

Prüfung auf Kombinationseffekte von Quercetin mit den Herbiziden Atrazin, Cyanazin und Gesamprim in Mutagenitätstests

C. Guigas¹, B.L. Pool-Zobel¹ und J.F. Diehl²

¹ Institut für Hygiene und Toxikologie und

² Institut für Ernährungsphysiologie der Bundesforschungsanstalt für Ernährung, Karlsruhe

Combination effects of quercetin with the herbicides atrazine, cyanazine or gesamprim in mutagenicity tests

Zusammenfassung: Das in Pflanzen vorkommende Flavonol Quercetin und die zu den Triazinen gehörenden Herbizide Atrazin, Cyanazin und Gesamprim® wurden einzeln und in Kombination miteinander auf genotoxische Wirkungen untersucht. Es wurden die Induktion von Schwesterchromatidaustauschen (SCE-Test) und von Mutationen zur 6-Thioguaninresistenz (HPRT-Test) an Ovarzellen des Chinesischen Hamsters (CHO-Zellen) bestimmt. Während sich im SCE-Test keine Hinweise auf genotoxische Wirkungen ergaben, verursachten die Prüfsubstanzen im HPRT-Test nach metabolischer Aktivierung durch zugesetzte subzelluläre Enzympräparate der Rattenleber (S9-Mix) leicht erhöhte Mutationsraten. Die Kombinationen von zwei oder drei Prüfsubstanzen verursachten keine deutliche Zunahme der genotoxischen Wirkung.

Summary: The plant flavonol quercetin and the triazine herbicides atrazine, cyanazine, and gesamprim were examined individually and in combination for the induction of genotoxic effects. The sister chromatid exchange (SCE) assay and the gene mutation assay for 6-thioguanine resistance (HPRT) were carried out with Chinese hamster ovary (CHO) cells. Whereas no evidence of an increased SCE rate was found, the test substances caused a slightly increased mutation rate in the HPRT assay after metabolic activation with a subcellular liver enzyme preparation. Combination studies with two or three of the test substances did not result in higher mutation rates than those observed for the individual compounds tested singly.

Schlüsselwörter: Pestizide – Kombinationswirkungen – Mutagenität

Key words: Genotoxicity – quercetin – herbicides – atrazine – cyanazine – combination effects – SCE test – HPRT test

Einleitung

Es hat nicht an Warnungen gefehlt, bei der toxikologischen Beurteilung von Lebensmittelzusatzstoffen und -kontaminanten dürfe man sich nicht mit der Prüfung der Einzelsubstanzen zufriedengeben, sondern müsse die „toxische Gesamtsituation“ berücksichtigen (9). In diesem Zusammenhang wird immer wieder auf die Möglichkeit hingewiesen, daß das Zusammenwirken mehrerer Stoffe zu potenzierenden (synergistischen) Wirkungen Anlaß geben könnte, daß also in einem solchen Fall die Gesamtwirkung größer wäre, als durch Addition der Einzelwirkungen zu erwarten ist. Angesichts der

fast unendlichen Zahl der denkbaren Kombinationsmöglichkeiten ist eine experimentelle Erforschung dieser Problematik mit aufwendigen Langzeit-Tierversuchen nur begrenzt durchführbar.

Da sich andererseits die der Krebsentstehung vorausgehenden Veränderungen des genetischen Materials der Zelle durch verschiedene In-vitro-Tests erkennen lassen, kann die Suche nach Kombinationswirkungen auch mit Hilfe solcher Genotoxizitätstests durchgeführt werden (22).

Ziel der vorliegenden Untersuchung war es, Kombinationswirkungen des weitverbreiteten Pflanzeninhaltsstoffs Quercetin mit den zur Stoffklasse der Triazine gehörenden Herbiziden Atrazin und Cyanazin zu untersuchen. Quercetin, eine Verbindung mit fraglichem kanzerogenem Potential, kommt auch in Gerste, Weizen und Mais vor (7). Seine mutagene Wirkung im Salmonellen/Mikrosomen-Test nach Ames wurde erstmals 1977 beschrieben (5) und seither von mehreren anderen Autoren bestätigt (1, 6, 14, 25). Da Herbizide im Getreideanbau besonders intensiv verwendet wurden, liegt die Frage nah, ob Mutagenitätstests eine additive, antagonistische oder synergistische Wirkung dieser Stoffe mit Quercetin erkennen lassen. Kommerzielle Präparate von Pflanzenschutzmitteln enthalten meist neben den eigentlichen Wirkstoffen Verunreinigungen, die ihrerseits an Kombinationswirkungen beteiligt sein könnten. Neben reinem Atrazin sollte daher auch das Atrazinpräparat „Gesamprim® 500 flüssig“ in die Untersuchung einbezogen werden. Atrazin verursacht eine Zunahme der Häufigkeit von Mammatumoren bei Ratten, nicht jedoch bei Mäusen (26). Seine Klassifizierung als Kanzerogen ist daher unsicher. Hinsichtlich mutagener Wirkungen liegen sowohl positive Befunde an *Schizosaccharomyces* (17, 20), Humanlymphozyten und in vivo an Knochenmarkzellen der Maus (19) als auch negative Befunde an *S. typhimurium* vor (8). Auch die Prüfung von Cyanazin auf Genotoxizität lieferte in einigen Testsystemen mit Pflanzen als Indikatororganismen positive (18), in anderen mit Bakterien als Indikatororganismen (20) negative Ergebnisse. In der vorliegenden Arbeit wurden die Verbindungen alleine und in Kombination an Ovarzellen des Chinesischen Hamsters (Chinese Hamster ovary, CHO) untersucht. Sie haben gegenüber den o.g. Systemen den Vorteil, Säugerzellen zu sein, womit relevantere Ergebnisse zu erwarten sind.

Material und Methoden

Chemikalien

Quercetin stammte von Sigma, St. Louis, USA, Atrazin und Cyanazin von Dr. S. Ehrendorfer, Augsburg, Gesamprim® 500 flüssig, das als Wirkstoff Atrazin in einer Konzentration von 480 g/l in wässriger Suspension enthält, von Ciba-Geigy, Frankfurt/M. DMSO von Roth GmbH, Karlsruhe, wurde als Lösungsmittel für Atrazin verwendet. Um Mutagene erkennen zu können, die einer metabolischen Aktivierung bedürfen, wurde S9-Mix in einer Konzentration von 10 % den Kulturen zugegeben. Der S9-Mix wurde nach Ames et al. (1) gewonnen. Er enthielt 10 % des 9000 × g Überstandes eines Leberhomogenates von männlichen Sprague-Dawley-Ratten, die zur Erreichung einer Enzyminduktion mit Aroclor 1254 behandelt worden waren.

6-Thioguaninresistenztest

Der HPRT-Test wurde nach der Methode von Gupta (13) modifiziert durchgeführt. CHO-Zellen des K₁-BH₄ Klons wurden in McCoy 5a-Medium, mit 10 % foetalem Kälberserum und 1 % Penicillin-Streptomycin bei 37 °C in einem CO₂-Inkubator gezüchtet. Etwa 5 × 10⁵ Zellen pro Flasche wurden 2 Stunden lang der Testlösung ausgesetzt und

anschließend jeden 2. Tag umgesetzt. Beginnend am 8. Tag wurden 3 Parallel-Ansätze (jeweils 2×10^5 Zellen/Flasche) mit 6-Thioguanin ($2 \mu\text{g/ml}$) 10 Tage inkubiert, Methylblau gefärbt zum Nachweis der mutierten Zellklone. N-Methyl-N-nitro-N-nitrosoguanidin (MNNG) und Cylcophosphamid (CPA) wurden als positive Kontrolle verwendet. Zur Überprüfung der spezifischen Testansprechrate wurde jeder Test mindestens $1 \times$ unabhängig reproduziert. Dadurch sind in den Tabellen die Ergebnisse aus 6fach Bestimmungen (3 Flaschen, 2 Versuche) angegeben.

Schwesterchromatidaustauschtest

Es wurde die von Perry und Wolf (21) beschriebene Methode verwendet. 10^6 Zellen wurden in 175 ml/Flaschen 24 h inkubiert. Nach 2stündiger Inkubation mit der Testlösung wurde 5-Bromdesoxyuridin (Endkonzentration von $10 \mu\text{g/ml}$) zugegeben und nach 24 Stunden mit Colchizin ($2 \mu\text{g/ml}$) versetzt. Zwei Stunden später wurden die Zellen durch Zentrifugation abgetrennt, 20 min. bei 37°C mit 1 %iger Nitratlösung behandelt, in 3 Fixationsschritten in 2:1 Ethanol/Essigsäure fixiert, auf Objektträger aufgetropft und nach der Giemsa-Fluoreszenzmethode angefärbt. Die Positivkontrollen wurden mit denselben Substanzen wie im HPRT-Test durchgeführt. Vier Präparate wurden pro Konzentrations-/Kombinationsansatz angefertigt und für jeden Ansatz wurden mindestens 20 gut ausgebreitete diploide Metaphasen ausgezählt. Die unabhängige Reproduktion jeder Versuchsbedingung erfolgte mindestens einmal.

Zytotoxizität und Wahl der Testkonzentrationen

Bei der Mutagenitätsprüfung müssen Testkonzentrationen, die durch zytotoxische Wirkung einen zu hohen Anteil der Zellen absterben lassen, vermieden werden. Eine Überlebensrate von ca. 50 % sollte nicht unterschritten werden. Die Bestimmung erfolgte in Vorversuchen nach 2stündiger Inkubation mit der Testlösung durch Aussaat von Zellaliquoten mit je 100 Zellen in Zellkulturschalen, 8tägiger Kultivierung bei 37°C in McCoy's-Wachstumsmedium und anschließender Auszählung der mit Methylblau angefärbten Kolonien. Die in Tabelle 1 angegebenen Zytotoxizitätswerte zeigen den prozentualen Anteil überlebender Zellen. Es handelt sich jeweils um Mittelwerte von drei Bestimmungen für jeden Konzentrations-/Kombinationsansatz aus einem repräsentativen Versuch. Ein weiteres Kriterium für die Wahl der Testsubstanzkonzentrationen war die Grenze der Löslichkeit in den angegebenen Kulturbedingungen.

Auswertung

Die statistische Absicherung der Daten zur Induktion der Mutantenkolonien erfolgte mit einem 2-Parameter-Test auf Variabilität mit STATGRAF (statistical parameter Cooperation, USA; Konfidenzintervall 95 %, $\alpha = 0,05$ und 99 % $\alpha = 0,01$). Verglichen wurden jeweils die Mutantenkolonien/-Platte der Einzel- und Kombinationsgruppen mit ihren entsprechenden Lösungsmittelkontrollen sowie die 2 Kombinationsgruppen mit ihren entsprechend dosierten, aber einzeln behandelten Gruppen.

Ergebnisse

Im Test zur Erkennung von Mutationen am HPRT-Locus war ohne metabolische Aktivierung eine eindeutige Zunahme der Häufigkeit von Vorwärtsmutationen nur bei der Positivkontrolle (MNNG) zu beobachten (Tab. 1). Keine der untersuchten Einzelsubstanzen führte zu einer Erhöhung der Mutantenrate. Für die Kombinationen von jeweils 2 dieser Substanzen wurden zum Teil, im Vergleich zur Lösungsmittelkontrolle oder den Einzelsubstanzen, zwar signifikante, aber geringe Zunahmen der mittleren

Tab. 1. Wirkung einzelner Substanzen u.d. Kombination mehrerer Substanzen auf die Überlebensrate und die Häufigkeit von HPRT-Mutanten und Schwester-Chromatid Austauschen in CHO-Zellen ohne metabolische Aktivierung (a, zur LK (Lösungsmittelkontrolle) ($P < 0.05$); b, zur LK ($P < 0.01$); c, zu beiden Einzelbehandlungen ($P < 0.05$); d, zur alleinigen Cyanazin-Behandlung ($P < 0.05$))

Testsubstanz	Konzentration $\mu\text{g/l}$	Überlebende Zellen (%)	Kolonien/ Flasche	MW \pm S.D. ¹⁾	Mutanten/ 10^6 Zellen	SCE/ Zelle ²⁾
unbehandelte Kontrolle		100	0/0/1/1/2/0	0.66 ± 0.42	3.3	8.6 ± 1.9
Kontrolle + 1 % DMSO		100	0/2/1/1/1/1	1 ± 0.63	5	8.8 ± 1.8
MNNG ³⁾	0.1	33	7/9/10/8/8/9	8.5 ± 1.05^b	42.5	34.5 ± 5.3
Quercetin	2.5	65	0/0/1/1/0/0	0.33 ± 0.52	1.7	8.9 ± 1.2
	25	66	3/1/2/2/1/1	1.66 ± 0.82	8.3	10.6 ± 2.3
Atrazin ⁴⁾	23	65	2/1/1/2/1/1	1.33 ± 0.52	6.7	7.8 ± 1.4
	230	64	1/1/1/2/2/1	1.33 ± 0.52	6.7	11.5 ± 2.6
Cyanazin	40	78	1/1/1/1/2/0	1.0 ± 0.63	5	7.5 ± 1.2
	400	59	1/1/1/1/2/0	1.0 ± 0.63	5	9.5 ± 2.2
Gesamprim	12	— ⁵⁾	—	—	—	7.9 ± 1.5
	120	73	2/3/0/2/2/1	1.66 ± 1.03	8.3	8.0 ± 1.4
Quercetin/Gesamprim	2.5/12	48	1/0/2/1/1/1	1.0 ± 0.52	5	9.1 ± 2.6
	25/120	25	4/2/3/4/3/2	$3.0 \pm 0.89^{b,c}$	15	8.7 ± 1.3
Quercetin/Atrazin	2.5/23	75	2/2/1/0/2/1	1.33 ± 0.82	6.7	9.4 ± 1.5
	25/230	70	2/3/2/2/2/1	2.0 ± 0.63^a	10	11.4 ± 2.4
Quercetin/Cyanazin	2.5/40	70	2/1/1/0/3/1	1.33 ± 1.03	6.7	9.3 ± 1.8
	25/400	59	4/2/3/2/2/1	$2.33 \pm 1.03^{a,d}$	11.7	10.0 ± 2.6
Quercetin/Cyanazin/ Atrazin	2.5/40/23	40	1/0/0/0/1/0	0.33 ± 0.52	1.7	8.2 ± 1.3
Quercetin/Cyanazin/ Atrazin	25/400/230	47	0/0/0/2/0/0	0.33 ± 0.82	1.7	8.5 ± 1.4

¹⁾ Mittelwert \pm S.D. von 2 Triplikaten (jeder Versuch $1 \times$ reproduziert)

²⁾ Mittelwert \pm S.D. von 40 Metaphasen (Versuch $1 \times$ reproduziert)

³⁾ MNNG. N-Methyl-N'-Nitro-N-Nitrosoguanidin

⁴⁾ Zugabe in max. 1 % DMSO

⁵⁾ —, nicht geprüft

Mutantenanzahl/Platte gefunden. In keinem Fall war die Wirkung einer Kombination auf die Mutanteninduktion höher als aus der Addition der Wirkung der Einzelsubstanzen zu erwarten.

Im Test unter Zusatz des metabolischen Aktivierungssystems (Tab. 2) waren signifikant erhöhte Mutantenzahlen bei alleiniger Gabe der hohen Dosen von Quercetin, Atrazin, Cyanazin und Gesamprim festzustellen. Die Kombination von zwei oder drei Testsubstanzen führte bei niedriger Dosierung zu einer Mutantenausbeute, die höher lag als die durch die Einzelsubstanzen verursachte. Die Kombination Quercetin/Gesamprim verursachte bei hoher Dosierung eine signifikant geringere Mutationsinduktion (im Mittel 1,0 Kolonien pro Flasche) als die gleiche Dosierung von Quercetin allein (3,66) oder Gesamprim allein (2,33). Auch die anderen Kombinationen führten bei hoher Dosierung zu unteradditiven Wirkungen, die Unterschiede waren jedoch nicht signifikant. In den letzten Spalten der Tabellen 1 und 2 sind die Werte der Prüfung

Tab. 2. Wirkung einzelner Substanzen u.d. Kombination mehrerer Substanzen auf die Überlebensrate und die Häufigkeit von HPRT-Mutanten und Schwester-Chromatid Austauschen in CHO-Zellen mit metabolischer Aktivierung (a. zur LK (Lösungsmittelkontrolle) ($P < 0.05$); b. zur LK ($P < 0.01$); c. zur alleinigen Behandlung mit Quercetin ($P < 0.01$) und zur alleinigen Gesamprim-Behandlung ($P < 0.05$))

Testsubstanz	Konzentration $\mu\text{g/l}$	Überlebende Zellen (%)	Kolonien/ Flasche	MW \pm S.D. ¹⁾	Mutanten/ 10^6 Zellen	SCE/ Zelle ²⁾
Kontrolle	–	100	1/0/1/2/1/1	1 \pm 0.63	5	9.2 \pm 1.2
Kontrolle + 1 % DMSO	–	100	0/0/1/0/1/0	0.33 \pm 0.2	1.7	9.6 \pm 1.8
CPA ³⁾	10	50	7/8/7/9/7/8	7.63 \pm 0.82 ^b	38.3	20.5 \pm 3.6
Quercetin	2.5	66	0	0	0	– ⁵⁾
	25	51	4/3/4/5/3/3	3.66 \pm 0.82 ^b	18.3	12.0 \pm 1.9
Atrazin ⁴⁾	23	69	0/0/1/1/0/0	0.36 \pm 0.52	1.7	–
	230	62	3/3/4/2/1/3	2.6 \pm 1.03 ^b	13.3	11.6 \pm 2.1
Cyanazin	40	92	0	0	0	–
	400	52	4/3/3/4/2/2	3 \pm 0.89 ^b	15	10.7 \pm 2.1
Gesamprim	120	83	3/4/2/3/1/1	2.33 \pm 1.2 ^b	11.7	10.1 \pm 1.4
Quercetin/Gesamprim	2.5/12	47	0/1/1/1/1/1	0.83 \pm 0.52	4.2	–
	25/120	92	0/2/1/1/1/1	1.0 \pm 0.63 ^c	5	–
Quercetin/Atrazin	2.5/23	82	3/2/1/2/2/2	2.0 \pm 0.63 ^b	10	8.3 \pm 1.5
	25/230	66	3/4/2/4/3/4	3.33 \pm 0.82 ^b	16.7	11.7 \pm 2.7
Quercetin/Cyanazin	2.5/40	57	3/3/0/3/2/1	2.0 \pm 1.26 ^a	10	8.6 \pm 1.6
	25/400	47	4/3/2/5/2/2	3.0 \pm 1.26 ^b	15	9.0 \pm 2.1
Quercetin/Cyanazin/ Atrazin	25/40/23	72	0/0/2/1/0/1	0.66 \pm 0.82	3.3	–
	25/400/230	39	1/4/1/2/1/3	2.0 \pm 1.26 ^a	10	–

1) Mittelwert \pm S.D. von 2 Triplikaten (jeder Versuch 1 \times reproduziert)

2) Mittelwert \pm S.D. von 40 Metaphasen (Versuch 1 \times reproduziert)

3) CPA. Cyclophosphamid

4) Zugabe in max. 1 % DMSO

5) –, nicht geprüft

auf SCE-Induktion angegeben. Eine Erhöhung der SCE-Rate ist nur für die jeweiligen Kontrollsubstanzen MNNG und CPA zu sehen. Weder Quercetin noch die Pestizide führten nach alleiniger Verabreichung zu SCE's, auch nicht nach metabolischer Aktivierung. Die Werte in den Kombinationen unterscheiden sich nicht von denen der Einzelverabreichungen.

Diskussion

Für die Beurteilung der komplexen Expositionssituation des Menschen, z.B. aus der Ernährung, der Umwelt oder am Arbeitsplatz ist die Erforschung von Kombinationswirkungen weiterhin von erheblichem Interesse. Im Bereich der Ernährung gilt dies besonders für Kombinationen zwischen mehreren Kontaminanten oder zwischen natürlichen Inhaltsstoffen und Kontaminanten. An Versuchen, derartige Kombinationswirkungen aufzufinden, hat es nicht gefehlt. Die Fragestellung galt dabei meist den möglichen Langzeitwirkungen, insbesondere der Kanzerogenese. Die Pflanzenschutzmittel-

kommission der Deutschen Forschungsgemeinschaft hat vor einigen Jahren einen Bericht über Kombinationswirkungen von Pflanzenschutzmitteln vorgelegt (15), in dem die Ergebnisse von 85 zu diesem Thema durchgeführten Untersuchungen zusammengefaßt wurden. Synergistische Effekte sind zwar bei Verabreichung hoher Dosen von Pflanzenschutzmitteln gelegentlich festgestellt worden, nicht jedoch, wenn niedrige Dosen verabreicht wurden, die den tatsächlichen Rückstandsgehalten der Lebensmittel entsprachen. Die krebserregende Wirkung eines Stoffes kann durch gleichzeitige Verabreichung eines anderen Kanzerogens sowohl verstärkt als auch abgeschwächt werden (11). Die meisten Untersuchungen betrafen die Kombinationswirkung von zwei Substanzen (2), es sind aber auch komplexere Mischungen von bis zu 40 Kanzerogenen im Tierversuch geprüft worden (24), wobei eindeutig synergistische Wirkungen nicht festgestellt wurden. Am Krebsforschungszentrum Heidelberg wurden Modellstudien zur Untersuchung grundlegender Kombinationswirkungen durchgeführt. Es wurden als Testsubstanzen drei Nitrosamine, die alle als Leberkanzerogen bekannt waren, in niedriger Dosierung an Ratten verabreicht. Die Wirkung der Kombination erwies sich als rein additiv (3). Bei drei weiteren Carcinogenen mit unterschiedlicher Organotropie der Tumorzielorgane war dagegen die Wirkung als unteradditiv zu bezeichnen (4).

Quercetin erwies sich in unseren Versuchen nach metabolischer Aktivierung als positiv im In-vitro-Mutagenitätstest. Dies wird durch Untersuchungen mit *S. typhimurium* bestätigt, in denen aufgezeigt wurde, daß eine mutagene Wirkung von Quercetin durch metabolische Aktivierung verstärkt wird (10, 16). Darüber hinaus erwies sich Quercetin im Zelltransformationstest in Hamster-Embryonalzellen, im Vorwärtsmutationstest am TK Locus in Maus Lymphoma-Zellen und im Vorwärtsmutationstest in V79-Zellen des Chinesischen Hamsters nach metabolischer Aktivierung durch S9 als mutagen (7). Auch im Fall von Atrazin, Cyanazin und Gesamprim war metabolische Aktivierung durch die lebermikrosomale Fraktion notwendig, um positive Effekte im HPRT-Test zu beobachten. Die Versuche mit Gesamprim (als Atrazin-Präparat) bestätigen dabei die Untersuchungen mit Atrazin qualitativ, aber nicht quantitativ. Dies könnte an der Verfügbarkeit des Atrazins in der Zubereitungsform liegen oder am Vorhandensein von Verunreinigungen.

Ohne metabolische Aktivierung führte die Kombination von Quercetin mit einem der Herbizide oder mit beiden Herbiziden in keinem Fall zu einer mutagenen Wirkung, die signifikant stärker war als die der Einzelsubstanzen. Mit metabolischer Aktivierung war die Kombinationswirkung bei hoher Dosierung unteradditiv, was für eine antimutagene Wirkung des Quercetins spricht. Diese Beobachtung ist kein Einzelfall, denn immer mehr Berichte zeigen, daß Quercetin, Antioxidantien und andere natürliche, pflanzliche Inhaltsstoffe sowie komplexe Extrakte aus verschiedenen Pflanzen inhibitorisch auf mutagene und genotoxische Wirkungen anderer Verbindungen wirken können (6, 12, 14). Soasa und Marletta zeigten, daß Quercetin die Cytochrom p450-abhängige Monooxygenaseaktivität hemmen kann (23).

Hinsichtlich der ursprünglichen Fragestellung nach Kombinationseffekten des pflanzlichen Inhaltsstoffes Quercetin mit den Herbiziden Atrazin und Cyanazin in Mutagenitätstests ist festzustellen, daß keine Hinweise auf eine synergistische Wirkung gefunden wurden. Im Gegenteil traten, vor allem bei hohen Testkonzentrationen, unteradditive Wirkungen auf, deren Wirkungsmechanismen noch unklar sind.

Literatur

1. Ames BN, McCann J, Yamasaki E (1975) Methods for detecting carcinogens and mutagens with the Salmonella/mammalian-microsome mutagenicity test. *Mutation Res* 31:347–364
2. Arcos JC, Woo JT, Lai DY (1988) Data basis on binary combination effects of chemical carcinogens. *Environ Carcinog Rev* 6:1–150
3. Berger MR, Schmähl D, Edler L (1990) Implications of the carcinogenic hazard of low doses of three hepatocarcinogenic N-nitrosamines. In *J Cancer Res* 81:598–606
4. Berger MR (1991) Risk assessment of exposure to three carcinogens with different organotropy in rats. Nitroso compounds: Biological mechanisms, exposures and cancer etiology. Kona, Hawaii, International Agency for Research on Cancer, pp 49
5. Bjeldanes LF and Chang GW (1977) Mutagenic activity of quercetin and related compounds. *Science* 197:577–578
6. Peryt B, Miloszevska J, Tudek B, Zielenska M and Szymczyk T (1988) Antimutagenic effects of several subfractions of extract from wheat sprout toward benzo(a)pyrene-induced mutagenicity in strain TA98 of Salmonella typhimurium. *Mutation Res* 206:221–225
7. Brown JP (1980) A review of the genetic effects of naturally occurring flavonoids, anthraquinones and related compounds. *Mutation Res* 75:243–277
8. Butler MA, Hoagland RE (1989) Genotoxicity assessment of atrazine and some major metabolites in the Ames test. *Bull Environment Contam Toxicol* 43:797–804
9. Diehl JF (1992) Die toxische Gesamtsituation heute. Gedanken zum WHO-Bericht „Diet, Nutrition and the Prevention of Chronic Disease“. *Z Ernährungswiss* 31:225–245
10. Elliger CA, Henika PR and Mac Gregor IT (1984) Mutagenicity of flavones, chromones and acetophenones in Salmonella typhimurium. *Mutation Research* 135:77–86
11. Falk HL (1976) Possible mechanisms of combination effects in chemical carcinogenesis. *Oncology* 33:77–85
12. Gentil JM and Gentil GJ (1991) The metabolic activation of 4-nitro-o-phenylenediamine by chlorophyll-containing plant extracts: The relationship between mutagenicity and antimutagenicity. *Mutation Res* 250:79–86
13. Gupta RS (1984) Genetic markers for quantitative mutagenesis studies in Chinese hamster ovary cells: application to mutagen screening studies. In: Kilbey BJ and Legators M, eds, *Handbook of Mutagenicity Test Procedures*, 2nd edit, Elsevier, Amsterdam, 291–310
14. Hayatsu H, Arimoto S and Negishi T (1988) Dietary inhibitors of mutagenesis and carcinogenesis. *Mutation Res* 202:429–446
15. Kommission für Pflanzenschutz, Pflanzenbehandlungs- und Vorratsschutzmittel der Deutschen Forschungsgemeinschaft, Mitteilung IX (1975) Wirkungen von Kombinationen der Pestizide. DFG, Bonn-Bad Godesberg
16. Macgregor JT and Jurd L (1987) Mutagenicity of plant flavonoids: structural requirements for mutagenic activity in S. typhimurium. *Mutation Res* 54:297–309
17. Mathias M, Gilot-Delhalle J, Moutschen J (1989) Mutagenicity of atrazine in Schizosaccharomyces pombe with and without metabolic activation by maize. *Environm Exp Bot* 29:237–240
18. Matijesevic Z, Erceg Z, Denic R, Bacun V, Alacevic M (1980) Mutagenicity of herbicide cyanazine: plant activation bioassay. *Mutat Res* 74:212
19. Meisner LF, Belluck DA, Roloff BD (1992) Cytogenetic effects of alachlor and/or atrazine in vivo and in vitro. *Environm Molec Mutagen* 19:77–82
20. Moriya M, Ohta T, Watanabe K, Miyazawa T, Kato K, Shirasu Y (1983) Further mutagenicity studies on pesticides in bacterial reversion assay systems. *Mutation Res* 116:185–216
21. Perry P, Wolff S (1974) New Giemsa method for differential staining of sister chromatids. *Nature (London)* 251:156–158
22. Pool BL (1988) Short-term tests as a tool in the identification of combinations and of combination effects in carcinogenesis. In: Schmähl D (ed), *Combination Effects in Chemical Carcinogenesis*, VCH Verlagsgesellschaft, Weinheim, pp 45–64
23. Soasa RL and Marletta MA (1985) Inhibition of cytochrome P-450 activity in rat liver microsomes by the naturally occurring flavonoid quercetin. *Arch Biochem Biophys* 240:345–357
24. Takayama S, Hasegawa H, Ohgaki H (1989) Combination effects of forty carcinogens administered at low doses to male rats. *Jpn J Cancer Res* 80:732–736

25. Vrijssen R, Michotte Y and Boeyé A (1990) Metabolic activation of quercetin mutagenicity. *Mutation Res* 232:243–248
26. WHO (1990) Atrazine Health and Safety Guide, Health and Safety Guide no 47, Geneva

Eingegangen 16. Juli 1992

akzeptiert 2. April 1993

Für die Verfasser:

Prof. Dr. Beatrice L. Pool-Zobel, Institut für Hygiene und Toxikologie, Bundesforschungsanstalt für Ernährung, Engesserstraße 20, 7500 Karlsruhe