

be the result of a circadian variation in the detoxification and/or distribution of morphine, or variable permeability of the blood brain barrier with time of day, or other 24-h changes in physiological systems. However, the rate of morphine destruction would appear to play but a minor role in the morphine rhythms demonstrated in this paper since analgesic activity was determined only 20 min after the morphine administration. Studies have been initiated to explore the relationship between pain threshold and morphine analgesia rhythms.

Zusammenfassung. Durch Tag-Nacht-Umkehr konnte bei Mäusen eine entsprechende Phasenverschiebung beim Muster der Sensibilität für die schmerzstillende Wirkung des Morphins erzielt werden.

E. F. LUTSCH and R. W. MORRIS

*Northeastern Illinois State College, and
University of Illinois, College of Pharmacy,
Chicago (Illinois 60680, USA), 8 September 1970.*

Kompensation der teratogenen Wirkung eines Thalidomid-Metaboliten durch L-Glutaminsäure

Der Thalidomid-Metabolit N-Phthalyl-DL-glutaminsäure¹ weist bei der SWS-Maus nach i.p. Applikation eine starke embryotoxische Aktivität auf², die ausschliesslich auf das L-Isomere zurückgeht³. In der vorliegenden Arbeit soll untersucht werden, ob die embryotoxische Wirkung der N-Phthalyl-L-glutaminsäure (N-P-L-Glu) durch zusätzliche Verabreichung von L- bzw. D-Glutaminsäure (L-Glu bzw. D-Glu) reduziert oder vollständig kompensiert werden kann.

Die Versuche erfolgten wieder an der Maus (SWS); Angaben über Tierhaltung, künstliche Besamung sowie die Methode der Schnittentbindung und Untersuchung auf embryotoxische Wirkung finden sich unter l.c.². Synthese und physikalische Daten der verabreichten N-P-L-Glu wurden ebenfalls früher mitgeteilt³. Zur Herstellung der Injektionslösung versetzte man in einem 25-ml-Erlenmeyerkolben 400 mg fein gepulverte N-P-L-Glu mit 5 ml Tween 20⁴, rührte 30 min mit einem Magnetrührer und tropfte dann langsam unter fortwährendem Rühren 15 ml physiologische Kochsalzlösung zu. Die Lösung war nach ca. 5 min klar und kam innerhalb 1 h zur Anwendung. Alle Verabreichungen erfolgten durch i.p. Injektion als einmalige Dosis.

Den Mäusen in Gruppe I–IV applizierten wir am Tag 9 p.c. je 400 mg/kg N-P-L-Glu in Form der oben beschriebenen Lösung (Tabelle I). Zusätzlich erhielten die

Tiere in Gruppe II–IV nach 1–3 min eine zweite Injektion, und zwar je 50, 100, 200 bzw. 400 mg/kg L-Glu⁵ in Gruppe II, je 400 mg/kg D-Glu⁶ in Gruppe III sowie 40 ml/kg physiologische Kochsalzlösung in Gruppe IV; die Lösungen der L- und D-Glu waren 2%ig in physiologischer Kochsalzlösung und unmittelbar vor der Injektion frisch zubereitet.

Zur Kontrolle bekamen am Tag 9 p.c. die Tiere in Gruppe V je 40 ml/kg physiologische Kochsalzlösung und in Gruppe VI je 40 ml/kg der Mischung physiologische Kochsalzlösung/Tween 20 = 3:1.

Allen in Tabelle II aufgeführten Tieren wurden 9 Tage 0 h p.c. je 400 mg/kg N-P-L-Glu appliziert. Jeweils 4 Mäuse hatten bereits 3, 6, 12 bzw. 18 h vor diesem Zeitpunkt je 400 mg/kg L-Glu erhalten; jeweils 4 anderen

¹ J. W. FAIGLE, H. KEBERLE, W. RIESS und K. SCHMID, *Experientia* 18, 389 (1962).

² F. KÖHLER und H. OCKENFELS, *Experientia* 26, 1157 (1970).

³ H. OCKENFELS und F. KÖHLER, *Experientia* 26, 1236 (1970).

⁴ Tween 20 rein, M~1200; Serva GmbH & Co., Heidelberg.

⁵ L(+)-Glutaminsäure für biochemische Zwecke (LAB); Merck, Darmstadt.

⁶ D-Glutaminsäure puriss.; Fluka AG, Buchs, Schweiz.

Tabelle I. Versuche zur Kompensation der embryotoxischen Wirkung von N-Phthalyl-L-glutaminsäure durch zusätzliche Verabreichung von L- bzw. D-Glutaminsäure (SWS-Maus)

Gruppe Nr.	Verabreichte Substanzen	Dosis ^a	Muttertiere	Implantationen I	Resorptionen		Feten Gesamt F	Missgebildet M	
					R	R/I (%)		M	M/F (%)
I	N-Phthalyl-L-glutaminsäure ^a	400 mg/kg	10	134	75	56,0	59	56	94,9
II	N-Phthalyl-L-glutaminsäure ^a + L-Glutaminsäure ^b	400 mg/kg + 50 mg/kg	5	68	29	42,6	39	34	87,2
		100 mg/kg	5	64	18	28,1	46	26	56,5
		200 mg/kg	5	61	13	21,3	48	11	22,9
		400 mg/kg	5	72	6	8,3	66	0	0
		400 mg/kg + D-Glutaminsäure ^b	5	74	25	33,8	49	49	100
III	N-Phthalyl-L-glutaminsäure ^a + D-Glutaminsäure ^b	400 mg/kg	5	74	25	33,8	49	49	100
IV	N-Phthalyl-L-glutaminsäure ^a + physiol. NaCl-Lösung	40 ml/kg	5	67	52	77,6	15	15	100
V	physiol. NaCl-Lösung	40 ml/kg	10	138	2	1,4	136	0	0
VI	physiol. NaCl-Lösung/Tween 20 (3:1)	40 ml/kg	20	287	11	3,8	276	0	0
VII	Normaltiere	—	30	399	12	3,0	387	0	0

^a 2%ige Lösung in einer Mischung aus physiologischer Kochsalzlösung und Tween 20 im Verhältnis 3:1. ^b 2%ig in physiologischer Kochsalzlösung; 1–3 min nach der ersten Injektion appliziert. ^c Alle Verabreichungen erfolgten am 9. Tag p.c. als einmalige i.p. Injektion.

Tabelle II. Kompensation der embryotoxischen Wirkung von N-Phthalyl-L-glutaminsäure: Abhängigkeit vom Zeitpunkt der zusätzlichen Applikation von L-Glutaminsäure (SWS-Maus)

Zeitpunkt der Applikation		Mutter- tiere	Implan- tationen I	Resorptionen		Feten Gesamt F	Missgebildet	
N-Phthalyl- L-glutaminsäure ^a	L-Glutaminsäure ^b			R	R/I (%)		M	M/F(%)
9 Tage 0 Std. p.c.	8 Tage 6 Std. p.c.	4	54	27	50,0	27	26	96,3
9 Tage 0 Std. p.c.	8 Tage 12 Std. p.c.	4	53	21	39,6	32	16	50,0
9 Tage 0 Std. p.c.	8 Tage 18 Std. p.c.	4	59	9	15,3	50	3	6,0
9 Tage 0 Std. p.c.	8 Tage 21 Std. p.c.	4	61	5	8,2	56	0	0
9 Tage 0 Std. p.c.	9 Tage 0 Std. p.c.	5	72	6	8,3	66	0	0
9 Tage 0 Std. p.c.	9 Tage 3 Std. p.c.	4	61	10	16,4	51	0	0
9 Tage 0 Std. p.c.	9 Tage 6 Std. p.c.	4	47	12	25,5	35	25	71,4
9 Tage 0 Std. p.c.	9 Tage 12 Std. p.c.	4	48	26	54,2	22	22	100

^a 400 mg/kg i.p. als 2%ige Lösung in einer Mischung aus physiologischer Kochsalzlösung und Tween 20 (3:1). ^b 400 mg/kg i.p., 2%ig in physiologischer Kochsalzlösung.

Tieren injiziert wir 3, 6 bzw. 12 h nach Verabreichung der N-P-L-Glu die gleiche Dosis L-Glu (2%ig in physiologischer Kochsalzlösung).

Die Auswertung der Würfe ergab folgenden Befund: Nach einmaliger i.p. Injektion von 400 mg/kg N-P-L-Glu am Tag 9 p.c. sind 56,0% der Implantationen resorbiert und 94,9% der Feten missgebildet (Tabelle I, Gruppe I). Diese intensive Fruchtschädigung kann durch gleichzeitige Verabreichung von L-Glu abgeschwächt werden: Bereits nach Gabe von 100 mg/kg L-Glu ist sowohl die Resorptionsrate (R/I) als auch die Missbildungsrate (M/F) gegenüber dem entsprechenden Wert in Gruppe I signifikant herabgesetzt (Vierfelder- χ^2 ; $P < 0,05$). Bei zusätzlicher Applikation von 400 mg/kg L-Glu treten keine Missbildungen mehr auf, und die Resorptionsrate geht auf 8,3% zurück (Gruppe II).

Das D-Isomere der Glu zeigt unter gleichen Versuchsbedingungen keine anti-teratogene Wirkung; allerdings fallen die Resorptionen von 56,0 auf 33,8% (Gruppe III). Dieser Abfall kann nicht auf die mit dem D-Isomeren zwangsläufig vermehrt zugeführte Kochsalzlösung zurückgehen, denn durch physiologische Kochsalzlösung, die auf die teratogene Aktivität der N-P-L-Glu keinen deutlichen Einfluss ausübt, wird die Resorptionsrate sogar auf 77,6% erhöht (Gruppe IV). Bezüglich der Missbildungsformen bestehen zwischen den einzelnen Gruppen keinerlei Unterschiede; sie entsprechen den früher beschriebenen Typen^{2,3}.

Wie aus Tabelle II ersichtlich, kann die Wirkung der N-P-L-Glu auch dann noch durch L-Glu im Sinne einer Abschwächung beeinflusst werden, wenn die Applikation dieses Schutzstoffes nicht zum gleichen Zeitpunkt, sondern vor oder nach der Gabe des embryotoxischen Agens erfolgt: Nach Injektion von 400 mg/kg N-P-L-Glu ist keine embryotoxische Wirkung mehr zu beobachten, wenn 3 h vorher 400 mg/kg L-Glu verabreicht worden sind. Selbst wenn die Zeitspanne zwischen Vorbehandlung und Zufuhr der embryotoxischen Substanz 12 h beträgt, ist deren Effekt noch merklich reduziert. Findet die Injektion der L-Glu jedoch 18 h vorher statt, so entfaltet die N-P-L-Glu wieder ihre volle embryotoxische Aktivität.

Eine analoge zeitliche Beziehung findet sich auch dann, wenn die Verabreichung der L-Glu nachträglich erfolgt; jedoch unterbleibt die Schutzwirkung jetzt bereits bei

einem 12stündigen Abstand zwischen den beiden Injektionen.

Wie aus den Versuchsergebnissen hervorgeht, lässt sich die embryotoxische Wirkung der N-P-L-Glu durch gleichzeitige Verabreichung von L-Glu vollständig aufheben; die D-Glu dagegen zeigt unter gleichen experimentellen Bedingungen keinen anti-teratogenen Effekt.

Auf Grund dieses Ergebnisses läge es nahe anzunehmen, dass N-P-L-Glu als Antagonist in den Glutaminsäure/Glutamin-Stoffwechsel eingreift. Gegen diese Deutung spricht jedoch eine grosse Anzahl detaillierter Untersuchungen an Säugetieren und an mikrobiologischen Systemen^{7,8}, bei denen keine Störung der biochemischen Funktionen natürlicher Glutaminsäure-Derivate durch Thalidomid oder seine Metabolite festgestellt werden konnte. Ferner ist mit der Glutaminsäure-Hypothese die Beobachtung schwer in Einklang zu bringen, dass auch Thalidomid-ähnliche Verbindungen ohne den Glutaminsäure-Molekülteil teratogene Wirkungen aufweisen⁸.

Summary. Skeletal defects were observed in the offspring of SWS-mice following i.p. administration of phthaloyl-L-glutamic acid, a metabolite of thalidomide. The fetuses of animals which received L-glutamic acid in addition to the teratogenic drug, did not show any malformations, whereas concurrent i.p. administration of the D-isomer of glutamic acid failed to reverse teratogenicity induced by phthaloyl-L-glutamic acid.

F. KÖHLER und H. OCKENFELS⁹

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

⁷ J. D. McCOLL, M. GLOBUS und S. ROBINSON, Can. J. Physiol. Pharmac. 43, 69 (1965).

⁸ H. KEBERLE, J. W. FAIGLE, H. FRITZ, F. KNÜSEL, P. LOUSTALOT und K. SCHMID, in *Embryopathic Activity of Drugs* (J. and A. Churchill, London 1965), p. 210, und dort zitierte Literatur.

⁹ Abteilung für Biochemie der Universität Ulm, Parkstrasse 11, D-69 Ulm (Deutschland).