

Teratogene Wirkung der N-Phthalyl-DL-glutaminsäure nach intraperitonealer Applikation bei der Maus

In der vorliegenden Untersuchung soll N-Phthalyl-DL-glutaminsäure, ein sekundäres Hydrolysenprodukt des Thalidomids, erneut auf eine etwaige teratogene Wirkung geprüft werden. Die Dosis wird hierbei im Unterschied zu den Versuchen anderer Autoren¹⁻⁴ extrem hoch gewählt, um eine möglichst hohe Substanzkonzentration am Wirkungsort zu erreichen. Die Applikation wird i.p. erfolgen, damit die im Magen-Darm-Trakt durch hydrolytische oder enzymatische Prozesse möglichen Veränderungen ausgeschlossen sind. Die wässrige Injektionslösung enthält noch Tween 20⁵ als Lösungsvermittler; hierdurch wird die Wasserlöslichkeit der zu applizierenden Dicarbonsäure wesentlich erhöht und die Herstellung einer 3,2 %igen Lösung ermöglicht.

Die Untersuchung erfolgte an 68 Mäusen des Inzuchtstammes SWS. Die Tiere erhielten Standardpressfutter (Fa. Latz) und Wasser ad libitum; sie wurden in Makrolonkäfigen (Fa. Altromin) gehalten. Die Raumtemperatur betrug $24 \pm 1^\circ\text{C}$, die relative Luftfeuchtigkeit 60%. Eine automatische Schaltung sorgte für einen 12stündigen Tag/Nacht-Rhythmus.

Durch Vaginalabstrich und tägliche Bestimmung des Körpergewichtes wurde der Zyklus kontrolliert und zum Zeitpunkt der Ovulation die künstliche Besamung vorgenommen⁶.

Jedem Tier in Gruppe I verabreichten wir zwischen dem 6. und 10. Tag p.c. eine einmalige Dosis von 320, 640 bzw. 1280 mg/kg N-Phthalyl-DL-glutaminsäure⁷ als i.p. Injektion (Tabelle). Die Applikation erfolgte als 3,2%ige Lösung in einer Mischung aus physiologischer Kochsalzlösung und Tween 20 im Verhältnis 3:1.

Zur Kontrolle des Lösungsmiteleinflusses injizierten wir jeder Maus in Gruppe II 40 ml/kg physiologische Kochsalzlösung und in Gruppe III 40 ml/kg eine Mischung aus physiologischer Kochsalzlösung und Tween 20 im Verhältnis 3:1. Die Verabreichung erfolgte i.p. als einmalige Dosis am Tag 7, 8, 9 oder 10 p.c., jeweils bei einer gleich grossen Tierzahl.

18½ Tage p.c. wurden die Mäuse aller Gruppen in Äthernarkose schnittentbunden. Zur Charakterisierung

der Würfe dienten folgende Kriterien: Anzahl der Implantationen, Zahl der Resorptionen sowie Gesamtzahl der Feten und Zahl der Feten mit Missbildungen. Die Feststellung von Missbildungen erfolgte unter einer Stereolupe an den lebenden schnittentbundenen Feten sowie an deren mit Kalilauge geklärten und mit Alizarinrot gefärbtem Skelett⁸.

Folgende Befunde wurden erhoben: Zwischen dem 7. und 10. Tag p.c. wirkt eine einmalige Dosis von 640 mg/kg N-Phthalyl-DL-glutaminsäure teratogen; am empfindlichsten reagieren die Tiere am 8. und 9. Tag p.c. Die Resorptionsraten sind bei allen Dosierungen an sämtlichen Applikationstagen gegenüber den Kontrollen (Gruppe III) deutlich erhöht; die Differenzen zwischen Versuchs- und Kontrolltieren lassen sich mit Ausnahme der am Tag 10 p.c. mit 640 mg/kg behandelten Mäuse auf dem 5%-Niveau statistisch sichern⁹. Gegenüber dem Tag 9 hat die applizierte Substanz am 10. Tag nur noch geringe Effekte, wie der steile Abfall der Missbildungs- und der Resorptionsrate zeigt.

Die missgebildeten Feten lassen zwei verschiedene Lokalisationen der Missbildungen erkennen: In der ersten

¹ H. KEBERLE, P. LOUSTALOT, R. K. MALLER, J. W. FAIGLE und K. SCHMID, *Ann. N.Y. Acad. Sci.* 123, 252 (1965).

² S. FABRO, H. SCHUMACHER, R. L. SMITH, R. B. L. STAGG und R. T. WILLIAMS, *Biochem. J.* 90, 5P (1964).

³ S. FABRO, H. SCHUMACHER, R. L. SMITH, R. B. L. STAGG und R. T. WILLIAMS, *Br. J. Pharmac.* 25, 352 (1965).

⁴ R. L. SMITH, S. FABRO, H. SCHUMACHER und R. T. WILLIAMS, in *Embryopathic Activity of Drugs* (J. und A. Churchill, London 1965), p. 205.

⁵ Tween 20 = Polyoxyäthylen-(20)-sorbitanmonolaurat. Verwendet wurde Tween 20 rein, $M \sim 1200$; Serva GmbH & Co., Heidelberg.

⁶ J. C. KILE JR., *Anat. Rec.* 109, 109 (1951).

⁷ N-Phthaloyl-DL-glutaminsäure puriss.; Fluka AG, Buchs, Schweiz.

⁸ D. D. CRARY, *Stain Technol.* 37, 124 (1962).

⁹ L. SACHS, *Statistische Auswertungsmethoden* (Springer, Berlin – Heidelberg – New York 1968).

Embryotoxische Wirkung der N-Phthalyl-DL-glutaminsäure in Kombination mit Tween 20 nach i.p. Applikation bei der Maus

Gruppe Nr.	Verabreichte Substanz	Applikation am Tag p.c.	Dosis ^a	Muttertiere	Implantationen I	Resorptionen		Feten Gesamt F	Missgebildet	
						R	R/I [%]		M	M/F [%]
I	N-Phthalyl-DL-glutaminsäure ^a	6	640 mg/kg	2	28	7	25,0	21	0	0
		7	320 mg/kg	1	18	6	33,3	12	0	0
		7	640 mg/kg	3	48	13	27,1	35	13	37,1
		8	320 mg/kg	1	16	5	31,3	11	0	0
		8	640 mg/kg	4	70	48	68,6	22	14	63,6
		9	320 mg/kg	1	13	3	23,1	10	0	0
		9	640 mg/kg	4	47	30	63,8	17	16	94,1
		10	640 mg/kg	2	26	3	11,5	23	2	8,7
		10	1280 mg/kg	2	28	14	50,0	14	3	21,4
II	physiol. NaCl-Lösung	7, 8, 9 oder 10	40 ml/kg	16	218	6	2,8	212	0	0
III	physiol. NaCl-Lösung + Tween 20 ^b	7, 8, 9 oder 10	40 ml/kg	16	208	10	4,8	198	0	0
IV	(Normaltiere)	–	–	16	205	7	3,4	198	0	0

^a Verabreicht als 3,2%ige Lösung in einer Mischung aus physiologischer Kochsalzlösung und Tween 20 im Verhältnis 3:1. ^b Physiologische Kochsalzlösung und Tween 20 gemischt im Verhältnis 3:1. ^c Die Verabreichung erfolgte als einmalige i.p. Injektion.

Gruppe treten ausschliesslich Anomalien im Schädelbereich (Exencephalien) auf; in der zweiten finden sich Missbildungen im Bereich der Extremitäten, der Rippen und der Wirbelsäule, während die Kopffregion unverändert ist. Die Feten mit Exencephalie entstammen den Applikationstagen 7 und 8 p.c. Die den Tagen 9 und 10 p.c. entstammenden Feten weisen überwiegend Aplasien der langen Knochen auf. Häufig ist die paraxiale-radiale Aplasie mit einer Tibiaaplasie verbunden; bei vielen Feten fehlen der Femur und die Tibia bei gleichzeitiger paraxialer Aplasie der Metatarsen und Phalangen. Vereinzelt ist eine Amelie vorhanden. An weiteren Missbildungen werden in dieser Gruppe Gabelrippen und Verschmelzungen der Rippen beobachtet; manchmal sind einzelne Rippen überhaupt nicht vorhanden, oder es fehlen ventrale und dorsale Knochenkerne der Wirbel. Über die einzelnen Missbildungsformen und ihren Vergleich mit denen nach Gabe von Thalidomid wird später berichtet.

Diese Ergebnisse zeigen, dass N-Phthalyl-DL-glutaminsäure bei der SWS-Maus eine starke teratogene Wirkung besitzt, wenn die Applikation i.p. als Lösung in einer Mischung aus physiologischer Kochsalzlösung und Tween 20 erfolgt. Hiermit erweist sich erstmals eine Substanz als teratogen, die in vivo aus Thalidomid durch nicht-

enzymatische Hydrolyse entsteht¹ und somit im Organismus als ständige Begleitsubstanz des Thalidomids auftritt^{10,11}.

Summary. Phthaloyl-DL-glutamic acid, a metabolite of thalidomide, was found to exert a teratogenic effect after i.p. administration to pregnant mice. The injected solution contained Tween 20 as solubilizer.

F. KÖHLER und H. OCKENFELS¹²

*Institut für Humangenetik der Universität Bonn,
Wilhelmsplatz 7, D-53 Bonn (Deutschland),
23. März 1970.*

¹⁰ R. T. WILLIAMS, H. SCHUMACHER, S. FABRO und R. L. SMITH, in *Embryopathic Activity of Drugs* (J. und A. Churchill, London 1965), p. 177.

¹¹ S. FABRO, H. SCHUMACHER, R. L. SMITH und R. T. WILLIAMS, *Nature* 201, 1125 (1964).

¹² Neue Anschrift: Abteilung für Biochemie der Universität Ulm, Parkstrasse 11, D-79 Ulm (Deutschland).

Entwicklungsleistungen transplanteder Genital- und Analanlagen von *Musca domestica* und *Phormia regina*

Bei *Drosophila melanogaster* gehen aus der Genital-Imaginalscheibe der Larve während der Metamorphose mit Ausnahme der Gonaden alle imaginalen Teile des äusseren und inneren Genitalapparates sowie die Analregion mit dem Enddarm hervor^{1,2}. Bei Calliphoridae wie *Phormia regina* und *Calliphora erythrocephala*^{3,4} sowie bei Musciden entstehen diese Organe aus drei Imaginalscheiben, nämlich der medianen Genitalscheibe und den beiden lateral gelegenen Nebengenitalscheiben (Figur 1). Um die prospektive Bedeutung dieser postabdominalen Imaginalscheiben zu untersuchen, wurden sie aus Larven des späten dritten Stadiums herauspräpariert und in die Körperhöhle gleichaltriger Wirte implantiert⁵, mit denen sie gemeinsam metamorphosieren.

Die weiblichen Genital- und Analorgane sind in Figur 2 dargestellt. Zwischen den beiden Arten *Musca domestica* und *Phormia regina* bestehen morphologisch im weiblichen Postabdomen nur geringfügige Unterschiede: In beiden werden stets drei Spermatheken ausgebildet, wobei in der Regel deren zwei zusammenhängen und zufallsmässig entweder rechts oder links des Oviduktes liegen. In *Musca* ist die Einzelspermatheke den beiden anderen gleich, bei *Phormia* dagegen ist sie länglich verformt und deshalb vom Spermathekenpaar gut zu unterscheiden. Die zwei Kopulationsblasen hängen bei *Musca* beidseitig als leicht erkennbare Säcke am Uterus. Bei *Phormia* werden keine solchen Blasen ausgebildet, hingegen sind die dorsalen und ventralen Divertikel des Uterus in beiden Arten sehr ähnlich gestaltet. Des weiteren hat *Phormia* nur eine Sternalplatte im 8. Abdominalsegment; bei *Musca* ist dieses Element paarig ausgebildet.

Als isoliertes Implantat liefert die mediane Genitalscheibe nach der Metamorphose die ventrale und dorsale Analplatte mit den beiden Cerci und den Enddarm (Figur 3) sowie – als einziges Element des Genitalapparates – die Parovarien (Kittdrüsen).

Beide Nebengenitalscheiben entwickeln als Implantat je die gleichen Imaginalstrukturen, die sich nur anhand weniger charakteristischer Borsten der linken bzw. rechten Körperseite zuordnen lassen. Bei *Musca* liefert eine jede Nebengenitalscheibe einen Tergiten und einen Sterniten des 8. Abdominalsegmentes, den Ovidukt, zwei Kopulationsblasen, den Uterovaginaltubus und zwei Spermatheken (Figur 4). Zuweilen treten auf dem 8. Sterniten überzählige Borsten auf, und in seltenen Fällen werden statt zwei sogar drei Spermatheken ausgebildet. Metamorphosierte Nebengenitalscheibenimplantate von *Phormia* unterscheiden sich von *Musca*-Implantaten darin, dass die beiden Spermatheken ungleich sind. Es wird stets eine lange Einzelspermatheke neben einer eiförmigen differenziert. Zudem bringt eine *Phormia*-Nebengenitalscheibe nicht einen ganzen 8. Sterniten, sondern nur eine Sagittalhälfte des unpaaren Sterniten 8 hervor.

Die mediane Genitalscheibe von *Musca* und *Phormia* liefert also – mit Ausnahme der Parovarien – nur Analstrukturen. Alle anderen Teile des inneren Genitalapparates, deren Anlagen bei *Drosophila* im Zentrum der Genitalscheibe liegen¹, sind ausschliesslich Derivate der Nebengenitalscheiben. Die Entwicklung der Genital- und Analorgane muss also als Integrationsleistung der beiden

¹ E. HADORN und H. GLOOR, *Rev. Suisse Zool.* 53, 495 (1946).

² E. HADORN, G. BERTANI und J. GALLERA, *Wilhelm Roux' Arch. EntwMech. Org.* 144, 31 (1949).

³ L. BRÜEL, *Zool. Jb. Anat.* 10, 511 (1897).

⁴ W. EMMERT, *Zool. Inst., D-Würzburg*, in Vorbereitung. Gemäss einer persönlichen Mitteilung wurden gleichzeitig und unabhängig von dieser Arbeit entsprechende Untersuchungen an *Calliphora erythrocephala* ausgeführt, die zu weitgehend übereinstimmenden Resultaten geführt haben.

⁵ B. EPHRUSSI und G. W. BEADLE, *Am. Nat.* 70, 218 (1936).