

CERCETĂRI PE CELULA VEGETALĂ REFERITOR LA ACȚIUNEA UNOR COMPUȘI DIN SERIA CHINAZOLIN-4-ONEI

RODICA OȚLEANU, MARIA RETEZEANU, ANA BERECHET

S-a testat pe celula vegetală de *Triticum vulgare*, în diviziune mitotică, acțiunea unor noi compuși din seria N-[2-metil-4-cetochinazolinil (3)-metil]-uretani-O-substituiți cu radicali alchilici normali sau ramificați ajungând la următoarele rezultate :

1. Substanțele la care s-au greșit radicalii alchilici normali ca : metil, etil, propil, butil, hexil, heptil, octil, potențează acțiunea statmodieretică a cafeinei. Acțiunea lor crește pe măsură ce numărul atomilor de carbon din radicalul alchilic crește, atingând maximum de acțiune în cazul cînd numărul carbonilor este 6.

2. Substanțele la care s-au greșit radicali alchilici ramificați ca : izo propil, sec butil, terț butil, izo butil și izo amil, prezintă o acțiune statmodieretică în absența cafeinei iar în prezența cafeinei o acțiune carioclazică.

3. Producții cu radicali alchilici ramificați s-au dovedit a fi mai activi decît cei cu radicali alchilici normali.

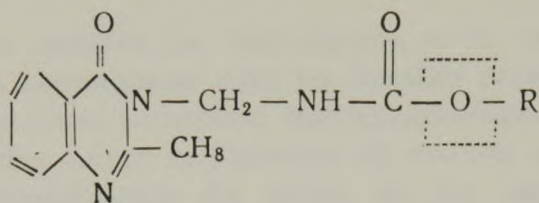
În ultimii 20—30 ani, nucleul chinazolinic a stat la baza a numeroase substanțe noi sintetizate, preparate în scopul de a găsi noi remedii anticanceroase. Cercetările experimentale s-au făcut atît asupra celulelor animale sănătoase sau canceroase, cît și asupra celulelor vegetale în diviziune (2), (8), (11), (17), (18).

De asemenea, tot în legătură cu aceste probleme, mai trebuie amintite și cercetările similare făcute pe etiluretan (6), (7), (10), (14), (15), (16).

Concluziile care au rezultat din aceste două domenii de cercetare, ne-au determinat să studiem pe celula vegetală acțiunea unor produși sintetizați de unul dintre noi (1), în molecula căroră apare atît nucleul chinazolinic cît și gruparea uretan.

Îmbinarea acestor două structuri ne-a făcut să întrevădem posibilitatea măririi efectului antimitotic, al fiecăreia dintre aceste două componente.

Formula generală a substanțelor sintetizate și cercetate de noi,



după cum se poate observa corespunde N-[2-metil-4-cetochinazolinil (3)-metil]-uretani-O-substituiți, în care R poate fi *alchil normal* sau *ramificat*, conținând un număr de carboni de la 1—8.

Studiile noastre au urmărit să stabilească dacă noii compuși sintetizați prezintă vreo acțiune pe celula vegetală în diviziune mitotică, iar în cazul substanțelor active, să precizăm dacă există vreun raport între structura chimică și acțiunea lor.

Materialul și tehnica de lucru

Materialul folosit a fost constituit din cariopse de grâu germinate (*Triticum vulgare* Vill.), soiul Bezostaia.

Germinația semințelor și tehnica folosită a fost cea indicată în lucrările noastre anterioare (3), (4), (5).

Metoda de lucru a constat din urmărirea modificărilor produse de fiecare substanță, în diferite concentrații, în celulele în diviziune mitotică, în absența și în prezența unei soluții milimolare de cafeină, cafeina avînd rolul după cum reiese din lucrările noastre anterioare (3), (4), (5) de a sensibiliza celula vegetală la acțiunea substanțelor cu proprietăți citostatice, în așa fel încît filmul modificărilor să se suprapună aceluia produs de aceleași substanțe pe celula canceroasă în absența cafeinei.

Compușii cercetați de noi, în majoritate practic insolubili în apă, au fost dizolvați în cloroform, iar pentru o distribuție uniformă a substanței, am procedat astfel :

Lotul experimental s-a împărțit în două grupe :

— în cutiile Petri din prima grupă s-au pipetat concentrații descrescînde din soluția cu substanța de cercetat dizolvată în cloroform ; după evaporarea completă a cloroformului la temperatura de $24 \pm 1^\circ\text{C}$, s-a pipetat în fiecare cutie Petri 15 ml apă de fîntînă (recent fiartă și răcită) ;

— în cutiile Petri din a doua grupă s-a procedat la fel, cu deosebirea că după evaporarea cloroformului, s-au adăugat cîte 15 ml soluție milimolar de cafeină.

În fiecare cutie Petri din cele două grupe s-au introdus apoi cîte 10 cariopse de grâu germinate, după care cutiile Petri au fost păstrate la termostat la temperatura de $24 \pm 1^\circ\text{C}$, timp de 24 de ore.

Examenul microscopic al vîrfurilor meristemate ale rădăcinilor principale de grâu secționare la o distanță de 5 mm, s-a efectuat orientativ pe preparate obținute prin metode rapide de colorare, carmin acetic, (9),

sau orceină acetică (12). Definitivarea rezultatelor s-a făcut prin interpretarea preparatelor din rădăcini tratate și fixate în soluția Navachine și colorate cu hematoxină ferică (13).

Rezultate :

Rezultatele acestor experimentări sînt redată în tabelul 1.

Din examinarea datelor din acest tabel se constată că în general toate substanțele active, produc fie alterarea figurilor mitotice (*efect mitoclastic*), fie inhibarea formării noii membrane celulare după diviziunea nucleului (*efect statmodieretic*), însă natura acestor modificări este în funcție de radicalul grefat la O-uretanic introdus în nucleul chinazolinic. Pentru compararea rezultatelor obținute, redăm imaginile diviziunii normale (profază, metafază, ana- și telofază (Pl. I, fig. 1—3), ale martorului în apă de fîntînă (recent fiartă și răcită).

Analiza mai aprofundată a datelor consemnate în tabelul 1 ne arată că substanțele sintetizate de noi și care conțin un radical *alchilic normal* grefat la oxigenul grupării uretan, produc o serie de modificări, care însă sînt în funcție de natura chimică a acestor radicali, astfel :

— prin introducerea unei grupări *metil* sau *etil*, acțiunea noilor compuși rezultați se caracterizează numai printr-o potențare a acțiunii *statmodieretice* a cafeinei, modificările produse caracterizîndu-se prin apariția de numeroase celule binucleate (Pl. I, fig. 4), radicalul *etil* dovedindu-se mai activ decît radicalul *metil* ;

— gruparea *propil* amplifică și mai mult acțiunea *statmodieretică* a cafeinei, observîndu-se pe lîngă celule binucleate în repaus (Pl. I, fig. 4) sau în diviziune (Pl. I, fig. 4—8), și apariția de celule tri-și tetranucleate (Pl. I, fig. 9), precum și prezența unor nuclei giganti. Trebuie subliniat că însăși acest produs este înzestrat cu acțiune *statmodieretică*, deoarece el produce celule bi, tri-și tetranucleate și în absența cafeinei ;

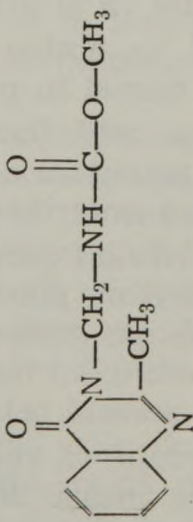
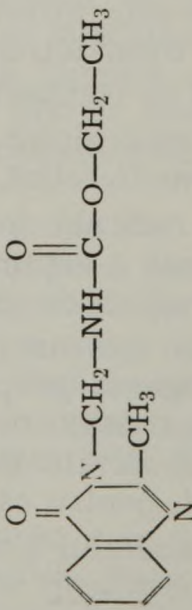
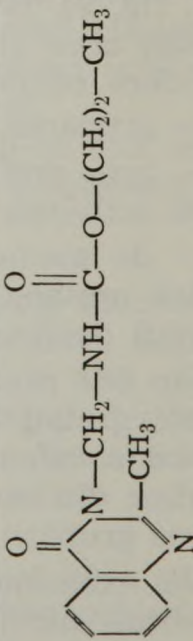
— gruparea *butil* se comportă la fel ca și gruparea *propil* ;

— prin grefarea radicalului *hexil*, se obține un produs cu cea mai intensă activitate *statmodieretică*, însă numai în prezența cafeinei

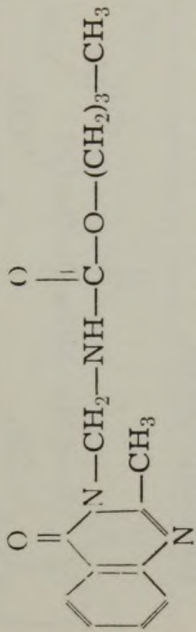
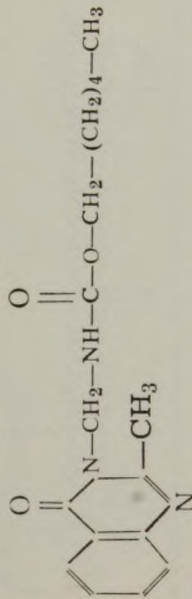
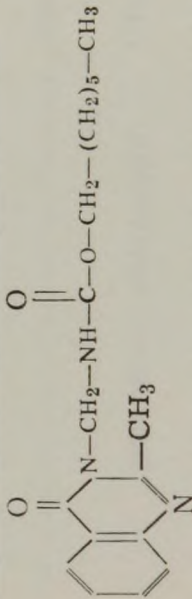
— de asemenea radicalii *heptil* și *octil* fixați la același oxigen al grupării uretan, prezintă o acțiune de potențare a cafeinei, de o intensitate mai mică decît cea produsă de gruparea anterioară.

Din cele prezentate mai sus reiese că noii compuși cu radicali *alchilici normali*, grefați la oxigenul grupării uretan, potențează acțiunea *statmodieretică* a cafeinei, activitate ce crește pe măsură ce numărul atomilor de carbon din radicalul alchilic crește, atîngînd maximum de acțiune prin grefarea grupării *hexil*, pentru ca apoi această activitate să scadă.

Din examinarea tabelului 1 mai rezultă că substanțele noi sintetizate, cu radicali *alchilici ramificați* sînt ele însăși dotate cu acțiune de tip *statmodieretic*, adică prezintă această activitate chiar în absența cafeinei, însă spre deosebire de cafeină, ele mai exercită și o activitate de tip *statmocinetic*, rezultată probabil în urma unor procese de simploidie cît și o activitate de tip *cromatoclastic*.

Nr. crt.	Denumirea derivatului	Modificări macroscopice După 24 ore		Modificări microscopice În prezența cafeinei	După 24 ore În prezența cafeinei
		În absența cafeinei	În prezența cafeinei		
1	2	3	4	5	6
Derivați cu radical alchil normal					
I	 <p>O-metil-N-[2-metil-4-cetochinazolinil (3)-metil]-uretan.</p>	Alungirea radicelelor	Creșterea slabă	Diviziuni normale	Celule binucleate, tro- pocineze, acțiune de stimulare a cafeinei
II	 <p>O-etil-N-[2-metil-4-cetochinazolinil (3)-metil]-uretan.</p>	Slabă alun- gire a ra- dicelelor	Slabă creștere	Diviziuni normale diminuate ca număr	Celule binucleate nu- meroase acumulări de mitoze, tropocineze în ana-meta-și telofază
III	 <p>O-n-propil-N-[2-metil-4-ceto-chinazolinil (3)-metil]-uretan.</p>	Slabă alun- gire a radi- celelor	Creșterea oprită	Anafaze tropocinezate. Celule binucleate nu- cleoli măriți în volum	Celule bi-tri-și tetra- nucleate, nucleii giganti. Celule binucleate în repaus sau în divi- ziune

Tabel 1 (continuare)

Nr. crt.	Denumirea derivatului	Modificări macroscopice După 24 ore		Modificări microscopice În prezența cafeinei	După 24 ore În prezența cafeinei
		În absența cafeinei	În prezența cafeinei		
1	2	3	4	5	6
Derivați cu radical alchil normal					
IV	 <p>O-n-butyl-N-[2-metil-4-cetochinazolinil (3)-metil]-uretan.</p>	Foarte slabă alungire a radicelelor	Creștere oprită	Multe celule binucleate, unii nuclei cu contur ușor diformat	Numeroase celule binu- cleate și tetra-nucleate
V	 <p>O-n-hexil-N-[2-metil-4-cetochinazolinil (3)-metil]-uretan.</p>	Alungirea radicelelor	Creștere oprită	Diviziuni normale	Numeroase celule binu- cleate în repaus sau în diviziune. Potențează acțiunea cafeinei
VI	 <p>O-n-heptil-N-[2-metil-4-cetochinazolinil (3)-metil]-uretan.</p>	Ușoară creștere	Creștere slabă	Acumulări de mitoze normale, profaze imense	Diviziuni normale în toate fazele, unele tro- pocinezate prezente și unele celule binucleate

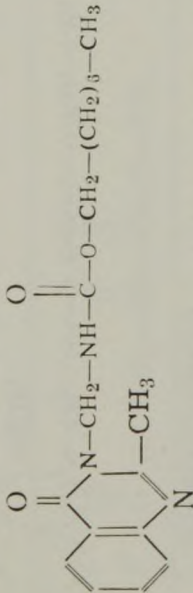
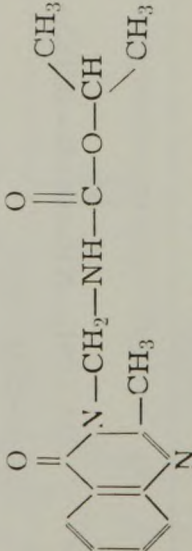
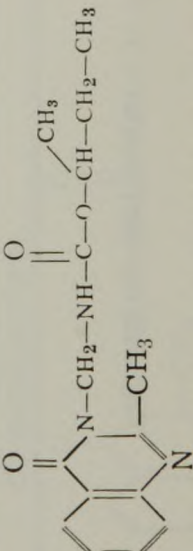
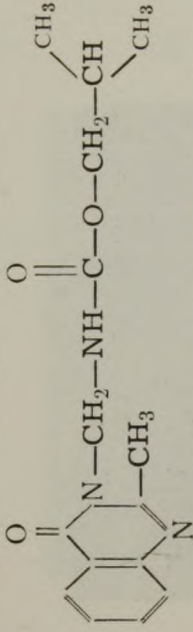
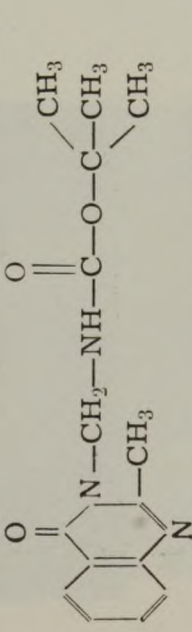
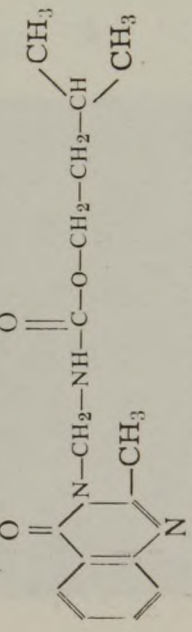
Nr. crt.	Denumirea derivatului	Modificări macroscopice După 24 ore		Modificări microscopice În prezența cafeinei	După 24 ore În prezența cafeinei
		În absența cafeinei	În prezența cafeinei		
1	2	3	4	5	6
Derivați cu radical alchil normal					
VII	 <p>O-n-metil-N-[2-metil-4-cetochinazolinil (3)-metil]-uretan.</p>	Creșterea radicelelor	Creștere slabă	Diviziuni normale. Unele acumulări de metafaze	Numeroase celule binu- cleate, sînt și unele diviziuni normale
VIII	 <p>O-izo-propil-N-[2-metil-4-cetochinazolinil (3)-metil]-uretan.</p>	Creștere oprită	Creștere oprită	Celule binucleate nu- merose mai ales spre zona diferențiată, tro- pocineze în ana- și metafază, pseudomete- faze și anafaze stelate	Celule binucleate, în repaus sau în divi- viziune. Stimulează efectul cafeinei
IX	 <p>O-sec-butil-N-[2-metil-4-cetochinazolinil (3)-metil]-uretan.</p>	Creștere oprită	Creștere oprită	Alterări în zona me- ristematică și diferen- țiată. Celule binucleate stelate și cu punți. Cromozomi întîrziți. Acumulări de metafaze. Profazele și telofazele nu sînt efectuate	Celule bi- și tetra- nucleate în repaus sau în diviziune. Modificări de tip statmodieretice

Table 1 (continuare)

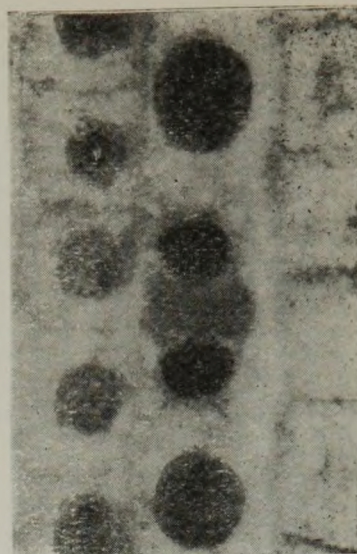
Nr. crt.	Denumirea derivatului	Modificări macroscopice După 24 ore		Modificări microscopice În prezența cafeinei	După 24 ore În prezența cafeinei
		În absența cafeinei	În prezența cafeinei		
1	2	3	4	5	6
Derivați cu radical alchil normal					
X	 <p>O-izo-butil-N-[2-metil-4-cetochinazolinil (3)-metil]-uretan.</p>	Creștere ușoară	Creștere oprită	Numeroase celule binucleate în repaus sau în diviziune; acumulări de metafaze	Celule binucleate, cromozomi întârziați
XI	 <p>O-terț-butil-N-[2-metil-4-cetochinazolinil (3)-metil]-uretan.</p>	Creștere oprită	Creștere oprită	Celule bi- și tetranucleate, în repaus sau în diviziune. Puncti anafaze și telofazice, anafaze stelate, cromozomi întârziați	Aceleași modificări ca la 5. Acțiunea cafeinei este stimulată
XII	 <p>O-izo-amil-N-[2-metil-4-cetochinazolinil (3)-metil]-uretan.</p>	Creștere oprită	Creștere oprită	Numeroase celule binucleate, unele anafaze stelate, cromozomi întârziați, puncti anafaze și telofazice, acumulări de pseudometafaze	Celule bi-, tri- și tetranucleate, în repaus sau în diviziune. În zona meristemă sint și alterări ca cele observate în absența cafeinei



1



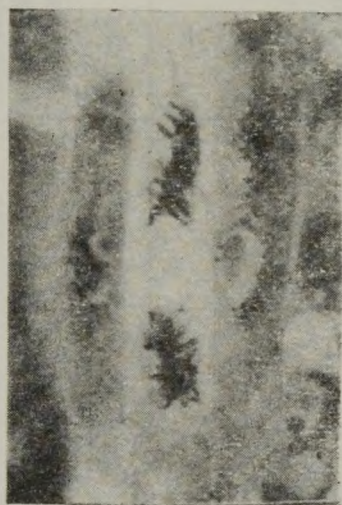
2



3



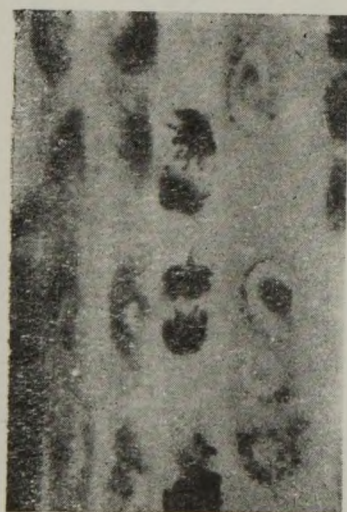
4



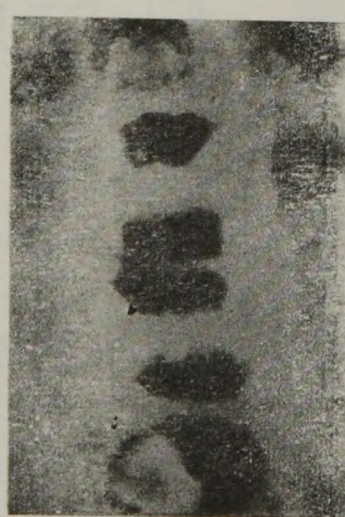
5



6



7



8



9

Imaginile nucleare din meristemele radiculare de *Triticum vulgare* Vill. netratate (martor) fig. 1—3 ; și sub acțiunea unor compuși din seria N[2-metil-4-cetochinazolinil (3)-metil]-uretani-O-substituiți cu radicali alchilici normali (fig. 4—9) după 24 de ore ; Navachine ; hematoxină ferică.
Oc. IOR F₂ × Ob. imersie 100 ×.

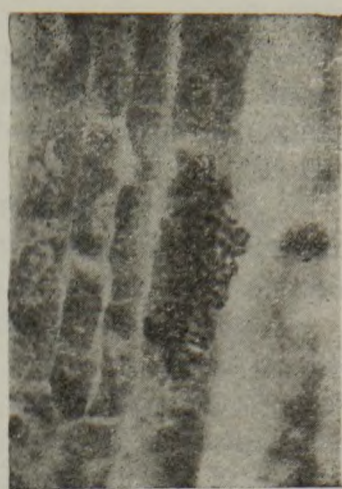
PLANȘA II



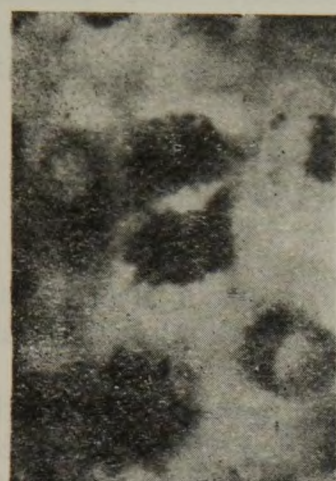
10



11



12



13



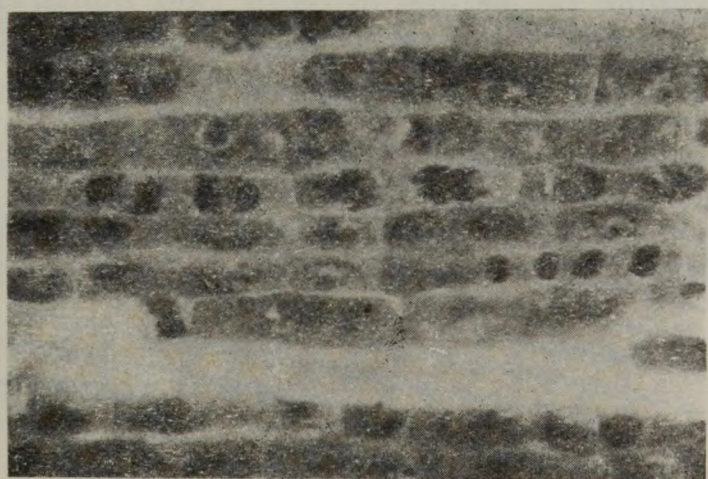
14



15



16



17

Imaginile nucleare din meristemele radiculare de *Triticum vulgare* Vill. sub acțiunea unor compuși din seria N-[2-metil-4-cetochinazolinil (3)-metil]-uretani-O-substituiți cu radicali *alchilici ramificați*, după 24 h; Navachine; hematoxină ferică.

Fig. 7—13 Oc. IOR F₂ × Ob. imersie 100 ×.

Fig. 14 Oc. IOR F₂ × Ob. imersie 40 ×.

Din examinarea modificărilor produse de aceste substanțe constatăm următoarele :

— prin introducerea unei grupări *izo-propil* se observă că produsul obținut produce în absența cafeinei, pe lângă apariția de celule binucleate și prezența unor pseudometafaze (Pl. II, fig. 10), și anafaze stelate și cu punți (Pl. II, fig. 13) ;

— gruparea *sec-butil* produce același tip de modificări, caracterizate în acest caz și prin apariția de punți ana-și telofazice (Pl. II, fig. 14—15), prezența de cromozomi întârziți (Pl. II, fig. 11) ;

— gruparea *izo-butil* imprimă noului produs mai mult un efect *statmocinetic*, pe când radicalul *terț-butil*, pe lângă modificările caracteristice *statmodieretice*, declanșează și modificări de tip *cromatoclastic*, observându-se cromozomi întârziți, punți telofazice (Pl. II, fig. 16), precum și unele anafaze stelate (Pl. II, fig. 12) ; produsul cu radical *terț-butil* este mai activ decât cei cu radicali *izo-butil* și *sec-butil* ;

— prin grefarea unei grupări *izo-amil* se observă, tot în absența cafeinei, apariția de numeroase celule bi-, tri- și tetranucleate, precum și unele anafaze stelate, cromozomi întârziți, punți ana- și telofazice, acumulări de mitoze (Pl. II, fig. 17) ; produsul cu acest radical s-a dovedit a fi cel mai activ.

Concluzii

Studiul pe celula vegetală a unor noi compuși din seria N-[2-metil-4-cetochinazolinil (3)-metil]-uretani-O-substituiți cu radicali alchilici normali sau ramificați ne-au dus la următoarele concluzii :

1. Substanțele la care s-au grefat radicalii *alchilici normali* ca : metil, etil, propil, butil, hexil, heptil, octil, potențează acțiunea *statmodieretică* a cafeinei manifestată prin apariția de celule bi- tri- și tetranucleate în repaus sau în diviziune, cu nuclei giganți ; acțiunea lor crește pe măsură ce numărul atomilor de carbon din radicalul alchilic crește, atingând maximum de acțiune în cazul când numărul carbonilor este 6.

2. Substanțele la care s-au grefat radicali *alchilici ramificați* ca : *izo-propil*, *sec-butil*, *terț-butil*, *izo-butil* și *izo-amil*, prezintă o acțiune *statmodieretică* în absența cafeinei, iar în prezența cafeinei o acțiune *carioclastică*, caracterizată prin apariția de punți ana- și telofazice, anafaze stelate, precum și acumulări de mitoze.

3. Producții care conțin radicali *alchilici ramificați* s-au dovedit a fi mai activi decât cei cu radicali *alchilici normali*.

BIBLIOGRAFIE

1. BERECHET, A., Farmacia XV, nr. 5, 1967.
2. CHEYMOL, J., DEYSSON, G., ADOLPHE MONIQUE, C. R. Soc. Biol., 161, 2, 231, 1967.
3. CONSTANTINESCU, GR. D., RETEZEANU, M., OȚLEANU, R., CONSTANTINESCU MARG., C. R. Ac. Sc. Paris, 255, 1357, 1962.

4. CONSTANTINESCU, GR. D., RETEZEANU, M., OȚLEANU, R., CONSTANTINESCU MARG., GRIGORESCU, E., *Farmacia*, vol. X, nr. 10, 587, 1962.
5. CONSTANTINESCU, GR. D., CONSTANTINESCU, MARG., RETEZEANU, M., OȚLEANU, R., *Arzneimittel-Forschung*, 12, 827, 1962.
6. CORNMAN, L., *Nat. Cancer Inst.*, 10, 1123, 1950.
7. CORNMAN, L., *Intern. Rev. Cytol.*, 3, 113, 1954.
8. DEYSSON, G., *C. R. Acad. Sc. Paris*, 259, nr. 2, 479, 1964.
9. GEITLER, L., *Schnellmethoden der Kern- und Chromosomen-Untersuchung*. Bornträger Verl., Berlin, 1940.
10. HADDOW, A., SEXTON, W. A., *Nature* 157, 500, 1946.
11. KOPPE, TH., *Monatssch. Chem.* 98, nr. 1, 214, 1967.
12. LA COUR, L., *Acetic Orcein „Strain Tech.“*, nr. 16, 169, 1941.
13. LANGERON, M., *Précis de microscopie*, Ed. Masson, Paris, 1942.
14. MURPHY, J. B., STURM, E., *Science*, 104, 427, 1946.
15. RETEZEANU, M., *Farmacia*, 9, 541, 1967.
16. TRUHAUT, R., DEYSSON, G., *Ann. pharm. franc.* XV, 324, 1957.
17. TRUHAUT, R., DEYSSON, G., *Ann. pharm. franç.*, 23, 163, 1965.
18. YALE, H., *J. Med. chem.*, 10, nr. 2, 334, 1967.

UNTERSUCHUNGEN AN PFLANZENZELLEN BETREFFEND
DIE EINWIRKUNG VON VERBINDUNGEN AUS DER REIHE
CHINAZOLIN-4-O.

Z u s a m m e n f a s s u n g

Es wurde die Wirkung einiger neuen Verbindungen aus der Reihe N-[2-Methyl-4-Cetochinazolil (3) - Methyl]-Uretani-O-substituierte mit normalen oder verzweigten alkyllischen Radikalen, auf Zellen von *Triticum vulgare*, testiert und es wurden folgende Resultate erlangt.

1. Substanzen bei welchen alkyllische Radikale, wie : Methyl, Aethyl, Propyl, Butyl, Hexyl, Heptyl, Oktyl, greffiert wurden, potenzieren die statmodiäretische Einwirkung des Kaffeeins. Deren Wirkung wächst mit der Zunahme der Anzahl der Kohlenstoff-Atome des alkyllischen Radikals, und erreicht das Maximum seiner Wirkung sobald die Zahl des Kohlenstoffes 6 ist.

2. Die Substanzen denen verzweigte alkyllische Radikale (wie : Iso-Propyl, sec.-Butyl, Tert-Butyl, Iso-Butyl und Iso-Amyl) greffiert wurden, weisen bei Anwesenheit von Kaffeein eine statmodiäretische Wirkung, jedoch in Gegenwart von Kaffeein eine karyoklazische Wirkung auf.

3. Verbindungen mit verzweigten alkyllischen Radikalen bewiesen sich aktiver als jene mit normalen Radikalen.