

Embryotoxische Wechselwirkungen zwischen einem Hydrolysenprodukt des Thalidomids und dem Tensid Tween 20 bei der Maus

Embryotoxic Interactions between a Hydrolysis Product of Thalidomide and the Surfactant Tween 20 in Mice

Ursula Kocher-Becker, Walter Kocher

Institut für Toxikologie und Embryonalpharmakologie, Freie Universität Berlin, Garystraße 5, D-1000 Berlin 33, Bundesrepublik Deutschland

und

Heinrich Ockenfels

Abteilung Physiologische Chemie, Universität Ulm, Albert-Einstein-Allee 11, D-7900 Ulm, Bundesrepublik Deutschland

Z. Naturforsch. **47c**, 155–169 (1992); received July 17, 1991

Embryotoxicity, Thalidomide, Surfactant Tween 20, Synergistic Interaction, Mouse

N,N-phthaloyl-L-glutamic acid (NPLG), a hydrolysis product of thalidomide, and the surfactant Tween 20 were co-administered intraperitoneally to pregnant NMRI mice on days 9 and 8½ p.c. at doses where the hydrolysis product as well as the surfactant alone induce minimal embryotoxicity. The combined substances (350 mg/kg NPLG + 1.0 ml/kg Tween 20) caused a potentiative teratogenic and an additive embryoethal response. Enhancement of the amount of Tween 20 in the combinations to 2.5 ml/kg led to the same potentiative teratogenic and, in addition, potentiative embryoethal response. Distribution studies using ¹⁴C-NPLG showed a strongly increased NPLG content in the maternal plasma under the influence of 2.5 ml/kg Tween 20 but not after co-administration with 1.0 ml/kg Tween 20.

The malformations obtained were of the same type in all groups and mostly located in the vertebrae and ribs. These axial and paraxial defects were frequently more severe and included more affected elements after application of the combined than of the single substances. Extension of our experiments with the combined substances to treatment days 8½ and 9½ p.c. revealed that the first affected segment shifts in caudal direction depending on an increasing embryonal age at treatment. Limb malformations occurred at a low frequency; most of them were of the same type as described in cases of human thalidomide embryopathy.

Einleitung

Wechselwirkungen zwischen teratogenen Faktoren haben mit steigender Chemikalien- und Arzneimittelproduktion für die Grundlagenforschung an Bedeutung gewonnen. Aus der teratogenen Wirksamkeit einzelner Faktoren läßt sich nicht ohne weiteres auf die teratogenen Effekte nach ihrer gemeinsamen Anwendung schließen: die Mißbildungsrate kann nach kombinierter Anwendung zweier oder mehrerer Teratogene gegenüber der Summe der Mißbildungsraten der Einzelfaktoren erniedrigt und im Extremfall gleich Null sein, sie kann der Mißbildungsrate eines der Faktoren entsprechen, sie kann ein additives Verhalten zeigen oder gar über der Summe der teratogenen Einzelwirkungen liegen (Übersicht bei [1]). Auch Verän-

derungen des Schweregrades [2] und der Art [3, 4] der Mißbildungen nach kombinierter Anwendung teratogener Faktoren wurden beschrieben. Von besonderer, auch praktischer Bedeutung sind Wechselwirkungen mit überadditiven Effekten, vornehmlich dann, wenn die Einzelfaktoren nur schwach wirksam sind. Selbst die gemeinsame Applikation von Substanzen in subteratogenen Dosen, die einzeln angewandt keinerlei Wirkung zeigen, kann zu zahlreichen und schweren teratogenen Effekten führen [5].

Als Kombination zweier Teratogene, bei der mit entsprechenden Wechselwirkungen gerechnet werden muß, ist auch die Applikation eines Pharmakons zusammen mit einem Lösungsmittel oder Lösungsvermittler anzusehen, wenn sowohl die Substanz selbst als auch das Vehikel teratogene Wirkungen aufweisen. In früheren Versuchen an der Maus konnten wir zeigen, daß das Tensid Tween 20, welches von einigen Autoren [6, 7] als Lösungsvermittler für Thalidomid benutzt wurde,

Reprint requests to Dr. U. Kocher-Becker.

Verlag der Zeitschrift für Naturforschung, D-7400 Tübingen
0939–5075/92/0100–0155 \$ 01.30/0



Dieses Werk wurde im Jahr 2013 vom Verlag Zeitschrift für Naturforschung in Zusammenarbeit mit der Max-Planck-Gesellschaft zur Förderung der Wissenschaften e.V. digitalisiert und unter folgender Lizenz veröffentlicht: Creative Commons Namensnennung-Keine Bearbeitung 3.0 Deutschland Lizenz.

Zum 01.01.2015 ist eine Anpassung der Lizenzbedingungen (Entfall der Creative Commons Lizenzbedingung „Keine Bearbeitung“) beabsichtigt, um eine Nachnutzung auch im Rahmen zukünftiger wissenschaftlicher Nutzungsformen zu ermöglichen.

This work has been digitalized and published in 2013 by Verlag Zeitschrift für Naturforschung in cooperation with the Max Planck Society for the Advancement of Science under a Creative Commons Attribution-NoDerivs 3.0 Germany License.

On 01.01.2015 it is planned to change the License Conditions (the removal of the Creative Commons License condition “no derivative works”). This is to allow reuse in the area of future scientific usage.

eine teratogene Eigenwirkung besitzt [8]. Die von Tween 20 ausgelösten Mißbildungen sind für die von uns untersuchte Behandlungsphase von der gleichen Art, wie sie von N,N-Phthaloyl-L-glutaminsäure (NPLG), einem Hydrolysenprodukt des Thalidomids, hervorgebracht werden [9].

In den hier folgenden Versuchen wird gezeigt, daß durch Kombination des Hydrolysenproduktes NPLG mit dem Tensid Tween 20 eine Steigerung des Mißbildungseffektes im Sinne einer Potenzierung eintritt. In ergänzenden Verteilungsstudien mit ^{14}C -NPLG wird nachgewiesen, daß unter dem Einfluß einer ausreichend hohen Dosis Tween 20 der Gehalt an NPLG im Plasma der Muttertiere stark erhöht wird.

Material und Methoden

Substanzen

N,N-Phthaloyl-L-glutaminsäure (NPLG) wurde aus L-Glutaminsäure durch Phthaloylierung mit N-Ethoxycarbonyl-phthalimid gewonnen [10, 11]: Schmp. 160–161 °C (H_2O); $[\alpha]_{\text{D}}^{22} = -48,4^\circ$ ($c = 3,0$; Dioxan). ^{14}C -N,N-Phthaloyl-L-glutaminsäure (^{14}C -NPLG), spezifische Aktivität 25,3 $\mu\text{Ci}/\text{mmol}$ (1 $\mu\text{Ci} = 37 \text{ kBq}$), wurde nach dem gleichen Verfahren unter Verwendung von L-[U- ^{14}C]Glutaminsäure, 275 mCi/mmol (Amersham Buchler, Braunschweig), hergestellt. Das verwendete Tween 20 (Polyoxyethylen-sorbitan-monolaurat; MG *ca.* 1200) war ein Handelsprodukt (Serva, Heidelberg).

Versuchstiere und Haltung

NMRI-Mäuse (Han, Auszucht; Zentralinstitut für Versuchstierkunde, Hannover) wurden in einem regelmäßigen Hell(11 h) – Dunkel(13 h)-Rhythmus gehalten (Raumtemperatur 20–22 °C, relative Luftfeuchtigkeit 50–60%). Die Tiere erhielten Altromin-Standardfutter 1324 und Wasser *ad libitum*. Je 5 nullipare Weibchen wurden am Morgen von 7–9 Uhr mit einem Männchen verpaart. Stattgefunden Besamungen wurden durch Pfropfkontrolle festgestellt (Stunde 0 der Trächtigkeit).

Herstellung von Lösungen

1. NPLG: 400 mg NPLG wurden in 20,0 ml 0,9-proz. NaCl-Lösung bei 75–80 °C gelöst. Anschlie-

ßend wurde die Lösung in ein Wasserbad von 40 °C eingestellt und bis zur Applikation mindestens 10–15 min darin stengelassen. Die Substanz blieb unter diesen Bedingungen gelöst und unverändert.

2. Tween 20: a) Zur Injektion von 1,0 ml/kg Tween 20 wurde Tween 20 mit 0,9-proz. NaCl-Lösung im Verhältnis 1:9 gemischt; b) Injektion von 2,5 ml/kg Tween 20: Tween 20 und 0,9-proz. NaCl-Lösung im Verhältnis 1:3.

3. NPLG + Tween 20: Die gemeinsame Verabreichung von 400 mg/kg NPLG und 1,0 ml/kg Tween 20 durch einmalige i.p.-Injektion ist aus Löslichkeitsgründen nicht möglich; der NPLG-Anteil wurde daher in beiden Kombinationen auf 350 mg/kg gesenkt. a) Zur Injektion von 350 mg/kg NPLG + 1,0 ml/kg Tween 20 wurden 700 mg NPLG, fein gepulvert, mit 2,0 ml Tween 20 versetzt und 30 min bei Raumtemperatur mit einem Magnetrührer gerührt. Dann wurden 18,0 ml 0,9-proz. NaCl-Lösung innerhalb 15–25 min unter Rühren zugetropft und noch 5 min nachgerührt; b) Injektion von 350 mg/kg NPLG + 2,5 ml/kg Tween 20: 700 mg NPLG/5,0 ml Tween 20/15,0 ml NaCl (0,9%); c) Injektion von 200 mg/kg NPLG + 1,0 ml/kg Tween 20: 400 mg NPLG/2,0 ml Tween 20/18,0 ml NaCl (0,9%); d) Injektion von 200 mg/kg NPLG + 2,5 ml/kg Tween 20: 400 mg NPLG/5,0 ml Tween 20/15,0 ml NaCl (0,9%).

Die ^{14}C -NPLG enthaltenden Lösungen wurden in kleinerem Maßstab in analoger Weise hergestellt. Alle Lösungen wurden innerhalb 1 h nach der Herstellung appliziert. NPLG bleibt während dieser Zeit in den Lösungen stabil; auf den Radiochromatogrammen können keinerlei Zerfallsprodukte nachgewiesen werden [12].

Durchführung der teratologischen Versuche

Die trächtigen Weibchen erhielten am Tag 8½, 8¾, 9 oder 9½ p.c. eine einmalige intraperitoneale Injektion von NPLG, Tween 20 oder einer Kombination von NPLG + Tween 20. NPLG wurde als *ca.* 40 °C warme Lösung appliziert. Die verabreichten Volumina waren 20 ml/kg Körpergewicht bei 400 mg/kg NPLG bzw. 40 ml/kg bei 800 mg/kg NPLG; von allen übrigen Lösungen wurden 10 ml/kg verabreicht. Eine Gruppe von Kontrolltieren erhielt eine i.p.-Injektion von 20 ml/kg, eine zweite eine Injektion von 40 ml/kg einer 0,9-proz. NaCl-Lösung, eine dritte blieb unbehandelt.

Auswertung der teratologischen Versuche

Am Tag 16 oder am Tag 18 p.c. wurden die Muttertiere getötet, die Uteri eröffnet und die Anzahl der Implantationen, der Resorptionen sowie die Anzahl der lebenden und toten Feten registriert. Die Feten wurden entnommen und unter einem Stereomikroskop auf äußere Mißbildungen untersucht. Anschließend wurden die lebenden Feten mit Chloroform abgetötet; in sämtlichen Fällen wurde das Skelett im Totalpräparat dargestellt (s.u.). Beim Eviscerieren wurden das Vorhandensein und die normale Größe der Nieren überprüft. Die Analyse der Skelette erfolgte unter einem Stereomikroskop.

Folgende geringe Abweichungen vom Normalskelett, die im NMRI-Stamm auch bei Feten unbehandelter Muttertiere vorkommen, wurden nicht als Mißbildungen gewertet: einseitiges oder paariges Vorhandensein einer 14. Rippe, Auftreten von kleinen postaxialen Anhängen an den Vorderextremitäten (manchmal mit ein oder zwei Knorpel-elementen) sowie geringfügige Formveränderungen des Xiphoidfortsatzes und der Wirbelbögen von Atlas und Axis.

Herstellung der Skelettpräparate

Zur vollständigen Erfassung der skeletalen Mißbildungen wurde die von Wassersug [13] für niedere Vertebraten entwickelte Methode zur gleichzeitigen Darstellung der Knorpel- und Knochenelemente des Skeletts abgewandelt und den speziellen Erfordernissen des Mäusefetus angepaßt: Die Feten wurden evisceriert, 18tägig entnommene zusätzlich gehäutet (beide Präparationsschritte werden durch vorheriges Einfrieren der Feten bei -20°C erleichtert), mindestens 3 Tage in einem 1:3-Gemisch von Formol und 0,9-proz. NaCl-Lösung fixiert, 2 Tage in mehrfach gewechseltem Aqua dest. gewässert, 4 Tage mit Alcianblau gefärbt (9 mg Alcianblau 8 GS + 60 ml 100-proz. Ethanol + 40 ml Eisessig), 8 Tage in täglich gewechseltem Ethanol (100%) gehalten, 3 Tage in 2-proz. KOH mazeriert, 4 Tage mit Alizarinrot S gefärbt (18 ml 0,5-proz. Stammlösung in 1-proz. KOH + 982 ml 0,5-proz. KOH), 2 Tage in einmal gewechseltem 50-proz. Glycerin aufgehellt und danach in 100-proz. Glycerin überführt, das im Verlauf der folgenden Wochen noch zweimal gewechselt wurde.

Verteilungsstudien mit ^{14}C -NPLG

24 trächtige Mäuse erhielten am Tag 9 p.c. eine einmalige intraperitoneale Injektion von ^{14}C -NPLG (400 mg/kg) oder einer Kombination von ^{14}C -NPLG + Tween 20 (350 mg/kg + 1,0 ml/kg bzw. 350 mg/kg + 2,5 ml/kg). Nach Ablauf von 2 h wurde unter Ethernarkose durch Herzpunktion Blut gewonnen, danach wurden die Tiere durch Cervicaldislokation getötet. Von Leber und Muskel (Oberschenkel) wurden jeweils 2 Proben von ca. 100 mg genommen. Anschließend wurde der Uterus entnommen und mehrere Male mit 0,9-proz. NaCl-Lösung gewaschen. Die Embryonen wurden unter einem Stereomikroskop herauspräpariert und mehrmals in NaCl-Lösung (0,9%) gewaschen [12].

Für die Radioaktivitätsmessung mußten wegen der relativ geringen spezifischen Aktivität der verwendeten ^{14}C -N,N-Phthaloyl-L-glutaminsäure sämtliche Embryonen einer Versuchsgruppe (8 Muttertiere) zusammengefaßt werden. Die Embryonen und Gewebeproben wurden mit Soluene-350 (Packard, Downers Grove, U.S.A.) über Nacht bei 50°C solubilisiert. Als Szintillator wurde UNISOLVE 1 (Zinsser, Frankfurt) verwendet. Zur Radioaktivitätsmessung diente ein Flüssigkeitsszintillationszähler (Packard, Modell 2425). Die Meßwerte wurden um den Leerwert korrigiert und unter Verwendung eines internen Standards auf μg NPLG/ml Plasma bzw. μg NPLG/g Gewebe (Frischgewicht) umgerechnet. Allen Konzentrationsangaben für Plasma, Leber und Muskel liegen Doppelbestimmungen zugrunde.

Statistik

Für die einzelnen Behandlungsgruppen wurden die Implantationen, Resorptionen und Feten – getrennt in tot, lebend und mißbildet (lebend) – der zu dieser Gruppe gehörenden Würfe zusammengefaßt. Die Prüfung auf statistisch signifikante Unterschiede zwischen den Gruppen wurde nach der χ^2 -Methode mit Hilfe von Kontingenztafeln [14] durchgeführt (Signifikanzgrenze: $p < 0,05$). Die Effekte in einer Kombinationsgruppe (NPLG + Tween 20) wurden nur dann als verschieden von denen der entsprechenden Gruppen mit Verabreichung der Einzelsubstanzen (NPLG oder Tween 20) angesehen, wenn sich gegenüber jeder der beiden Gruppen signifikante Unterschiede ergaben.

Die Frage, ob die Lage des ersten mißbildeten Würfels bzw. der ersten mißbildeten Rippe entlang der cranio-caudalen Achse vom Zeitpunkt der Behandlung abhängig ist, wurde mit Hilfe der Varianzanalyse und anschließendem Mittelwertsvergleich nach Scheffé [14] geprüft.

Ergebnisse

Teratologische Untersuchungen

Die embryoletalen und teratogenen Wirkungen von NPLG, Tween 20 sowie von Kombinationen unterschiedlicher Dosen beider Substanzen nach Applikation am Tag 9 p.c. sind in Tab. I zusammengestellt.

NPLG hat bei einer Dosis von 400 mg/kg Körpergewicht im Vergleich zu den Kontrollen keinen Einfluß auf die Resorptionsrate (3,1%); die teratogene Wirksamkeit liegt an der unteren Grenze (Mißbildungsrate 3,4%). Eine Verdoppelung der Dosis auf 800 mg/kg erhöht die Resorptionsrate auf 8,6% ($p < 0,05$) und die Häufigkeit der Mißbildungen auf 19,0% ($p < 0,05$).

Tween 20 zeigt bei einer Dosis von 1,0 ml/kg nur eine geringe embryotoxische Wirkung (Resorptionsrate 7,2%; Mißbildungsrate 2,6%). Eine Erhöhung der Dosis auf 2,5 ml/kg erhöht die Resorptionsrate auf 21,1% ($p < 0,05$), die Mißbildungsrate auf 7,3% (n.s.).

Die Kombination von 350 mg/kg NPLG + 1,0 ml/kg Tween 20 führt zu einer Resorptionsrate von 9,3%, was etwa der Summe der Resorptionsraten nach Anwendung der Einzelsubstanzen (400 mg/kg NPLG bzw. 1,0 ml/kg Tween 20) entspricht. Die Mißbildungsrate dagegen wird auf 19,2% erhöht und liegt damit 3,2mal höher als die Summe der Mißbildungsrate nach Applikation vergleichbarer Mengen der Einzelkomponenten; ein überadditiver Effekt bei der Mißbildungsrate ist auch dann noch zu verzeichnen, wenn der Gehalt an NPLG in der Kombination auf annähernd die Hälfte (200 mg/kg) reduziert wird.

Die Kombination von 350 mg/kg NPLG mit der höheren Dosis Tween 20 (2,5 ml/kg) zeigt eine starke embryotoxische Wirkung: die Resorptionsrate ist in dieser Kombinationsgruppe auf 45,2% gestiegen und ist damit etwa doppelt so hoch wie die Summe der Resorptionsraten, die nach alleiniger Anwendung vergleichbarer Dosen von NPLG und Tween 20 auftraten. Auch die Mißbildungs-

rate zeigte mit 25,2% eine überadditive Erhöhung gegenüber 3,4% (NPLG) und 7,3% (Tween 20). Beide Effekte, die überadditive Erhöhung der Resorptionsrate und die überadditive Erhöhung der Mißbildungsrate, bleiben auch dann erhalten, wenn man nur 200 mg/kg NPLG gemeinsam mit der höheren Dosis Tween 20 (2,5 ml/kg) appliziert (Resorptionsrate 45,7%; Mißbildungsrate 20,6%). Die synergistischen Effekte lassen sich nicht zeigen, wenn auf die Zahl der Würfe mit mindestens einem mißbildeten Feten bezogen wird.

Über diese Ergebnisse hinaus lassen sich nach Anwendung der Kombination von 350 mg/kg NPLG + 2,5 ml/kg Tween 20 in einigen Fällen an den Muttertieren toxische Wirkungen erkennen, die bei den übrigen Gruppen nur in geringem Umfang in Erscheinung treten: 5 von 24 trächtigen Weibchen starben innerhalb dreier Tage nach der Applikation, zwei weitere abortierten im gleichen Zeitraum sämtliche Embryonen. In den drei Gruppen, die die höhere Dosis Tween 20 erhielten, sowie nach Gabe von 800 mg/kg NPLG sank bei einem Teil der trächtigen Weibchen das Körpergewicht innerhalb von 24 h nach Applikation deutlich ab und hatte nach weiteren 24 h wieder das Ausgangsniveau erreicht. Nicht in jedem Fall wurde eine Korrelation zwischen dem Gewichtsverlust des Muttertieres und dem Auftreten von Mißbildungen beobachtet.

Die Art der Mißbildungen (Tab. I unten) ist in allen untersuchten Gruppen ähnlich. Die Defekte manifestieren sich überwiegend im Skelett der Thorakal- und Lumbalwirbelsäule sowie in den Rippen. Es treten Verschmelzungen von Wirbelkörpern und/oder Wirbelbögen sowie von mehr oder minder großen Anteilen zweier bis vieler Rippen auf (Abb. 1a–c). Wirbel- und Rippenverschmelzungen sind einander meist segmental zugeordnet. Daneben finden sich Verlustmißbildungen in Form von Keilwirbeln, Schmetterlingswirbeln, Halbwirbeln oder Ausfällen einzelner oder mehrerer Wirbel und Rippen.

Der Umfang der Wirbel- und Rippenmißbildungen ist in den einzelnen Gruppen unterschiedlich. Bei Verabreichung der Einzelsubstanzen sind meist nur wenige Elemente betroffen, insbesondere nach Anwendung der niedrigeren Dosen. Die Substanzkombinationen verursachen neben Defekten geringen Umfangs häufig komplexe Mißbildungen, an denen zahlreiche axiale und paraxiale Ele-

Tab. I. Embryoletale und teratogene Wirkungen von N,N-Phthaloyl-L-glutaminsäure (NPLG), Tween 20 und Kombinationen von NPLG + Tween 20 nach einmaliger intraperitonealer Applikation am Tag 9 p.c.

	NPLG		Tween 20		NPLG + Tween 20				Kontrollen		
	400 mg/kg	800 mg/kg	1,0 ml/kg	2,5 ml/kg	200 mg/kg +1,0 ml/kg	200 mg/kg +2,5 ml/kg	350 mg/kg +1,0 ml/kg	350 mg/kg +2,5 ml/kg	NaCl (0,9%)	unbe- handelt	
Dosierung									20 ml/kg	40 ml/kg	–
Muttertiere, gesamt	14	15	7	20	6	11	10	24	3	11	17
Muttertiere, gestorben	0	0	0	1	0	0	0	5	0	0	0
Abortierte Würfe	0	1	0	1	0	1	1	2	0	0	0
Würfe mit mindestens einem mißbildeten Feten	3	9	2	8	3	4	6	8	0	1	1
Implantationen	159	163	83	213	75	116	118	188	34	116	193
Resorptionen	5	14	6	45	9	53	11	85	0	4	11
(%)	(3,1)	(8,6)	(7,2)	(21,1)	(12,0)	(45,7) ^c	(9,3)	(45,2) ^c	(0)	(3,4)	(5,7)
Feten:											
tot	6	2	0	3	0	0	3	0	0	1	0
lebend	148	147	77	165	66	63	104	103	34	111	182
mißbildet (lebend)	5	28	2	12	9	13	20	26	0	1	1
(%) ^a	(3,4)	(19,0)	(2,6)	(7,3)	(13,6) ^c	(20,6) ^c	(19,2) ^d	(25,2) ^c	(0)	(0,9)	(0,5)
Feten mit folgenden Mißbildungen											
Extremitäten											
Rippen + Wirbel											
Sonstige											
	1	1	0	2	0	0	0	0	0	0	0
	1	25	1	8	9	13	19	20	0	0	0
	3	0	0	0	0	0	0	1	0	1 ^b	1 ^b
	0	2	0	2	0	0	1	5	0	0	0
	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0
	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0

^a Bezogen auf die Gesamtzahl der lebenden Feten.^b Exencephalie.^{c,d} Signifikant gegenüber 400 mg/kg NPLG und gegenüber 1,0 ml/kg Tween 20 (c: $p < 0,05$; d: $p < 0,01$).^e Signifikant gegenüber 400 mg/kg NPLG und gegenüber 2,5 ml/kg Tween 20 ($p < 0,01$).

mente beteiligt sind. In Extremfällen lassen sich in Teilabschnitten der Wirbelsäule keine individuellen Wirbel mehr erkennen; die Schwänze können ganz fehlen (Abb. 1 c). Die am schwersten betroffenen Fälle finden sich nach Anwendung der Kombination 350 mg/kg NPLG + 2,5 ml/kg Tween 20.

Extremitätenmißbildungen treten sporadisch auf. Sie umfassen Defekte unterschiedlichen Schweregrades wie Polydaktylie, Ausfall eines oder mehrerer Fingerstrahlen, weitgehende Tibia-Aplasie bei gleichzeitigem Fehlen des ersten Zehenstrahls, Phokomelie und Amelie; letztere geht meist mit einer Reduktion von Gürtелеlementen einher. In den 4 Fällen mit Amelie waren jeweils sämtliche Gliedmaßen betroffen; bei 6 der 16 äußerlich als fehlend erscheinenden Extremitäten wurden Reste von Humerus bzw. Femur gefunden (Peromelie). Ein Fet mit Amelie sämtlicher Gliedmaßen ist in Abb. 2 wiedergegeben. Die Extremitätenmißbildungen, die auch nur einzelne Gliedmaßen eines Feten betreffen können, kommen meist in Verbindung mit Wirbel- und Rippende-

fekten vor, können aber auch der einzige Schaden des betreffenden Individuums sein. Sie treten sowohl nach Applikation der Einzelsubstanzen als auch der Kombinationen auf. Gelegentlich wurden sie auch bei abgestorbenen Feten gefunden. Die Extremitätenmißbildungen zeigen mit Ausnahme der Peromelien und der postaxialen Strahlenausfälle der Vorderextremitäten sehr große Ähnlichkeit mit den von Willert und Henkel [15] für die menschliche Thalidomid-Embryopathie dargestellten Fällen. Außer den bisher genannten Mißbildungen werden gelegentlich Exencephalien und Gaumenspalten beobachtet, die in seltenen Fällen auch bei den Kontrollen vorkommen (in Tab. I und IV unter „Sonstige“ geführt).

Das sporadische Auftreten von Extremitätenmißbildungen veranlaßte uns, der Frage nachzugehen, ob bei geringfügiger *Variation des Behandlungszeitpunktes* Extremitätendefekte ähnlicher Art in größerer Häufigkeit entstehen (Tab. II). Wir applizierten deshalb an den Tagen 8½, 8⅔ oder 9½ p.c. trächtigen Weibchen die Substanzkombination mit dem stärksten teratogenen Effekt

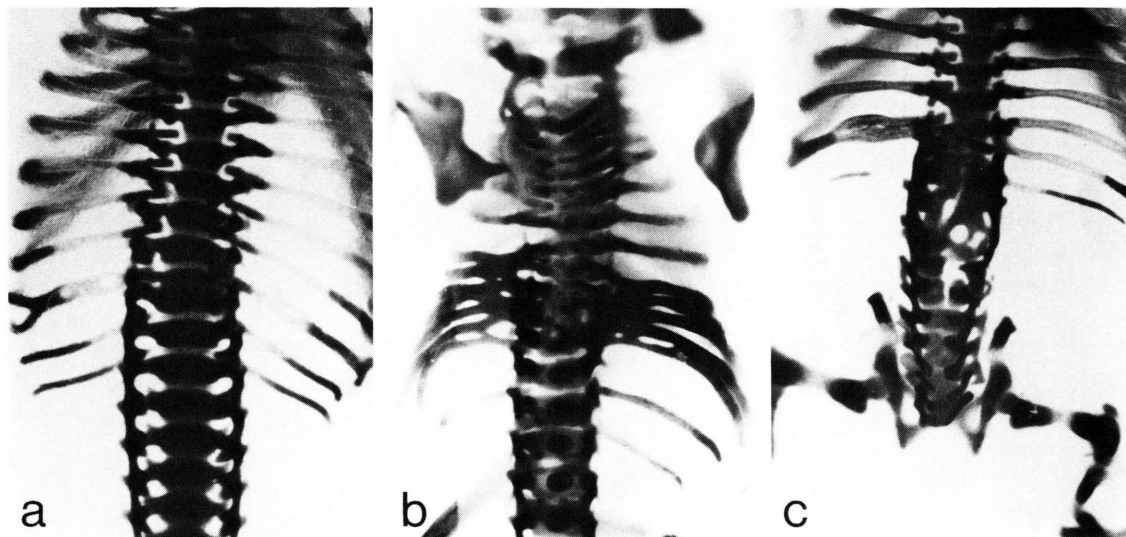


Abb. 1. Skelette 18tägiger Mausfeten mit unterschiedlich starken Wirbel- und Rippenmißbildungen nach Behandlung der Muttertiere am Tag 9 p.c. mit einer Kombination von 350 mg/kg NPLG + 2,5 ml/kg Tween 20.

- a) Verschmelzung der Thorakalwirbel 10 und 11, Thorakalwirbel 10 verschmälert; Verschmelzung der Rippenpaare 10 und 11.
 b) Mißbildungen der Thorakalwirbel 3 bis 10; umfangreiche Rippenverschmelzungen, Fehlen der 13. Rippe links.
 c) Mißbildungen der unteren Thorakal-, der Lumbal- und der Sakralwirbelsäule, der Schwanz fehlt; im Bereich der oberen Lumbalwirbelsäule keine individuellen Wirbel mehr erkennbar; Verschmelzung der Rippen 11 und 12 sowie Unterbruch in Rippe 13 auf der linken Körperseite. Vergr. 10,5 ×.

Tab. II. Mißbildungsraten bei Variation des Behandlungszeitpunktes.

Zeitpunkt der Behandlung ^a (Tag p.c.)	8½	8⅔	9	9½
Implantationen	135	86	188	132
Lebende Feten	99	42	103	77
Mißbildete Feten (lebend)	19	19	26	11
(%) ^b	(19,2)	(45,2) ^c	(25,2)	(14,3)
Feten mit Extremitätenmißbildungen	2	5	5	7
(%) ^b	(2,0)	(11,9)	(4,9)	(9,1)

^a Einmalige intraperitoneale Injektion einer Kombination von NPLG + Tween 20 (350 mg/kg + 2,5 ml/kg).

^b Bezogen auf die Gesamtzahl der lebenden Feten.

^c Signifikant gegenüber den Mißbildungsraten an den übrigen Behandlungszeitpunkten ($p < 0,05$).

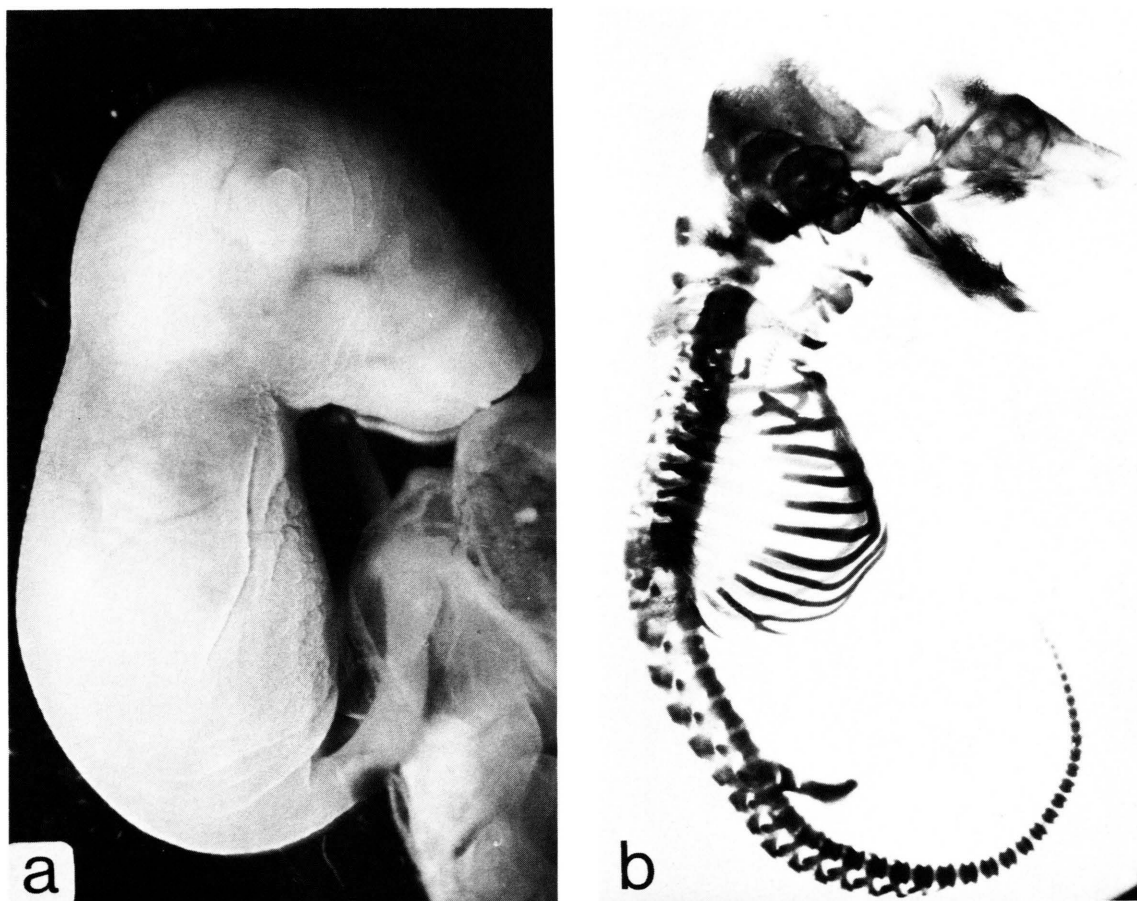


Abb. 2. 18tägiger Fetus mit Amelie sämtlicher Gliedmaßen: Behandlung des Muttertieres am Tag 9 p.c. mit einer Kombination von 350 mg/kg NPLG + 2,5 ml/kg Tween 20.

a) Lebendaufnahme.

b) Skelettdarstellung: fehlende Extremitäten, Reduktion der Gürtel, Wirbel- und Rippenmißbildungen. Vergr. 6 ×.

(350 mg/kg NPLG + 2,5 ml/kg Tween 20). Es ergab sich zwar nach Behandlung am Tag $8\frac{1}{2}$ eine signifikante Erhöhung der Gesamtmißbildungsrate; eine Anhäufung von Extremitätenmißbildungen ließ sich aber für keinen der veränderten Behandlungszeitpunkte statistisch sichern.

Nach Behandlung an den Tagen $8\frac{1}{2}$ oder $8\frac{3}{4}$ war der *Typ der Extremitätendefekte* der gleiche wie nach Behandlung am Tag 9. Die Schädigungen umfaßten wiederum verschiedene Ausprägungsstufen; ein Fall von Phokomelie ist in Abb. 3 dargestellt. Nach Applikation am Tag $9\frac{1}{2}$ traten nur postaxiale Strahlenausfälle an den Vorderextremitäten auf, in einem Fall zusätzlich eine partielle Ulnaaplasie.

Die nach Behandlung an den Tagen $8\frac{1}{2}$, $8\frac{3}{4}$ oder 9 p.c. aufgetretenen Mißbildungen der Vorder- und Hinterextremitäten lassen sich jeweils in teratologischen Reihen anordnen (Abb. 4).

Wirbel- und Rippendefekte bildeten auch nach Behandlung an den Tagen $8\frac{1}{2}$ oder $8\frac{3}{4}$ den Hauptanteil der Mißbildungen. Der erste mißbildete Wirbel bzw. die erste mißbildete Rippe lagen aber im Mittel weiter cranial als nach Behandlung am Tag 9 (Tab. III). Nach Verabreichung der Substanzkombination am Tag $9\frac{1}{2}$ waren Wirbeldefekte seltener und beschränkten sich auf die Lumbal-, Sakral- und/oder Schwanzwirbelsäule; in einem Falle war auch der 13. Thorakalwirbel betroffen. Rippenmißbildungen fehlten. Insgesamt ergab sich

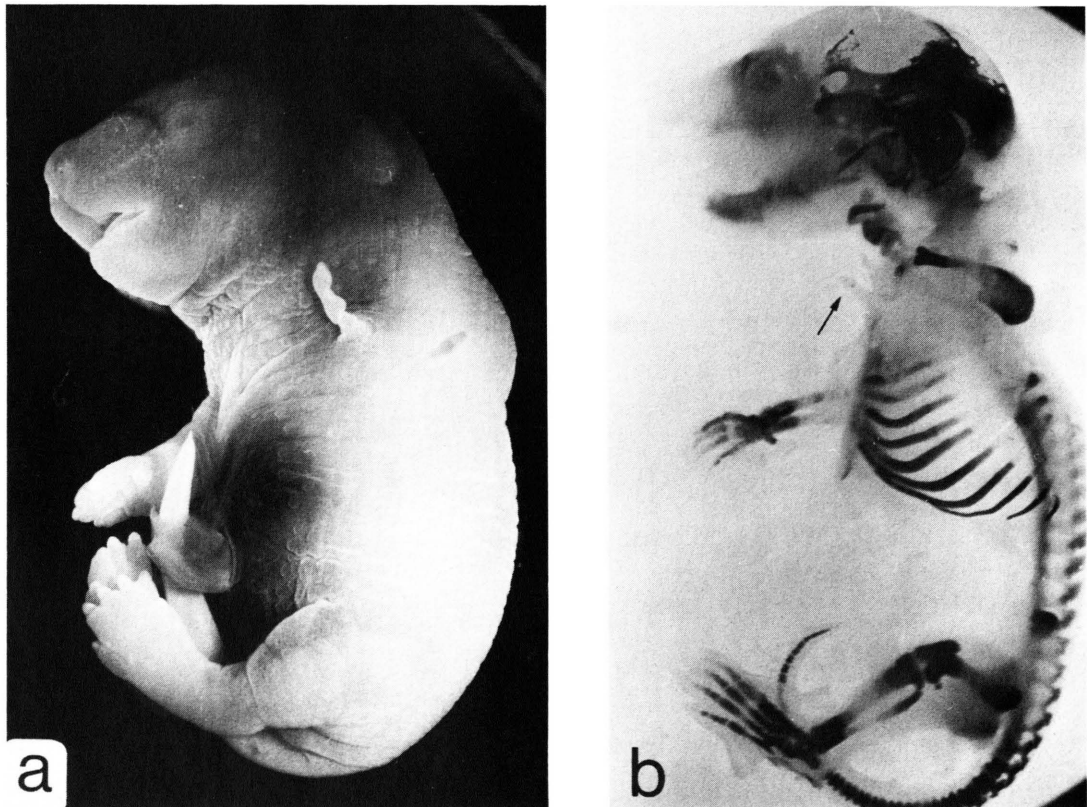


Abb. 3. 18tägiger Fet mit Phokomelie vorne links: Behandlung des Muttertieres am Tag $8\frac{1}{2}$ p.c. mit einer Kombination von 350 mg/kg NPLG + 2,5 ml/kg Tween 20.

a) Lebendaufnahme.

b) Skelettdarstellung: Reduktion des linken Schultergürtels, 2 winzige Knorpelstückchen im Rudiment der linken Vorderextremität (↑), Wirbel- und Rippenmißbildungen (in der Abb. nicht erkennbar). Vergr. 6×.

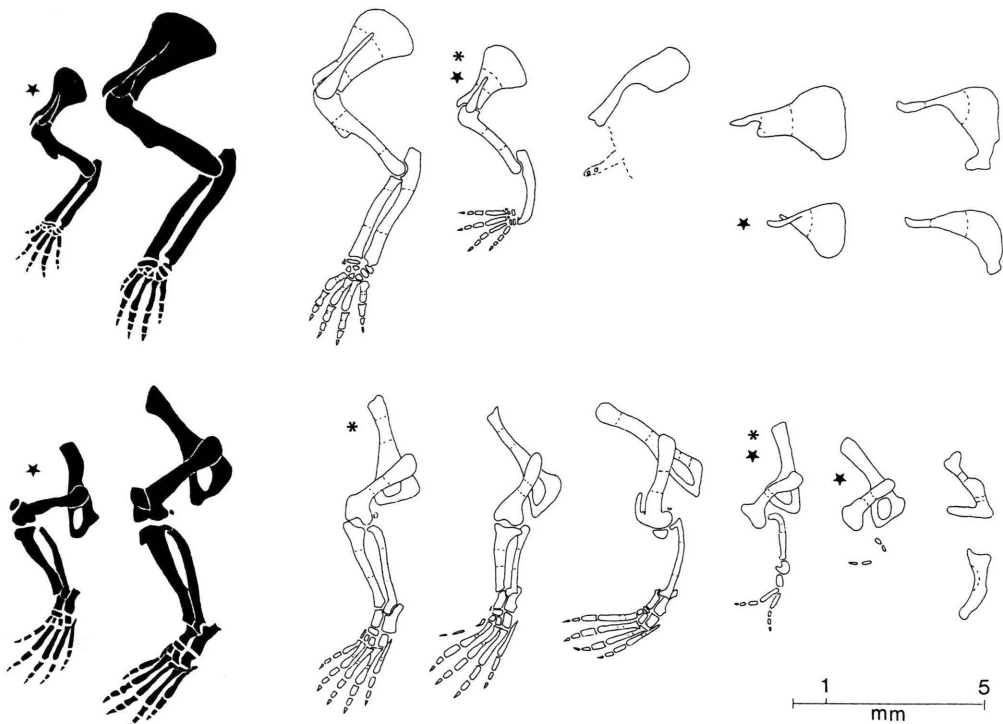


Abb. 4. Teratologische Reihen der Mißbildungen der Vorder- und Hinterextremitäten von Feten, deren Mütter an den Tagen 8½, 8⅔ oder 9 p.c. mit Kombinationen von NPLG + Tween 20 behandelt wurden. Die normalen Kontrollen sind schwarz dargestellt; Alter der Feten der mit ★ bezeichneten Extremitätsenskelette 16 Tage, der übrigen 18 Tage; * = spiegelbildliche Darstellung.

mit steigendem Behandlungsalter eine cranio-caudale Verschiebung des ersten geschädigten axialen und/oder paraxialen Elementes. Als Besonderheit trat nach Behandlung am Tag 9½ bei etwa der

Hälfte der lebenden Feten an der Schwanzspitze anstelle der terminalen Wirbel ein unsegmentierter Stab auf, der von uns nicht als Mißbildung, sondern als kleinere Anomalie gewertet wurde. Diese

Tab. III. Einfluß des Behandlungszeitpunktes auf die Lage der mißbildeten Wirbel und Rippen.

Zeitpunkt der Behandlung ^a (Tag p.c.)	8½	8⅔	9	9½
Anzahl der Feten mit Wirbel- und/oder Rippenmißbildungen	20	18	25	6
Lokalisation der ersten Wirbel- und/oder Rippenmißbildung ^b	12,8 ± 0,76	13,4 ± 0,96	15,9 ^c ± 0,84	21,2 ± 0,83

^a Einmalige intraperitoneale Injektion einer Kombination von NPLG + Tween 20 (350 mg/kg + 2,5 ml/kg).
^b Fortlaufende Numerierung der Wirbel beginnend mit dem 1. Halswirbel (Mittelwert ± Standardfehler des Mittelwertes).
^c Signifikant gegenüber den entsprechenden Werten an den Tagen 8½ und 9½ p.c. (p < 0,01).

Abänderung war in den übrigen Versuchsgruppen nur gelegentlich beobachtet worden. Zusätzlich zu den sonst gefundenen Mißbildungen wurde nach Behandlung am Tag 8 $\frac{2}{3}$ je ein Fall von Nierenhypoplasie und Nierenaplasie zusammen mit den oben genannten Extremitätendefekten beobachtet.

Die relativ hohe Gesamtmißbildungsrate am Tag 8 $\frac{2}{3}$ nach Anwendung der Kombination 350 mg/kg NPLG + 2,5 ml/kg Tween 20 ließ es lohnend erscheinen, die Versuche an diesem Behandlungszeitpunkt ebenfalls auf die *Einzelwirkungen der beiden Teratogene* sowie auf die *Kombination von NPLG mit der niedrigeren Dosis Tween 20 (1,0 ml/kg)* auszudehnen. Die Ergebnisse sind in Tab. IV zusammengestellt.

Die niedrigeren Konzentrationen beider Einzelsubstanzen (400 mg/kg NPLG bzw. 1,0 ml/kg Tween 20) zeigen nach Anwendung am Tag 8 $\frac{2}{3}$ keine embryotale und nur eine geringe teratogene Wirkung entsprechend den Befunden nach Applikation am Tag 9. Die doppelte Dosis NPLG (800 mg/kg) bewirkt bei Anwendung am Tag 8 $\frac{2}{3}$ eine am Tag 9 nicht gefundene hohe Embryoletalität (60,6% Resorptionen; $p < 0,01$) und zeigt auch toxische Wirkungen auf die Muttertiere; die Mißbildungsrate ist nicht signifikant höher als nach Behandlung am Tag 9. Die höhere Dosis Tween 20 (2,5 ml/kg) bewirkt am Tag 8 $\frac{2}{3}$ im Vergleich mit dem Tag 9 keine signifikante Veränderung der Resorptionsrate, wohl aber eine signifikante Erhö-

Tab. IV. Embryoletale und teratogene Wirkungen von N,N-Phthaloyl-L-glutaminsäure (NPLG), Tween 20 und Kombinationen von NPLG + Tween 20 nach einmaliger intraperitonealer Applikation am Tag 8 $\frac{2}{3}$ p.c.

Dosierung	NPLG		Tween 20		NPLG + Tween 20		Kontrollen		unabhängig
	400 mg/kg	800 mg/kg	1,0 ml/kg	2,5 ml/kg	350 mg/kg + 1,0 ml/kg	350 mg/kg + 2,5 ml/kg	NaCl (0,9%)	20 ml/kg	40 ml/kg
Muttertiere, gesamt	11	16	12	7	11	13	5	8	11
Muttertiere, gestorben	0	6	1	1	0	4	0	0	0
Abortierte Würfe	0	3	0	1	1	1	0	0	0
Würfe mit mindestens einem mißbildeten Feten	2	3	3	2	4	4	0	1	1
Implantationen	130	71	126	60	118	86	61	102	118
Resorptionen (%)	5 (3,8)	43 (60,6) ^f	8 (6,3)	8 (13,3)	16 (13,6)	43 (50,0) ^e	0 (0)	3 (2,9)	5 (4,2)
Feten:									
tot	3	0	1	0	1	1	1	1	0
lebend	122	28	117	52	101	42	60	98	113
mißbildet (lebend) (%) ^a	2 (1,6)	8 (28,6)	3 (2,6)	9 (17,3) ^g	15 (14,9) ^d	19 (45,2) ^{e, g}	0 (0)	1 (1,0)	1 (0,8)
Feten mit folgenden Mißbildungen									
Extremitäten									
Rippen + Wirbel									
Sonstige									
	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	2	7	2	7	14	11	0	0	0
	0	0	1	1	0	1	0	1 ^c	1 ^t
	0	0	0	1	1	3	0	0	0
	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	0	1	0	0	0	2	0	0	0
	0	0	0	0	0	2	0	0	0

^a Bezogen auf die Gesamtzahl der lebenden Feten.

^b Exencephalie.

^c Gaumenspalte.

^d Signifikant gegenüber 400 mg/kg NPLG und gegenüber 1,0 ml/kg Tween 20 ($p < 0,01$).

^e Signifikant gegenüber 400 mg/kg NPLG und gegenüber 2,5 ml/kg Tween 20 ($p < 0,01$).

^{f, g} Signifikant gegenüber den entsprechenden Werten am Tag 9 p.c. (f: $p < 0,01$; g: $p < 0,05$).

hung der Mißbildungsrate ($p < 0,05$). Nach Anwendung der Einzelsubstanzen am Tag 8 $\frac{2}{3}$ trat nur in einem Fall eine Extremitätenmißbildung auf.

Die gemeinsame Applikation der beiden Teratogene ergibt nach Anwendung von 350 mg/kg NPLG + 1,0 ml/kg Tween 20 auch am Tag 8 $\frac{2}{3}$ keine überadditive Erhöhung der Resorptionsrate. Die Mißbildungsrate hingegen liegt 3,5mal höher als die Summe der Mißbildungsraten nach Applikation vergleichbarer Mengen der Einzelsubstanzen. Kommt die Kombination 350 mg/kg NPLG + 2,5 ml/kg Tween 20 zur Anwendung, erfahren sowohl die Resorptions- als auch die Mißbildungsrate eine überadditive Erhöhung. Hinsichtlich dieser synergistischen Effekte bestätigen die Versuche mit vorgezogenem Behandlungszeitpunkt die Befunde nach Behandlung am Tag 9 p.c.

Verteilungsstudien mit ^{14}C -NPLG

Zur Klärung der synergistischen Wechselwirkungen zwischen NPLG und Tween 20 wurde auch die Organverteilung von ^{14}C -markiertem NPLG bei graviden Mäusen untersucht. Eine Gruppe von Tieren erhielt am Tag 9 p.c. eine einmalige intraperitoneale Injektion von ^{14}C -NPLG, während zwei andere Tiergruppen mit Kombinationen von ^{14}C -NPLG + Tween 20 behandelt wurden. 2 h nach Verabreichung der Substanzen wurde der NPLG-Gehalt in Plasma, Leber und Skelettmuskel bestimmt. Die Ergebnisse sind in Tab. V zusammengestellt.

Nach alleiniger Applikation von ^{14}C -NPLG (400 mg/kg) wurde eine mittlere Plasmakonzentration von 9,0 μg NPLG/ml gefunden. Die Kombination von 350 mg/kg ^{14}C -NPLG + 2,5 ml/kg Tween 20 ergab zum selben Zeitpunkt einen Plasmaspiegel von 609 μg NPLG/ml, d.h. eine Erhöhung des Gehalts an NPLG etwa um den Faktor 70. Bei Tieren, denen 350 mg/kg ^{14}C -NPLG in Kombination mit der niedrigeren Dosis Tween 20 (1,0 ml/kg) verabreicht worden waren, trat dieser Effekt in 6 von 8 Fällen nicht auf. Bei den restlichen beiden Tieren dieser Gruppe war die Wirkung von Tween 20 auf den NPLG-Gehalt im Plasma mit einer *ca.* drei- bzw. 19fachen Steigerung vergleichsweise gering.

In der Leber wurde nach alleiniger Applikation von ^{14}C -NPLG ein dreimal höherer Gehalt an NPLG gefunden als im Plasma; im Muskel betrug der Gehalt nur $\frac{1}{5}$ des Plasmawerts. Die kombinierte Verabreichung von 350 mg/kg ^{14}C -NPLG + 2,5 ml/kg Tween 20 führte bei allen Tieren zu einem Anstieg der NPLG-Konzentration in Leber und Muskel, allerdings in geringerem Ausmaß als im Plasma: der NPLG-Gehalt lag in der Leber 15mal, im Muskel 34mal höher als in den entsprechenden Geweben der mit ^{14}C -NPLG allein behandelten Tiere. Die gleichzeitige Anwendung von 350 mg/kg ^{14}C -NPLG und der niedrigeren Dosis Tween 20 (1,0 ml/kg) zeigte entsprechend den Befunden im Plasma in 6 von 8 Fällen keine Wirkung auf den NPLG-Gehalt von Leber und Muskel. Die

Tab. V. ^{14}C -Verteilung nach Applikation von [^{14}C]N,N-Phthaloyl-L-glutaminsäure (^{14}C -NPLG) und Kombinationen von ^{14}C -NPLG + Tween 20.

Behandlung ^a	^{14}C -NPLG	^{14}C -NPLG + Tween 20			
Dosierung	400 mg/kg	350 mg/kg + 1,0 ml/kg		350 mg/kg + 2,5 ml/kg	
Konzentrationen ^b in:					
Plasma (μg NPLG/ml)	9,0 \pm 6,0	9,7 \pm 7,2	31	169	609 \pm 145
Leber (μg NPLG/g)	26 \pm 20	25 \pm 13	77	289	384 \pm 94
Skelettmuskel (μg NPLG/g)	1,4 \pm 0,5	1,0 \pm 0,6	7	15	48 \pm 13
Anzahl der Tiere	8	6	1	1	8

^a Einmalige intraperitoneale Injektion am Tag 9 p.c.

^b Alle Bestimmungen erfolgten 2 h nach der Applikation; Mittelwerte sind mit ihren Standardabweichungen aufgeführt.

restlichen beiden Tiere dieser Gruppe reagierten in diesen Geweben mit einem geringen Konzentrationsanstieg entsprechend dem Verhalten des Plasmaspiegels.

Orientierende Versuche zeigten, daß auch in den Embryonen der NPLG-Gehalt unter dem Einfluß von Tween 20 erhöht ist: Nach Applikation der Kombination 350 mg/kg ^{14}C -NPLG + 2,5 ml/kg Tween 20 lag die NPLG-Menge im Embryo mit 7,0 µg/g *ca.* 70% höher als der Wert von 4,1 µg NPLG/g bei den Embryonen, deren Mütter ausschließlich ^{14}C -NPLG (400 mg/kg) erhalten hatten. Dieser Anstieg ist relativ gering und folgt damit nicht der außerordentlichen Erhöhung des NPLG-Gehaltes im maternalen Plasma. Nach kombinierter Verabreichung von 350 mg/kg ^{14}C -NPLG und der niedrigeren Dosis Tween 20 (1,0 ml/kg) lag der Anstieg des NPLG-Gehalts in den Embryonen in der gleichen Größenordnung.

Diskussion

In der vorliegenden Arbeit wurde die Wechselwirkung zweier Teratogene, eines Hydrolysenproduktes des Thalidomids und des Tensides Tween 20, untersucht und gezeigt, daß ihre kombinierte Anwendung zu einer Potenzierung der teratogenen Wirkung führt. Für ein anderes Tensid vom nicht-ionogenen Typ mit teratogenen Eigenschaften, Triton WR-1339, wurde bereits früher eine mehr als additive Erhöhung der Mißbildungsrate nach gemeinsamer Applikation mit Vitamin A gezeigt [16].

In unseren Versuchen waren die Mengen an Hydrolysenprodukt NPLG in den Kombinationen mit dem Tensid Tween 20 so bemessen, daß sie an der unteren Grenze der Teratogenität liegen, wenn sie für sich allein in physiologischer Kochsalzlösung appliziert werden [9]. Für den Anteil des Tensides wurden zwei Dosisstufen gewählt, von denen die niedrigere minimale, die höhere deutliche teratogene Effekte gezeigt hatte [8].

Die kombinierte Verabreichung von NPLG und Tween 20 führte in den angewandten Dosierungen immer zu einer Steigerung des Mißbildungseffektes im Sinne einer Potenzierung. Die Resorptionsrate (Embryoletalität) dagegen zeigte nur in Kombination mit der höheren Dosis Tween 20 eine überadditive Erhöhung. Daß sich Mißbildungs-

und Resorptionsrate in unterschiedlicher Weise verändern können, wenn die Anteile der Einzelkomponenten in den Substanzkombinationen variiert werden, wurde auch für andere Kombinationen von Teratogenen beschrieben, z. B. für Vitamin A und Trypanblau [17], für Coffein und Hydroxyharnstoff sowie für Coffein und 5-Fluor-2'-desoxyuridin [18].

Die Änderung der Embryoletalität von der additiven zur überadditiven Reaktion, wenn in den Kombinationen von der niedrigeren zur höheren Dosisstufe des Tensides übergegangen wird, findet eine Entsprechung in der sprunghaften Veränderung des NPLG-Gehalts im Plasma der Muttertiere: in den Verteilungsstudien mit ^{14}C -NPLG führte die Applikation der Kombination mit der niedrigeren Dosis Tween 20 in 6 von 8 Fällen nicht – und beim Rest nur in geringem Umfang – zu einem Anstieg des NPLG-Gehalts im mütterlichen Plasma, während die Anwendung der Kombination mit der höheren Dosis des Tensides überraschenderweise eine *ca.* 70fache Erhöhung des NPLG-Spiegels bei allen Muttertieren bewirkte. In bezug auf die Teratogenität dagegen existiert keine solche Parallele, da die überadditive Erhöhung der Mißbildungsrate auch dann auftritt, wenn die Kombination appliziert wird, die keine oder nur eine geringe Erhöhung des NPLG-Gehalts im mütterlichen Plasma bewirkt. Auch der vergleichsweise geringe Anstieg der NPLG-Konzentration in den Embryonen nach Anwendung der beiden Kombinationen scheint nicht von der Höhe des NPLG-Gehalts im mütterlichen Plasma, sondern von anderen Mechanismen abhängig zu sein. Hier wäre an eine Veränderung der Membrandurchlässigkeit zu denken; Erhöhungen der Zellpermeabilität unter dem Einfluß bestimmter Tween-Typen sind für zahlreiche Substanzen nachgewiesen worden [19–21].

Offensichtlich können Teratogenität und Embryoletalität durch äußere Faktoren unterschiedlich beeinflußt werden [17, 18, 22–24]. In unseren Versuchen könnte die überadditive Erhöhung der Embryoletalität nach Anwendung der Kombination mit der höheren Dosis Tween 20 indirekt über Veränderungen im mütterlichen Organismus bewirkt werden, die gleichzeitig zu dem starken Anstieg der NPLG-Konzentration im mütterlichen Plasma führen. Die Mißbildungen hingegen scheinen durch direkte Einwirkung der Substanzen auf

die Embryonen zu entstehen, wobei die in Gegenwart von Tween 20 resultierende Erhöhung von ca. 70% im NPLG-Gehalt der Embryonen ausreicht, um eine überadditive Erhöhung der Mißbildungsrate hervorzurufen. Die Vermutung, daß indirekt über die Mutter wirkende Faktoren für die Embryoletalität verantwortlich sind, Mißbildungen dagegen durch direkte Einwirkung der Substanzen auf den Embryo erzeugt werden, wurde auch geäußert aufgrund von Untersuchungen über die Wechselwirkung von Actinomycin D und Hormonen (Progesteron + Oestron) [23] sowie von Triton WR-1339 und Progesteron [25].

Die skeletalen Mißbildungen unseres Untersuchungsmaterials zeigen lediglich quantitative, aber keine qualitativen Unterschiede zwischen den einzelnen Behandlungsgruppen. Sie sind den Mißbildungen des Menschen sehr ähnlich, die als Folge der Thalidomid-Einwirkung auf bestimmte Embryonalstadien beschrieben wurden [15, 26, 27]. Die einzelnen Defekte manifestieren sich aber nicht in der gleichen Häufigkeit wie beim Menschen: Während isolierte Mißbildungen der Wirbelsäule beim Menschen selten beobachtet wurden [26] und Rippenschädigungen offenbar nur sporadisch vorkommen [15], repräsentieren sie in unseren Versuchen den Hauptanteil der Mißbildungen; Extremitätendefekte, die Leitmißbildungen der menschlichen Thalidomid-Embryopathie, treten dagegen bei allen von uns untersuchten Behandlungszeitpunkten relativ selten auf und finden sich nicht in allen Experimentalansätzen der verschiedenen Behandlungsgruppen. Trotz ihrer geringen Anzahl umfassen aber die nach Behandlung an den Tagen 8½, 8⅔ oder 9 p.c. aufgetretenen Extremitätenmißbildungen alle Schweregrade des beim Menschen vorkommenden Schädigungsmusters und lassen sich zu teratologischen Reihen für die Vorder- und Hinterextremitäten anordnen (Abb. 4). Ein proximaler Ausfall des Stylopodium (Humerus oder Femur) bei gleichzeitigem Fehlen des Radius bzw. der Tibia – die axiale Form der Ektromelie nach Willert und Henkel [15] – trat zwar in dem vorliegenden Material nicht auf, wurde aber von uns bei Swiss-Mäusen in Form des „Übergangs-Achsentyps“ nach Applikation einer Kombination von NPLG + Tween 20 gefunden.

Trotz der generellen Ähnlichkeit der von uns gefundenen Extremitätenmißbildungen mit den von Willert und Henkel [15] für die menschliche Thali-

domid-Embryopathie beschriebenen Formen finden sich in unserem Material auch Fälle, die nicht mit dem menschlichen Schädigungsmuster übereinstimmen: 1) Bei 6 der 21 äußerlich als fehlend erscheinenden Vorder- oder Hinterextremitäten wurde – bei vollständig erhaltenem Gürtel – als einziges Skelettelement der freien Extremität ein mehr oder minder großer proximaler Teil des Stylopodium gefunden. Mißbildungen dieser Art traten in der experimentellen Embryologie beim Hühnerkeim auf, wenn in der sehr jungen Extremitätenanlage die apikale Epidermisleiste entfernt wurde [28, 29]. Sie wurden auch nach Applikation von Acetazolamid + Cadmiumsulfat bei der Maus [30] sowie nach Anwendung von Triethylenmelamin (TEM) am Ende der Primitiventwicklung beim Hühnerkeim gefunden [31]. 2) An den Vorderextremitäten kam es nach Behandlung an den Tagen 8½, 8⅔ oder 9 p.c. gelegentlich zu einem postaxialen Strahlenverlust. Nach Behandlung am Tag 9½ p.c. war dies immer der Fall; einmal trat bei diesem Behandlungszeitpunkt sogar eine partielle Ulnaaplasie auf. An den Hinterextremitäten wurde ein postaxialer Strahlenverlust nicht beobachtet.

Außer diesen grundsätzlichen Abweichungen vom Schädigungsmuster der menschlichen Thalidomid-Embryopathie kommen in unserem Material – beschränkt auf die Hinterextremitäten – noch einige graduelle Veränderungen vor, die lediglich als Variationen des Thalidomid-typischen präaxialen Mißbildungsmusters anzusehen sind: Während beim Menschen keine isolierten Zehenmißbildungen vorkamen, ist Triphalangie, Polydaktylie oder Schwächung des ersten Strahls bei den von uns untersuchten Mausfeten stets die einzige Mißbildung an der betroffenen Hinterextremität. Tibiahypoplasie bzw. partielle oder totale Tibiaaplasie waren beim Menschen mit Vermehrung der Zehen oder mit normaler Zehenzahl bei möglicher Triphalangie der Großzehe, nie mit Zehenreduktion vergesellschaftet; in unserem Material dagegen fehlt in den beiden Fällen mit partieller Tibiaaplasie gleichzeitig der erste Zehenstrahl, und die beiden Fälle mit totaler Tibiaaplasie gehen mit dem Verlust mehrerer präaxialer Strahlen einher. Im Gegensatz zu den Befunden beim Menschen kommen Mißbildungen der Hinterextremitäten auch bei Mausfeten mit normalen Vorderextremitäten vor.

Die Wirbeldeformationen sind die gleichen, die auch beim Menschen auftraten: Halbwirbel, Schmetterlingswirbel und Blockbildungen [15]. Halbwirbel und Wirbelausfälle wurden auch nach Applikation von Thalidomid in Dimethylformamid bei der Ratte gefunden [32]. Die umfangreichen Verwachsungen im Bereich der Lendenwirbelsäule, bei denen keine einzelnen Wirbel mehr erkennbar sind (Abb. 1 c), wurden auch beim Menschen beschrieben [27].

Die Anwendung von Kombinationen, insbesondere mit der höheren Dosis Tween 20, bewirkt im Vergleich zu den Einzelsubstanzen meist einen höheren Schweregrad der Wirbel- und Rippenmißbildungen und häufig eine umfangreichere Ausdehnung der Schädigungsregion in caudaler Richtung; dies könnte auf einer verzögerten Elimination einer oder beider Substanzen aus dem embryonalen Gewebe beruhen. Darüber hinaus ergibt sich mit fortschreitendem Alter der Embryonen zum Zeitpunkt der Substanzapplikation eine cranio-caudale Verlagerung der axialen und/oder paraxialen Defekte. Diese Tatsache spricht dafür, daß nur bestimmte, zeitlich begrenzt ablaufende Prozesse während der Entwicklung der Wirbel und Rippen durch die Teratogene NPLG und Tween 20 gestört werden.

Die Somiten, aus denen die mißbildeten Wirbel und Rippen hervorgehen, sind zum Zeitpunkt der Substanzapplikation noch nicht gebildet. Daher ist als Ursache für die Wirbel- und Rippenmißbil-

dungen eine Schädigung des noch unsegmentierten paraxialen Mesoderms mit nachfolgender Störung der Somitenbildung und der Sklerotomawandlung in Betracht zu ziehen. Dabei könnten u. a. Veränderungen des Adhäsionsverhaltens der Zellen und der Zell-Zell-Interaktionen eine Rolle spielen.

Eine Schädigung des paraxialen und lateralen Mesoderms könnte darüber hinaus auch die Ursache sein für die in der Literatur beschriebenen degenerativen Veränderungen in den Neuronen der Spinalganglien [33] sowie der Nierendysplasien, die beim Menschen [34], beim Kaninchen [35] und auch von uns bei der Maus nach Einwirkung von Thalidomid bzw. seines Hydrolysenproduktes NPLG gefunden wurden.

Parallel dazu könnten sich Schädigungen des unsegmentierten paraxialen und lateralen Mesoderms auch auf die Entwicklung der Extremitäten auswirken, die zum Zeitpunkt der Substanzapplikation in der Somatopleura angelegt werden. Regionalspezifische induktive Einflüsse des unsegmentierten Somitenmesoderms sowie des mesonephrogenen Mesoderms auf die angrenzenden Extremitätenbezirke in der Somatopleura werden aufgrund von Befunden aus der experimentellen Embryologie diskutiert [36, 37]. Doch sind im Falle der Extremitätenmißbildungen auch andere Mechanismen, wie z. B. eine direkte Störung der Prozesse, die zur Ausbildung der apikalen Epidermisleiste führen, als Ursache denkbar.

- [1] F. C. Fraser, in: *Handbook of Teratology* (J. G. Wilson und F. C. Fraser, Hrsg.), Bd. 1, S. 445–463, Plenum Press, New York, London 1977.
- [2] B. K. Beyer, M. S. Guram und W. F. Geber, *Teratology* **30**, 39–45 (1984).
- [3] V. H. Ferm, *Experientia* **25**, 56–57 (1969).
- [4] R. M. Hackman und L. S. Hurley, *Teratology* **30**, 225–236 (1984).
- [5] J. G. Wilson, *Environment and Birth Defects*, Academic Press, New York, London 1973.
- [6] F. Köhler und H. Koch, *Arzneim.-Forsch./Drug Res.* **24**, 1616–1619 (1974).
- [7] G. Blaschke, H. P. Kraft, K. Fickentscher und F. Köhler, *Arzneim.-Forsch./Drug Res.* **29**, 1640–1642 (1979).
- [8] U. Kocher-Becker, W. Kocher und H. Ockenfels, *Z. Naturforsch.* **36c**, 904–906 (1981).
- [9] U. Kocher-Becker, W. Kocher und H. Ockenfels, *Naturwissenschaften* **69**, 191–192 (1982).
- [10] G. H. L. Nefkens, G. I. Tesser und R. J. F. Nivard, *Recl. Trav. Chim. Pays-Bas* **79**, 688–698 (1960).
- [11] H. Ockenfels und F. Köhler, *Experientia* **26**, 1236–1237 (1970).
- [12] M. C. Aletsee, *Dissertation*, Universität Ulm 1985.
- [13] R. J. Wassersug, *Stain Technol.* **51**, 131–134 (1976).
- [14] L. Sachs, *Angewandte Statistik*, 6. Aufl., Springer-Verlag, Berlin, Heidelberg, New York, Tokyo 1984.
- [15] H.-G. Willert und H.-L. Henkel, *Klinik und Pathologie der Dismelie*, Springer-Verlag, Berlin, Heidelberg, New York 1969.
- [16] C. Roussel und H. Tuchmann-Duplessis, *C. R. Acad. Sci. Paris* **271**, Ser. D, 215–218 (1970).
- [17] J. G. Wilson, *J. Pharmacol. Exp. Ther.* **144**, 429–436 (1964).
- [18] E. J. Ritter, W. J. Scott, J. G. Wilson, P. R. Mathinos und J. L. Randall, *Teratology* **25**, 95–100 (1982).
- [19] A. G. Malenkov, S. A. Bogatyreva, V. P. Bozhkova, E. A. Modjanova und Ju. M. Vasiliev, *Exp. Cell Res.* **48**, 307–318 (1967).
- [20] A. A. Stavrovskaya, T. V. Potapova, V. A. Rosenblatt und A. S. Serpinskaya, *Int. J. Cancer* **15**, 665–672 (1975).
- [21] D. Billen und A. C. Olson, *J. Cell Biol.* **69**, 732–736 (1976).
- [22] C. Roussel und H. Tuchmann-Duplessis, *C. R. Acad. Sci. Paris* **266**, Ser. D, 2171–2174 (1968).
- [23] J. Elis und J. A. DiPaolo, *Teratology* **3**, 33–38 (1970).
- [24] R. Bass, G. Bochart, H.-J. Merker und D. Neubert, *J. Toxicol. Environ. Health* **2**, 1353–1374 (1977).
- [25] C. Roussel und H. Tuchmann-Duplessis, *Teratology* **9**, A-34 (1974).
- [26] L. Ruffing, in: *Morphogenesis and Malformation of the Limb* (D. Bergsma und W. Lenz, Hrsg.), *Birth Defects: Original Article Series*, Bd. 13, Nr. 1, S. 287–300, A. R. Liss, New York 1977.
- [27] C. G. H. Newman, *Teratology* **32**, 133–144 (1985).
- [28] J. W. Saunders, *J. exp. Zool.* **108**, 363–403 (1948).
- [29] D. Summerbell, *J. Embryol. exp. Morph.* **32**, 651–660 (1974).
- [30] J. Milaire, *Teratology* **32**, 433–451 (1985).
- [31] W. Kocher, D. Braasch, B. Preusser, S. Storm und U. Kocher-Becker, *J. Embryol. exp. Morph.* **82** (Suppl.), 174 (1984).
- [32] M. Parkhie und M. Webb, *Teratology* **27**, 327–332 (1983).
- [33] W. G. McBride, *Teratology* **14**, 71–88 (1976).
- [34] H. Hauke und H. Weicker, *Dtsch. med. Wschr.* **90**, 2200–2204 (1965).
- [35] H. Sterz, H. Nothdurft, P. Lexa und H. Ockenfels, *Arch. Toxicol.* **60**, 376–381 (1987).
- [36] J. Milaire, *Arch. Biol. (Bruxelles)* **98**, 67–97 (1987).
- [37] T. D. Stephens, R. Spall, W. C. Baker, S. R. Hiatt, D. E. Pugmire, M. R. Shaker, H. J. Willis und K. P. Winger, *J. Morphol.* **208**, 367–379 (1991).

