

Aus dem Institut für Hygiene
der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf
Direktorin: Prof. Dr. med. Helga Idel

**Untersuchungen zum Einfluß von synthetischen Pyrethroiden auf die
mitotische Zellteilung an humanen Lymphozytenkulturen und an Lungenzellen
des Chinesischen Hamsters der Linie V79**

Dissertation

zur Erlangung des Grades eines Doktors der Medizin
Der Medizinischen Fakultät der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf

vorgelegt von

Barbara Stiller

2003

Als Inauguraldissertation gedruckt mit Genehmigung der Medizinischen
Fakultät der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf

gez.: Univ.-Prof. Dr. med. dent. Wolfgang H.-M. Raab
Dekan

Referent: Univ.-Prof. Dr. Idel
Koreferent: Univ. -Prof. Dr. Daldrup

Für meine Eltern

Danksagung

Frau Professor Dr. med. Helga Idel, Direktorin des Instituts für Hygiene Der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf möchte ich herzlich für die Überlassung des Themas danken.

Besonders danke ich Herrn Dr. rer. nat. Hadnagy für die intensive Betreuung in allen Phasen der Arbeit.

Bei Frau Marsetz, Frau Poduschnik und dem übrigen Team des Instituts für Hygiene möchte ich mich für ihren Einsatz bedanken.

Frau Dr. med. Sylke Lehmann danke ich für die Korrekturen und den regelmäßigen Antrieb.

Meiner Familie und R. Domergue danke ich für Geduld und Mühe, meinem Vater für die Korrekturen.

**Untersuchungen zum Einfluß von synthetischen
Pyrethroiden auf die mitotische Zellteilung an humanen
Lymphozytenkulturen und an Lungenzellen des
Chinesischen Hamsters der Linie V79**

Inhaltsverzeichnis

1. Einleitung	1-12
1.1 Pyrethroide	1
1.2 Gesundheitliche Auswirkung	5
1.3 Genotoxische Effekte	6
1.4 Wirkung auf die mitotische Zellteilung	8
1.4.1 Die mitotische Zellteilung	8
1.4.2 Zellteilungsstörungen	10
1.5 Aufgabenstellung und Ziel	11
2. Material und Methoden	13-23
2.1 Testsubstanzen	13
2.1.1 Pyrethroide	13
2.1.2 Herstellung der Testkonzentrationen	14
2.2 Testsysteme	14
2.2.1 Humane Lymphozytenkulturen	14
2.2.1.1 Blutentnahme	14
2.2.1.2 Ansatz und Behandlung von Lymphozytenkulturen	15
2.2.1.3 Metaphasenpräparation	15
2.2.1.4 Auswertekriterien	17
2.2.2 Lungenzellen des Chinesischen Hamsters (V79)	19
2.2.2.1 Herkunft und Charakterisierung	19
2.2.2.2 Subkultivierung	19
2.2.2.3 Koloniebildungstest	20
2.2.2.4 Präparation von V79 Zellen für Mitoseprofilstudien	21
2.2.2.5 Auswertekriterien der Mitoseprofilstudien	21
2.3 Statistik	23

3. Ergebnisse	24-53
3.1 Lymphozytenkulturen	24
3.1.1 Bestimmung des Mitoseindex	24
3.1.2 Bestimmung von Zellteilungsstörungen	28
3.2 Lungenzellen des Chinesischen Hamsters V79	33
3.2.1 Koloniebildungstest	33
3.2.2 Bestimmung des Mitoseindex nach Behandlung mit Cypermethrin	40
3.2.3 Mitoseprofilstudien nach Behandlung mit Cypermethrin	42
3.2.3.1 Bestimmung von Mitosestadien	43
3.2.3.2 AT/M-Verhältnis	47
3.2.3.3 Mitosestörungen	48
4. Diskussion	54-62
5. Zusammenfassung	63
6. Literatur	64-72
7. Anhang	73-79

1. Einleitung

1.1 Pyrethroide

Pyrethroide spielten in den letzten 25 Jahren eine zunehmende Rolle in der Reihe der Insektizide. Ihre Anwendung ist weit verbreitet und sie ersetzen zunehmend andere Insektizide wie DDT, Lindan und Organophosphate.

Die natürlichen Pyrethrum-Insektizide wurden schon seit Jahrhunderten aus den Blütenköpfen verschiedener Chrysanthemenarten gewonnen. Als Hauptwirkstoffe enthielten sie eine Mischung aus Pyrethrin und Jasmolinen (Jäger-Mischke et al., 1988). Im antiken China wurde Insektenpuder aus getrockneten Köpfen von *Chrysanthemum cinerifolius* und *Chrysanthemum coccineum* gewonnen, einer den Margariten ähnlichen Blume. In Afrika wurde *Chrysanthemum cinerariaefolius* schon früh kommerziell genutzt (Wegerhoff 1996, Mersch-Sundermann 1995). Vor über 200 Jahren wurde das Pyrethrum als Insektizid durch armenische Händler nach Europa gebracht. Es konnte sich als Insektizid auf dem Markt nicht durchsetzen, da es umweltlabil, lichtinstabil und nicht zuletzt zu teuer in der Produktion war (Wegerhoff 1996). In der weiteren Entwicklung wurde in den 50er Jahren ein Wirkungsverstärker, Piperonylbutoxid, der detoxifizierende Enzymsysteme hemmte, zu dem Pyrethrum gegeben (Mersch-Sundermann 1995). In den 70er Jahren fand man die Möglichkeit Pyrethroide synthetisch herzustellen (Casida et al., 1998).

Inzwischen sind mehr als 1000 verschiedene synthetische Pyrethroide bekannt; so weiß man zum Beispiel, dass Deltamethrin eine 50fach höhere Wirkung als das natürliche Pyrethrum (Matsuo 1989, Wegerhoff 1996, Mersch-Sundermann 1995) besitzt. Abbildung 1 gibt die Strukturformeln der in dieser Arbeit verwendeten Pyrethroide wieder.

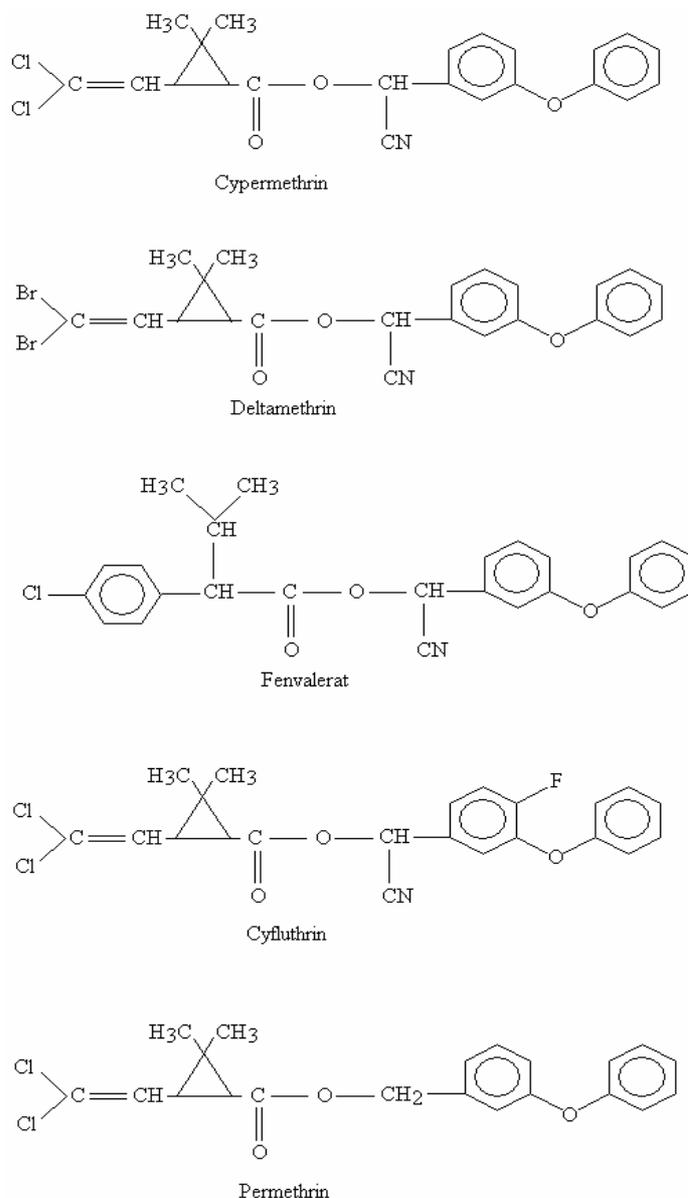


Abbildung 1: chemische Struktur von Pyrethroiden

Chemisch handelt es sich um Ester spezifischer Säuren, zum Beispiel Chrysanthemumsäure und Alkohole, die als Gemische mehrerer optischer Isomere vorliegen (Perger et al., 1994). Unterschieden werden zwei chemische Klassen, Typ I ohne Cyano-Gruppe und Typ II mit Cyano-Gruppe an der Carboxylposition des Alkohols.

Inzwischen werden Pyrethroide weltweit eingesetzt und machen mehr als 25 % des Weltinsektizidverbrauchs aus (Mersch-Sundermann 1995, Tippe 1993). Sie werden in der Landwirtschaft, zur Seuchenbekämpfung, in der Textilindustrie, der Bauindustrie sowie im Bereich der Hygiene und des Haushalts verwendet. Eine Vielzahl von Produkten ist im Handel frei erhältlich; es sind fast alle Gemische verschiedener Substanzen. Der Mensch kommt mit Pyrethroiden in Form von Sprays, Gel, Insektenstrips, Stäubemitteln oder Elektroverdampfern täglich in Kontakt.

Eine wichtige Eigenschaft machte die Pyrethroide besonders interessant. Die Pyrethroide weisen im Vergleich zu chlorierten Kohlenwasserstoffen, organischen Phosphorsäureestern und Carbamaten eine höhere Selektivität für Insekten und eine geringere Warmblütertoxizität auf (Perger et al., 1994). Für Deltamethrin fand Elliot 1977 eine 5.000fach höhere toxische Wirkung gegenüber der Hausfliege im Vergleich zur Ratte.

Das Zielorgan von Pyrethroiden bei den Insekten ist das Nervensystem. Die Pyrethroide bewirken eine Verlängerung des physiologischen Na^+ -Einwärtsstroms in Nervenmembranen während der Erregungsphase, was eine höhere Konzentration von Na^+ in der Nervenzelle bewirkt. Dies wiederum führt

zu verstärkten oder gehäuften Entladungen (Aldrige et al., 1990, Wegerhoff 1996). Die Pyrethroide ohne Cyano-Gruppe wiederholen Nervenimpulse von kurzer Dauer, Pyrethroide mit Cyano-Gruppe bewirken langanhaltende Folgen von repetitiven Entladungen. Das heißt, als messbaren Effekt bewirken Pyrethroide ohne Cyano-Gruppe eine erhöhte Aktivität der Nerven. Pyrethroide mit Cyano-Gruppe induzieren eine Depression von Nervenimpulsen (Wegerhoff 1996, Perger et al., 1994). Zusätzlich zu dem Einfluß auf die Natriumkanäle wird ein Einfluß auf die „gap junctions“, die Verbindungskanäle von Zellen, diskutiert (Wegerhoff 1996).

Die Pyrethroide haben eine relativ geringe biologische Halbwertszeit und werden zum größten Teil nach Metabolisierung aus dem Körper wieder eliminiert. Der Abbau des Esters erfolgt oxidativ oder hydrolytisch in der Leber durch mikrosomale Enzyme. Durch die Spaltung entstehen als Hauptmetabolite Zyklopropancarbonsäure-Verbindungen und 3-Phenoxybenzoesäure, die in freier oder konjugierter Form über die Faeces oder den Harn ausgeschieden werden (Perger et al., 1994, Matsuo 1989, Kühn et al., 1996,1998, Leng et al., 1996).

Der Nachweis der Pyrethroidexposition erfolgt über den Nachweis der ungiftigen Metabolite im Urin mittels Gaschromatographie (Leng et al., 1997). Die lipophile Eigenschaft der Pyrethroide bewirkt eine Retention im Fettgewebe, Leber, Niere und Haut.

1.2 Gesundheitliche Auswirkungen

Trotz ihrer geringen Warmblütertoxizität wird den Pyrethroiden eine Reihe von gesundheitlichen Auswirkungen beim Menschen zugeschrieben, die kontrovers diskutiert werden. Typische Aufnahmewege beim Menschen sind transcutan, peroral und inhalativ. Auftretende gesundheitliche Auswirkungen sind abhängig von der Art und Quantität der Aufnahme. Bei dosisgerechter Anwendung kann es zu Symptomen wie Kribbeln, Brennen, Jucken der Haut, Schwindel, Kopfschmerzen, Übelkeit, Müdigkeit, Reizungen der Mukosa und Abgeschlagenheit kommen. Bei einer stark erhöhten Dosis im Rahmen einer unsachgemäßen Anwendung kommt es zu Tremor, Choreoathetose, Salivation, Bewusstlosigkeit, Faszikulationen, konvulsiven Attacken, Koma bis hin zum Lungenödem (He et al., 1988, 1989, Wegerhoff 1996, Perger et al., 1994). Diese Symptome treten unmittelbar nach Exposition auf und sind reversibel. Krankenhausaufenthalte von einer Woche bis zu zwei Monaten wurden nach übermäßiger Exposition bei Personen in China beschrieben (Tippe 1993). Tabelle 1 zeigt eine Übersicht der auftretenden Symptome in Abhängigkeit des Schweregrades der Exposition. Klinische Symptome werden unterteilt in T-Symptome (Tremor) ausgelöst von der Typ I-Gruppe und den CS-Symptomen (Choreoathetose, Salivation) der Typ II-Gruppe der Pyrethroide.

Schweregrad	Symptome
1. suspekt	Ausschließlich lokale Effekte an der Haut in Form von Parästhesien (Kribbeln, Brennen, Juckreiz)
2. leicht	Lokale Effekte wie bei Punkt 1, unspezifische systemische Effekte (Schwindel, Kopfschmerzen, Übelkeit, Müdigkeit, allg. Abgeschlagenheit)
3. mittel	Wie Punkt 1 und 2, zusätzlich leichte Bewusstseinstrübung, Faszikulationen im Bereich der Extremitätenmuskulatur.
4. schwer	Wiederholte epileptische Anfälle, Koma, zum Teil Lungenödem mit Todesfolge in seltenen Fällen

Tabelle 1 (Perger et al. 1994): Klinische Symptomatik in Abhängigkeit vom Schweregrad einer akuten Pyrethroid-Intoxikation

1.3 Genotoxische Effekte

Von vielen chemischen Substanzen ist bekannt, dass sie durch Schädigung des genetischen Materials, der Desoxyribonukleinsäure (DNS), beim Menschen Krebs erzeugen können (Williams et Weisburger 1986). Diese genotoxische Wirkungen können anhand von chromosomalen Aberrationen, Schwesterchromatidenaustausch und Punktmutationen nachgewiesen werden (Hollstein et al., 1979). Hinsichtlich ihrer kanzerogenen Wirkung sind Pyrethroide nicht klassifizierbar und werden daher von der International Agency for Research on Cancer (IARC 1991) in Gruppe 3 eingestuft, d.h. es gibt

keinen eindeutigen Hinweis für oder gegen eine kanzerogene Wirkung. Mehrere Studien weisen jedoch auf ein genotoxisches Potential von Pyrethroiden hin.

Basierend auf Tierexperimenten wurde eine erhöhte Rate von Mikrokernen im Knochenmark der Ratte und der Maus nach oraler und intratrachealer Applikation des Pyrethroids Deltamethrin gefunden (Agarwal et al., 1994, Gandhi et al., 1995). Das Pyrethroid Fenvalerat induzierte nach intraperitonealer Applikation einer hohen Dosis (20 mg/kg) in Knochenmarkszellen der Maus chromosomale Aberrationen (Giri et al., 2002). Niedrigere Dosen bzw. subakute Dosen induzierten keine chromosomalen Aberrationen, jedoch Schwesterchromatidaustausche. Beim Menschen führte die Exposition gegenüber einem Komplex aus Pestiziden mit Pyrethroiden zur Induktion von chromosomalen Aberrationen in peripheren Lymphozyten (Páldy et al., 1987) bzw. die gemischte Exposition von Pyrethroiden mit Organophosphaten und Carbamaten zu Mikrokernen (Bolognesi et al., 1993). Genotoxische Effekte beim Menschen nach Pyrethroidexposition allein wurden nicht beschrieben. Ebenso zeigten sich Pyrethroide negativ im Mutagenitätstest mit Bakterien und Säugerzellkulturen (Pluijmen et al., 1994). Andererseits wurden in menschlichen und tierischen Zellkulturen die Induktion von chromosomalen Aberrationen, Schwesterchromatidaustauschen und Mikrokernen beschrieben (Puig et al., 1989, Surralles et al., 1990, 1995, Barrueco et al., 1992, 1994). Keine Induktion von chromosomalen Aberrationen konnte mit dem Pyrethroid Fenprothrin in chinesischen Hamsterlungenfibroblasten festgestellt werden (Ryu et al., 1996). Ebenso ließ sich für Deltamethrin keine signifikant erhöhte Häufigkeit von

Schwesterchromatidenaustausch oder Mikrokernen in humanen Lymphozytenkulturen nachweisen (Villarini et al., 1998).

1.4 Wirkung auf die mitotische Zellteilung

Kanzerogene Wirkungen von chemischen Substanzen werden nicht nur infolge einer Schädigung des genetischen Materials (genotoxisch) verursacht, sondern auch durch Störung der Zellteilung, d.h. durch eine nichtgenotoxische Wirkung (Weisburger et Williams, 1981), wie z.B. durch Schädigung zellulärer Strukturen, die für die Zellteilung unabdingbar sind. Dies führt entweder zur Blockierung der Teilung oder zum Auftreten von numerischen Chromosomenveränderungen.

1.4.1 Die mitotische Zellteilung

Die normale mitotische Zellteilung wird in vier Phasen - Prophase, Metaphase, Anaphase und Telophase - unterteilt. Nach Reduplikation des genetischen Materials tritt die Zelle in die Prophase ein. Während der Prophase schrauben sich die Chromosomen, die jeweils aus zwei am Zentromer zusammenhängenden Chromatiden bestehen, auf. Die Kernmembran löst sich auf und die Zentriolen wandern zu den entgegengesetzten Polen. Hier beginnt die Metaphase, in der die Chromosomen nun maximal verkürzt und verdickt sind. Dadurch werden sie im Lichtmikroskop sichtbar. Die Chromosomen ordnen sich in der Äquatorialebene an. Zwischen den beiden Zentriolen bildet sich der Spindelapparat aus. Es entsteht eine Verbindung durch die Spindelfaser zu

jedem Chromosom am Zentromer. In der nächsten Phase, der Anaphase, werden die Chromosomen der Länge nach geteilt und die Chromatiden werden zu den jeweilig entgegengesetzten Polen gezogen. In der letzten Phase der Telophase entschauben sich die an den Polen angekommenen Chromatiden, eine neue Kernmembran wird gebildet. In Höhe der Äquatorialebene entsteht eine neue Zellmembran.

Das Ergebnis dieser Zellteilung sollten zwei genetisch identische Tochterzellen sein.

Bei einem so komplexem Vorgang bieten sich multiple Angriffspunkte. Durch das Fehlen einzelner wichtiger Strukturen kann die gesamte Zellteilung gehemmt werden. Eine der bekanntesten Störungen ist die Hemmung des Spindelapparates, dem durch seine zentral wichtige Rolle eine besondere Bedeutung zukommt. Eine Störung des Spindelapparates führt zu einer Störung in der Metaphase und bei einem kompletten Funktionsverlust des Spindelapparates zu einer Arretierung der Zellteilung in der Metaphase. Bekanntes Spindelgift ist z.B. das Colchizin, ein Alkaloid der Herbstzeitlosen, das zu einer kompletten Arretierung in der Metaphase führt. Daraus leitet sich der Begriff der sogenannten C-Mitose oder C-Metaphase ab. Bei einer inkompletten Hemmung kann es nach Zellteilung in der Tochterzelle zu numerischen Chromosomenveränderungen kommen. Andere bekannte Spindelgifte sind u.a. das synthetische Hormon Diethylstilböstrol, nichtsteroidale Östrogene (Barrett et al., 1981, Parry 1985) oder Chloroform, Formaldehyd und Benzol (Liang et Brinkley, 1985).

1.4.2 Zellteilungsstörungen

Die Folgen von Zellteilungsstörungen sind entweder der Zelltod oder numerische Chromosomenveränderungen. Zellteilungsstörungen lassen sich auch anhand von so genannten Mikrokernen erfassen. Mikrokerne entstehen entweder aus Chromosomenteilen oder aus einem kompletten Chromosom. Im Fall von kompletten Chromosomen geht in der Regel eine Spindelstörung voraus. Es gibt Hinweise, dass als Folge von Spindelstörungen neoplastische Veränderungen auftreten können, die auf einem nicht-genotoxischen Mechanismus beruhen (Oshimura et Barret, 1986, Melnick et al., 1996).

In vivo und in vitro Untersuchungen weisen darauf hin, dass Pyrethroide ein genotoxisches Potential besitzen. Dies betrifft neben chromosomalen Aberrationen und Schwesterchromatidenaustauschen insbesondere die Induktion von Mikrokernen. Mikrokerne entstehen aufgrund von Chromosomenbrüchen, die während der Zellteilung nicht in die Tochterkerne inkorporiert werden oder aufgrund von Chromosomenfehlverteilungen infolge von mitotischen Zellteilungsstörungen (Fenech et Morley, 1985). Beide Mechanismen führen dazu, dass ein kleiner zusätzlicher Kern im Zytoplasma in einer der Tochterzellen entsteht. Dieser sogenannte Mikrokern lässt sich in der Interphase erfassen. Neben der Induktion von Chromosomenaberrationen ist daher auch eine Wirkung auf den mitotischen Spindelapparat in Betracht zu ziehen. Hinweise auf mitotische Spindeldysfunktionen durch Pyrethroide lassen sich aufgrund einer Hemmung der Zellzyklusprogression in menschlichen Lymphozytenkulturen und der Induktion von abnormalen Metaphasen in

menschlichen und pflanzlichen Testsystemen ableiten (Chauhan et al., 1986, Carbonell et al., 1989, Surallés et al., 1990, Surallés et al., 1995). Für Fenvalerat konnte jedoch gezeigt werden, dass bezüglich der Hemmung der Zellzyklusprogression wie auch der Mikrokerninduktion widersprüchliche Ergebnisse, sogar innerhalb derselben Untersuchungsgruppe auftraten (Surallés et al., 1990, Surallés et al., 1995). Es wird vermutet, dass zusätzliche Faktoren wie chemische Verunreinigungen der Pyrethroide oder die Bezugsquelle im Hinblick auf zytogenotoxische Effekte eine Rolle spielen (Surallés et al., 1995, Giri et al., 2002).

1.5 Aufgabenstellung und Ziel

Ziel dieser Arbeit war, die zytogenotoxische Wirkungen von synthetischen Pyrethroiden zu erfassen, insbesondere Effekte auf die mitotische Zellteilung. Im Hinblick auf die zum Teil kontroversen Ergebnisse sollte auch der Einfluss von zusätzlichen Faktoren auf die Zytotoxizität mitberücksichtigt werden. Untersuchungen zu folgenden Fragestellungen sollten zur Klärung beitragen:

1. Führen unterschiedliche Pyrethroide zu unterschiedlichen zytogenotoxischen Wirkungen?
2. Führen Pyrethroide zu unterschiedlichen Effekten in menschlichen und tierischen Zellkulturen?
3. Spielen chemische Verunreinigungen bzw. Herkunft der Pyrethroide eine Rolle bei der zytotoxischen und zytogenotoxischen Wirkung?

Zellteilungsstörungen wurden anhand des Mitoseindex und dem Auftreten von abnormalen Metaphasen an Kulturen von menschlichen peripheren Lymphozyten und Lungenzellen des Chinesischen Hamsters (V79) bestimmt. Als weiterer Indikator für Zellteilungsstörungen wurden das Mitoseprofil sowie der Quotient von Anaphasen + Telophasen zu Metaphasen in V79 Zellkulturen erfasst.

Als Parameter einer Zytotoxizität diente der Koloniebildungstest von V79 Zellen, der auch zur Differenzierung der Toxizität von Pyrethroiden mit unterschiedlichen Reinheitsgraden herangezogen wurde.

2. Material und Methoden

2.1 Testsubstanzen

2.1.1 Pyrethroide

Die verwendeten Pyrethroide wurden von der Firma Dr. Ehrenstorfer aus Augsburg und von der Firma Promochem aus Wesel bezogen und lagen als Feststoffe in verschiedenen Reinheitsgraden vor (Tab. 1).

Tabelle 1: Verwendete Pyrethroide, Reinheitsgrad und Herkunft

Pyrethroid	Reinheitsgrad	Firma
Deltamethrin	99 %	Dr. Ehrenstorfer
Permethrin	97 %	Dr. Ehrenstorfer
Cyfluthrin	92 %	Dr. Ehrenstorfer
Fenvalerat	99,1 %	Dr. Ehrenstorfer
Cypermethrin	91 %	Dr. Ehrenstorfer
Cypermethrin	99 %	Dr. Ehrenstorfer
Cypermethrin	99 %	Promochem

Bei den Molekülstrukturen der getesteten Pyrethroide handelt es sich um halosubstituierte Carboxylsäureester mit einem Alkoholanteil, dem 3-Phenoxybenzylalkohol. Mit Ausnahme von Permethrin besitzen alle aufgeführten Pyrethroide eine Cyanogruppe. Zusätzlich wurde auch Phenoxybenzoesäure als Bestandteil aller Pyrethroide getestet.

2.1.2 Herstellung der Testkonzentrationen

Alle verwendeten Pyrethroide lagen als Feststoffe vor und wurden mit dem Lösungsmittel Dimethylsulfoxid (DMSO) gelöst. Die Ausgangskonzentration betrug 10 mg/ml DMSO, von der eine Verdünnungsreihe in Zweierverdünnungsschritten hergestellt wurde (5 mg/ml, 2,5 mg/ml, 1,25 mg/ml, 0,625 mg/ml, 0,3125 mg/ml). Um unspezifische Wirkungen des Lösungsvermittlers DMSO auszuschließen, führten wir eine Kontrollgruppe mit DMSO durch. Als Positivkontrolle wurde das Spindelgift Colcemid (Gibco) mit einer Ausgangskonzentration 10 µg/ml verwendet.

2.2 Testsysteme

2.2.1 Humane Lymphozytenkulturen

2.2.1.1 Blutentnahme

Für die Kultivierung humaner Lymphozyten wurde venöses Blut jeweils unmittelbar vor dem Versuch durch eine Venenpunktion gewonnen. Die Blutentnahme erfolgte mit einem sterilen 5 ml Vakuumröhrchen, welches mit Antikoagulanzen, Natriumheparinat (Firma Promota), beschichtet war. Als Spender diente eine 27-jährige gesunde Probandin.

2.2.1.2 Ansatz und Behandlung der Lymphozytenkulturen

Pro Testansatz wurde 0,3 ml Vollblut mit sterilen Pipetten in sterile Kulturröhrchen mit 5 ml Chromosomenmedium 1 A (Gibco) gegeben. Alle Ansätze wurden gut gemischt und bei 37° C für 48 Stunden im Brutschrank inkubiert.

Danach wurden die jeweiligen Testsubstanzen mit sterilen Tuberkulinspritzen im Doppelansatz hinzugefügt und gemischt. Die Behandlung der Kulturen erfolgte durch Zugabe von 50 µl der entsprechenden Pyrethroid-Ausgangskonzentration. Die Endkonzentration der Pyrethroide in der Kultur betragen 50 µg/ml, 25 µg/ml, 12,5 µg/ml, 6,25 µg/ml und 3,125 µg/ml. Des weiteren wurde eine unbehandelte Kontrollkultur sowie eine Lösungsmittelkontrolle mitgeführt. Die DMSO-Konzentration der Lösungsmittelkontrolle sowie der Pyrethroid-behandelten Kulturen lag bei 1%. Die Zugabe von Colcemid als Positivkontrolle betrug 0,1 ml, das entsprach einer Endkonzentration von 0,02 µg/ml. Anschließend wurden die Kulturen für weitere 24 Stunden bei 37° C inkubiert. Bis zu diesem Arbeitsschritt wurde unter sterilen Bedingungen gearbeitet.

2.2.1.3 Metaphasenpräparation

Nach Kulturende wurden die Kulturansätze aufgeschüttelt, 10 Minuten bei 700 U/min (= 100 xg) zentrifugiert (Rotor Silenta II, Hettich) und der Überstand mit einer Pasteurpipette abgesaugt und verworfen.

Das zurückbleibende Sediment wurde aufgewirbelt und mit einer auf 37° C vorgewärmten 0,075 M Kaliumchlorid-Lösung hypotonisch behandelt. Die hypotone Behandlung erfolgte in zwei Schritten. Zuerst wurden pro Ansatz 1 ml der KCL-Lösung hinzugefügt, mit der Pasteurpipette gemischt, anschließend weiteren 2,5 ml KCL hinzugegeben und gut gemischt. Darauf erfolgte eine Inkubation von 4 Minuten bei 37° C im Brutschrank. Bei der hypotonen Behandlung platzten die Erythrozyten und die Lymphozyten schwohlen infolge der Wasseraufnahme an. Danach wurde die Zellsuspension bei 700 U/min (100xg) 10 Minuten zentrifugiert und der Überstand mit einer Pasteurpipette abgesaugt, wobei sorgfältig darauf geachtet wurde, die verwaschene Zone zwischen Sediment und Überstand im Zentrifugenröhrchen zu belassen. Die Zellen wurden anschließend in zwei Arbeitsschritten mit frisch angesetzttem eiskalten Methanol-Eisessig fixiert. Dazu wurde zunächst mit einer vollen Pasteurpipette Methanol-Eisessig-Gemisch (3:1) überschichtet, dann wurde eine weitere mit Methanol-Eisessig-Gemisch gefüllte Pipette bis auf den Boden des Reagenzglases geführt, das Sediment aufgewirbelt und im weiteren gut gemischt. Anschließend wurden die Zellsuspensionen abzentrifugiert, der Überstand abgesaugt und verworfen. In die Zentrifugenröhrchen wurde jeweils eine volle Pasteurpipette Methanol-Eisessig-Gemisch hinzugegeben, das Sediment erneut aufgewirbelt und die Doppelansätze zusammengeführt. Danach wurde der Waschvorgang mit Fixativ wie oben beschrieben noch 3 mal wiederholt. Nach dem letzten Zentrifugationsschritt wurden das Zellsediment mit etwas Methanol-Eisessig aufgewirbelt, gut gemischt und auf kalte, gereinigte mit Aqua dest. benetzte Objektträger aufgetropft. Zuvor wurden die Objektträger physikalisch gereinigt, d.h. mit einem trockenen Baumwolltuch

abgerieben, danach chemisch d.h. durch Äther-Alkohol. Dazu wurden sie für 1 Stunde in eine mit Äther-Alkohol gefüllte Küvette gestellt. Eine weitere Stunde wurden sie dann mit Leitungswasser gespült und kamen dann in eine mit Aqua dest. gefüllte Küvette in den Kühlschrank.

Beim Auftropfen der Zellsuspension auf die Objektträger platzten die Zellen und die Metaphasenchromosomen breiteten sich flach auf der Glasoberfläche aus. Von jeder Zellsuspension wurden 4 Replikate fertiggestellt.

Für die Färbung der Metaphasen wurden die getrockneten Objektträger 2 Minuten in Giemsa-Lösung (Giemsa, Azur-Eosin-Methylblau-Lösung, Firma Merck Darmstadt) gestellt. Die Giemsa-Farblösung wurde durch eine Verdünnung der Giemsa-Stammlösung mit Sörensenpuffer (pH 6,8) im Verhältnis 1:20 hergestellt. Danach wurde 2–3 mal mit Aqua dest. gespült. Nach sorgfältiger Lufttrocknung der Objektträger (mindestens 1 Tag lang) wurden diese 10 Minuten in Xylol behandelt und daraufhin mit Deckgläsern mit Hilfe von Eukitt eingedeckelt.

2.2.1.4 Auswertkriterien

Mitoseindex

Der Mitoseindex gibt Auskunft über den Anteil der sich in Teilung befindlichen Zellen im Verhältnis zu der Gesamtzellzahl. Im Lichtmikroskop Dialux 20 EB (Leitz, Wetzlar) bei 300facher Vergrößerung wurde die Anzahl der Mitosen auf 1000 transformierte Lymphozyten ausgewertet. Der Mitoseindex wurde in Promille angegeben.

Metaphasen

Die Bewertung der Metaphasen erfolgte unter dem Lichtmikroskop Dialux 20 EB (Leitz, Wetzlar) bei 1200facher Vergrößerung. Bestimmt wurden Metaphasen, C-Metaphasen und initiale C-Metaphasen (partiellen C-Metaphasen).

Für die Bewertung der Metaphasen wurden folgende Kriterien zugrunde gelegt:

1. Länge und Dicke der Chromosomen
2. Sichtbare oder verdoppelte Chromatiden
3. Anzahl und Art der Winkel der Chromosomen
4. Lage der Chromosomen (Kreis-Äquatorialebene oder verstreut)

Bei den normalen Metaphasen sollten die Chromosomen sichtbar in der Äquatorialebene angeordnet sein und mehr als 50% gewinkelte Chromosomen vorliegen.

Bei den partiellen C-Metaphasen sind die Chromosomen nicht vollständig in der Äquatorialebene angeordnet und liegen zum Teil verstreut vor.

In der Regel sind weniger als 50% gewinkelte Chromosomen vorhanden.

Bei den C-Metaphasen ist die Äquatorialebene aufgehoben, die Chromosomen liegen verstreut vor. Die Chromosomen sind klein, kontrahiert und ungewinkelt.

Beide Chromatiden sind sichtbar.

2.2.2 Lungenzellen des Chinesischen Hamsters (V79)

2.2.2.1 Herkunft und Charakterisierung

Für die Experimente wurden Hamsterlungenzellen eines chinesischen Hamsters aus der Linie V79 verwendet.

Diese stammen aus einer permanent wachsenden Zelllinie, die von Ford und Tergorian aus einer reifen Lunge eines männlichen chinesischen Hamsters 1958 isoliert wurden. Der Subklon 379 A V79-1 wurde von den Flow Laboratories Ltd. (Meckenheim, Germany) bezogen. Bei dieser Zelllinie handelt es sich um eine pseudodiploide Linie mit einer Generationszeit von 12–24 Stunden. Der Chromosomensatz differierte zwischen 20 und 24 Chromosomen.

2.2.2.2 Subkultivierung

Die V79-Zellen wurden als Monolayerkulturen in Eagle`s Minimum Essential Medium (Flow Laboratories LTd., Glasgow) kultiviert. Das Kulturmedium enthielt 10 % fötales Kälberserum (Biochrom, Berlin), 2 mmol L-Glutamin (Flow Laboratories Ltd., Glasgow) und Penicillin/Streptomycin (Biochrom, Berlin).

Die Kultivierung erfolgte in feuchter Atmosphäre und einer kontinuierlichen Begasung mit einem Gemisch aus 95 % Luft und 5 % CO₂ in einem CO₂ Brutschrank B 5061 EC/CO₂ (Heraeus, Osterode) bei 37° C. Die Passagierung der Zellen wurde im Abstand von 3-4 Tagen durchgeführt. Dazu wurden die Zellen zweimal mit einer phosphatgepufferten Salzlösung ohne Calcium und ohne Magnesium-Ionen gespült und anschließend mit 1,5 ml eines Trypsin-Versen-Gemisches (0,05 % Trypsin, 0,02 % EDTA) überschichtet.

Überschüssiges Trypsin-Versen wurde abgegossen und die Zellen für eine Minute bei 37° C im Brutschrank inkubiert. Nach erfolgter Trypsinierung der Zellen wurden die Zellen im „Coulter Counter“ (Coulter Electronics Ltd.) gezählt. Nach Einstellung einer definierten Zellzahl mit Kulturmedium erfolgte die Subkultivierung. Für die Experimente wurden logarithmisch wachsende V79 Zellen eingesetzt.

2.2.2.3 Koloniebildungstest

100 Zellen/5 ml Kulturmedium wurden in Plastikkulturgefäßen (Falcon, No. 2012, Kulturfläche 25 cm²) angelegt. Nach einer Kulturzeit von 24 Stunden erfolgte die Behandlung mit verschiedenen Konzentrationen der Pyrethroide durch Zugabe von 50 µl/Ansatz. Diese entsprachen einer Endkonzentration von 100 µg/ml, 50 µg/ml, 25 mg/ml, 12,5 mg/ml, 6,25 µg/ml.

Die behandelten Kulturen wurden 120 Stunden inkubiert. Nach dieser Zeit wurden alle Gefäße zweimal mit Hank's Lösung und einmal mit Dulbecco Medium und 10%-igem Kälberserum gespült. Anschließend wurden die Zellen für weitere 48 Stunden in 5 ml Dulbecco Medium und 10%-igem fötalen Kälberserum kultiviert. Danach wurden die Kulturen 2-3 mal mit physiologischer Kochsalzlösung gespült, mit Methanol-Eisessig fixiert und mit Giemsa gefärbt.

Die Auswertung der Kolonien erfolgte im Umkehrmikroskop. Pro Konzentration wurden vier Parallelkulturen ausgewertet. Registriert wurden nur Kolonien mit mehr als 50 Zellen.

2.2.2.4 Präparation von V79 Zellen für Mitoseprofilstudien

50.000 V79 Zellen/5 ml Medium wurden auf sterilen Objektträgern (Bellco, Vineland, USA, No. 5638-10300, 26 x 76 mm) in Quadriperm-Kulturschalen (Heraeus, Hanau) für 24 Stunden kultiviert. Danach erfolgte die Behandlung mit verschiedenen Konzentrationen der Testsubstanzen.

Nach 16 Stunden Exposition wurden die Kulturen mit Methanol-Eisessig im Verhältnis 3:1 dreimal für 10 Minuten fixiert und für 1 bis 2 Tage luftgetrocknet. Danach wurden die Präparate 10 Minuten mit einer 5 % Giemsa-Lösung (Azur-Eosin-Methylblau-Lösung, Firma Merck, Darmstadt) in Sörensen-Phosphatpuffer (0,067 M, pH 6,8) gefärbt, mit drei Portionen Aqua dest. gespült und anschließend mit Eukitt (O. Kindler GmbH und Co., Freiburg) und Deckgläschen (Menzel, 24x50 mm) luftdicht eingedeckelt.

2.2.2.5 Auswertekriterien der Mitoseprofilstudien

Die Auswertung der Präparate erfolgte im Lichtmikroskop Dialux 20 EB (Leitz, Wetzlar) bei 300-facher Vergrößerung. Die Mitoseprofilstudien wurden nach folgenden Kriterien durchgeführt:

1. Erfassung eines Mitoseblocks

1.1 Erhöhung des Mitoseindex

Der Mitoseindex wurde anhand vorhandener Mitosen pro 1000 Zellen ermittelt.

1.2 Reduktion des Verhältnisses von Ana-Telophasen zu Metaphasen (AT/M-Verhältnis)

Das AT/M-Verhältnis gibt Auskunft über die Wirksamkeit und Toxizität von Spindelgiften (Hsu et. al. 1986; Liang et al., 1983). Im Falle eines totalen mitotischen Blocks beträgt das AT/M-Verhältnis Null, bei inkomplettem mitotischen Arrest ist ein Verhältnis zwischen Null und dem Kontrollwert zu erwarten. Zur Bestimmung des AT/M-Verhältnisses wurden je 50 Mitosen in der Meta-, Ana- und Telophase von vier Replikaten ausgewertet.

2. Ermittlung mitotischer Verteilungsstörungen

Registriert wurden normale Mitosen im Stadium der Prophase, Metaphase und Ana-Telophase sowie Mitosen mit Zellteilungsstörungen pro 50 Mitosefiguren. Die morphologische Beurteilung und Quantifizierung von mitotischen Verteilungsstörungen erfolgte nach den bei Levan (1954) Bauchinger und Schmid (1972), Schmid und Bauchinger (1976) und Schmid et al. (1989) beschriebenen Kriterien zur Erfassung induzierter C-Mitosen. Es werden danach zwei Typen von C-Mitosen unterschieden, die „initiale C-Metaphase“ und die „C-Metaphase“:

2.1 Initiale C-Metaphase

Dieser frühe Typ ist charakteristisch für eine Kurzzeitbehandlung in Verbindung mit partiellen Spindelstörungen (Levan 1954). Für die Klassifizierung initialer C-Metaphasen wurden folgende morphologische Kriterien herangezogen:

- Dislozierung einzelner Chromosomen von der Äquatorialplatte
- Bildung von Chromosomengruppen in der Zelle mit zum Teil verkürzten Chromosomen
- Anordnung der Chromosomen im Zentrum der Zelle

Vielfach sind die Chromosomen metaphasisch stark verkürzt.

2.2 C-Metaphasen

Typische Erscheinungsform einer nach Colchizin-Einwirkung auftretenden Metaphase, die sich auf den Ausfall der Spindelbildung oder Inaktivierung, beziehungsweise Zerstörung der bereits gebildeten Spindel zurückführen lässt. Die Chromosomen sind stark verkürzt und liegen verstreut in der Zelle vor.

2.3 Statistik

In allen Experimenten wurden in allen Konzentrationen jeweils 4 Replikate ausgewertet. Die erhaltenen Daten wurden computerisiert und mit Hilfe eines statistischen Softwareprogramms (PCS 4, Top Soft, Hannover) ausgewertet. Die deskriptive Statistik beinhaltet die Berechnung des Mittelwertes und der Standardabweichung. Für Varianzgleichheit wurde der Bartlett's Test oder Kruskal-Wallis-Test, für unabhängige Vergleiche der Student's t-Test oder Wilcoxon-Test durchgeführt. Für signifikante Unterschiede zwischen den erhaltenen Mittelwerten, der Negativkontrollen und der behandelten Kulturen wurde eine Irrtumswahrscheinlichkeit von $p < 0,05$ festgesetzt.

3. Ergebnisse

3.1 Lymphozytenkulturen

In den Lymphozytenkulturen wurden Phenoxybenzoesäure, die Pyrethroide Deltamethrin, Cyfluthrin, Fenvalerat, Cypermethrin und Permethrin sowie Colcemid als Positivsubstanz getestet. Bestimmt wurde der Mitoseindex in Promille sowie der Prozentsatz von abnormalen Mitosen und deren Klassifikation in C-Metaphasen und initiale C-Metaphasen.

3.1.1 Bestimmung des Mitoseindex

Tabelle 3 a-f zeigt den Mitoseindex in Promille für Phenoxybenzoesäure sowie für die Pyrethroide in Abhängigkeit des getesteten Konzentrationsbereiches von 3,125 µg/ml bis 50 µg/ml. Desweiteren sind der Mitoseindex einer unbehandelten Lymphozytenkultur (Negativkontrolle) und einer mit DMSO behandelten Lymphozytenkultur (Lösungsmittelkontrolle) aufgeführt. Als Positivkontrolle diente Colcemid in einer Konzentration von 0,02 µg/ml. Der Test auf Varianzgleichheit der einzelnen Mitoseindices erfolgte mit dem Kruskal-Wallis-Test, der paarweise Vergleich der einzelnen Pyrethroidkonzentrationen mit der Lösungsmittelkontrolle mit dem Wilcoxon-Test.

Ein starker Einfluß auf den Mitoseindex konnte für das Spindelgift Colcemid ermittelt werden. In Abhängigkeit der einzelnen Experimente wurde ein Mitoseindex von 59,25 bis 168 ‰ gefunden. Dagegen wies die Negativkontrolle

Mitoseindices zwischen 5,5 und 10,0 ‰ auf. Vergleichbare, jedoch leicht erhöhte Mitoseindices wurden auch für die Lösungsmittelkontrolle mit DMSO im Bereich zwischen 7,5 und 12,75 ‰ gefunden. Bezüglich der getesteten Phenoxybenzoesäure ergaben sich im Vergleich zu der DMSO-Kontrolle keine wesentlichen Unterschiede in den Mitoseindices. Ein konzentrationsabhängiger Einfluß auf den Mitoseindex war ebenfalls nicht erkennbar. Dies traf auch für die getesteten Pyrethoide Deltamethrin, Cyfluthrin, Fenvalerat, und Cypermethrin zu. Dagegen wies Permethrin eine konzentrationsabhängige Reduzierung des Mitoseindex auf, der sich bei einer Konzentration von 25 µg/ml signifikant von der DMSO-Kontrolle unterschied.

Tabelle 3 a-f: Bestimmung des Mitoseindex in Lymphozytenkulturen nach Behandlung mit Phenoxybenzoesäure, verschiedenen Pyrethroiden und Colcemid

a) Phenoxybenzoesäure	Mitoseindex ‰		Kruskal-Wallis-Test
	Mittelwert	SD	
Colcemid	107,75	35,37	p = 0,0795
Kontrolle	8,00	1,63	
DMSO-Kontrolle	10,25	2,22	
Phenoxybenzoesäure (µg/ml)			
3,125	13,50	2,65	
6,25	12,00	4,55	
12,5	6,75	3,50	
25	8,25	0,96	
50	11,00	2,58	

b) Delthamethrin	Mitoseindex ‰		Kruskal-Wallis-Test
	Mittelwert	SD	
Colcemid	107,00	34,77	p = 0,0876
Kontrolle	7,75	2,75	
DMSO-Kontrolle	10,75	2,22	
Deltamethrin (µg/ml)			
3,125	14,50	1,73	
6,25	13,00	1,63	
12,5	10,00	1,83	
25	10,25	1,71	
50	13,00	3,83	

c) Cyfluthrin	Mitoseindex ‰		Kruskal-Wallis-Test
	Mittelwert	SD	
Colcemid	107,00	9,90	p = 0,5446
Kontrolle	11,25	2,06	
DMSO-Kontrolle	12,75	3,86	
Cyfluthrin (µg/ml)			
3,125	10,25	2,22	
6,25	11,00	3,56	
12,5	10,25	1,26	
25	13,50	3,42	
50	10,50	3,11	

d) Fenvalerat	Mitoseindex ‰		Kruskal-Wallis-Test
	Mittelwert	SD	
Colcemid	168,00	18,89	p = 0,6795
Kontrolle	5,50	3,00	
DMSO-Kontrolle	9,00	2,94	
Fenvalerat (µg/ml)			
3,125	8,25	2,63	
6,25	10,00	3,16	
12,5	10,00	2,45	
25	11,25	0,96	
50	11,50	4,93	

e) Cypermethrin	Mitoseindex ‰		Kruskal-Wallis-Test
	Mittelwert	SD	
Colcemid	79,75	14,03	p = 0,6663
Kontrolle	10,00	1,63	
DMSO-Kontrolle	8,50	2,52	
Cypermethrin (µg/ml)			
3,125	6,50	2,38	
6,25	7,50	3,51	
12,5	7,00	2,94	
25	6,25	2,22	
50	8,75	2,63	

f) Permethrin	Mitoseindex ‰		Kruskal-Wallis-Test
	Mittelwert	SD	
Colcemid	59,25	15,84	p = 0,0164
Kontrolle	7,00	2,94	
DMSO-Kontrolle	7,50	2,52	
Permethrin (µg/ml)			
3,125	9,50	1,73	
6,25	4,00	1,41	
12,5	6,25	2,75	
25	*3,25	0,50	
50	3,50	1,73	

*p<0.05 (Wilcoxon-Test)

In der Abbildung 2 werden Phenoxybenzoesäure und die verwendeten Pyrethroide hinsichtlich ihres Mitoseindexes in Abhängigkeit der getesteten Konzentrationen dargestellt und verglichen. Mit Ausnahme von Permethrin konnte für die getesteten Substanzen keine eindeutige Konzentrationsabhängigkeit beobachtet werden. Die gefundenen Mitoseindices der untersuchten Substanzen waren unterschiedlich und variierten zwischen 6 und 14 ‰. Für Permethrin zeigte sich eine konzentrationsabhängige Reduzierung des Mitoseindexes von 9,5 ‰ auf 3,5 ‰.

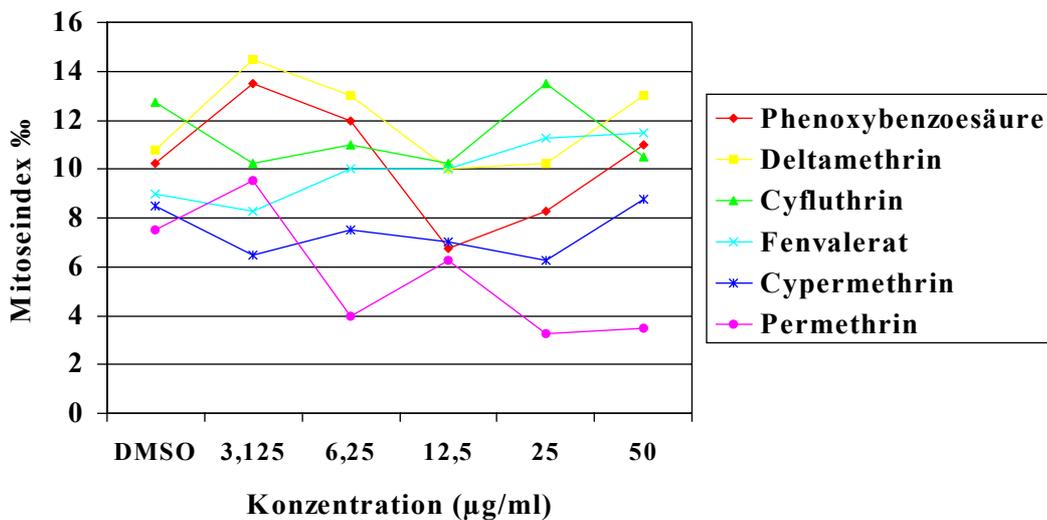


Abbildung 2: Mitoseindex % für Phenoxybenzoesäure und verschiedene Pyrethroide in Abhängigkeit der Konzentration

3.1.2 Bestimmung von Zellteilungsstörungen

In den Tabellen 4 a-f ist der Prozentsatz normaler Mitosen und abnormaler Mitosen für verschiedene Konzentrationen der Phenoxybenzoesäure sowie der getesteten Pyrethroide in einem Konzentrationsbereich von 3,125 µg/ml bis 50 µg/ml im Vergleich zur Positivkontrolle Colcemid, zur unbehandelten Kontrolle und zur Lösungsmittelkontrolle (DMSO) dargestellt. Zur Charakterisierung abnormaler Metaphasen erfolgte eine Unterteilung in C-Metaphasen und partiellen C-Metaphasen, deren Prozentsatz ebenfalls dargestellt ist. Der Test auf Varianzgleichheit der einzelnen Mitoseindices erfolgte mit dem Kruskal-Wallis-Test.

In den einzelnen Experimenten führte die Positivkontrolle Colcemid zu einer deutlichen Produktion von abnormalen Mitosen mit einem Prozentsatz zwischen 98 und 99,5 %, die alle dem C-Metaphasen-Typ zugeordnet werden konnten. Im Vergleich dazu betrug der Prozentsatz der spontanen Bildung abnormaler Mitosen in der unbehandelten Kontrolle zwischen 7 und 9 %, die der DMSO-Kontrolle zwischen 6,5 und 8,5 %. Dabei handelte es sich in der Regel um C-Metaphasen. Zu einem geringen Anteil wurden auch initiale C-Metaphasen gefunden. Die Behandlung mit Phenoxybenzoesäure führte bei keiner der getesteten Konzentrationen zu einem veränderten Prozentsatz abnormaler Mitosen im Vergleich zu der DMSO-Kontrolle. Dies traf auch für die getesteten Pyrethroide Deltamethrin, Cyfluthrin und Fenvalerat zu. Für Deltamethrin und Cyfluthrin konnte zwar bei den beiden am höchsten getesteten Konzentrationen von 25 und 50 µg/ml eine Tendenz zu höheren Prozentsätzen im Vergleich zur DMSO-Kontrolle beobachtet werden, eine Konzentrationsabhängigkeit war aber nicht vorhanden. Dagegen zeigten die beiden Pyrethroide Cypermethrin und Permethrin einen konzentrationsabhängigen Anstieg innerhalb der getesteten Konzentrationen. Dabei zeigten sich jedoch im niedrigen Konzentrationsbereich von 3,125 bis 12,5 µg/ml für Cypermethrin sowie für Permethrin bei einer Konzentration von 3,125 µg/ml, niedrigere Prozentsätze im Vergleich zur DMSO-Kontrolle. Deutlich höhere Prozentsätze von abnormalen Mitosen im Vergleich zur DMSO-Kontrolle wurden bei den höheren Konzentrationen gefunden. Für Cypermethrin betrug diese 11,5 und 11,0 % bei einer Konzentration von 25 bzw. 50 µg/ml vs. 8,25 % bei der DMSO-Kontrolle. Permethrin wies bei den Konzentrationen von 12,5, 25 und 50 µg/ml Prozentsätze von abnormalen Mitosen von 11,25, 11,75 und 11,00 vs. 8,50 %

bei der DMSO-Kontrolle auf. Diese erhöhten Prozentsätze wiesen innerhalb des getesteten Bereichs keine Konzentrationsabhängigkeit auf und zeigten keine signifikanten Unterschiede zur DMSO-Kontrolle. Die Erhöhung von abnormalen Mitosen in den vorher beschriebenen Fällen lässt sich neben dem Auftreten von C-Metaphasen mit einer Zunahme von initialen C-Metaphasen erklären.

Tabelle 4 a-f: Prozentsatz von normalen Mitosen und abnormalen Mitosen (C-Metaphasen, partielle C-Metaphasen) in menschlichen Lymphozytenkulturen nach Behandlung mit Phenoxybenzoesäure, verschiedenen Pyrethroiden und Colcemid

a) Phenoxybenzoesäure	Normale Mitosen %		abnormale Mitosen %		C-Metaphasen %		partielle C-Metaphasen %	
	Mittelwert	SD	Mittelwert	SD	Mittelwert	SD	Mittelwert	SD
Colcemid	1,50	1,29	98,50	1,29	98,50	1,29	0,00	0,00
Kontrolle	93,00	2,16	7,00	2,16	5,75	2,06	1,25	2,50
DMSO-Kontrolle	94,00	1,41	6,00	1,41	5,75	0,96	0,25	0,50
Phenoxybenzoesäure (µg/ml)								
3,125	95,75	0,96	4,25	0,96	4,25	0,96	0,00	0,00
6,25	95,25	1,26	4,75	1,26	4,75	1,26	0,00	0,00
12,5	93,25	2,63	6,75	2,63	6,75	2,63	0,00	0,00
25	93,00	2,16	7,00	2,16	6,75	1,71	0,25	0,50
50	93,25	1,50	6,75	1,50	6,00	1,41	0,75	0,96

b) Delta- methrin	Normale Mitosen %		abnormale Mitosen %		C-Metaphasen %		partielle C-Metaphasen %	
	Mittelwert	SD	Mittelwert	SD	Mittelwert	SD	Mittelwert	SD
Colcemid	0,50	0,58	99,50	0,58	99,50	0,58	0,00	0,00
Kontrolle	91,00	0,82	9,00	0,82	7,00	1,41	2,00	1,63
DMSO- Kontrolle	91,50	2,52	8,50	2,52	7,50	2,52	1,00	1,15
Deltamethrin (µg/ml)								
3,125	95,50	0,58	4,50	0,58	3,50	1,73	1,00	1,15
6,25	95,25	0,96	4,75	0,96	3,50	1,29	1,25	0,96
12,5	93,25	2,36	6,75	2,36	4,50	1,91	2,25	1,71
25	89,00	3,65	11,00	3,65	9,25	5,68	1,75	2,06
50	90,75	3,77	9,25	3,77	8,00	2,71	1,25	1,50

c) Cyfluthrin	Normale Mitosen %		abnormale Mitosen %		C-Metaphasen %		partielle C-Metaphasen %	
	Mittelwert	SD	Mittelwert	SD	Mittelwert	SD	Mittelwert	SD
Colcemid	0,25	0,50	99,75	0,50	99,75	0,50	0,00	0,00
Kontrolle	93,25	2,50	6,75	2,50	4,25	1,71	2,50	1,29
DMSO- Kontrolle	92,25	2,63	7,75	2,63	5,75	2,75	2,00	0,82
Cyfluthrin (µg/ml)								
3,125	96,50	1,29	3,50	1,29	2,25	0,50	1,25	1,50
6,25	93,00	1,63	7,00	1,63	5,75	1,50	1,25	0,96
12,5	93,75	1,71	6,25	1,71	4,50	2,65	1,75	1,71
25	89,75	1,71	10,25	1,71	7,50	1,29	2,75	1,71
50	90,75	4,11	9,25	4,11	6,25	2,87	3,00	2,58

d) Fenvalerat	Normale Mitosen %		abnormale Mitosen %		C-Metaphasen %		partielle C-Metaphasen %	
	Mittelwert	SD	Mittelwert	SD	Mittelwert	SD	Mittelwert	SD
Colcemid	1,25	1,89	98,75	1,89	98,75	1,89	0,00	0,00
Kontrolle	91,75	2,50	8,00	1,83	6,25	0,96	1,75	1,50
DMSO-Kontrolle	92,00	1,83	8,25	2,50	6,50	2,65	1,75	0,50
Fenvalerat (µg/ml)								
3,125	93,00	2,83	7,00	2,83	3,50	1,00	3,50	1,91
6,25	95,00	0,82	5,00	0,82	4,00	1,41	1,00	0,82
12,5	95,25	1,26	4,75	1,26	3,75	1,71	1,00	0,82
25	91,50	3,11	8,50	3,11	8,50	3,11	0,00	0,00
50	94,00	2,83	6,00	2,83	3,75	1,71	2,25	1,71

e) Cypermethrin	Normale Mitosen %		abnormale Mitosen %		C-Metaphasen %		partielle C-Metaphasen %	
	Mittelwert	SD	Mittelwert	SD	Mittelwert	SD	Mittelwert	SD
Colcemid	1,00	1,15	99,00	1,15	99,00	1,15	0,00	0,00
Kontrolle	91,00	1,83	9,00	1,83	7,50	1,73	1,50	1,91
DMSO-Kontrolle	91,75	2,06	8,25	2,06	8,25	2,06	0,00	0,00
Cypermethrin (µg/ml)								
3,125	95,25	2,87	4,75	2,87	3,00	2,16	1,75	1,26
6,25	95,00	3,46	5,00	3,46	4,75	3,59	0,25	0,50
12,5	92,00	2,94	8,00	2,94	6,75	2,50	1,25	0,96
25	88,50	4,51	11,50	4,51	6,50	2,65	5,00	2,58
50	89,00	3,27	11,00	3,27	9,75	1,89	1,25	2,50

f) Permethrin	Normale Mitosen %		abnormale Mitosen %		C-Metaphasen %		partielle C-Metaphasen %	
	Mittelwert	SD	Mittelwert	SD	Mittelwert	SD	Mittelwert	SD
Colcemid	2,00	1,41	98,00	1,41	98,00	1,41	0,00	0,00
Kontrolle	91,00	1,83	9,00	1,83	8,00	1,83	1,00	1,15
DMSO-Kontrolle	91,50	1,73	8,50	1,73	6,25	2,87	2,25	1,50
Permethrin (µg/ml)								
3,125	93,25	1,71	6,75	1,71	5,75	2,22	1,00	0,82
6,25	91,50	1,29	8,50	1,29	8,50	1,29	0,00	0,00
12,5	88,75	1,71	11,25	1,71	8,50	1,73	2,75	2,99
25	88,25	3,77	11,75	3,77	8,25	1,50	3,50	4,12
50	89,00	2,94	11,00	2,94	8,50	1,29	2,50	3,00

3.2 Lungenzellen des Chinesischen Hamsters V79

Mit den Lungenzellen des Chinesischen Hamsters V79 wurde der Einfluß von Phenoxybenzoesäure, den Pyrethroiden Deltamethrin, Cyfluthrin, Fenvalerat, Permethrin, Cypermethrin sowie Colcemid (Positivsubstanz) und DMSO (Kontrolle) auf die Koloniebildungsfähigkeit getestet. Zwei in ihrem Reinheitsgrad und Herkunft unterschiedliche Cypermethrine wurden des weiteren auf Zellteilungsstörungen untersucht. Dazu wurde der Mitoseindex in Prozent bestimmt und ein Mitoseprofil ermittelt.

3.2.1 Koloniebildungstest

Der Koloniebildungstest ist ein äußerst sensibler Test zum Nachweis der Zellreplikation nach Behandlung von Einzelzellen mit Schadstoffen. In den Tabellen 5 a-h sind die Ergebnisse des Koloniebildungstestes für

Phenoxybenzoesäure, die Pyrethroide, Deltamethrin, Cyfluthrin, Fenvalerat und Permethrin und Cypermethrin dargestellt. Für die Testung von Cypermethrin wurden 3 unterschiedliche Chargen verwendet, die sich im chemischen Reinheitsgrad (99 % und 91 %) und der Bezugsquelle unterschieden (Promochem und Dr. Ehrenstorfer). Der getestete Konzentrationsbereich betrug für alle Substanzen 6,25 µg/ml bis 100 µg/ml. In den Tabellen ist jeweils die Anzahl der Kolonien aufgeführt. Für Unterschiede zwischen der Anzahl der Kolonien der DMSO-Kontrolle und den behandelten Zellkulturen wurde der Student's t-test verwendet.

Die Anzahl der Kolonien der DMSO-Kontrolle bei einer Einsaat von 100 V79 Zellen betrug in den einzelnen Experimenten zwischen 97,3 und 138,3. Für die Phenoxybenzoesäure war im Konzentrationsbereich zwischen 6,25 und 50 µg/ml kein Unterschied im Vergleich zur DMSO-Kontrolle ersichtlich. Bei der höchsten getesteten Konzentration von 100 µg/ml zeigte sich eine signifikante Reduzierung. Die Koloniebildungsfähigkeit bei den getesteten Pyrethroiden ergab deutliche Unterschiede. Ein konzentrationsabhängiger starker Effekt wurde für Permethrin gefunden. Bei einer Konzentration von 6,25 und 12,5 µg/ml war die Anzahl der Kolonien signifikant reduziert im Vergleich zur DMSO-Kontrolle. Ab einer Konzentration von 25 µg/ml konnten keine Kolonien mehr gefunden werden. Moderate Effekte wurden für Deltamethrin und Fenvalerat beobachtet, die eine signifikant erniedrigte Kolonienzahl bei 100 µg/ml bzw. 50 und 100 µg/ml aufwiesen. Für Cyfluthrin wurde bereits bei 25 µg/ml eine signifikant reduzierte Kolonienzahl von 54,3 registriert, die bei 50 µg/ml weiter auf 5,3 abfiel. Bei 100 µg/ml waren keine Kolonien mehr vorhanden. Betrachtet

man die verschiedenen Chargen von Cypermethrin, zeigten alle einen deutlichen konzentrationsabhängigen zytotoxischen Effekt mit signifikanten Unterschieden zur DMSO-Kontrolle ab einer Konzentration von 25 µg/ml (Cypermethrin 99 %, Dr. Ehrenstorfer) und von 12,5 mg/ml (Cypermerthrin 91 %, Dr. Ehrenstorfer; Cypermethrin 99 % Promochem). Letztere beiden bildeten bei der höchsten getesteten Konzentration von 100 µg/ml keine Kolonien mehr, während bei dem Cypermethrin 99 % von Dr. Ehrenstorfer noch 43,3 Kolonien auftraten.

Tabelle 5 a-h: Koloniebildung von V79-Zellen nach Behandlung mit verschiedenen Pyrethroiden. Signifikante Unterschiede im Vergleich zu DMSO *p<0,05, **p<0,01 (Student's t-test)

a) Phenoxybenzoesäure	Kolonien (n)	
	Mittelwert	SD
DMSO-Kontrolle	108,8	2,8
Phenoxybenzoesäure (µg/ml)		
6,25	111,3	5,9
12,5	109,0	7,4
25	108,0	8,2
50	108,7	6,7
100	**96,3	2,9

b) Deltamethrin	Kolonien (n)	
	Mittelwert	SD
DMSO-Kontrolle	138,3	9,5
Deltamethrin (µg/ml)		
6,25	141,5	1,2
12,5	135,5	19,6
25	135,8	6,9
50	124,0	14,1
100	**101,8	4,9

c) Cyfluthrin	Kolonien (n)	
	Mittelwert	SD
DMSO-Kontrolle	129,3	12,0
Cyfluthrin ($\mu\text{g/ml}$)		
6,25	140,3	4,9
12,5	130,0	11,5
25	**54,3	15,2
50	**5,3	1,5
100	0,0	0,0

d) Fenvalerat	Kolonien (n)	
	Mittelwert	SD
DMSO-Kontrolle	129,3	12,0
Fenvalerat ($\mu\text{g/ml}$)		
6,25	134,8	4,6
12,5	133,8	8,7
25	136,5	10,2
50	*111,3	2,5
100	**97,5	7,0

e) Permethrin	Kolonien (n)	
	Mittelwert	SD
DMSO-Kontrolle	108,8	2,8
Permethrin ($\mu\text{g/ml}$)		
6,25	**40,7	8,7
12,5	**2,8	1,3
25	0,0	0,0
50	0,0	0,0
100	0,0	0,0

f) Cypermethrin 99 % Dr. Ehrenstorfer	Kolonien (n)	
	Mittelwert	SD
DMSO-Kontrolle	138,3	9,5
Cypermethrin ($\mu\text{g/ml}$)		
6,25	135,8	3,9
12,5	145,0	6,2
25	*102,3	9,2
50	**70,5	9,9
100	**43,3	9,1

g) Cypermethrin 91 % Dr. Ehrenstorfer	Kolonien (n)	
	Mittelwert	SD
DMSO-Kontrolle	97,3	8,5
Cypermethrin ($\mu\text{g/ml}$)		
6,25	86,8	4,4
12,5	**71,0	5,8
25	**9,5	1,9
50	**4,0	2,2
100	**0,0	0,0

h) Cypermethrin 99 % Promochem	Kolonien (n)	
	Mittelwert	SD
DMSO-Kontrolle	97,3	8,5
Cypermethrin ($\mu\text{g/ml}$)		
6,25	105,5	4,4
12,5	*87,8	2,9
25	**23,8	6,1
50	**4,0	1,6
100	**0,0	0,0

In Abbildung 3 ist die Reduktion der Koloniebildungsfähigkeit in Prozent im Vergleich mit der DMSO-Kontrolle für Phenoxybenzoesäure und die Pyrethroide Deltamethrin, Fenvalerat, Cypermethrin und Permethrin in Abhängigkeit der Konzentration aufgeführt. Die Abbildung verdeutlicht den starken dosisabhängigen Effekt von Permethrin, welches schon bei einer Konzentration von 25 $\mu\text{g/ml}$ eine 100%ige Reduktion der Koloniebildung zeigte. Ebenfalls eine starke konzentrationsabhängige Wirkung konnte für Cyfluthrin gefunden werden, wobei die Koloniebildung bei 100 $\mu\text{g/ml}$ auf 0 % reduziert war. Weniger ausgeprägte Effekte fanden sich bei Deltamethrin und Fenvalerat, die mit dem Effekt der Phenoxybenzoesäure vergleichbar waren.

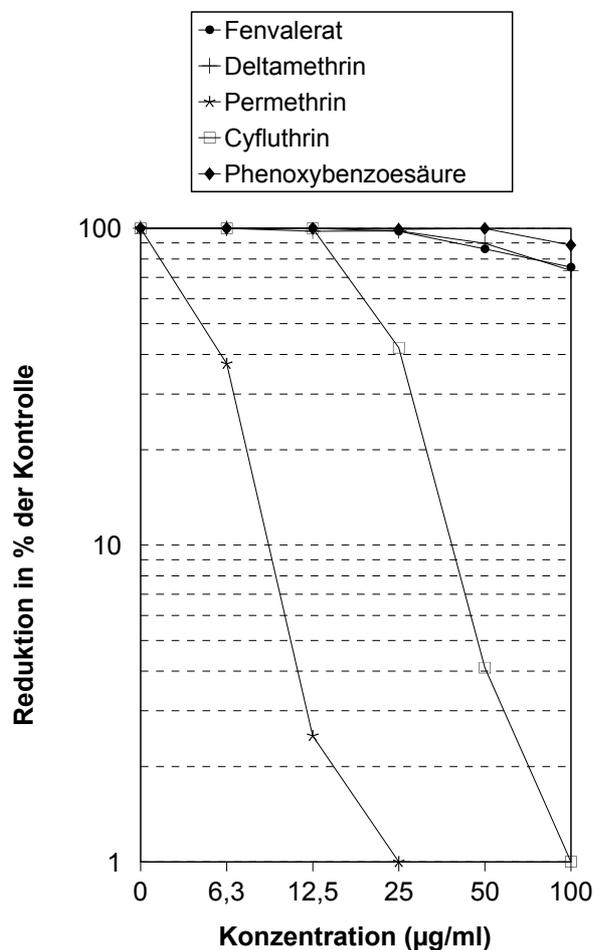


Abbildung 3: Koloniebildungsfähigkeit von verschiedenen Pyrethroiden

In der nächsten Abbildung wird die Reduktion der Koloniebildungsfähigkeit der DMSO-Kontrolle, in Prozent für verschiedene Chargen von Cypermethrin in Abhängigkeit der Konzentration gezeigt (Abb. 4). Eine vergleichbar starke Reduktion der Koloniebildungsfähigkeit wurde für das Cypermethrin von Promochem mit 99 % Reinheitsgrad und für das Cypermethrin von Dr.

Ehrenstorfer mit einem niedrigeren Reinheitsgrad von 91 % gefunden. Beide Chargen von Cypermethrin führten bei einer Konzentration von 100 µg/ml zu einer Reduktion auf 0 %. Im Vergleich dazu zeigte das Cypermethrin von Dr. Ehrenstorfer mit einem Reinheitsgrad von 99 % ebenfalls eine konzentrationsabhängige Wirkung, jedoch war der Effekt deutlich schwächer ausgeprägt.

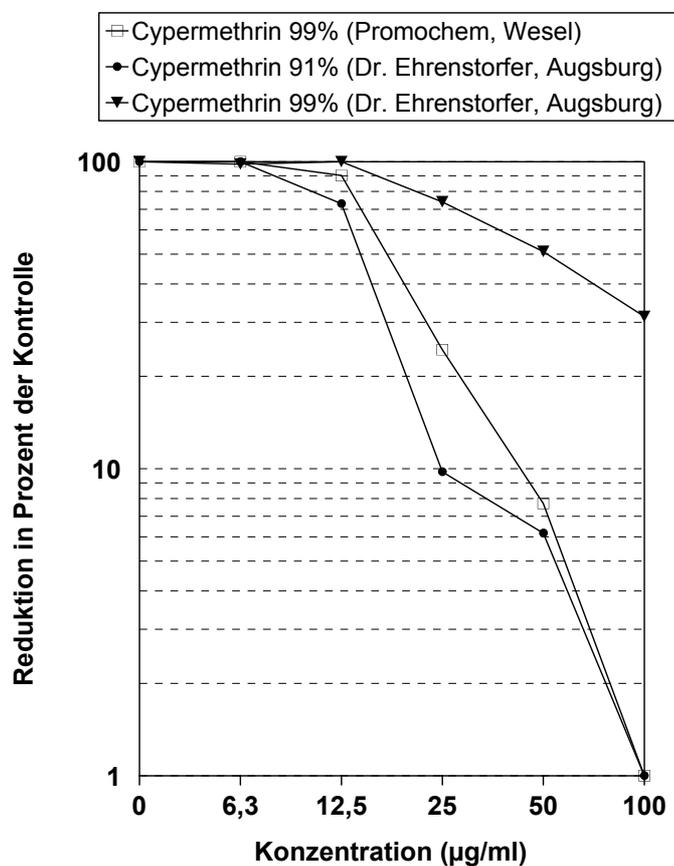


Abbildung 4: Koloniebildungsfähigkeit von verschiedenen Cypermethrinen

3.2.2 Bestimmung des Mitoseindexes nach Behandlung mit Cypermethrin

Zur Ermittlung des Mitoseindexes wurden die vorhandenen Mitosen pro 1000 V79 Zellen nach der Behandlung mit Cypermethrin (91 %, Dr. Ehrenstorfer) und Cypermethrin (99 %, Promochem) sowie Colcemid als Positivsubstanz ausgezählt und in Prozent umgerechnet (Tab. 6 a, b). Die unbehandelte Kontrolle wies einen Mitoseindex von 5,23 %, die DMSO-Kontrolle von 5,83 % auf. Im Vergleich dazu führte die Positivkontrolle mit Colcemid zu einem Mitoseindex von 16,53 %. Sowohl das Cypermethrin von Dr. Ehrenstorfer als auch von Promochem führten zu vergleichbaren Mitoseindices bei den getesteten Konzentrationen im Bereich von 6,25 µg/ml bis 50 µg/ml. Bei der höchsten getesteten Konzentration von 50 µg/ml wurden erhöhte Mitoseindices im Vergleich zur DMSO-Kontrolle gefunden. Für das Cypermethrin von Dr. Ehrenstorfer (91 % Reinheitsgrad) war der Unterschied signifikant.

In der Abbildung 5 werden die beiden Cypermethrine hinsichtlich ihres Mitoseindexes in Abhängigkeit der Konzentration dargestellt und verglichen. Es konnte eine deutliche Konzentrationsabhängigkeit beobachtet werden. Die dargestellten Substanzen unterschieden sich trotz ihres unterschiedlichen Reinheitsgrades bezüglich der Mitoseindices nur geringfügig.

Tabelle 6 a, b: Mitoseindex in Prozent in V79-Zellkulturen nach Behandlung mit unterschiedlichen Cypermethrinen. Signifikante Erhöhung im Vergleich zu DMSO * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$ (Wilcoxon-Test). Der statistische Vergleich der einzelnen Mitoseindices, der getesteten Cypermethrinkonzentrationen mit der DMSO-Kontrolle, erfolgte mit dem Kruskal-Wallis-Test

a) Cypermethrin (91 %, Dr. Ehrenstorfer)	Mitoseindex %		Kruskal- Wallis-Test
	Mittelwert	SD	
Colcemid	16,53	1,96	p = 0,0095
Kontrolle	5,23	0,36	
DMSO-Kontrolle	5,83	0,32	
Cypermethrin ($\mu\text{g/ml}$)			
6,25	4,13	0,90	
12,5	6,83	0,36	
25	7,13	1,75	
50	*7,85	1,36	

b) Cypermethrin (99 %, Promochem)	Mitoseindex %		Kruskal- Wallis-Test
	Mittelwert	SD	
Colcemid	16,53	1,96	p = 0,0346
Kontrolle	5,23	0,36	
DMSO-Kontrolle	5,83	0,32	
Cypermethrin ($\mu\text{g/ml}$)			
6,25	4,40	0,34	
12,5	5,70	1,20	
25	5,88	1,61	
50	7,53	0,84	

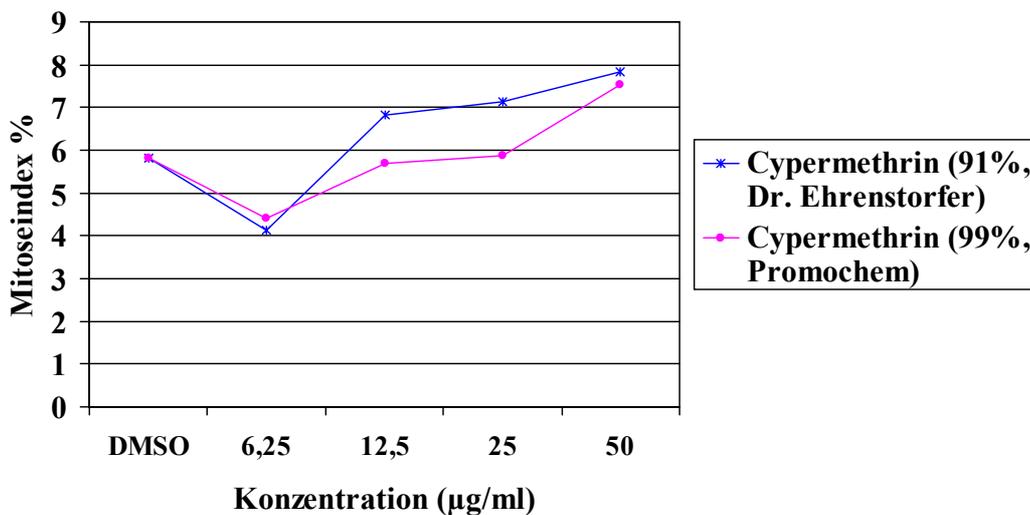


Abbildung 5: Mitoseindex in % für Cypermethrin der Firma Dr. Ehrenstorfer (91 % Reinheitsgrad) und der Firma Promochem (99 % Reinheitsgrad) in Abhängigkeit der Konzentrationen

3.2.3 Mitoseprofilstudien nach Behandlung mit Cypermethrin

Um eine weitere Auskunft über die Zytogenotoxizität von Cypermethrine mit unterschiedlichen Reinheitsgrad und Herkunft zu erhalten, wurden Mitoseprofilstudien durchgeführt. Mitoseprofilstudien beinhalten die Erfassung von einzelnen Mitosestadien, die Berechnung des AT/M-Verhältnisses sowie die Bestimmung des Prozentsatzes von abnormalen Mitosen und deren Klassifikation in C-Metaphasen, initiale C-Metaphasen und Cluster.

3.2.3.1 Bestimmung von Mitosestadien

Tabelle 7 a, b zeigt das Mitoseprofil ermittelt in V79-Zellkulturen nach Behandlung mit Cypermethrin der Firma Dr. Ehrenstorfer (91 % Reinheitsgrad) und der Firma Promochem (99 % Reinheitsgrad). Angegeben sind jeweils der Mittelwert \pm Standardabweichung von der Anzahl ausgewerteter Zellen von 4 Replikativen (50 ausgewertete Mitosen/Replikativ) für die einzelnen Mitosephasen wie Prophase, Metaphase, Anaphase und Telophase. Unterschiede der Mittelwerte bei den einzelnen getesteten Konzentrationen im Vergleich zur DMSO-Kontrolle wurden mit dem Wilcoxon-Test ermittelt.

Im Vergleich zur Kontrolle und DMSO-Kontrolle mit $23,25 \pm 3,30$ bzw. $26,25 \pm 3,77$ Zellen in der Metaphase lagen bei Colcemid alle Zellen im Stadium der Metaphase ($50 \pm 0,00$) vor. Abbildung 6 zeigt die prozentuale Verteilung von Prophasen (15,5 %), Metaphase (46,5 %), sowie Ana-/Telophasen (38 %) der unbehandelten Kontrolle und von Colcemid, das 100 % Metaphasen aufweist. Durch das Zellgift Colcemid wurden alle Zellen arretiert und konnten nicht in die nachfolgenden Mitosephasen übertreten.

Für Cypermethrin (91 %, Dr. Ehrenstorfer) konnte im Vergleich zur DMSO-Kontrolle ein signifikanter konzentrationsabhängiger Anstieg in der Anzahl der Metaphasen bis $48,25 \pm 0,96$ bei einer Konzentration von 25 $\mu\text{g/ml}$ beobachtet werden. Im gleichen Maße nahm die Anzahl der Anaphasen und Telophasen signifikant ab. Eine signifikante Reduktion im Vergleich zur DMSO-Kontrolle wurde auch bei den einzelnen Konzentrationen der Prophasen gefunden. In

ähnlicher Weise bezüglich der Anzahl der Pro-, Meta-, Ana- und Telophasen verhielt sich das Cypermethrin von Promochem (99 % Reinheitsgrad). Dies wird nochmals verdeutlicht bei Betrachtung der prozentualen Verteilung der einzelnen Mitosestadien (Prophase, Metaphase, Ana-/Telophase), die in Abbildung 7 und 8 dargestellt ist. Dabei ist besonders der konzentrationsabhängige Anstieg des Prozentsatzes von Metaphasen bei gleichzeitiger Abnahme des Prozentsatzes von Ana-/Telophasen zu beobachten.

Tabelle 7 a, b: Anzahl der Prophasen, Metaphasen, Anaphasen und Telophasen in V79-Zellkulturen nach Behandlung mit Cypermethrin der Firma Dr. Ehrenstorfer (91 % Reinheitsgrad) und der Firma Promochem (99 % Reinheitsgrad)

a) Cypermethrin (91 %, Dr. Ehrenstorfer)	Mittelwert \pm Standardabweichung			
	Prophase	Metaphase	Anaphase	Telophase
Colcemid	0,00 \pm 0,00	50,00 \pm 0,00	0,00 \pm 0,00	0,00 \pm 0,00
Kontrolle	7,75 \pm 1,71	23,25 \pm 3,30	10,75 \pm 0,50	8,25 \pm 3,86
DMSO-Kontrolle	9,25 \pm 2,36	26,25 \pm 3,77	10,25 \pm 6,55	4,25 \pm 2,75
Cypermethrin (μ g/ml)				
6,25	4,25 \pm 1,50*	37,00 \pm 4,62*	7,75 \pm 3,86	1,00 \pm 0,82
12,5	6,00 \pm 2,16	42,00 \pm 0,82*	2,00 \pm 1,83	0,00 \pm 0,00*
25	1,75 \pm 0,96*	48,25 \pm 0,96*	0,00 \pm 0,00*	0,00 \pm 0,00*
50	3,5 \pm 1,29*	46,50 \pm 1,29*	0,00 \pm 0,00*	0,00 \pm 0,00*

*p<0,05, **p<0,01 (Wilcoxon-Test)

b) Cypermethrin (99 %, Promochem)	Mittelwert \pm Standardabweichung			
	Prophase	Metaphase	Anaphase	Telophase
Colcemid	0,00 \pm 0,00	50,00 \pm 0,00	0,00 \pm 0,00	0,00 \pm 0,00
Kontrolle	7,75 \pm 1,71	23,25 \pm 3,30	10,75 \pm 0,50	8,25 \pm 3,86
DMSO-Kontrolle	9,25 \pm 2,36	26,25 \pm 3,77	10,25 \pm 6,55	4,25 \pm 2,75
Cypermethrin (μ g/ml)				
6,25	4,25 \pm 2,63	35,75 \pm 2,36*	7,75 \pm 3,69	2,25 \pm 2,87
12,5	3,00 \pm 2,16*	44,75 \pm 3,30*	2,25 \pm 1,71	0,00 \pm 0,00*
25	2,75 \pm 1,50*	45,50 \pm 3,32*	1,75 \pm 2,06	0,00 \pm 0,00*
50	2,00 \pm 1,83*	47,00 \pm 2,45*	1,00 \pm 0,82*	0,00 \pm 0,00*

* $p < 0,05$, ** $p < 0,01$ (Wilcoxon-Test)

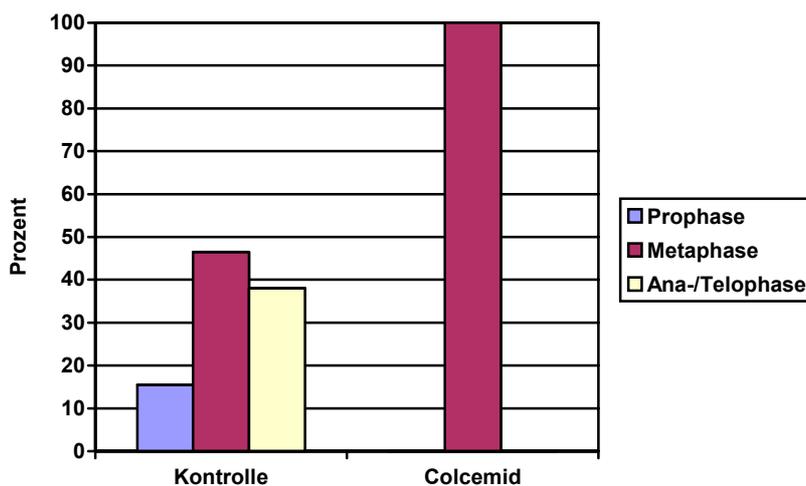


Abbildung 6: Mitoseprofil bei V79-Zellkulturen einer unbehandelten Kontrolle und nach Behandlung mit Colcemid

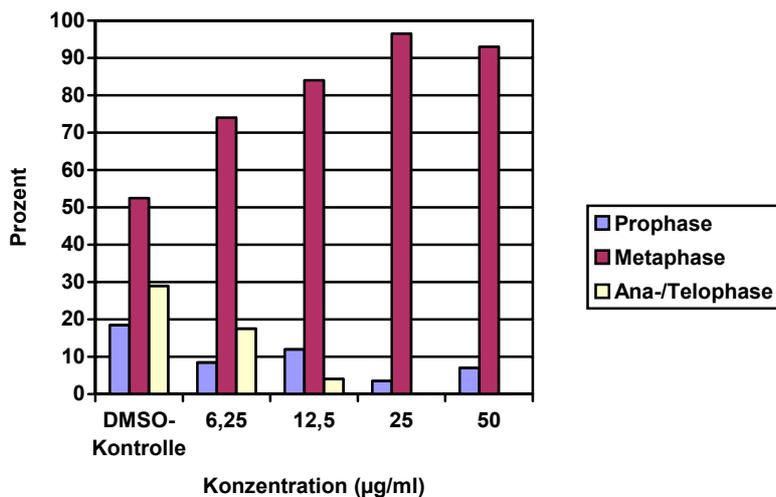


Abbildung 7: Mitoseprofil bei V79-Zellkulturen nach Behandlung mit DMSO und verschiedenen Konzentrationen von Cypermethrin (91 %, Dr. Ehrenstorfer)

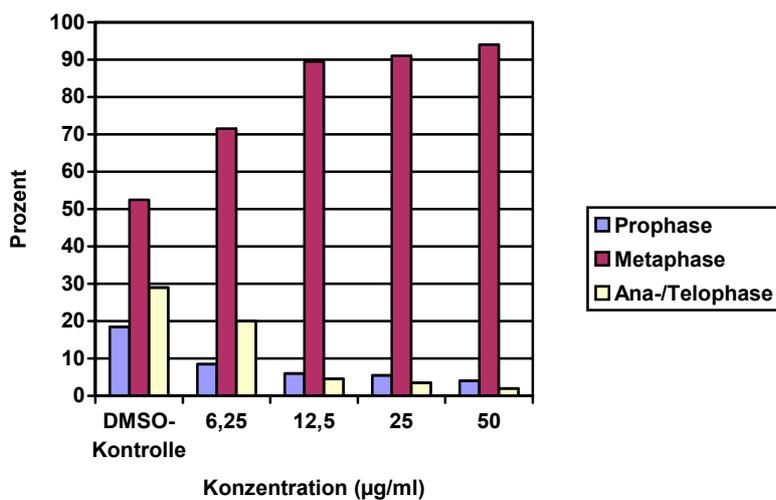


Abbildung 8: Mitoseprofil bei V79-Zellkulturen nach Behandlung mit DMSO und verschiedenen Konzentrationen von Cypermethrin (99 %, Promochem)

3.2.3.2 AT/M-Verhältnis

In Abbildung 9 ist der Vergleich der beiden Cypermethrine für das AT/M-Verhältnis dargestellt. Die Kurven laufen nahezu parallel und weisen eine deutliche Konzentrationsabhängigkeit auf. Mit steigender Konzentration der Cypermethrine geht das AT/M-Verhältnis in Richtung Null, was für eine totale Arretierung der Zellen im Stadium der Metaphase spricht. Der ähnliche Verlauf beider Kurven spricht für eine annähernd gleichstarke Wirkung beider Cypermethrine trotz der unterschiedlichen Reinheitsgrade.

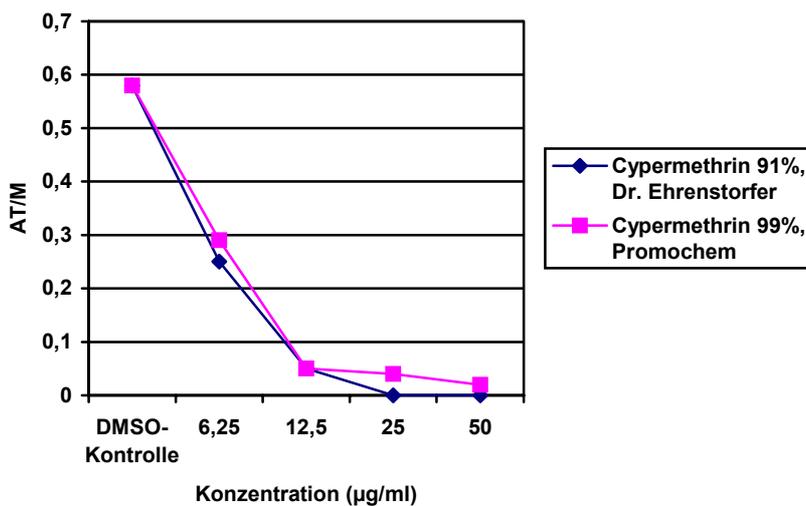


Abbildung 9: AT/M Verhältnis von V79-Zellkulturen nach Behandlung mit Cypermethrin der Firma Dr. Ehrenstorfer (91 % Reinheitsgrad) und der Firma Promochem (99 % Reinheitsgrad)

3.2.3.3 Mitosestörungen

Zur Ermittlung von Mitosestörungen erfolgte eine Unterteilung der ausgewerteten Metaphasen in normale und abnormalen Metaphasen. In Tabelle 9 a, b ist der mittlere Prozentsatz \pm Standardabweichung von 4 Replikativen pro Konzentration von Cypermethrin der Firma Dr. Ehrenstorfer (91 % Reinheitsgrad) und der Firma Promochem (99 % Reinheitsgrad) dargestellt. Die unbehandelte Kontrolle enthielt 94,90 % normale Metaphasen und 5,10 % abnormale Metaphasen, die DMSO-Kontrolle 99,08 % normale und 0,02 % abnormale Metaphasen, während das Zellgift Colcemid 99 % abnormale Metaphasen aufwies. Beide getesteten Cypermethrine führten zu einem konzentrationsabhängigen Anstieg von abnormalen Metaphasen. Die Prozentsätze von abnormalen Mitosen, waren mit Ausnahme des Cypermethrins von Promochem, bei einer Konzentration von 6,25 $\mu\text{g/ml}$ bei allen anderen Konzentrationen signifikant erhöht. Ein starker sprunghafter Anstieg des Prozentsatzes wurde im Konzentrationsintervall von 6,25 $\mu\text{g/ml}$ zu 12,5 $\mu\text{g/ml}$ beobachtet. Dieser betrug 13,55 zu 67,75 % bei dem Cypermethrin von Dr. Ehrenstorfer und 6,15 zu 51,75 % bei dem Cypermethrin von Promochem. Bei der höchsten getesteten Konzentration von 50 $\mu\text{g/ml}$ wurde für das Cypermethrin von Dr. Ehrenstorfer ein Prozentsatz von 77,27 % ermittelt, für das von Cypermethrin von Promochem 82,22 %. In der Abbildung 10 werden die beiden Cypermethrine hinsichtlich ihres Prozentsatzes von abnormalen Metaphasen in Abhängigkeit ihrer Konzentration graphisch dargestellt und zeigen vergleichbare Kurvenverläufe.

Tabelle 8 a, b: Prozentsatz von normalen und abnormalen Metaphasen bei V79-Zellkulturen nach Behandlung mit Cypermethrin der Firma Dr. Ehrenstorfer (91 % Reinheitsgrad) und der Firma Promochem (99 % Reinheitsgrad)

a) Cypermethrin (91 %, Dr. Ehrenstorfer)	Mittelwert \pm Standardabweichung	
	normale Metaphasen %	abnormale Metaphase %
Colcemid	1,00 \pm 2,00	99,00 \pm 2,00
Kontrolle	94,90 \pm 6,32	5,10 \pm 6,32
DMSO-Kontrolle	99,08 \pm 1,85	0,02 \pm 1,85
Cypermethrin ($\mu\text{g/ml}$)		
6,25	86,45 \pm 4,76	13,55 \pm 4,76*
12,5	32,25 \pm 7,71	67,75 \pm 7,71*
25	22,25 \pm 7,24	77,75 \pm 7,26*
50	22,73 \pm 7,80	77,27 \pm 7,80*

b) Cypermethrin (99 %, Promochem)	Mittelwert \pm Standardabweichung	
	normale Metaphasen %	abnormale Metaphasen %
Colcemid	1,00 \pm 2,00	99,00 \pm 2,00
Kontrolle	94,90 \pm 6,32	5,10 \pm 6,32
DMSO-Kontrolle	99,08 \pm 1,85	0,02 \pm 1,85
Cypermethrin ($\mu\text{g/ml}$)		
6,25	93,85 \pm 5,23	6,15 \pm 5,23
12,5	48,25 \pm 17,43	51,75 \pm 17,43*
25	27,73 \pm 12,97	72,27 \pm 12,97*
50	17,78 \pm 9,30	82,22 \pm 9,30*

*Wilcoxon-Test: $p < 0.05$

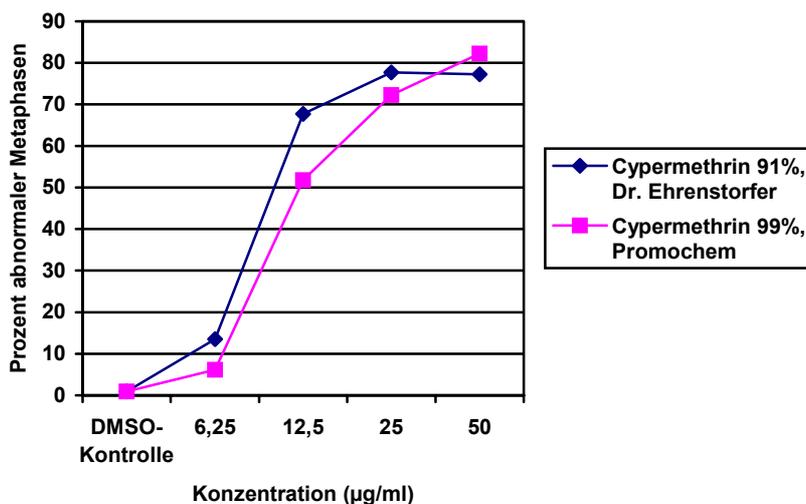


Abbildung 10: Grafische Darstellung des Prozentsatzes von abnormalen Metaphasen nach Behandlung mit Cypermethrin der Firma Dr. Ehrenstorfer (91 % Reinheitsgrad) und der Firma Promochem (99 % Reinheitsgrad)

Zur Ermittlung von spezifischen Mitosestörungen erfolgte eine Unterteilung der abnormalen Metaphasen in C-Metaphasen, initiale Metaphasen und in Metaphasen mit Cluster in bezug auf den Prozentsatz der gesamten Metaphasen. In Tabelle 10 ist der mittlere Prozentsatz \pm Standardabweichung von 4 Replikativen pro Konzentration von Cypermethrin der Firma Dr. Ehrenstorfer (91 % Reinheitsgrad) und der Firma Promochem (99 % Reinheitsgrad) dargestellt.

Colcemid führte zu 99 % C-Metaphasen. Im Vergleich dazu konnte für die unbehandelte Kontrolle 0,93 % C-Metaphasen und 4,18 % Cluster nachgewiesen werden. Für die DMSO-Kontrolle wurden ebenfalls 0,93 % C-Metaphasen in Abwesenheit von initialen C-Metaphasen und Cluster gefunden. Beide Cypermethrine zeigten einen konzentrationsabhängigen Anstieg des

Prozentsatzes von C-Metaphasen bis zu 50,45 % (Cypermethrin Dr. Ehrenstorfer) bzw. 54,75 % (Cypermethrin, Promochem) bei der am höchsten getesteten Konzentration von 50 µg/ml. Der Prozentsatz der initialen C-Metaphasen zeigte zunächst ebenfalls einen konzentrationsabhängigen Anstieg für beide Cypermethrine (38,80 % bzw. 31,33 %) bis 12,5 µg/ml. Die höheren Konzentrationen führten zu einem Abfall in der Konzentration der initialen C-Metaphasen gegenläufig zu der Erhöhung der C-Metaphasen. Das Auftreten von Clustern spielte für beide Cypermethrine eine untergeordnete Rolle.

In den Abbildungen 11 und 12 sind die spezifischen Mitosestörungen von Cypermethrin der Firma Dr. Ehrenstorfer (91 % Reinheitsgrad) und der Firma Promochem (99 % Reinheitsgrad) in Abhängigkeit ihrer Konzentration dargestellt und zeigen vergleichbare Anteile von C-Metaphasen, initialen C-Metaphasen und Cluster.

Tabelle 9 a, b: Prozentsatz abnormaler Metaphasen unterteilt in C-Metaphasen, initiale C-Metaphasen und Cluster in Prozent der gesamten Metaphasen nach Behandlung mit dem Cypermethrin der Firma Dr. Ehrenstorfer (91 % Reinheitsgrad) in verschiedenen Konzentrationen

a) Cypermethrin (91 %, Dr. Ehrenstorfer)	Mittelwert \pm Standardabweichung		
	C-Metaphase %	initiale Metaphase %	Cluster %
Colcemid	99,00 \pm 2,00	0,00 \pm 0,00	0,00 \pm 0,00
Kontrolle	0,93 \pm 1,85	0,00 \pm 0,00	4,18 \pm 6,14
DMSO-Kontrolle	0,93 \pm 1,85	0,00 \pm 0,00	0,00 \pm 0,00
Cypermethrin ($\mu\text{g/ml}$)			
6,25	8,03 \pm 6,24	4,23 \pm 2,91	1,20 \pm 1,39
12,5	28,56 \pm 1,78	36,80 \pm 7,40	2,40 \pm 1,96
25	45,13 \pm 8,05	29,05 \pm 3,42	3,58 \pm 4,22
50	50,45 \pm 4,58	24,15 \pm 2,09	2,68 \pm 2,03

b) Cypermethrin (99 %, Promochem)	Mittelwert \pm Standardabweichung		
	C-Metaphase %	initiale Metaphase %	Cluster %
Colcemid	99,00 \pm 2,00	0,00 \pm 0,00	0,00 \pm 0,00
Kontrolle	0,93 \pm 1,85	0,00 \pm 0,00	4,18 \pm 6,14
DMSO-Kontrolle	0,93 \pm 1,85	0,00 \pm 0,00	0,00 \pm 0,00
Cypermethrin ($\mu\text{g/ml}$)			
6,25	3,38 \pm 3,19	2,73 \pm 2,09	0,00 \pm 0,00
12,5	20,43 \pm 6,93	31,33 \pm 10,97	0,00 \pm 0,00
25	41,55 \pm 11,09	29,73 \pm 2,59	1,05 \pm 2,10
50	54,75 \pm 2,45	25,95 \pm 6,80	1,55 \pm 2,00

Cypermethrin 91% (Dr. Ehrenstorfer)

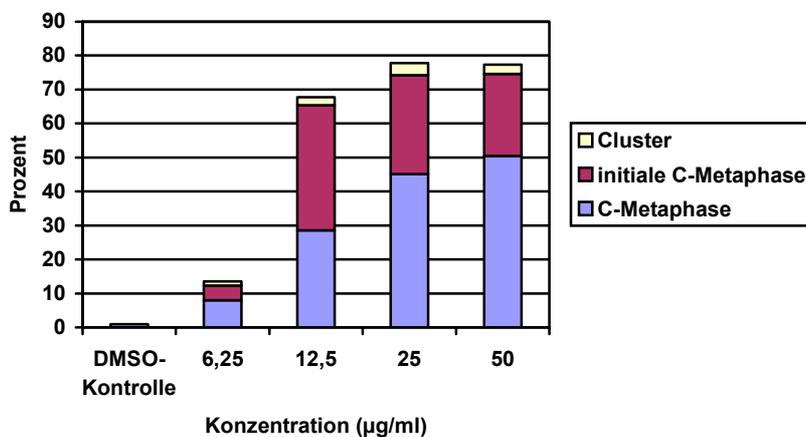


Abbildung 11: Prozentsatz abnormaler Metaphasen unterteilt in C-Metaphasen, initiale C-Metaphasen und Cluster nach Behandlung mit dem Cypermethrin der Firma Dr. Ehrenstorfer (91 % Reinheitsgrad) in verschiedenen Konzentrationen

Cypermethrin 99% (Promochem)

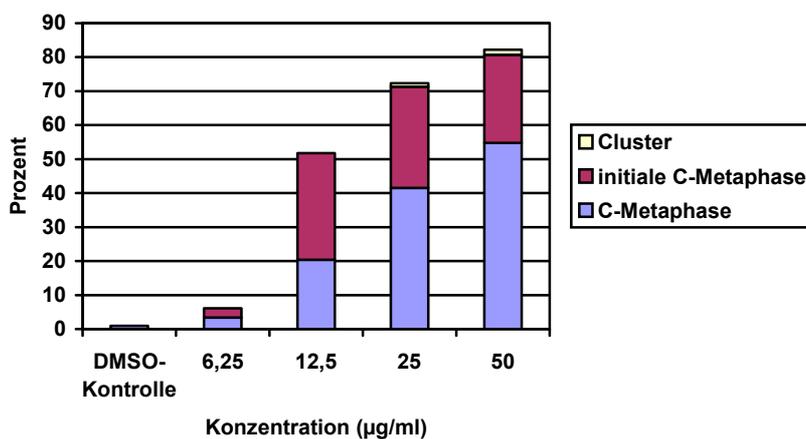


Abbildung 12: Prozentsatz abnormaler Metaphasen in C-Metaphasen, initialen C-Metaphasen und Cluster nach Behandlung mit dem Cypermethrin der Firma Promochem (99 % Reinheitsgrad) in verschiedenen Konzentrationen

4. Diskussion

Es gilt als wissenschaftlich gesichertes Kenntnis, dass es sich bei den Pyrethroiden um hochwirksame, neurotoxische Insektizide handelt. Die neurotoxische Wirkung bei Insekten wurde in der Literatur ausführlich beschrieben (Casida et al., 1983, 1998, Gammon 1985, Jaques et al., 1980, Narahashi T. et al., 1982). Bei den Menschen wird diese Wirkung jedoch sehr kontrovers diskutiert. Neben einer neurotoxischen Wirkung wird auch zunehmend der Verdacht einer genotoxischen Wirkung geäußert. Hinsichtlich ihrer kanzerogenen Wirkung sind Pyrethroide nicht klassifizierbar und werden daher von der International Agency for Research on Cancer (IARC 1991) in Gruppe 3 eingestuft, d.h. es gibt keinen eindeutigen Hinweis für oder gegen eine kanzerogene Wirkung. Es besteht jedoch die Möglichkeit, dass Pyrethroide eine kanzerogene Wirkung als Folge sogenannter nicht-genotoxischer Mechanismen besitzen. Starke Hinweise dafür sind das Auftreten von Mikrokernen und Zellteilungsstörungen in menschlichen und tierischen Zellen *in vivo* und *in vitro* sowie in pflanzlichen Zellsystemen (Chauhan et al., 1986, Puig et al., 1989, Carbonell et al., 1989, Suralles et al., 1990, Barrueco et al., 1992, Agarwal et al., 1994, Gandhi et al. 1995). Es gibt jedoch keine eindeutigen Hinweise, ob die induzierten Mikrokern auf Zellteilungsstörungen beruhen, da in einigen Arbeiten auch die Induktion von chromosomalen Aberrationen beschrieben werden (Puig et al., 1989, Caballo et al., 1992, Amer et al., 1993), die ebenfalls zu Mikrokernen führen können.

Es ist bekannt, dass eine Vielzahl von Nervengiften wie z.B. Taxol oder Methylquecksilber Zellteilungsstörungen durch Interaktionen mit dem mitotischen Spindelapparat verursachen (Önfelt, 1987, Vignani et al., 1992). So beschreibt auch Carbonell et al. (1989) für das Pyrethroid Fenvalerat an humanen Lymphozytenkulturen einen starken dosisabhängigen mitotischen Arrest, als Folge der Induktion von C-Metaphasen in einem Konzentrationsbereich von 2- 50 µg/ml. Bei der höchsten getesteten Konzentration von 50 µg/ml wurden ausschließlich C-Metaphasen gefunden, die einem Effektäquivalent von 0,01 µg/ml Demicolcin, einem bekannten Spindelgift, entsprachen. Dieser Effekt von Fenvalerat wurde auf die Hemmung bzw. Störung der normalen Spindelfunktion zurückgeführt.

Bei gleicher Methode und Inkubationszeit sowie gleichem Konzentrationsbereich konnten in der vorliegenden Arbeit diese Ergebnisse in der humanen Lymphozytenkultur nicht reproduziert werden. Das von uns verwendete Fenvalerat der Firma Dr. Ehrenstorfer führte zu einer leichten nicht-signifikanten Erhöhung des Mitoseindex bei der höchsten getesteten Konzentration von 50 µg/ml. Ein Effekt im Hinblick auf die Induktion von C-Metaphasen oder partiellen C-Metaphasen ließ sich jedoch nicht beobachten. Vergleichbare Ergebnisse bezüglich des Mitoseindex bzw. des Auftretens von C-Metaphasen zeigten auch die weiteren getesteten Pyrethroide Cypermethrin, Deltamethrin und Cyfluthrin sowie der Leitmetabolit Phenoxybenzoesäure. Das Pyrethroid Permethrin dagegen wies eher eine Hemmung der Zellproliferation im Konzentrationsbereich von 6,25 -50 µg/ml auf. Eine signifikante Erniedrigung des Mitoseindex ergab sich bei einer Permethrinkonzentration von 25 µg/ml (4 ‰) im Vergleich zu der DMSO-Kontrolle (7,5 ‰). Dies deutet auf einen

zytotoxischen Effekt von Permethrin auf die Lymphozyten hin. So konnte auch eine moderate Hemmung der Zellproliferation nach Behandlung von Lymphozyten von Normergikern durch Permethrin oder S-Bioallethrin gefunden werden, die bei Atopikern jedoch stärker ausgeprägt war (Diel et al., 1995, Diel, 1997). Der von Barrueco et al. (1992) gefundene unveränderte Proliferationsindex nach Behandlung von humanen Lymphozytenkulturen mit dem Pyrethroid Permethrin im Konzentrationsbereich von 5 bis 100 µg/ml weist darauf hin, dass diese Pyrethroide keinen Einfluß auf die Zellproliferation und mitotische Zellteilung aufweisen.

Ein Spindeleffekt ließ sich in der vorliegenden Arbeit anhand der Häufigkeit von C-Metaphasen und partiellen C-Metaphasen in der menschlichen Lymphozytenkultur nicht beschreiben. Insgesamt ließ sich für alle getesteten Pyrethroide im Konzentrationsbereich von 3,125 – 50 µg/ml kein Einfluß auf die mitotische Zellteilung nachweisen. In einer anderen Untersuchung führten Konzentrationen über 50 µg/ml Permethrin jedoch zu Bildung von Mikrokernen und chromosomalen Aberrationen (Barrueco et al., 1992). Suralles und Mitarbeiter fanden 1990 mit dem Pyrethroid Fenvalerat in humanen Lymphozytenkulturen dagegen einen Einfluß auf die Zellproliferation anhand einer reduzierten Häufigkeit binukleärer Zellen, was auch von einer signifikanten dosisabhängigen Induktion von Mikrokernen begleitet war. Dieser starke Effekt von Pyrethroiden auf das Auftreten von Mikrokernen ließ sich jedoch von der selben Arbeitsgruppe später nicht mehr verifizieren (Suralles et al., 1995). Die Pyrethroide Fenpropatin und Cypermethrin führten nur zu einer schwachen Induktion von Mikrokernen in humanen Lymphozytenkulturen, während die

Pyrethroide Permethrin, Deltamethrin und Fenvalerat nicht zur Induktion von Mikrokernen beitrugen. Es wurde die Vermutung nahe gelegt, dass die Bezugsquelle, die Isomerzusammensetzung sowie der Reinheitsgrad eine Rolle bezüglich der kontroversen Ergebnisse spielen. Bezugnehmend auf die Diskrepanz der Ergebnisse des getesteten Pyrethroids Fenvalerat ergab sich als einziger Unterschied die Bezugsquelle. Die erzielten hohen Effekte bezüglich der Induktion von C-Metaphasen (Carbonell et al., 1989) sowie von Mikrokernen (Suralles et al., 1990) wurden mit einem Fenvalerat erzielt, das von der Firma S.E.P. Shell bezogen wurde. Das von der Firma Dr. Ehrenstorfer bezogene Fenvalerat führte dagegen nicht zur Induktion von Mikrokernen im selben getesteten Konzentrationsbereich (Suralles et al., 1995).

In der vorliegenden Arbeit wurden ebenfalls Pyrethroide der Firma Dr. Ehrenstorfer getestet, die mit Ausnahme von Cypermethrin einem vergleichbaren Reinheitsgrad entsprachen wie die von Suralles et al. (1995) getesteten Pyrethroide. Zur Klärung der Fragestellung, inwieweit Pyrethroide mit unterschiedlichen Reinheitsgraden und unterschiedlicher Herkunft auch zu unterschiedlichen Effekten führen, wurden weiterführende Untersuchungen zur Zelltoxizität und Zytogenotoxizität durchgeführt. Als Zellsystem wurde die Lungenzell-Linie des Chinesischen Hamsters (V79) verwendet. Die Untersuchungen zur Zelltoxizität erfolgte anhand der Koloniebildungsfähigkeit. Die getesteten Pyrethroide führten zu deutlichen unterschiedlichen toxischen Effekten. Ein dosisabhängiger starker Effekt wurde für Permethrin gefunden, welches zu einer 100 % Reduktion der Koloniebildungsfähigkeit bei einer Konzentration von 25 µg/ml führte, bei Cyfluthrin dagegen erst bei einer

Konzentration von 100 µg/ml. Fenvalerat und Deltamethrin dagegen zeigten eine geringere Reduktion der Koloniebildungsfähigkeit auf etwa 30 % bei der höchsten getesteten Konzentration von 100 µg/ml. Dieser zytotoxische Effekt ist in guter Übereinstimmung mit einem anderen zytotoxischen Index, dem „cytokinesis block proliferation index (CBPI)“, der in humanen Lymphozyten bestimmt wurde (Suralles et al., 1995). In dieser sowie in unserer Untersuchung wurden Pyrethroide der Firma Dr. Ehrenstorfer verwendet. Ein möglicher Einfluß auf die mitotische Zellteilung lässt sich vermuten, da in der Arbeit von Suralles et al. (1995) eine geringe Induktion von Mikrokernen an isolierten Lymphozytenkulturen vorhanden war, jedoch nicht unter Verwendung von Vollblutkulturen. Dies erklärt möglicherweise auch das fehlende Auftreten von C-Metaphasen bzw. initialen C-Metaphasen in der vorliegenden Arbeit, in der humanen Lymphozytenkultur mit Vollblut verwendet wurde. Vermutlich sind in dem Vollblut Systeme vorhanden, die zur Detoxifizierung von Pyrethroiden beitragen und somit einem zytogenotoxischen Effekt entgegenwirken. So wird beschrieben, dass Carboxylesterasen im Blut zur Pyrethroidentgiftung beitragen (Leng, 1998).

Die Erfassung zusätzlicher Faktoren, wie Reinheitsgrad und Herkunft, sollten Aufschluß über deren möglichen Einfluß auf die Zytotoxizität geben. Dazu wurden im Koloniebildungstest zwei Cypermethrine derselben Firma (Dr. Ehrenstorfer) mit unterschiedlichen Reinheitsgraden von 99 % und 91 % getestet und mit einem Cypermethrin einer anderen Firma (Promochem) mit einem Reinheitsgrad von 99 % verglichen. Die zwei von Dr. Ehrenstorfer erhaltenen Cypermethrine zeigten unterschiedliche Wirkung, wobei der

zytotoxische Effekt bei dem höher verunreinigten Cypermethrin (91 %) deutlich stärker ausgeprägt war. Das führt zu der Vermutung, dass die chemische Verunreinigung eine große Rolle spielt und die Pyrethroide per se keine oder nur eine geringe zytotoxische Wirkung entfalten. Vergleichbare Effekte wurden von Kerkfliet et al. (1982) für ein anderes Pestizid, dem Pentachlorphenol, beschrieben. Es zeigte sich, dass das Pentachlorphenol mit einer Reinheit von 86 % im Tierversuch eine T-Zellreduktion und Tumorbildung verursachte, während das Pentachlorphenol mit einer Reinheit von 99 % keine Effekte aufwies. Es ist jedoch nicht bekannt, welche Stoffe der Verunreinigung zu diesen Effekten führen. Interessanterweise zeigte das Cypermethrin von Promochem, mit einem Reinheitsgrad von 99 %, annähernd die gleiche starke zytotoxische Wirkung wie das mit 91 % Reinheitsgrad angegebene Cypermethrin von Dr. Ehrenstorfer. Dieses Ergebnis zeigt, dass nicht nur die Verunreinigung sondern auch die Herkunft eine bedeutende Rolle bei den zytotoxischen Effekten spielt. Ob dies auf den Herstellungsprozess oder auch unterschiedliche Isomerzusammensetzung zurückzuführen ist, lässt sich nicht beantworten, da keine chemischen Analysen verfügbar waren.

Der weitere Vergleich von Cypermethrin anhand zytogenotoxischer Effekte bei V79 sollte Aufschluß über dessen Wirkung auf den mitotischen Spindelapparat geben. So führten das Cypermethrin von Dr. Ehrenstorfer sowie das von Promochem zu einem vergleichbaren konzentrationsabhängigen Anstieg des Mitoseindex von 5 % auf 8 %. Für das Spindelgift Colcemid war der Mitoseindex etwa doppelt so hoch. Diese Hemmung der mitotischen Zellteilung ist in guter Übereinstimmung mit der Reduktion im Koloniebildungstest. Daraus

lässt sich schließen, dass der Koloniebildungstest prädikativ für Effekte auf die mitotische Zellteilung sein kann. Dies wird bestätigt durch den hohen Prozentsatz abnormaler Metaphasen von bis zu 80 % für beide Cypermethrine bei der höchsten getesteten Konzentration von 50 µg/ml. Der größte Anteil der abnormalen Metaphasen ist auf das Auftreten von C-Metaphasen zurückzuführen. Dieser Effekt ist mit einem totalen Verlust des mitotischen Spindelapparates zu erklären, ähnlich dem Effekt des Spindelgiftes Colcemid. C-Metaphasen oder Anzeichen einer Spindelstörung geben einen nachhaltigen Hinweis auf ein aneuploidie-induzierendes Potential (Miller et Adler, 1989). Bezüglich eines Zusammenhangs zwischen Aneuploidie und maligner Zelltransformation b.z.w. Krebsentstehung (Hofmann et al. 1986, Oshimura et al. 1986, Melnick et al. 1996) sind Effekte auf die Zellteilung als nicht-genotoxischer Mechanismus der Kanzerogenese von Bedeutung. Für Rotenone, ein natürliches Insektizid, ließen sich in Abwesenheit chromosomaler Aberrationen eine Induktion von Aneuploidie und Polyploidie in Chinesischen Hamsterzellen (CHL) nachweisen (Matsumoto et Ohta, 1991). Dies spricht für einen nicht-genotoxischen Mechanismus aufgrund von Zellteilungsstörungen. Ob dies der alleinige Mechanismus für die hier untersuchten Pyrethroide ist, lässt sich nicht eindeutig klären. Für Delthametrin z.B. ließen sich neben Spindelstörungen auch Chromosomenbrüche nach Behandlung von Wurzelspitzen von *Allium cepa* nachweisen (Chauhan et al., 1986), was zusätzlich auf einen genotoxischen Mechanismus hinweist. Hinweise auf beide Mechanismen lassen sich von Tierexperimenten ableiten, bei denen im Knochenmark der Ratte nach oraler bzw. intravenöser Applikation von

Delthamethrin chromosomale Aberrationen und Effekte auf den Spindelapparat beschrieben wurden (Agarwal et al., 1994).

Die zum Teil kontroversen Ergebnisse bezüglich genotoxischer und nicht-genotoxischer Effekte lassen vermuten, dass in der Tat nicht das Pyrethroid selbst der entscheidende Faktor ist, sondern dass den Verunreinigungen eine bedeutende Rolle zukommt. Dies lässt sich darin begründen, dass die Verunreinigungen eine Mischung von komplexen Substanzen enthalten, die einerseits Effekte auf die Chromosomen haben und andererseits auf den mitotischen Spindelapparat. Diese Effekte können je nach chemischer Zusammensetzung der Verunreinigungen auch gemeinsam auftreten. Unterschiedliche Ausmaße von Effekten durch chemische Verunreinigungen in den verschiedenen Zellkultursystemen, wie in der humanen Vollblutkultur oder Lungenzellkultur des Chinesischen Hamsters (V79), lassen sich vermutlich auf die unterschiedliche Ausstattung mit detoxifizierenden Enzymen zurückführen.

Abschließend lässt sich anhand der vorliegenden Arbeit sagen, dass unterschiedliche Pyrethroide zu unterschiedlichen zytogenotoxischen Wirkungen führen. Diese Wirkungen sind jedoch auf die Testung in Chinesischen Hamsterlungenzellen (V79) beschränkt und lassen sich nicht für die humane Lymphozytenkulturen bestätigen. Als ein entscheidender Faktor für die unterschiedliche Wirkung der Pyrethroide untereinander werden chemische Verunreinigungen angesehen, die sich auf das Ausmaß der Verunreinigung sowie auf unterschiedliche chemischen Zusammensetzungen zurückführen lassen. Für die unterschiedliche Wirkung der Pyrethroide in der

humanen Lymphozytenkultur sowie der Chinesischen Hamsterlungenzellkultur (V79) werden unterschiedliche schadstoff-detoxifizierende Metabolisierungsmechanismen in Betracht gezogen. Daraus lässt sich schließen, dass die Pyrethroide per se nicht für die zytogenotoxische Wirkung verantwortlich sind. Vielmehr scheinen der Reinheitsgrad der Pyrethroide wie auch chemische Verunreinigungen im Hinblick auf deren Bezugsquelle eine entscheidende Rolle zu spielen. Für eine toxikologische Bewertung von Pyrethroiden sollten daher Inhaltsstoffe der chemischen Verunreinigung der Pyrethroide mitberücksichtigt werden.

5. Zusammenfassung

Untersuchung zum Einfluss von synthetischen Pyrethroiden auf die mitotische Zellteilung an humanen Lymphozytenkulturen und an Lungenzellen des Chinesischen Hamsters der Linie V79

Barbara Stiller

In der vorliegenden Arbeit wurde die zytogenotoxische Wirkung von Pyrethroiden auf humane Lymphozytenkulturen und Chinesische Lungenhamsterzellen (V79) untersucht.

In der humanen Lymphozytenkultur wurden verschiedene synthetische Pyrethroide mit unterschiedlichen chemischen Reinheitsgraden und von unterschiedlicher Herkunft verwendet.

Die Pyrethroide, Deltamethrin mit einem Reinheitsgrad von 99 %, Permethrin mit einem Reinheitsgrad von 97 %, Cyfluthrin mit einem Reinheitsgrad von 92 %, Fenvalerat mit einem Reinheitsgrad von 99,1 %, Cypermethrin mit einem Reinheitsgrad von 91 % und die Phenoxybenzoesäure wurden von der Firma Dr. Ehrenstorfer bezogen.

Die Wirkung der Pyrethroide wurde über Nachweis von Zellteilungsstörungen anhand des Mitoseindex und des Auftretens von abnormalen Metaphasen, C-Metaphasen und initialen C-Metaphasen ermittelt. Die Lymphozytenkulturen ergaben im Vergleich zu der Kontrollgruppe (Lösungsmittel DMSO) für die getesteten Pyrethroide und für die Phenoxybenzoesäure im Konzentrationsbereich von 3,125 µg/ml bis 50 µg/ml keinen konzentrationsabhängigen Einfluss auf den Mitoseindex und dem Prozentsatz abnormaler Mitosen. Die Ausnahme bildete Permethrin, welches bei einer Konzentration von 25 µg/ml zu einer signifikanten Reduktion des Mitoseindex führte.

Im Koloniebildungstest mit V79 Zellen wurden zusätzliche Pyrethroide (Cypermethrin mit einer Reinheit von 99 % der Firma Dr. Ehrenstorfer und Cypermethrin mit einer Reinheit von 99 % der Firma Promochem) getestet. Bei allen untersuchten Pyrethroiden zeigte sich ein konzentrationsabhängiger zytotoxischer Effekt mit signifikanten Unterschieden zur DMSO-Kontrollgruppe. Die stärksten Effekte wurden für Permethrin, Cyfluthrin und Cypermethrin gefunden. Weiterhin ergab sich bei Verwendung von Cypermethrin unterschiedlichen Reinheitsgrades und Herkunft, dass unterschiedliche zytotoxische Effekte hervorgerufen wurden. Dabei zeigte sich, dass das Cypermethrin mit einer Reinheit von 91 % der Firma Dr. Ehrenstorfer einen stärkeren Effekt aufwies, als das Cypermethrin mit einer Reinheit von 99 % der Firma Dr. Ehrenstorfer.

Das Cypermethrin einer anderen Firma (Promochem) mit einem hohen Reinheitsgrad (99%) zeigte einen ähnlichen zytotoxischen Effekt in der Koloniebildungsfähigkeit wie das stärker verunreinigte der Firma Dr. Ehrenstorfer.

Weitere Experimente zeigten, dass dieser zytotoxische Effekt auf Zellteilungsstörungen zurückzuführen ist.

Cypermethrin mit einem Reinheitsgrad von 91 % der Firma Dr. Ehrenstorfer und das Cypermethrin mit einem Reinheitsgrad von 99 % der Firma Promochem ergaben einen signifikanten dosisabhängigen Anstieg des Mitoseindex.

Die Mitoseprofilstudien zeigte eine Arretierung der Mitose in der Metaphase sowie eine Abnahme der Ana- und Telophasen. Dementsprechend wurde eine konzentrationsabhängige Reduktion des AT/M-Verhältnisses festgestellt.

Als Ursache der Metaphasenarretierung wurden schwerwiegende Störungen der Chromosomenverteilung, hauptsächlich C-Metaphasen und initiale Metaphasen registriert. Die beobachteten Zellteilungsstörungen sind auf einen partiellen oder totalen Verlust des Spindelapparates zurückzuführen. Zellteilungsstörungen mit nachfolgender Aneuploidie sind von besonderer Bedeutung und weisen auf einen nicht-genotoxischen Mechanismus bei der Krebsentstehung hin.

Zusammenfassend lässt sich daraus schließen, dass nicht die Pyrethroide selbst für die zytogenotoxische Wirkung verantwortlich sind, sondern dass ihr Reinheitsgrad, ihre chemische Verunreinigung sowie ihre Herkunft die entscheidenden Rollen spielen.

Literaturverzeichnis

Agarwal D.K., Chauhan L.K.S., Gupta S.K., Sundararaman V. (1994) Cytogenetic effects of deltamethrin on rat bone marrow. *Mutation Res.* 311, 133-138

Aldrige W.N. (1990) An assessment of the toxicological properties of pyrethroids and their neurotoxicity. *Crit. Rev. Toxicol.* 2, 89-104

Amer S.M., Ibrahim A.A., El-Sherbeny K.M. (1993) Induction of chromosomal aberrations and sisterchromatide exchange in vivo and in vitro by the insecticide cypermethrin. *J. Appl. Toxicol.* 13, 341-345

Barrett J.C., Wong A., McLachlan J.A. (1981) Diethylstilbestrol induces neoplastic transformation without measurable gene mutation at two loci. *Science*, 212, 1402-1404

Barrueco C., Herrera A., Caballa C., de la Peña E. (1992) Cytogenetic effects of permethrin in cultured human lymphocytes. *Mutagenesis* vol. 7 no.6 pp.433-437

Barrueco C., Herrera A., Caballa C., de la Peña E. (1994) The induction of structural chromosomal aberrations in human lymphocytes and CHO cells by permethrin. *Teratog. Carcinog. Mutag.* 14, 31-38

Bauchinger M., Schmid E., (1972) Chromosomenanalysen in Zellkulturen des Chinesischen Hamsters nach Applikation von Bleiacetat. *Mutation Res.* 14, 95-100

Bolognesi C., Parrini M., Merlo F., Bonassi S. (1993) Frequency of micronuclei in lymphocytes from a group of floriculturists exposed to pesticides. *J. Toxicol. Environ. Health* 40, 405-411

Caballo C., Herrera A., Barrueco C., Santa-Maria A., Sanz F., de la Pena E. (1992) Analysis of cytogenetic damage induced in CHO cells by the pyrethroid insecticide fenvalerate. *Teratog. Mutagen.* 12, 243-249

Carbonell E., Puig M., Xamena N., Creus A., Marcos R. (1989) Mitotic arrest induced by fenvalerate in human lymphocyte cultures. *Toxicol. Lett.* 45, 45-48

Casida J.E., Quistad G.B. (1998) Golden age of insecticide research: past, present, or future? *Annu. Rev. Entomol.* 43, 1-16

Casida J.E., Gammon D.W., Glickmann A.H., Lawrence L.J. (1983) Mechanisms of selective action of pyrethroid insecticides. *Ann. Rev. Pharmacol. Toxicol.* 23, 413-438

Chauhan L.K.S., Dikshith T.S.S., Sundararaman V. (1986) Effect of deltamethrin on plant cells. *Mutation Res.* 171, 25-30

Diel F., Schock B., Modi R., Schrimpf D., Mitsche T., Borck H., Diel E. (1995) Wirkung von Pyrethroide auf menschliche Lymphozyten in vitro. Umwelt und Gesundheit 3

Diel F. (1997) Immunotoxicologie der Pyrethroide. Umwelt und Gesundheit 3, 126-135

Elliot M., Janes N.F., Kimmel E.C., Casida J.E., (1972) Metabolic fate of pyrethrin I, pyrthrin II, and allethrin administred orally to rats. J. Agric. Food Chem. 20, 300-313

Fenech M., Morley A.A. (1985) Measurement of micronuclei in lymphocytes. Mutation Res. 147, 29-36

Ford D.K., Tergorian G. (1958) Observation of the chromosomes of the chinese hamster cells in tissue culture. J. Natl. Canc. Inst., Bd 21, 393-425

Gammon D.W. (1985) The pyrethroid insecticides. Pestic. Sci. 27

Gandhi G., Chowdhury J.B., Sareen P.K., Shillon V.P.S. (1995) Genotoxic effects of deltamethrin in the mouse bone marrow micronucleus assay. Mutation Res. 346, 203-206

Giri S., Sharma G.D., Giri A., Prasad S.B. (2002) Fenvalerat-induced chromosome aberrations and chromatid exchanges in the bone marrow cells of mice in vivo. Mutation Res. 520, 125-132

He F., Sun J., Han K., Wu Y., Yao P. (1988) Effects of pyrethroid insecticides on subjects engaged in packaging pyrethroids. *Br. J. Ind. Med.* 45, 548-551

He F., Wang S., Liu L., Chen S., Zhang Z., Sun J. (1989) Clinical manifestation and diagnosis of acute pyrethroid poisoning. *Arch. Toxicol.* 63, 54-58

Hofman G.R., Dellarco V.L., Voytek P.E. (1986) A review of the symposium on aneuploidy: etiology and mechanisms. *Environ. Mutagen.* 8, 643-651

Hollstein M., McCann J., Angelosanto F.A., Nichols W.W. (1979) Short-term tests for carcinogens and mutagens. *Mutation Res.* 65,133-226

Hsu T.C., Liang J.C., Satya-Prakash K.L. (1986) cytogenetic assays for mitotic poisons using somatic animal cells. *Chemical Mutagens, Principles and Methods for their Detection*, Volumen 10, Plenum Press New York and London, 155-181 edited by Frederick J.D. Serres

IARC (1991) IARC Monograph on the Evaluation of Carcinogenic Risks to Humans. Vol. 53: Occupational Exposures in Insecticide Application, and some Pesticides. Lyon, France

Jäger-Mischke I., Wollny V.(1988) Pyrethrum und Pyrethroide. Ein Beitrag zur Naturstoffdiskussion. Werkstattreihe Nr. 50, Öko-Institut, Freiburg

Jaques Y.G., Romey M., Cavey T., Kartallowski B., Lazdunski M. (1980) Interaktion of pyrethroids with the Na⁺ channel in mammalian neuronal cells in culture. *Biochem. Biophys. Acta* 600, 882-897

Kerkfliet N.I., Baecher-Steppan L., Schmitz J.A., (1982) Immunotoxicity of pentachlorophenol (PCP): increased sustibility to tumor growth in adult mice fed technical PCP-contaminated diets. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* 62, 55-64

Kühn K.-H., Leng G., Bucholski K.A., Dunemann L., Idel H. (1996) Determiation of pyrethroid metabolites in human urine by capillary gas chromatography-mass spectrometry. *Chromatographia* 43, 285-292

Kühn K.-H., Wieseler B., Leng G., Idel H. (1998) Toxicokinetics of pyrethroids in humans: Consequences for biological monitoring. *Bull. Environ. Contam. Toxicol.* 62, 101-108

Leng G., Kühn K.H., Dunemann L., Idel H. (1996) Gas chromatography an Mass Spectrometric Method for the Determiation of Selected Pyrethroid Metabolites in Urine. *Zentralbl-Hyg-Umweltmed.* 198, 443-451

Leng G., Kühn K.H., Idel H. (1997) Biological monitoring of pyrethroids in blood and pyrethroids metabolites in urine: applications and limitations. *Sci. Total Environ.* 199, 173-181

Leng G. (1998) Neue Erkenntnisse über Toxikologie und Metabolismus von Pflanzenschutz- und Schädlingsbekämpfungsmitteln. Arbeitsmedizin Sozialmedizin Umweltmedizin. 33. J., Heft 5, 212-218

Levan A. (1954) Colchicine-induced C-Mitosis in two mouse ascites tumours. Hereditas 40, 1-64

Liang J.G., Hsu T.C., Henry J.E. (1983) Cytogenetic assays for mitotic poisons. The grasshopper embryo system for volatile liquids. Mutation Res. 113, 467-79

Liang J.G., Brinkley B.R. (1985) Chemical probes and possible targets for the induction of aneuploidy. Basic Life Sci. 36, 491-505

Matsumoto K., Ohta T. (1991) Rotenone induces aneuploidy, polyploidy and endoreduplication in cultured Chinese hamster cells. Mutation Res. 263, 173-177

Matsuo M. (1989) Toxicological study on pyrethroid insecticides for household use. Aerosol Age 1, 37

Melnick R.L., Kohn M.C., Portier C.J. (1996) Implications for risk assessment of suggested nongenotoxic mechanisms of chemical carcinogenesis. Environ. Health Perspect. 1004 (Suppl. 1), 123-134

Mersch-Sundermann V. (1995) Chemische Faktoren, Teil 5, Pestizide-Pyretroide, Umweltmedizin 1-25

Miller B.M. and Adler I.-D. (1989) Suspect spindle poisons: induction of c-mitotic effects in mouse bone marrow cells. *Mutagenesis* 4, 2008-215

Narahashi T. (1982) Nerve membrane sodium channels as the major target site of pyrethroids and DDT. *Proc. 5 th Int. Cong. Pestic. Chem., Kyoto*, pp. 109-114

Önfelt A. (1987) Spindle disturbances in mammalian cells.III. Toxicity, c-mitosis and aneuploidy with 22 different compounds. Specific and unspecific mechanisms. *Mutation Res.*182,135-154

Oshimura M., Barrett C. (1986) Chemically induced aneuploidy: mechanism and biological significance in cancer. *Environ. Mutagen.* 8, 129-159

Páldy A., Puskás n., Vincze K., Hadházi M. (1987) Cytogenetic studies on rural populations exposed to pesticides. *Mutation Res.* 187, 127-132

Parry E.M. (1985) Test for effects on mitosis and the mitotic spindle in Chinese hamster primary liver cells (CH1-L) in culture. Ashby J., de Serres F.J. et al. (Eds) *Progress in Mutation Res.* 3, 479-485

Perger G., Szadkowski D. (1994) Wirkungsweise und Toxikologie von Pyrethroiden mit besonderer Berücksichtigung des berufsbedingten Expositionsrisikos. *Deutsches Ärzteblatt* 91, Heft 15, (39)

Puig M., Carbonell E., Xamena N., Creus A., Marcos R. (1989) Analysis of cytogenetic damage induced in cultured human lymphocytes by pyrethroid insecticides cypermethrin and fenvalerat. *Mutatgenesis* 4, 72-74

Pluijmen M., Devron C., Montesano R., Malaveille C., Hautefeuille A., Bartsch H. (1994) Lack of mutagenicity of synthetic pyrethroids in *Salmonella typhimurium* strains and V79 Chinese hamster cells. *Mutation Res.* 137, 7-15

Ryu J.-C., Kim K.-R., Kim H.-J., et al (1996) Evaluation of the genetic toxicity of synthetic chemicals (II), a pyrethroid insecticide, fenpropathrin. *Arch. Pharmacol. Res.* 19, 251-257

Schmid E., Bauchinger M., Ziegler-Skylakakis X., Andrae U. (1989) Chlorobenzylidene (CS) causes spindle disturbances in V79 Chinese hamster cells. *Mutation Res.* 226, 133-136

Schmid E., Bauchinger M. (1976) The cytogenetic effect of an X-ray contrast medium in Chinese hamster cell cultures. *Mutation Res.* 34, 291-298

Surrallés J., Carbonell E., Puig M., Xamena N., Creus A., Marcos R. (1990) Induction of mitotic micronuclei by the pyrethroid insecticide fenvalerate in cultured human lymphocytes. *Toxicol. Lett.* 54, 151-155

Surrallès J., Xamena N., Creus A., Marcos R. (1995) The suitability of the micronucleus assay in human lymphocytes as a new biomarker of excision repair. *Mutation Res.* 342, 43-59

Surrallès J., Xamena N., Creus A., Catalán J., Norppa H., Marcos R. (1995) Induction of micronuclei by five pyrethroid insecticides in whole-blood and isolated human lymphocyte cultures. *Mutation Res.* 341, 169-184

Tippe A. (1993) Sind Pyrethroide unbedenklich? Zur Bewertung experimenteller Befunde. *Zbl. Hyg.* 194, 342-359

Villarini M., Moretti M., Pasquini R., Scassellati-Sforzolini G., Fatigoni C., Marcarelli M., Monarca S., Rodriguez A.V. (1998) In vitro genotoxic effects of the insecticide deltamethrin in human peripheral blood leukocytes: DNA damage ("comet" assay) in relation to the induction of sister-chromatid exchanges and micronuclei. *Toxicol.* 130, 129-139

Wegerhoff R. (1996) Pyrethroide: Unbedenkliche Insektizide? Produkt- und Umwelthaftpflicht international PHi 3/96, 94-97

Weisburger J.H., Williams G.M. (1981) Carcinogen testing: Current problems and new approaches. *Science* 214, 401-407

Williams G.M., Weisburger J.H. (1986) Food and cancer: cause and effect? *Surg. Clin. North Am.* 66, 873-889

Vignani R., Milanese C., Di Simplicio P. (1992) Disruption of cytoskeleton by methylmercury in cultured CHO cells. *Toxic. in Vitro* 6, 61-70

Anhang/ Tabellen

1. Mitoseindex der humanen Lymphozyten
2. Abnormale Mitosen bei Lymphozyten
3. V79 Koloniebildung
4. Mitoseprofilstudien V79

Mitoseindex der humanen Lymphozyten

Substanz	transf. Zellen	Mitosen	Substanz	transf. Zellen	Mitosen	Substanz	transf. Zellen	Mitosen	Substanz	transf. Zellen	Mitosen	Substanz	transf. Zellen	Mitosen
Kontrolle	987	13	Kontrolle	991	9	Kontrolle	996	4	Kontrolle	990	10	Kontrolle	996	4
	987	13		994	6		992	8		992	8			
	990	10		995	5		990	10		992	8			
	991	9		989	11		992	8		990	10			
	985	15		991	9		988	12		990	10			
DMSO 25 µl / 5 ml	985	15	DMSO 25 µl / 5 ml	990	10	DMSO 25 µl / 5 ml	991	9	DMSO 25 µl / 5 ml	992	8	DMSO 25 µl / 5 ml	992	8
	993	7		990	10		989	11		995	5			
	986	14		986	14		993	7		988	12			
	895	105		944	56		938	62		805	195			
	893	107		879	121		858	142		833	167			
Colcemid 100 µl / 5 ml	880	120	Colcemid 100 µl / 5 ml	866	134	Colcemid 100 µl / 5 ml	846	154	Colcemid 100 µl / 5 ml	909	91	Colcemid 100 µl / 5 ml	921	79
	904	96		883	117		872	128		844	156			
	986	14		984	16		988	12		886	14			
	988	12		988	12		986	14		983	17			
	993	7		984	16		990	10		994	6			
Cyfluthrin 50 µg / ml	991	9	Deltamethrin 99% 50 µg / ml	992	8	Fenvalerat 50 µg / ml	991	9	Cypermethrin 91% Dr. E. 50 µg / ml	989	11	Permethrin 97% 50 µg / ml	995	5
	988	12		990	10		991	9		988	12			
	990	10		988	12		988	12		993	7			
	990	10		988	12		988	12		995	5			
	982	18		989	11		993	7		988	12			
Cyfluthrin 25 µg / ml	986	14	Deltamethrin 99% 25 µg / ml	992	8	Fenvalerat 25 µg / ml	991	9	Cypermethrin 91% Dr. E. 25 µg / ml	991	9	Permethrin 97% 25 µg / ml	997	3
	990	10		992	8		989	11		991	9			
	991	9		989	11		989	11		991	9			
	991	9		989	11		989	11		991	9			
	988	12		988	12		988	12		988	12			
Cyfluthrin 12,5 µg / ml	991	9	Phenoxylbenzoesäure 12,5 µg / ml	989	11	Fenvalerat 99,10% 12,5 µg / ml	988	12	Cypermethrin 91% Dr. E. 12,5 µg / ml	990	10	Permethrin 97% 12,5 µg / ml	991	9
	988	12		989	11		988	12		988	12			
	988	12		988	12		988	12		988	12			
	987	13		985	15		987	13		988	12			
	992	8		987	13		983	17		988	12			
Cyfluthrin 92% 6,25 µg / ml	987	13	Deltamethrin 99% 6,25 µg / ml	985	15	Fenvalerat 99,10% 6,25 µg / ml	994	6	Cypermethrin 91% Dr. E. 6,25 µg / ml	990	10	Permethrin 97% 6,25 µg / ml	996	4
	992	8		989	11		994	6		987	13			
	985	15		987	13		987	13		991	9			
	993	7		988	12		987	13		992	8			
	989	11		984	16		990	10		994	6			
Cyfluthrin 92% 3,13 µg / ml	988	12	Phenoxylbenzoesäure 3,13 µg / ml	985	15	Fenvalerat 99,10% 3,13 µg / ml	988	12	Cypermethrin 91% Dr. E. 3,13 µg / ml	991	9	Permethrin 97% 3,13 µg / ml	993	7
	989	11		985	15		985	15		988	12			
	989	11		985	15		985	15		988	12			
	989	11		985	15		985	15		988	12			
	989	11		985	15		985	15		988	12			

Abnormale Mitosen bei humanen Lymphozyten

GRUPPE/ SUBSTANZ	NORM. MITO.	ABNORM. MITOSEN	C- MITO.	PART. MITOSEN	GRUPPE/ SUBSTANZ	NORM. MITO.	ABNORM. MITOSEN	C- MITO.	PART. MITOSEN	GRUPPE/ SUBSTANZ	NORM. MITO.	ABNORM. MITOSEN	C- MITO.	PART. MITOSEN
101	93	7	4	3	201	92	8	6	2	301	91	9	4	5
Kontrolle	90	10	6	4	Kontrolle	91	9	7	2	Kontrolle	96	4	4	0
	96	4	2	2		90	10	6	4		92	8	8	0
	94	6	5	1		91	9	9	0		93	7	7	0
102	95	5	3	2	202	88	12	10	2	302	95	5	5	0
DMSO	90	10	7	3	DMSO	94	6	4	2	DMSO	96	5	5	0
25 µl / 5ml	90	10	9	1	25 µl / 5 ml	92	8	8	0	25 µl / 5 ml	92	8	7	1
	94	6	4	2		92	8	8	0		94	6	6	0
103	0	100	100	0	203	0	100	100	0	303	0	100	100	0
Colcemid	1	99	99		Colcemid	0	100	100	0	Colcemid	3	97	97	0
100 µl / 5 ml	0	100	100	0	100 µl / 5 ml	1	99	99	0	100 µl / 5 ml	1	99	99	0
	0	100	100	0		0	100	99	0		2	98	98	0
104	92	8	4	4	204	88	12	9	3	304	92	8	6	2
Cyfluthrin	87	13	7	6	Deltamethrin	88	12	10	2	Phenoxybenzoesäure	94	6	5	1
92%	88	12	10	2	99%	91	9	9	0	50 µg / ml	92	8	8	0
50 µg / ml	96	4	4	0	50 µg / ml	96	4	4	0		95	5	5	0
105	90	10	8	2	205	85	15	15	0	305	90	10	10	9
Cyfluthrin	89	11	6	5	Deltamethrin	91	9	6	3	Phenoxybenzoesäure	95	5	5	0
92%	92	8	7	1	99%	87	13	13	0	25 µg / ml	93	7	7	0
25 µg / ml	88	12	9	3	25 µg / m	93	7	3	4		94	6	6	0
106	93	7	3	4	206	93	7	3	4	306	92	8	8	0
Cyfluthrin	92	8	8	0	Deltamethrin	95	5	5	0	Phenoxybenzoesäure	91	9	9	0
92%	96	4	2	2	99%	90	10	7	3	12,5 µg / ml	93	7	7	0
12,5 µg / ml	94	6	5	1	12,5 µg / ml	95	5	3	2		97	3	3	0
107	93	7	5	2	207	96	4	3	1	307	97	3	3	0
Cyfluthrin	93	7	7	0	Detamethrin	94	6	4	2	Phenoxybenzoesäure	95	5	5	0
92%	91	9	7	2	99%	95	5	5	0	6,25 µg / ml	94	6	6	0
6,25 µg / ml	95	5	4	1	6,25 µg / ml	96	4	2	2		95	5	5	0
108	97	3	3	0	208	96	4	2	2	308	95	5	5	0
Cyfluthrin	96	4	2	2	Deltamethrin	96	4	2	2	Phenoxybenzoesäure	96	4	4	0
92%	95	5	2	3	99%	95	5	5	0	3,13 µg / ml	95	5	5	0
3,13 µg / ml	98	2	2	0	3,13 µg / ml	95	5	5	0		97	3	3	0

GRUPPE/ SUBSTANZ	NORM. MITO.	ABNORM. MITOSEN	C- MITO.	PART. MITOSEN	GRUPPE/ SUBSTANZ	NORM. MITO.	ABNORM. MITOSEN	C- MITO.	PART. MITOSEN	GRUPPE/ SUBSTANZ	NORM. MITO.	ABNORM. MITOSEN	C- MITO.	PART. MITOSEN
401 Kontrolle	94	6	5	1	501	90	10	10	0	601	92	8	6	2
	90	10	7	3	Kontrolle	93	7	7	0	Kontrolle	89	11	9	2
	91	9	6	3		92	8	6	2		90	10	10	0
	93	7	7	0		89	11	7	4		93	7	7	0
402 DMSO 25 µl / 5 ml	95	5	3	2	502	93	7	7	0	602	94	6	3	3
	91	9	8	1	DMSO	90	10	10	0	DMSO	91	9	6	3
	89	11	9	2	25 µl / 5 ml	90	10	10	0	25 µl / 5 ml	90	10	10	0
	92	8	6	2		94	6	6	0		91	9	6	3
403 Colcemid 100 µl / 5 ml	0	100	100	0	503	0	100	100	0	603	1	99	99	0
	0	100	100	0	Colcemid	0	100	100	0	Colcemid	2	98	98	0
	4	96	96	0	100 µl / 5 ml	2	98	98	0	100 µl / 5 ml	1	99	99	0
	1	99	99	0		2	98	98	0		4	96	96	0
404 Fenvalerat 99,10% 50 µg / ml	94	6	3	3	504	85	15	10	5	604	89	11	7	4
	92	8	4	4	Cypermethrin	89	11	11	0	Permethrin	85	15	9	6
	98	2	2	0	91% Dr. E.	89	11	11	0	97%	90	10	10	0
	92	8	6	2	50 µg / ml	93	7	7	0	50 µg / ml	92	8	8	0
405 Fenvalerat 99,10% 25 µg / ml	90	10	10	0	505	82	18	10	8	605	83	17	9	8
	91	9	9	0	Cypermethrin	89	11	5	6	Permethrin	88	12	6	6
	89	11	11	0	91% Dr. E.	91	9	7	2	97%	91	9	9	0
	96	4	4	0	25 µg / ml	92	8	4	4	25 µg / ml	91	9	9	0
406 Fenvalerat 99,10% 12,5 µg / ml	95	5	4	1	506	91	9	7	2	606	87	13	6	7
	94	6	6	0	Cypermethrin	89	11	10	1	Permethrin	89	11	9	2
	97	3	2	1	91% Dr. E.	96	4	4	0	97%	91	9	9	0
	95	5	3	2	12,5 µg / ml	92	8	6	2	12,5 µg / ml	88	12	10	2
407 Fenvalerat 99,10% 6,25 µg / ml	95	5	5	0	507	96	4	4	0	607	91	9	9	0
	94	6	5	1	Cypermethrin	98	2	2	0	Permethrin	92	8	8	0
	96	4	2	2	91% Dr. E.	90	10	10	0	97%	93	7	7	0
	95	5	4	1	6,25 µg / ml	96	4	3	1	6,25 µg / ml	90	10	10	0
408 Fenvalerat 99,10% 3,13 µg / ml	93	7	3	4	508	91	9	6	3	608	91	9	9	0
	95	5	3	2	Cypermethrin	97	3	3	0	Permethrin	94	6	5	1
	95	5	3	2	91% Dr. E.	96	4	2	2	97%	93	7	5	2
	89	11	5	6	3,13 µg / ml	97	3	1	2	3,13 µg / ml	95	5	4	1

V79 Koloniebildung

Schadstoff	Kolonien	Schadstoff	Kol.	Schadstoff	Kol.	Schadstoff	Kol.	Schadstoff	Kol.	Schadstoff	Kol.	Schadstoff	Kol.	Schadstoff	Kol.
Fenvalerat 99,1 %	n	Deltamethrin 99 %	n	Permethrin 97 %	n	Cyfluthrin	n	Phenoxybenzoessäure	n	Cypermethrin 99% Dr. Ehrenstorfer	n	Cypermethrin 91% Dr. Ehrenstorfer	n	Cypermethrin 99% Promochem	n
100 µg/ml	106	100 µg/ml	105	100 µg/ml	0	100 µg/ml	0	100 µg/ml	0	100 µg/ml	46	100 µg/ml	0	100 µg/ml	0
	94	100 µg/ml	107	100 µg/ml	0	100 µg/ml	0	100 µg/ml	0	100 µg/ml	30	100 µg/ml	0	100 µg/ml	0
	90		98		0		0		0		46		0		0
	100		97		0		0		0		51		0		0
50 µg/ml	114	50 µg/ml	115	50 µg/ml	0	50 µg/ml	0	50 µg/ml	4	50 µg/ml	68	50 µg/ml	4	50 µg/ml	6
	112	50 µg/ml	134	50 µg/ml	0	50 µg/ml	0	50 µg/ml	7	50 µg/ml	66	50 µg/ml	2	50 µg/ml	4
	111		109		0		0		6		85		7		4
	108		138		0		0		4		63		3		2
25 µg/ml	113	25 µg/ml	129	25 µg/ml	0	25 µg/ml	0	25 µg/ml	41	25 µg/ml	113	25 µg/ml	8	25 µg/ml	16
	131	25 µg/ml	139	25 µg/ml	0	25 µg/ml	0	25 µg/ml	45	25 µg/ml	92	25 µg/ml	8	25 µg/ml	24
	125		144		0		0		75		98		10		24
	137		131		0		0		56		106		12		31
12,5 µg/ml	133	12,5 µg/ml	156	12,5 µg/ml	3	12,5 µg/ml	3	12,5 µg/ml	115	12,5 µg/ml	148	12,5 µg/ml	66	12,5 µg/ml	88
	142	12,5 µg/ml	148	12,5 µg/ml	3	12,5 µg/ml	3	12,5 µg/ml	139	12,5 µg/ml	146	12,5 µg/ml	66	12,5 µg/ml	88
	138		115		4		4		127		150		76		84
	122		123		1		1		139		136		76		91
6,25 µg/ml	138	6,25 µg/ml	141	6,25 µg/ml	Pliz	Pliz	Pliz	6,25 µg/ml	142	6,25 µg/ml	134	6,25 µg/ml	96	6,25 µg/ml	102
	129	6,25 µg/ml	140	6,25 µg/ml	43	6,25 µg/ml	43	6,25 µg/ml	142	6,25 µg/ml	139	6,25 µg/ml	101	6,25 µg/ml	102
	133		143		48		48		144		131		91		107
	139		142		31		31		133		139		99		111
DMSO	125	DMSO	127	DMSO	107	DMSO	107	DMSO	125	DMSO	127	DMSO	99	DMSO	99
25 µl / 5ml	143	25 µl / 5ml	140	25 µl / 5ml	112	25 µl / 5ml	112	25 µl / 5ml	143	25 µl / 5ml	140	25 µl / 5ml	94	25 µl / 5ml	94
	134	25 µl / 5ml	136	25 µl / 5ml	110	25 µl / 5ml	110	25 µl / 5ml	134	25 µl / 5ml	136	25 µl / 5ml	88	25 µl / 5ml	88
	115		150		106		106		115		150		108		108
Zellkultur	142	Zellkultur	152	Zellkultur	108	Zellkultur	108	Zellkultur	123	Zellkultur	152	Zellkultur	99	Zellkultur	99
	138	Zellkultur	144	Zellkultur	116	Zellkultur	116	Zellkultur	136	Zellkultur	144	Zellkultur	99	Zellkultur	99
	157		157		116		116		140		157		97		97
	115		137		103		103		132		137		96		96

MITOSEPROFIL V79

Substanz/Gruppe	Interphase-Zellen	Mitosen	Mitoseindex %	Prophase	Prophase %	Metaphase	Metaphase %	Anaphase	Anaphase %	Telophase	Telophase %	Ana+Telophase
101 Kontrolle	951	49	4,9	6	12	23	46	11	22	10	20	21
	947	53	5,3	10	20	27	54	10	20	3	6	13
	950	50	5,0	8	16	19	38	11	22	12	24	23
	943	57	5,7	7	14	24	48	11	22	8	16	19
	807	193	19,3	0	0	50	100	0	0	0	0	0
102 Colcemid 100 µl / 5 ml	850	150	15,0	0	0	50	100	0	0	0	0	0
	835	165	16,5	0	0	50	100	0	0	0	0	0
	847	153	15,3	0	0	50	100	0	0	0	0	0
103 DMSO 25 µl / 5 ml	937	63	6,3	11	22	22	44	10	20	7	14	17
	943	57	5,7	11	22	31	62	2	4	6	12	8
	944	56	5,6	9	18	27	54	11	22	3	6	14
	943	57	5,7	6	12	25	50	18	36	1	2	19
	916	84	8,4	5	10	45	90	0	0	0	0	0
104 Cypermethrin Dr.E. 91% 50 µg/ml	935	65	6,5	3	6	47	94	0	0	0	0	0
	905	95	9,5	4	8	46	92	0	0	0	0	0
	930	70	7,0	2	4	48	96	0	0	0	0	0
	946	54	5,4	1	2	49	98	0	0	0	0	0
	925	75	7,5	3	6	47	94	0	0	0	0	0
105 Cypermethrin Dr.E. 91% 25 µg/ml	938	62	6,2	1	2	49	98	0	0	0	0	0
	906	94	9,4	2	4	48	96	0	0	0	0	0
	934	66	6,6	7	14	42	84	1	2	0	0	1
	927	73	7,3	3	6	43	86	4	8	0	0	4
	931	69	6,9	6	12	41	82	3	6	0	0	3
106 Cypermethrin Dr.E. 91% 12,5 µg/ml	935	65	6,5	8	16	42	84	0	0	0	0	0
	970	30	3,0	6	12	33	66	10	20	1	2	11
	959	41	4,1	5	10	41	82	4	8	0	0	4
	948	52	5,2	3	6	41	82	5	10	1	2	6
	958	42	4,2	3	6	33	66	12	24	2	4	14
108 Cypermethrin P. 99% 50 µg/ml	937	63	6,3	1	2	48	96	1	2	0	0	1
	918	82	8,2	0	0	50	100	0	0	0	0	0
	921	79	7,9	3	6	45	90	2	4	0	0	2
	923	77	7,7	4	8	45	90	1	2	0	0	1
	942	58	5,8	2	4	48	96	0	0	0	0	0
109 Cypermethrin P. 99% 25 µg/ml	919	81	8,1	2	4	48	96	0	0	0	0	0
	947	53	5,3	5	10	41	82	4	8	0	0	4
	957	43	4,3	2	4	45	90	3	6	0	0	3
	929	71	7,1	4	8	43	86	3	6	0	0	3
	940	60	6,0	5	10	41	82	4	8	0	0	4
110 Cypermethrin P. 99% 12,5 µg/ml	958	42	4,2	3	6	47	94	0	0	0	0	0
	945	55	5,5	0	0	48	96	2	4	0	0	2
	954	46	4,6	4	8	34	68	12	24	0	0	12
	961	39	3,9	3	6	36	72	8	16	3	6	11
	954	46	4,6	2	4	34	68	8	16	6	12	14
111 Cypermethrin P. 99% 6,25 µg/ml	955	45	4,5	8	16	39	78	3	6	0	0	3

Ana+Telophase %	AT/M	normale Meta.	normale Meta. %	abnorm.Meta.	abnorm. Meta. %	C-Meta.	C-Meta. %	Initiale C-Meta.	Initiale C-Meta. %	Cluster	Cluster %
42	0,91	20	87,0	3	13,0	0	0,0	0	0,0	3	13,0
26	0,48	25	92,6	2	7,4	1	3,7	0	0,0	1	3,7
46	1,21	19	100,0	0	0,0	0	0,0	0	0,0	0	0,0
38	0,79	24	100,0	0	0,0	0	0,0	0	0,0	0	0,0
0	0,00	2	4,0	48	96,0	48	96,0	0	0,0	0	0,0
0	0,00	0	0,0	50	100,0	50	100,0	0	0,0	0	0,0
0	0,00	0	0,0	50	100,0	50	100,0	0	0,0	0	0,0
0	0,00	0	0,0	50	100,0	50	100,0	0	0,0	0	0,0
34	0,77	22	100,0	0	0,0	0	0,0	0	0,0	0	0,0
16	0,26	31	100,0	0	0,0	0	0,0	0	0,0	0	0,0
28	0,52	27	100,0	1	3,7	1	3,7	0	0,0	0	0,0
38	0,76	25	100,0	0	0,0	0	0,0	0	0,0	0	0,0
0	0,00	15	33,3	30	66,7	20	44,4	10	22,2	0	0,0
0	0,00	8	17,0	39	83,0	26	55,3	11	23,4	2	4,3
0	0,00	11	23,9	35	76,1	23	50,0	11	23,9	1	2,2
0	0,00	8	16,7	40	83,3	25	52,1	13	27,1	2	4,2
0	0,00	16	32,7	33	67,3	17	34,7	13	26,5	3	6,1
0	0,00	10	21,3	37	78,7	21	44,7	16	34,0	0	0,0
0	0,00	8	16,3	41	83,7	23	46,9	14	28,6	4	8,2
0	0,00	9	18,8	39	81,3	26	54,2	13	27,1	0	0,0
2	0,02	11	26,2	31	73,8	13	31,0	16	38,1	2	4,8
8	0,09	11	25,6	32	74,4	12	27,9	20	46,5	0	0,0
6	0,07	17	41,5	24	58,5	11	26,8	12	29,3	1	2,4
0	0,00	15	35,7	27	64,3	12	28,6	14	33,3	1	2,4
22	0,33	27	81,8	6	18,2	4	12,1	2	6,1	0	0,0
8	0,10	34	82,9	7	17,1	6	14,6	0	0,0	1	2,4
12	0,15	37	90,2	4	9,8	1	2,4	2	4,9	1	2,4
28	0,42	30	90,9	3	9,1	1	3,0	2	6,1	0	0,0
2	0,02	8	16,7	40	83,3	27	56,3	11	22,9	2	4,2
0	0,00	5	10,0	45	90,0	28	56,0	16	32,0	1	2,0
4	0,04	14	31,1	31	68,9	23	51,1	8	17,8	0	0,0
2	0,02	6	13,3	39	86,7	25	55,6	14	31,1	0	0,0
0	0,00	16	33,3	32	66,7	18	37,5	14	29,2	0	0,0
0	0,00	12	25,0	36	75,0	21	43,8	13	27,1	2	4,2
8	0,10	17	41,5	24	58,5	12	29,3	12	29,3	0	0,0
6	0,07	5	11,1	40	88,9	25	55,6	15	33,3	0	0,0
6	0,07	15	34,9	28	65,1	11	25,6	17	39,5	0	0,0
8	0,10	14	34,1	27	65,9	10	24,4	17	41,5	0	0,0
0	0,00	25	53,2	22	46,8	10	21,3	12	25,5	0	0,0
4	0,04	34	70,8	14	29,2	5	10,4	9	18,8	0	0,0
24	0,35	32	94,1	2	5,9	1	2,9	1	2,9	0	0,0
22	0,31	36	100,0	0	0,0	0	0,0	0	0,0	0	0,0
28	0,41	32	94,1	2	5,9	1	2,9	1	2,9	0	0,0
6	0,08	34	87,2	5	12,8	3	7,7	2	5,1	0	0,0

Lebenslauf

Name : Barbara Stiller

Geburtsdatum/ -ort : 10. März 1969 in Düsseldorf

Schulbildung : 1989 Cecilien-Gymnasium, Düsseldorf
Allgemeine Hochschulreife

Hochschulbildung : 1989-1998 Heinrich-Heine Universität Düsseldorf,
Studiengang Humanmedizin

Praktisches Jahr : 1997-1998 Hôpital Necker, Université René
Descartes, Paris, Kinderchirurgie
Hôpital Boucicaut, Paris, Innere
Marienhospital, Düsseldorf
Wahlfach: Gynäkologie

Arzt im Praktikum: 01.04.1999 bis 30.09.2000
Plastische- und Handchirurgie
Katholische Kliniken Ruhrhalbinsel
Essen

Assistenzärztin : 15.11.2000 Allgemeinchirurgie
Elisabeth Krankenhaus
Akademisches Lehrkrankenhaus der
Universitätsklinik Essen

Zusatzausbildung : 1998 Schulung durch Fresenius GmbH,
München: Berechnung von Infusions-
therapie, Grundlagen der parenteralen
Ernährung, Umgang mit zentralen
Zugängen.

1996 Akupunktur, 140 Stunden Ausbildung
an der „Deutschen Akupunktur-
gesellschaft“, Düsseldorf

Düsseldorf, den 22.12.2003

Barbara Stiller