

Embryotoxicity of DDP in Swiss Webster mice

Group	No. of dams	No. of conceptuses per animal	No. of resorbed/dead fetuses/animal	No. of live fetuses per animal	Total No. of resorbed or dead fetuses	Total No. of live fetuses	B.wt of live fetuses (g)
Noninjected	12	9.58 ± 1.73	0.50 ± 1.00	9.08 ± 1.68	6	109	1.24 ± 0.16
Saline injected	12	11.08 ± 1.78	0.67 ± 0.65	10.42 ± 1.88	8	125	1.17 ± 0.16
13 mg/kg DDP	10	9.90 ± 1.20	9.90 ± 1.20*	0	101*	0*	0
8 mg/kg DDP	13	9.77 ± 2.92	9.54 ± 3.10*	0.23 ± 0.83*	124*	3*	0.80 ± 0.03*
3 mg/kg DDP	12	10.67 ± 1.72	3.33 ± 4.03**	7.33 ± 3.11**	40*	88*	1.09 ± 0.18**

DDP was injected i.p. on day 8 of gestation. Control dams received saline or were not injected at all. All dams were killed on day 18 of gestation. Results are given as means ± SD. * Statistically significant ($p < 0.001$). ** Statistically significant ($p < 0.01$).

the surviving embryos compared with the controls. A total of 30 fetuses from 12 dams injected with 3 mg/kg of DDP were examined after alizarin S staining. 11 dams had at least 1 malformed fetus. 19 out of the 30 fetuses examined showed some skeletal malformations such as zig-zag sternebrae, supernumerary ribs and vertebral malformations. 1 fetus showed multiple abnormalities including cleft palate and deformed extremities. Both live fetuses delivered from dams treated with 8 mg/kg DDP showed skeletal malformations. In the control group only 1 fetus showed grossly visible malformations of extremities. 1 of 22 alizarin S stained fetus showed zig-zag sternebrae. No other skeletal malformations were noted in untreated animals.

Discussion. LD₅₀ for DDP injected i.p. was estimated to be in the range of 7.6 to 9.5 mg/kg for rodents². The newer, better purified compounds seem to be less toxic. Our data (unpublished) indicate that LD₅₀ for Swiss Webster mice injected i.p. is in the range of 17–18 mg/kg. Attesting to the relatively low toxicity of new compounds is the fact that in

this study, none of the dams injected with either 3,8 or 13 mg/kg died. Doses of 9 mg/kg seem to be well-tolerated even after multiple injections³. In contrast to low toxicity in adult animals DDP appears to be highly embryotoxic if administered during early stages of pregnancy. Even in a dose of 3 mg/kg, DDP kills approximately 50% of all exposed fetuses. The surviving fetuses show weight reduction and skeletal malformations. Although most skeletal malformations were minor, their presence indicates that DDP interferes with normal embryogenesis and that its use in pregnant women should be discouraged.

- 1 M. Rosencweig, D.D. von Hoff, M. Slavik and F.M. Muggia, Ann. int. Med. 86, 803 (1977).
- 2 J.M. Ward and D.M. Young, J. Am. vet. med. Ass. 169, 952 (1976).
- 3 V.K. Ghants, M.T. Jones, D.A. Woodard, J.R. Durant and R.N. Hiramoto, Cancer Res. 37, 771 (1977).

Hypertrophie du foie provoquée par l'oxythioquinox: Influence du taux de lipides de la ration alimentaire

Liver enlargement induced by oxythioquinox: Effect of the fat content of the diet

G. Carrera, S. Mitjavila et R. Derache

INSERM, U.87, Institut de Physiologie, 2, rue François-Magendie, F-31400 Toulouse (France), 24 juillet 1978

Summary. The relationship between the level of lipid calories in the diet and the effects of oxythioquinox, administered at 200 mg/kg fresh food, for 35 days, was studied on the liver enlargement of rat. The results show that the level lipid calories itself have no effect since, in the treated animals, the liver enlargement is due part to an increase of the water content and part to an increase of the size of the cells.

L'augmentation du poids du foie sous l'effet des substances xénobiotiques et en particulier des pesticides est un phénomène fréquemment observé en toxicologie^{1–3}. Certains auteurs^{4,5} ont observé une augmentation importante du poids du foie chez les animaux intoxiqués à l'oxythioquinox, dérivé à la fois fungicide et acaricide^{6,7}, sans toutefois en préciser les causes. Dans un travail antérieur⁸, nous avions observé que cette augmentation du poids du foie, sous l'effet de l'oxythioquinox administré à 200 mg/kg d'aliment, était en relation avec le taux de calories lipidiques du régime. Il nous a donc paru intéressant de préciser la nature de cette hépatomégalie et de rechercher une interaction éventuelle entre les effets de l'oxythioquinox et ceux des lipides du régime puisque nous avions également montré que la toxicité de l'oxythioquinox était potentialisée lorsqu'il était administré en solution huileuse⁹.

Matériel et méthodes. Nous avons utilisé des rats mâles (Wistar CF), répartis en 4 lots de 6 rats témoins et 4 lots de

6 rats traités, en fonction des calories lipidiques de la ration, les traités recevant l'oxythioquinox, solubilisé dans les lipides de la ration, à la concentration de 200 mg/kg d'aliment frais. Les régimes dont la composition a été donnée dans un travail antérieur¹⁰ contiennent respectivement 3, 18, 35 et 49% de calories d'origine lipidiques. En faisant varier le taux d'hydratation et la teneur en glucides, nous avons maintenu le rapport calories totales/poids des protéines en g, constant et égal à 21, l'apport calorique total du régime étant de 1950 cal/kg d'aliment frais. A la fin des 35 jours de la période expérimentale, les animaux ont été pesés, sacrifiés et le foie prélevé. Sur cet organe, nous avons déterminé la teneur en eau (105 °C pendant 48 h), les protéines¹¹, l'ARN et l'ADN¹², les acides gras totaux et le cholestérol¹³. Sur ces résultats, nous avons étudié successivement la régression, la linéarité, l'effet propre du régime, l'effet propre de l'oxythioquinox par comparaison des ordonnées à l'origine et l'interaction par le test de compa-

raison des pentes¹⁴. Les résultats sont exprimés par g de foie frais mais ils ont été également calculés pour le foie total et par 100 g de poids corporel.

Résultats. Les régimes utilisés nous ont permis d'obtenir une croissance identique chez tous les animaux témoins d'une part et chez tous les animaux traités d'autre part (voir tableau). Le taux de calories lipidiques du régime est sans effet, aussi bien sur le poids corporel que sur le poids du foie de tous les animaux. Par contre, l'oxythioquinox diminue significativement le poids corporel des animaux traités et augmente ($p < 0,01$) le poids de leur foie. Il faut noter que lorsque le poids du foie est ramené à 100 g de poids corporel, l'augmentation du poids relatif chez les traités, est encore plus significative. Le taux de calories lipidiques du régime est sans effet sur les autres paramètres étudiés: eau, protéines, ARN, ADN, cholestérol et acides gras totaux, aussi bien chez les animaux témoins que chez les traités et ceci quelque soit le mode d'expression des résultats. L'oxythioquinox augmente significativement la teneur en eau et en ARN chez les animaux traités alors qu'il diminue significativement le taux d'ADN et de protéines, lorsque les résultats sont exprimés par g de foie frais (voir tableau). Par contre, le taux de cholestérol et d'acides gras totaux ne varie pas significativement sous l'effet de l'oxythioquinox. Si l'on exprime les résultats en g/100 g de poids corporel, tous ces paramètres sont augmentés significativement chez

les animaux traités par rapport aux animaux témoins sous l'effet propre de l'oxythioquinox, à l'exception de l'ADN et du cholestérol qui eux diminuent significativement chez les traités. Pour tous les paramètres étudiés, quelques soit le mode d'expression des résultats, il existe une interaction significative entre les effets de l'oxythioquinox et ceux du taux de calories lipidiques de la ration. Lorsque les résultats sont exprimés par g de foie frais, pour la teneur en eau, en cholestérol et en acides gras, l'interaction va dans le sens d'une potentiation des effets de l'oxythioquinox par les lipides, alors que pour les autres paramètres, l'interaction traduit un effet antagoniste entre les lipides et l'oxythioquinox. Lorsque les résultats sont exprimés par 100 g de poids corporel, l'interaction va toujours dans le sens d'un antagonisme entre les effets des lipides et ceux de l'oxythioquinox. Sur la figure, nous avons représenté les rapports ARN/ADN et protéines/ADN. L'étude de ces 2 rapports montre qu'ils sont toujours plus élevés dans le cas des animaux traités et que la différence entre les témoins et les traités tend à diminuer lorsque le pourcentage de calories lipidiques augmente.

Discussion et conclusion. Les résultats obtenus montrent que l'augmentation du poids du foie observée chez les animaux intoxiqués à l'oxythioquinox, à moyen terme, par voie orale, est due à 2 facteurs simultanés. D'une part, on observe une augmentation des protéines cellulaires et d'autre

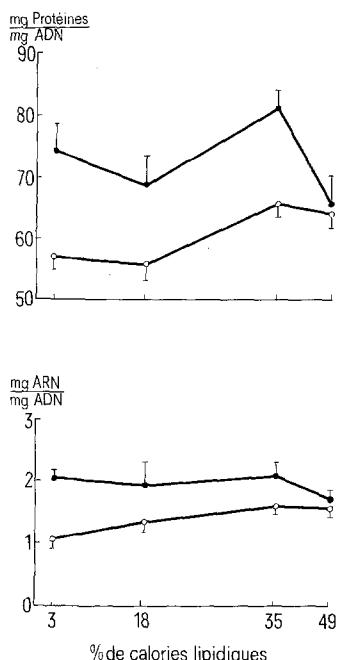
Analyse des divers constituants du foie

Lots	Pourcentage de calories lipidiques					Equation des droites $y = a(\pm a')x + b(\pm b')$	F de la régression F_{23}^1	F de la linéarité F_{20}^2	Effet propre du régime F_{20}^3	Effet propre de l'oxythioquinox (DL = 10)	Interaction (DL = 46)
	3	18	35	49	$a \pm a'^d$	$b \pm b'^d$					
Poids vif des rats	Témoins $\pm 9,981$	262,26 ^c $\pm 11,966$	262,0 $\pm 10,137$	268,16 $\pm 0,289$	255,16 $\pm 0,2896$	-0,087 $\pm 7,604$	264,17	< 1	< 1	< 1	11,59 ^h 2,24 ^f
Oxythioquinox en g	219,0 $\pm 12,886$	216,16 $\pm 6,784$	211,83 $\pm 5,799$	224,66 $\pm 11,473$	0,095 $\pm 0,2734$	214,67 $\pm 7,178$		< 1	< 1	< 1	
Poids du foie en g	Témoins $\pm 0,491$	10,98 $\pm 0,659$	11,53 $\pm 0,927$	10,01 $\pm 0,465$	-0,022 $\pm 0,0189$	11,56 $\pm 0,491$	1,36	< 1	1,07	4,50 ^g 2,05 ^f	
Oxythioquinox	12,81 $\pm 0,836$	12,19 $\pm 0,707$	11,46 $\pm 0,261$	11,35 $\pm 0,672$	-0,033 $\pm 0,0181$	12,82 $\pm 0,475$	3,06	< 1	1,06		
Eau ^a	Témoins $\pm 6,076$	673,78 $\pm 2,879$	677,21 $\pm 3,458$	677,94 $\pm 6,163$	-0,075 $\pm 0,1392$	669,43 $\pm 3,655$	676,56 $\pm 3,655$	< 1	< 1	< 1	2,99 ^f 3,26 ^g
Oxythioquinox	689,39 $\pm 11,325$	692,31 $\pm 6,291$	680,30 $\pm 3,603$	701,59 $\pm 15,741$	0,144 $\pm 0,2978$	687,12 $\pm 7,818$		< 1	< 1	< 1	
Protéines ^a	Témoins $\pm 4,653$	187,41 $\pm 5,715$	187,38 $\pm 5,324$	189,98 $\pm 5,224$	0,123 $\pm 0,1444$	192,95 $\pm 3,792$	186,18 $\pm 3,792$	< 1	< 1	< 1	6,81 ^h 1,68
Oxythioquinox	165,78 $\pm 6,732$	177,65 $\pm 7,645$	181,26 $\pm 4,652$	174,79 $\pm 4,706$	0,201 $\pm 0,1760$	169,57 $\pm 4,621$		1,32	1,11	1,18	
ARN ^a	Témoins $\pm 0,438$	3,78 $\pm 0,241$	4,72 $\pm 0,342$	4,67 $\pm 0,403$	0,0208 $\pm 0,01030$	4,88 $\pm 0,271$	3,96 $\pm 0,271$	3,92	< 1	1,84	4,58 ^g 6,09 ^h
Oxythioquinox	5,05 $\pm 0,511$	4,79 $\pm 0,843$	4,79 $\pm 0,288$	4,88 $\pm 0,116$	-0,0051 $\pm 0,01385$	4,75 $\pm 0,363$	5,01 $\pm 0,363$	< 1	< 1	< 1	
ADN ^a	Témoins $\pm 0,157$	3,36 $\pm 0,146$	3,46 $\pm 0,051$	2,86 $\pm 0,195$	-0,010 $\pm 0,0046$	3,06 $\pm 0,122$	3,45 $\pm 0,122$	5,54	2,43	3,47	13,13 ^h 11,37 ^h
Oxythioquinox	2,38 $\pm 0,218$	2,48 $\pm 0,102$	2,31 $\pm 0,151$	2,71 $\pm 0,114$	0,0049 $\pm 0,00449$	0,0049 $\pm 0,117$	2,34 $\pm 0,117$	1,24	1,23	1,23	
Cholestérol ^a	Témoins $\pm 0,209$	1,95 $\pm 0,545$	2,81 $\pm 0,411$	3,32 $\pm 0,566$	0,035 $\pm 0,0126$	3,63 $\pm 0,331$	1,99 $\pm 0,331$	7,38	< 1	2,57	1,05 8,73 ^h
Oxythioquinox	1,78 $\pm 0,458$	2,02 $\pm 0,263$	1,87 $\pm 0,323$	2,13 $\pm 0,523$	0,0056 $\pm 0,01118$	2,13 $\pm 0,293$	1,81 $\pm 0,293$	< 1	< 1	< 1	
Acides gras totaux ^b	Témoins $\pm 0,0249$	0,141 $\pm 0,0091$	0,129 $\pm 0,0143$	0,147 $\pm 0,0188$	0,0005 $\pm 0,00041$	0,165 $\pm 0,0108$	0,145 $\pm 0,0108$	1,31	< 1	< 1	1,94 3,76 ^h
Oxythioquinox	0,137 $\pm 0,0247$	0,128 $\pm 0,0096$	0,124 $\pm 0,0101$	0,141 $\pm 0,0187$	0,000013 $\pm 0,000491$	0,132 $\pm 0,0128$	0,132 $\pm 0,0128$	< 1	< 1	< 1	

^aRésultats exprimés en mg/g de foie frais. ^bmeq Ac. gras/g de foie frais. ^cMoyenne et erreur type de la moyenne de 6 rats sauf pour l'ARN et l'ADN où les résultats représentent la moyenne et l'erreur type de la moyenne de 4 rats. ^dEcart type. ^eSauf pour l'ARN et l'ADN où les degrés de liberté sont les suivants: régression F_{15}^1 ; linéarité F_{12}^2 ; effet propre du régime F_{12}^3 ; effet propre de l'oxythioquinox DL = 6; interaction DL = 30. ^fp < 0,05. ^gp < 0,01, ^hp < 0,001.

tre part une augmentation de la teneur en eau du tissu. Chez les animaux intoxiqués, la teneur en protéines, exprimée en g/100 g de poids corporel, et la teneur en ARN du tissu, augmentent alors que le taux d'ADN est moins élevé, bien que le poids frais du foie soit plus important. De ce fait, les rapports protéines/ADN et ARN/ADN sont toujours plus élevés chez les traités que chez les témoins (voir figure). Ceci signifie donc que les cellules sont moins nombreuses mais plus développées^{15,16}. L'augmentation du rapport protéines/ADN n'est pas suffisante pour expliquer à elle seule, le taux d'hydratation plus élevé du foie des animaux traités. En effet, bien que la teneur relative en protéines (exprimée pour le foie total/100 g de poids corporel), soit plus élevée chez les traités que chez les témoins, elle n'est cependant pas suffisante pour expliquer l'augmentation de la teneur en H_2O qui accompagne la synthèse des protéines comme cela a été observé récem-

ment¹⁷. Malgré le taux élevé de lipides de la ration, on n'observe pas une stéatose au niveau du foie, même en présence d'oxythioquinox. Le taux de calories lipidiques ne semble pas avoir d'effet significatif ni sur la teneur en eau ni sur les différents constituants du foie. Ceci est sans doute dû au maintien du rapport calories totales/poids des protéines en g, du régime à une valeur constante quelque soit le taux de calories lipidiques du régime. Les effets du taux de lipides du régime et ceux de l'oxythioquinox semblent être antagonistes pour la plupart des paramètres étudiés et l'interaction est toujours significative. Enfin il est important de souligner que cette augmentation du poids du foie n'est pas du type adaptatif car elle ne s'accompagne pas d'une augmentation de l'activité des microsomes hépatiques mais au contraire d'une diminution de cette activité⁵.



Protéines/ADN et ARN/ADN du foie en fonction du pourcentage de calories lipidiques du régime: ○ Témoin, ● oxythioquinox.

- 1 L.G. Hart et J.R. Fouts, Arch. exp. Path. Pharmak. 249, 486 (1965).
- 2 T. Barka et H. Popper, Medecine, Baltimore 46, 103 (1967).
- 3 G. Griffaton, R. Lowy, B. Arduin, F. Dupuy et B. Plumas, Ann. Nutr. Aliment. 32, 111 (1978).
- 4 G.P. Carlson et K.P. Dubois, J. Pharmac. exp. Ther. 173, 60 (1970).
- 5 D. Gaillard, G. Chamoiseau et R. Derache, Arch. env. cont. Tox. 5, 403 (1977).
- 6 K. Sasse, Höfchenbr. Bayer. PflSchutz-Nachr. 13, 197 (1960).
- 7 K. Sasse, R. Wegler et F. Grewe, Angew. Chem. 72, 973 (1960).
- 8 G. Carrera, S. Mitjavila, C. Luong Dinh et R. Derache, Ann. Nutr. Aliment. 30, 55 (1976).
- 9 G. Carrera, S. Mitjavila et C. Lacombe, Eur. J. Tox. 9, 295 (1976).
- 10 G. Carrera, N. Delvolve, S. Mitjavila et R. Derache, Toxicology (sous presse).
- 11 M.J. Johnson, J. biol. Chem. 137, 575 (1941).
- 12 Wannemacher, Bank and Wunner, Analyt. Biochem. 11, 320 (1965).
- 13 M.J. Albrink, J. Lipid Res. 1, 53 (1959).
- 14 D. Schwartz, Méthodes Statistiques à l'usage des médecins et des biologistes, 3e ed. Flammarion, Paris 1969.
- 15 G. Durand, G. Fauconneau et E. Penot, Ann. Biol. Anim. Biochem. Biophys. 5, 163 (1965).
- 16 R.Y. Thomson, F.C. Neagy, W.C. Hutchinson et J.N. Davidson, J. Biochem. 53, 460 (1953).
- 17 E. Baraona, M.A. Leo, S.A. Borowsky et C.S. Lieber, J. clin. Invest. 60, 546 (1977).

Offset rate of action of muscarinic antagonists depends on their structural flexibility

Y. Lass, S. Akselrod, B. Gavish, S. Cohen and A. Fisher¹

Department of Physiology and Pharmacology, Sackler School of Medicine, Tel Aviv University (Israel), and Institute for Biological Research, Ness-Ziona (Israel), 24 August 1978

Summary. Time course measurements of the action of muscarinic antagonists were performed in the spontaneously beating carp atrium. Several high affinity drugs, which embody the quinuclidine structure were examined. The structural flexibility of these molecules was reflected in the dissociation of the drugs from the muscarinic receptor. The dissociation of rigid drugs was very much prolonged as compared to flexible drugs of the same affinity.

It has been proposed^{2,3} that the molecular flexibility of drugs finds expression in the kinetic parameters of drug-receptor interaction. It has also been stated that the offset rates in such interactions are *a priori* very uncertain⁴, whilst onset rates are mainly diffusion-controlled⁵.

We propose that the offset rates of muscarinic antagonists can be anticipated from the extent of flexibility allowed in the framework of the respective molecules. A rigid drug dissociates from the receptor at a slower rate. The muscarinic pharmacophore consists of 3 'active' sites which,

when bound to the corresponding sites on the receptor, will necessarily impose almost equal rigidity on all such antagonists, irrespective of structural flexibility of the isolated molecule. In view of this, flexibility (or rigidity) will be of consequence only when the drug molecule is in a state of partial binding to the receptor as might occur during associative or dissociative processes.

Prolonged time course measurements in isolated organs obtained from homeotherms^{6,7} are not practical. A more suitable preparation is the spontaneously beating carp