

On the Percutaneous Absorption of Tribenoside Applied Topically to the Mouse Ear

Tribenoside, a glucofuranose derivative (ethyl 3,5,6-*tri-O*-benzylglucufuranoside = TBGF = C. 21, 401-Ba¹), is capable of antagonizing the spasmogenic effects of a great variety of biogenous amines, kinins and kinin-forming enzymes *in vitro*² and, when administered orally or intraperitoneally, inhibits the inflammatory response elicited by various irritants such as dextran, endotoxin, turpentine^{2,3}, formaldehyde⁴, cotton⁴ or by antigen-antibody reactions². In a recent study it has also been demonstrated that TBGF applied topically together with an irritant solution containing croton oil suppresses the oedema caused by such an irritant in the mouse ear⁵. This latter, more or less indirect evidence of a percutaneous absorption and activity of TBGF has now been substantiated by the use of C¹⁴- or H³-labelled TBGF. The following is a preliminary account of experiments in which the absorption of TBGF applied to the ear of mice with or without irritant mixture was evaluated quantitatively⁶.

Male albino mice of the same provenance as that used in the previous study⁵ (NMRI, purchased from Ivanovas, with a body weight of 20 ± 1 g) were employed. For several days prior to the experiment they were provided with NAFAG pellets No. 194 and water *ad libitum*. Labelled TBGF was applied in exactly the same way as when it was used to demonstrate the anti-inflammatory action⁵. In most of the experiments described hereafter the absorption of H³-labelled TBGF (formula 1) was investigated; in another set, C¹⁴-labelled TBGF (formula 2) was applied simultaneously with H³-TBGF. Immediately after and at intervals following the topical application of labelled TBGF, the amounts of TBGF remaining on the ear and the concentrations occurring in blood taken from the heart of etherized animals were determined. In yet another set, H³-labelled TBGF was applied topically to the inner side of the mouse ear without the use of the irritant solution in order to study the role played by the irritant in percutaneous absorption of TBGF. Further groups of mice were treated orally or *i.p.* with appropriate doses of H³-TBGF (dissolved in polyethylene glycol 400, 0.2 ml/animal) in an attempt to detect possible differences in the rates of absorption of TBGF applied by the various routes of administration. In each experimental set, groups of at least 5 animals per group were used. Deter-

minations of the radio-active material were made on the ears or blood of treated animals (following combustion under O₂) and the activities calculated in terms of the labelled compound administered. The results obtained so far can be summarized as follows:

(1) Using the same technique as the one employed earlier for the study of the topical anti-inflammatory activity, *i.e.* when TBGF is incorporated in an irritant solvent⁵, from 0.4–2.0 mg of the compound are applied to the ear of a mouse (mean obtained from 3 groups of 5 mice each: 1.0 ± 0.1 mg).

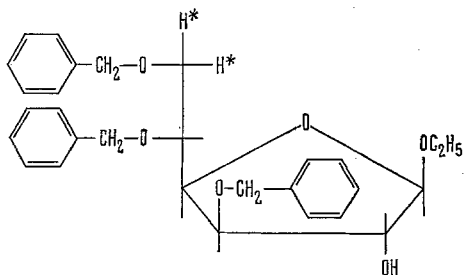
(2) Within the first few hours, only little of the dose applied initially together with the irritant disappears from the ear. After 4 h, from 30.8–58.3% still remain on the ear; thereafter, there is a steady decline, but appreciable amounts are still detectable after 12 and 24 h (see Table). When applied without irritant, TBGF disappears more rapidly from the ear than when applied together with it.

(3) In the heart blood, significant amounts are detectable 1 h following topical administration. There is a net increase until the 12th h post-treatment, and at 24 h the mean blood concentration still exceeds 1 μ g/ml (see Table).

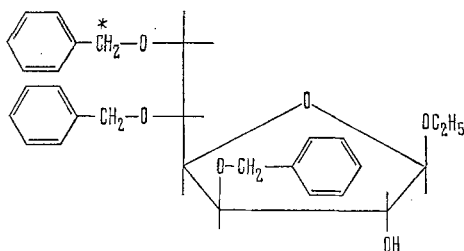
Organ and blood concentration of H³-labelled ethyl-3,5,6-*tri-O*-benzyl-glucufuranoside following topical application to the ear in irritant mixture

Sampling time	Ear (mg/total) ^a Mean $\pm$ S.E.	Mean as % of dose applied	Blood (μ g/ml) ^a Mean $\pm$ S.E.
0 min	1.15 ± 0.25	100.0	0.0
30 min	1.44 ± 0.31	125.2	(0.21 ± 0.21)
1 h	1.09 ± 0.08	94.8	2.00 ± 0.34
2 h	1.10 ± 0.07	95.7	1.08 ± 0.24
3 h	1.18 ± 0.17	102.6	2.39 ± 0.52
4 h	0.68 ± 0.02	58.3	1.95 ± 0.68
6 h	0.73 ± 0.07	63.5	3.08 ± 0.67
12 h	0.32 ± 0.04	27.8	4.02 ± 1.07
24 h	0.13 ± 0.02	11.3	1.15 ± 0.18

^a H³ concentration calculated in terms of unchanged molecule.



Formula 1. H³-Glyvenol-(6-furanose-H³).



Formula 2. C¹⁴-Glyvenol-(6-benzyl-C¹⁴).

(4) When injected *i.p.* or administered by stomach tubing at a dose of 50 mg/kg (*i.e.* a dose roughly equivalent to that administered topically), the blood concentrations detected at varying intervals are about the same for the intraperitoneal as well as the oral route. However, both these routes do not achieve the same sustained blood concentrations as does the epicutaneous administration.

(5) When the ears treated topically with TBGF are 'washed' by 3 successive rinsings in 95% ethanol after having been cut off at varying intervals, a large proportion of the material applied is removed by this procedure. This is taken to indicate that most of the TBGF applied

¹ Glyvenol®.

² R. JAGUES and B. SCHÄR, Schweiz. med. Wschr. 97, 553 (1967).

³ R. JAGUES, G. HUBER, L. NEIPP, A. ROSSI, B. SCHÄR and R. MEIER, Experientia 23, 149 (1967).

⁴ M. DI ROSA, Archs int. Pharmacodyn. Théor. 173, 162 (1968).

⁵ L. RIESTERER and R. JAGUES, Experientia 24, 581 (1968).

⁶ The technical assistance of Miss M. TAUBER is gratefully acknowledged.

remains on the ear surface and in the superficial layers of the skin for several hours.

(6) When TBGF labelled with C^{14} in the 6-benzyl group is applied topically or administered intraperitoneally together with equal amounts of TBGF bearing the H^3 label in the furanose moiety, essentially identical C^{14} and H^3 concentrations can be found in the heart blood taken at intervals of up to 24 h post-treatment.

A detailed description of this work will be published elsewhere.

Zusammenfassung. Mit Hilfe von radioaktiv markierten Präparaten (6-Benzyl- C^{14} bzw. 6-Furanose- H^3) wird gezeigt, dass auf die Haut applizierte Äthyl-3, 5, 6-tri-O-benzylglucofuranosid (Glyvenol®) bei der Maus gut resorbiert wird.

R. JAQUES, H. KEBERLE,
L. RIESTERER and K. SCHMID

Research Laboratories
of the Pharmaceutical Department of Ciba Limited,
4000 Basel 7 (Switzerland), 10 June 1969

Effet de quelques stéroïdes sur l'incorporation de la proline- ^{14}C au niveau de l'os, chez le rat castré

La proline, acide aminé métabolisable, participe à la biosynthèse du collagène¹ après avoir été transformée en hydroxyproline²⁻⁴ et son incorporation revêt une importance toute particulière dans le cas de l'os dont la matrice est presque totalement constituée de collagène (94% environ).

Ce phénomène a fait l'objet de nombreux travaux montrant en particulier l'effet stimulant de certaines hormones stéroïdes androgènes^{5,6} ou oestrogènes⁷⁻¹⁰. La question peut se poser de savoir si cet effet est lié à l'action hormonale de ces stéroïdes ou s'il en est indépendant. C'est pourquoi il nous a paru intéressant d'aborder ce problème en étudiant l'incorporation de proline- ^{14}C dans le fémur de rats castrés, sous l'effet d'une injection préalable soit de stéroïdes anabolisants, soit d'une association dans laquelle l'addition à l'un d'entre eux de stéroïdes modificateurs, supprime l'activité hormonale et potentialise l'activité anabolisante¹¹.

Protocole expérimental. Cette expérimentation est réalisée sur des rats mâles Wistar-Sherman CF, âgés de 7 semaines, pesant 180 à 200 g et répartis en lots de 6 animaux chacun. Les rats subissent une castration puis sont maintenus à un régime normal ad libitum et pesés à intervalles réguliers.

Les stéroïdes étudiés sont: le propionate de testostérone (I), le phénylpropionate (II), le décanoate (III) et l'undécylate (IV) de la nor-19 androstène-4-one-3, et une association (V) contenant par millilitre de solution injectable 80 mg de produit IV, 1,3 mg de propionyl-3 nicotylol-17 β oestradiène-1, 3, 5(10) et 80 mg d'heptyl-17 α pregnène-4-dione-3, 20.

Ces produits sont administrés par voie i.m., en solution huileuse, à des doses correspondant à 4 mg/kg de testostérone pour I et à 6 mg/kg de nor-19-androstène-4-one-3 pour II, III, IV et V. La proline- ^{14}C utilisée provient du C.E.A. (Saclay). Son activité spécifique est de 83 mCi/mM.

Le protocole adopté est le suivant: (1) *Traitement par les stéroïdes.* Les injections sont pratiquées par voie i.m. entre le 1er et le 12^e jour suivant la castration, selon la durée d'action envisagée. (2) *Injection de proline- ^{14}C .* Elle est pratiquée par voie i.p. (50 μ Ci/kg), le 12^e jour suivant la castration¹². Les animaux sont alors maintenus en cages individuelles, sans nourriture, avec eau de boisson ad libitum. (3) *Prélèvements, extractions, mesures.* Les animaux sont sacrifiés par décapitation 17 h après injection de la proline- ^{14}C ¹³. Les fémurs sont prélevés par dissection, débarrassés de tout tissu adhérent puis pesés. L'os est finement haché, décalcifié par traitement à l'EDTA durant 48 h, puis traité selon la méthode décrite par HURYCH et CHVAPIL¹⁴. L'extrait trichloracétique contient le collagène et les acides nucléiques^{15,16}. La fraction insoluble en milieu acide est séparée par centrifugation, lavée à l'alcool puis à l'alcool-éther. La radio-activité de ces deux fractions est mesurée à l'aide d'un flow-counter

(Tracerlab). L'azote protéique est mesuré dans l'extrait trichloracétique par microdosage colorimétrique¹⁷. L'hydroxyproline est dosée selon la méthode de PROCKOP et UDENFRIEND¹⁸.

Résultats. Chez les rats témoins, la proportion de ^{14}C retrouvée au total dans le fémur représente environ 0,25% de la dose radio-active administrée. Exprimée par gramme de tissu frais, la radio-activité de l'extrait trichloracétique est très nettement plus élevée pour l'os que pour d'autres tissus, pourtant riches en collagène, tels la peau, le tendon de la queue ou le foie (Tableau 1). Elle représente plus de 90% de la radio-activité totale de l'os (Figure).

Tableau I. Radioactivité (cpm/g de tissu frais) mesurée après extraction trichloracétique chez des rats témoins castrés 12 jours après injection de proline- ^{14}C

Tissus	cpm/g tissu
Peau	1 394 $\pm$ 196 ^a
Tendon	1 373 $\pm$ 492
Foie	716 $\pm$ 48
Os	10 730 $\pm$ 320

^a Voir note du Tableau III.

¹ G. A. M. FINERMAN, S. DOWNING et L. E. ROSENBERG, Biochim. biophys. Acta 135, 1008 (1967).

² M. R. STETTEN, J. biol. Chem. 181, 31 (1949).

³ N. M. GREEN et D. A. LOWTHER, Biochem. J. 71, 55 (1959).

⁴ B. PETERKOFKY et S. UDENFRIEND, J. biol. Chem. 238, 3966 (1963).

⁵ J. KOWALEWSKI et R. T. MORRISON, Can. J. Biochem. Phys. 35, 771 (1957).

⁶ K. B. WIANCKO et K. KOWALEWSKI, Acta Endocrin. 36, 310 (1961).

⁷ K. Y. T. KAO, W. E. HITT, A. T. BUSH et T. H. MCGAVACK, Proc. Soc. exp. Biol. Med. 117, 86 (1964).

⁸ M. R. URIST, A. M. BUDY et F. C. McLEAN, J. Bone Jt Surg. 32 A, 143 (1950).

⁹ E. W. KELLY, Arch. Path. 74, 550 (1962).

¹⁰ D. H. HENNEMAN et N. J. RARITAN, Endocrinology 83, 678 (1968).

¹¹ E. C. SAVINI, Thérapie 21, 753 (1966).

¹² Délai au bout duquel les taux d'incorporation donnent, chez les animaux témoins, les valeurs les plus homogènes.

¹³ Ce temps, choisi en fonction d'essais préliminaires, correspond à un délai suffisant pour que la fixation de l'acide aminé au niveau de l'os soit indépendante de toute variation de concentration sanguine et donne chez les animaux témoins les valeurs les plus homogènes.

¹⁴ J. HURYCH et M. CHVAPIL, Biochim. biophys. Acta 65, 170 (1962).

¹⁵ S. M. FITCH, M. L. R. HARKNESS et R. D. HARKNESS, Nature 176, 163 (1955).

¹⁶ J. McLENNAN et M. KARASEK, Biochim. biophys. Acta 117, 184 (1966).

¹⁷ R. LECOQ, Manuel d'analyses médicales et de biologie clinique (Editions Doin, Paris 1967), Tome I, p. 303.

¹⁸ D. J. PROCKOP et S. UDENFRIEND, Analyt. Biochem. 7, 228 (1960).