

CHROMOSOMENUNTERSUCHUNGEN NACH DER EINWIRKUNG VON PRIMIDON (MYLEPSINUM[®]) UND SEINER ABBAUPRODUKTE PHENOBARBITAL UND PHENYLETHYLMALONDIAMIDE IN VITRO

DIETER FOERST

SUMMARY

Primidone and its metabolites Phenobarbital and Phenylethylmalondiamide were tested in cultures of human lymphocytes on possible effects of inducing chromosome aberrations. The substances examined ranged from concentrations lower than the therapeutic serum level to 10-75 times this value, which differed with the various substances. Phenylethylmalondiamide shows, besides an increase of spiralization defects at higher concentrations, which was typical for all three substances, no reaction on the chromosome structure.

By using the Friedman-test a statistically significant difference ($P < 5\%$) could be found between the average aberration rates of the controls and the cultures which had been treated with Primidone and Phenobarbital. The test according to Wilcoxon and Wilcox shows that there is a statistically significant ($P < 5\%$) difference between the aberration rates of controls and the respectively treated cultures. The higher values for percentage of aberrant mitoses are caused by the increase of gaps and breaks. There was, however, no proof for a linear dependence of the percentage of aberrant mitoses on the increasing concentrations of the substances. The number of tetraploid mitoses, endoreduplications and hyperploid cells was within the normal range.

Since in these investigations the number of chromosome exchanges was not increased, it can certainly be said that Primidone and Phenobarbital are not highly mutagenic substances.

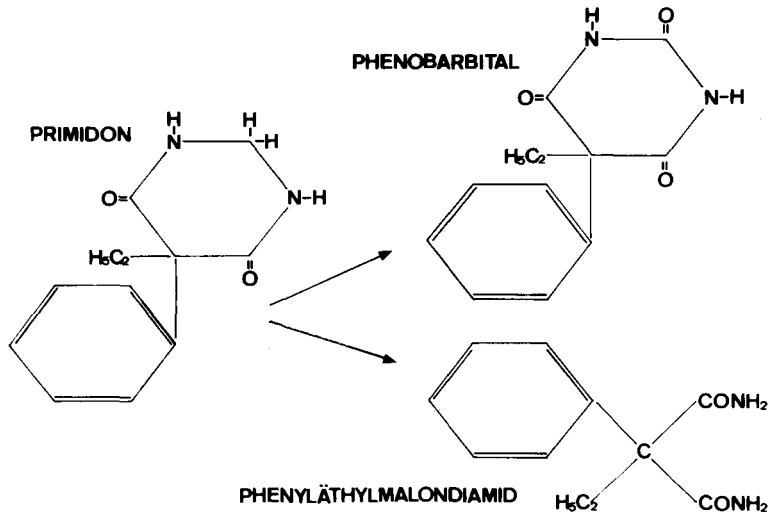
EINLEITUNG

Untersuchungen über die aberrationsauslösende Wirkung von Medikamenten auf menschliche Chromosomen ergaben, daß Patienten, die unter Antikonvulsiva-therapie stehen, eine erhöhte Aberrationsrate an den Chromosomen aus Lymphozytenkulturen aufweisen. Arzneimittel dieser Gruppe können bei Schwangeren dia-plazentar die gleiche Wirkung auf die Lymphozyten des Blutes der Kinder ausüben (Ayraud 1968, Neuhäuser et al. 1970, Große et al. 1972).

Da in der Regel Antikonvulsiva nicht in Monotherapie verabreicht werden, war es bisher anhand des untersuchten Patientengutes nicht möglich, nachzuweisen, ob allen oder nur einigen der in Frage kommenden Medikamente eine Aberrationen auslösende Wirkung zuschreiben ist. Dabei wäre es auch von großer Bedeutung herauszufinden, welche Typen von Aberrationen durch die verschiedenen Medikamente der Antikonvulsiva-Gruppe induziert werden. Es wurden daher in vitro Versuche mit dem häufig verordneten Präparat Mylepsinum[®] (Primidon) und seinen, durch den Metabolismus im Körper entstehenden Hauptabbauprodukten, durchgeführt.

MATERIAL UND METHODE

Primidon (5-äthyl-5-phenyl-hexahydropyrimidin-4,6-dion) und seine beiden Abbauprodukte Phenobarbital (5-äthyl-5-phenyl-barbitursäure; Butler und Waddell 1956) und Phenyläthylmalondiamid (Bogue und Carrington 1952) wurden untersucht, um festzustellen, ob diese Substanzen die Fähigkeit besitzen, in menschlichen Zellkulturen Chromosomenaberrationen zu induzieren.¹



Als Testsystem dienten Kulturen von Lymphozyten aus dem peripheren Blut gesunder Blutspender, angesetzt nach der geringfügig modifizierte Methode von Moorhead et al. (1960).

Jeder Kulturansatz bestand aus 18 Tropfen Vollblut, 2 ml fetalem Kälberserum und 0.2 ml Phytohämagglutininlösung. Die Mediummenge (TC 199, Difco) war bei den Kontrollen und niederen Konzentrationen 6 ml, bei höheren Konzentrationen wurde mit weniger Medium angesetzt und erst später, durch Zugabe der entsprechenden Testlösungen, auf 6 ml ergänzt.

Die Kulturdauer betrug immer 72 Stunden, die Einwirkungszeit der Agentien 24 bzw. 72 Stunden, d.h. sie wurden entweder sofort beim Ansetzen oder 24 Stunden vor dem Aufbereiten den Kulturen zugegeben. Zwei Stunden vor dem Ende der Kulturdauer wurde jeder Ansatz mit 0.2 ml einer 0.02 prozentigen Colcemidlösung versetzt.

Die Fixierung erfolgte in Eisessig-Äthanol (1 : 3); die luftgetrockneten Präparate wurden in Orcein-Eisessig gefärbt.

Das gleiche penicillinhaltige Medium, das zum Ansetzen der Kulturen Verwendung fand, war auch das Lösungsmittel für alle drei Agentien. Die Stammlösungen sind jeweils kurzfristig vor der Zugabe zu den entsprechenden Kulturansätzen frisch hergestellt worden (Pippenger und Gillen 1969).

¹ Die entsprechenden Substanzen hatte die Firma Rhein-Pharma freundlicherweise zur Verfügung gestellt.

Den verwendeten Konzentrationen der Wirksubstanzen lagen als Richtwerte die entsprechenden Serumspiegel bei therapeutischer Dosierung von Primidon zugrunde.

Für Primidon liegt der optimale Serumspiegel nach Booker et al. (1970) und Olesen und Dam (1967) zwischen 10-15 mg/l. Die Konzentrationen von Primidon variierten in der vorliegenden Versuchsanordnung zwischen 2.5-375 mg/l.

Der toxische Serumspiegel für Phenobarbital wird von Livingston (1966) mit 50 mg/l angegeben. Plaa et al. (1958) berichten über Intoxikationen durch Phenobarbital bei Patienten, die u.a. auch mit Primidon behandelt wurden und Phenobarbitalkonzentrationen zwischen 40-58 mg/l im Serum aufwiesen. Als durchschnittliche Konzentration von Phenobarbital im Serum mit Primidon behandelter Patienten dürfte, unter Berücksichtigung mehrerer Autoren, ein Wert zwischen 30-45 mg/l angenommen werden. Daher wurde in dieser Arbeit mit Konzentrationen von 22.4-388 mg/l gearbeitet.

Für Phenyläthylmalondiamid liegt nach Goodman et al. (1953) der Serumspiegel niedriger als für Primidon, da es eine höhere Toxizität besitzt. In den Lymphozytenkulturen unserer entsprechenden Versuche lagen die Konzentrationen zwischen 13.9-750 mg/l.

Es wurde, wie gerade ausführlich beschrieben, für jede der getesteten Substanzen eine große Konzentrationsbreite untersucht. Für die Reaktion der Agentien mit den menschlichen Chromosomen sollte geprüft werden, ob Schwellenwerte vorhanden sind, und ob eine Abhängigkeit der Häufigkeit von Chromosomenaberrationen von den Konzentrationen der zugegebenen Wirkstoffe besteht.

Zwei der gesunden Blutspender wiesen eine relativ hohe Rate sekundärer Chromosomenaberrationen auf. Sie konnten dennoch in die Untersuchung mit aufgenommen werden, da sie keinen Sonderfall für einen mit Primidon behandelten Patienten darstellten. Außerdem waren nicht die absoluten Werte der Aberrationsraten für die Beurteilung ausschlaggebend, sondern die Differenzen zwischen den Werten von Kontrolle und Behandlung.

Die mikroskopische Auswertung der Präparate erfolgte mit einer 1250-fachen Endvergrößerung. Der Bewertung jeder Konzentrationsstufe lagen jeweils 100 ausgewertete Metaphasen zugrunde. Dabei wurden erstens Veränderungen in der Chromosomenstruktur (Gaps, Brüche, Umbaufiguren; Einteilung nach Gebhart 1970), zweitens Veränderungen der Chromosomenzahl (aneuploide Zellen, tetraploide Zellen, Endoreduplikationen) erfaßt. Zusätzlich wurden auch unspezifische Chromosomenveränderungen wie Spiralisierungsdefekte, Pulverisierung und Stickiness ausgewertet.

METHODIK DER STATISTISCHEN AUSWERTUNG

Die zahlenmäßigen Ergebnisse sind in den Tabellen I, II und III dargestellt.

Da bei den für jede Substanz durchgeführten Versuchsreihen nach Schwellenwerten gesucht wurde und nicht alle möglichen Konzentrationen berücksichtigt werden konnten, sind Datenlücken vorhanden. Deshalb wurden für den statistischen Vergleich Klassen aus einander benachbarten Konzentrationen gebildet; es ließen sich jedoch gewisse Verzerrungen nicht vermeiden. Von den Ergebnissen der untersuchten Fälle in diesen Konzentrationsklassen wurden Mittelwerte gebildet. Die Information über die Verteilung der Werte war nicht hinreichend, deshalb wurde ein nichtparametrischer Test zum Vergleich der Klassenmittel angewandt, und zwar, da es sich um verbundene Meßergebnisse handelt, der Friedman-Test (Sachs 1968). Das Ergebnis dieses Tests erlaubt eine Aussage über Unterschiede zwischen den einzelnen Konzentrationen überhaupt.

Um zu prüfen, welche Konzentrationen sich von der Kontrolle bzw. unter sich selbst paarweise unterscheiden, wurde weiterhin der Test nach Wilcoxon und Wilcox (Sachs 1968) durchgeführt. Für die paarweisen Vergleiche war eine einseitige Fragestellung gegeben, d.h. es sollte geprüft werden, ob die höheren Konzentrationen der Substanzen auch zu höheren Aberrationsraten führen. Die Dreiecksmatrix der paarweisen Differenzen der Rangsummen — die hier zur Beurteilung hinzugezogen wurden — ist für Primidon in Tab. V, für Phenobarbital in Tab. VII, dargestellt. Beim Vergleich mit den tabellarisch vorliegenden Grenzwerten erkennt man, ob die Differenzen gesichert von Null verschieden sind.

Wird der Grenzwert bei einer Irrtumswahrscheinlichkeit $P \leq 1\%$ erreicht bzw. überschritten, sprechen wir von einem signifikanten Ergebnis, bei $P \leq 5\%$ von einem statistisch auffälligen Ergebnis.

ZYTOLOGISCHE ERGEBNISSE

Bei steigender Konzentration jeder der drei Substanzen in den entsprechenden Kulturen war, als unspezifische Chromosomenveränderung, eine Zunahme der Spiralisierungsdefekte zu finden. Endoreduplikationen, tetraploide und aneuploide (hyperploide) Zellen wurden nicht vermehrt beobachtet. Strukturaberrationen beschränkten sich, bei der Zugabe von Primidon und Phenobarbital zu den Kulturen, auf Gaps und Brüche. Für Phenyläthylmalondiamid ließ sich keine entsprechende Wirkung sichern.

Umbafiguren waren gegenüber den Kontrollen nicht vermehrt.

Die Zunahme der Gaps und Brüche bei der Primidon bzw. Phenobarbitalbehandlung liegt noch unterhalb jenen Konzentrationen, die bei dem entsprechenden therapeutischen Wirkspiegel erreicht werden. Für Primidon ist nur bei der niedrigsten untersuchten Konzentrationsstufe (2.5 mg/l) keine Erhöhung des prozentualen Anteils gestörter Mitosen ersichtlich.

Eine lineare Abhängigkeit der Aberrationsraten von steigenden Substanz-Konzentrationen ist bei keinem der Agentien festzustellen.

Im einzelnen ergaben sich folgende Befunde.

Primidon

Von 5 Blutspendern wurden in 5 Versuchsreihen 500 Metaphasen zur Beurteilung der Nullkontrolle ausgewertet und 2800 Metaphasen nach der Behandlung der Kulturen mit Primidonkonzentrationen zwischen 2.5-375 mg/l.

Nach Behandlung mit Primidon betrug die Häufigkeit für Endoreduplikationen 0.04%, für tetraploide Mitosen 0.46% und für hyperploide Zellen 0.04%. Diese Werte liegen, verglichen mit den Ergebnissen von Große et al. (1972), im Normbereich.

(Große et al. fanden bei Untersuchungen gesunder Personen der Durchschnittsbevölkerung: Endoreduplikationen in 0.05%, tetraploide Mitosen in 0.3% und hyperploide Zellen in 0.3% bei 4000 ausgewerteten Mitosen).

VERGLEICH VON UNBEHANDELTEN UND BEHANDELTEN KULTUREN

| | % gestörter Mitosen | Aberrationstypen % ^a | | | Aberrat. Mitose | Brüche Mitose |
|-------------------------------------|------------------------|---------------------------------|-----|-----|--------------------|------------------|
| | | G | B | E | | |
| Kontrolle (N = 500) | 9 | 8.2 | 2.0 | 0.2 | 0.10 | 0.02 |
| Behandl. mit Primidon (N = 2800) | 15 | 12.2 | 4.6 | 0.2 | 0.17 | 0.05 |

^a Erläuterung siehe Tab. III.

Phenobarbital

Von 5 Blutspendern wurden 700 Metaphasen zur Beurteilung der Nullkontrolle ausgewertet und 1300 Metaphasen nach der Behandlung der Kulturen mit Phenobarbitalkonzentrationen zwischen 22.4-388 mg/l.

VERGLEICH VON UNBEHANDELTEN UND BEHANDELTEN KULTUREN

| | % gestörter Mitosen | Aberrationstypen % ^a | | | Aberrat. Mitose | Brüche Mitose |
|---------------------------------------|------------------------|---------------------------------|-----|-----|--------------------|------------------|
| | | G | B | E | | |
| Kontrolle (N = 700) | 7 | 6 | 1.6 | 0.1 | 0.08 | 0.02 |
| Behandl. mit Phenobarb. (N = 1300) | 13.8 | 11.2 | 4.5 | 0.2 | 0.16 | 0.04 |

^a Erläuterung siehe Tab. III.

Nach der Behandlung mit Phenobarbital betrug die Häufigkeit für tetraploide Mitosen 0.7% Endoreduplikationen und hyperploide Zellen wurden bei dieser Versuchsserie nicht gefunden.

Phenyläthylmalondiamid

Von 2 Blutspendern wurden in 2 Versuchsreihen 200 Metaphasen zur Beurteilung der Nullkontrolle ausgewertet und 900 Metaphasen nach der Behandlung der Kulturen mit Phenyläthylmalondiamid-Konzentrationen zwischen 13.9-750 mg/l.

VERGLEICH VON UNBEHANDELTEN UND BEHANDELTEN KULTUREN

| | % gestörter Mitosen | Aberrationstypen % ^a | | | Aberrat. Mitose | Brüche Mitose |
|---|------------------------|---------------------------------|-----|-----|--------------------|------------------|
| | | G | B | E | | |
| Kontrolle (N = 200) | 11.5 | 10 | 2.5 | 0.5 | 0.13 | 0.03 |
| Behandl. mit Päma ^b (N = 900) | 15.2 | 11.3 | 5.7 | 0 | 0.17 | 0.06 |

^a Erläuterung siehe Tab. III.

^b Päma = Phenyläthylmalondiamid.

Die Häufigkeit für tetraploide Mitosen betrug 0.3%; es wurden keine weiteren Störungen gefunden.

STATISTISCHE AUSWERTUNG

Primidon

Durch den Test nach Friedman wird nachgewiesen, daß statistisch auffällige Unterschiede (Irrtumswahrscheinlichkeit $P < 5\%$) zwischen den mittleren Aberrationsraten, die bei den einzelnen Konzentrationen von Primidon bzw. den dazugehörigen Kontrollen festgestellt wurden, bestehen (Tab. IV).

Die paarweisen Differenzen zwischen den Werten aufsteigender Konzentrationen (Tab. V) haben fast alle positive Vorzeichen, ausgenommen die Differenz zwischen den Rangsummen der Klassen 4 und 5. Bei dem gegebenen Umfang der Untersuchungen konnte jedoch die sich in den Zahlen abzeichnende Tendenz nur durch zwei statistisch auffällige Teilergebnisse gestützt werden.

Phenobarbital

Bei dieser Versuchsreihe mußte eine gröbere Klasseneinteilung vorgenommen werden (Tab. II). Wie bei Primidon ergibt der Test nach Friedman ein statistisch auffälliges Resultat (Tab. VI).

Die Dreiecksmatrix der paarweisen Differenzen der Rangsummen zeigt im Vergleich mit den von Wilcoxon und Wilcox angegebenen Grenzwerten, daß sich ein statistisch auffälliger Unterschied zwischen den zur Klasse drei zusammengefaßten höchsten Konzentrationen und den Kontrollen sichern läßt.

Phenyläthylmalondiamid

Hier lassen sich keine statistisch auffälligen Unterschiede der Aberrationsraten bei steigender Konzentration von Phenyläthylmalondiamid nachweisen. Die Nullhypothese auf Gleichheit des prozentualen Anteils gestörter Mitosen, in den mit dem Agens behandelten und in den unbehandelten Kulturen, läßt sich somit nicht widerlegen.

DISKUSSION

Mit dem hier zur Untersuchung herangezogenen Testsystem wird nachgewiesen, daß Primidon, ebenso wie sein Abbauprodukt Phenobarbital, in hohen Konzentrationen strukturelle Chromosomenaberrationen induzieren kann. In der Versuchsserie mit Phenyläthylmalondiamid können keine entsprechenden Unterschiede zwischen unbehandelten und behandelten Kulturen gefunden werden.

Bei den vorhandenen chromosomalen Strukturdefekten handelt es sich überwiegend um Gaps oder lokale Achromasien. Der Anteil der Brüche ist gegenüber der Kontrolle annähernd verdoppelt.

Damit werden die Ergebnisse, die Große et al. (1972) durch Untersuchungen an Lymphozytenkulturen mit Antikonvulsiva behandelter Patienten erzielte, bestätigt.

Über den Wirkungsmechanismus von Primidon und Phenobarbital auf die Chromosomen kann mit dem hier durchgeführten Versuchsaufbau und dem verwendeten Testsystem keine Aussage gemacht werden. Daß die induzierten Chromosomenaberrationen jeweils durch die beiden Substanzen und nicht durch mögliche Umwandlungsprodukte derselben während der Kulturdauer verursacht wurden, ließe sich mit Sicherheit nur durch Bestimmungen der Serumspiegel am Ende der Kulturdauer nachweisen. In vivo spielen die Leber und Niere eine Hauptrolle im Metabolismus und bei der Ausscheidung beider Agentien (Swinyard et al. 1954), weshalb ein Umbau innerhalb des Kulturansatzes unwahrscheinlich erscheint.

Ob Primidon selbst zu den antikonvulsiv wirkenden Substanzen gehört, die diaplazentar ihre Wirkung auch auf die Kinder von Schwangeren auszuüben vermögen, wird vermutet. Beweiskräftig wären Serumspiegeluntersuchungen bei Neugeborenen, deren Mütter während der Schwangerschaft das Medikament einnahmen.

Sicher jedoch ist, daß das Abbauprodukt Phenobarbital leicht alle Körperschranken überwindet; das gilt auch für die Plazenta. Beachtet man nun folgende Tatsachen, daß:

(a) bei häufiger Gabe von Primidon in hohen Dosen es durch gesteigerten Umbau (Enzyminduktion) zu einer Anschoppung von Phenobarbital kommt, die durch die unterschiedlichen Halbwertszeiten der beiden Substanzen noch verstärkt wird (Serum-HWZ für Primidon 10-12 Stunden, Booker et al. 1970; Serum-HWZ für Phenobarbital 3,4 Tage, Mark 1963);

(b) der Blutspiegel beim Säugling doppelt so hohe Werte wie bei der Mutter erreichen kann, da im Fetus Barbiturate sehr langsam abgebaut und deshalb nur geringere Mengen ausgeschieden werden (Saxl 1972);

so können im Blut von Säuglingen, deren Mütter während der Schwangerschaft Primidon eingenommen hatten, hohe Phenobarbitalkonzentrationen auftreten.

In wieweit sich die beiden Substanzen Primidon und Phenobarbital, für die jeweils getrennt eine aberrationsauslösende Wirkung festgestellt wurde, bei gleichzeitigem Vorhandensein beeinflussen, müßte noch untersucht werden. Es wäre möglich, daß sich *in vivo*, d.h. bei Applikation von Primidon, die Aberrationsraten gering erhöhen.

Bei der Auswertung der mit Phenobarbital behandelten Kulturen konnten polyploide Kerne oder Mitosen nicht vermehrt gefunden werden. Daher lassen sich anhand dieser Arbeit die Ergebnisse von Autoren, die über eine Erhöhung der Anzahl polyploider Kerne bei Behandlungen mit Barbituraten berichten, nicht bestätigen.

Die Befunde an den mit Primidon und mit Phenobarbital behandelten Kulturen lassen sich, hinsichtlich der Zerstörung genetischer Strukturen, wie folgt auslegen:

Da Umbauten (Translokationen, Ringchromosomen, dicentrische und atypische Chromosomen) nicht vermehrt aufgetreten sind, kann man mit Sicherheit sagen, daß die beiden Agentien nicht zu den stark mutagen wirkenden Substanzen zu rechnen sind.

Die Vermehrung der Gaps deutet zwar auf eine spezifische Reaktion der Substanzen mit dem genetischen Material hin (Gebhart 1970) und auch die Zunahme der Brüche auf das Doppelte kann in diesem Sinne interpretiert werden, die praktische Bedeutung dieser Befunde ist jedoch noch unklar.

Die Unsicherheit der Aussage über eine mögliche mutagene und teratogene Wirkung von Primidon und seinem Abbauprodukt Phenobarbital liegt darin, daß der hier durchgeführte Test mit Somazellen und nicht mit Keimzellen durchgeführt wurde. Man kennt zwar aus der *Drosophila*-Genetik einen Zusammenhang zwischen dem vermehrten Auftreten von Mißbildungen und Chromosomenaberrationen, doch Röhrborn (1970) weist nachdrücklich auf einen möglichen Unterschied zwischen Somazellen und Keimzellen und sogar zwischen verschiedenen Keimzellstadien, hinsichtlich ihrer Empfindlichkeit auf mutagene Substanzen, hin. Daher empfiehlt er auch den Dominant-Letal-Test bei Ratte und Maus als weiteres Prüfsystem für Gen- und Chromosomenmutationen.

Ähnliche Versuche haben Grote et al. (1969) mit graviden Bastardkaninchen und Methyl-cyclohexenyl-methylbarbitursäure-Na als Testsubstanz durchgeführt. Sie stellten fest, daß das Barbitursäurederivat in den embryonalen Zellen Zellteilungsstörungen im Sinne der Stathmokinase verursacht, und daß möglicherweise ein Kausalzusammenhang besteht zwischen den bei den untersuchten Embryonen aufgetretenen Polyploidien und einem Absterben der Keime.

Herrn Prof. Dr. L. Horbach, Direktor des Instituts für Medizinische Statistik und Dokumentation, danke ich herzlich für seine Hilfe bei der statistischen Auswertung der Versuchsergebnisse.

TAB. I. KONZENTRATIONEN VON PRIMIDON VERGLICHEN MIT DEM ZUGEHÖRIGEN ANTEIL GESTÖRTER MITOSEN UND MIT VERSCHIEDENEN ABERRATIONSPARAMETERN

| Konzentration in mg/l | 0 | 2.5 | 3.7 | 4.9 | 9.5 | 11.8 | 14 | 18 | 18.2 | 22.2 | 23.8 | 40 | 45.5 | 75 | 80 | 100 | 125 | 375 | |
|--------------------------|----|-----|-----|-----|-----|------|----|----|------|------|------|----|------|----|----|-----|-----|-----|----|
| Versuch I | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| % gestörte Mitosen | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| G | 15 | 16 | | 28 | | | | | | | | | 28 | | | | | 26 | 25 |
| B | 14 | 13 | | 23 | | | | | | | | | 25 | | | | | 26 | 17 |
| E | 3 | 3 | | 7 | | | | | | | | | 6 | | | | | 2 | 10 |
| 4n | 1 | | | 1 | | | | | | | | | 1 | | | | | 1 | |
| Versuch II | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| % gestörte Mitosen | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| G | 5 | 8 | 13 | 16 | 17 | | | | | | | | | | 23 | | | | |
| B | 5 | 8 | 10 | 10 | 9 | | | | | | | | | | 15 | | | | |
| E | | 2 | 4 | 6 | 9 | | | | | | | | | | 8 | | | | |
| 4n | | | | | | | | | | | | | | | 1 | | | | |
| Versuch III | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| % gestörte Mitosen | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| G | 8 | | | 13 | | 14 | | | | 13 | 11 | | 11 | | | | 12 | 12 | 14 |
| B | 6 | | | 11 | | 12 | | | | 9 | 7 | | 8 | | | | 11 | 12 | 13 |
| E | 2 | | | 4 | | 4 | | | | 4 | 4 | | 4 | | | | 3 | 1 | 2 |
| 4n | | | | 1 | | | | 1 | | | | | | | | | | | |
| Endoreduplikation | | | | | | | | | | | | | 3 | | | | 1 | | 1 |
| Versuch IV | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| % gestörte Mitosen | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| G | 4 | | | | 11 | | 12 | 13 | | | | | 14 | | | | | | 12 |
| B | 3 | | | | 8 | | 10 | 9 | | | | | 11 | | | | | | 6 |
| E | 2 | | | | 3 | | 3 | 5 | | | | | 5 | | | | | | 5 |
| 4n | | | | | 1 | | | | | | | | | | | | | | 2 |
| 2n+x | | | | | 1 | | | 1 | | | | | | | | | | | 1 |
| Versuch V | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| % gestörte Mitosen | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| G | 13 | | | | 11 | | 8 | | 19 | | | | 14 | | | | | 15 | |
| B | 13 | | | | 9 | | 7 | | 14 | | | | 14 | | | | | 13 | |
| E | 3 | | | | 4 | | 2 | | 9 | | | | 4 | | | | | 6 | |
| 4n | | | | | | | 1 | | 1 | | | | 1 | | | | | | |

Erläuterung der Abkürzungen siehe Tab. III.

TAB. II. KONZENTRATIONEN VON PHENOBARBITAL VERGLICHEN MIT DEM ZUGEHÖRIGEN ANTEIL GESTÖRTER MITOSEN (DIE KONZENTRATIONSTUFEN WURDEN IN 2 KLASSEN ZUSAMMENGEFASST)

| Konzentration in mg/l | 0 | 22.4-111 | 156-388 |
|------------------------------|-----|----------|---------|
| I gestörte Mitosen in % | 8 | 13 | 11 |
| II gestörte Mitosen in % | 4 | 11 | 13 |
| III gestörte Mitosen in % | 15 | 18 | 22 |
| IV gestörte Mitosen in % | 5.5 | 12 | 16.5 |

TAB. III. KONZENTRATIONEN VON PHENYLÄTHYLMALONDIAMID VERGLICHEN MIT DEM ZUGEHÖRIGEN ANTEIL GESTÖRTER MITOSEN UND MIT VERSCHIEDENEN ABERRATIONSPARAMETERN

| Konzentration in mg/l | 0 | 13.9 | 33.6 | 39.2 | 63.7 | 125 | 143 | 208 | 500 | 750 |
|-----------------------|----|------|------|------|------|-----|-----|-----|-----|-----|
| Versuch I | | | | | | | | | | |
| % gestörte Mitosen | 8 | 13 | 11 | | 15 | | 10 | | | 11 |
| G | 6 | 9 | 9 | | 12 | | 6 | | | 7 |
| B | 2 | 5 | 3 | | 4 | | 5 | | | 5 |
| E | | | | | | | | | | |
| 4n | | 1 | | | | | | | | 1 |
| Versuch II | | | | | | | | | | |
| % gestörte Mitosen | 15 | | | 14 | | 19 | | 22 | 22 | |
| G | 14 | | | 11 | | 13 | | 21 | 14 | |
| B | 3 | | | 4 | | 8 | | 5 | 10 | |
| E | 1 | | | | | | | | | |
| 4n | | | | 1 | | | | 1 | | |

Erläuterungen: G = Chromatid- und Isochromatidgaps; B = Chromatid- und Isochromatidbrüche; E = Austauschfiguren; 4n = Tetraploide Mitosen; 2n+x = Hyperploide Zellen.

TAB. IV. FRIEDMAN-TEST FÜR PRIMIDON

| Versuch Nr. | Kulturen aufsteigender Konzentration und die zugehörigen Rangzahlen (Rz) | | | | | | | | | | | | |
|----------------|--|----|----|----|----|------|----|-----|----|------|----|-----|-----|
| | 1 | Rz | 2 | Rz | 3 | Rz | 4 | Rz | 5 | Rz | 6 | Rz | |
| I | 15 | 1 | 16 | 2 | 28 | 5.5 | 28 | 5.5 | 26 | 4 | 24 | 3 | |
| II | 5 | 1 | 8 | 2 | 13 | 3 | 16 | 4 | 17 | 5 | 23 | 6 | |
| III | 8 | 1 | 13 | 4 | 14 | 5.5 | 12 | 2.5 | 12 | 2.5 | 14 | 5.5 | |
| IV | 4 | 1 | 11 | 2 | 12 | 3.5 | 13 | 5 | 14 | 6 | 12 | 3.5 | |
| V | 13 | 3 | 11 | 2 | 8 | 1 | 19 | 6 | 14 | 4 | 15 | 5 | |
| Summe | | 7 | | 12 | | 18.5 | | 23 | | 21.5 | | 23 | 105 |

Kontrolle der Spaltenrangsummen: für $n = 5$ und $k = 6$

$$\sum_{i=1}^k R_i = \frac{n \cdot k(k+1)}{2} = 105$$

Prüfgröße nach Friedman: $\hat{\chi}_R^2 = \left[\frac{12}{n \cdot k(k+1)} \sum_{i=1}^k R_i^2 \right] - 3n(k+1) = 12.4$

Signifikanzschranken: $\hat{\chi}_{FG=5, P \leq 5\%}^2 = 11.07$
 $\hat{\chi}_{FG=5, P \leq 1\%}^2 = 15.09$

TAB. V. MULTIPLE VERGLEICHE ABHÄNGIGER STICHPROBEN NACH WILCOXON UND WILCOX FÜR PRIMIDON
Dreiecksmatrix der paarweisen Differenzen der Rangsummen

| | | 1 | 2 | 3 | 4 | 5 | 6 |
|---|------|---|----|------|-----|------|-----|
| | | 7 | 12 | 18.5 | 23 | 21.5 | 23 |
| 1 | 7 | 0 | 5 | 11.5 | 16 | 14.5 | 16 |
| 2 | 12 | | 0 | 6.5 | 11 | 9.5 | 11 |
| 3 | 18.5 | | | 0 | 4.5 | 3 | 4.5 |
| 4 | 23 | | | | 0 | -1.5 | 0 |
| 5 | 21.5 | | | | | 0 | 1.5 |

Die kritische Differenz für $n = 5$ und $k = 6$ ist auf dem 5% Niveau 15.3 (einseitig).

TAB. VI. FRIEDMAN-TEST FÜR PHENOBARBITAL

| Versuch Nr. | Kulturen aufsteigender Konzentration und die zugehörigen Rangzahlen (Rz) | | | | | | |
|----------------|--|----|----|----|------|----|----|
| | 1 | Rz | 2 | Rz | 3 | Rz | |
| I | 8 | 1 | 13 | 3 | 11 | 2 | |
| II | 4 | 1 | 11 | 2 | 13 | 3 | |
| III | 15 | 1 | 18 | 2 | 22 | 3 | |
| IV | 5.5 | 1 | 12 | 2 | 16.5 | 3 | |
| Summe | | 4 | | 9 | | 11 | 24 |

Die berechnete Prüfgröße nach Friedman: $\hat{X}_R^2 = 6.5$; für $n = 4$ und $k = 3$ gilt nach den entsprechenden Tabellen bei $\hat{X}_R^2 = 6.5$ eine Wahrscheinlichkeit $P = 0.042$.

TAB. VII. MULTIPLE VERGLEICHE ABHÄNGIGER STICHPROBEN NACH WILCOXON UND WILCOX FÜR PHENOBARBITAL

| Dreiecksmatrix der paarweisen Differenzen der Rangsummen | 1 | 2 | 3 | Die kritische Differenz für $n = 4$ und $k = 6$ ist auf dem 5% Niveau 5.8 (einseitig). | |
|--|---|---|---|--|----|
| | | 4 | 9 | | 11 |
| | 1 | 4 | 0 | 5 | 7 |
| | 2 | 9 | 0 | 0 | 2 |

LITERATUR

- Aladj H. 1961. Experimentelle Auslösung chromosomaler Verteilungsstörungen in menschlichen Leukozyten durch in vitro-Zusatz verschiedener Narkotika. — Diss., Düsseldorf.
- Ayraud N., Kermarec J., Martinon J. 1968. Effets cytogénétiques des médicaments anticonvulsivants. *Ann. Genet.*, 11: 253-257.
- Bogue J.Y., Carrington H.C. 1952. Personal communication. In: L.S. Goodman et al. 1953.
- Bogue J.Y., Carrington H.C. 1953. The evaluation of "mysoline" — A new anticonvulsant drug. *Br. J. Pharmacol.*, 8: 230-236.
- Booker H.E., Hosokawa K., Burdette R.D., Darcey B. 1970. A clinical study of serum primidone levels. *Epilepsia*, 11: 395-402.
- Butler T.C., Waddell W.J. 1956. Metabolic conversion of primidone (mysoline) to phenobarbital. *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.*, 93: 544-546.
- Caratzali A., Roman J.-C., Turpin R. 1969. Action stathmocinétique de quelques dérivés barbituriques sur le lymphocyte humain en culture. *C. R. Acad. Sc. (Paris)*, 268: 191-192.
- Fujimoto J.M., Mason W.H., Murphy M. 1968. Urinary excretion of primidone and its metabolites in rabbits. *J. Pharmacol.*, 159: 379-388.
- Gebhart E. 1970a. Beiträge zur chemischen Mutagenese beim Menschen. *Sitzungsberichte der physikal.-med. Sozietät zu Erlangen 83/84 (1970)* 18-31.
- Gebhart E. 1970b. The treatment of human chromosomes in vitro: results. In F. Vogel and G. Röhrborn (Hrsg): *Chemical Mutagenesis in Mammals and Man*. Springer-Verlag, Berlin-Heidelberg-New York.
- German J., Ehlers K.H., Kowal A., De George F.V., Engle A., Passarge E. 1970. Possible teratogene-

- ticity of trimethadione and paramethadione. *Lancet* 2: 261-167.
- Gleiss J. 1968. Überlegung zur Teratogenität von Schlafmitteln. *Dtsch. Med. Wochenschr.*, 93: 1732-1734.
- Goodman L.S., Swinyard E.A., Brown W.C., Schiffman D.O., Grewal M.S., Bliss E.L. 1953. Anticonvulsant properties of 5-phenyl-5-ethyl-hexa-hydro-pyrimidine-4,6-dione (mysoline), a new antiepileptic. *J. Pharmacol.*, 108: 428-436.
- Große K.-P., Schwanitz G., Rott H.-D., Wißmüller, H.F. 1972. Chromosomenuntersuchungen bei Behandlung mit Antikonvulsiva. *Humangenetik*, 16: 209-216.
- Grote W., Kabarity A., Schade H. 1970. Auswirkungen eines Barbitursäurederivates auf die Embryogenese von Kaninchen durch Mitosestörungen. *Humangenetik*, 8: 280-288.
- Livingston S. 1966. *Drug Therapy for Epilepsy*. Charles C. Thomas, Springfield, pp. 234.
- Mark L.C. 1963. Metabolism of barbiturates in man. *Clin. Pharmacol. Ther.*, 4: 504-530.
- Meadow S.R. 1968. Anticonvulsant drugs and congenital abnormalities. *Lancet* 2: 1296.
- Moorhead P.S., Nowell P.S., Mellman W.J., Battips D.M., Hungerford D.A. 1960. Chromosome preparations of leukocytes cultured from human peripheral blood. *Exp. Cell. Res.*, 20: 613-616.
- Pashayan H., Pruzansky D., Pruzansky S. 1971. Are anticonvulsants teratogenic? *Lancet* 2: 702-703.
- Neuhäuser G., Schwanitz G., Rott H.D. 1970. Zur Frage mutagener und teratogener Wirkung von Antikonvulsiva. *Fortschr. Med.*, 19: 819-820.
- Olesen O.V., Dam M. 1967. The metabolic conversion of primidone (Mysoline[®]) to phenobarbitone in patients under long-term treatment. *Acta Neurol. Scand.*, 43: 348-356.
- Persaud T.V.N., Henderson W.M. 1969. The teratogenicity of barbital sodium in mice. *Arzneim. Forsch.*, 8: 1309-1310.
- Pippenger C.E., Gillen H.W. 1969. Gas chromatographic analysis for anticonvulsant drugs in biological fluids. *Clin. Chem.*, 15: 582-590.
- Plaa G.L., Fujimoto J.M., Hine C.H. 1958. Intoxication from primidone due to its biotransformation to phenobarbital. *J. Am. Med. Ass.*, 168: 1769-1770.
- Röhrborn G. 1970. The dominant lethals: method and cytogenetic examination of early cleavage stages. In: F. Vogel and G. Röhrborn (Hrsg.): *Chemical Mutagenesis in Mammals and Man*. Springer-Verlag, Berlin-Heidelberg-New York.
- Sachs L. 1968. *Statistische Auswertungsmethoden*. Springer-Verlag, Berlin-Heidelberg-New York.
- Saxl O. 1972. Nebenwirkungen von Barbituraten. *Fortschr. Med.*, 2: 50-54.
- Swinyard E.A., Tedeschi D.H., Goodman L.S. 1954. Effects of liver damage and nephrectomy on anticonvulsant activity of mysoline and phenobarbital. *J. Am. Pharm. Assoc.*, 43: 114-116.

ZUSAMMENFASSUNG

Primidon und seine beiden Abbauprodukte Phenobarbital und Phenyläthylmalondiamid wurden in menschlichen Lymphozytenkulturen auf eine mögliche aberrationsauslösende Wirkung untersucht. Der getestete Konzentrationsbereich beginnt unterhalb des therapeutischen Serumspiegels und erreicht, bei den einzelnen Substanzen verschieden, ungefähr das 10 bis 75 fache dieses Wertes.

Phenyläthylmalondiamid zeigt, außer einer bei allen drei Substanzen vorgefundenen Zunahme der Spiralisierungdefekte bei steigenden Konzentrationen, keinen Einfluß auf die Chromosomenstruktur.

Mit dem Friedman-Test werden statistisch auffällige Unterschiede ($P < 5\%$) zwischen den mittleren Aberrationsraten der Kontrollen und der Versuche, die mit Primidon bzw. Phenobarbital behandelt waren, nachgewiesen. Der Test nach Wilcoxon und Wilcox zeigt, daß zwischen den hohen Konzentrationen der beiden Agentien und den entsprechenden Nullkontrollen eine Zunahme der Aberrationsraten auf dem 5% Niveau zu sichern ist. Die höheren Werte für % gestörter Mitosen nach Behandlung sind auf das vermehrte Auftreten von Gaps und Brüchen zurückzuführen. Eine lineare Abhängigkeit des Anteils gestörter Mitosen von den steigenden Konzentrationen der Substanzen ist jedoch nicht nachweisbar. Die Anzahl der gefundenen tetraploiden Mitosen, Endoreduplikationen und hyperploiden Zellen liegt im Normbereich.

Da bei der vorliegenden Untersuchung Chromosomenumbauten nicht vermehrt aufgetreten sind, kann mit Sicherheit gesagt werden, daß Primidon und Phenobarbital nicht zu den stark mutagen wirkenden Substanzen zu rechnen sind.

RIASSUNTO

Sono stati studiati, in culture linfocitarie, i possibili effetti del primidone e dei suoi metaboliti fenobarbital e fenil-etil-malondiamide sull'induzione di aberrazioni cromosomiche. Le concentrazioni andavano da livelli inferiori a livelli da 10 a 75 volte superiori a quello del siero terapeutico, diverso per le varie sostanze.

Oltre ad un aumento dei difetti di spiralizzazione alle concentrazioni superiori, tipico per tutte e tre le sostanze, la fenil-etil-malondiamide non ha mostrato alcun effetto sulla struttura cromosomica.

Il test di Friedman ha indicato una differenza statisticamente significativa ($P < 5\%$) fra il tasso medio di aberrazioni nei controlli e nelle culture trattate con primidone e fenobarbital. Il test secondo Wilcoxon e Wilcox indica una differenza statisticamente significativa ($P < 5\%$) fra i tassi di aberrazioni nei controlli e nelle culture trattate. I più elevati valori percentuali sono dovuti ad un aumento di *gaps* e rotture. Tuttavia, non si è trovata dimostrazione di una dipendenza lineare della percentuale delle mitosi aberranti dall'aumentata concentrazione delle sostanze. Il numero di mitosi tetraploidi, endoreduplicazioni e cellule iperploidi è nell'ambito della norma.

Poiché in tali ricerche non è risultato un aumento del numero di scambi cromosomici, si può affermare con certezza che primidone e fenobarbital non sono sostanze ad elevata attività mutagena.

RÉSUMÉ

Primidone et ses deux produits de décomposition, Phénobarbital et Phényléthylmalondiamide, ont été examinés en cultures de lymphocytes humains, afin de rechercher si ces substances peuvent induire des aberrations chromosomiques. En cas d'augmentation des concentrations, toutes trois substances montraient une augmentation du dérangement des chromosomes. A côté de cela, le Phényléthylmalondiamide ne montrait pas d'influence sur la structure des chromosomes. Les aberrations chromosomiques étaient plus nombreuses dans les cultures traitées, vis-à-vis des contrôles. Les types d'aberrations trouvées étaient *gaps* et cassures.

Étant donné le nombre pas élevé de remaniements chromosomiques, on peut affirmer que le Primidone et le Phénobarbital ne sont pas des substances très mutagènes.

Dr. Dieter Foerst, Institut für Humangenetik und Anthropologie der Universität, Bismarckstrasse 10, 8520 Erlangen, German Federal Republic.