

Studie sirných derivátů 6-azauracilu (IV)* Distribuce 2-thio-6-azathyminu v organismu krysy

F. HORÁK, O. THOMESOVÁ

Katedra organické technologie Slovenské vysoké školy technické, Bratislava

Věnováno prof. dr. Juražovi Gašperíkovi k 60. narozeninám

Po perorální aplikaci 2-thio-6-azathyminu bylo zjištěno, že přibližně 70 % substance se vyloučí močí za 24 hodin jednak v nezměněné formě, jednak jako metabolity. Část se vyloučí ve vydýchávaném vzduchu jako kysličník uhličitý a část odchází stolicí. Z metabolitů byly dále identifikovány 6-azathymin, 2-methylmerkaptó-6-azathymin a SO_4^{2-} . K metabolizaci pravděpodobně dochází již ve stěně zažívacího traktu. Celkově bylo při použití 2-thio-6-azathyminu- ^{35}S prokázáno 7 metabolitů a při 2-thio-6-azathyminu-4- ^{14}C 8 metabolitů. Ze zjištěných látek má 6 společné atomy původní molekuly z polohy 2 a 4.

V práci bylo dále sledováno vychytávání radioaktivní substance štítnou žlázou. Bylo zjištěno, že v časovém odstupu se její množství v štítné žláze zvyšuje a za 24 hodin činí 0,43 %.

Poznání metabolismu některé látky v organismu ve většině případů nezodpovídá otázku o mechanismu účinku. Přesto však v komplexní studii je nezbytně doplňující součástí. Otázka biotransformace 2-thio-6-azathyminu nebyla doposavad řešena. Z látek obdobné struktury je poznán metabolismus thiouracilu [1], thiobarbiturátu [2], dále thiomocoviny [3, 4] a 6-azathyminu [5]. Převládajícím procesem při metabolizaci síru obsahujících látek byla prokázána S-oxidace.

Mimořádně zajímavý strumigenní účinek 2-thio-6-azathyminu, který byl z 20 různě substituovaných sirných derivátů 6-azauracilu neúčinnější, byl podnětem pro bližší poznání jeho biologických vlastností. Již J. Škoda u tohoto derivátu zjistil jeho inhibiční vliv na růst *Escherichia coli* a prokázal, že v koncentraci 100 $\mu\text{g/ml}$ brzdí růst o 36 % [6]. Taktéž Z. Šormová se zabývala v rámci obsáhlé studie o účincích různých látek na růst rostlin také 2-thio-6-azathyminem a zjistila, že je jedním z neúčinnějších stimulačních faktorů kořenového systému hrachu [7].

Experimentální část

Vylučování 2-thio-6-azathyminu a jeho metabolismus byl studován na dospělých kryších samcích druhu Wistar, kteří dostávali normální dietu. Počas pokusu byly krysy umístěny v metabolických klíčkách a tyto byly opatřeny pitnou vodou a zařízeny tak,

* III. sdělení: *Čs. farm.* (v tisku).

že umožňovaly analýzu vydechovaného vzduchu. Vylučovaná moč se zachytávala po frakcích a její množství bylo zaznamenáváno.

Pro dělení a identifikaci metabolitů se použila papírová chromatografie. Při spektrofotometrickém sledování kvantitativního vylučování nezměněného 2-thio-6-azathyminu v moči bylo z chromatografického papíru Whatman 1 po identifikaci polohy příslušející této látce označené místo vystříženo a eluováno. K eluci se použilo 10 ml McIlvainova pufru o pH 7,2. Vyhodnocení bylo provedeno za použití grafů získaných přidavkem standardních vzorků látky do moče normálních krys a proměřením při 264 m μ . Vlastní pokus se provedl na třech krysách o váze 200 g. Krysám byl sondou aplikován roztok sodné soli 2-thio-6-azathyminu o koncentraci 100 mg/ml, a to v množství 1 ml. Z každého odběru moče, získaného od jedné krysy počas osmi hodin a od zbývajících dvou za 24 hodin, bylo naneseno na chromatografický papír 0,1 ml. Současně na stejný chromatografický papír byly naneseny i standardní roztoky. Chromatografie byla provedena dvojnásobným vyvíjením v soustavě *n*-butanol nasycený 5 % amoniakem a detekce provedena v ultrafialovém světle (Philora-Philips).

Další studie byla provedena se substancí, která měla v molekule radionuklidy, a sice ^{14}C a ^{35}S . Metabolity moče s radioaktivními atomy se sledovaly jednorozměrnou nebo dvojrozměrnou chromatografií kvalitativně tak, že byly porovnávány hodnoty R_F v různých rozpouštědlových systémech se standardy [8], případně i kvantitativně. Při kvalitativním vyhodnocení byla detekce provedena přiložením chromatogramů na röntgenový film (Agfa). Doba detekce byla volena různě, a to podle množství radioaktivity, jakou vzorek vykazoval, a pohybovala se od 3–10 dnů. Ke kvantitativnímu vyhodnocení bylo použito Frisekeho—Hoepfnerova přístroje a vlastní vyhodnocení bylo provedeno vážením ploch záznamu.

Při papírové chromatografii bylo v prvním směru používáno vyvíjející směsi *n*-butanol nasycený 5 % amoniakem a v druhém směru *n*-butanol, kyselina octová, voda v poměru 4 : 1 : 5.

Na izolovaném krysím střevu o účinné délce 10 cm byla sledována otázka, zda dochází *in vitro* k biotransformaci 2-thio-6-azathyminu. Střevo bylo ihned po vypreparování promyto dvakrát fyziologickým roztokem o teplotě 37 °C a oběma konci bylo upevněno na promývacím zařízení tak, aby jím kontinuálně protékal 1 % roztok 2-thio-6-azathyminu- ^{35}S , mající celkovou radioaktivitu 20 μC a připravený ve fyziologickém roztoku. Celé zařízení bylo temperováno na 37 °C. Doba průtoku byla 4 hodiny. Po skončení byla vnější tekutina extrahována etherem, roztok zahustěn a extrakt chromatografován.

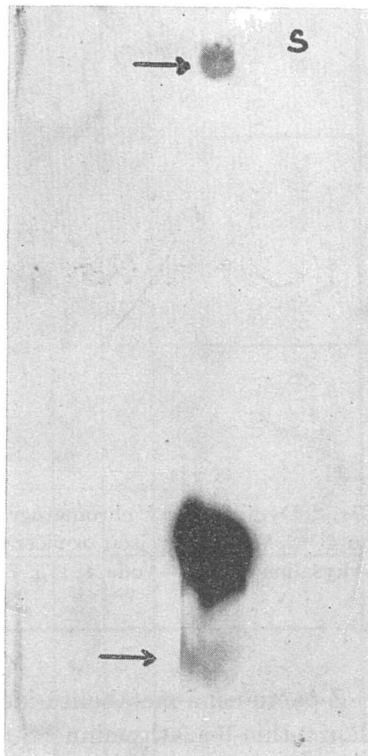
Vyhodnocení resorpce 2-thio-6-azathyminu- ^{14}C štítnou žlázou bylo provedeno na krysích samcích o váze 100 g. Každé kryse byl aplikován 1 ml substance o specifické aktivitě 17,5 $\mu\text{C}/\text{ml}$. Roztok byl podán sondou a po 1, 12 a 24 hodinách byly krysy usmrceny v etherové narkóze. Intenzita radioaktivity ve štítných žlázách byla vyhodnocena po převedení na BaCO_3 .

Současně s předcházejícím pokusem bylo sledováno, zda vydýchaný vzduch obsahuje radioaktivní kyslíčník uhlíčitý. Pokus byl proveden jen kvalitativně na základě vyloučeného, radioaktivitu obsahujícího BaCO_3 , získaného probubláváním vydýchaného vzduchu roztokem hydroxidu barnatého.

Při sledování přítomnosti 2-thio-6-azathyminu, případně jeho metabolitů v štítné žláze, byla použita papírová chromatografie. Štítné žlázy za 24 hodin po aplikaci substance, mající v molekule ^{14}C , byly hydrolyzovány trypsinem a hydrolyzát po extrakci *n*-butanolem chromatografován [9].

Výsledky a diskuse

V pokuse in vitro na izolovaném krysím střevu bylo zjištěno, že vedle nezreagované substance jsou po průchodu stěnou střevní v promývací tekutině další dvě látky (obr. 1). Je pravděpodobné, že obdobný proces probíhá taktéž in vivo

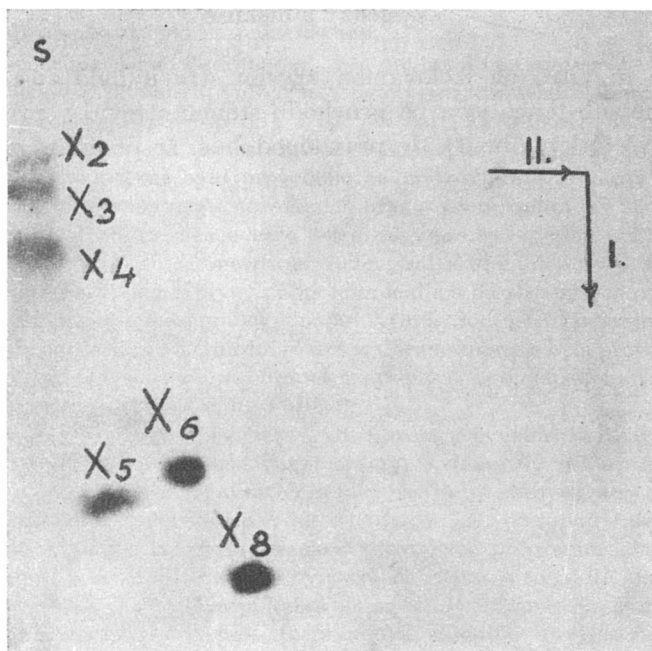


Obr. 1. Radiochromatogram extraktu z promývací tekutiny po aplikaci 2-thio-6-azathyminu- ^{35}S z pokusu in vitro na izolovaném krysím střevu. Šipkami jsou označeny metabolity. Chromatografováno ze směsi *n*-butanol—kyselina octová—voda 4 : 1 : 5. Detekce autoradiografií.

Další metabolizace v organismu je podstatně složitější. Při kvantitativním vyhodnocení, zpracovaném na základě sledování radioaktivity, bylo zjištěno, že se za 24 hodin vyloučí asi 70 % látky, a to částečně jako nezměněná substance a částečně jako metabolity. Malé množství metabolitů této substance odchází ve vydýchaném vzduchu a část se vyloučí ve stolici.

Při sledování počtu metabolitů bylo jich zatím zjištěno devět. Osm z nich bylo zjištěno v moči a devátý byl identifikován po aplikaci 2-thio-6-azathyminu-4- ^{14}C ve vydýchaném vzduchu jako kysličník uhličitý.

Metabolity 2-thio-6-azathyminu, podle toho, jakou zaujímaly polohu na chromatogramech, možno rozdělit do dvou skupin. Prvou skupinu tvoří látky označené X_1 — X_4 , druhou skupinu zbývající metabolity X_5 — X_8 . Částečný přehled rozložení metabolitů je na obr. 2.



Obr. 2. Dvojměrný chromatogram moče krysy, získané po aplikaci 2-thio-6-azathyminu-4-¹⁴C. Metabolity jsou označeny podle tab. I. Chromatografováno I. směr *n*-butanol—*n*-kyselina octová—voda 4:1:5. II. směr *n*-butanol nasycený 5 % amoniakem. Detekce autoradiografií.

Z počtu osmi metabolitů identifikovaných v moči bylo sedm zjištěno po podání 2-thio-6-azathyminu-³⁵S a taktéž sedm po podání 2-thio-6-azathyminu-4-¹⁴C. Šesti metabolitům jsou společná stejná seskupení atomů, jaké měla výchozí molekula v polohách 2 a 4. Přehled metabolismu je v tab. 1.

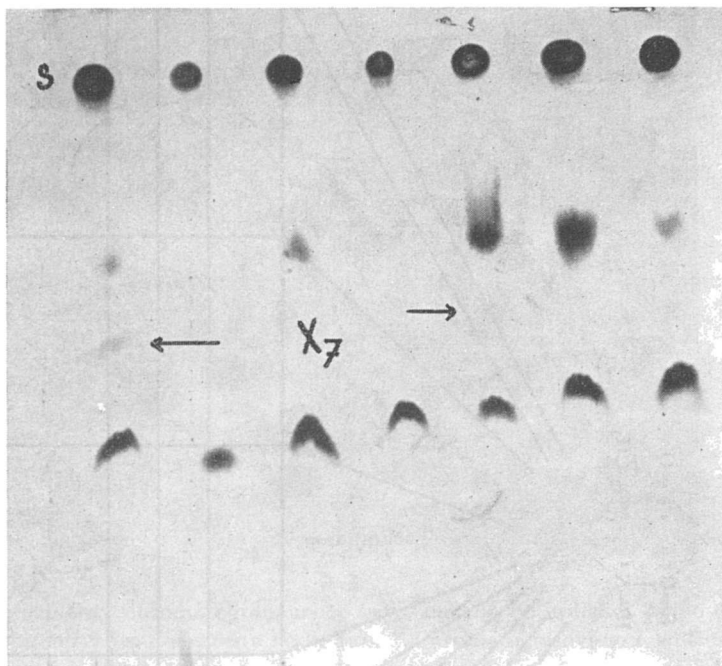
Z celkového počtu zjištěných metabolitů bylo pět identifikováno. Je to již vzpomenutý kysličník uhlíčitý, jehož přítomnost ve vydychávaném vzduchu svědčí o biologické destrukci molekuly. Znamená to, že v organismu dochází k otevření asymetrického triazinového skeletu a jeho další metabolizaci. Na základě tohoto zjištění nejpravděpodobnějším mechanismem je hydrolytické rozštěpení molekuly mezi dusíkem v poloze 3 a uhlíkem v poloze 4 s následující dekarboxylací.

Dalším identifikovaným metabolitem v moči vedle zjištěného nezměněného 2-thio-6-azathyminu (X_6) byl anion SO_4^{2-} (X_1). Oxidativním odbouráváním vznikl i další metabolit, 6-azathymin (X_5). Poslední identifikovaná látka, 2-methylmerkpto-6-azathymin (X_7), byla nalezena jen v některých frakcích

Tabulka 1
Přehled metabolismu 2-thio-6-azathyminu

Mechanismus biotransformace									
	hydrolyza a dekarboxylace	oxidace				desulfurace	zkrata metabolisme	s-methylace	
Označení metabolitu	X	X ₁	X ₂	X ₃	X ₄	X ₅	X ₆	X ₇	X ₈
Metabolit obsahuje z původní molekuly	C		C	C	C	C	C	C	C
Metabolit obsahuje z původní molekuly		S	S	S	S		S	S	S
Vzorec metabolitu	CO ₂	SO ₄ ⁻							

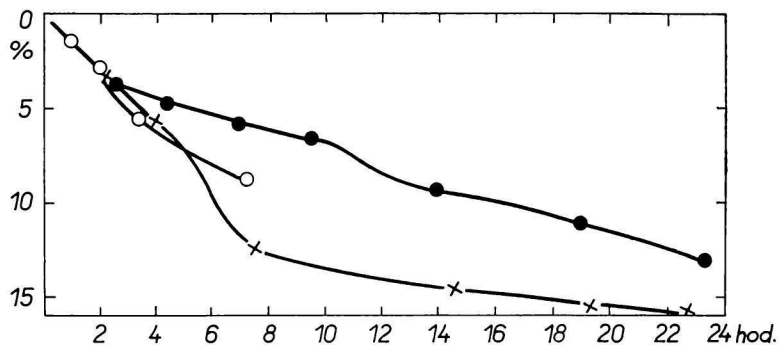
moče. Zajímavé je, že není ani ve všech frakcích od jedné krysy, jak je vidět na obr. 3, kde ze sedmi odběrů byl zjištěn jen v prvním a pátém.



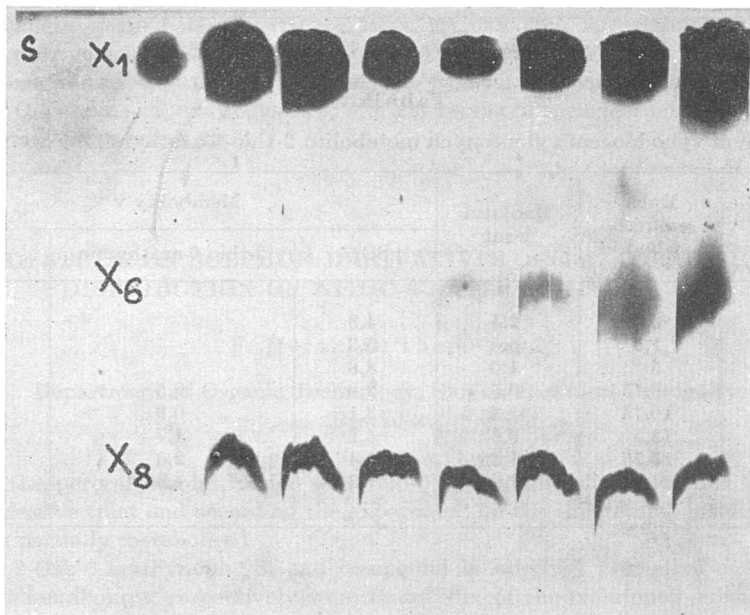
Obr. 3. Chromatogramy moče, získané po aplikaci 2-thio-6-azathyminu-³⁵S. V prvním a pátém odběru je šipkou označená skvrna identifikována jako 2-methylmerkapto-6-azathymin (X_7). Chromatografováno ze směsi *n*-butanol nasycený 5 % amoniakem. Detekce autoradiografií.

Ze zbývajících metabolitů, které zatím byly identifikovány, jsou X_2 , X_3 a X_4 ze skupiny první a X_8 ze skupiny druhé. Metabolity první skupiny se postupně objevují na chromatogramech až v pozdějších frakcích moče. Nejprve je zjištělná skvrna označená X_4 a zbývající X_2 a X_3 se objeví později. Metabolit X_4 dává pozitivní nitroprusidovou reakci. To nasvědčuje přítomnosti sulfhydrylové skupiny. U zbývajících dvou byla reakce neurčitá. Jak bylo prokázáno, obsahují molekuly těchto metabolitů obě centra původní molekuly.

Při sledování kvantitativního vylučování 2-thio-6-azathyminu v moči bylo zjištěno, že až jedna sedmina se vyloučí za 24 hodin v nezměněné formě. Vylučování nezměněného 2-thio-6-azathyminu je vidět z obr. 4 a 5. Byly však zjištěny proměnné rozptyly močí vyloučeného 2-thio-6-azathyminu v jednotlivých časových intervalech (obr. 5).



Obr. 4. Vylučování nemetabolizovaného 2-thio-6-azathyminu v moči krysy. U dvou krys označených ● a × byl odběr proveden během 24 hodin a u zbývajících během 8 hodin.



Obr. 5. Vylučování metabolitů v moči krysy po aplikaci 2-thio-6-azathyminu-³⁵S. Chromatografováno ze směsi *n*-butanol nasycený 5 % amoniakem. Detekce provedena autoradiografií.

Podle rozložení radioaktivity v metabolitech moče bylo zjištěno, že 42,2 % z podaného množství 2-thio-6-azathyminu-³⁵S se za 24 hodin přemění oxidativní biotransformací na SO_2^- a že tímto mechanismem se metabolizuje největší množství substance (tab. 3).

K objasnění mechanismu účinku strumigenů byla zjišťována resorpce 2-thio-6-azathyminu-4-¹⁴C štítnou žlázou. Výsledky uvedené v tab. 2 ukazují,

Tabulka 2

Množství radioaktivity ve štítných žlázách krysy po aplikaci 2-thio-6-azathyminu-4-¹⁴C

Váha krysy v g	Čas v hod.	Váha štítných žláz v mg	Impulzy za min.	Procento z aplikovaného množství
100	1	5,3	1 139	0,034
100	12	5,8	10 483	0,25
100	24	6,0	17 842	0,43

Tabulka 3

Kvantitativní vyhodnocení vyloučených metabolitů 2-thio-6-azathyminu-³⁵S v moči krysy

Frakce moče	Doba exkrece v hod.	Množství v ml	Metabolity v %		
			SO ₄ ²⁻	2-thio-6-azathymin	X _s
1	0,5	2,1	4,8		
2	1,5	0,5	5,3		1,4
3	5	1,0	8,8		3,0
4	6,75	0,6	2,9	0,5	1,5
5	10,75	1,3	3,1	0,9	2,2
6	12,5	0,6	4,2	1,7	2,3
7	15,75	1,2	5,4	2,6	3,6
8	24	2,2	7,2	4,6	2,3

že z podaného množství se resorbuje v této žláze za 24 hodin 0,43 %. Nedá se však zatím rozhodnout, zda jde o běžnou resorpci látky orgánem nebo o funkční zásah strumigenů. Kvalitativně byla zjištěna po hydrolyze štítné žlázy trypsinem přítomnost nejméně dvou látek vykazujících radioaktivitu. Bližší identifikace obou zjištěných látek zatím provedena nebyla.

ИЗУЧЕНИЕ СЕРНЫХ ПРОИЗВОДНЫХ 6-АЗАУРАЦИЛА (IV)
РАСПРЕДЕЛЕНИЕ 2-ТИО-6-АЗАТИМИНА В ОРГАНИЗМЕ КРЫС

Ф. Горак, О. Томесова

Кафедра органической технологии Словацкого политехнического института,
Братислава

При пероральном введении 2-тио-6-азатимина происходит поглощение этого вещества желудочно-кишечным трактом и опыт на изолированной кишке крысы показывает, что уже здесь имеет место частичный обмен веществ.

При применении 2-тио-6-азатимина -³⁵S обнаружилось 7 метаболитов а с веществом меченым радиоактивным углеродом 8 метаболитов. Из определенных веществ имеет 6 общие центры в положении 2 и 4 исходной молекулы. В дальнейшем доказалось, что в течение одних суток выделится мочой приблизительно 70 % введенного вещества. Приблизительно 1/7 из введенного количества 2-тио-6-азатимина выделяется в неизменном виде. Кроме этого вещества обнаружались в моче 6-азатимин, 2-метилмеркапто-6-азаурацил и сульфат-ион. Выдыхательный воздух содержал углекислый газ. Остальные четыре метаболиты не были, до сих пор, идентифицированы. Три, из этих, дают положительную нитропруссидную реакцию.

В работе также изучалось задержание радиоактивного вещества щитовидной железой. Определилось, что количество этого вещества со временем повышается и после одних суток составляет 0,43 %.

*Preložil M. Fedoroňko*THE STUDY ON SULPHUR DERIVATIVES OF 6-AZAURACILE (IV)
DISTRIBUTION OF 2-THIO-6-AZATHYMININE IN RATS

F. Horák, O. Thomesová

Department of Organic Technology, Slovak Technical University,
Bratislava

After the peroral administration of 2-thio-6-azathymine this substance is absorbed in the digestive tract and according the experiment on the isolated rat intestine already here it is partially metabolised.

Using 2-thio-6-azathymine-³⁵S, and compound labelled by radioactive carbon, seven and eight metabolites, respectively were found. Six of the mentioned substances have the common centers from the position 2 and 4 of the original molecule. Furthermore, it was proved, that during 24 hours ca 70 % of the applicated substance was excreted by urine. Approximately 1/7 from the given dosis of 2-thio-6-azathymine was excreted unchanged. Besides this 6-azathymine, 2-methylmercapto-6-azauracil and sulphate anion were proved to be present in urine. In expired air, carbon dioxide was proved. The remaining four metabolites have not been so far identified. Three of them afford the positive nitroprusside reaction.

In the presented work the uptake of the radioactive substance by thyroid was investigated. It was found that its amount was increased in time and in 24 hours it makes 0,43 %.

Preložil I. Kompiš

LITERATURA

1. Sarcione E. J., *J. Biol. Chem.* **231**, 605 (1958); Morch P., *Acta Pharmacol.* **1**, 106 (1945).
2. Spector E., Shiedeman F. E., *Biochem. Pharmacol.* **2**, 182 (1959).
3. Campbell D., Landgrebe F. W., Morgan T. N., *Lancet* **246**, 636 (1944).
4. Maloof F., Spector E., *J. Biol. Chem.* **234**, 949 (1959).
5. Gaito A., Prusoff H., *Biochem. Pharmacol.* **11**, 323 (1962).
6. Škoda J., Čihák A., Gut J., Prystaš M., Piskala A., Párkányi C., Šorm F., *Collection Czech. Chem. Commun.* **27**, 1736 (1962).
7. Šormová Z., *Rozpravy Českoslov. akad. věd* **71** (1961).
8. Horák F., *Chem. zvesti* **16**, 151 (1962).
9. Horák F., Sámel M., *Collection Czech. Chem. Commun.* **30**, 1229 (1965).

Do redakcie došlo 27. 9. 1965

Adresa autorov:

Dr. František Horák, CSc., inž. Olga Thomesová, Katedra organickej technológie SVŠT, Bratislava, Jánska 1.