



УДК 576.32/.36:616-006:547.853

## ДОСЛІДЖЕННЯ ВПЛИВУ СПІРОКАРБОНУ ТА ПОХІДНИХ ПІРОЛОПІРИМІДИНДІОНІВ НА ЛЕЙКОЗНІ КЛІТИНИ

*Л. С. Старикович<sup>1</sup>, М. О. Старикович<sup>2</sup>, О. Н. Речицький<sup>3</sup>,  
В. А. Єресько<sup>3</sup>, Т. Ю. Косяк<sup>3</sup>, Н. О. Сибірня<sup>1</sup>*

*<sup>1</sup>Львівський національний університет імені Івана Франка  
вул. Грушевського, 4, Львів 79005, Україна*

*<sup>2</sup>Інститут біології клітини НАН України, вул. Драгоманова, 14–16, Львів 79005, Україна*

*<sup>3</sup>Херсонський державний університет, вул. 40 років Жовтня, 27, Херсон 73002, Україна*

Досліджено вплив спірокарбону та двох похідних піролопіримідиндіонів (1,6-диметил-4-феніл-1,2,3,4,5,7-гексагідропіроло-[3,4-d]-піримідиндіон-2,5(1H) і 1,6-диметил-4-(2-трифлуорометилфеніл)-1,2,3,4,5,7-гексагідропіроло-[3,4-d]-піримідиндіон-2,5(1H) на лейкозні клітини лінії L1210 і СЕМ-Т4 миші та людини, відповідно. Виявлено швидке проникнення спірокарбону в клітини та зниження рівня їхнього виживання, залежне від зростання концентрації усіх досліджуваних речовин. Цитотоксичний ефект спірокарбону супроводжується апоптичною фрагментацією ядерної ДНК у клітинах лінії L1210.

**Ключові слова:** спірокарбон, піролопохідні піримідиндіонів, цитотоксичність, апоптоз, лейкозні клітини, лінія L1210, лінія СЕМ-Т4.

### ВСТУП

У роботі вивчено цитотоксичну дію на лейкозні клітини миші та людини спірокарбону (6,6,6',6'-тетраметил-2,2'-діоксо-4,4'-спіро-бі(гексагідропіримідин) речовина №1, а також двох похідних піролопохідних піримідиндіонів (1,6-диметил-4-феніл-1,2,3,4,5,7-гексагідропіроло-[3,4-d]-піримідиндіон-2,5(1H), речовина № 2 і 1,6-диметил-4-(2-трифлуорометилфеніл)-1,2,3,4,5,7-гексагідропіроло-[3,4-d]-піримідиндіон-2,5(1H), речовина № 3). Усі речовини були синтезовані на кафедрі органічної та біологічної хімії Херсонського державного університету.

Молекула спірокарбону складається з двох гетероциклів, кожен із яких містить два атоми Нітрогену та чотири атоми Карбону, один із яких є спільним для обох циклів (рис. 1). Крім того, кожне кільце містить карбонільний Оксиген та по два метильних замісники. Цикли перебувають у транс-конфігурації відносно спільного атома Карбону у зв'язку зі стеричними перешкодами та взаємним відштовхуванням неподілених пар електронів атомів Нітрогену при спільному атомі Карбону.

Спірокарбон добре розчинний у воді. Молекули похідних піролопіримідиндіонів утворені з двох конденсованих шести- та п'ятичленних нітрогеновмісних гетероциклів із арильними замісниками у положенні 4 (рис. 1). Ці похідні піролопіримідиндіонів розчиняються у воді значно гірше.

У попередніх дослідженнях біологічної дії названих речовин було встановлено низьку токсичність спірокарбону у щурів, в яких його  $LD_{50}$  становить 3 000 мг на кг маси тварин. Він впливає на гіпоталамо-гіпофізарну нейросекреторну систему щурів,

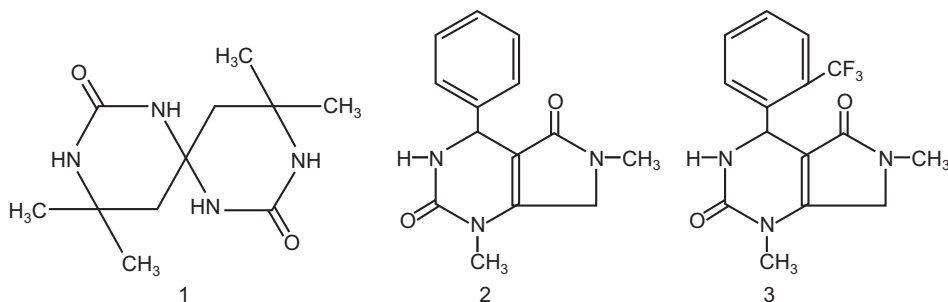


Рис. 1. Структурні формули спірокарбону (№ 1) та похідних піролопіримідиндіонів (№ 2 та № 3)

Fig. 1. Chemical structure of spirocarbone (N1) and pyrolopyrimidine derivatives (N2 and N3)

на ріст, розвиток і продуктивність курей, а також рослин [1, 3, 6]. У той же час речовини № 2 та № 3 виявляли досить високу гемокоагулюючу дію [2]. Встановлено неоднозначний вплив спірокарбону на активність ферментів антиоксидантного захисту, фізико-хімічні характеристики гемоглобіну та резистентність еритроцитів щура і людини до кислотного гемолітика в нормі та за алкогольної інтоксикації *in vitro* [4, 5].

У даній роботі продовжено вивчення механізмів біологічної дії синтезованих речовин, зокрема досліджено їхній вплив на виживання лейкозних клітин лінії L1210 і СЕМ-Т4 миші та людини, відповідно.

## МАТЕРІАЛИ І МЕТОДИ ДОСЛІДЖЕНЬ

Досліди проводили із використанням клітин лінії L1210 (лейкозні В-лімфоцити миші) та лінії СЕМ-Т4 (лейкозні Т-лімфоцити людини), одержаних із колекції Інституту експериментальної патології, онкології та радіології імені Р.Є. Кавецького НАН України (Київ). Клітини вирощували у  $CO_2$ -інкубаторі (Jouan IG 150, США) при  $37^\circ C$ , концентрація  $CO_2$  становила 5%, відносна вологість 100%. Культивування клітин здійснювали у середовищі RPMI 1640 (Sigma, США) із додаванням 10% сироватки крові ембріонів великої рогатої худоби (Sigma, США) та  $50 \text{ мкг} \times \text{мл}^{-1}$  гентаміцину (Sigma, США) до досягнення клітинами субконфлюентного стану. У досліджах використовували  $2 \times 10^5 \times \text{клітин} \times \text{мл}^{-1}$ , які вносили у 96-лункові пластикові планшети для культивування (Greiner Bio-One Cellstar, США). Після 2-годинної інкубації в лунки зі суспензією клітин додавали препарати тестованих речовин, розчинені у забуференому фізіологічному розчині (ЗФР), після чого досліджували їхню дію впродовж 1–24 годин.

Аналіз люмінесценції препаратів № 1, № 2 та № 3 та їхньої проникності у досліджувані клітини проводили за допомогою мікроскопа МИКМЕД-2 (ЛОМО, Росія) у діапазонах збудження 360–440 нм і 530–570 нм та емісії свічення при 480–700 нм

і 600–700 нм, відповідно. Фотографії отримували цифровою камерою Canon A460 зі світлового мікроскопа (500-кратне збільшення).

Рівень виживання клітин оцінювали, використовуючи тест із MTS (метатетразолієвий синій, Sigma, США). Індекс цитотоксичності (IC) визначали за формулою:

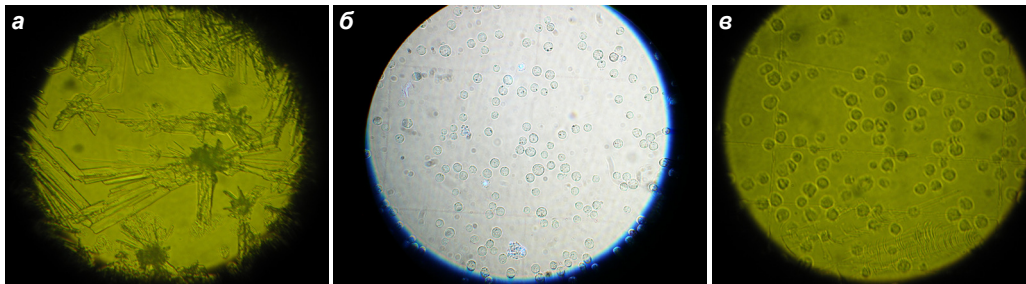
$$IC = \frac{\% \text{ живих клітин у контролі}}{\% \text{ живих клітин у досліді}},$$

де контроль – клітини, які інкубували у ЗФР [7]. Апоптичну фрагментацію ДНК під впливом досліджуваних речовин виявляли за допомогою електрофорезу в гелі агарози (Lachema, Чехія), як описано Gong J., et al. [8].

Статистичне опрацювання даних здійснювали, використовуючи програму Gel-Pro 3.1 та OriginPro 7.0. Достовірність показників оцінювали за *t*-критерієм Стьюдента.

## РЕЗУЛЬТАТИ ДОСЛІДЖЕННЯ ТА ЇХНЄ ОБГОВОРЕННЯ

Встановлено, що під час інкубування клітин із 0,1% (кінцева концентрація) спірокарбонм він кристалізується з утворенням прямокутних призмоподібних кристалів, які флуоресцюють у зеленій ділянці спектра (рис. 2, а). За інкубації клітин лінії L1210 з цією речовиною вже протягом однієї години спостерігали її проникнення в клітини (рис. 2, в). За цих умов клітини флуоресцюють не лише у зеленій, але й у червоній ділянці спектру, що може свідчити про певні зміни фізико-хімічних властивостей плазматичної мембрани, зокрема її ущільнення. Отже, спірокарбон проникає у клітини і швидко накопичується в них, впливаючи при цьому на клітинну мембрану, ймовірно, утворюючи комплекси з макромолекулами клітин. Що стосується речовин № 2 та № 3, то за даних експериментальних умов вони меншою мірою нагромаджуються у клітинах.



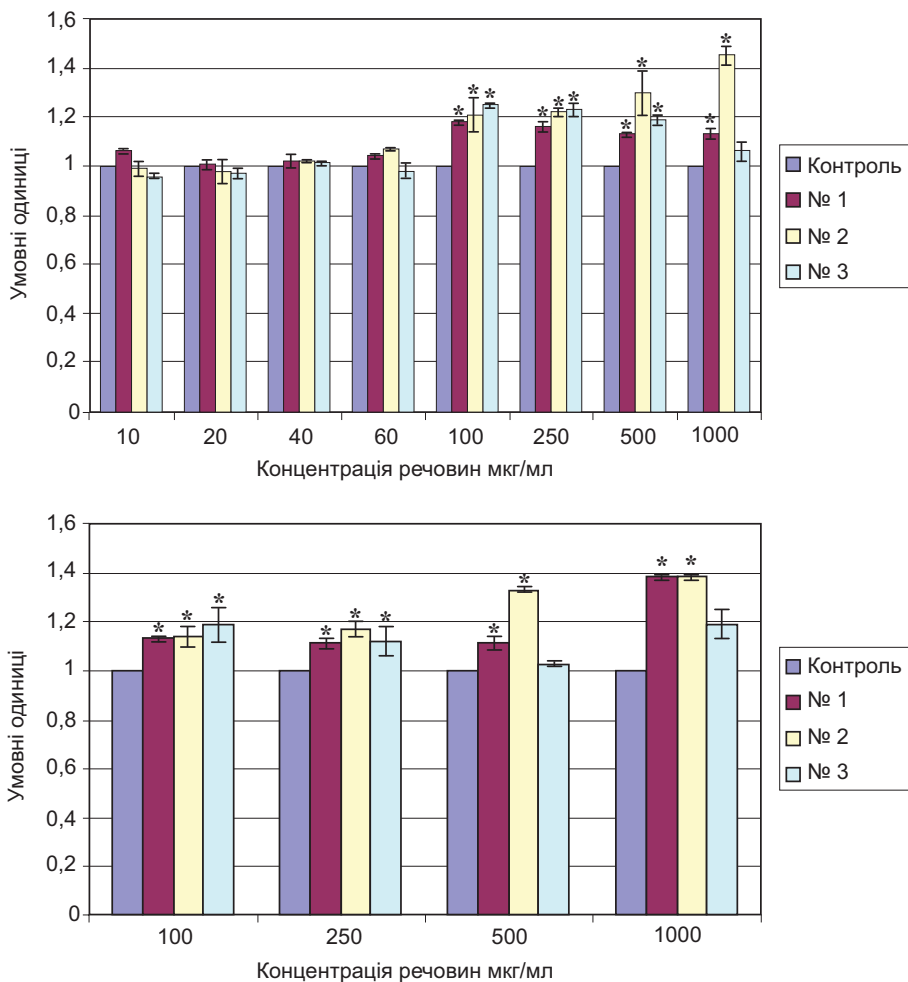
**Рис. 2.** Фотографії кристалів спірокарбону у видимій частині спектра (а), емісія клітин лінії L1210 у контролі (б) та клітин, інкубованих із спірокарбонм (в) у світловому мікроскопі (500 × збільшення, цифрова камера Canon A460)

**Fig. 2.** Crystals of spirocarbone in the visible part of spectrum (a), cell emission (line L1210) control (b) and after their incubation with spirocarbone (v) under the light microscope (× 500, digital camera Canon A460)

За дії різних концентрацій досліджуваних сполук достовірно зростання індексу цитотоксичності (IC) у клітин лінії SEM-T4 протягом 24 год їхньої інкубації спостерігається лише за концентрацій, що перевищують 100 мкг×мл<sup>-1</sup>. За концентрації 1000 мкг×мл<sup>-1</sup> найбільш виражену цитотоксичну дію має речовина № 2. У той же

час речовина № 3 за концентрації 500 і 1000 мкг×мл<sup>-1</sup> має знижену порівняно з контролем цитотоксичну дію (рис. 3), очевидно, внаслідок нижчої розчинності цього трифлуор-похідного піролопіримідиндіону.

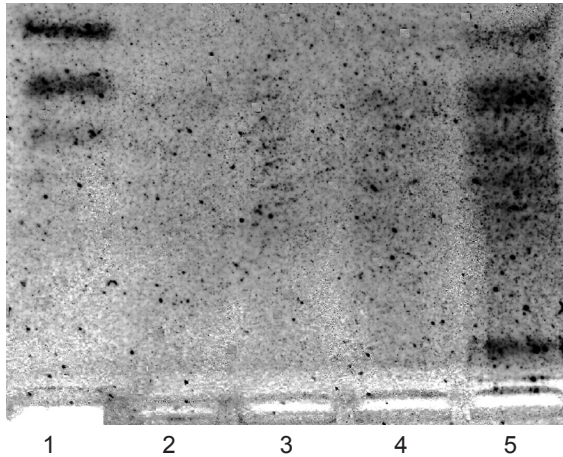
Подібну залежність виявлено за дії згаданих речовин на клітини лінії L1210. Отже, спірокарбон і обидва похідних піролопіримідиндіонів у концентраціях 100–1000 мкг×мл<sup>-1</sup> виявляють хоч і невеликий, але статистично достовірний цитотоксичний ефект у цих клітинах.



**Рис. 3.** Індекс цитотоксичності (умовні одиниці) за дії різних концентрацій речовин № 1, № 2 та № 3 на лейкозні клітини ліній CEM-T4 (1) та L1210 (2) (використання тесту з MTS); \* – різниця порівняно з контролем достовірна  $p < 0,05$

**Fig. 3.** Indices of cytotoxicity (r.u.) at different concentrations of substances N1, N2 and N3 acting towards cultured CEM-T4 (1) and L1210 (2) cells studied by MTS-test; \* –  $p < 0.05$ , comparing with the control

Щоб з'ясувати можливий механізм цитотоксичної дії тестованих речовин, було проведено електрофорез у гелі агарози ДНК клітин лінії L1210 після їхнього 2-годинного інкубування зі сполуками № 1, № 2 та № 3 (рис. 4). Виявлено виразну



**Рис. 4.** Електрофорез ДНК клітин лінії L1210 в гелі агарози (концентрація досліджуваних речовин у всіх варіантах  $100 \text{ мкг} \times \text{мл}^{-1}$ ), після двогодинної інкубації клітин із цими речовинами: 1. доксорубіцин; 2. ЗФР (забуферений фосфатний розчин); 3. № 2; 4. № 3; 5. № 1

**Fig. 4.** DNA electrophoresis in agarose gel (cells of L1210 line, concentration of chemicals in all variants  $100 \text{ } \mu\text{g} \times \text{ml}^{-1}$ ) after 2-hour incubation with the studied chemicals: 1. doxorubicine; 2. PBS; 3. N2; 4. N3; 5. N1

фрагментацію ДНК лише у випадку дії на клітини спірокарбону, тоді як речовини № 2 та № 3 не мали такої дії. Отже, зміна проліферативної здатності лімфоцитів за присутності досліджуваних речовин може бути пов'язана з їхнім впливом на різні ланки регулювання клітинних процесів, причому лише спірокарбон, ймовірно, призводить до ініціювання апоптозу та руйнування ядерної ДНК.

1. Ересько В. А., Голик Г. А., Евтушенко В. П. **Регулятор роста растений**. Автор. свидет. 1628255, опуб. 15.10.1990.
2. Ересько В. А., Речицкий А. Н., Бойко Р. Т. и др. **Синтез и фармакологические свойства 1,6,-замещенных-4-арил-2,3,4,5,6,7-гексагидро(1H)пирроло-[3,4-d]-пиримидиндионов-2,5**. Физиологически актив. вещества, 1995; 26: 27–30.
3. Кошелева В. Д., Бойко Р. Т., Ересько В. А. **Влияние спирокарбона на гипоталамо-гипофизарную нейросекреторную систему (ГГНС) растущих животных**. Матер. всеукр. науч.-практ. конф. Херсон; 1994: 103.
4. Речицкий О. Н., Ересько В. А., Дудок К. П., Сибірна Н. О. Дослідження впливу „спірокарбону” на структурно-функціональний стан еритроцитарних мембран периферичної крові здорових людей та хворих на алкоголізм. В кн.: **Теорія і практика сучасного природознавства**. Матер. III Всеукр. наук.-практ. конф., присв. 90-річчю утворення Херсон. держ. ун-ту. Херсон; 2007: 47–52.
5. Старикович Л. С., Дудок К. П., Речицкий О. Н. та ін. Дослідження впливу спірокарбону на біохімічні та фізико-хімічні характеристики еритроцитів щурів в нормі та за алкогольної інтоксикації. **Мед. хімія**, 2009; 11 (1): 58–62.
6. Трибрат Т. П., Ересько В. А. **Влияние биологически активных веществ на рост и яичную продуктивность птицы кросса «Хайсекс браун»**. Матер. Всеук. науч.-практ. конф. Сб. тез. Херсон; 1994: 101.
7. Фильченков А. А. **Современные технологии количественной оценки апоптоза и их применение в экспериментальной и клинической онкологии**. В кн.: **Семинары по гематологии**. (11); Киев: ДИА, 2003. 76 с.
8. Gong J., Traganos F., Darzynkiewicz Z. A selective procedure for DNA Extraction from apoptotic cells applicable for gel electrophoresis and flow cytometry. **Anal. Biochem**, 1994; 218: 314–319.

## INFLUENCE OF SPIROCARBONE AND DERIVATES OF PYRROLO PYRIMIDINEDIONES ON SURVIVAL OF LEUKEMIA CELLS

**L. S. Starykovych<sup>1</sup>, M. O. Starykovych<sup>2</sup>, A. N. Rechytskyi<sup>3</sup>,  
V. A. Yeresko<sup>3</sup>, T. U. Kosyak<sup>3</sup>, N. O. Sybirna<sup>1</sup>**

<sup>1</sup>Ivan Franko National University of Lviv, 4, Hrushevskiy St., Lviv 79005, Ukraine

<sup>2</sup>Institute of Cell Biology, NAS of Ukraine, 14–16, Drahomanov St., Lviv 79005, Ukraine

<sup>3</sup>State University of Kherson, 27, 40 rokiv Zhovtnia St., Kherson 73002, Ukraine

Influence of spirocarbone and derivatives of pyrrolopyrimidinediones (1,6-dimethyl-4-phenyl-1,2,3,4,5,7-hexahydropyrrolo-[3,4-d]-pyrimidinione-2,5(1H), and 1,6-dimethyl-4-(2-threefluoromethylphenyl)-1,2,3,4,5,7-hexahydropyrrolo-[3,4-d]-pyrimidinedione-2,5(1H)) on the leukemia cells of L1210 and CEM-T4 lines of mouse and human, respectively was studied. Cytotoxic effect of spirocarbone towards L1210 cells accompanied by apoptotic fragmentation of nuclear DNA.

**Key words:** spirocarbone, pyrrolopyrimidine, cytotoxic activity, apoptosis, leukemia cells, L1210, CEM-T4 lines.

## ИССЛЕДОВАНИЕ ВЛИЯНИЯ СПИРОКАРБОНА И ПРОИЗВОДНЫХ ПИРРОЛОПИРИМИДИНОНОВ НА ЛЕЙКОЗНЫЕ КЛЕТКИ

**Л. С. Старикович<sup>1</sup>, М. А. Старикович<sup>2</sup>, А. Н. Речицкий<sup>3</sup>,  
В. А. Єресько<sup>3</sup>, Т. Ю. Косяк<sup>3</sup>, Н. А. Сибирная<sup>1</sup>**

<sup>1</sup>Львовский национальный университет имени Ивана Франко  
ул. Грушевского, 4, Львов 79005, Украина

<sup>2</sup>Институт биологии клетки НАН Украины, ул. Драгоманова, 14–16, Львов 79005, Украина

<sup>3</sup>Херсонский государственный университет  
ул. 40-летия Октября, 27, Херсон 73002, Украина

Исследовано влияние спирокарбона и двух производных пирролопиримидинонов (1,6-диметил-4-фенил-1,2,3,4,5,7-гексагидропирроло-[3,4-d]-пиримидиндион-2,5(1H) и 1,6-диметил-4-(2-трифлуорометилфенил)-1,2,3,4,5,7-гексагидропирроло-[3,4-d]-пиримидиндион-2,5(1H)) на лейкозные клетки линий L1210 и CEM-T4 мыши и человека, соответственно. Установлено быстрое проникновение спирокарбона в клетки и снижение уровня их выживания, зависящее от повышения концентрации всех исследуемых веществ. Цитотоксический эффект спирокарбона сопровождается апоптической фрагментацией ядерной ДНК в клетках линии L1210.

**Ключевые слова:** спирокарбон, пирролопроизводные пиримидинонов, цитотоксичность, апоптоз, лейкозные клетки, линия L1210, линия CEM-T4.

Одержано: 30.03.2009