

Enzymatische Hydroxylierung von Ruthenocen und Osmocen durch Leber-Mikrosomen

Enzymatic Hydroxylation of Ruthenocen and Osmocene

Michael Schneider, Martin Wenzel
und Gerd Schachschneider

Pharmazeutisches Institut, Freie Universität Berlin,
Königin-Luise-Str. 2–4, D-1000 Berlin 33

Z. Naturforsch. 37 c, 136–138 (1982);
received August 20, 1981

Metallocenes, Radiodiagnosis, Osmium, Ruthenium, Hydroxylation

In buffer solution (pH 7,4) ruthenocene and osmocene are far more stable than ferrocene. The metallocenes ruthenocene and osmocene are metabolized by microsomes of mouse liver in the presence of NADPH and O_2 . The K_M -values are similar for both metallocenes, the rate of metabolism is higher for osmocene that for ruthenocene.

Metallocene werden als Cytostatika [1, 2] und – mit γ -Strahlern markiert – für den Einsatz als Radiodiagnostika vorgeschlagen [3–5]. In diesem Zusammenhang interessiert die Frage: Wird das Metallocen-Gerüst vom Organismus metabolisiert? Von zwei Metallocenen mit Metallen der 8. Nebengruppe als Zentralatom ist bekannt, daß sie im Säugetier-Organismus metabolisiert werden: Nach Gabe von Ferrocen bzw. Ruthenocen wurden im Urin von Mäusen oder Ratten Konjugationsprodukte der entsprechenden Hydroxymetallocene ausgeschieden [6, 7].

In der folgenden Arbeit haben wir untersucht, ob sich bei Osmocen ebenfalls eine enzymatische Metabolisierung nachweisen läßt. Dabei interessieren auch Vergleiche innerhalb der Reihe Ferrocen, Ruthenocen und Osmocen.



Zunächst wurde die Zersetzung der 3 Metallocene in Puffer bei 37 °C und pH 7,4 untersucht. Abb. 1 zeigt an Hand der Wiederfindung die deutlich größere Stabilität von Osmocen und Ruthenocen im Vergleich zum Ferrocen.

Sonderdruckanforderungen an Prof. Dr. M. Wenzel.
0341-0382/82/0100-0136 \$ 01.00/0

Die Zerfallreaktion läßt sich als Reaktion 2. Ordnung beschreiben ($1/c = k \cdot t + (1/c_0)$). Die großen Stabilitätsunterschiede drücken sich auch in den Halbwertszeiten aus:

	$t_{1/2}$	
Ferrocen	67 min	(abgelesen aus Abb. 1)
Ruthenocen	360 min	berechnet aus obiger
Osmocen	990 min	Gleichung

Eine stärkere Zersetzung des Ferrocen-Gerüstes unter Freigabe von Eisen-Ionen hatten wir schon aus Versuchen zur Organverteilung von Ferrocen- und Ruthenocen-Carbonsäure geschlossen; dagegen konnte kein Hinweis für das Freisetzen von Ruthenium-Ionen gefunden werden [4].

Da Ferrocen relativ unstabil ist und außerdem für diese Verbindung Befunde zur *in vitro* Metabolisierung vorliegen [6], wurde hier die Metabolisierung nur von Ruthenocen und Osmocen durch Mikrosomen aus Mäuse-Leber untersucht. Die Ergebnisse in Tab. I zeigen, daß für den Umsatz des Metallocens NADPH das wirksamere Coenzym im Vergleich zum NADH ist, und daß ohne Coenzym-Zusatz und bei 0 °C keine Hydroxylierung durch die Mikrosomen stattfinden. Auch die oxydierten Coenzyme NAD und NADH sind relativ wirkungslos. Der fehlende Umsatz unter Stickstoff beweist, daß der Metallocen-Metabolismus eine Sauerstoff-verbrauchende Reaktion ist. Dieses und die Wirk-

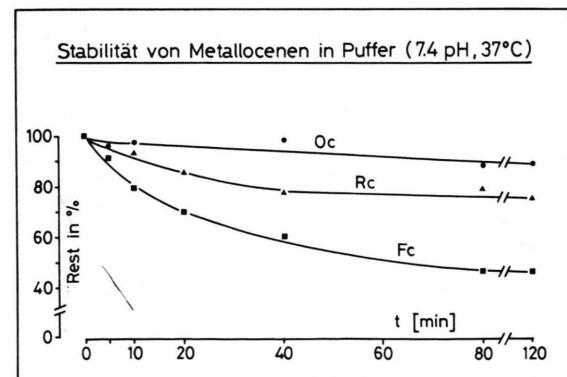


Abb. 1. Stabilität von Fc, Rc und Oc in Puffer (pH = 7,4). Zu 2 ml Krebs-Ringer-TRIS-Puffer (pH = 7,4) werden 50 µl einer äthanolischen Metallocen-Lösung (Endkonz. = 10^{-4} mol/l) pipettiert und in verschlossenen Gefäßen bei 37 °C inkubiert. Anschließend wurde 3 × je 2 ml Cyclohexan ausgeschüttelt und die Metallocen-Menge gegen Puffer-gesättigtes Cyclohexan photometrisch bei 240 nm bestimmt. Mittelwerte aus 2 Bestimmungen.

Tab. I. Coenzym-Spezifität der Ruthenocen- bzw. Osmocen-Hydroxylierung. Zu 1 ml Krebs-Ringer-TRIS-Puffer (pH 7,4) wurden 50 µl einer äthanolischen Metallocen-Lösung (Endkonz. 2.8×10^{-4} mol/l mit ca. 0,01 µCi [^{103}Ru]-Ruthenocen bzw. [^{191}Os]-Osmocen im Ansatz), 100 µl Coenzym-Lösung (Endkonz. 2×10^{-3} mol/l) und 200 µl (entsprechend 200 mg Leber) einer Mikrosomensuspension (CF1 Mäuse ♂) zugesetzt. Nach 30 min Inkubation bei 37 °C wurde mit 0,1 ml 0,1 N NaOH versetzt, das nicht umgesetzte Metallocen mit Cyclohexan extrahiert und die Radioaktivität im Extrakt und im wässrigen Rückstand bestimmt. Von den so bestimmten Werten wurden jeweils die Leerwerte (Inkubation ohne Coenzym bei 0 °C) abgezogen und der Metallocen-Umsatz auf eine Mikrosomen-Menge bezogen, die 1 g Leber entspricht ($n = 2$).

Coenzym	Umsatz			
	Ruthenocen		Osmocen	
	[µmol/g · h]	[%]	[µmol/g · h]	[%]
NADPH	0,57 ± 0,03	100	1,09 ± 0,08	100
NADPH (0 °C)	0,087 ± 0,02	15,3	0,042 ± 0,002	3,9
NADPH (N_2)	0,16 ± 0,01	28,1	0,031 ± 0,003	2,8
NADP	0,011 ± 0,001	1,9	0,36 ± 0,007	33,0
NADH	0,21 ± 0,003	36,8	0,99 ± 0,06	90,8
NAD	0,058 ± 0,002	10,2	0,25 ± 0,02	22,9

samkeit von NADPH spricht für eine Hydroxylierungs-Reaktion mit dem mikrosomalen Cytochrom P₄₅₀-System. Dabei wird Osmocen schneller umgesetzt als Ruthenocen, wie auch der größere V_{\max} -Wert des Osmocens in Abb. 2 zeigt. Der K_M -Wert ist dagegen für die beiden untersuchten Metallocene etwa gleich groß ($1,4 \times 10^{-4}$ mol/l) und liegt in der gleichen Größenordnung wie von Soine [8] für Ferrocen ($0,6 \times 10^{-4}$ mol/l) angegeben.

Freie Hydroxy-Metallocene sind unstabil [8, 9], werden sie aber durch Konjugations-Reaktionen z. B. *in vivo* als Glukuronid abgefangen, kann auch bei Hydroxy-Derivaten die Sandwich-Struktur erhalten bleiben [6–8]. Für mögliche diagnostische Anwendungen dürften sich nach diesen Untersu-

chungen aufgrund ihrer größeren Stabilität eher Osmocen- und Ruthenocen- als Ferrocen-Derivate eignen. Ergebnisse entsprechender Untersuchungen sind an anderer Stelle erschienen [10, 11].

Die Untersuchungen zeigen ferner, daß die aromatischen metallorganischen Verbindungen vom Metallocen-Typ analog zu den klassischen aromatischen Systemen wie Benzol [12] oder Naphthalin [13] vom Organismus metabolisiert werden.

Danksagungen

Wir danken der DFG für finanzielle Unterstützung und Frau Brüggner für experimentelle Mitarbeit.

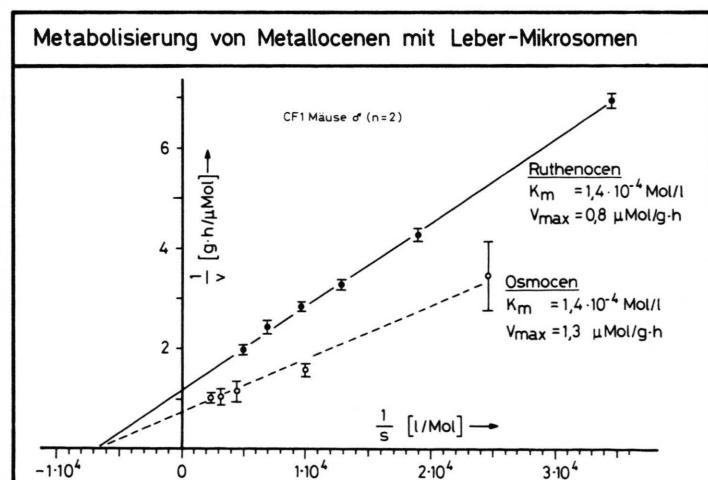


Abb. 2. K_M und V_{\max} für Metallocen-Hydroxylierung. Reaktions-Bedingungen siehe Legende Tab. I. Die Metallocen-Konzentration wurde variiert gemäß den Angaben der Abszisse. Die Reaktionsgeschwindigkeit v entspricht dem Umsatz (in µmol) pro Mikrosomen-Menge von 1 g Leber pro Stunde.

- [1] H. Koepf u. P. Koepf-Maier, Angew. Chem. **91**, 509 (1979).
- [2] M. Wenzel, M. Schneider u. E. Liss, Z. Naturforsch. **34 c**, 670 (1979).
- [3] M. Wenzel, N. Subramanian u. E. Nipper, Naturwissenschaften **63**, 341 (1976).
- [4] M. Wenzel, E. Nipper u. W. Klose, J. Nucl. Med. **18**, 367 (1977).
- [5] M. Wenzel, R. Herken u. W. Klose, Z. Naturforsch. **32 c**, 473 (1977).
- [6] R. Hanzlik u. W. Soine, J. Am. Chem. Soc. **100**, 1290 (1978).
- [7] A. Taylor u. M. Wenzel, Xenobiotica **8**, 107 (1978).
- [8] Dissertation W. H. Soine, Univ. of Kansas (1978).
- [9] A. Nesmeyanow, U. Sazanova u. V. Drozd, Tetrahedron Lett. **17**, 13 (1959).
- [10] A. Taylor, J. Macha u. M. Wenzel, J. Nucl. Med. **21**, 63 (1980).
- [11] M. Wenzel u. K. Hoffmann, Naturwissenschaften **66**, 313 (1979).
- [12] R. Synder, F. Uzuki, L. Gonasun, E. Bromfield u. A. Wells, Toxicol. Appl. Pharmacol. **11**, 346 (1967).
- [13] K. J. Netter, Naunyn-Schmiedeberg's Arch. Pharmak. Exp. Path. **262**, 375 (1969).