

## **Teratogenetische und mutagenetische Untersuchungen mit Coffein im Tierexperiment\*)**

*T. von Kreybig* und *G. Czok* (Hamburg)

Mit 4 Tabellen

(Eingegangen am 30. Juni 1975)

### **Einleitung**

Mit der Erkennung der besonderen Probleme der speziellen Toxikologie, der möglichen karzinogenen, mutagenen und teratogenen Wirkung von Stoffen im Lebensbereich des Menschen geriet Coffein in den Verdacht, außer seiner anregenden und pharmakologisch günstigen Wirkkomponenten auch teratogen und mutagen zu wirken. Eine große Zahl von Experimenten mit verschiedenen Objekten unterschiedlicher Methodik, mit verschiedener Dosierung und dementsprechend auch mit unterschiedlichen Befunden wurde in den letzten 20 Jahren veröffentlicht. Das Ziel der vorliegenden Studie ist – anhand eigener experimenteller Untersuchungen –, die wichtigsten auf diesem Gebiet mitgeteilten Befunde aus dem Gesichtspunkt der toxikologischen Teratologie und Mutationsgenetik kritisch zu untersuchen.

### **Die teratogene Wirkung**

Als teratogene Wirkung wird eine die Morphogenese im Zuge der vorbirthlichen Entwicklung veränderte Aktion eines endogenen oder exogenen Faktors definiert.

Diese kann sich

- a) über den mütterlichen Stoffwechsel, via Histotrophie oder transplazentar der Frucht zugeführt,
- b) auf Grund von Störungen des mütterlichen Stoffwechsels oder der fetomaternalen Beziehung oder
- c) als Resultat einer Interaktion dieser Faktoren mit anomalen Erbanlagen

durch selektive zytotoxische Effekte in der Frucht manifestieren.

Aus teratogenetischen Tierexperimenten ist bekannt, daß die auf die biochemischen Primärreaktionen folgenden zytologischen Effekte kritischer Dosen zur anomalen Fortsetzung der Entwicklung der Frucht, also zur Entstehung von Mißbildungen führen (*Kreybig* und *Schmidt* 1966, *Kreybig* 1968, *Kreybig* 1975). Die Manifestation eines teratogenen Effektes ist in diesem Sinne durch den angetroffenen Entwicklungszustand der Frucht, also phasenspezifisch, und durch die besondere Art des Reaktionspartners, die Organotropie der Wirkung, bedingt. Durch diese zwei Gesetzmäßigkeiten modifiziert, sind für die teratogene Wirkung die allgemeinen Gesetzmäßigkeiten der Toxikologie gültig.

\*) Vortrag auf dem VII. Internationalen Wissenschaftlichen Colloquium über Kaffee. ASIC: Hamburg, Juni 1975

Nicht jede im weiteren Sinne toxische oder zytotoxische Wirkung verändert, mit dem Säugerembryo konfrontiert, den weiteren Verlauf der Morphogenese:

Manche Gifte finden selbst im subletalen Dosisbereich keinen Reaktionspartner in der Frucht, wie z. B. N-Methyl-N-nitrosourethan, Formhydrazid oder Benzpyren.

Andere u. U. auch zytostatisch wirksame Molekülkonfigurationen töten in kritischer Dosierung die Frucht, wie z. B. N-Oxydlost, Äthylennitramin oder Tetramethylharnstoff.

Es sind auch Substanzen bekannt, die die Morphogenese nicht beeinträchtigen, lediglich die überlebenden Feten toxisch schädigen, d. h. die Entwicklung verzögern, das Wachstum hemmen, Ödeme oder Hämorrhagien usw. erzeugen, z. B. unerschwellige Dosen der oben genannten Substanzen, chlorierte Kohlenwasserstoff-Inhalationsnarkotika, subletale Dosen physiologisch aktiver, aber nicht teratogen wirksamer Substanzen usw. (Kreybig 1968, 1975).

Die teratogene Wirkung ist also spezifisch: Mißbildungen entstehen nur, wenn eine entsprechende Molekülstruktur in bestimmten Prozessen des Stoffwechsels der embryonalen Zellen reagiert (Kreybig 1975).

Studien über die Beziehung zwischen chemischer Konstitution und teratogener Wirkung im Tierexperiment zeigten auf, daß geringfügige Veränderungen eines Moleküls Veränderungen der Art der Teratogenität der Organotropie oder auch Verlust der teratogenen Wirkung bedingen können.

Bei dem Vergleich der teratogenetischen Reaktionsbereitschaft bei verschiedenen Spezies, z. B. Maus und Ratte, sind grundsätzlich Unterschiede erkennbar:

Bei Mäusen liegt die Spontanmißbildungsrate je nach Versuchstierstamm zwischen 1 und 15 %, bei Ratten dagegen unterhalb oder in der Promillegrößenordnung (Pfeifer und Kreybig 1973, Schlote und Kreybig 1975). Diese Normalverhältnisse müssen genauso im teratologischen Tierexperiment berücksichtigt werden wie die Unterschiede der Dauer der vorgeburtlichen Entwicklung (Maus 19, Ratte 23 Tage) und der unterschiedliche Metabolismus der beiden Spezies.

### **Teratogenetische Untersuchungen mit Coffein bzw. mit Kaffee bei Ratte und Maus**

Die  $DL_{50}$  von Coffein liegt bei Maus und Ratte etwa in der gleichen Größenordnung (Tab. 1, 2). Teratogenetische Untersuchungen von verschiedenen Autoren und auch unsere eigenen Studien wurden auf extrem hohen, selbst mit einem Kaffeeabusus nicht vergleichbaren Dosen begründet.

Knoche und König (1964) haben täglich 15,6 % der  $DL_{50}$  von Coffein graviden Rattenweibchen verabreicht. Eine signifikante Erhöhung der Resorptions- oder der Mißbildungsrate war nicht feststellbar.

Erheblich höhere Dosen (32–63 % der  $DL_{50}$ /Tag) wurden von Bertrand und Mitarb. (1965) graviden Rattenweibchen per os zugeführt:

In diesen Untersuchungen zeigten sich markante Effekte. Allerdings wurde außer der Verabreichung von Coffein durch Schlundsonde bei den

Tab. 1. Die zur Untersuchung der Teratogenität verwendeten Coffeindosen in % der  $DL_{50}$  bei der Ratte ( $DL_{50} = 240 \text{ mg/kg i.p., } 264 \text{ mg/kg per os}$ )

Autor	Dosis (% $DL_{50}$ )	Zusätzliche Manipulation	Effekt
Bertrand et al. (1965)	32–63 %/Tag i.p.	9.–10. Tag der Gestation Probe- laparotomie	15–62% Resorptionen 3,5–19,8% Mißbildungen
Fuji and Nishimura (1972)	68–125 %/Tag per os	–	17,4–38,3% Resorptionen 0–100% toxische Schäden (Ödeme, Hämorrhagien)
Leuschner und Czok (1971)	75 %/Tag per os 6.–16. Tag	–	80% Resorptionen 2,5% Runts 1,9% Mißbildungen
Czok und von Kreybig (1975)	1 × 45–68 % i.p. 13. Tag	–	19,2–33,2% Wachstums- verzögerung 0% Mißbildungen Resorptionsrate nicht erhöht

Versuchstieren am 9. oder am 10. Tag der Gestation eine Probelaaparotomie zur Feststellung der Zahl der Implantationen vorgenommen. So kann nachträglich nicht geklärt werden, ob die hohe Resorptionsrate und die Anhäufung der unilateralen Ektodaktylien der hinteren Extremitäten und der subkutanen Hämorrhagien der Feten auf die Wirkung der hohen Coffeindosen oder vielmehr auf eine Wechselwirkung der Coffeinbehandlung und der anderen Manipulationen zurückgeführt werden können. Fuji und Nischimura (1972) mischten Coffein in die Nahrung von graviden Rattenweibchen. Es wurden extrem hohe, sogar die  $DL_{50}$  übersteigenden Dosen verabreicht (Tab. 1). Die registrierten Effekte, Ödeme und Deformitäten, sind jedoch keine per definitionem phasenspezifischen Mißbildungen, d. h. Produkte einer teratogenen Wirkung, sondern toxische Entwicklungsstörungen, bedingt durch die Wirkung der hohen Coffeindosen auf den Kreislauf der Muttertiere.

Leuschner und Czok (1971) bestätigten eine entsprechende unspezifisch toxische Wirkung hoher Coffeindosen bei Ratten.

Tab. 2. Die zur Untersuchung der Teratogenität verwendeten Coffeindosen in % der  $DL_{50}$  bei der Maus ( $DL_{50} = 304 \text{ mg/kg i.p., } 410 \text{ mg/kg per os}$ )

Autor	Dosis (% $DL_{50}$ )	Zusätzliche Manipulation	Effekt
Bertrand et al. (1969)	18,2 %/Tag per os 5.–18. Tag	–	12–24% Resorptionen 0–7% Mißbildungen
Fuji et al. (1969)	32,8–65,6 % ip., s.c.	–	8,1–14,7% Resorptionen 6,1–20,6% Mißbildungen

Tab. 3. Teratogenetische Untersuchungen mit Coffein bei CD-Ratten. Behandlung mit Coffein Na-Benzolat i.p. am 13. Tag der Gestation.

Dosis	Reines Coffein mg/kg	Zahl der Muttertiere	Implantationen	Normale Feten	Resorptionen	EVZ WVZ	Mißbildungen
300	162	6	75	49 (65,3%)	1 (1,3%)	25 (33,4%)	0%
200	108	6	73	53 (72,6%)	6 (8,2%)	14 (19,2%)	0%
Kontrolle	—	10	117	109 (93,1%)	6 (5,2%)	2 (1,7%)	0%

Zur Untersuchung, ob ein Unterschied zwischen der Wirkung von Coffein-natriumbenzoat oder Kaffee auf die vorgeburtliche Entwicklung besteht, haben wir zwei weitere Versuchsserien mit Ratten durchgeführt. In der ersten Versuchsreihe wurden am 13. Tag der Gestation 45–68 % der DL<sub>50</sub> Coffein-natriumbenzoat einmalig i.p. verabreicht.

An diesem Gestationstag – Mitte der embryonalen Entwicklungsphase – sind gegenüber chemischen Teratogenen folgende Blasteme bzw. Primitivanlagen kritisch empfindlich: die Gehirnbälchen und das Neuralohr, die Blasteme der Gesichtsregion, vor allem die Mandibulabögen. Die Knospen der vorderen Extremitäten sind in ihrem Determinationsstadium empfindlicher als die der hinteren, die zu dieser Zeit ihre Wachstumsphase durchlaufen. Ferner kann durch teratogene Wirkungen die Ausbildung des Körperskelettes geschädigt werden. Entsprechende Mißbildungsformen erzeugen eine Vielzahl definitiv teratogen wirksamer Substanzen aus verschiedenen chemischen Gruppen, allerdings mit jeweils unterschiedlicher Organotropie, d. h., sie treffen eine Auswahl zwischen den kritisch empfindlichen Blastemen oder beeinträchtigen die Entwicklung auf unterschiedliche Art.

Die einmalig hohe Coffeindosis schädigte bei keinem einzigen Fetus der 10 behandelten Muttertiere die kritisch empfindlichen Blasteme. Vielmehr wurden in dosisabhängigem Anteil in ihrem Wachstum gehemmte, jedoch morphologisch normale Feten angetroffen. Die Resorptionsrate entsprach den Kontrollverhältnissen (Tab. 3).

In einer zweiten Versuchsreihe wurden gravide Rattenweibchen vom 8. bis zum 14. Gestationstag mit 5 %igem gesüßtem gefriergetrocknetem

Tab. 4. Teratogenetische Untersuchungen mit Coffein bei CD-Ratten. Gravide Weibchen wurden vom 8.–14. Tag der Gestation ausschließlich mit gesüßtem 5 % löslichem Kaffee-Extrakt getränkt (50–100 mg/kg/Tag).

Dosis	Zahl der Muttertiere	Wurfzahl	Aufzuchtzahl	Gewicht am 30. Tag p.p.
26 ml/Tag löslicher Kaffee-Extrakt (8 Tage)	5	53	50	64,8 g
Kontrolle Aqua ad libitum 40–60 ml/Tag	5	61	59	65,2 g

Kaffee ab libitum getränkt. Außer dieser Lösung wurde den Tieren keine andere Flüssigkeit gegeben. Die täglich getrunkene Flüssigkeitsmenge mit durchschnittlich 20 ml/Tag/Tier entsprach der knappen Hälfte der von Kontrolltieren täglich getrunkenen Wassermenge. Die Verringerung der Flüssigkeitsaufnahme bzw. das Ersetzen des Trinkwassers durch diese hochkonzentrierte Kaffeelösung beeinträchtigte weder die Morphogenese noch die postnatale Entwicklung der Jungtiere in diesem Versuch (Tab. 4).

Bei Mäusen wurden teratogenetische Untersuchungen mit niedrigeren Coffeindosen durchgeführt, die jedoch ebenfalls keine eindeutige teratogene Wirkung aufgezeigt haben. Die auch bei Kontrollen vorgefundenen Spontanmißbildungen traten z. T. in gering erhöhtem Anteil bei den mit Coffein behandelten Versuchstieren (Tab. 2) auf. Eine besondere Bedeutung muß hier den Versuchen von *Thayer* und *Kensler* (1973) beigemessen werden, die vier Generationen von Mäusen Coffein im Trinkwasser verabreicht haben und weder teratogene noch mutagene Schäden registrieren konnten.

In teratogenetischen Tierexperimenten kann also eine definierte teratogene Wirkung von Coffein nicht nachgewiesen werden.

### Die mutagene Wirkung

Als mutagene Wirkung wird aus dem Gesichtspunkt der Toxikologie die Aktion definiert, die in Zellen des Organismus das genetische Programm irreversibel verändert. Hierbei handelt es sich um eine eindeutig nukleotrope, d. h. auf den Zellkernstoffwechsel gerichtete Wirkung. „Die Mutation ist eine definierte irreversible Veränderung einer Erbanlage bzw. deren Programm. Diese gewinnt jedoch nur an Bedeutung, wenn sie in einer Keimzelle oder Keimzellenmutterzelle (Spermatogonium oder Oogonium) stattfindet und somit an der Reproduktion beteiligt werden kann“ (*Kreybig* 1973).

Die mutagene Wirkung ist nicht spezifisch. Vergleichbare Gesetzmäßigkeiten, wie die Phasenspezifität oder die Organotropie in der Teratogenese, sind in diesen primär auf molekularer Ebene verlaufenden Prozessen nicht erkennbar. Aus diesem Grunde ist auch die methodische Erfassung der mutagenen Wirkung beträchtlich schwieriger als die der teratogenen Wirkung.

Das Studium der einschlägigen Literatur zeigt folgende Tendenzen: In In-vitro-Systemen, wie z. B. Wurzelspitzen, Meristemen, Gewebskulturen usw. soll die Zufuhr von Coffein direkt oder synergistisch den Zellkernstoffwechsel beeinträchtigen (*Roberts* und *Sturrock* 1973, *Ahnström* 1974, *Bishun* et al. 1974, *Khilman* 1974, *Lehmann* und *Kirk-Bell* 1974, *Loprieno* et al. 1974, *Mendelson* und *Sobels* 1974, *Roberts* et al. 1974, *Swietlinska* und *Zuk* 1974).

In Ganztierversuchen konnte durch Coffein keine mutagene Wirkung nachgewiesen werden (*Lyon* et al. 1962, *Russel* et al. 1968, *Legartor* 1970, *Röhrborn* 1972, *Thayer* 1973). Die Gültigkeit dieser letzteren umfassenden Untersuchungen für den Menschen, d. h. das Fehlen einer mutagenen Wirkung durch Coffein, ist mit größter Wahrscheinlichkeit anzunehmen.

## Diskussion

Der Verdacht, daß Coffein teratogen wirken könnte, gründete sich weitgehend auf seine nahe chemische Verwandtschaft zu den Purin-Basen der DNS. Es zeigte sich jedoch in zahlreichen Versuchen, daß Coffein im Ganztierexperiment nicht teratogen wirkt und auch eine mutagene Wirkung ausgeschlossen werden kann. Klinische Studien bestätigten, daß Coffein nur zusammen mit Zigaretten und Alkoholkonsum für die Schwangerschaft einen möglichen Risikofaktor bedeuten kann (Mau und Netter 1974). Die eindeutig schädliche Wirkung des Rauchens und des Alkoholabusus sind heute allgemein bekannt.

Die belebende, durchblutungsfördernde Wirkung einer Tasse Kaffee für die Schwangere bietet eine Möglichkeit zur Verbesserung des Allgemeinbefindens. Diese Tasse Kaffee ersetzt in den meisten Fällen die Kleinanalgetica, die außer Coffein auch Pharmaka, Acetyl-salicylsäure, Phenacetin usw. enthalten. Allerdings ist auch beim Kaffeegenuß für die Schwangere Maßhalten geboten (Kreybig 1975).

## Zusammenfassung

Die Gesetzmäßigkeiten der teratogenen und mutagenen Wirkung werden definiert.

Die bisher vorliegenden tierexperimentellen Untersuchungen und eigenen Studien mit Coffein-natriumbenzoat und gefriergetrocknetem, löslichem Kaffee bei graviden Rattenweibchen werden den Effekten teratogen wirksamer Zytostatika gegenübergestellt.

Eine teratogene Wirkung von Coffein kann ausgeschlossen werden. Auch für eine mögliche Mutagenität fehlen exakte Beweise.

## Summary

Principles of teratogenic and mutagenic actions are defined. The recent experimental studies with laboratory animals, and our investigations with caffeine-sodium benzoicum and with soluble coffee in pregnant rats and mice showed no teratogenicity. The results are compared with specific teratogenic effects of cytostatic agents.

A teratogenicity of caffeine can be excluded, a mutagenicity in animal experiments can also not be proved.

## Literatur

- Ahnström, G., Mutation Res. 26, 99-103 (1974). - Bertrand, M., E. Schwam, A. Frandon, A. Vagne, J. Alary, Compt. Rend. Soc. Biol. 159, 2199-2202 (1965). - Bishun, N., D. Williams, J. Mills, Mutation Res. 26, 151-155 (1974). - Fuji, T., H. Nishimura, Toxicol. Appl. Pharmacol. 22, 449-457 (1972). - Groupe d'Etude des Risques tératogènes. Thérapie 24, 575-580 (1969). - Khilman, B. A., Mutation Res. 26, 53-71 (1974). - Knoche, Ch., J. König, Arzneim.-Forsch. 14, 415-419 (1964). - Kreybig, Th. von, Experimentelle Praenatal-Toxikologie. Ed. Cantor KG, Aulendorf/Württ. (1968). - Kreybig, Th. von, Verh. Dtsch. Ges. inn. Med. 79, 63-69 (1973). - Kreybig, Th. von, Entstehung von Mißbildungen aus inneren und äußeren Ursachen (München 1975). - Kreybig, Th. von, W. Schmidt, Arzneim.-Forsch. 16, 989-1001 (1966). - Legator, M. S., In: Vogel, F., G. Röhrborn (Eds.), Chemical Mutagenesis in Mammals and Man (Berlin/Heidelberg/New York 1970). - Lehmann, A. R., S. Kirk-Bell, Mutation Res. 26, 73-82 (1974). -

Leuschner, F., G. Czok, ASIC 5<sup>o</sup> Colloque Lisbonne, 388-391 (1971). – Loprieno, N., R. Barale, S. Baroncelli, Mutation Res. 26, 23-87 (1974). – Lyon, M. F., J. S. R. Philip, A. G. Searle, Z. Vererbungsl. 93, 7 (1962). – Mau, G., P. Netter, Geburtsheilk. u. Frauenheilk. 34, 1018-1022 (1974). – Mendelson, D., F. H. Sobels, Mutation Res. 26, 123-128 (1974). – Pfeifer, G., Th. von Kreybig, Experientia (Basel) 29, 225-228 (1973). – Roberts, J. J., J. E. Sturrock, K. N. Ward, Mutation Res. 26, 129-143 (1974). – Röhrborn, G., Supplementum 14 d. Z. f. Ernährungswiss., 54-67 (1972). – Russel, W. L., R. B. Cumming, E. M. Kelly, Biol. Div. Ann. Progr. Rept. Dec. 31, 100 (1968). – Schlote, H. H., Th. von Kreybig, Votr. Dtsch. Ges. für Mund-, Kiefer- und Gesichtschir. 25. Jahrestagung Hamburg, 12.-16. Mai 1975. – Swietlinska, Z., J. Zuk, Mutation Res. 26, 89-97 (1974). – Thayer, P. S., C. J. Kensler, Toxicol. Appl. Pharmacol. 25, 157-168 (1973). – Thayer, P. S., C. J. Kensler, Toxicol. Appl. Pharmacol. 25, 169-174 (1973).

Anschrift der Verfasser:

Priv.-Doz. Dr. Thomas von Kreybig, Forschungsgruppe Experimentelle Biologie, Teratologie und Onkologie an der Nordwestdeutschen Kieferklinik der Universität Hamburg, Martinistraße 52, 2000 Hamburg 20; Prof. Dr. Georg Czok, Pharmakologisches Institut der Universität Hamburg, Martinistr. 52, 2000 Hamburg 20