J, ROTH J, *et al.* Pyrimidine dideoxyribonucleosides: selectivity of penetration into cerebrospinal fluid. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 1988, 245: 466-470.

CONNOLLY K, HAMMER S. Antiretroviral therapy: reverse transcriptase inhibition. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* 1992, 36:245-254.

COONEY D, AHLUWALIA G, MITSUYA H, FRIDLAND A, FLORA K, HAO Z, *et al.* Initial studies on the cellular pharmacology of 2',3'-dideoxyadenosine, an inhibitor of HIV infectivity. *Biochem. Pharmacol.* 1987, 36: 3797-3800.

COONEY D, DALAL M, MITSUYA H, *et al.* Initial studies on the cellular pharmacology of 2',3'-dideoxycytidine, an inhibitor of HTLV-III infectivity. *Biochem Pharmacol.* 1986, 35: 2065-2068.

COPELAND W, CHEN YC. Human DNA polymerases alpha and beta are able to incorporate anti-HIV deoxynucleotides into DNA. *The Journal of Biological Chemistry* 1992, 267: 21459-21464.

CRAIGIE R. HIV integrase, a brief overview from chemistry to therapeutics. *The Journal of Biological Chemistry* 2001, 276 (26): 23213-23216.

CRETTON E, XIE M-J, BEVAN R *et al.* Catabolism of 3'-azido-3'-deoxythymidine in hepatocytes and liver microsomes, with evidence of formation of 3'-amino-3'-deoxythymidine, a highly toxic catabolite for human bone marrow cells. *Mol. Pharmacol.* 1991, 39: 494-500.

- CROFTON-SLEIGH C, DOHERTY A, ELLARD S, PARRY EM, VENITT S.** Micronucleus assays using cytochalson-blocked MCL-5 cells, a proprietary human cell line expressing five human cytochromes P-450 and microsomal epoxide hydrolase, *Mutagenesis* **1993**, 8: 363-372.
- CUI L, LOCATELLI L, XIE MY, SOMMADOSSI J-P.** Effect of Nucleoside Analogs on Neurite Regeneration and Mitochondrial DNA Synthesis in PC-12 Cells. *The Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics* **1997**, 280 (3): 1228-1234.
- DABIS F, MSELLATI P, DUNN D, LEPAGE P, NEWELL M, et al.** Estimating the rate of mother-to-child transmission of HIV. Report of a Workshop on methodological issues Ghent (Belgium), 17 – 20 February 1992. The Working Group on Mother-to-child Transmission of HIV. *AIDS* **1993**, 7(8): 1139-1148.
- DASSOPOULOS T, EHRENPREIS E.** Acute pancreatitis in human immunodeficiency virus-infected patients: A review. *Am J. Med.* **1999**, 107: 78-84.
- DE JONG M, VEENSTRA J, STILIANAKIS NI, et al.** Host-parasite dynamics and outgrowth of virus containing a single K70R amino acid change in reverse transcriptase are responsible for the loss of human immunodeficiency virus type 1 RNA load suppression by zidovudine. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **1996**, 93: 5501-5506.
- DETINGER S, TOROUS D, TOMETSKO K.** Induction of micronuclei by low doses of azidothymidine (AZT). *Mutation Research* **1996**, 368: 301-307.
- DIETERLEN-LIÈVRE F.** Birds in: **ROURLEY AF, RATCLIFFE NA, (EDS.)**, Vertebrate Blood Cells, *Cambridge University Press, Cambridge* **1988**, pp.257-336.
- DINNENDAHL V, FRICKE U (HRSG.)**. Arzneistoff-Profil. *Govi-Verlag, Eschborn* (1982-1997).
- DIWAN B, RIGGS C, LOGSDON D, HAINES D, OLIVERO O, RICE J, YUSPA S, POIRIER M, ANDERSON L.** Multiorgan transplacental and neonatal carcinogenicity of 3'-azido-3'-deoxythymidine in mice. *Toxicology and Applied Pharmacology* **1999**, 161: 82-99.
- DOMIN B, MAHONY W, ZIMMERMANN T.** Membrane permeation mechanisms of 2',3'-dideoxynucleosides. *Biochem. Pharmacol.* **1993**, 46: 725-729.
- DOMINGO E, MENENDEZARIAS L, HOLLAND J.** RNA virus fitness. *Rev. Med. Virol.* **1997**, 7: 87-96.

DORENBAUM A, CUNNINGHAM C, GELBER R, *et al.* Two-dose intrapartum/newborn nevirapine and standard antiretroviral therapy to reduce perinatal HIV transmission: A randomised trial. *J. Am. Med. Assoc.* **2002**, 288 (2):189-198.

ERON J. HIV-1 protease inhibitors. *Clinical Infectious Diseases* **2000**, 30 (2): 160-170.

EUROPEAN COLLABORATIVE STUDY: Mother-to-child transmission of HIV infection in the era of highly active antiretroviral therapy. *Clin. Infect. Dis.* **2005**, 40 (3):458-465.

EUROPEAN COLLABORATIVE STUDY: The association between mother-to-child transmission of HIV and antenatal and neonatal antiretroviral regimen. *Conference on Retroviruses and Opportunistic Infections 2005 A*, 12: Abs 783.

ESNOUF R, REN J, ROSS C, JONES Y, STAMMERS D, STUART D. Mechanism of inhibition of HIV-1 reverse transcriptase by non-nucleoside inhibitors. *Nature Structural Biology* **1995**, 2: 303-308.

FACHINFORMATION. *Retrovir* 10 mg/ml i.v. Konzentrat zur Herstellung einer Infusionslösung. <http://www.fachinfo.de> August **2008**.

FACHINFORMATION. *Videx*, Pulver-2g . <http://www.fachinfo.de> März **2008**.

FACHINFORMATION. *Epivir* (300 mg Filmtabletten/ 10 mg/ml Lösung zum Einnehmen). <http://www.fachinfo.de> September **2007**.

FACHINFORMATION. *Zerit*, Hartkapseln. <http://www.fachinfo.de> Januar **2007**.

FACHINFORMATION. *Hivid*. <http://www.fachinfo.de> September **2004**.

FAUCI A. HIV and AIDS: 20 years of science. *Nature Medicine* **2003**, 9 (7): 839-843.

FENG J, MYRICK F, MARGOT N, MULAMBA G, *et al.* Virologic and enzymatic studies revealing the mechanism of K65R- and Q151M-associated HIV-1 drug resistance towards emtricitabine and lamivudine. *Nucleosides, Nucleotides & Nucleic Acids* **2006**, 25: 89-107.

FENG J, ANDERSON K. Mechanistic studies comparing the incorporation of (+) and (-) isomers of 3TCTP by HIV-1 reverse transcriptase. *Biochemistry* **1999**, 38: 55-63.

FIELDS BN, KNIPE D, HOWLEY P (EDS.). *Fields Virology*. 3rd Ed. Philadelphia, Lippincott-Raven Publishers **1996**.

- FURMAN P, FYFE J, ST. CLAIR M, WEINHOLD K, *et al.* Phosphorylation of 3'-azido-3'-deoxythymidine and selective interaction of the 5'-triphosphate with human immunodeficiency virus reverse transcriptase. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **1986**, *83*: 8333-8337.
- GAO H, BOYER P, SARAFIANOS S, ARNOLD E, HUGHES S. The role of steric hindrance in 3TC resistance of human immunodeficiency virus type-1 reverse transcriptase. *Journal of Molecular Biology* **2000**, *300*: 403-418.
- GAO W, JOHNS D, TONAKA M, MITSUYA H. Suppression of replication of multidrug resistant HIV type 1 variants by combinations of thymidylate synthetase inhibitors with zidovudine or stavudine. *Mol Pharmacol.* **1999**, *55*: 535-540.
- GAO W, AGBARIA R, DRISCOLL J, MITSUYA H. Divergent anti-human immunodeficiency virus activity and anabolic phosphorylation of 2',3'-dideoxynucleoside analogs in resting and activated human cells. *The Journal of Biological Chemistry* **1994**, *269*(17): 12633-12638.
- GAO W, SHIRASAKA T, JOHNS D, BRODER S, MITSUYA H. Differential phosphorylation of azidothymidine, dideoxycytidine, and dideoxyinosine in resting and activated peripheral blood mononuclear cells. *The Journal of Clinical Investigation* **1993**, *91*: 2326-2333.
- GIACCA M, BORELLA F, CALDERAZZO L, *et al.* Synergistic antiviral action of ribonucleotide reductase inhibitors and 3'-azido-3'-deoxythymidine an HIV type 1 infection in vitro. *AIDS Res. Hum. Retrovir.* **1996**, *12*: 677-682.
- GIBSON G, SKETT P. Introduction to drug metabolism. *2nd ed. Blackie, London* **1994**.
- GÖTTE M, ARION D, PARNIAK M, WAINBERG M. The M184V mutation in the reverse transcriptase of human immunodeficiency virus type 1 impairs rescue of chain-terminated DNA synthesis. *Journal of Virology* **2000**, *74*(8): 3579-3585.
- GU ZX, FLETCHER RS, ARTS EJ, *et al.* The K65R mutant reverse transcriptase of HIV-1 cross-resistant to 2,3-dideoxycytidine, 2,3-dideoxy-3-thiacytidine, and 2,3-dideoxyinosine shows reduced sensitivity to specific dideoxynucleoside triphosphate inhibitors in vitro. *Journal of Biological Chemistry* **1994**, *269*: 28118-28122.
- HARTMANN N, AHLUWALIA G, COONEY D, MITSUYA H, *et al.* Inhibitors of IMP dehydrogenase stimulate the phosphorylation of the anti-human immunodeficiency virus nucleosides 2',3'-dideoxyadenosine and 2',3'-dideoxyinosine. *Molecular Pharmacology* **1991**, *40*: 118-124.

HAVLIR D, TIERNEY C, FRIEDLAND G, POLLARD R, *et al.* In vivo antagonism with zidovudine plus stavudine combination therapy. *The Journal of Infectious Diseases* **2000**, 182: 321-325.

HAYAKAWA M, OGAWA T, SUGIYAMA S, *et al.* Massive conversion of guanosine to 8-hydroxy-guanosine in mouse liver mitochondrial DNA by administration of azidothymidine. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **1991**, 176: 87-93.

HAZUDA D, FELOCK P, WITMER M, WOLFE A, STILLMOCK K, GROBLER J, *et al.* Inhibitors of strand transfer that prevent integration and inhibit HIV-1 replication in cells. *Science* **2000**, 287(5453): 646-650.

HEDDLE JA, CIMINO MC, HAYASHI M, ROMAGNA F, SHELBY MD, TUCKER JD, VANPARYS PH, MAYGREGOR JT. Micronuclei as an index of cytogenetic damage: Past, present and future. *Environmental Molecular Mutagenesis* **1991**, 18: 277-291.

HEINRICH-HIRSCH B, HOFFMANN D, WEBB J, NEUBERT D. Activity of aldrin-neproxidase, 7-ethoxycoumarin-o-deethylase and 7-ethoxyresorufin-o-deethylase during the development of chick embryos in ovo. *Arch. Toxicol.* **1990**, 64: 128-134.

HO D, NEUMANN A, PERELSON A *et al.* Rapid turnover of plasma virions and CD4 lymphocytes in HIV-1 infection. *Nature* **1995**, 373: 123-126.

HO HT, HITCHCOCK M. Cellular pharmacology of 2',3'-dideoxy-2',3'-didehydrothymidine, a nucleoside analog active against human immunodeficiency virus. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* **1989**, 33(6): 844-849.

HOBBS G, KEILBAUGH S, RIEF P, SIMPSON M. Cellular targets of 3'-azido-3'-deoxythymidine: An early (non-delayed) effect on oxidative phosphorylation. *Biochemical Pharmacology* **1995**, 50: 381-390.

HOGGARD P, KEWN S, BARRY M, KHOOS, BACK D. Effects of drugs on 2',3'-dideoxy-2',3'-didehydrothymidine phosphorylation in vitro. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* **1997**, 41: 1231-1236.

HOGGARD P, KHOO S, BARRY M, BACK D. Intracellular metabolism of zidovudine and stavudine in combination. *The Journal of Infectious Diseases* **1996**, 174: 671-672.

HOGGARD P, VEAL G, WILD M, BARRY M, BACK D. Drug interactions with zidovudine phosphorylation in vitro. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* **1995**, 39(6): 1376-1378.

HÖSCHELE D. Persönliche Mitteilung von Höschele D, Dr. rer. nat., Bundesinstitut für Arzneimittel und Medizinprodukte. **2007**

HÖSCHELE D. Biochemische, histologische und enzymhistorische Untersuchungen zum Einfluss knochenwirksamer Substanzen auf die Osteogenese am versuchstierfreien Modell des bebrüteten Hühnereis, Inaugural-Dissertation, Universität Osnabrück, Fachgebiet Pharmakologie und Toxikologie im Fachbereich Psychologie und Gesundheitswissenschaften. **2000**

IARC. IARC monographs on the evaluation of carcinogenic risks to humans. World Health Organisation. *IARC Scientific Publications* **2000**, No. 76, IARC Lyon, France.

IGNARRO L, SHIDEMAN F. Catechol-O-methyl transferase and mono-amine oxidase activities in the heart and liver of the embryonic and developing chick. *Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics* **1968**, 159: 29-37.

ISEL C, EHRESMANN C, WALTER P, EHRESMANN B, MARQUET R. The emergence of different resistance mechanisms toward nucleoside inhibitors is explained by the properties of the wild type HIV-1 reverse transcriptase. *The Journal of Biological Chemistry* **2001**, 276(52): 48725-48732.

IVERSEN A, SHAFER R, WEHRLY K, WINTERS M, MULLINS J, et al. Multidrug-resistant human immunodeficiency virus type 1 strains resulting from combination antiretroviral therapy. *Journal of Virology* **1996**, 70 (2): 1086-1090.

IZUTA S, SANEYOSHI M, SAKURAI T, et al. The 5'-triphosphates of 3'-azido-3'-deoxythymidine and 2',3'-dideoxynucleosides inhibit DNA polymerase gamma by different mechanisms. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **1991**, 179: 776-783.

JACKSON M, KENNEDY S, LOWN G, BURCHELL B. Induction of UDP-glucuronyl-transferase mRNA in embryonic chick livers by phenobarbital. *Biochem. Pharmacol.* **1986**, 35: 1191-1198.

JAPOUR A, LERTORA J, MEEHAN P, ERICE A, et al. A phase-I study of the safety, pharmacokinetics, and antiviral activity of combination didanosine and ribavirin in patients with HIV-1 disease. *Journal of Acquired Immune Deficiency Syndromes and Human Retrovirology* **1996**, 13: 235-246.

JOHNSON M, FRIDLAND A. Phosphorylation of 2',3'-dideoxyinosine by cytosolic 5'-nucleotidase of human lymphoid cells. *Mol. Pharmacol.* et al. **1989**, 2:291-295.

- JOHNSON M, AHLUWALIA G, CONNELLY M, COONEY D, et al.** Metabolic pathways for the activation of the antiretroviral agent 2',3'-dideoxyadenosine in human lymphoid cells. *The Journal of Biological Chemistry* **1988**, 263(30): 15354-15357.
- JULIAS J, PATHAK V.** Deoxyribonucleoside triphosphate pool imbalances in vivo are associated with an increased retroviral mutation rate. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* **1998**, 72: 7941-7949.
- KAKUDA T.** Pharmacology of nucleoside and nucleotide reverse transcriptase inhibitor-induced mitochondrial toxicity. *Clinical Therapeutics* **2000**, 22(6): 685-708.
- KEMPER FH.** Hühnereiembryopathien. *Arzneimittel-Forschung* **1993**, 13: 191-194.
- KEWN S, VEAL G, HOGGARD P, BARRY M, BACK D.** Lamivudine (3TC) phosphorylation and drug interactions in vitro. *Biochemical Pharmacology* **1997**, 54: 589-595.
- KOSALARAKSA P, KAVLIK M, MAROUN V, LE R, MITSUYA H.** Comparative fitness of multi-dideoxynucleoside-resistant human immunodeficiency virus type-1 (HIV-1) in an in vitro competitive HIV-1 replication assay. *Journal of Virology* **1999**, 73 (7): 5356-5363.
- KREBS R, IMMENDORFER U, THRALL S, et al.** Single-step kinetics of HIV-1 reverse transcriptase mutants responsible for virus resistance to nucleoside inhibitors zidovudine and 3TC. *Biochemistry* **1997**, 36: 10292-10300.
- KUCERA P, BURNAND MB.** Routine teratogenicity test that uses chick embryos in vitro. *Terat., Carcinog., Mutagen.* **1987**, 7: 427-447.
- KUKHANOVA M, LI X, CHEN SH, et al.** Interaction of -1-2',3'-dideoxy-2',3'-didehydro-5-CTP with human immunodeficiency virus-1 reverse transcriptase and human DNA polymerases: Implications for human immunodeficiency virus drug design. *Molecular Pharmacology* **1996**, 53: 801-807.
- LANGTRY H, CAMPOLI-RICHARDS D.** Zidovudine. A review of its pharmacodynamic and pharmacokinetic properties, and therapeutic efficacy. *Drugs* **1989**, 37: 408-450.
- LARDER B, KEMP S.** Multiple mutations in HIV-1 reverse transcriptase confer high-level resistance to zidovudine (AZT). *Science* **1989**, 246: 1155-1158.
- LAVIE A, SCHLICHTING I, VETTER I, KONRAD M, et al.** The bottleneck in AZT activation. *Nature Medicine* **1997**, 3: 922-924.

- LEMEZ L. The blood of chick embryos: Quantitative embryology at a cellular level. In: **ABERCROMBIE A, BRACKET J** (Eds.) *Advances in Morphogenesis*, Vol. 3. *Academic Press, New York* **1964**, 197-245.
- LEWIS W, DALAKAS M. Mitochondrial toxicity of antiviral drugs. *Nature Medicine* **1995**, 1 (5): 417-422.
- LUCAS AM, JAMROZ C. Atlas of avian hematology. *Agriculture Monograph 25, United States Department of Agriculture, U.S. Government Printing Office, Washington, DC*. **1961**.
- LÜPKE NP. Toxikologisch-pharmakologische Prüfmöglichkeiten am bebrüteten Hühnerei in: Möglichkeiten und Grenzen der Reduktion von Tierversuchen in: SCHÖFFL H, SCHULTE-HERMANN R, TRITTHART H (HRSG.). *Springer-Verlag Wien, New York*, **1992**.
- LÜPKE NP, THEISEN NL, BARON G. Vascular effects of flavonol glycosides on the chorioallantoic membrane. *Int. J. Microcirculation* **1990**, 9: 102-102.
- LÜPKE NP. Hühner-Ei-Test; Ein pharmakologisch-toxikologisches Experimentalmodell. *Ärztliche Kosmetologie* **1987**, 17: 13-30.
- LÜPKE NP. Hen's egg chorioallantoic membrane test for irritation potential. *Food Chem. Toxic.* **1985**, 23(2): 287-291.
- LÜPKE NP. Möglichkeiten und Grenzen einer toxikologischen Prüfung am Hühnerembryo, *Habilitationsschrift an der Westfälischen Wilhelms-Universität Münster* **1982**.
- MARCELIN AG, DELAUGERRE C, WIRDEN M, *et al.* Thymidine Analogue Reverse Transcriptase Inhibitors Resistance Mutations Profiles and Association to Other Nucleoside Reverse Transcriptase Inhibitors Resistance Mutations Observed in the Context of Virological Failure. *Journal of Medical Virology* **2004**, 72: 162-165.
- MARGOLIS D, HEREDIA A, GAYWEE J, OLDACH D, DRUSANO G, REDFIELD R. Abacavir and mycophenolic acid, an inhibitor of inosine monophosphohate dehydrogenase, have profound and synergistic anti-HIV activity. *J. Acquir. Immune. Defic. Syndr.* **1999**, 21:362-370.
- MARTIN J, BROWN C, MATTHEWS-DAVIS N, REARDON J. Effects of antiviral nucleoside analogs on human DNA polymerases and mitochondrial DNA synthesis. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* **1994**, 38 (12): 2743-2749.

MARTY R, OUAMEUR A, NEAULT JF, NAFISI S, TAJMIR-RIAHI HA. AZT-DNA interaction. *DNA and Cell Biology* **2004**, 23(3): 135-140.

MAYER A, BACHMANN PA, BIBRACK B, WITTMANN G. Virologische Arbeitsmethoden Band 1. *VEB Gustav Fischer Verlag Jena* **1974**: 369-384.

MAYERS D, JAPOUR A, ARDUINO JM, *et al.* Dideoxynucleoside resistance emerges with prolonged zidovudine monotherapy. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* **1994**, 38: 307-314.

MENG Q, WALKER D, OLIVERO O, SHI X, *et al.* Zidovudine-didanosine coexposure potentiates DNA incorporation of zidovudine and mutagenesis in human cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2000**, 97(23): 12667-12671.

MEYER P, MATSUURA S, MOHSIN MIAN A, SO A, SCOTT W. A mechanism of AZT resistance: An increase in nucleotide-dependant primer unblocking by mutant HIV-1 reverse transcriptase. *Molecular Cell* **1999**, 4: 35-43.

MEYER P, MATSUURA S, SCHINAZI R, SO A, SCOTT W. Differential removal of thymidine nucleotide analogues from blocked DNA chains by human immunodeficiency virus reverse transcriptase in the presence of physiological concentrations of 2'-deoxynucleoside triphosphates. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* **2000**, 44(12): 3465-3472.

MILLER JA. Recent studies on the metabolic activation of chemical carcinogens. *Cancer Res.* **1994**, 18: 187-190.

MODICA-NAPOLITANO J. AZT causes tissue-specific inhibition of mitochondrial bioenergetic function. *Biochem. Biophys. res. Commun.* **1993**, 194: 170-177.

MOORE KH, BARRETT JE, SHAW S *et al.* The pharmacokinetics of lamivudine phosphorylation in peripheral blood mononuclear cells from patients infected with HIV-1. *AIDS* **1999**, 13: 2239-2250.

MORSE G, SHELTON M, O'DONNELL A. Comparative pharmacokinetics of antiviral nucleoside analogues. *Clinical Pharmacokinetics* **1993**, 24(2): 101-123.

MOTIMAYA A, SUBRAMANYA K, CURRY P, KITCHIN R. Evaluation of the genotoxic potential of selected anti-AIDS treatment drugs at clinical doses in vivo in mice. *Toxicology Letters* **1994**, 70(2):171-83.

MOTIMAYA A, SUBRAMANYA K, *et al.* Lack of induction of micronuclei by azidothymidine (AZT) in vivo in mouse bone marrow cells. *Environmental and Molecular Mutagenesis*, **1994a**, 23: 74-76.

- MOYLE G, SADLER M. Peripheral neuropathy with nucleoside antiretrovirals: Risk factors, incidence and management. *Drug Safety* 1998, 19: 481-494.
- MUNCH-PETERSEN B, CLOOS L, TYRSTED G, ERIKSSON S. Diverging substrate specificity of pure human thymidine kinase 1 and 2 against antiviral dideoxynucleosides. *The Journal of Biological Chemistry* 1991, 266(14): 9032-9038.
- MÜLLER WU, STREFFER C. Micronucleus assays. In: OBE G (ED.), *Advances in Mutagenesis Research*, Vol. 5. Springer, Berlin 1994: 1-134.
- MÜLLER-TEGETHOFF K, KASPER P, MÜLLER L. Evaluation studies on the rat hepatocyte micronucleus assay. *Mutation Research* 1995, 335: 293-307.
- NAVÉ JF, ESCHBACH A, WOLFF-KUGEL D, HALAZY S, BALZARINI J. Enzymatic phosphorylation and pyrophosphorylation of 2',3'-dideoxyadenosine-5'-monophosphate, a key metabolite in the pathway for activation of the anti-HIV (Human Immunodeficiency Virus) agent 2',3'-dideoxyinosine. *Biochemical Pharmacology* 1994, 48(6): 1105-1112.
- NEUGEBAUER M. Biotransformation von Metamfetamin im bebrüteten Hühnerei. *Pharmazie* 1995, 50: 201-206.
- NOTE R, MAISONNEUVE C, LETTÉRON P, PEYTAVIN P, *et al.* Mitochondrial and metabolic effects of nucleoside reverse transcriptase inhibitors (NRTIs) in mice receiving one of five single- and three dual-NRTI treatments. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* 2003, 3384-3392.
- NUESCH R, ANANWORANICH J, SIRIVICHAYAKUL S, UBOLYAM S, *et al.* Development of HIV with drug resistance after CD4 cell count-guided structured treatment interruptions in patients treated with highly active antiretroviral therapy after dual-nucleoside analogue treatment. *Clin. Infect. Dis.* 2005 40(5):728-34.
- OLIVERO O, TEJERA A, FERNANDEZ J, TAYLOR B, DAS S, DIVI R, POIRIER M. Zidovudine induces S-phase arrest and cell cycle gene expression changes in human cells. *Mutagenesis*, 2005, 20(2). 139-146.
- OLIVERO O, REDDY M, PIETRAS S, POIRIER M. Plasma drug levels compared with DNA incorporation of 3'-azido-3'-deoxythymidine (AZT) in adult cynomolgus (Macaca fascicularis) monkeys. *Exp. Biol. Med.* 2001, 226: 446-449.
- OLIVERO O, SHEARER G, CHOUGNET C, KOVACS A, LANDAY A, *et al.* Incorporation of zidovudine into leukocyte DNA from HIV-1-positive adults and pregnant women, and cord blood from infants exposed *in utero*. *AIDS* 1999, 13: 919-925.

OLIVERO O, ANDERSON L, DIWAN B, HAINES D, HARBAUGH S, et al. Transplacental effects of 3'-azido-3'-dideoxythymidine (AZT): Tumorigenicity in mice and genotoxicity in mice and monkeys. *Journal of National Cancer Institute* **1997**, 89(21): 1602-1608.

OLIVERO O, BELAND F, FULLERTON N, POIRIER M. Vaginal epithelial DNA damage and expression of preneoplastic markers in mice during chronic dosing with tumorigenic levels of 3'-azido-2',3'-dideoxythymidine (AZT). *Cancer Research* **1994 a**, 54: 6235-6242.

OLIVERO O, BELAND F, POIRIER M. Immunofluorescent localization and quantitation of 3'-azido-2',3'-dideoxythymidine (AZT) incorporated into chromosomal DNA of human, hamster and mouse cell lines. *International Journal of Oncology* **1994 b**, 4: 1602-1608.

PAINTER G, ALMOND M, MAO S, LIOTTA D. Biochemical and mechanistic basis for the activity of nucleoside analogue inhibitors of HIV reverse transcriptase. *Current Topics in Medicinal Chemistry* **2004**, 4(10):1035-44.

PALMER S, COX S. Increased activation of the combination of 3'-azido-3'-deoxythymidine and 2'-deoxy-3'-thiacytidine in the presence of hydroxyurea. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* **1997**, 41: 460-464.

PERRY C, BALFOUR J. Didanosine: An update on its antiviral activity, pharmacokinetic properties and therapeutic efficacy in the management of HIV disease. *Drugs* **1996**, 52: 928-962.

PERRY C, FAULDS D. Lamivudine – A review of its antiviral activity, pharmacokinetic properties and therapeutic efficacy in the management of HIV infection. *Drugs* **1997**, 53 (4):657-680.

PETERS JJ, VONDERAHE AR, POWERS TH. The functional chronology in developing chick nervous system. *J. Exp. Zool.* **1956**, 133: 505-518.

PHILLIPS M, NASCIMBENI B, TICE R, SHELBY M. Induction of micronuclei in mouse bone marrow cells: An evaluation of nucleoside analogues used in the treatment of AIDS. *Environmental and Molecular Mutagenesis.* **1991**, 18: 168-183.

PICARD V, ANGELINI E, MAILLARD A, RACE E et al. Comparison of genotypic and phenotypic resistance patterns of human immunodeficiency virus type 1 isolates from patients treated with stavudine and didanosine or zidovudine and lamivudine. *The Journal of Infectious Diseases* **2001**, 184: 781-784.

PILLAY D, BRYANT M, GETMAN D. HIV-1 protease inhibitors: their development, mechanism of action and clinical potential. *Reviews in Medical Virology* 1995, 5: 87-33.

POIRIER M, OLIVERO O, WALKER D, WALKER V. Perinatal genotoxicity and carcinogenicity of anti-retroviral nucleoside analog drugs. *Toxicology and Applied Pharmacology* 2004, 199: 151-161.

POIRIER M, DIVI R, AL-HARTHI L, OLIVERO O, NGUYEN V, WALKER B, LANDAY A, *et al.* Long-term mitochondrial toxicity in HIV-uninfected infants born to HIV-infected mothers. *J. Acquir. Immune Defic. Syndr.* 2003, 33(2): 175-183.

POIRIER M, PATTERSON T, SLIKKER JR. W, OLIVERO O. Incorporation of 3'-azido-3'-deoxythymidine (AZT) into fetal DNA and fetal tissue distribution of drug after infusion of pregnant late-term rhesus macaques with a human equivalent AZT dose. *J. Acquired Immun. Defic. Syndr.* 1999, 22: 477-483.

POMMERANTZ R, HORN G. Twenty years of therapy for HIV-1 infection. *Nature Medicine* 2003, 9 (7): 867-873.

POMMIER Y, MARCHAND C, NEAMATI N. Retroviral integrase inhibitors year 2000: update and perspectives. *Antiviral Research* 2000, 47: 139-148.

PUBMED: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov>

RAGNO R, FRASCA S, MANETTI F, BRIZZI A, MASSA S. HIV-reverse transcriptase inhibition: inclusion of ligand-induced fit by cross-docking studies. *J. Med. Chem.* 2005, 48(1):200-12.

RANA K, DUDLEY M. Clinical pharmacokinetics of stavudine. *Clin. Pharmacokinet.* 1997, 33 (4): 276-284.

REN J, ESNOUF RM, HOPKINS AL, WARREN J, BALZARINI J, STUART DI, *et al.* Crystal structures of HIV-1 reverse transcriptase in complex with carboxanilide derivatives. *Biochemistry* 1998, 37 (41): 14394-14403.

REPORT ON THE GLOBAL AIDS EPIDEMIC. *UNAIDS, Geneva, Switzerland* 2006.

ROBBINS B, GREENHAW J, FRIDLAND A. Cellular phosphorylation of 2',3'-Dideoxyadenosine-5'-monophosphate, a key intermediate in the activation of the antiviral agent ddI, in human peripheral blood mononuclear cells. *Nucleosides, Nucleotides & Nucleic Acids* 2000, 19(1&2): 405-413.

- ROBERTS J, BEBENEK K, KUNKEL T.** The accuracy of reverse transcriptase from HIV-1. *Science* **1988**, 242: 1171-1173.
- ROMANOFF AL.** The avian embryo – structural and functional developments. *The Macmillan Company, New York* **1960**.
- ROSSI L, SERAFINI S, SCHIAVANO G, et al.** Metabolism, mitochondrial uptake and toxicity of 2',3'-dideoxycytidine. *Biochem. Journal* **1999**, 344: 915-920.
- ROY P, YU LJ, CRESPICL, WAXMAN DJ.** Development of a substrate-activity based approach to identify the major human liver P-450 catalysts of cyclophosphamide and ifosfamide activation based on cDNA-expressed activities and liver microsomal P-450 profiles. *Drug Metabolism and Disposition* **1999**, 27 (6): 655-666.
- RUSSEL WMS, BURCH RL** (1959). The principle of humane experimental technique. *London: Methuen; Facsimile Edition, Potters Bar, Herts: UFAW, 1992; 156-157.*
- SAMUEL R, BETTIKER R, BYUNGSE S.** Antiretroviral therapy 2006: Pharmacology, applications and special situations. *Arch. Pharm. Res.* **2006**, 29 (6): 431-458.
- SCALFARO P, CHESAUX J, BUCHWALDER P, BIOLLAZ J, MICHELI J.** Severe transient neonatal lactic acidosis during prophylactic zidovudine treatment. *Intensive Care Medicine* **1998**, 24(3): 247-250.
- SCHIMURA H, LEVY J.** Polymerase substrate depletion: a novel substrate for inhibiting the replication of the human immunodeficiency virus. *Virology* **1995**, 211: 554-560.
- SCHACHTER J, CALDWELL HD.** Chlamydiae (Zit. nach Stainier, 1986), *Ann. Rev. Microbiol.* **1980**, 34: 285-309.
- SCHUURMAN R, NIJHUIS M, VAN LEEUWEN P, SHIPPER D, et al.** Rapid changes in human immunodeficiency virus type 1 RNA load and appearance of drug-resistant virus populations in patients treated with lamivudine (3TC). *The Journal of Infectious Diseases* **1995**, 171: 1411-1419.
- SHAFIK H, NOKTA M, POLLARD R.** Recombinant human interferon beta ser protects against zidovudine-induced genetic damage in AIDS patients. *Antiviral Research* **1991**, 16: 205-212.
- SHALKA A, GOFF S. (eds).** Reverse transcriptase. *Cold Spring Harbor Laboratory Press, NY* **1993**.

SHARMA P, NURPEISOV V, HERNANDEZ-SANTIAGO B, BELTRAN T, SCHINAZI R. Nucleoside inhibitors of human immunodeficiency virus type 1 reverse transcriptase. *Current Topics in Medicinal Chemistry* **2004**, 4(9):895-919.

SHERLEY J, KELLY T. Regulation of human thymidine kinase during the cell cycle. *The Journal of Biological Chemistry* **1988**, 263(17): 8350-8358.

SIMPSON M, CHIN C, KEILBAUGH S *et al.* Studies on the inhibition of mitochondrial DNA replication by 3'-azido-3'-deoxythymidine and other dideoxynucleoside analogs which inhibit HIV-1 replication. *Biochem. Pharmacol.* **1989**, 38: 1033-1036.

SINCLAIR JF, SINCLAIR PR. Avian cytochrome P450 in: Schenkman J, Greim H (Eds.). Handbook of experimental Pharmacology. Springer-Verlag, Heidelberg **1992**, 105: 259-277.

SINGLAS E, PIOGER J, TABURET A, COLANERI S, FILLASTRE J. Comparative pharmacokinetics of zidovudine (AZT) and its metabolite (G.AZT) in healthy subjects and HIV seropositive patients. *Eur. J. Clin. Pharmacol.* **1989**, 36: 639-640.

SLADEK NE. Metabolism of oxazaphosphorines. *Pharmacology and Therapeutics* **1988**, 37: 301-355.

SLUIS-CREMER N, TEMIZ NA, BAHAR I. Conformational changes in HIV-1 reverse transcriptase induced by nonnucleoside reverse transcriptase inhibitor binding. *Current HIV Research* **2004**, 2:323-332.

SOMMADOSSI JP, CARLISLE R, ZHOU Z. Cellular pharmacology of 3'-azido-3'-deoxythymidine with evidence of incorporation into DNA of human bone marrow cells. *Mol. Pharmacol.* **1989**, 36: 9-14.

SPENCER B, RAFTERY J. Sulphate activation and sulphotransferase in foetal guinea pigs and in developing hen's eggs. *Biochemical Journal/Proceedings of the Biochemical Society* **1966**, 99: 35-36.

SPIELMANN H, LIEBSCH M, KALWEIT S, MOLDENHAUER F, WIRNSBERGER T, HOLZHÜTTER HG, SCHNEIDER B, *et al.* Results of a validation study in Germany on two in vitro alternatives to the Draize eye irritation test, the HET-CAM test and the 3T3 NRU cytotoxicity test. *Alternatives To Laboratory Animals* **1996**, 24: 741-858.

SQUIRES K. An introduction to nucleoside and nucleotide analogues. *Antiviral Therapy* **2001**, 6(3): 1-14.

- ST. CLAIR M, RICHARDS C, SPECTOR T, WEINHOLD K, MILLER W, LANGLOIS A, *et al.* 3'-Azido-3'-deoxythymidine triphosphate as an inhibitor and substrate of purified human immunodeficiency virus reverse transcriptase. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* **1987**, 31: 1972-1977.
- STARNES M, CHENG YC. Cellular metabolism of 2',3'-dideoxycytidine, a compound active against human immunodeficiency virus in vitro. *The Journal of Biological Chemistry* **1987**, 262:988-991.
- STEIN D, MOORE K. Phosphorylation of nucleoside analog antiretrovirals: A review for clinicians. *Pharmacotherapy* **2001**, 21(1): 11-34.
- STELLBRINL HJ. Antiviral drugs in the treatment of AIDS: what is in the pipeline? *Eur. J. Med. Res.* **2007**, 12(9): 483-495.
- TANTILLO C, DING J, JACOBO-MOLINA A, *et al.* Locations of anti-AIDS drug binding sites and resistance mutations in the three-dimensional structure of HIV-1 reverse transcriptase. *J. Mol. Biol.* **1994**, 243: 369-387.
- TEMESGEN Z, WARNKE D, KASTEN MJ. Current status of antiviral therapy. *Expert Opinion Pharmacother.* **2006**, 7(12): 1541-1554.
- TEMPEL K, KORTENBEUTEL H, VON ZALLINGER C. Bleomycin – Induced DNA damage and DNA repair in chicken embryo cells as compared to X-irradiation. *Z. Naturforsch.* **1999**, 54c: 1068-1074.
- THORNBERRY N, LAZEBNIK Y. Caspases: Enemies within. *Science.* **1998**, 281: 1312-1316.
- THORNE C, NEWELL ML. Treatment options for the prevention of mother-to-child transmission of HIV. *Current Opinion in Investigational Drugs* **2005**, 6 (8): 804-811.
- TIERSCHUTZBERICHT DER BUNDESREGIERUNG 2007, Bundesministerium für Ernährung, Landwirtschaft und Verbraucherschutz (Hrsg.).
http://www.bmelv.de/cln_045/nn_754188/DE/00-Home/ Homepage_node.html nnn=true.
- TIERSCHG, *Tierschutzgesetz des Bundesministerium der Justiz*, 1987.
- TOSI P, CALABRESI P, GOULETTE F, RENAUD C, DARNOWSKI J. Azidothymidine induced cytotoxicity and incorporation into DNA in the human colon tumor cell line HCT-8 is enhanced by methotrexate in vitro and in vivo. *Cancer Research* **1992**, 52:4069-4073.

- TURRIZIANI O, SIMEONI E, et al.** Anti-HIV antiviral activity of stavudine in a thymidine kinase-deficient cellular line. *Antiviral Therapy* **1998**, 3: 191-194.
- TURRIZIANI O, ANTONELLI G, VERRI A, et al.** Alteration of thymidine kinase activity in cells treated with an antiviral agent. *J. Biol. Regul. Homeost. Agents*. **1995**, 9: 47-51.
- ULLMAN B, COONS T, ROCKWELL S, MCCARTAN K.** Genetic analysis of 2',3'-dideoxycytidine incorporation into cultured human T lymphoblasts. *The Journal of Biological Chemistry* **1988**, 263 (25): 12391-12396.
- VANDAMME A-M, VAN LAETHEM K, DE CLERCQ E.** Managing resistance to anti-HIV drugs – An important consideration for effective disease management. *Drugs* **1999**, 57(3): 337-361.
- VAN DYKE R, MCSHERRY G, DIAZ C, et al.** A phase 1-dose-escalating study of the combination of didanosine plus ribavirin in HIV-infected children [anstr.]. In: *Program and abstracts of the 38th international conference on antimicrobial agents and chemotherapy*. Washington, DC: American Society of Microbiology **1998**, I-6.
- VEAL G, BACK D.** Metabolism of Zidovudine, *Gen. Pharmac.* **1995**, 26(7): 1469-1475.
- VEAL G, WILD M, BARRY M, BACK D.** Effects of dideoxyinosine and dideoxycytidine on the intracellular phosphorylation of zidovudine in human mononuclear cells. *Br. J. clin. Pharmac.* **1994**, 38:323-328.
- VERRET MJ, SCOTT WF.** Toxicity of food additive chemicals in the developing chicken embryo. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* **1980**, 56: 265-273.
- VOGT M, HARTSHORN K, FURMAN P, et al.** Ribavirin antagonizes the effect of azidothymidine on HIV replication. *Science* **1987**, 235: 1376-1379.
- VON TUNGELN L, DOBROVOLSKY V, BISHOP M, SHADDOCK J, et al.** Frequency of *Tk* and *Hprt* lymphocyte mutants and bone marrow micronuclei in mice treated neonatally with zidovudine and didanosine. *Mutagenesis* **2004**, 19(4): 307-311.
- VON TUNGELN L, HAMILTON L, DOBROVOLSKY V, BISHOP M, SHADDOCK J, HEFLICH R, BELAND F.** Frequency of *Tk* and *Hprt* lymphocyte mutants in bone marrow micronuclei in B6C3F1/*Tk*+/- mice treated with zidovudine and lamivudine. *Carcinogenesis* **2002**, 23(9): 1427-1432.
- WAIN-HOBSON S.** The fastest genome evolution ever described: HIV variation in situ. *Current Opinion in Genetics and Development* **1993**, 3: 878-883.

WANG L, MUNCH-PETERSEN B, HERRSTRÖM SJÖBERG A, *et al.* Human thymidine kinase 2: molecular cloning and characterisation of the enzyme activity with antiviral and cytostatic nucleoside substrates. *FEBS Letters* **1999**, 442: 170-174.

WEI X, GHOSH SK, TAYLOR M, *et al.* Viral dynamics in human immunodeficiency virus type 1 infection. *Nature* **1995**, 373: 117-121.

WEHKING-BRÖKER U. Untersuchung zum kinetischen Verhalten von Phenacetin und Diazepam im bebrüteten Hühnerei. *Dissertationsschrift an der Universität Osnabrück* **2000**.

WHITE K, MARGOT N, LY J, CHEN J, RAY A, PAVELKO M, *et al.* A combination of decreased NRTI incorporation and decreased excision determines the resistance profile of HIV-1 K65R RT. *AIDS* **2005**, 19: 1751-1760.

WILSON J, AULABAUGH A, CALIGAN B, MCPHERSON S, *et al.* Human immunodeficiency virus type-1 reverse transcriptase. Contribution of Met-184 to binding of nucleoside 5'-triphosphate. *Journal of Biological Chemistry* **1996**, 271: 13656-13662.

WINKLER H. Rickettsiae: Intracytoplasmatic life. *Am. Soc. Microbiol. News* **1982**, 45: 184-187.

WITT K, TICE R, WOLFE G, BISHOP J. Genetic damage detected in CD-1 mouse pups exposed perinatally to 3'-azido-3'-deoxythymidine or dideoxyinosine via maternal dosing, nursing, and direct gavage: II. Effects of the individual agents compared to combination treatment. *Environmental and Molecular Mutagenesis* **2004**, 44(4):321-8.

WOLF T. Evaluierung der versuchstierfreien Genotoxizitätsprüfung am bebrüteten Hühnerei (hen's egg test for micronuclei-induction, HET-MN). *Habilitationsschrift an der Universität Osnabrück* **2003**.

WOLF T, NIEHAUS-ROLF C, LUEPKE NP. Investigating genotoxic and hematotoxic effects of N-nitrosodimethylamine, N-nitrosodiethylamine and N-nitrosodiethanolamine in the hen's egg- micronucleus test (HET-MN). *Food Chem. Toxicol.* **2003**, 41: 561-573.

WOLF T, NIEHAUS-ROLF C, LUEPKE NP. Some new methodological aspects of the hen's egg test for micronucleus induction (HET-MN). *Mutation Research* **2002**, 514: 59-76.

WOLF T, LUEPKE NP. Ersatz- und Ergänzungsmethoden zu Tierversuchen. *PZ PRISMA* **2001**, 8(3): 147-163.

WOLF T, LÜPKE NP. Formation of micronuclei in incubated hen's eggs as a measure of genotoxicity. *Mutation Research* **1997**, 394: 163-175.

WOLFE H, HUANG K. The conjugation of the aminobenzoic acid isomers in the adult and embryonic gallus domesticus. *Journal of Cellular and Comparative Physiology* **1959**, 54: 243-249.

WOLTERS K, SCHUITEMAKER H, MIEDEMA F. Rapid CD4+ T-cell turnover in HIV-1 infection: a paradigm revisited. *Immunol. Today* **1998**, 19: 44-48.

WUTZLER P, THUST R. Genetic risk of antiviral nucleoside analogues – a survey. *Antiviral Research* **2001**, 49: 55-74.

YARBRO J. Mechanism of action of hydroxyurea. *Semin. Oncol.* **1992**, 19 (3 suppl.9): 1-10.

YARCHORAN R, MITSUJA H, MYERS C, BRODER S. Clinical pharmacology of 3'-azido-2',3'-dideoxythymidine (zidovudine) and related dideoxynucleosides. *New England Journal of Medicine* **1989**, 321: 726-738.

ZAKHAROVA O, SUTURINA O, TIMOFEEVA O, GUDIMA S, et al. Interaction of tRNA-derivates and oligonucleotide primers with AZT-resistant mutants of HIV-1 reverse transcriptase. *Bioorganic & Medicinal Chemistry* **1998**, 6: 2041-2049.

ZIMMERMAN T, MAHONY W, PRUS K. 3'-Azido-3'-deoxythymidine. An unusual nucleoside analogue that permeates the membrane of human erythrocytes and lymphocytes by nonfacilitated diffusion. *The Journal of Biological Chemistry* **1987**, 262: 5748-5754.

8 Anhang

HET-MN AZT-3 (Retrovir®) und ddl-1

171204D11

Behandlung	Gruppe	Volumen	Dosis/Ei	Dosis/kg Eigewicht	n1: Gesamtzahl der eingesetzten Eier (als Grundlage der Viabilitätsberechnung)	n2: Zahl der untersuchten Eier	Viabilität	n3: Zahl der ausgewerteten Erythrocyten	Zellen in Metaphase MW% ± s.d.	Kernaberrationen MW% ± s.d.	MNE II (gesamt) MW% ± s.d.
AZT	A	1 ml	10 mg	575.60 µmol	10	10	100%	10000	2.4 % ± 2.7	0.0 % ± 0.0	22.7 % ± 10.1
AZT	B	1 ml d8 0.5 ml d9	15 mg	863.40 µmol	10	8	80%	6000	3.7 % ± 2.7	0.0 % ± 0.0	30.5 % ± 9.9
AZT	C	1 ml d8 1 ml d9	20 mg	1151.20 µmol	10	10	0%	Nicht gezählt	-	-	-
CP in H2O	D	100 µl	0.05 mg	2.95 µmol	6	6	100%	6000	0.8 % ± 1.0	0.0 % ± 0.0	15.8 % ± 5,0
Vehicel	E	1 ml	0.0 mg	0.0 µmol	6	6	100%	6000	0.0 % ± 0.0	0.0 % ± 0.0	1.3 % ± 1,2
ddl	F	1 ml	20 mg	1302.35 µmol	5	5	100%	5000	0.0 % ± -	0.0 % ± -	-
ddl	G	0.5 ml	10 mg	651.17 µmol	3	3	100%	3000	0.0 % ± 0.0	0.0 % ± 0.0	44.3 % ± 6,0
ddl	H	0.25 ml	5 mg	325.59 µmol	2	2	100%	2000	0.5 % ± 0.7	0.0 % ± 0.0	12.5 % ± 2.1

Vehikel:	Aq. bidest.
Applikation:	d8
Blutentnahme:	d11
Route:	ac

Bei AZT: vermehrt binukleirte Zellen. Nicht so bei ddl.

Gruppe C wurde nicht gezählt, da sich Gruppe B schon deutlich positiv.

HET-MN AZT-4 (Retrovir®)

210105D11

Behandlung	Gruppe	Volumen	Dosis/Ei	Dosis/kg Eigewicht	n1: Gesamtzahl der eingesetzten Eier (als Grundlage der Viabilitäts- berechnung)	n2: Zahl der unter- suchten Eier	Viabilität	n3: Zahl der ausgewerteten Erythrocyten	Zellen in Metaphase MW% ± s.d.	Kernaberrationen MW% ± s.d.	MNE II (gesamt) MW% ± s.d.
AZT	A	1 ml	8 mg	460.48 µmol	7	5	100 %	5000	1.8 % ± 2.7	0.0 % ± 0.0	20.2% ± 5.7
AZT	B	1ml	4 mg	230.24 µmol	7	6	100 %	6000	1.0 % ± 1.3	0.0 % ± 0.0	9.2% ± 3.1
AZT	C	1ml	2 mg	115.12 µmol	7	7	100 %	7000	0.3 % ± 0.5	0.0 % ± 0.0	2.6% ± 1.8
AZT	D	1ml	1 mg	57.56 µmol	7	6	86 %	6000	0.3 % ± 0.8	0.0 % ± 0.0	2.7% ± 1.2
CP in H2O	E	100 µl	0.05 mg	2.95 µmol	6	6	100 %	6000	0.0 % ± 0.0	0.0 % ± 0.0	11.3% ± 5.0
Vehicle	F	1 ml	0.0 mg	0.0 µmol	6	6	100 %	6000	0.2 % ± 0.4	0.0 % ± 0.0	0.8% ± 1.6
AZT	G	1ml	10 mg	575.60 µmol	7	5	100 %	2500	4.0 % ± 4.9	1.2 % ± 2.7	33.2% ± 6.4
AZT	H	1ml	0.5 mg	28.78 µmol	6	6	100 %	6000	0.3 % ± 0.8	0.0 % ± 0.0	2.8% ± 2.1

Bei AZT: vermehrt binukleirte Zellen.

Vehikel:	Aq. bidest.
Applikation:	d8
Blutentnahme:	d11
Route:	ac

HET-MN AZT-5 (Retrovir®)

180205D11

Behandlung	Gruppe	Volumen	Dosis/Ei	Dosis/kg Eigewicht	n1: Gesamtzahl der eingesetzten Eier (als Grundlage der Viabilitäts- berechnung)	n2: Zahl der unter- suchten Eier	Viabilität	n3: Zahl der ausgewerteten Erythrocyten	Zellen in Metaphase MW% ± s.d.	Kernaberrationen MW% ± s.d.	MNE II (gesamt) MW% ± s.d.
AZT	A	600 µl	6 mg	345.35 µmol	7	7	100 %	7000	0.6 % ± 1.0	0.0 % ± 0.0	11.3% ± 5.2
AZT	B	400 µl	3 mg	172.68 µmol	7	7	100 %	7000	0.0 % ± 0.0	0.0 % ± 0.0	4.1% ± 1.7
AZT	C	150 µl	1.5 mg	86.34 µmol	7	7	100 %	7000	0.6 % ± 1.1	0.0 % ± 0.0	3.7% ± 2.1
AZT	D	75 µl	0.75 mg	43.17 µmol	7	7	100 %	7000	0.0 % ± 0.0	0.0 % ± 0.0	2.7% ± 2.6
CP in H2O	E	100 µl	0.05 mg	2.95 µmol	7	5	72 %	5000	0.4 % ± 0.5	0.0 % ± 0.0	22.6% ± 4.6
Vehicle	F	600 µl	0.0 mg	0.0 µmol	6	6	100 %	6000	0.0% ± 0.0	0.0 % ± 0.0	0.7% ± 0.8

Bei AZT: vermehrt binukleirte Zellen.

Vehikel:	Aq. bidest.
Applikation:	d8
Blutentnahme:	d11
Route:	ac

HET-MN d4T-1

110705 d11

Behandlung	Gruppe	Dosis/Ei	Dosis/kg Eigewicht	n1: Gesamtzahl der eingesetzten Eier (als Grundlage der Viabilitäts- berechnung)	n2: Zahl der unter- suchten Eier	Viabilität	n3: Zahl der ausgewerteten Erythrocyten	Zellen in Metaphase MW% ± s.d.	Kernaberrationen MW% ± s.d.	MNE II (gesamt) MW% ± s.d.
d4T	A	10 mg	686.17 µmol	10	1	20 %	1000	0.0 ± 0.0	0.0 ± 0.0	2.0 ± 0.0
d4T	B	5 mg	343.08 µmol	10	8	100 %	8000	0.4 ± 0.7	0.0 ± 0.0	2.3 ± 1.6
d4T	C	2.5 mg	171.54 µmol	10	8	100 %	8000	0.2 ± 0.4	0.0 ± 0.0	2.9 ± 1.9
d4T	D	1.25 mg	85.77 µmol	9	8	100 %	8000	1.6 ± 1.3	0.0 ± 0.0	1.8 ± 1.2
H ₂ O	E	1 ml	0.0 µmol	7	6	100 %	6000	0.3 ± 0.5	0.0 ± 0.0	1.2 ± 1.2
CP	F	0.05 mg	2.95 µmol	7	6	100 %	6000	0.0 ± 0.0	0.0 ± 0.0	10.7 ± 3.0

Vehikel:	Aq. bidest.
Applikation:	d8
Blutentnahme:	d11
Route:	ac

**HET-MN
d4T-2**

020905 d11

Behandlung	Gruppe	Dosis/Ei	Dosis/kg Eigewicht	n1: Gesamtzahl der eingesetzten Eier (als Grundlage der Viabilitäts- berechnung)	n2: Zahl der unter- suchten Eier	Viabilität	n3: Zahl der ausgewerteten Erythrocyten	Zellen in Metaphase MW% ± s.d.	Kernaberrationen MW% ± s.d.	MNE II (gesamt) MW% ± s.d.
d4T	A	5 mg d8 5 mg d9 5 mg d10	1029.25 µmol	18	1	11 %	-	-	-	-
d4T	B	5 mg d8 5 mg d9	686.17 µmol	18	4	22 %	4000	0.0 ± 0.0	0.0 ± 0.0	3.3 ± 2.2
d4T	C	5 mg	343.08 µmol	10	7	90 %	7000	0.3 ± 0.8	0.0 ± 0.0	4.7 ± 3.0
d4T	D	2.5 mg	171.54 µmol	10	6	100 %	6000	0.2 ± 0.4	0.0 ± 0.0	1.3 ± 0.4
H ₂ O	E	1 ml	0.0 µmol	7	6	100%	6000	0.2 ± 0.4	0.0 ± 0.0	1.3 ± 1.0
CP	F	0.05 mg	2.95 µmol	7	6	100 %	6000	0.3 ± 0.5	0.0 ± 0.0	8.7 ± 4.8

Vehikel:	Aq. bidest.
Applikation:	d8
Blutentnahme:	d11
Route:	ac

HET-MNddl/ddC-2 **d4T-3** 3TC-1

300905 d11

Behandlung	Gruppe	Dosis/Ei	Dosis/kg Eigewicht	n1: Gesamtzahl der eingesetzten Eier (als Grundlage der Viabilitäts- berechnung)	n2: Zahl der unter- suchten Eier	Viabilität	n3: Zahl der ausgewerteten Erythrocyten	Zellen in Metaphase MW% ± s.d.	Kernaberrationen MW% ± s.d.	MNE II (gesamt) MW% ± s.d.
ddl	A	0.4 mg	26.05 µmol	8	6	100 %	6000	0.3 ± 0.8	0.0 ± 0.0	5.2 ± 2.3
ddC	B	0.2 mg	14.57 µmol	8	6	100 %	6000	0. ± 0.0	0.0 ± 0.0	4.5 ± 2.8
ddl/ ddC	C	0.4/ 0.2 mg	26.05/ 14.57 µmol	8	6	100 %	6000	0.2 ± 0.4	0.0 ± 0.0	13.0 ± 6.1
3TC	D	10 mg	670.99 µmol	10	0	0 %	0	-	-	-
d4T	E	20 mg	1372.34 µmol	10	0	0 %	0	-	-	-
H ₂ O	F	1 ml	0.0 µmol	7	6	100 %	6000	0.2 ± 0.4	0.0 ± 0.0	1.2 ± 1.2
CP	G	0.05 mg	2.95 µmol	7	6	100 %	6000	0.0 ± 0.0	0.0 ± 0.0	10.0 ± 4.6
d4T	H	10 mg	686.17 µmol	8	0	0 %	0	-	-	-

Vehikel:	Aq. bidest.
Applikation:	d8 (E & H : d10)
Blutentnahme:	d11
Route:	ac

HET-MN d4T-4_3TC-2

211005 d11

Behandlung	Gruppe	Dosis/Ei	Dosis/kg Eigewicht	n1: Gesamtzahl der eingesetzten Eier (als Grundlage der Viabilitätsberechnung)	n2: Zahl der untersuchten Eier	Viabilität	n3: Zahl der ausgewerteten Erythrocyten	Zellen in Metaphase MW% ± s.d.	Kernaberrationen MW% ± s.d.	MNE II (gesamt) MW% ± s.d.
d4T	A	5 mg	343.08 µmol	8	6	100 %	3000	0.7 ± 1.2	0.0 ± 0.0	3.0 ± 1.7
d4T	B	10 mg	686.17 µmol	20	9	45 %	9000	0.2 ± 0.4	0.0 ± 0.0	3.1 ± 1.5
d4T	C	7.5 mg	514.63 µmol	15	10	80 %	7000	1.0 ± 0.8	0.0 ± 0.0	3.6 ± 1.5
3TC	D	8 mg	536.78 µmol	17	0	0 %	0	-	-	-
H ₂ O	E	ml	0.0 µmol	8	6	100 %	6000	0.0 ± 0.0	0.0 ± 0.0	2.2 ± 0.8
CP	F	0.05 mg	2.95 µmol	8	6	100 %	6000	0.7 ± 1.2	0.0 ± 0.0	10.7 ± 3.8
3TC	G	4 mg	268.34 µmol	10	5	50 %	5000	0.2 ± 0.4	0.0 ± 0.0	2.2 ± 1.5
3TC	H	2 mg	134.12 µmol	10	6	90 %	6000	0.3 ± 0.5	0.0 ± 0.0	3.3 ± 1.5

G: Zum Teil bizarre, unregelmäßige Kernformen.

H: Vereinzelt bizarre, unregelmäßige Kernformen.

Vehikel:	Aq. bidest.
Applikation:	d8 (E & H :auch d10)
Blutentnahme:	d11
Route:	ac

HET-MN d4T-5

191205 d11

Behandlung	Gruppe	Dosis/Ei	Dosis/kg Eigewicht	n1: Gesamtzahl der eingesetzten Eier (als Grundlage der Viabilitäts- berechnung)	n2: Zahl der unter- suchten Eier	Viabilität	n3: Zahl der ausgewerteten Erythrocyten	Zellen in Metaphase MW% ± s.d.	Kernaberrationen MW% ± s.d.	MNE II (gesamt) MW% ± s.d.
d4T	A	11 mg	754.79 µmol	21	8	38 %	8000	0.5 ± 0.5	0.0 ± 0.0	3.4 ± 1.4
d4T	B	10 mg	686.17 µmol	30	10	37 %	10000	0.5 ± 0.7	0.0 ± 0.0	4.6 ± 2.1
d4T	C	7.5 mg	514.63 µmol	18	10	100 %	10000	0.2 ± 0.4	0.0 ± 0.0	2.7 ± 2.0
PBS	D	1.1 ml	? µmol	7	6	100 %	6000	0.2 ± 0.4	0.0 ± 0.0	1.3 ± 1.0
CP	E	0.05 mg	2.95 µmol	7	6	100 %	6000	0.2 ± 0.4	0.0 ± 0.0	9.0 ± 3.5

Vehikel:	Aq. bidest.
Applikation:	d8
Blutentnahme:	d11
Route:	ac

HET-MN d4T-6

240206 d11

Behandlung	Gruppe	Dosis/Ei	Dosis/kg Eigewicht	n1: Gesamtzahl der eingesetzten Eier (als Grundlage der Viabilitäts- berechnung)	n2: Zahl der unter- suchten Eier	Viabilität	n3: Zahl der ausgewerteten Erythrocyten	Zellen in Metaphase MW% ± s.d.	Kernaberrationen MW% ± s.d.	MNE II (gesamt) MW% ± s.d.
d4T	A	4 mg	274.47 µmol	8	6	100 %	6000	0.0 ± 0.0	0.0 ± 0.0	3.3 ± 0.8
d4T	B	5 mg	343.07 µmol	8	6	75 %	6000	0.3 ± 0.5	0.0 ± 0.0	2.8 ± 1.3
d4T	C	8 mg	548.85 µmol	10	7	80 %	7000	0.1 ± 0.4	0.0 ± 0.0	4.1 ± 3.5
d4T	D	12 mg*	823.40 µmol	26	10	42 %	10000	0.4 ± 0.7	0.0 ± 0.0	3.3 ± 1.5
H ₂ O	E	1.2 ml	0.0 µmol	7	6	100 %	6000	0.0 ± 0.0	0.0 ± 0.0	1.5 ± 1.0
CP	F	0.05 mg	2.95 µmol	7	6	100 %	6000	0.2 ± 0.4	0.0 ± 0.0	12.7 ± 4.6
d4T	G	8 mg**	548.85 µmol	10	6	70 %	6000	0.8 ± 0.4	0.0 ± 0.0	2.8 ± 1.2

Vehikel:	PBS
Applikation:	d8
Blutentnahme:	d11
Route:	ac

HET-MN ddC-2

210305D11

Behandlung	Gruppe	Volumen	Dosis/Ei	Dosis/kg Eigewicht	n1: Gesamtzahl der eingesetzten Eier (als Grundlage der Viabilitäts- berechnung)	n2: Zahl der unter- suchten Eier	Viabilität	n3: Zahl der ausgewerteten Erythrocyten	Zellen in Metaphase MW% ± s.d.	Kernaberrationen MW% ± s.d.	MNE II (gesamt)
											MW% ± s.d.
ddC	A	1 ml	5 mg	364.13 µmol	8	0	0 %	0000	-	-	-
ddC	B	500 µl	2.5 mg	182.06 µmol	8	0	0 %	0000	-	-	-
ddC	C	250 µl	1.25 mg	91.03 µmol	8	5	62 %	5000	0.0 % ± 0.0	0.0 % ± 0.0	56.2 % ± 13.0
ddC	D	125 µl	0.625 mg	45.52 µmol	8	6	75 %	6000	0.2 % ± 0.4	0.0 % ± 0.0	27.0 % ± 13.0
Vehicel	E	1 ml	0.0 mg	0.0 µmol	8	6	75 %	6000	0.0 % ± 0.0	0.0 % ± 0.0	1.2 % ± 0.8
CP in H2O	F	100 µl	0.05 mg	2.95 µmol	8	6	100 %	6000	0.0 % ± 0.0	0.0 % ± 0.0	11.8 % ± 3.4

Vehikel:	Aq. bidest.
Applikation:	d8
Blutentnahme:	d11
Route:	ac

Bei allen Präparaten: erhöhte Herzfrequenz, sowie abgestorbene Extremitäten, bzw. Phalangen.

HET-MN
ddC-3

180405D11

Behandlung	Gruppe	Dosis/Ei	Dosis/kg Eigewicht	n1: Gesamtzahl der eingesetzten Eier (als Grundlage der Viabilitäts- berechnung)	n2: Zahl der unter- suchten Eier	Viabilität	n3: Zahl der ausgewerteten Erythrocyten	Zellen in Metaphase MW% ± s.d.	Kernaberrationen MW% ± s.d.	MNE II (gesamt) MW% ± s.d.
ddC	A	1 mg	72.84 µmol	15	7	100 %	7000	0.0% ± 0.0	0.0% ± 0.0	52.0% ± 11.7
ddC	B	0.6 mg	43.70 µmol	12	7	100 %	7000	0.0% ± 0.0	0.0% ± 0.0	24.6% ± 9.2
ddC	C	0.5 mg	36.42 µmol	8	7	100 %	7000	0.1% ± 0.4	0.0% ± 0.0	16.4% ± 8.9
ddC	D	0.4 mg	29.13 µmol	8	7	100 %	7000	0.1% ± 0.4	0.0% ± 0.0	16.1% ± 9.0
ddC	E	0.2 mg	14.57 µmol	6	6	100 %	6000	0.7% ± 1.6	0.0% ± 0.0	3.4% ± 2.1
H ₂ O	F	0.0 mg	0.0 µmol	7	7	100 %	7000	0.6% ± 1.0	0.0% ± 0.0	1.1% ± 1.1
CP	G	0.05 mg	2.95 µmol	7	7	100 %	7000	0.0% ± 0.0	0.0% ± 0.0	9.3% ± 3.9

Vehikel:	Aq. bidest.
Applikation:	d8
Blutentnahme:	d11
Route:	ac

HET-MN ddC-4

300505 d11

Behandlung	Gruppe	Dosis/Ei	Dosis/kg Eigewicht	n1: Gesamtzahl der eingesetzten Eier (als Grundlage der Viabilitäts- berechnung)	n2: Zahl der unter- suchten Eier	Viabilität	n3: Zahl der ausgewerteten Erythrocyten	Zellen in Metaphase MW% ± s.d.	Kernaberrationen MW% ± s.d.	MNE II (gesamt) MW% ± s.d.
ddC	A	0.6 mg	43.70 µmol	10	6	80 %	6000	0.0 ± 0.0	0.0 ± 0.0	21.8 ± 8.8
ddC	B	0.5 mg	36.42 µmol	10	6	100 %	6000	0.2 ± 0.4	0.0 ± 0.0	17.8 ± 6.7
ddC	C	0.4 mg	29.13 µmol	9	6	100 %	6000	0.2 ± 0.4	0.0 ± 0.0	14.2 ± 3.5
ddC	D	0.2 mg	14.57 µmol	8	6	100 %	6000	0.3 ± 0.5	0.0 ± 0.0	4.7 ± 4.2
H ₂ O	E	0.0 mg	0.0 µmol	7	6	100 %	6000	0.2 ± 0.4	0.0 ± 0.0	1.0 ± 1.1
CP	F	0.05 mg	2.95 µmol	7	6	100 %	6000	0.3 ± 0.5	0.0 ± 0.0	11.2 ± 7.4

Vehikel:	Aq. bidest.
Applikation:	d8
Blutentnahme:	d11
Route:	ac

HET-MN**ddl/ddC-2_d4T-3_3TC-1**

30.09.05 d11

Behandlung	Gruppe	Dosis/Ei	Dosis/kg Eigewicht	n1: Gesamtzahl der eingesetzten Eier (als Grundlage der Viabilitätsberechnung)	n2: Zahl der untersuchten Eier	Viabilität	n3: Zahl der ausgewerteten Erythrocyten	Zellen in Metaphase MW% ± s.d.	Kernaberrationen MW% ± s.d.	MNE II (gesamt) MW% ± s.d.
ddl	A	0.4 mg	26.05 µmol	8	6	100 %	6000	0.3 ± 0.8	0.0 ± 0.0	5.2 ± 2.3
ddC	B	0.2 mg	14.57 µmol	8	6	100 %	6000	0. ± 0.0	0.0 ± 0.0	4.5 ± 2.8
ddl/ ddC	C	0.4/ 0.2 mg	26.05/ 14.57 µmol	8	6	100 %	6000	0.2 ± 0.4	0.0 ± 0.0	13.0 ± 6.1
3TC	D	10 mg	670.99 µmol	10	0	0 %	0	-	-	-
d4T	E	20 mg	1372.34 µmol	10	0	0 %	0	-	-	-
H ₂ O	F	1 ml	0.0 µmol	7	6	100 %	6000	0.2 ± 0.4	0.0 ± 0.0	1.2 ± 1.2
CP	G	0.05 mg	2.95 µmol	7	6	100 %	6000	0.0 ± 0.0	0.0 ± 0.0	10.0 ± 4.6
d4T	H	10 mg	686.17 µmol	8	0	0 %	0	-	-	-

Vehikel:	Aq. bidest.
Applikation:	d8 (E & H : d10)
Blutentnahme:	d11
Route:	ac

HET-MN

d4T-4/3TC-2

211005 d11

Behandlung	Gruppe	Dosis/Ei	Dosis/kg Eigewicht	n1: Gesamtzahl der eingesetzten Eier (als Grundlage der Viabilitäts- berechnung)	n2: Zahl der unter- suchten Eier	Viabilität	n3: Zahl der ausgewerteten Erythrocyten	Zellen in Metaphase MW% ± s.d.	Kernaberrationen MW% ± s.d.	MNE II (gesamt) MW% ± s.d.
d4T	A	5 mg	343.08 µmol	8	6	100 %	3000	0.7 ± 1.2	0.0 ± 0.0	3.0 ± 1.7
d4T	B	10 mg	686.17 µmol	20	9	45 %	9000	0.2 ± 0.4	0.0 ± 0.0	3.1 ± 1.5
d4T	C	7.5 mg	514.63 µmol	15	10	80 %	7000	1.0 ± 0.8	0.0 ± 0.0	3.6 ± 1.5
3TC	D	8 mg	536.78 µmol	17	0	0 %	0	-	-	-
H ₂ O	E	ml	0.0 µmol	8	6	100 %	6000	0.0 ± 0.0	0.0 ± 0.0	2.2 ± 0.8
CP	F	0.05 mg	2.95 µmol	8	6	100 %	6000	0.7 ± 1.2	0.0 ± 0.0	10.7 ± 3.8
3TC	G	4 mg	268.34 µmol	10	5	50 %	5000	0.2 ± 0.4	0.0 ± 0.0	2.2 ± 1.5
3TC	H	2 mg	134.12 µmol	10	6	90 %	6000	0.3 ± 0.5	0.0 ± 0.0	3.3 ± 1.5

G: Zum Teil bizarre Kernformen

H: Vereinzelt bizarre Kernformen

Vehikel:	Aq. bidest.
Applikation:	d8 (E & H : d10)
Blutentnahme:	d11
Route:	ac

HET-MN 3TC-2 (2. Auszählung der Gruppen G&H)

211005 d11

Behandlung	Gruppe	Dosis/Ei	Dosis/kg Eigewicht	n1: Gesamtzahl der eingesetzten Eier (als Grundlage der Viabilitätsberechnung)	n2: Zahl der untersuchten Eier	Viabilität	n3: Zahl der ausgewerteten Erythrocyten	Zellen in Metaphase MW% ± s.d.	Kernaberrationen MW% ± s.d.	MNE II (gesamt) MW% ± s.d.
3TC	G	4 mg	268.34 µmol	10	5	50 %	5000	0.0 ± 0.0	0.0 ± 0.0	2.-6 ± 1.7
3TC	H	2 mg	134.12 µmol	10	6	100 %	6000	0.0 ± 0.0	0.0 ± 0.0	3.3 ± 1.5
H ₂ O	E	ml	0.0 µmol	8	6	100 %	6000	0.0 ± 0.0	0.0 ± 0.0	2.2 ± 0.8
CP	F	0.05 mg	2.95 µmol	8	6	100 %	6000	0.7 ± 1.2	0.0 ± 0.0	10.7 ± 3.8

Vehikel:	Aq. bidest.
Applikation:	d8 (E & H : d10)
Blutentnahme:	d11
Route:	ac

HET-MN 3TC-3 (Epivir [Saft zum Einnehmen])

30.0.06 d11

Behandlung	Gruppe	Dosis/Ei	Dosis/kg Eigewicht	n1: Gesamtzahl der eingesetzten Eier (als Grundlage der Viabilitäts- berechnung)	n2: Zahl der unter- suchten Eier	Viabilität	n3: Zahl der ausgewerteten Erythrocyten	Zellen in Metaphase MW% ± s.d.	Kernaberrationen MW% ± s.d.	MNE II (gesamt) MW% ± s.d.
3TC	A	5 mg	335.50 µmol	23	2	9 %	2000	3,5 ± 3.5	0.0 ± 0.0	12.0 ± 8.5
3TC	B	4 mg	268.40 µmol	20	8	45 %	8000	0.8 ± 1.0	0.0 ± 0.0	5.9 ± 2.0
3TC	C	3 mg	201.30 µmol	11	4	36 %	4000	0.3 ± 0.5	0.0 ± 0.0	6.0 ± 3.6
3TC	D	2 mg	134.20 µmol	10	7	90 %	7000	0.6 ± 0.8	0.0 ± 0.0	5.0 ± 3.3
H ₂ O	E	0.5 ml	0.0 µmol	7	6	100 %	6000	0.2 ± 0.4	0.0 ± 0.0	1.5 ± 1.0
CP	F	0.05 mg	2.95 µmol	7	6	100 %	6000	0.0 ± 0.0	0.0 ± 0.0	11.7 ± 5.0

Vehikel:	Aq. bidest.
Applikation:	d8
Blutentnahme:	d11
Route:	ac

HET-MN
AZT/ddl-3_3TC-4

110906 d11

Behandlung	Gruppe	Dosis/Ei	Dosis/kg Eigewicht	n1: Gesamtzahl der eingesetzten Eier (als Grundlage der Viabilitäts- berechnung)	n2: Zahl der unter- suchten Eier	Viabilität	n3: Zahl der ausgewerteten Erythrocyten	Zellen in Metaphase MW% ± s.d.	Kernaberrationen MW% ± s.d.	MNE II (gesamt) MW% ± s.d.
AZT	A	2.5 mg	143.9 µmol	10	6	100 %	6000	0.0 ± 0.0	0.0 ± 0.0	5.8 ± 3.0
ddl	B	2.5 mg	162.79 µmol	10	6	100 %	6000	0.0 ± 0.0	0.0 ± 0.0	6.7 ± 1.6
AZT/ ddl	C	2.5 mg/ 2.5 mg	143.9 µmol/ 162.79 µmol	12	6	90 %	6000	0.0 ± 0.0	0.0 ± 0.0	58.8 ± 38.8
3TC	D	30 mg	2013 µmol	20	6	95 %	6000	0.0 ± 0.0	0.3 ± 0.8	6.2 ± 2.6
H ₂ O	E	1 ml	0.0 µmol	8	6	100 %	6000	0.0 ± 0.0	0.0 ± 0.0	1.5 ± 1.0
CP	F	0.05 mg	2.95 µmol	8	6	100 %	6000	0.0 ± 0.0	0.0 ± 0.0	10.5 ± 2.6

Vehikel:	Aq. bidest.
Applikation:	d8
Blutentnahme:	d11
Route:	ac

HET-MN 3TC-5

260107 d11

Behandlung	Gruppe	Dosis/Ei	Dosis/kg Eigewicht	n1: Gesamtzahl der eingesetzten Eier (als Grundlage der Viabilitäts- berechnung)	n2: Zahl der unter- suchten Eier	Viabilität	n3: Zahl der ausgewerteten Erythrocyten	Zellen in Metaphase MW% ± s.d.	Kernaberrationen MW% ± s.d.	MNE II (gesamt)
										MW% ± s.d.
3TC	A	60 mg	4025.98 µmol	17	6	71 %	6000	0.8 ± 1.2	0.3 ± 0.8	11.0 ± 10.2
3TC	B	50 mg	3354.98 µmol	15	6	53 %	6000	0.2 ± 0.4	0.0 ± 0.0	11.5 ± 8.6
3TC	C	40 mg	2683.98 µmol	12	7	58 %	7000	0.4 ± 0.8	0.0 ± 0.0	9.9 ± 11.8
3TC	D	30 mg	2012.99 µmol	10	6	90 %	6000	0.3 ± 0.5	0.0 ± 0.0	4.8 ± 1.9
3TC in 5 %iger PBS/PG-12- Lsg.	E	30 mg/ 5%	2012.99 µmol	14	6	0 %	6000	0.0 ± 0.0	0.0 ± 0.0	0.0 ± 0.0
PBS	F	1 ml	0.0 µmol	7	6	86 %	6000	0.0 ± 0.0	0.0 ± 0.0	1.7 ± 0.8
CP	G	0.05 mg	2.95 µmol	7	6	100 %	6000	0.2 ± 0.4	0.0 ± 0.0	13.3 ± 3.6

Vehikel:	PBS
Applikation:	d8
Blutentnahme:	d11
Route:	ac

HET-MN
3TC-6

020307 d11

Behandlung	Gruppe	Dosis/Ei	Dosis/kg Eigewicht	n1: Gesamtzahl der eingesetzten Eier (als Grundlage der Viabilitätsberechnung)	n2: Zahl der untersuchten Eier	Viabilität	n3: Zahl der ausgewerteten Erythrocyten	Zellen in Metaphase MW% ± s.d.	Kernaberrationen MW% ± s.d.	MNE II (gesamt) MW% ± s.d.
3TC	A	60 mg	4025.98 µmol	15	6	53 %	6000	0.3 ± 0.5	0.0 ± 0.0	12.3 ± 7.1
3TC	B	50 mg	3354.98 µmol	15	6	47 %	6000	0.5 ± 0.5	0.0 ± 0.0	11.0 ± 5.3
3TC	C	40 mg	2683.98 µmol	15	6	80 %	6000	1.7 ± 2.1	0.0 ± 0.0	6.3 ± 1.8
3TC	D	30 mg	2012.99 µmol	15	6	80 %	6000	0.5 ± 1.2	0.0 ± 0.0	7.2 ± 2.7
PBS	E	1 ml	0.0 µmol	7	4	57%	4000	0.3 ± 0.5	0.0 ± 0.0	0.8 ± 0.5
CP	F	0.05 mg	2.95 µmol	7	6	100 %	6000	0.0 ± 0.0	0.0 ± 0.0	12.0 ± 2.9

Vehikel:	PBS
Applikation:	d8
Blutentnahme:	d11
Route:	ac

HET-MN**ddl-1** und AZT-3 (Retrovir)

171204D11

Behandlung	Gruppe	Volumen	Dosis/Ei	Dosis/kg Eigewicht	n1: Gesamtzahl der eingesetzten Eier (als Grundlage der Viabilitätsberechnung)	n2: Zahl der untersuchten Eier	Viabilität	n3: Zahl der ausgewerteten Erythrocyten	Zellen in Metaphase MW% ± s.d.	Kernaberrationen MW% ± s.d.	MNE II (gesamt) MW% ± s.d.
AZT	A	1 ml	10 mg	575.60 µmol	10	10	100%	10000	2.4 % ± 2.7	0.0 % ± 0.0	22.7 % ± 10.1
AZT	B	1 ml d8 0.5 ml d9	15 mg	863.40 µmol	10	8	80%	6000	3.7 % ± 2.7	0.0 % ± 0.0	30.5 % ± 9.9
AZT	C	1 ml d8 1 ml d9	20 mg	1151.20 µmol	10	10	100%	Nicht gezählt	-	-	-
CP in H2O	D	100 µl	0.05 mg	2.95 µmol	6	6	100%	6000	0.8 % ± 1.0	0.0 % ± 0.0	15.8 % ± 5,0
Vehicel	E	1 ml	0.0 mg	0.0 µmol	6	6	100%	6000	0.0 % ± 0.0	0.0 % ± 0.0	1.3 % ± 1,2
ddl	F	1 ml	20 mg	1302.35 µmol	5	1	20%	1000	0.0 % ± -	0.0 % ± -	Nur ein Ei gezählt
ddl	G	0.5 ml	10 mg	651.17 µmol	3	3	100%	3000	0.0 % ± 0.0	0.0 % ± 0.0	44.3 % ± 6,0
ddl	H	0.25 ml	5 mg	325.59 µmol	2	2	100%	2000	0.5 % ± 0.7	0.0 % ± 0.0	12.5 % ± 2.1

Vehikel:	Aq. bidest.
Applikation:	d8
Blutentnahme:	d11
Route:	ac

HET-MN ddl-2

280105D11

Behandlung	Gruppe	Volumen	Dosis/Ei	Dosis/kg Eigewicht	n1: Gesamtzahl der eingesetzten Eier (als Grundlage der Viabilitäts- berechnung)	n2: Zahl der unter- suchten Eier	Viabilität	n3: Zahl der ausgewerteten Erythrocyten	Zellen in Metaphase MW% ± s.d.	Kernaberrationen MW% ± s.d.	MNE II (gesamt)
											MW% ± s.d.
ddl	A	500 µl	5 mg	325.59 µmol	7	5	72 %	5000	0.0 % ± 0.0	0.0 % ± 0.0	17.2% ± 12.8
ddl	B	250 µ	2.5 mg	162.79 µmol	7	6	100 %	6000	0.2 % ± 0.4	0.0 % ± 0.0	8.7% ± 4.8
ddl	C	120 µl	1.2 mg	78.14 µmol	7	6	100 %	6000	0.2 % ± 0.4	0.0 % ± 0.0	5.5% ± 3.3
ddl	D	60 µl	0.6 mg	39.07 µmol	7	6	86 %	6000	0.2 % ± 0.4	0.0 % ± 0.0	1.5% ± 0.8
Vehicel	E	500 µl	0.0 mg	0.0 µmol	7	5	100 %	5000	0.0% ± 0.0	0.0 % ± 0.0	1.0% ± 1.2
CP in H2O	F	100 µl	0.05 mg	2.95 µmol	7	7	100 %	7000	0.0 % ± 0.0	0.0 % ± 0.0	22.2% ± 2.5

Vehikel:	Aq. bidest.
Applikation:	d8
Blutentnahme:	d11
Route:	ac

HET-MN
ddl-3

040305D11

Behandlung	Gruppe	Volumen	Dosis/Ei	Dosis/kg Eigewicht	n1: Gesamtzahl der eingesetzten Eier (als Grundlage der Viabilitäts- berechnung)	n2: Zahl der unter- suchten Eier	Viabilität	n3: Zahl der ausgewerteten Erythrocyten	Zellen in Metaphase MW% ± s.d.	Kernaberrationen MW% ± s.d.	MNE II (gesamt)
											MW% ± s.d.
ddl	A	500 µl	5 mg	325.59 µmol	7	7	100 %	7000	0.1 % ± 0.4	0.0 % ± 0.0	17.3 % ± 10.1
ddl	B	250 µ	2.5 mg	162.79 µmol	7	6	86 %	6000	0.3 % ± 0.5	0.0 % ± 0.0	4.7 % ± 2.3
ddl	C	125 µl	1.25 mg	81.39 µmol	7	6	100 %	6000	0.3 % ± 0.5	0.0 % ± 0.0	3.8 % ± 1.7
ddl	D	80 µl	0.8 mg	52.09 µmol	6	6	100 %	6000	0.3 % ± 0.5	0.0 % ± 0.0	2.2 % ± 1.5
ddl	E	60 µl	0.6 mg	39.07 µmol	6	6	100 %	6000	0.7% ± 0.8	0.0 % ± 0.0	1.7% ± 0.8
ddl	F	40 µl	0.4 mg	26.05 µmol	6	4	67 %	4000	0.0 % ± 0.0	0.0 % ± 0.0	1.5 % ± 0.6
Vehicel	G	500 µl	0.0 mg	0.0 µmol	6	6	100 %	6000	0.0 % ± 0.0	0.0 % ± 0.0	1.3 % ± 1.4
CP in H2O	H	100 µl	0.05 mg	2.95 µmol	6	5	100 %	5000	0.0 % ± 0.0	0.0% ± 0.0	18.1 % ± 1.5

Vehikel:	Aq. bidest.
Applikation:	d8
Blutentnahme:	d11
Route:	ac

In allen Gruppen konzentrationsabhängig auftretend große Zellkerne mit budding.

HET-MN AZT (Retrovir®)/ddl-1

25.11.05 d11

Behandlung	Gruppe	Dosis/Ei	Dosis/kg Eigewicht	n1: Gesamtzahl der eingesetzten Eier (als Grundlage der Viabilitäts- berechnung)	n2: Zahl der unter- suchten Eier	Viabilität	n3: Zahl der ausgewerteten Erythrocyten	Zellen in Metaphase MW% ± s.d.	Kernaberrationen MW% ± s.d.	MNE II (gesamt) MW% ± s.d.
AZT	A	0.05 mg	2.88 µmol	8	6	100 %	6000	0.2 ± 0.4	0.0 ± 0.0	2.8 ± 0.8
AZT	B	0.025 mg	1.44 µmol	7	6	100 %	6000	0.5 ± 0.8	0.0 ± 0.0	2.5 ± 0.8
ddl	C	0.4 mg	26.05 µmol	8	6	87 %	6000	1.7 ± 1.4	0.0 ± 0.0	1.8 ± 1.2
AZT/ddl	D	0.05/ 0.4 mg	2.88/ 26.05 µmol	10	8	100 %	8000	0.5 ± 0.8	0.0 ± 0.0	3.6 ± 2.4
AZT/ddl	E	0.025/ 0.4 mg	1.44/ 826.05 µmol	10	9	100 %	9000	1.1 ± 0.9	0.0 ± 0.0	3.4 ± 1.4
H ₂ O	F	0.1 ml	0.0 µmol	7	6	100 %	6000	0.2 ± 0.4	0.0 ± 0.0	1.3 ± 1.4
CP	G	0.05 mg	2.95 µmol	7	6	100 %	6000	0.3 ± 0.8	0.0 ± 0.0	11.2 ± 3.0

Vehikel:	Aq. bidest.
Applikation:	d8
Blutentnahme:	d11
Route:	ac

HET-MN AZT (Retrovir®)/ddl-2

05.05.06 d11

Behandlung	Gruppe	Dosis/Ei	Dosis/kg Eigewicht	n1: Gesamtzahl der eingesetzten Eier (als Grundlage der Viabilitäts- berechnung)	n2: Zahl der unter- suchten Eier	Viabilität	n3: Zahl der ausgewerteten Erythrocyten	Zellen in Metaphase MW% ± s.d.	Kernaberrationen MW% ± s.d.	MNE II (gesamt) MW% ± s.d.
AZT	A	1 mg	57.56 µmol	10	6	100 %	6000	1.2 ± 1.3	0.0 ± 0.0	2.7 ± 0.5
AZT	B	3 mg	172.68 µmol	10	6	100 %	6000	0.3 ± 0.5	0.0 ± 0.0	4.7 ± 1.2
ddl	C	0,4 mg	26.05 µmol	10	6	90 %	6000	0.2 ± 0.4	0.0 ± 0.0	1.8 ± 0.8
AZT/ ddl	D	1 mg / 0,4 mg	57.56 µmol/ 26.05 µmol	10	6	100 %	6000	0.0 ± 0.0	0.0 ± 0.0	4.2 ± 1.2
AZT/ ddl	E	3 mg / 0,4 mg	172.68 µmol/ 26.05 µmol	10	6	100 %	6000	0.2 ± 0.4	0.0 ± 0.0	6.2 ± 1.9
H ₂ O	F	0,7 ml	0.0 µmol	7	6	100 %	6000	0.7 ± 1.0	0.0 ± 0.0	1.0 ± 0.6
CP	G	0.05 mg	2.95 µmol	7	5	71 %	5000	0.0 ± 0.0	0.0 ± 0.0	7.8 ± 2.3

Vehikel:	Aq. bidest.
Applikation:	d8
Blutentnahme:	d11
Route:	ac

HET-MN**AZT (Retrovir®)/ddl-3_3TC-4**

110906 d11

Behandlung	Gruppe	Dosis/Ei	Dosis/kg Eigewicht	n1: Gesamtzahl der eingesetzten Eier (als Grundlage der Viabilitäts- berechnung)	n2: Zahl der unter- suchten Eier	Viabilität	n3: Zahl der ausgewerteten Erythrocyten	Zellen in Metaphase MW% ± s.d.	Kernaberrationen MW% ± s.d.	MNE II (gesamt)
										MW% ± s.d.
AZT	A	2.5 mg	143.9 µmol	10	6	100 %	6000	0.0 ± 0.0	0.0 ± 0.0	5.8 ± 3.0
ddl	B	2.5 mg	162.79 µmol	10	6	100 %	6000	0.0 ± 0.0	0.0 ± 0.0	6.7 ± 1.6
AZT/ ddl	C	2.5 mg/ 2.5 mg	143.9 µmol/ 162.79 µmol	12	6	90 %	6000	0.0 ± 0.0	0.0 ± 0.0	58.8 ± 38.8
3TC	D	30 mg	2013 µmol	20	6	95 %	6000	0.0 ± 0.0	0.3 ± 0.8	6.2 ± 2.6
H ₂ O	E	1 ml	0.0 µmol	8	6	100 %	6000	0.0 ± 0.0	0.0 ± 0.0	1.5 ± 1.0
CP	F	0.05 mg	2.95 µmol	8	6	100 %	6000	0.0 ± 0.0	0.0 ± 0.0	10.5 ± 2.6

Vehikel:	Aq. bidest.
Applikation:	d8
Blutentnahme:	d11
Route:	ac

HET-MN ddl/ddC-1

010705 d11

Behandlung	Gruppe	Dosis/Ei	Dosis/kg Eigewicht	n1: Gesamtzahl der eingesetzten Eier (als Grundlage der Viabilitäts- berechnung)	n2: Zahl der unter- suchten Eier	Viabilität	n3: Zahl der ausgewerteten Erythrocyten	Zellen in Metaphase MW% ± s.d.	Kernaberrationen MW% ± s.d.	MNE II (gesamt) MW% ± s.d.
ddl	A	2,5 mg	162.81 µmol	9	6	100 %	6000	0.0 ± 0.0	0.0 ± 0.0	10.5 ± 4.5
ddC	B	0,4 mg	29.13 µmol	9	6	100 %	6000	0.3 ± 0.5	0.0 ± 0.0	21.2 ± 15.7
ddC	C	0,2 mg	14.57 µmol	9	6	100 %	6000	0.0 ± 0.0	0.0 ± 0.0	4.0 ± 2.1
ddl/ ddC	D	2,5/ 0,4 mg	162.81/29.13 µmol	13	6	92 %	6000	0.0 ± 0.0	0.0 ± 0.0	42.8 ± 16.1
ddl/ ddC	E	2,5/ 0,2 mg	162.81/ 14.57 µmol	12	6	100 %	6000	0.0 ± 0.0	0.0 ± 0.0	27.0 ± 9.4
H ₂ O	F	0,5 ml	0.0 µmol	7	6	100 %	6000	0.3 ± 0.5	0.0 ± 0.0	1.3 ± 1.0
CP	G	0,05 mg	2.95 µmol	7	6	100 %	6000	0.0 ± 0.0	0.0 ± 0.0	9.8 ± 3.9

Vehikel: Aq. bidest. MW ():
 Applikation:
 Blutentnahme: d11
 Route: ac
 Applikationsvolumen: 100 µl

HET-MN

ddl/ddC-2_d4T-3_3TC-1

300905 d11

Behandlung	Gruppe	Dosis/Ei	Dosis/kg Eigewicht	n1: Gesamtzahl der eingesetzten Eier (als Grundlage der Viabilitäts- berechnung)	n2: Zahl der unter- suchten Eier	Viabilität	n3: Zahl der ausgewerteten Erythrocyten	Zellen in Metaphase MW% ± s.d.	Kernaberrationen MW% ± s.d.	MNE II (gesamt) MW% ± s.d.
ddl	A	0.4 mg	26.05 µmol	8	6	100 %	6000	0.3 ± 0.8	0.0 ± 0.0	5.2 ± 2.3
ddC	B	0.2 mg	14.57 µmol	8	6	100 %	6000	0. ± 0.0	0.0 ± 0.0	4.5 ± 2.8
ddl/ ddC	C	0.4/ 0.2 mg	26.05/ 14.57 µmol	8	6	100 %	6000	0.2 ± 0.4	0.0 ± 0.0	13.0 ± 6.1
3TC	D	10 mg	670.99 µmol	10	0	0 %	0	-	-	-
d4T	E	20 mg	1372.34 µmol	10	0	0 %	0	-	-	-
H ₂ O	F	1 ml	0.0 µmol	7	6	100 %	6000	0.2 ± 0.4	0.0 ± 0.0	1.2 ± 1.2
CP	G	0.05 mg	2.95 µmol	7	6	100 %	6000	0.0 ± 0.0	0.0 ± 0.0	10.0 ± 4.6
d4T	H	10 mg	686.17 µmol	8	0	0 %	0	-	-	-

Vehikel:	Aq. bidest.
Applikation:	d8 (E & H : d10)
Blutentnahme:	d11
Route:	ac

HET-MN ddl/ddC-3

19.05.06 d11

Behandlung	Gruppe	Dosis/Ei	Dosis/kg Eigewicht	n1: Gesamtzahl der eingesetzten Eier (als Grundlage der Viabilitäts- berechnung)	n2: Zahl der unter- suchten Eier	Viabilität	n3: Zahl der ausgewerteten Erythrocyten	Zellen in Metaphase MW% ± s.d.	Kernaberrationen MW% ± s.d.	MNE II (gesamt) MW% ± s.d.
ddl	A	2,5 mg	162.80 µmol	10	6	100 %	6000	0.2 ± 0.4	0.0 ± 0.0	10.8 ± 3.0
ddl	B	0,4 mg	26.05 µmol	10	6	100 %	6000	0.0 ± 0.0	0.0 ± 0.0	3.8 ± 2.1
ddC	C	0,2 mg	14.57 µmol	10	6	100 %	6000	0.0 ± 0.0	0.0 ± 0.0	6.8 ± 2.6
ddl/ ddC	D	2,5 mg/ 0,2 mg	162.80 µmol/ 14.57 µmol	10	6	100 %	6000	0.0 ± 0.0	0.0 ± 0.0	22.5 ± 9.6
ddl/ ddC	E	0,4 mg/ 0,2 mg	26.05 µmol/ 14.57 µmol	10	6	100 %	6000	0.0 ± 0.0	0.0 ± 0.0	6.7 ± 2.7
H ₂ O	F	1 ml	0.0 µmol	7	6	100 %	6000	0.0 ± 0.0	0.0 ± 0.0	0.8 ± 0.4
CP	G	0.05 mg	2.95 µmol	7	6	100 %	6000	0.0 ± 0.0	0.0 ± 0.0	9.2 ± 4.8

Vehikel:	Aq. bidest.
Applikation:	d8
Blutentnahme:	d11
Route:	ac

HET-MN AZT (Retrovir®)/d4T-1

210706 d11

Behandlung	Gruppe	Dosis/Ei	Dosis/kg Eigewicht	n1: Gesamtzahl der eingesetzten Eier (als Grundlage der Viabilitäts- berechnung)	n2: Zahl der unter- suchten Eier	Viabilität	n3: Zahl der ausgewerteten Erythrocyten	Zellen in Metaphase	Kernaberrationen	MNE II (gesamt)
								MW% ± s.d.	MW% ± s.d.	MW% ± s.d.
AZT	A	4 mg	230.24 µmol	7	6	100 %	6000	0.0 ± 0.0	0.0 ± 0.0	6.8 ± 2.1
d4T	B	5 mg	343.08 µmol	10	6	100 %	6000	0.5 ± 0.5	0.0 ± 0.0	3.2 ± 0.8
AZT/ d4T	C	4 mg/ 5 mg	230.24 µmol/ 343.08 µmol	12	6	100 %	6000	0.8 ± 1.0	0.0 ± 0.0	11.3 ± 2.3
PBS	D	1 ml	0.0 µmol	7	6	100 %	6000	0.2 ± 0.4	0.0 ± 0.0	0.8 ± 1.2
CP	E	0.05 mg	2.95 µmol	7	6	100 %	6000	0.7 ± 1.0	0.0 ± 0.0	8.2 ± 1.5
AZT	F	6 mg	345.35 µmol	7	6	100 %	6000	2.2 ± 1.9	0.0 ± 0.0	17.2 ± 4.8
AZT/ d4T	G	6 mg/ 5 mg	345.35 µmol/ 343.08 µmol	12	6	100 %	6000	1.5 ± 2.3	0.0 ± 0.0	18.7 ± 5.7

Vehikel:	Aq. bidest.
Applikation:	d8
Blutentnahme:	d11
Route:	ac

HET-MN

Interne Selbstkontrolle [AZT-3 (Retrovir®)/ddl-1]

171204D11

Behandlung	Gruppe	Volumen	Dosis/Ei	Dosis/kg Eigewicht	n1: Gesamtzahl der eingesetzten Eier (als Grundlage der Viabilitäts- berechnung)	n2: Zahl der unter- suchten Eier	Viabilität	n3: Zahl der ausgewerteten Erythrocyten	Zellen in Metaphase MW% ± s.d.	Kernaberrationen MW% ± s.d.	MNE II (gesamt) MW% ± s.d.
CN CP in H2O	D	100 µl	0.05 mg	2.95 µmol	6	6	100%	6000	0.8 % ± 1.0	0.0 % ± 0.0	15.8 % ± 5,0
CN Vehicel	E	1 ml	0.0 mg	0.0 µmol	6	6	100%	6000	0.0 % ± 0.0	0.0 % ± 0.0	1.3 % ± 1,2
KB * CP in H2O	D	100 µl	0.05 mg	2.95 µmol	6	6	100%	6000	0.3 % ± 0.5	0.0 % ± 0.0	18.0 % ± 3.8
KB * Vehicel	E	0.5 ml	0.0 mg	0.0 µmol	6	6	100%	6000	0.2 % ± 0.4	0.0 % ± 0.0	1.7 % ± 0.8
KB ** CP in H2O	D	100 µl	0.05 mg	2.95 µmol	6	6	100%	6000	0.5 % ± 0.5	0.0 % ± 0.0	16.3 % ± 2.8
KB ** Vehicel	E	1 ml	0.0 mg	0.0 µmol	6	6	100%	6000	0.2 % ± 0.4	0.0 % ± 0.0	1.5 % ± 0.8

CN Geübte Untersucherin
KB Ungeübte Untersucherin

* 1. Auszählung
** 2. Auszählung

Vehikel: Aq. bidest.
Applikation: d8
Blutentnahme: d11
Route: ac

9 Danksagung

Zuvorderst danke ich Herrn Prof. Dr. Dr. Niels-Peter Lüpke, Leiter des Fachgebiets Pharmakologie und Toxikologie, Fachbereich Gesundheitswissenschaften an der Universität Osnabrück für die Möglichkeit in seinem Fachbereich forschen zu dürfen und für die Übernahme des Zweitgutachtens.

Ganz besonderer Dank gilt Herrn PD Dr. Wolf für die freundliche und hilfreiche Betreuung meiner Arbeit und die Bereitschaft diese als Erstgutachter zu beurteilen.

Des Weiteren danke ich Frau Dr. Baron-Ruppert für Rat und Tat in allen Phasen meiner Promotion sowie für die herzliche Atmosphäre während meiner Zeit an der Universität Osnabrück.

Ich danke Frau Niehaus-Rolf für die exzellente Einarbeitung in den MET-MN und den unermüdlichen technischen Beistand, sowie die mühevollen Auszählung der Präparate.

Den Mitarbeitern des Fachgebiets Pharmakologie und Toxikologie danke ich für das produktive Arbeitsklima sowie die angenehmen Stunden und die freundliche Atmosphäre. Besonders sei Herrn Dr. Hoppe für seine freundliche Unterstützung bei mathematischen und chemischen Fragestellungen gedankt.

Ein Dank auch an alle Korrekturleser, insbesondere Funda Bayraktar für Tipps und Hilfestellungen bei Software-Fragen.

Ein besonderes Dankeschön richtet sich an Dina Lescow und Svenja Horstmann für ihre moralische Unterstützung und die vielen wertvollen Gespräche.

Zu guter letzt gilt meinen Eltern ein spezieller Dank für die Förderung und Unterstützung die sie mir während meines gesamten Studiums und besonders während schwieriger Phasen zuteil werden ließen.