

Arch. Pharm. (Weinheim) 310, 1011–1014 (1977)

Johannes Reisch, Ulrich Seeger und Helmut Möllmann

Ganztierautoradiographische Untersuchungen am 7-(Butin-(3')-yl)-theophyllin-³H*))**

Aus dem Institut für Pharmazeutische Chemie der Westfälischen Wilhelms-Universität Münster

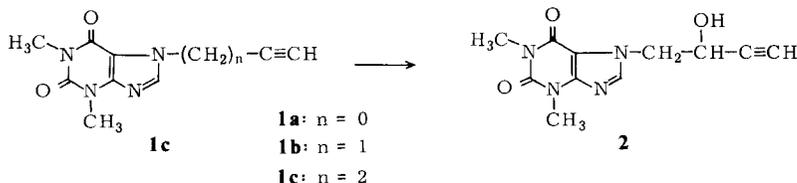
(Eingegangen am 31. Januar 1977)

Die Synthese des 7-(Butin-(3')-yl)-theophyllins-³H wird beschrieben. Ganztierautoradiographische Untersuchungen an Wistar-Ratten ergaben eine Anreicherung der Substanz im liquor cerebrospinalis, sowie im Glaskörper des Auges und den Zwischenwirbelscheiben. Bei einer histologischen Analyse der Niere zeigte sich in den tubuli contorti I und II Abschnitten eine vakuolige Auflockerung mit teilweiser Zerstörung der gesamten Zelle.

Studies of [³H]-7-(3-Butynyl)theophylline by Whole-Body Autoradiography

The synthesis of [³H]-7-(3-butynyl)-theophylline is described. Whole-body autoradiography of Wistar rats after application of the compound shows a cumulation of radioactivity in the cerebrospinal fluid, in the vitreous body of the eye and in the intervertebral discs. Histologic analysis of the kidney showed a vacuolic structure and partial destruction of the cells in convoluted tubules I and II.

Wie tierexperimentelle Untersuchungen an Wistar-Ratten ergeben hatten, bleibt von den homologen alkinylsubstituierten Theophyllinen (1a–1c) bei Körperpassage nur beim 7-(Butin-(3')-yl)-theophyllin (1c) die Seitenkette erhalten^{1,2}. 1c wird dabei zum urinalen 7-(2'-Hydroxy-butin-(3')-yl)-theophyllin (2) metabolisiert². Die tierexperimentellen Studien sollten durch autoradiographische Untersuchungen abgerundet werden.



* 15. Mitt.: Zur Synthese und Wirkung potentieller Arzneistoffe; 14. Mitt.: J. Reisch und U. Seeger, Arch. Pharm. (Weinheim) 310, 888 (1977).

** Teilergebnisse der Dissertation U. Seeger, Münster 1973.

1 J. Reisch und U. Seeger, Arch. Pharm. (Weinheim) 310, 888 (1977).

2 J. Reisch und U. Seeger, Arch. Pharm. (Weinheim) 310, 351 (1977).

Von den zur Auswahl stehenden Markierungsmöglichkeiten wurde einer Tritierung des Theophyllin-Grundkörpers der Vorzug gegeben.

Die Synthese des 7-(Butin-(3')-yl)-theophyllin-³H (**3**) erfolgte auf einem Wege, der schon früher bei der nicht markierten Verbindung beschritten wurde²⁾. Dazu wurde Theophyllin-³H mit unmarkiertem Material verschnitten und mit 1-Brombutin-(3) umgesetzt.

Im Dünnschichtchromatogramm, dem inaktives **1c** beigemischt war, trat lediglich eine radioaktive Zone auf, die sich mit der inaktiven Verbindung **1c** deckte.

Nach einmaliger Applikation von 30 mg **3** per Schlundsonde kamen die Versuchstiere in Stoffwechselläufige und wurden nach 3, 6, 12 bzw. 24 h getötet. Die Durchführung der Ganzkörperautoradiographien erfolgte in Anlehnung an eine von Ullberg entwickelte Technik³⁾. Die Ganztierschnitte wurden 2,5 Monate auf einem Röntgenfilm gelagert.

Die nach dieser Expositionszeit durchgeführte Auswertung der Radiogramme ergab folgendes differenziertes Verteilungsmuster von **3** (Abb. 1–3): Auffällig war die Anreicherung im liquor cerebrospinalis, sowie im Glaskörper des Auges und den Zwischenwirbelscheiben. Desgleichen schienen die serösen Häute von einem Radioaktivitätsfilm überzogen zu sein. Auch in einigen Kopfdrüsen war eine leichte Anreicherung der markierten Verbindung zu erkennen. In den distalen Darmabschnitten fand sich durch die fäkale Ausscheidung eine deutliche Radioaktivität.

Die abgebildeten Autoradiographien sind Positiv-Darstellungen, d. h. Orte erhöhter Radioaktivität zeichnen sich durch eine hellere Nuancierung gegenüber der Umgebung aus. Die lange Expositionszeit war notwendig, da Tritium nur ein relativ schwacher β -Strahler ist. Eine weitergehende Aussage konnte anhand dieser Autoradiographien nicht gemacht werden, denn nach dieser Zeit können sich Feuchtigkeitsschäden auf dem Film einstellen, die zu ungenauen Ergebnissen führen.

Wie bereits früher beobachtet, steigt nach Applikation von 150 mg/kg **1c** die Harnausscheidung auf das 6-fache des Normalwertes an²⁾. Zu vermuten war, daß neben einer eventuellen Hemmung bestimmter Enzyme durch die endständige Acetylenbindung eine Gewebsschädigung der Niere eingetreten war.

Bei der histologischen Analyse der Niere nach HE-Anfärbung zeigte sich in den tubuli contorti I-Abschnitten eine Veränderung und vakuolige Ausweitung einzelner Epithelzellen. Die Zellen des tubulus contortus II waren ebenfalls durch eine Auflockerung verändert und wiesen vakuolige Umwandlungen mit teilweiser Zerstörung der gesamten Zelle auf. Die beobachtete vermehrte Diurese könnte demnach auf die durch **1c** induzierte Gewebsschädigung zurückgeführt werden, die eine Rückresorption erschwerte bzw. unmöglich machte.

Von den drei untersuchten alkinylsubstituierten Purinen **1a**–**1c** bewirken nur **1a** und **1c** eine Erhöhung der Harnausscheidung. Da **1b** – bei dem dieser Effekt nicht

3 S. Ullberg, Biochem. Pharmacol. 9, 29 (1962).

eintrat – fast vollständig metabolisiert wird, **1a** und **1c** dagegen nicht, sollte die intakte endständige Acetylenbindung für diesen Effekt verantwortlich sein.

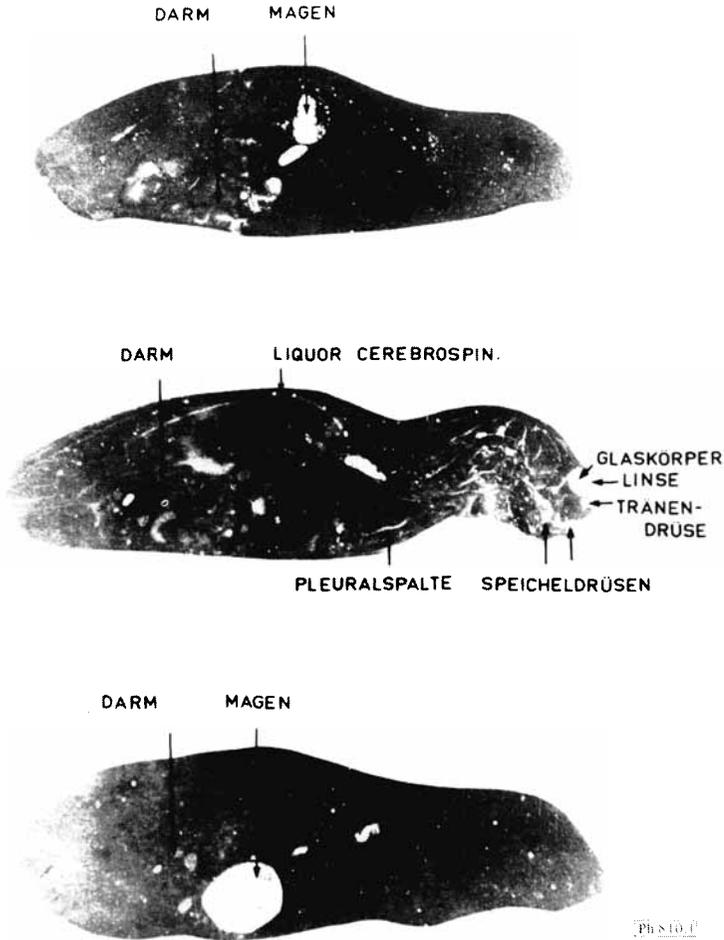


Abb. 1–3: Autoradiographien von Ganztierschnitten nach Applikation von 150 mg/kg 7-(Butin-(3')-yl)-theophyllin-³H. 12 Stunden nach der Applikation.

Experimenteller Teil

Verwendete Geräte

Dünnschicht-Scanner Bethold, Modell LB 2721; Flüssigkeits-Szintillations-Spektrometer Packard Instrument Company, Inc., Modell 314 EX.

7-Butin-(3')-yl-(theophyllin-³H) (3)

Das als wäßrige Lösung vorliegende Theophyllin-³H (spezifische Aktivität 7,1 mCi/mg^{***}) mit einer Gesamtaktivität von 5 mCi wurde mit 200 mg unmarkiertem Material verschnitten, das Wasser bei 60° entfernt und der Rückstand 3 h bei 110° getrocknet.

Das trockene Material wurde in einer Lösung von 25,5 mg Natrium in 10 ml Alkohol eingebracht, mit 3,5 ml absol. DMF und 170 mg 1-Brombutin-(3) versetzt und 12,5 h unter Rühren und Rückfluß erhitzt. Danach wurde i. Vak. bis zur Trockne eingedampft, der Rückstand in 40 ml Chloroform aufgenommen und zweimal mit je 15 ml 5proz. Natriumcarbonatlösung gewaschen, nach dem Trocknen das Lösungsmittel i. Vak. entfernt und aus wenig Äthanol umkristallisiert, Schmp. 188°; Ausbeute: 125 mg.

Dünnschichtchromatographie: Adsorbens: Kieselgel GF₂₅₄ Merck; Fließmittelsystem: Chloroform/Essigester/Methanol/Eisessig (40 : 40 : 5 : 2); Detektion: Fluoreszenzlösung.

Die Radioaktivität von drei Proben, die je 0,1 ml einer Lösung von 10 mg 3 in 100 ml Chloroform enthielten, wurde im Flüssigkeits-Szintillations-Spektrometer 10 min gemessen. Als Standard diente Toluol-³H. Aus dem Mittelwert der drei Messungen errechnete sich eine spezifische Radioaktivität von 194 μ Ci/mg.

Die ganztierautoradiographische Untersuchung

180–200 g schwere Ratten erhielten in einer einmaligen Dosis 30 mg 3 per Schlundsonde appliziert. Die Dosis war in Wasser aufgeschlämmt und mit Ultraschall mikrotonisiert. Die Tiere erhielten nach 3, 6, 12 bzw. 24 h einen Ätherrausch und wurden in einer Kältemischung aus Aceton und Trockeneis eingefroren. Die tiefgekühlten Tiere wurden anschließend bei ca. –20° zur Temperaturangleichung mindestens 24 Std. aufbewahrt.

Zur Anfertigung der Schnitte wurden die Tiere auf einem Gefriertisch in magerem, sehnenfreien Rohgehackten mit einem Wasserzusatz bis zu 50 % eingefroren und mit einer Bandsäge die gewünschte Schnittebene vorgesägt. Anschließend wurden bei –15° Schnitte mit einer Dicke von 0,1 mm angefertigt. Hierzu wurde die Sägefläche des Präparates durch mehrfaches Schneiden geglättet, ein der gesamten Schnittfläche entsprechend großes Stück Tesafilm^R aufgeklebt und die Schnitte angefertigt. Die Schnitte wurden sofort in einen Kryostaten gebracht und bei 18° getrocknet.

Nach einer Trocknungszeit von ca. 24 h wurden die Schnitte auf einen Röntgenfilm (Dupont Doneo–X-Ray-Film) gelegt und zwischen zwei Glasplatten eingespannt. Zur Exposition wurde der Film in einem Tiefkühlschrank bei –20° gelagert; die Expositionszeit betrug 2,5 Monate. Danach wurde der Film entwickelt (Entwickler G. 230, F. Agfa Gevaert) und in einem sauren Fixierbad fixiert.

*** Bezogen von der Fa. The Radiochemical Centre Amerham, England.