

Toxikologische Bewertung von Ferrocen

im medizinischen Bereich und als Additiv in Treib- und Schmierstoffen

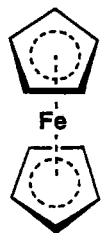
D. Henschler

Prof. Dr. D. Henschler, Institut für Toxikologie der Universität Würzburg, Versbacher Straße 9, D-W-8700 Würzburg

Zusammenfassung. Ferrocen ist eine eisenorganische Verbindung von Sandwich-Charakter mit Redoxeigenschaften. Es eignet sich als Katalysator, z.B. als Additiv in Treib- und Schmierstoffen; auch als Medikament hat es zur Lieferung von Eisen bei Anämieerkrankungen gedient. Der Stoff wird über Magen-Darm und Lunge rasch resorbiert und spaltet im Organismus Eisen ab. Auf dem freigesetzten Eisen beruhen die beobachteten akut-toxischen Wirkungen: Gewebsreizung bis zur Zellnekrose; gespeichert wird Eisen, nicht aber Ferrocen selbst. Ferrocen wird im Stoffwechsel hydroxyliert und nach Kopplung mit Glukuronsäure rasch über die Nieren ausgeschieden. Die akute und subakute Toxizität ist gering. Bei Inhalation im Tierversuch wird das Riechepithel konzentrationsabhängig geschädigt. Im Langzeitversuch (6 Monate) werden an Hunden ab 100 mg/kg/Tag oral Vergiftungszeichen in Form von verstärkter Blutbildung, Leberschädigung und Hämosiderinablagerungen in allen parenchymatösen Organen gefunden. Mutagenitätsuntersuchungen in einer Reihe von mikrobiellen und Warmblüterzellsystemen brachten negative Ergebnisse; lediglich ein Versuch an *Drosophila* brachte ein zweifelhaftes Ergebnis. Im Kanzerogenitätstest nach intramuskulärer Applikation wurden lokale Tumoren beobachtet, wie sie von einer Reihe anderer, eisenliefernder Verbindungen bekannt sind.

1 Chemische Konstitution und technische Verwendung

Ferrocen, Dicyclopentadienyleisen mit der Summenformel $C_{10}H_{10}Fe$, ist eine organische Eisenkomplexverbindung. Die Koordinativbindung erfolgt über π -Elektronen, so daß eine „Sandwich-Struktur“ zustandekommt:



In Ferrocen kann das Eisen seine Wertigkeit ändern, je nachdem, ob die Verbindung oxidativen oder reduktiven Bedingungen ausgesetzt ist; Ferrocen stellt daher ein Redox-System dar. Darauf beruht auch ein Großteil seiner technischen Verwendung, die weit gespannt ist (eine systematische Beschreibung ist nicht Ziel dieser Übersicht).

Von besonderer Bedeutung für die toxikologische Bewertung ist die Tatsache, daß Ferrocen in biologischen Systeme-

men, vor allem im Warmblüterorganismus, Eisen freisetzen kann. Ferrocen ist daher auf seine Verwendung als Arzneimittel zur Bereitstellung biologisch verträglicher Eisenzustandsformen untersucht worden. Bei Eisenmangelzuständen, wie bestimmten Anämieformen, kann Ferrocen die Eisenbestände des Organismus auffüllen und so therapeutische Eigenschaften entfalten.

Ferrocen ist unter normalen Umgebungsbedingungen eine feste Substanz, gelborange Nadeln vom Schmelzpunkt 172 °C und Siedepunkt 249 °C. Oberhalb von 100 °C sublimiert die Substanz. Es kann also bei bestimmten technischen Prozessen, möglicherweise auch bei Erhitzung aus anderer Ursache, freigesetzt werden und in die Umgebungsluft übertreten. Damit besteht die Möglichkeit, daß Ferrocen in Form des Dampfes, womöglich auch als Aerosol, mit der Atemluft vom Menschen aufgenommen wird. Im toxikologischen Schrifttum finden sich kaum verwendbare Hinweise, in welcher Form Ferrocen tatsächlich auf den Menschen einwirkt. Eine der wichtigsten toxikologischen Experimentalarbeiten [1] untersucht Ferrocen in Dampf-Form im Inhalationsexperiment an Ratten. Die Arbeit bezeichnet Ferrocen als flüchtige lipophile Eisenverbindung, die repräsentativ für zahlreiche flüchtige Organometallverbindungen sei. Die Freisetzung von Ferrocen aus der kristallinen Form für die Inhalationsexperimente geschah durch einfache Erhitzung auf 93 °C in einer Heizpatrone mit darübergeliteter Luft von 100 ml/min und späterer Weiterverdünnung. Auf diese Weise wurde eine Konzentration von 88 mg/m³ erzeugt.

Man kann daraus schließen, daß möglicherweise eine maßgebliche Exposition des Menschen in wesentlichem Ausmaß über die Atemwege erfolgen kann. Ihr soll daher bei der Beschreibung und Bewertung des Toxizitätsprofils besondere Beachtung geschenkt werden.

Über Produktion und Expositionsmessungen in der Bundesrepublik sind keine veröffentlichten Daten verfügbar. Man kann jedoch davon ausgehen, daß die industrielle Produktion von Ferrocen in Deutschland etwa 100 t pro Jahr beträgt. Diese Menge wird vorwiegend als Verbrennungverbesserer z.B. für leichtes Heizöl eingesetzt. Für die USA liegen einige Angaben vor, wonach die Verbindung zunehmend als chemisches Zwischenprodukt, Katalysator, Antiklopfmittel, Ultraviolettstabilisator, Zusatz in Polymeren für die Unterdrückung von Rauchentwicklung, Polymerisationskatalysator, Additiv zu Schmiermitteln und Raketentreibstoffen verwendet wird [2].

2 Aufnahme, Verteilung, Metabolismus und Elimination

Ferrocen stellt zufolge seiner organischen Reste ohne Heteroatome eine stark **lipophile Verbindung** dar. Es sollte also über die Schleimhäute von Atemtrakt und Gastrointestinaltrakt rasch resorbiert werden. Dies ist in einer Reihe einschlägiger Untersuchungen auch ausgewiesen worden. Kontrollierte Inhalationsstudien an Ratten mit einer doppeltmarkierten Verbindung (^{59}Fe , ^3H im Cyclopentadienylrest) ergaben bei Exposition nur der Nase der Tiere von 88 (73–97) μl für 17 Minuten eine Gesamtaufnahme von $36,6 \pm 2,2\%$ aus der Gasphase [1]. Die systematische Aufarbeitung der Gewebe über bis zu 120 Tage nach dieser Exposition ergab eine hohe Anreicherung von ^{59}Fe in der Schleimhaut von Nase und Rachen, etwa halb so hoch an den Schleimhäuten des tieferen Atemtraktes. Während mehr als drei Viertel der aufgenommenen Ferrocen-Menge als eisenfreie Bruchstücke schon am ersten Tag mit dem Harn, weniger mit dem Kot eliminiert werden, bleiben ca. 70 % des aufgenommenen Eisens in den Schleimhäuten des Atemtraktes haften; der Rest geht überwiegend in einer sehr langsamen Kinetik in das Blut über, bedingt durch Einschleusung in den Eisenpool des roten Blutfarbstoffes. Die Halbwertszeiten für das lokal gebundene Eisen betragen im bronchopulmonalen System 200 Tage, an der Nasen- und Rachenschleimhaut 70 Tage.

Die rasche Abspaltung von Eisen aus Ferrocen im Organismus wird durch eine Reihe weiterer Befunde bestätigt. Bringt man Ferrocen mit menschlichen Gammaglobulinen, also Eiweißbestandteilen des Blutes, in Kontakt, so findet sich das Eisen zwar reversibel und komplex daran gebunden, aber nicht in Form angelagerten Eisen-Dicyclopentadiens [3]. Mehrere frühere Untersuchungen hatten schon gezeigt, daß das Eisen aus Ferrocen für die Blutbildung verfügbar ist [4–6].

Neben der reinen, offenbar enzymunabhängigen, Aufspaltung im Organismus finden aber auch Metabolisierungsvorgänge an intaktem Ferrocen statt. Erstmals ist in einer Dissertation von W. H. SOINE [7] die oxidative Umsetzung von Ferrocen durch mischfunktionelle Oxygenasen in der Leber von intakten Versuchstieren (Ratten) sowie in *in vitro*-Ansätzen mit Lebermikrosomen gezeigt worden. In einer späteren Mitteilung finden sich genaue Daten [9]. Danach bewirkt das P450-abhängige System der mischfunktionellen Oxygenasen der Leber in Gegenwart von Sauerstoff und NADPH die Hydroxylierung von Ferrocen in 2-Stellung an einem der beiden Dicyclopentadienreste; sie verläuft wahrscheinlich über die intermediäre Bildung eines Epoxids an der olefinischen Bindung. Dieses hydroxylierte Derivat wird rasch an Glukuronsäure, in geringerem Anteil auch an Schwefelsäure, gekoppelt; beides sind hydrophile Verbindungen, die rasch mit dem Urin ausgeschieden werden.

Da als Hauptangriffsort von Ferrocen bei Inhalation hoher Konzentrationen im Tierversuch die Schleimhaut der Nase identifiziert worden ist, hat man in diesem Gewebe die Bilanz der Metabolisierung detailliert untersucht. Nach einem neueren Bericht [2] sind in *in vitro*-Versuchen mit

^{59}Fe - und ^3H -markiertem Ferrocen vergleichende Untersuchungen mit Mikrosomen aus Schleimhautzellen der Nase und aus Leberzellen durchgeführt worden. Danach findet die Hydroxylierungsreaktion in den Ethmoturbinalien etwa 8mal, in den Maxilloturbinalien etwa 4mal rascher statt als in der Leber. Die Autoren schließen aus diesen Ergebnissen, daß das in der Nasenschleimhaut von Ratten freigesetzte Eisen dort die Lipidperoxidation – eine zur Membranzerstörung führende toxische Veränderung – in besonders starkem Maße bewirkt und daß die **Nasenschleimhaut** das empfindlichere Organ gegenüber der Schleimhaut der tieferen Atemwege und jedem anderen Körperorgan sei. Ferner wird mitgeteilt, daß nur die Nasenschleimhaut der Ratte, nicht die anderer Tierspezies diese hohe Empfindlichkeit aufweist.

Aus diesen Daten kann gefolgert werden: Toxikokinetik und Metabolismus von Ferrocen sind ausführlich untersucht worden, um das Schicksal der Verbindung sowohl an den auftretenden Schleimhäuten der Atemwege als auch nach Aufnahme in den Organismus zu beurteilen. Überwiegend wird Eisen freigesetzt, das in dieser Form **lokal toxische Effekte** auslösen kann. Ein geringerer Teil des Moleküls wird oxidativ umgesetzt und in weiteren Koppelungsreaktionen harnfähig gemacht, so daß es rasch über die Niere ausgeschieden werden kann. Offenbar akkumuliert im Organismus nur **freigesetztes Eisen**, nicht aber unverändertes Ferrocen.

3 Toxizität, Mutagenität, Kanzerogenität

3.1 Akute Toxizität

Akute LD50-Bestimmungen sind in mehreren Laboratorien an mehreren Tierarten durchgeführt worden:

An der Maus wurde nach **intrapertonealer Verabfolgung** ein Wert von 235 mg/kg bestimmt; an der Ratte betrug die LD50 unter gleichen Bedingungen 500 mg/kg [9].

Nach **intravenöser Zufuhr** ergab sich an der Maus ein LD50-Wert von 178 mg/kg [10].

Orale LD50-Bestimmungen wurden an Mäusen und Ratten durchgeführt. Für die Maus ergab sich eine Ziffer von 832 mg/kg [5]. Für die Ratte beträgt die orale LD50 1320 mg/kg (11).

Bei all diesen LD50-Bestimmungen wurden keine auffälligen toxischen Effekte an den Versuchstieren festgestellt. Die genaue Todesursache ist nicht ermittelt worden.

Zur Vorbereitung und Dosisfindung eines Langzeit-Inhalationsversuches mit Ferrocen an Mäusen und Ratten im National Toxicology Program wurden Inhalationsversuche an Nagetieren durchgeführt. Je 5 weibliche und männliche Ratten und Mäuse wurden einmalig 6 Stunden lang einer Konzentration von $48,5 \text{ mg/m}^3$ Ferrocon als Dampf ausgesetzt (Sättigungsgrenze). Makroskopische Schäden wurden nicht beobachtet. Histologisch blieben der linke Lungenunterlappen und die Trachea ohne Befund. In den Nasennebenhöhlen zeigte die Schleimhaut fleckförmig akute Nekrosen und Degeneration des **Riechepithels**, verbunden mit mäßiger Exudation in die Nasenhöhle; diese Veränderung bestand bei allen Tieren und wurde als mäßig

bis schwer charakterisiert, die Schleimhaut der übrigen Nasenteile blieb ohne Befund [12].

3.2 Subakute Toxizität

Daraufhin führte man Zweiwochen-Inhalationsversuche an Mäusen und Ratten durch, und zwar 6 Stunden täglich an 5 Wochentagen in Konzentrationen von 2,5; 5,0; 10; 20 und 40 mg/m³. Wiederum fanden sich Läsionen lediglich am Epithel der **Riechschleimhaut**, die als subakute, nekrotisierende Entzündung bezeichnet wurden. Bezüglich der Schwere ergab sich eine Abhängigkeit von der Expositionskonzentration. In der höchsten Konzentration war die Körpergewichtszunahme leicht reduziert, bei den Organgewichten gab es geringe Abweichungen in Leber, Milz, Thymus und Gehirn [2].

Gruppen von je zehn männlichen und zehn weiblichen Mäusen wurden drei Monate täglich 6 Stunden (wochentags) den Konzentrationen von 0; 3,0; 10 und 30 mg/m³ Ferrocen exponiert. Es traten keine Todesfälle ein, makroskopisch boten sich keine Krankheitszeichen. Die Körpergewichtsentwicklung war nur bei weiblichen Tieren in der höchsten Konzentration leicht beeinträchtigt. Die Organgewichte von Herz, Leber und Milz waren bei weiblichen Tieren leicht erniedrigt, das Lebergewicht war bei männlichen Tieren leicht erhöht. Histologisch fand sich Pigmentablagerung in Nase, Larynx, Trachea, Lunge, Leber und Nieren, am stärksten in der Nase. Spezialfärbungen ergaben, daß es sich bei dem Pigment um ein Gemenge von Ferri- und Ferro-Verbindungen handelt. Am stärksten betroffen war das **Riechepithel der Nase**, wo die Pigmentierung mit Degenerationszeichen, Entzündungserscheinungen verschiedenen Grades, Hyperplasie und Übergang zur Regeneration gekennzeichnet war. Die Affektion am Riechepithel wurde als möglicherweise *lebensbedrohend* charakterisiert, sofern durch eine bakterielle Infektion überlagert. In der Leber zeigte sich eine minimale bis milde Pigmenteinlagerung, verbunden mit minimalen Entzündungszeichen; betroffen waren sowohl die Hepatozyten als auch Makrophagen. In den Nieren fanden sich milde Pigmentierungen in den Tubulusepithelien. Die geschilderten Veränderungen wurden durchgängig, jedoch im allgemeinen dosisabhängig, gefunden.

Ein gleichartiger Inhalationsversuch wurde an Ratten beiderlei Geschlechts durchgeführt. Dabei zeigten nur männliche Tiere in der niedrigsten und höchsten Konzentrationsgruppe geringe Einbußen der Körpergewichtsentwicklung, weibliche Tiere blieben hier frei. Die Organgewichte zeigten bei männlichen Tieren leichte Abnahme in Thymus und Hoden, während bei weiblichen Tieren das Lebergewicht leicht erhöht war. Grobe Krankheitszeichen wurden in keiner der Expositionsgruppen beobachtet. Die histologische Aufarbeitung zeigte Pigmenteinlagerungen in Nase, Larynx, Trachea, Lunge und Leber. Wiederum war die Nase am stärksten betroffen, dort wiederum das **Riechepithel**, wobei die feingeweblichen Veränderungen sich von den bei Mäusen beobachteten nicht maßgeblich unterschieden [12].

Weiterhin ist ein 4-Wochen-Fütterungsversuch an Ratten

durchgeführt worden [13a]. Je 5 männliche und 5 weibliche Sprague-Dawley-Ratten erhielten 0 (Kontrolle); 5; 25 oder 125 mg · kg⁻¹ · Tag⁻¹. Es zeigten sich in der hohen Dosisgruppe bei beiden Geschlechtern leichte, aber deutliche, in der mittleren Dosisgruppe nur bei einzelnen Tieren leichte pathologische Veränderungen; die niedrigste Dosisgruppe blieb ohne Befund. Die Hauptwirkung bestand im Anstieg der Erythrozytenzahlen, verbunden mit einer Zunahme des Erythrozytenvolumens und einer Verminderung der Hämoglobinkonzentration in den Erythrozyten. Daneben waren die Retikulozytenzahlen dosisabhängig bei der mittleren und hohen Dosierungsgruppe in beiden Geschlechtern erhöht. In der Leber fand sich, bei leichter Gewichtszunahme des Organs in beiden Geschlechtern, eine zentrilobuläre Hypertrophie der Parenchymzellen, verbunden mit einer Ablagerung von Hämosiderin. In der Niere fand sich Hyalinetropfenbildung in den Tubulusepithelien in der Hochdosisgruppe, jedoch nur bei männlichen Tieren. In einer unabhängig durchgeführten Kontrolluntersuchung der histologischen Schnitte kommt ein Pathologe zu der Aussage [13b], daß im Knochenmark der Tiere keine Veränderungen feststellbar sind, ebensowenig an der Wand des Dünn- und Dickdarms. Damit wird eine Resorptionsstörung für Eisen ausgeschlossen.

Diese Befunde bestätigen, daß als empfindliches Kriterium der Toxizität von Ferrocen die des im Organismus **freigesetzten Eisens** zu werten ist. An Ratten wird dies ab 25 mg/kg/Tag beobachtet, und zwar nur in Form von Veränderungen der Erythrozyten, nicht der blutbildenden Stammzellen im Knochenmark. Die Leber reagiert erst ab 125 mg/kg/Tag, bei den Nierenveränderungen handelt es sich um eine geschlechtsspezifische, nur Ratten eigene Speicherstörung eines Proteins, wie sie z.B. auch nach Trimethylpentan beobachtet wird.

Aus diesen Versuchsdaten läßt sich schließen: Ferrocen besitzt an mehreren Versuchstierarten übereinstimmend bei unterschiedlicher Zufuhrart eine sehr geringe akute und subakute Toxizität. Eisenpigmentablagerungen werden sowohl an den Schleimhäuten des Atemtraktes als auch in Leber und Niere festgestellt. Nach den Kriterien des Chemikaliengesetzes wäre Ferrocen als mindergiftig einzustufen.

3.3 Subchronische und chronische Toxizität

Hierzu liegt eine ausführliche Verträglichkeitsstudie aus dem Jahre 1969 vor [6]. Dabei erhielten je 3 männliche und weibliche Hunde oral täglich Dosen von 30 mg/kg, 100 mg/kg und 300 mg/kg an 5 Tagen der Woche über 6 Monate; zwei weitere Gruppen 1000 mg/kg über 3 Monate. Die systematische Auswertung in abgestuften Zeitintervallen während und nach dem Versuch ergab folgendes:

Die Dosierungen waren für keines der eingesetzten Tiere tödlich. Für zwei Tiere der hohen Dosisgruppen verzeichnete man Gewichtsabnahmen. In Abhängigkeit von der Dosis sank der Gehalt an rotem Blutfarbstoff, und der Erythrozytenmasse im Blut. Diese Veränderung erwies sich als reversibel. Bei den beiden höchsten Dosierungsgruppen entwickelten sich Zeichen der Leberschädigung von leichten Initialveränderungen bis zu manifester Zirrhose, sicht-

bar an einer Reihe von Enzymveränderungen im Blut sowie im histologischen Bild. In Leber, Milz, Knochenmark, Nebennieren, Lungen, Magendarmtrakt, Lymphknoten im Bauchbereich und Hoden fanden sich Ablagerungen von Hämosiderin. Dabei handelt es sich um einen eisenhaltigen Abkömmling des roten Blutfarbstoffes, der regelhaft nach hochdosierter Zufuhr auch zahlreicher anderer, eisenliefernder Verbindungen gefunden wird. Auch in bestimmten Hirnarealen ließ sich Hämosiderin angereichert nachweisen. In den niedrigen Dosierungsgruppen fand sich zwar ein dosisabhängiger Anstieg des zirkulierenden Eisens im Blut, es wurden aber keine Zeichen von Organschädigung festgestellt.

Weitere Studien zur subchronischen oder chronischen Toxizität liegen nicht vor.

3.4 Mutagene Wirkung

Es liegen eine Reihe von *in vitro*- und *in vivo*-Untersuchungen in verschiedenen Testsystemen mit Ferrocen vor: Der Ferrocen-Carbamat-Komplex, untersucht aus anderem Interesse, aber auch in der Wirkung indikativ für Ferrocen, erwies sich im Ames-Test als nicht mutagen [14].

Eine mehr systematische Untersuchung von Ferrocen selbst wurde im Ames-Test durchgeführt [15]. Eingesetzt wurde der in der EEG-Richtlinie 79/831 vorgeschriebene Standardtest (Platten-Vorinkubationstest). Verwendet wurden die Teststämme *Salmonella Typhimurium* TA 98, TA 100, TA 1535, TA 1537 und TA 1538. Eingesetzt wurden pro Platte 10; 50; 250; 1000 und 5000 μg Ferrocen, jeweils in Dimethylsulfoxid gelöst. Die Versuche wurden einmal mit, einmal ohne Zusatz eines metabolisierenden Enzymsystems (S9-Überstand aus induzierten Rattenlebermikrosomen) durchgeführt. In einem nachgezogenen Test, sonst unter identischen Bedingungen, wurde ohne Vorinkubation gearbeitet. Das Ergebnis war in beiden Testvarianten, in allen eingesetzten Teststämmen und bei allen Dosierungen negativ. Danach ist Ferrocen im *in vitro*-Test an Mikroben **nicht mutagen**.

Es liegt noch ein Bericht vor über einen schwach positiven Ames-Test in einem Labor, während in einem zweiten (Vergleichs-)Labor das Ergebnis negativ ausfiel [16]. Bei einer vergleichenden Untersuchung von 20 Industriechemikalien an der Taufliege (*Drosophila melanogaster*) wurde auch eine technische Charge von Ferrocen (Reinheit > 95 %; Firma Eastman, Bezeichnung P142) getestet. Es handelte sich um die Prüfung auf rezessive Letalmutationen, und auf chromosomale Translokationen. Bei Fütterung an die Tiere blieben beide Tests negativ, bei Injektion einer Lösung von Ferrocen in 10 % Ethanol an männliche Tiere vor der Verpaarung war eine Konzentration von 100 ppm bei der rezessiven Letalmutation fraglich positiv, bei dem Translokationstest eindeutig positiv [17].

In einem zytogenetischen Test an Chinesischen Hamstero-varzellen, durchgeführt in zwei Laboratorien zum Zwecke des Methodenvergleichs, war Ferrocen positiv im Schwesterchromatidaustausch in einem der Laboratorien, jedoch negativ in dem anderen. Die Tests wurden mit und ohne Zugabe eines metabolisierenden Enzymsystems (S9-Mix

von induzierten Rattenlebern) durchgeführt. Der Test auf das Auftreten von Chromosomenaberrationen im gleichen System war in beiden Laboratorien negativ [18].

Ferrocen wurde an Primärzelllinien von Syrischen Hamstere-embryofibroblasten (SHE-Zellsystem nach PIENTA) auf die Fähigkeit zur malignen Zelltransformation und Mikrokernbildung untersucht. In Konzentrationen von 5, 10, 20, 30, 40, 50 $\mu\text{g}/\text{ml}$ blieben beide genetischen Endpunkte negativ [19].

Ein *in vivo*-Mikrokerntest an der Maus ist nach OECD-Prüfrichtlinien durchgeführt worden. Bei der maximal verträglichen Dosis von 1 000 mg/kg wurden negative Ergebnisse erhalten [20]. Ferrocen ist also auch im Säugetier-Mutagenitätstest **ohne Wirkung**.

Aus den vorliegenden Daten zur Mutagenität ist zu schließen: Im üblichen Test an Mikroben (Ames-Test), im Zelltransformationstest und in Mikrokerntests *in vitro* und *in vivo*, beide nach EG-Vorschrift durchgeführt, ergibt sich **kein Anhalt** für eine mutagene, klastogene oder zelltransformierende Wirkung. Nach den Kriterien des Chemikaliengesetzes ist damit **kein Verdacht** auf gentoxisches Potential ableitbar. Dagegen liegen einige positive Befunde an der Taufliege und an Chinesischen Hamstero-varzellkulturen vor, deren Bedeutung zur Zeit nicht gültig beurteilt werden kann.

3.5 Versuche zur Kanzerogenität

Ferrocen ist, zusammen mit einer Reihe anderer organischer Metallverbindungen, in den Vereinigten Staaten daraufhin bewertet worden, ob sich ein Verdacht auf ein kanzerogenes Potential ergibt, der Anlaß zu Untersuchungen im Rahmen des National Toxicology Program (NTP) in Langzeitversuchen auf Kanzerogenität sein könnte [21]. Danach wurde eine positive Empfehlung abgegeben, d.h. Ferrocen wird zur Überprüfung im Lebenszeit-Kanzerogenitätstest an Mäusen und Ratten vorgesehen. Die Empfehlung gründet auf die weite Verbreitung des Stoffes und die nach Zahl der Personen erhebliche Exposition bei Verwendung als Zusatz zu Treibstoffen. Ferrocen wurde daraufhin in das NTP-Programm aufgenommen. Voruntersuchungen zur Ermittlung der im Lebenszeitversuch an Ratten und Mäusen anzusetzenden Dosen sind vom National Toxicology Program in Auftrag gegeben (NTP-Annual-Report 1989); die Ergebnisse dieser Prüfung auf akute und subakute Toxizität (bis zu 13 Wochen Verabfolgungsdauer) sind im Abschnitt „akute und subakute Toxizität“ behandelt.

Zu der positiven Empfehlung könnte auch ein in der Literatur geführter, aber nicht ausführlich publizierter Befund geführt haben: Bei einem Verträglichkeitsversuch mit intramuskulärer Injektion von Ferrocen wurden an der Einstichstelle lokale Tumoren gefunden [22]. Eine ausführliche Darstellung dieses Befundes ist nicht verfügbar. Aus früheren Untersuchungen mit mehreren organischen Eisenverbindungen, vor allem Eisen-Dextran, ist jedoch bekannt, daß bei längerfristiger Verabfolgung auf intramuskulärem Wege das freigesetzte Eisen an den Einstichstellen zu starken und langdauernden Reizzuständen

führt, die zum Teil auch in Tumorbildung münden können. Diesem Effekt ist nach ausführlicher Diskussion in der Wissenschaft keine Bedeutung für ein kanzerogenes Potential von aus organischer Verbindung freigesetztem Eisen beige-messen worden.

Weitere Daten zur Kanzerogenität liegen nicht vor.

Aus diesen Unterlagen können folgende Schlüsse gezogen werden: Systematische Untersuchungen zur krebserzeugenden Wirksamkeit von Ferrocen sind bisher nicht durchgeführt worden. Für ein maßgebliches kanzerogenes Potential ergibt sich aber aus den vorliegenden Gentoxizitätsbefunden und aus bisheriger Kenntnis des Wirkungsmechanismus der Verbindung **kein Anhalt**.

4 Wirkungsmechanismus

Schon frühzeitig war erkannt worden, daß Ferrocen in der Lage ist, im Warmblüterorganismus Eisen freizusetzen, das zur **Anregung der Blutbildung** therapeutisch genutzt werden kann [23]. Die eisenfreisetzende Wirkung lag auch der Idee zugrunde, Ferrocen auf seine Eignung als **zytostatisches Arzneimittel** zu überprüfen. Dies ist in einer beträchtlichen Anzahl wissenschaftlicher Arbeiten über fast zwei Jahrzehnte hin versucht worden. Ferrocen selbst ist im Ehrlich-Aszites-Tumor an Mäusen nicht zytostatisch [24]; nur einige Ferrocenderivate erwiesen sich als schwach tumoristatisch [25]. Eine sehr schwache zytostatische Wirksamkeit wurde *in vitro* gefunden [26], *in vivo* jedoch nicht bestätigt. Dagegen war die Molekülkombination von Ferrocen mit Haloperidol, wenn auch schwach, wirksam [27]. Weiterhin wurde eine Verstärkerwirkung von ionisierenden Strahlen durch Ferrocen bei der Tumorbehandlung gefunden, wenn auch nur schwach ausgeprägt, z.B. in hypoxischen EMT6-Zellen [28, 29].

Weitere Hinweise auf den möglichen Wirkungsmechanismus in biologischen Systemen wurden aus folgenden Untersuchungen erhalten: Nicht Ferrocen selbst, aber polare Derivate (Carboxyl-, Dicarboxyl-Verbindung) hemmen Typ 1-Procollagen-N-Proteinase, ein Effekt, der bei der Rheumatismusbehandlung Bedeutung haben könnte [30]. Bei Untersuchungen an Ratten zur Stimulierung der Leberregeneration, die nach partieller Hepatektomie beobachtet wird, war Ferrocen ohne Einfluß [31]. Bei Vergiftung durch Paraquat ist Ferrocen als Radikalfänger unwirksam [32]. Eine – offenbar sehr geringe – antibakterielle Wirkung von Ferrocen wurde beschrieben [33]. Auf das Pflanzenwachstum hat Ferrocen keinen Einfluß, offenbar wegen seiner Wasserunlöslichkeit; denn wasserlösliche Derivate von Ferrocen hemmen das Pflanzenwachstum [34].

Aus diesen Untersuchungen läßt sich im Hinblick auf den toxischen Wirkungsmechanismus in Warmblüterorganismen folgendes schließen: Ferrocen und das nach Aufnahme in den Organismus in den Zellen freigesetzte Eisen können als Redox-Systeme wirksam werden und sogenanntes **Redox-Cycling** anregen [4]. Die dabei gebildeten reaktiven Sauerstoffspezies sind in der Lage, eine Vielzahl von enzymatischen Abläufen zu beeinflussen oder essentielle biologi-

sche Strukturen anzugreifen. Die generierten reaktiven Sauerstoffspezies können unter bestimmten Umständen auch mit DNA reagieren. Dies wäre eine Möglichkeit, mutagene (eventuell auch kanzerogene) Effekte zu erklären. Vermutungen ähnlicher Art sind auch im Zusammenhang mit der Frage erörtert worden, ob Ferrocen Lungenschäden auslösen kann: inhalede Ferrocenpartikel würden nicht gelöst, sondern könnten – ähnlich wie Quarz – über die Anregung von Abwehrmechanismen granulomatöse Veränderungen hervorrufen; eine Bestätigung für diese Vermutung ist aber nicht erbracht worden [35]. Theoretisch käme auch das metabolisch gebildete Epoxid [7] für gentoxische Effekte in Betracht; wahrscheinlich erfolgt aber die Umlagerung zur Hydroxyverbindung so rasch, daß dies nicht zum Tragen kommt. Insgesamt sind in allen geprüften biologischen Testsystemen die Effekte von Ferrocen nur marginal ausgeprägt, oder gar nicht feststellbar. Zum Teil ist dafür, sofern es sich um *in vitro*-Systeme handelt, die mangelnde Wasserlöslichkeit verantwortlich; eine Tatsache, welche die Extrapolation von *in vitro*- auf *in vivo*-Verhältnisse erschwert.

5 Zusammenfassende Bewertung der Toxikologie von Ferrocen

Ferrocen wird als **lipophile Verbindung** leicht in den Organismus aufgenommen und lebhaft metabolisiert. Das dabei freigesetzte Eisen kann biologisch wirksam werden. Dies ist jedoch nur bei längerfristiger Einwirkung sehr hoher Dosen zu beobachten und manifestiert sich in Organschäden, die bisher an der Leber, an den Nebennieren und (bei Inhalation) an den Schleimhäuten von Nase und Nasennebenhöhlen bei Ratten und Mäusen festgestellt worden sind.

Die **akute und subakute Toxizität** von Ferrocen ist bei verschiedenen Zufuhrarten, geprüft an verschiedenen Tierarten, gering. Nach dem Chemikaliengesetz wäre Ferrocen daher als **mindergiftig** einzustufen.

Die **chronische Toxizität** ist bisher nicht systematisch überprüft worden. Aus einem sehr sorgfältigen subchronischen Versuch über 6 Monate an Hunden mit oraler Zufuhr ergab sich jedoch eine mäßig stark ausgeprägte hepatotoxische Wirkung, die sich erst nach Tagesdosen von 300 mg/kg und mehr manifestierte. Für das Auftreten chronischer Toxizität stärkeren Ausmaßes bei Versuchsführung über die Lebenszeit der Versuchstiere ergibt sich kein Anhalt. Jedoch fehlt für eine verlässlichere toxikologische Beurteilung ein längerfristiger Inhalationsversuch. Er ist in jedem Falle angezeigt, wenn es sich um die Bewertung einer Exposition gegenüber der flüchtigen Verbindung über die Atemwege handelt.

Das **mutagene Wirkungspotential** von Ferrocen kann zur Zeit (noch) nicht abschließend beurteilt werden. Nach den im Chemikaliengesetz vorgesehenen Standardtests (Ames-Test, Mikronukleustest *in vivo*) ergibt sich kein Anhalt für ein mutagenes Potential. Jedoch liegen Berichte über mutagene Wirksamkeit an *Drosophila melanogaster* und Syrischen Hamsterovarzellkulturen vor. Die bisherigen Kenntnisse über den Wirkungsmechanismus der Verbindung (→ **Abschnitt 4**) geben gewisse Hinweise dafür, daß

Ferrocen unter bestimmten Bedingungen ein mutagenes Potential zukommen könnte. Es ist daher zu erwägen, weitere Untersuchungen zur Klärung der noch nicht endgültig geklärten mutagenen Wirksamkeit von Ferrocen in *Drosophila* und Hamsterozellen durchzuführen. Die eindeutig negativen Befunde im Zelltransformationstest sowie im Mikronukleustest *in vivo* sprechen insgesamt gegen ein gentoxisches Potential von Ferrocen in Warmblütersystemen.

Das **kanzerogene Potential** von Ferrocen ist bisher nicht systematisch überprüft worden. Eine frühe Mitteilung über das Auftreten lokaler Tumoren an der Injektionsstelle nach intramuskulärer Beibringung gibt keinen direkten Hinweis auf ein kanzerogenes Potential, da auch andere, eisenliefernde Verbindungen derartige Tumoren auslösen können. Im National Toxicology Program sind Vorversuche zur Überprüfung im Langzeit-Kanzerogenitätsversuch bei Inhalation an zwei Tierarten durchgeführt worden. Das Ergebnis des Langzeitversuches wird Klarheit über kanzerogene Wirkungen von Ferrocen erbringen. Nach dem derzeitigen Wissensstand ergibt sich für ein kanzerogenes Potential von Ferrocen kein Anhalt, es kann aber auch nicht mit hinreichender Wahrscheinlichkeit ausgeschlossen werden.

6 Literatur

- [1] A. R. DAHL; T. J. BRINER: Biological fate of a representative lipophilic metal compound (ferrocene) deposited in the respiratory tract of rats. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* **56**, 232–239 (1980)
- [2] J. D. SUN; A. R. DAHL; N. A. GILLET; E. B. BARR; M. C. CREWS; A. F. EIDSON; W. E. BECHTHOLD; D. G. BURT; M. A. DIETER; C. H. HOBBS: Two-week repeated inhalation exposure of F344/N rats and B6C3 F₁ mice to ferrocene. *Fundam. Appl. Toxicol.* **17**, 150–158 (1991)
- [3] P. C. BERGMANN: Eigenschaften von mit Ferricenium-Kationen eisenmarkierten Gamma-Globulinen. *Acta Biol. Med. German.* **30**, 441–443 (1973)
- [4] U. GOLDBERG; L. E. MARTIN: The absorption, distribution and utilisation of iron in fat-soluble form. *Life Sci.* **3**, 1465–1474 (1964)
- [5] J. L. MADINAVEIDA: Ferrocenes as haematinics. *Brit. J. Pharmacol.* **24**, 352–359 (1965)
- [6] R. A. YEARY: Chronic Toxicity of dicyclopenta-dienyliron (Ferrocene) in dogs. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* **15**, 666–676 (1969)
- [7] W. H. SOINS: The metabolism of ferrocene and the biological activity of D, L-beta-ferrocenyl-alpha-alamine. Dissertation, University of Kansas, Lawrence, Kansas (1977)
- [8] R. P. HANZLIK; W. H. SOINE: Enzymatic hydroxylation of ferrocene. *J. Amer. Chem. Soc.* **100**, 1290–91 (1978)
- [9] Progress Report an das National Cancer Institute, durchgeführt vom Instiut für Chemische Biologie der Universität San Francisco
- [10] US-Army Data: Bericht an NIOSH
- [11] Shell Chemicals Co: Unveröffentlichter Bericht (1961)
- [12] NTP Interim Report: Carcinogenicity study on ferrocene, *Int. Agency Agr.* 401–ES–70157 (1981)
- [13a] Inveresk Research International Laboratories, Project No. 436825, Report No. 5206 v. 03. 05. 1988. Ferrocene: 4 week dietary study in rats (1988)
- [13b] Dr. PITTERMANN, Düsseldorf. Bericht vom 07. 12. 1989
- [14] H. MARCHNER; I. HAEGGQUIST; B. KARLSSON; T. JOHANSSON: Studies on the mutagenic effects of ferrocene carbamate and HI-6, two candidates against soman poisoning. Report; ISS FOA-C-40243-4.7; (1987) 79 pp.
- [15] Interner Bericht Hüls AG, Mutagenitätslabor, Mutagenitätsuntersuchung von Ferrocen mit Hilfe des *Salmonelle typhimurium*/Microsomen, Mutagenitätstests nach Ames an VEBA OEL vom 03. 02. 1988
- [16] S. HARWORTH; T. LAWLOR; K. MORTELSMANS; W. SPECK; E. ZEIGER: Salmonella mutagenicity test results for 250 chemicals. *Envir. Mutag.* **5** (Suppl. 1), 3–142 (1983)
- [17] S. ZIMMERIG; J. M. MASON; R. VALENCIA; R. C. WOODRUFF: Chemical Mutagenesis Testing in *Drosophila* II. Results of 20 Coded Compounds Tested for the National Toxicology Program. *Envir. Mutag.* **7**, 87–100 (1985)
- [18] S. M. GALLOWAY; A. D. BLOOM; M. RESWICH; B. H. MARGOLIN; F. NAKASINURA; P. ARCHER; E. ZEIGER: Development of a Standard Protocol for *in vitro* Cytogenetic Testing with Chinese Hamst Ovary Cells. *Envir. Mutag.* **7**, 1–51 (1985)
- [19] D. SCHIFFMANN: Test auf Zelltransformation und Mikrokernbildung in Syrischen Hamstereembryofibroblasten mit Ferrocen. Untersuchungsbericht an VEBA OEL (1991)
- [20] Interner Bericht Hüls kAG, Mutagenitätslabor, an VEBA OEL vom 10. 02. 88
- [21] M. K. DOELTZ; M. MACHIL; P. A. RICH; C. C. SIGMAN; C. C. HELMES: A study of organometallic compounds for the selection of candidates for carcinogen bioassay. *J. Envir. Sci. Health*, **A19**, 27–65 (1984)
- [22] NCI Progress Report, Inst. Chem. Biol., University of San Francisco (1969)
- [23] J. L. MADINAVEIDA: Ferrocenes as haematinics. *Brit. J. Pharmacol. Chemothr.* **24**, 352–359 (1965)
- [24] P. KOEPP-MAIER; H. KOEPP; E. W. NEUSE: Ferricenium complexes; a new type of water-soluble antitumor agent. *J. Cancer Res. Clin. Oncol.* **108**, 336–340 (1984)
- [25] P. KOEPP-MAIER; T. KLAPOETKE: Tumor inhibition by ferricenium complexes. Activity against some solid experimental tumors. *Arzneimittelforsch./Drug Research* **39**, 369–371 (1989)
- [26] M. WENZEL; Y. WU; E. LISS; E. W. NEUSE: Stabilität des Ferricenium-Kationen und seine cytostatische Wirkung. *Z. Naturforsch. C* **43**, 963–966 (1988)
- [27] M. WENZEL; Y. WU: Synthesis and organ distribution of ferrocene, ruthenocene or rhodocene analogs of haloperidol after tagging with ruthenium-103 or rhodium-103. *App. Rad. Isot.* **39**, 1237–1241 (1988)
- [28] P. A. TEICHER; J. L. JACOBS; C. L. CATHERT; M. J. ABRAMS; J. F. VOLLANO; D. H. PICKER: Some complexes of cobalt (III) and iron (III) are radiosensitizers of hypoxic EMT 6 cells. *Rad. Res.* **109**, 36–46 (1987)
- [29] A. L. JOY; D. M. L. GOODGAME; I. J. STRATFORD: High efficiency of ferricenium salts as radiosensitizers of V 79 cells *in vitro*. *Int. J. Radiol. Oncol. Biol. Phys.* **16**, 1055–1056 (1989)
- [30] K. E. DOMBROWSKY; J. E. SHEATS; D. J. PROCKOP: Iron containing metallocenes as active site directed inhibitors of the proteinase that cleaves the NH₂-terminals from type I procollagen. *Biochemistry* **25**, 4302–4309 (1986)
- [31] U. K. GERSCHBEIN: Rat liver regeneration in the presence of nonbenzenoid aromatic compounds: ferrocenes and cyclopentatrienes. *Res. Comm. Pathol. Pharmacol.* **27**, 139–145 (1980)
- [32] P. L. UPHAM; K. K. HATZIOS: Counteraction of paraquat toxicity at the chloroplast level. *Z. Naturforsch. C* **42**, 824–828 (1987)
- [33] S. KALUZ; S. TOMA: Biologically active derivatives of ferrocene. Part 2. Ferrocene derivative as potential drugs and pesticides. *Pharm. Obz.* **58**, 11–16 (1989)
- [34] E. R. PAGE: Effects of ferrocene and related compounds on plant growth. *Nature* **212**, 640–641 (1966)
- [35] D. W. NIELSON: A theory of primary alveolar mechanics and a study of the structure of a pulmonary pathogen. Dissertation, University of Utah. Dissertation Abstracts No. 76–30, 459, Xerox University Microfilms, Ann Arbor, Michigan 48106 (1976)