

# **Forschungsbericht über die Genetische Toxikologie von *Dequalinium Chloride***

erstellt von:

Prof. Dr. Rudolf Fahrig  
Krippener Str. 18b  
01259 Dresden

1. März 2021

## Inhaltsverzeichnis

|             |  |   |
|-------------|--|---|
| <i>I.</i>   | <i>Datenlage genetische Toxikologie</i>        |   |
| 1.          | Genmutationen <i>in vitro</i>                  | 3 |
| 1.1         | Salmonella-Mikrosomen (Ames)-Test              | 3 |
| 1.2         | HPRT-Test mit Säugerzellen in Kultur           | 3 |
| 2.          | Chromosomenaberrationen <i>in vitro</i>        | 4 |
| 2.1         | Chromosomenaberration menschlichen Lymphozyten | 4 |
| 3.          | Genmutationen <i>in vivo</i>                   | 5 |
| 3.1         | Spot Test mit Mäusen                           | 5 |
| <i>II.</i>  | <i>Wertung</i>                                 | 6 |
| <i>III.</i> | <i>Literatur</i>                               | 8 |

# Genetische Toxikologie von *Dequalinium Chloride*

## I. Datenlage

*Dequalinium Chloride*, eine Substanz aus der Gruppe der Ammoniumbasen, erfüllt die Aufgaben eines lokalen Desinfizienz (Vaginaltablette). *Dequalinium Chloride* ist in vier verschiedenen Mutagenitätstests (Fahrig, 1993) auf genetische Wirksamkeit hin untersucht worden. Im einzelnen handelt es sich um folgende Untersuchungen:

### 1. Genmutationen *in vitro*

#### 1.1 Salmonella-Mikrosomen (Ames)-Test

Im Ames-Test mit den Stämmen TA 98, 100, 1535, 1537 und 1538  $\pm$  S9-Mix wurde die mutagene Wirkung von *Dequalinium Chloride* geprüft. Untersucht wurden 0.5, 1, 5, 10, 25, 50, 100 und 250  $\mu\text{g}$ /Petrischale.

a) Die negativen und positiven Kontrollen ergaben Werte, die den historischen Kontrolldaten des Labors entsprachen.

b) *Dequalinium Chloride* war im Dosisbereich von 100 bis 250  $\mu\text{g}$ /Petrischale toxisch.

c) *Dequalinium Chloride* induzierte im Dosisbereich von 1 bis 250  $\mu\text{g}$ /Petrischale mit und ohne Aktivierungssystem in Stamm TA 1537 eine dosisabhängige Erhöhung der Anzahl von Mutantenkolonien. In den Stämmen TA 98 und TA 1538 wurde ein marginaler Anstieg festgestellt. In den Stämmen TA 100 und TA 1535 war kein Anstieg festzustellen.

d) *Dequalinium Chloride* kann als „frameshift“-Mutagen in *Salmonella typhimurium* klassifiziert werden.

#### 1.2. HPRT-Test mit V79 Zellen des Chinesischen Hamsters

*Dequalinium Chloride* wurde mit und ohne S9-Mix auf die Auslösung von Genmutationen getestet. Es wurde eine Cytotoxizität gemessen, jedoch keine mutagene Wirkung festgestellt.

a) Die negativen und positiven Kontrollen ergaben Werte, die den historischen Kontrolldaten des Labors entsprachen.

b) *Dequalinium Chloride* war fast unlöslich in Wasser oder DMSO. In Kulturmedium ohne DMSO konnte es leicht suspendiert und pipettiert werden. Bedenkt man jedoch, daß nur geringe Mengen von *Dequalinium Chloride* löslich waren und die Toxizität von *Dequalinium Chloride* die Verwendung geringer Dosen erforderte, dürften in einigen Fällen die kalkulierten Konzentrationen durchaus von den realen Konzentrationen abgewichen sein. Daher waren dosisunabhängige Fluktuationen in der „plating efficiency“ unvermeidlich.

c) Ein toxischer Effekt begann bei etwa 10 µg/ml. Die Zellen sahen geschädigt aus und die Koloniegröße war verkleinert gegenüber der Negativkontrolle. Dies war der Grund, die Konzentrationen nicht weiter zu erhöhen. Obwohl deshalb die „plating efficiency“ relativ hoch war, verhinderte die morphologisch sichtbare Wirkung der Zytotoxizität die Verwendung höherer Dosen.

d) *Dequalinium Chloride* verursachte mit und ohne S9-Mix im getesteten Konzentrationsbereich von 2.5 bis 25 µg/ml keine Erhöhung in der Anzahl von Mutantenkolonien im Vergleich zur Spontanhäufigkeit. Mit S9-Mix wurde *Dequalinium Chloride* von 5 bis 20 µg/ml getestet. Berücksichtigt man, daß die Fluktuationen der Mutationsraten eine dosisunabhängige Erhöhung und Erniedrigung gegenüber der spontanen Mutationsrate zeigten, besitzt die Erhöhung der Mutationsrate bei hohen Konzentrationen keine biologische Relevanz. Unterstützung findet diese Interpretation durch die klar negativen Resultate von 5 zusätzlich mit S9-Mix durchgeführten Experimenten. Entsprechend der hohen Mutationsrate der Negativkontrollen (> 30) wurden diese 5 Experimente dem Bericht nur als Zusammenfassung beigelegt. Bei Berücksichtigung aller Daten kann *Dequalinium Chloride* nur als nicht mutagen bezeichnet werden.

## **2. Chromosomenaberrationen *in vitro***

### **2.1 Chromosomenaberrationen in menschlichen Lymphozyten**

*Dequalinium Chloride* wurde mit und ohne S9-Mix auf die Auslösung von Chromosomenaberrationen untersucht. Die getesteten Konzentrationen waren:

4 Stunden Behandlung ohne S9-Mix:

0.125, 0.25, 0.50, 0.75, 1.0, 2.0, 4.0 µg *Dequalinium Chloride* /ml

4 Stunden Behandlung mit S9-Mix:

0.125, 0.25, 0.50, 0.75, 1.0, 2.0, 4.0 µg *Dequalinium Chloride* /ml

24 Stunden Behandlung ohne S9-Mix:

0.125, 0.25, 0.75 µg *Dequalinium Chloride* /ml

a) Die negativen und positiven Kontrollen ergaben Werte, die den historischen Kontrolldaten des Labors entsprachen.

b) *Dequalinium Chloride* war fast unlöslich in Wasser oder DMSO. In Kulturmedium ohne DMSO konnte es leicht suspendiert und pipettiert werden. Aber entsprechend der Tatsache, dass nur geringe Mengen von *Dequalinium Chloride* löslich waren und die Toxizität von *Dequalinium Chloride* die Verwendung geringer Dosen erforderte, dürften in einigen Fällen die kalkulierten Konzentrationen durchaus von den realen Konzentrationen abgewichen sein. Daher waren dosisunabhängige Fluktuationen im Mitoseindex, dem Maß der Toxizität, unvermeidlich.

c) *Dequalinium Chloride* induzierte keine Chromosomenaberrationen. Ein toxischer Effekt war schon von der geringsten Dosis an festzustellen. Als Maß für die toxische Wirkung diente der Mitoseindex. Obwohl teilweise im stark toxischen Bereich gearbeitet wurde und stark toxische Effekte durchaus zum Auftreten von Chromosomenaberrationen führen können, zeigte sich auch in diesem Konzentrationsbereich keine biologisch signifikante Erhöhung von Chromosomenaberrationen.

### **3. Genmutationen in vivo**

#### **3.1 Spot Test mit Mäusen**

*Dequalinium Chloride* wurde *in vivo* auf die Auslösung von Genmutationen und Rekombinationen untersucht. Der Spot Test wurde gewählt, da er die Erfassung von Mutagenen erlaubt, welche spezifisch Frameshift-Mutationen auslösen. Dies war eine notwendige Voraussetzung, da im Ames-Test gerade diese Art von Mutationen ausgelöst worden war und deshalb dieser Endpunkt *in vivo* verfolgt werden musste. Da *Dequalinium Chloride* bei peroraler Gabe praktisch nicht resorbiert wird, erfolgte die Verabreichung durch intraperitoneale Injektion.

a) Die positive Kontrollsubstanz (Ethylnitrosoharnstoff, ENU) und die Negativkontrolle (Wasser) ergaben Werte, die den historischen Daten des Labors entsprachen.

b) *Dequalinium Chloride* war fast unlöslich in Wasser oder DMSO. In Wasser konnte es leicht suspendiert und durch intraperitoneale Injektion verabreicht werden. Die hohe Toxizität von *Dequalinium Chloride* erlaubte nur die Verabreichung niedriger Dosen. Der lösliche Anteil von *Dequalinium Chloride* kann deshalb durchaus hoch gewesen sein, konnte jedoch nicht bestimmt werden.

c) Bei einer Dosis von 45 mg/kg (1 Tier) oder 50 mg/kg (2 Tiere) starben alle behandelten nicht trächtigen Weibchen innerhalb von 24 Stunden. Die toxische Wirkung von *Dequalinium Chloride* auf nicht trächtige Weibchen begann bei einer Dosis von 40 mg/kg. Eine von fünf mit dieser Dosis behandelten Weibchen starb innerhalb von 24 Stunden. Tiere, die mit 10, 20 oder 30 mg/kg behandelt waren, überlebten bei guter Gesundheit.

d) Auf trächtige Weibchen wirkte *Dequalinium Chloride* erheblich toxischer als auf nicht trächtige Weibchen. Von 6 Tieren, die mit 30 mg/kg behandelt waren, starben 4 innerhalb von 5 Minuten bzw. zwei Stunden, die übrigen zwei 4 Tage später. Von sieben mit 20 mg/kg behandelten Tieren mussten wegen ihres schlechten Gesundheitszustands nach sechs Tagen sechs abgetötet werden, und ein Tier starb nach 3 Tagen. Von 10 mit 10 mg/kg behandelten Tieren hatte nicht eins einen Wurf. Von 10 mit 7,5 mg/kg behandelten Tieren hatten vier einen Wurf, aber ein Drittel der Neugeborenen starb innerhalb von einigen Stunden. Ein Muttertier musste wegen ihres schlechten Gesundheitszustands abgetötet werden. Von 11 mit 5 mg/kg behandelten Tieren hatten 8 einen Wurf, dessen Größe mit der der Kontrolltiere vergleichbar war. Von 9 mit 1 mg/kg behandelten Tieren hatten sechs einen Wurf, dessen Größe mit der der Kontrolltiere vergleichbar war.

d) Entsprechend den Ergebnissen der Toxizitätstests wurde die in den Hauptversuchen zu verwendende Dosen auf 5 und 7 mg/kg festgesetzt. Weder 5 noch 7 mg/kg *Dequalinium Chloride* verursachte einen Anstieg in der Zahl der Fellflecken von genetischer Relevanz (SGR): 0,9 % Fleckenhäufigkeit unter 706 F<sub>1</sub>-Tieren (5 mg/kg) und 1,5 % Fleckenhäufigkeit unter 342 F<sub>1</sub>-Tieren (7 mg/kg) gegenüber 1,8 % Fleckenhäufigkeit unter 458 F<sub>1</sub>-Kontrolltieren. Bedenkt man, daß *Dequalinium Chloride* toxische Wirkung auf Muttertiere und Neugeborene ausübte und dass die Häufigkeit von gelben Missdifferenzierungssflecken und weißen, auf der Abtötung von Pigmentzellen beruhenden Bauchflecken gegenüber der Kontrolle erhöht war, so kann davon ausgegangen werden, daß *Dequalinium Chloride* die Zielzellen erreicht, aber weder mutagene noch rekombinogene Wirkung ausgeübt hat.

## II. Wertung

Bei der Untersuchung von *Dequalinium Chloride* wurden alle relevanten genetischen Endpunkte berücksichtigt. Einer absolut negativen Datenlage steht lediglich ein spezifischer mutagener *In vitro*-Effekt im Ames-Test entgegen: In einem Bakterienstamm wurden eine bestimmte Art von Genmutationen, Frameshift-Mutationen, ausgelöst. Die Relevanz dieses Ergebnisses wurde *in vivo* im Spot Test überprüft. Der Spot Test war deshalb ausgewählt worden, da er die Erfassung von Mutagenen erlaubt, welche spezifisch Frameshift-Mutationen auslösen (Fahrig, 1995). Dies war eine notwendige Voraussetzung für den Einsatz des Tests, da im Ames-Test gerade diese Art von Mutationen ausgelöst worden war und deshalb dieser Endpunkt auch verfolgt werden musste. Die Verfolgung dieses genetischen Endpunkts *in vivo* im Spot Test mit Mäusen brachte trotz Verabreichung toxischer Dosen (5 und 7 mg/kg) ein negatives Ergebnis. Da zuvor schon der HPRT-Test ein negatives Ergebnis gezeigt hatte, stehen der spezifischen Frameshift-induzierenden Wirkung von *Dequalinium Chloride* in Bakterien eindeutig negative Ergebnisse im Säuger *in vitro* und *in vivo* gegenüber.

Für die Relevanz der Ergebnisse im Spot Test und damit für die Wertung ist entscheidend, dass *Dequalinium Chloride* die Zielzellen in genügenden Konzentrationen erreicht, um eine Wirkung ausüben zu können. Bedenkt man, dass *Dequalinium Chloride* toxische Wirkung auf Muttertiere und Neugeborene ausübte und daß die Häufigkeit von gelben Misstdifferenzierungsflecken und weißen, auf der Abtötung von Pigmentzellen beruhenden Bauchflecken gegenüber der Kontrolle erhöht war, so kann davon ausgegangen werden, dass *Dequalinium Chloride* die Zielzellen erreicht, aber weder mutagene noch rekombinogene Wirkung ausgeübt hat.

Isoliert dastehenden positiven *In-vitro*-Befunden sollte von vornherein keine große Bedeutung beigemessen werden. Im vorliegenden Falle konnte gezeigt werden, dass eine mutagene Wirkung nur bei Bakterien und weder *in vivo* noch *in vitro* in Säugierzellen auftrat. Aus diesem Grunde kann dem Befund mit Bakterien keine Bedeutung für den Menschen beigemessen werden.

### ***III. Literatur***

Fahrig, R., Mouse spot test, in: Environmental Mutagenesis (ed. D.H. Phillips and S. Venitt), BIOS Scientific Publishers Oxford (1995) 181 - 200.

Fahrig, R., Mutationsforschung und genetische Toxikologie, Wissenschaftliche Buchgesellschaft, Darmstadt (1993) 1 - 444.

Fh-ITA Report Fa 95/1: *In vitro* Mammalian Cell HPRT-Test (V79 Chinese Hamster Cells) with Dequalinium Chloride (1995).

Fh-ITA Report Fa 95/2: Spot Test with Dequalinium Chloride (1995).

Fh-ITA Report 95/2 CM: In vitro cytogenetic test for the analysis of chromosomal aberrations in peripheral human lymphocytes (1995).

Fh-ITA Report G 95/2: Salmonella Mutagenicity Test with Dequalinium Chloride (1995).