

МИКРОЯДЕРНАЯ И ПРОТИВООПУХОЛЕВАЯ АКТИВНОСТЬ ДВУХ НОВОСИНТЕЗИРОВАННЫХ ПРОИЗВОДНЫХ ПИРИМИДИНА

© А. К. Нерсисян,^{1*} Р. Е. Мурадян,² Ф. Г. Арсенян²

¹ Национальный онкологический центр МЗ Республики Армения и

² Институт тонкой органической химии НАН Республики Армения, Ереван;

¹ электронный адрес: armen.nersesyan@meduniwien.ac.at; armenn@freenet.am

Изучали микроядерную и противоопухолевую активность двух новосинтезированных соединений — иодидов пиразоло[1,5а]пиримидина — на мышах. Показали, что оба соединения малотоксичны и не обладают противоопухолевой активностью на модели асцитного рака Эрлиха. Только одно из них обладало слабой микроядерной активностью. Однако оба соединения усиливали как микроядерный, так и противоопухолевый эффект циклофосфана.

Ключевые слова: иодиды пиразоло[1,5а]пиримидина, мыши, микроядра, асцитная карцинома Эрлиха, противоопухолевая активность, циклофосфан.

Пиримидиновое кольцо имеется в структуре ряда противоопухолевых препаратов (антиметаболитов — цитозинарабинозида, флударабина, кладрибина и кселода; алкилатов — допана и блеомицина (Oncology, Prescribing Guide, 2001)). Широко используемый в клинической онкологии для лечения опухолей головного мозга темодар (темозолomid) является алкилирующим агентом, содержащим сопряженный атом азота в химической структуре. Аналогичным свойством обладает дакарбазин — препарат для лечения злокачественной меланомы и болезни Ходжкина (Oncology Prescribing Guide, 2001). Поэтому вполне логично предположить, что соединения, имеющие в химической структуре пиримидиновое кольцо и сопряженный атом азота, могут обладать выраженными противоопухолевыми свойствами. Данагулян и коллеги (Danagulyan et al., 2005) синтезировали целый ряд таких соединений.

Целью настоящей работы была оценка микроядерной и противоопухолевой активности двух таких соединений (иодидов), содержащих пиримидиновое кольцо и сопряженный атом азота, — DGB-100 (иодид 4,5,7-триметил-2-фенил пиразоло[1,5а]пиримидина) и DGS-618 (иодид 2,4,5-триметил-7-амино-пиразоло[1,5а]пиримидина).

Материал и методика

Соединения, содержащие пиримидиновое кольцо и сопряженный атом азота (иодиды), были синтезированы Данагуляном и соавторами (Danagulyan et al., 2005). Химические структуры их представлены на рисунке. Все реактивы, использованные в экспериментах, были от фирмы Sigma-Aldrich (Германия). Эксперименты проводили на белых мышах-самцах Swiss (средняя масса 25 г), полученных из вивария Института тонкой органической хи-

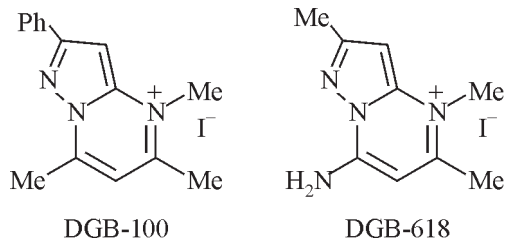
мии НАН Республики Армения (Ереван). Острую токсичность соединений (ЛД₁₀₀ — летальная доза, ЛД₅₀ — половина летальной дозы) и максимальную толерантную дозу в крахмальном клейстере (0.3 мл) определяли по рутинному методу. Всего в данном эксперименте было использовано 48 мышей.

Микроядерную (МЯ) активность соединений оценивали по описанному методу (Kirkhart, 1981) и протоколу CSGMT/JEMS.MMS (1990), который отличается от рутинного протокола тем, что тестируемое соединение вводится внутрибрюшинно дважды с промежутком в 24 ч и препараты костного мозга приготавливаются через 1 сут после последнего введения соединения. Протокол регистрирует МЯ-активность изучаемых соединений с высокой чувствительностью. Другим его преимуществом является отсутствие необходимости изучения МЯ-активности в разные временные интервалы (24, 48 и 72 ч). В качестве негативного контроля использовали растворитель соединений (0.3 мл), а положительным контролем служил циклофосфан (ЦФ). Оба вводили мышам внутрибрюшинно (30 мг/кг).

Так как в литературе имеются данные о том, что дериваты пиримидина могут влиять на активность репарации ДНК, существенно снижая ее (Castro Kreder et al., 2004; Valovicova, Gabelova, 2004), мы исследовали сочетанное действие ЦФ с DGB-100 или DGS-618. Через 1 ч после однократного внутрибрюшинного введения ЦФ (30 мг/кг) мышам вводили исследуемые соединения в дозах, эквивалентных 1/2 от ЛД₅₀. Всего в данном эксперименте было использовано 55 мышей (по 5 в каждой группе).

Мышей забивали дислокацией шейных позвонков через 24 ч после введения соединений. Приготовление препаратов костного мозга и их окраска для микроскопического анализа не отличались от описанных нами ранее (Nersesyan, Muradyan, 2004; Nersesyan et al., 2006). От каж-

* Проф. А. К. Нерсисян. Адрес в настоящее время: Группа по изучению экологической токсикологии, Институт онкологии, Медицинский университет г. Вены, ул. Боршкегассе 8А, А-1090, Вена, Австрия. Факс: +431 4277 9651; Тел.: +431 4277 65146



Химические структуры производных пиридина: DGB-100 ($C_{15}H_{16}IN_3$, мол. масса 365.31) и DGS-618 ($C_9H_{13}IN_4$, мол. масса 304.13).

дого животного изучали по 2000 полихроматофильных эритроцитов (ПХЭ). Подсчитывали также долю ПХЭ среди эритроцитов.

Противоопухолевую активность соединений тестировали на модели асцитной карциномы Эрлиха (АКЭ), которая широко используется в экспериментальной химиотерапии опухолей и фармакологических исследованиях (Marzano et al., 2004; Rathinasami et al., 2006; Junior et al., 2007). Мышам внутрибрюшинно вводили по $2 \cdot 10^6$ опухолевых клеток. Тестируемые соединения вводили через 1 сут после инокуляции опухолевых клеток в дозах, эквивалентных 1/2 от максимально толерантной дозы (МТД), в течение 6 сут. Противоопухолевую активность оценивали по средней продолжительности жизни (СПЖ) мышей. Активными считали соединения, удлиняющие жизнь мышам более чем на 25 % по сравнению с контрольными животными (Marzano et al., 2004). В эксперименте по изучению влияния сочетанного действия ЦФ и двух соединений на противоопухолевое действие мышам с АКЭ вводили ЦФ (30 мг/кг), а через 1 ч — DGB-100 или DGS-618 в дозах, эквивалентных 1/2 от МТД, в течение 6 сут. Часть мышей забивали через 1 сут после конечного введения соединений и ЦФ и определяли индекс торможения опухолевого роста по объему асцитной жидкости, число МЯ в клетках АКЭ и количество живых опухолевых клеток по окрашиванию трипановым синим. В другой группе мышей изучали СПЖ. Всего в данном эксперименте было использовано 88 мышей (по 10 в каждой группе в первом эксперименте, по 6 во втором и по 5 в третьем).

Статистическую обработку полученных результатов проводили с применением U-теста Манна—Уитни (GraphPad Prism, version 3.02).

Результаты и обсуждение

Показатели острой токсичности изучаемых соединений представлены в табл. 1. Оба соединения обладают практически равной острой токсичностью и относятся к малотоксичным веществам, так как их ЛД₅₀ находится между 101 и 1000 мг/кг (Изомеров и др., 1977).

Таблица 1

Показатели острой токсичности соединений

Соединение	Доза, мг на 1 кг массы животного		
	ЛД ₁₀₀	ЛД ₅₀	максимальная толерантная
DGB-100	160	85	45
DGB-618	150	75	35

Таблица 2

Активность соединений в тесте на микроядра (МЯ) в клетках костного мозга мышей

Введенное мышам соединение	Доза, мг/кг	Доля ПХЭ ^а с МЯ, %	Доля ПХЭ ^а , %
DGB-100	42.5	2.6 ± 0.5	52.2 ± 1.2
	17.0	2.0 ± 0.5	52.8 ± 1.1
	8.5	2.0 ± 0.5	54.5 ± 0.9
DGS-618	37.5	9.2 ± 0.8 ^б	53.4 ± 0.9
	15.0	2.4 ± 0.8	50.8 ± 1.1
	7.5	1.8 ± 0.4	53.4 ± 1.3
Негативный контроль	—	1.6 ± 0.3	55.2 ± 1.2
ЦФ	30.0	36.0 ± 4.8 ^а	51.6 ± 1.2

^а ПХЭ — полихроматофильные эритроциты. ^б $P < 0.01$ по сравнению с негативным контролем (тест Манна—Уитни). Здесь и в табл. 3—5 ЦФ — циклофосфан.

Таблица 3

Сочетанное влияние ЦФ и новосинтезированных соединений на индукцию МЯ в клетках костного мозга мышей

Введенные мышам соединения	Доза, мг/кг	Доля ПХЭ с МЯ, %	Число МЯ на 1000 клеток	Доля ПХЭ, %
ЦФ + DGB-100	30.0 + 22.5	26.2 ± 1.3 ^а	27.4 ± 1.4 ^а	49.8 ± 1.2
ЦФ + DGS-618	30.0 + 17.5	32.8 ± 1.5 ^а	34.8 ± 1.6 ^а	48.4 ± 0.9
ЦФ	30.0	22.0 ± 1.2	22.0 ± 1.2	52.6 ± 1.0

^а $P < 0.05$ по сравнению с негативным контролем (тест Манна—Уитни).

Результаты экспериментов по изучению МЯ-активности соединений представлены в табл. 2. Только соединение DGS-618 в дозе, эквивалентной 1/2 от ЛД₅₀ (37.5 мг/кг), индуцировало возрастание в 5.8 раза уровня ПХЭ с МЯ по сравнению с негативным контролем. Во всех остальных случаях соединения не показали активности в данном тесте. ЦФ индуцировал 22-кратное возрастание числа

Таблица 4

Средняя продолжительность жизни (СПЖ) мышей с асцитной карциномой Эрлиха

Введенные мышам соединения	Дозы, мг/кг, и количество введений	СПЖ, сут	Удлинение СПЖ, %
ЦФ + DGB-100	(30.0 + 22.5) × 6	29.2 ± 1.2 ^{а, б}	90.8 ^а 30.9 ^б
ЦФ + DGS-618	(30.0 + 17.5) × 6	36.3 ± 1.5 ^{а, б}	137.2 ^а 62.8 ^б
ЦФ	30 × 6	22.3 ± 1.8 ^а	45.8 ^а
Негативный контроль	—	15.3 ± 1.1	—

^а $P < 0.05$ по сравнению с негативным контролем. ^б $P < 0.05$ по сравнению с позитивным контролем (тест Манна—Уитни).

Таблица 5

**Сочетанное влияние ЦФ и новосинтезированных соединений
на индукцию МЯ в клетках асцитной карциномы Эрлиха,
объем асцитной жидкости и число живых опухолевых клеток**

Введенные мышам соединения	Доза, мг/кг	Доля опухолевых клеток с МЯ, %	Число МЯ на 1000 клеток	Объем асцитной жидкости, мл	Общее число живых клеток АКЭ, $\times 10^7$
ЦФ + DGB-100	30.0 + 22.5	$38.2 \pm 1.6^{a, б}$	$42.2 \pm 1.8^{a, б}$	$1.4 \pm 0.6^{a, б}$	$11.4 \pm 1.1^{a, б}$
ЦФ + DGS-618	30.0 + 17.5	$49.8 \pm 1.5^{a, б}$	$54.8 \pm 2.1^{a, б}$	$0.8 \pm 0.3^{a, б}$	$6.6 \pm 0.9^{a, б}$
ЦФ	30.0	32.0 ± 1.6^a	35.4 ± 1.8^a	1.8 ± 0.8^a	20.4 ± 2.4^a
Негативный контроль	—	8.2 ± 0.3	9.6 ± 1.1	3.4 ± 1.4	86.8 ± 3.6

^a $P < 0.05$ по сравнению с негативным контролем. ^б $P < 0.05$ по сравнению с позитивным контролем (тест Манна—Уитни).

ПХЭ с МЯ, что сопоставимо с литературными и нашими собственными данными (Nersesyan, Muradyan, 2004; Lakshmi et al., 2005; Jagetia, Rao, 2006). Из этого следует, что DGS-618 является крайне слабым индуктором МЯ *in vivo*, так как ЦФ в дозе, эквивалентной 1/10 от ЛД₅₀, при однократном введении индуцировал почти в 4 раза больше ПХЭ с МЯ, чем DGS-618 в дозе, эквивалентной 1/2 от ЛД₅₀, при двукратном введении.

Оба соединения абсолютно не обладали противоопухолевой активностью (не было удлинения СПЖ; данные не представлены). СПЖ контрольных животных была 14.4 сут, что совпадает с литературными данными (Magzano et al., 2004; Lakshmi et al., 2005).

Данные о влиянии ЦФ (в суммарной дозе 180 мг/кг) на продолжительность жизни мышей с АКЭ сходно с данными других исследователей (Lakshmi et al., 2005). Сочетанное действие ЦФ и исследуемых соединений (DGB-100 или DGS-618) приводило к достоверному усилению цитогенетического действия ЦФ на 19 и 49 % соответственно (табл. 3).

СПЖ мышей с АКЭ при сочетанном действии ЦФ и DGB-100 или DGS-618 удлинилась на 91 и 137 % соответственно по сравнению с негативным контролем (табл. 4), а по сравнению с положительным контролем (только ЦФ) продолжительность жизни мышей удлинилась на 31 и 63 % соответственно.

Торможение опухолевого роста, рассчитанное по объему асцитной жидкости при действии ЦФ, составляло 47 %, а при сочетанном действии ЦФ с DGB-100 или DGS-618 — 52.9 и 76.4 % соответственно (табл. 5). При этом число опухолевых клеток с МЯ увеличилось при сочетанном действии ЦФ с DGB-100 или DGS-618 по сравнению с действием ЦФ в 1.2 и 1.6 раза соответственно. Интересно отметить, что наблюдается прямая зависимость между возрастанием числа опухолевых клеток с МЯ, общего числа МЯ и удлинением СПЖ и обратная зависимость с количеством живых клеток АКЭ (табл. 5). Это показывает, что изучаемые соединения влияют как на цитогенетический, так и на противоопухолевый эффект ЦФ. Аналогичные данные (усиление цитогенетического действия цитостатиков, приводящее и к усилению противоопухолевого эффекта, и к снижению количества живых опухолевых клеток) были получены и другими исследователями (Quintana et al., 1994; Papageorgiou et al., 1999).

Точный механизм полученного нами эффекта неизвестен, так как соединения исследуются впервые. Однако

исходя из литературных данных о торможении репарации ДНК производными пиримидина можно предположить, что и в данном случае они ингибируют репарацию ДНК, поврежденной действием ЦФ (Castro Kreder et al., 2004; Valovicova, Gabelova, 2004).

Интересно отметить, что в соединении DGB-100 по сравнению с DGS-618 метильная группа заменена на фенольную в положении 2, метильная группа в положении 7 заменена на аминную. Однако эти замены химических групп в структуре молекул не повлияли на показатели токсичности и противоопухолевой активности, но несколько повлияли на МЯ-активность. В частности, соединение DGS-618 обладает очень слабой МЯ-активностью в дозе, эквивалентной 1/2 от ЛД₅₀. Это же соединение сильнее влияет на противоопухолевую активность и индукцию МЯ противоопухолевого аппарата ЦФ.

Итак, результаты данного исследования показали, что соединения DGB-100 и DGS-618 малотоксичны, практически не обладают МЯ-активностью и абсолютно не обладают противоопухолевой активностью. Мы предполагаем, что наличие иода в структуре пиразоло-пиримидинов приводит к снижению противоопухолевой и мутагенной активности. Недавно было показано, что соединение DGS-658, сходное по химической структуре, но без молекулы иода, обладает довольно высокой противоопухолевой активностью и удлиняет СПЖ мышей с АКЭ на 35 % (Nersesyan et al., 2006). Однако в то же время соединения обладают способностью усиливать МЯ и противоопухолевые эффекты ЦФ.

Авторы благодарны Г. Г. Данагуляну за синтез и предоставление соединений для исследования.

Данное исследование выполнено частично благодаря финансовой поддержке Американского фонда гражданских исследований и развития (US Civilian Research & Development Foundation, US CRDF, # ARB2-2640-YE-05).

Список литературы

- Измеров Н. Ф., Саноцкий И. В., Сидоров К. К. 1977. Параметры токсикометрии промышленных ядов при однократном воздействии. М.: Медицина. 256 с.
- Castro Kreder N., Van Bree C., Franken N. A., Haveman J. 2004. Effects of gemcitabine on cell survival and chromosome aberrations after pulsed low dose-rate irradiation. J. Radiat. Res. (Tokyo). 45 : 111—118.

- CSGMT/JEMS.MMS. 1990. Single versus multiple dosing in the micronucleus test: the summary of the fourth collaborative study by CSGMT/JEMS.MMS. Collaborative study group for the micronucleus test, the mammalian mutagenesis study group of the Environmental mutagen society. Japan (CSGMT/JEMS.MMS). *Mutat. Res.* 234 : 205—222.
- Danagulyan G. G., Boyakhchyan A. P., Sahakyan L. G., Danagulyan A. G. 2005. Proceedings of the International conference on heterocyclic compounds devoted to the 90th anniversary of A. N. Kost. Moscow. 157—158.
- Jagetia G. C., Rao S. K. 2006. Evaluation of the antineoplastic activity of guduchi (*Tinospora cordifolia*) in Ehrlich ascites carcinoma bearing mice. *Biol. Pharm. Bull.* 29 : 460—466.
- Junior A. D., Mota L. G., Nunan E. A., Wainstein A. J., Wainstein A. P., Leal A. S., Cardoso V. N., De Oliveria M. C. 2007. Tissue distribution evaluation of stealth Ph-sensitive liposomal cisplatin versus free cisplatin in Ehrlich tumor-bearing mice. *Life Sci.* 80 : 659—664.
- Kirkhart B. 1981. Micronucleus test on 21 compounds. In: Evaluation of short-term tests for carcinogenesis. Geneva: Univ. Press. 1 : 698—704.
- Lakshmi C., Deb C., Ray C., Ray M. R. 2005. Reduction of hematotoxicity and augmentation of antitumor efficacy of cyclophosphamide by dopamine. *Neoplasma.* 52 : 68—73.
- Marzano C., Bettio F., Baccichetti F., Trevisan A., Giovagnini L., Fregona D. 2004. Antitumor activity of a new platinum (II) complex with low nephrotoxicity and genotoxicity. *Chem. Biol. Interact.* 148 : 37—48.
- Nersesyan A., Muradyan R. 2004. Sea-buckthorn juice protects mice against genotoxic action of cisplatin. *Exp. Oncol.* 26 : 153—155.
- Nersesyan A., Muradyan R., Arsenyan F., Danagulyan G. 2006. Micronucleus-inducing and antitumor activity of three newly synthesized bridged nitrogen atom-containing pyrimidines. *J. BUON.* 11 : 329—334.
- Oncology Prescribing Guide.* 2001. Glaxo Smith Kline. Tallahassee, FL, USA. 398 p.
- Papageorgiou A., Nikolaropoulos S. S., Arsenou E. S., Karaberis E., Mourelatos D., Kotsis A., Chrysogelou E. 1999. Enhanced cytogenetic and antineoplastic effects by the combined action of two ester steroid derivatives of nitrogen mustards. *Chemotherapy.* 45 : 61—67.
- Quintana E., Pertusa J., Gonzalez R., Renau-Piqueras J. 1994. Carboplatin treatment induces dose-dependent increases in the frequency of micronuclei in Ehrlich ascites tumor cells. *Mutat. Res.* 322 : 55—60.
- Rathinasamy S., Karki S. S., Bhattacharya S., Manikandan L., Prabakaran S. G., Gupta M., Mazumder U. K. 2006. Synthesis and anticancer activity of certain mononuclear Ru (II) complexes. *J. Enzyme Inhib. Med. Chem.* 21 : 501—507.
- Valovicova Z., Gabelova A. 2004. Effect of cytosine arabinoside and hydroxyurea on micronucleus formation induced by model clastogens in Chinese hamster V79 cells. *Neoplasma.* 51 : 442—449.

Поступила 21 V 2007

MICRONUCLEAR AND ANTITUMOR ACTIVITIES
OF TWO NEWLY SYNTHESIZED PYRIMIDINE DERIVATIVES

A. K. Nersesyan,¹ R. E. Muradyan,² F. G. Arsenyan²

¹ National Centre of Oncology and ² Institute of Fine Organic Chemistry, Yerevan, Armenia;
¹ e-mail: armen.nersesyan@meduniwien.ac.at; armenn@freenet.am

Micronuclear and antitumor activities of two newly synthesized iodides of pyrazolo[1,5a]pyrimidines were investigated using mice model. It has been shown that both compounds are slightly toxic and have no antitumor activity in mice with Ehrlich's ascites carcinoma. Only one of them has weak micronuclear activity. Both compounds increase substantially micronuclear as well as antitumor activities of cyclophosphamide.

Key words: iodides of pyrazolo[1,5a]pyrimidines, mice, micronuclei, Ehrlich ascitic carcinoma, antitumor action, cyclophosphamide.