

**KERNFORSCHUNGSZENTRUM**

**KARLSRUHE**

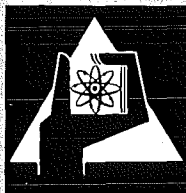
September 1971

KFK 1498

Institut für Strahlenbiologie

Metabolismus und Toxizität therapeutischer Chelatbildner  
XI. Mitteilung: Einfluß auf die  
pränatale Entwicklung bei der Ratte

H. Bömer



**GESELLSCHAFT FÜR KERNFORSCHUNG M. B. H.**  
**KARLSRUHE**



Sonderdruck

**142/3**

1971

# **Strahlentherapie**

**Archiv für klinische  
und experimentelle Radiologie**

## **Metabolismus und Toxizität therapeutischer Chelatbildner**

**XI. Mitteilung: Einfluß auf die pränatale Entwicklung bei der Ratte**

**Hubert Bömer**

Aus dem Institut für Strahlenbiologie, Kernforschungszentrum Karlsruhe



**URBAN & SCHWARZENBERG**

MÜNCHEN - BERLIN - WIEN

Alle Rechte, auch die des Nachdrucks, der photomechanischen Wiedergabe und der Übersetzung, vorbehalten

© Urban & Schwarzenberg, München-Berlin-Wien 1971

# Metabolismus und Toxizität therapeutischer Chelatbildner

## XI. Mitteilung: Einfluß auf die pränatale Entwicklung bei der Ratte

Hubert Bömer

Aus dem Institut für Strahlenbiologie, Kernforschungszentrum Karlsruhe

Im Lehrbuch von Goldstein et al. [10] bzw. dem einschlägigen Übersichtsreferat von Kalter u. Warkany [12] wird unter den teratogen wirkenden Medikamenten auch Äthylendiamintetraacetat (ÄDTA) aufgeführt. Diesen Angaben liegt eine Untersuchung [19] zugrunde, in der nach Verabfolgung des Ca-freien ÄDTA an trächtige Ratten Mißbildungen der Föten nachgewiesen wurden. Ca-freies ÄDTA löst bekanntlich eine Hypokalzämie aus [8, 14], die ihrerseits teratogen ist [22]. Da jedoch ÄDTA und das ihm verwandte Diäthylentriamin-pentaacetat (DTPA) bei der Therapie von Vergiftungen mit radioaktiven oder stabilen Metallen in Form ihrer Ca-Chelate Verwendung finden, muß die Zuordnung von ÄDTA zu den teratogenen Medikamenten als nicht gerechtfertigt, zumindest jedoch als mißverständlich betrachtet werden. Untersuchungen über teratogene Wirkung der Ca-Chelate gibt es noch nicht.

Die vorliegende Arbeit soll diese Lücke schließen, indem der Einfluß von Ca-DTPA auf die pränatale Entwicklung der Ratte untersucht wurde. Die Chelatdosen (s. Tab. 2) sind höher als die für die Humanmedizin empfohlenen ( $15 \text{ bis } 60 \mu\text{mol} \cdot \text{kg}^{-1} \cdot \text{d}^{-1}$ ), jedoch erheblich niedriger als die im Tierexperiment akut bzw. chronisch toxischen Dosen [3]. In die Untersuchung einbezogen wurde weiterhin Zn-DTPA, das im Vergleich zu Ca-DTPA eine erheblich geringere Toxizität besitzt [2, 5, 15, 23], bei der Dekorporation von  $^{91}\text{Y}$ ,  $^{144}\text{Ce}$  [4],  $^{147}\text{Pm}$  [17],  $^{238}\text{Pu}$  [18] und  $^{239}\text{Pu}$  [16] aber praktisch gleich effektiv ist.

Zur Bestimmung des diaplazentaren Transfers verwendeten wir, da uns radioaktiv markiertes DTPA nicht zur Verfügung stand,  $^{51}\text{Cr(III)-ÄDTA}$ . Da es sich bei Cr(III)-ÄDTA um ein sogenanntes robustes Chelat handelt, d. h., die Abspaltung von  $\text{Cr}^{3+}$  vernachlässigbar ist, erlaubt die Bestimmung von  $^{51}\text{Cr}$  Aussagen über das physiologische Verhalten des Chelat-Anions. Da weiterhin keine nennenswerteren Unterschiede im Verhalten von Cr(III)-ÄDTA

und Ca-ÄDTA [21] bzw. von Ca-ÄDTA und Ca-DTPA [1] vorliegen, ist es durchaus gerechtfertigt, von mit Cr(III)-ÄDTA erhaltenen Befunden auf einen analogen Metabolismus von Ca-DTPA zu schließen.

### Methodik

Als Versuchstiere dienten drei bis vier Monate alte Rattenweibchen des Heiligenberg-Inzuchtstammes, die mit etwa vier Monate alten männlichen Ratten gepaart wurden. Die Tiere erhielten „altromin-R-Pellets“ und Leitungswasser ad libitum. Um die Chelatbildner zu einem definierten Zeitpunkt verabreichen zu können, mußte der Beginn der Schwangerschaft bestimmt werden. Dies geschah, indem nach zwölf Stunden Paarung ein Vaginalabstrich entnommen und mit Giemsa-Lösung gefärbt wurde. Die Tiere, bei denen Spermien im Abstrich nachweisbar waren, erhielten am siebenten, achten und neunten Tag danach je 2 ml 0,9% NaCl-Lösung bzw. Ca-DTPA (in zwei verschiedenen Dosierungen) oder Zn-DTPA. In einer weiteren Gruppe erhielten die Tiere vom siebenten bis 14. Tag Ca-DTPA. Die Chelate wurden, in 2 ml Aqua tridestillata gelöst, in leichter Äthernarkose subkutan unter die Rückenhaut injiziert. Am 21. Tag der Schwangerschaft wurden die Muttertiere in Äthernarkose durch Entbluten getötet, die Föten durch Schnittentbindung gewonnen, nach Abnabelung mit Äther getötet, gewogen und dann exenteriert. Danach wurden sie nach der Methode von Dawson [6] fixiert und das Skelett mit Alizarinrot S angefärbt. Im Uterus bestimmten wir die als kleine braune Knötchen sichtbaren sogenannten Resorptionen, d. h. die nicht entwickelten bzw. abgestorbenen Implantate. Die Föten wurden mittels einer Lupe auf evtl. Anomalien gemustert, histologische Untersuchungen wurden jedoch nicht vorgenommen.

$^{51}\text{Cr(III)-ÄDTA}$  wurde den Ratten etwa am 15. Tag der Schwangerschaft in einer Dosis von  $\sim 0,01 \mu\text{mol}$  und  $25 \mu\text{Ci}$  in die Schwanzvene injiziert. Zu verschiedenen Zeitpunkten töteten wir die Tiere durch Entbluten in Äthernarkose und bestimmten mittels eines  $\gamma$ -Spektrometers den  $^{51}\text{Cr}$ -Gehalt von Blutplasma, Leber, Muskulatur, Plazenta und Föten.

Tabelle 1. Konzentrationen von  $^{51}\text{Cr}$ -ÄDTA in Abhängigkeit von der Zeit. Mittelwerte von zwei bis fünf Ratten  $\pm$  Standardfehler.

Zeit (Std.)	% der $^{51}\text{Cr}$ -Dosis in 1 g				
	Blutplasma	Leber	Muskulatur	Plazenta	Föt
0,25	1,28 $\pm$ 0,21	0,15 $\pm$ 0,02	0,11 $\pm$ 0,061	0,32 $\pm$ 0,039	0,021 $\pm$ 0,0030
0,30	0,32 $\pm$ 0,036	0,11 $\pm$ 0,32	0,032 $\pm$ 0,0046	0,19 $\pm$ 0,065	0,031 $\pm$ 0,0059
1	0,20 $\pm$ 0,046	0,087 $\pm$ 0,0027	0,022 $\pm$ 0,0045	0,14 $\pm$ 0,021	0,029 $\pm$ 0,0001
2	0,036 $\pm$ 0,0044	0,072 $\pm$ 0,0016	0,0049 $\pm$ 0,00038	0,076 $\pm$ 0,013	0,031 $\pm$ 0,0039
4	0,0055 $\pm$ 0,0017	0,041 $\pm$ 0,0032	0,0011 $\pm$ 0,00010	0,071 $\pm$ 0,025	0,029 $\pm$ 0,0022

### Ergebnisse

Die in Tabelle 1 zusammengestellten Ergebnisse des Versuchs mit  $^{51}\text{Cr}$ -ÄDTA zeigen, daß ein diaplazentarer Transfer des Chelats in die Föten stattfindet und die (an sich niedrige) Chelatkonzentration im Föt und in der Plazenta langsamer als im Gewebe des Muttertiers abnimmt. Die Plasmaclearance ist mit der bei nicht trächtigen Tieren [21] identisch.

Da die Verabreichung der Chelatbildner erst am siebenten Tag nach der Paarung begann und die Implantation zu diesem Zeitpunkt bereits erfolgt ist, sollte die Zahl der Implantate, d. h. der Föten und Resorptionen, bei homogenem Material konstant sein. Einige wenige Ratten der Kontroll- und Versuchsgruppen, bei denen nur ein oder zwei Implantate vorlagen, wurden deshalb von der Analyse ausgeschlossen. Zu den in Tabelle 2 zusammengestellten Ergebnissen ist bezüglich der statistischen Auswertung folgendes zu bemerken: Die Resorptionshäufigkeit wurde einmal als Prozent der Resorptionen von der *gesamten* Zahl von Implantaten wie-

dergegeben (Methode I); bei der Methode II dagegen entspricht der angeführte %-Wert dem Mittelwert der Resorptionshäufigkeiten bei den verschiedenen Tieren einer Gruppe. Was die Angaben über das mittlere Fötengewicht betrifft, so wurden die Werte einer Gruppe einer Varianzanalyse unterzogen. Bei Methode I läßt der Mittelwert die Streuung zwischen den einzelnen Würfen außer acht, und der Fehler errechnet sich aus der sogenannten Intra-Tiervarianz. Bei der Methode II dagegen wurde über die Mittelwerte der einzelnen Muttertiere gemittelt und der Fehler aus der sogenannten Inter-Tiervarianz berechnet. Der Vergleich der entsprechenden Werte in Tabelle 2 zeigt, daß die Variabilität zwischen den einzelnen Würfen eindeutig größer ist als die Streuung innerhalb der Würfe.

Die Häufigkeit der Resorptionen wird, wie aus Tabelle 2 zu entnehmen ist, durch die höhere Ca-DTPA-Dosis stark, auf rund das sechsfache erhöht, während bei der niedrigeren Dosis keine statistisch signifikante Erhöhung der Resorp-

Tabelle 2. Einfluß von DTPA auf die pränatale Entwicklung. Mittelwerte  $\pm$  Standardfehler. Erklärung bezüglich I und II siehe Text.

	Kontrolle	Ca-DTPA (7. bis 9. Tag)	Ca-DTPA (7. bis 9. Tag)	Ca-DTPA (7. bis 14. Tag)	Zn-DTPA (7. bis 9. Tag)
Gewicht der Muttertiere (g)	202	201	214	203	206
Zahl der Muttertiere	12	10	8	12	11
Chelatdosis ( <i>mannitol</i> $\cdot$ $10^{-3}$ )	—	0,60	0,19	0,58	0,59
Zahl der Implantate pro Muttertier	9,3	9,9	8,9	9,8	9,0
% Resorptionen (I)	10,7 $\pm$ 2,9	65,7 $\pm$ 4,8	15,5 $\pm$ 4,3	75,4 $\pm$ 4,0	10,0 $\pm$ 3,2
% Resorptionen (II)	10,4 $\pm$ 3,0	65,1 $\pm$ 7,5	13,5 $\pm$ 6,4	76,86 $\pm$ 7,0	9,7 $\pm$ 5,4
Gewicht der Föten (g) II (I)	3,19 $\pm$ 0,29	2,41 $\pm$ 0,14	2,83 $\pm$ 0,12	2,38 $\pm$ 0,15	3,05 $\pm$ 0,16
Gewicht der Föten (g) I (II)	3,17 $\pm$ 0,066	2,51 $\pm$ 0,044	2,82 $\pm$ 0,030	2,38 $\pm$ 0,058	3,07 $\pm$ 0,030
Zahl der Metatarsalknochen	3,98 $\pm$ 0,012	3,63 $\pm$ 0,127	3,63 $\pm$ 0,089	3,31 $\pm$ 0,112	3,97 $\pm$ 0,017
Zahl der Wirbelkörper (vom Beckenbeginn)	8,10 $\pm$ 0,08	6,94 $\pm$ 0,09	6,77 $\pm$ 0,29	5,48 $\pm$ 0,21	7,80 $\pm$ 0,08

tionsrate mehr vorliegt, desgleichen nicht im Falle von Zn-DTPA. Die Gruppe, die vom siebenten bis 14. Tag Ca-DTPA erhielt, weist eine im Vergleich zu der kürzer dauernden Verabfolgung höhere Resorptionsrate auf, doch erreicht der Unterschied keine statistische Signifikanz. Einen eindeutigen Einfluß übt Ca-DTPA auch auf das Gewicht der Föten aus, wobei auch im Falle der niedrigeren Ca-DTPA-Dosis das Gewicht statistisch gesichert niedriger als in der Kontrolle ist. Wie auch im Falle der Resorptionen, liegt bezüglich des Fötengewichts kein gesicherter Unterschied zwischen den Gruppen vor, in denen Ca-DTPA am siebenten bis neunten bzw. siebenten bis 14. Tag verabfolgt wurde. Ein normales Gewicht weisen die Föten in der Zn-DTPA-Gruppe auf.

Bei der Durchsicht der Föten konnten in keiner der Gruppen makroskopisch sichtbare Mißbildungen nachgewiesen werden. Dagegen liegt eine eindeutige Hemmung der Ossifikation durch Ca-DTPA vor, die sich in erster Linie in einer Verminderung der mit Alizarinrot anfärbaren kaudalen Wirbelkörper und — in geringerem Maße — der Metatarsalknochen manifestiert (Tab. 2). Zn-DTPA zeigte bezüglich der Metatarsalknochen keine Wirkung, während die mittlere Zahl der Wirbel geringfügig und an der Grenze der statistischen Signifikanz ( $P = 0,02$ ) vermindert ist.

## Diskussion

Unsere Versuche zeigen, daß die Verabfolgung von Ca-DTPA während der kritischen Phase der Organogenese einen toxischen Effekt auf den Fötus ausübt, der sich in einer starken Erhöhung der Resorptionshäufigkeit sowie in einer Verlangsamung des fötalen Wachstums und der Ossifikation manifestiert. Mißbildungen konnten wir zwar nicht nachweisen, doch läßt sich im Hinblick auf das zum Teil stark herabgesetzte Gewicht der Föten das Vorliegen von Mißbildungen bzw. einer Atrophie des ZNS und der Augen nicht ausschließen. Eine Verlängerung der Ca-DTPA-Verabfolgung über die Phase der Organogenese hinaus, d. h. bis zum

<sup>1</sup> Diese Annahme wird durch eine neuere Untersuchung von Swenerton u. Hurley [Science 173 (1971), 62] bestätigt: Die Verfütterung von 3% Na<sub>2</sub>-EDTA an schwangere Ratten erhöhte die Resorptionshäufigkeit und führte zu fötalen Mißbildungen. Bei Erhöhung des Zn-Gehalts der Nahrung auf das Zehnfache zeigte dagegen EDTA keinen Einfluß.

14. Tag, zeigte eine nur geringfügige und nicht immer statistisch gesicherte Erhöhung der Toxizität. Daß es sich bei der Erhöhung der Resorptionsrate und der Wachstumshemmung möglicherweise um zwei verschiedene Wirkungsmechanismen und/oder Angriffsorte des Chelatbildners handelt, geht aus der Tatsache hervor, daß im Falle der niedrigeren Ca-DTPA-Dosis die Resorptionsrate dem Kontrollwert entspricht, der Einfluß auf das Wachstum aber noch eindeutig nachweisbar ist.

Die Föten sind nach den obigen Versuchsergebnissen erheblich empfindlicher gegenüber Ca-DTPA als die Muttertiere, bei denen keine toxischen Nebenerscheinungen beobachtet wurden.

Was die Ursache für die toxischen Wirkungen von Ca-DTPA auf die fötale Entwicklung betrifft, so legt der Nachweis, daß Zn-DTPA diesbezüglich unwirksam ist, naturgemäß die Vermutung nahe, in der Chelierung von endogenem Zn durch DTPA, genauer ausgedrückt dem Austausch gegen Ca, den pathogenetisch relevanten Faktor zu sehen.<sup>1</sup> Geht man von den Untersuchungen von Havlíček [11] und Dvořák [7] über die Beeinflussung des Zn-Stoffwechsels durch Ca-DTPA aus, so würde eine dreimalige Verabfolgung von  $0,6 \text{ mmol} \cdot \text{kg}^{-1}$  bei dem Muttertier zu einer positiven Zn-Bilanz und zu einer Mobilisierung von etwa ein bis zwei  $\mu\text{mol Zn}$  führen. Dazu tritt der Umstand, daß nach den Ergebnissen der Tabelle 1 das Chelat im Fötus eine etwas längere Verweilzeit als im Muttertier aufzuweisen scheint und damit die Wahrscheinlichkeit für die Wechselwirkung mit Zn erhöht wird. Die Verzögerung des Wachstums bei Zn-Defizienz ist wohl bekannt (Literatur bei Vallee [20] und Follis [9]), und ein analoger Einfluß auf das fötale Wachstum ist sehr wahrscheinlich. Bei Hühnern konnte eine eindeutige Häufung von verschiedenartigsten Mißbildungen bei Zn-Mangel nachgewiesen werden [13].

Die praktischen Konsequenzen aus unseren Befunden liegen auf der Hand: Die Medikation von Ca-DTPA während der Schwangerschaft ist kontraindiziert. Für die Verabfolgung von Zn-DTPA dagegen bestehen keine Bedenken. Die Frage der Verwendung von Zn-DTPA an Stelle des Ca-Chelats wurde in der Einleitung kurz berührt und an anderer Stelle [3] ausführlich diskutiert.

## Zusammenfassung

### Metabolismus und Toxizität therapeutischer Chelatbildner

#### XI. Mitteilung: Einfluß auf die pränatale Entwicklung bei der Ratte

Die Verabfolgung von Ca-DTPA an trächtige Ratten während des Stadiums der Organogenese löst keine makroskopisch sichtbaren Mißbildungen aus, jedoch eine starke Erhöhung der Resorptionshäufigkeit sowie eine Verlangsamung des fötalen Wachstums und der Ossifikation. Zn-DTPA dagegen ist nicht toxisch. Mit Hilfe von  $^{51}\text{Cr(III)}$ -ÄDTA wurde ein nichtlimitierter diaplazentarer Transfer des Chelats nachgewiesen. Die theoretische und praktische Bedeutung dieser Befunde wird diskutiert.

## Summary

### Metabolism and Toxicity of Therapeutic Chelating Agents

#### 11th Communication: Influence on the Prenatal Development in the Rat

The administration of Ca-DTPA to pregnant rats during the phase of organogenesis leads to a markedly higher resorption rate as well as to a retardation of fetal growth and ossification. Macroscopically visible malformations were not observed. Zn-DTPA proved to be nontoxic. As shown by  $^{51}\text{Cr(III)}$ -EDTA, the diaplacental transfer of the chelate is not limited. The theoretical and practical significance of the results is discussed.

## Résumé

### Métabolisme et toxicité des chélateurs thérapeutiques

#### 11ème communication: L'influence sur le développement prénatal chez le rat

L'administration du chélate calcique de DTPA à des rates en gestation pendant la période de l'organogénèse ne provoque aucune malformation visible mais une forte augmentation des résorptions ainsi qu'une inhibition de la croissance et de l'ossification. Le chélate zincique du DTPA ne montre pas d'effets toxiques. Des études conduites avec le  $^{51}\text{Cr(III)}$ -EDTA permettent de constater un transfert du chélate à travers le placenta. La signification pratique et théorique de ces résultats est discutée.

## Schrifttum

- [1] Bohne, F., A.-E. Harmuth-Hoene, K. Kürzinger, F. Havlíček: Strahlentherapie 136 (1968), 609.  
[2] Catsch, A.: Naunyn-Schmiedebergs Arch. exp. Path. Pharmak. 246 (1964), 316.  
[3] Catsch, A.: Dekorporierung radioaktiver und stabiler Metallionen. K. Thiemig, München 1968.  
[4] Catsch, A., D. Kh. Lê, D. Chambault: Int. J. Radiat. Biol. 8 (1964), 35.  
[5] Catsch, A., E. von Wedelstaedt: Experientia (Basel) 21 (1965), 210.  
[6] Dawson, A. B.: Stain Technol. 1 (1926), 123.  
[7] Dvořák, P.: Strahlentherapie 139 (1970), 611.  
[8] Dyckerhoff, H. R., R. Marx, B. Ludwig: Z. ges. exp. Med. 110 (1942), 412.  
[9] Follis, R. H.: In „Zinc Metabolism“. A. S. Prasad (Ed.), S. 129, Ch. C. Thomas, Springfield, Ill. 1966.  
[10] Goldstein, A., L. Aronov, S. M. Kalman: Principles of Drug Action. Harper & Row, New York-Evanston-London 1969.  
[11] Havlíček, F.: Strahlentherapie 134 (1967), 296.  
[12] Kalter, H., J. Warkany: Physiol. Rev. 39 (1959), 69.  
[13] Kienholz, E. W., D. E. Turk, M. L. Sunde, W. G. Hoekstra: J. Nutr. 75 (1961), 211.  
[14] Popovici, A., C. F. Geschickter, A. Reinovsky, M. Rubin: Proc. Soc. exp. Biol. (N. Y.) 74 (1950), 415.  
[15] Seidel, A.: Strahlentherapie 139 (1970), 603.  
[16] Seidel, A., V. Volf, A. Catsch: Int. J. Radiat. Biol. 19 (1971), 399.  
[17] Smith, V. H.: BNWL-1050, part 1,5.3 (1970).  
[18] Smith, V. H.: Pers. Mitt.  
[19] Tuchmann-Duplessis, H., L. Mercier-Parot: C. R. Acad. Sci. (Paris) 243 (1956), 1064.  
[20] Vallee, B. L.: Physiol. Rev. 39 (1959), 443.  
[21] Volf, V., M. Vladár, A. Seidel: Arch. int. Pharmacodyn. 190 (1971), 110.  
[22] Warkany, J.: Amer. J. Dis. Child. 66 (1943), 511.  
[23] Weber, K. M.: Z. ges. exp. Med. 150 (1969), 354.

Anschrift d. Verf.: Dr. med. H. Bömer, Kernforschungszentrum Karlsruhe, Institut für Strahlenbiologie, 75 Karlsruhe 1, Postfach 3640, Germany.