

ЗАЙКА Л. А.[✉], БОЛСУНОВА О. І., САВІНСЬКА Л. О., ЗАЄЦЬ В. М., ЛОЖКО Д. М.,
РУБАН Т. В., ПОТОПАЛЬСЬКИЙ А. І.

Інститут молекулярної біології і генетики,

Україна, 03143, м. Київ, вул. Академіка Заболотного, 150, ORCID: 0000-0002-1590-1376,

0000-0002-5885-2391, 0009-0001-0658-0101, 0000-0002-5130-4325, 0000-0002-3251-3164,

0009-0001-9482-5948, 0000-0002-7588-7633

[✉] lazaika@ukr.net, 0970491968

ПРОАПОПТИЧНА ДІЯ ПРОТИВІРУСНОГО, ПРОТИПУХЛИННОГО ПРЕПАРАТУ ІЗАТІЗОН

Апоптоз – запрограмована загибель клітини, характерна для всіх багатоклітинних організмів, яка не супроводжується запальним процесом на відміну від некрозу, і є імунологічно інертним процесом. **Мета.** Вивчити проапоптичну дію ізатізону і його аналогів на культуру лінії злоякісних клітин людини К-562. **Методи.** Використовували метод проточної цитометрії для виявлення дії препаратів на апоптоз. З'ясовували вплив препаратів на активність каспази-3 за допомогою вестерн-блоту. **Результати.** Дані досліджень методом проточної цитометрії показують, що ізатізон його аналог Idd зупиняли поділ клітин у фазі G₀–G₁, після чого починався апоптоз. Дослідження впливу ізатізону і його аналогів на культуру злоякісних клітин К-562 на активність каспази-3 показали, що всі препарати ініціюють каспазу-3. **Висновки.** Ізатізон і його аналоги ініціюють апоптоз у культурі злоякісних клітин К-562 і можуть використовуватись для подальших досліджень у практичній медицині.

Ключові слова: імуномодулюючий препарат ізатізон, проапоптична дія.

Різне збільшення числа інфекційних і онкологічних захворювань наразі пов'язано з погіршенням стану довкілля через вплив війни – ведення воєнних дій у локальних та глобальних масштабах, а також помилковою поведінкою людини, що викликає суттєві навантаження на природні ресурси та саму людину, і тим самим, є причиною та наслідком зміни клімату. Прогресування війн від використання хімічної зброї до ядерної створює дедалі більше навантажень на людину, екосистеми та навколишнє середовище. Це призводить, зрештою, до деградації

довкілля і кризи стійкості живих організмів. Високий рівень науково-технічного прогресу є недостатнім для збільшення виживаності хворих на онкозахворювання. Тому досить гострим питанням сьогодення є пошук нових або вдосконалення існуючих засобів діагностики та лікування онкозахворювань.

Розробка структурно-спрямованих препаратів та дослідження молекулярного впізнавання між тривимірними структурними мішенями стала інтегральною частиною сучасного пошуку лікарських препаратів.

Нині наявні протиопухлинні засоби мають ряд побічних ефектів, основним з яких є значна їх токсичність, і потребують корекції шляхом використання імунобіологічних препаратів.

Ізатізон належить до групи мало токсичних речовин [1]. Він не пригнічує кровотворення, не має кумулятивних властивостей. При застосуванні в індуктивну фазу імуногенезу зменшує прояви анафілактичного шоку, має властивість збільшувати показники специфічної та неспецифічної резистентності при порушенні імунного статусу, шляхом стимулювання інтерферонової системи. Ізатізон має противірусну властивість, збільшує чутливість до ацетилхоліну і хлористого барію, має антисептичні та протизапальні властивості [2, 4].

Ізатізон – це пегельована форма метисазону [1] в універсальному розчиннику. Структурно-динамічна особливість молекули метисазону – її структурна «м'яккість» обумовлена наявністю чотирьох низьких частот фундаментальних коливань – 39, 46, 69 і 81 довжин у її коливальному спектрі [2]. Очевидно, структурна «лабільність» поряд з конформаційними можливостями, а також здатність вступати в міжмолекулярні Н-

© ЗАЙКА Л. А., БОЛСУНОВА О. І., САВІНСЬКА Л. О., ЗАЄЦЬ В. М., ЛОЖКО Д. М.,
РУБАН Т. В., ПОТОПАЛЬСЬКИЙ А. І.

зв'язки лежать в основі біологічної активності метисазону. Можна припустити, що наявність специфічного розчинника у складі ізатізону переводить молекулу з енергетично найвигіднішої конформації у високоенергетичну «робочу», біологічно активну [2, 3].

Ізатізон [1], володіючи противірусною, протипухлинною та антимікробною активністю, здатен безпосередньо впливати як на збудника захворювання, так і на імунну систему, нормалізуючи її дію [6]. Тому вивчення апоптичної дії ізатізону та його аналогів на культурі клітин мієлоїдної лейкемії людини К-562, розкриває нові дані по механізмі дії.

Ізатізон, як і метисазон має широкий спектр противірусної дії, проте, що дуже важливо, ізатізон у 20–100 разів ефективніший від метисазону і не проявляє токсичного ефекту [4]. Препарат впливає на ДНК- та РНК-вмістні віруси, є селективним інгібітором зворотної транскриптази різних ретровірусів, вірусу Вісна та ін. Механізм дії ізатізону полягає у затримці експресії ранніх вірусних генів, реплікації і синтезу VAI РНК, що призводить до різкого ослаблення вірусного захисту від дії інтерферону [5]. При експериментальній герпетичній інфекції ізатізон показав значний захисний ефект. Загибель тварин, інфікованих ВПГ і, до яких не застосовували ізатізон, спостерігалася у період з 7 до 11 доби і відбувалась на фоні виразних клінічних ознак захворювання. А в групах, які лікували ізатізоном, клінічні прояви хвороби були значно слабшими [7].

Протипухлинна дія ізатізону виявлена на мишиній моделі злоякісного росту меланоми Гардінг-Пасі. Препарат призводив до вірогідного гальмування росту пухлини, не викликаючи помітної побічної дії [4]. Найбільшого поширення і перспективності набули дослідження створення протипухлинних препаратів нового покоління. Вони мають поєднувати в собі ефект таргетного безпосереднього антибластичного впливу та імуномодуючих властивостей з противірусною та протимікробною дією.

Матеріали і методи

У дослідженнях використовували перещеплювану лінію клітин хронічної мієлоїдної лейкемії людини К-562. Культури клітини підтримували за загальноприйнятим методом, використовуючи поживне середовище, що складалось з 90 % середовища RPMI 1640 («Sigma-

Aldrich») з додаванням 10 % інактивованої ембріональної сироватки («Fetal Bovine Sera, Heat Inactivated», Sigma-Aldrich) і антибіотиків – пеніциліну та стрептоміцину (100 МО/мл) або канаміцину (50 МО/мл). Клітини вирощували у скляних або пластикових флаконах («Nunc») об'ємом 50–100 мл при 37°C + 5 % CO₂. Кожні 3–4 дні живі клітини підраховували за допомогою трипанового синього та розсіювали в початковій концентрації 200 000 клітин в 1 мл.

Перещеплювані культури клітин знімали з поверхні флакона за допомогою версену або трипсину, центрифугували і до осаду додавали 1 мл поживного середовища, піпетували й підраховували у камері Горяєва кількість клітин в 1 мл поживного середовища. Клітини розсіювали у планшети (плашки) для культур клітин (Zellkultur testplate 96F, Switzerland) із розрахунку 200 000 клітин в 1 мл.

Для визначення апоптозу клітини фарбували пропідію йодидом в гіпотонічному буфері з Тритоном Х-100. Відсоток гіподиплоїдних клітин обраховували за діаграмами розподілу, одержаними на проточному цитофлюориметрі FACS Calibur («Becton Dickinson», США) на моделі перещеплюваної лінії злоякісних клітин людини К-562.

Оцінку апоптичної дії проводили через 24 год, 72 год та 120 год (на 1-у, 2-у та 3-ю добу) інкубації клітин з препаратами. Обраховували за допомогою програми Mod Fit LT 2.0 (Becton Dickinson, США).

Аналіз проводили за фазами клітинного циклу за допомогою програмного забезпечення Mod Fit LT 3.0 (Becton Dickinson, США).

Зміни вмісту активної каспази-3, під впливом ізатізону, ізатізону + срібло, срібло, ізатітонію, ізатітонію + срібло вивчали за методом Вестерн-блот аналізу [8]. Для контролю рівномірності навантаження білка використовували β-актин.

Результати та обговорення

Дослідження проапоптичної дії проводили за допомогою проточної цитометрії. Результати дії ізатізону та його аналогів свідчать (табл.), що ізатізон протягом 24 годинної інкубації зупиняв поділ клітин у фазі G₀–G₁, у результаті чого гальмувалась проліферація культури злоякісних клітин лінії К-562, що супроводжувалось розвитком апоптозу. Цей ефект був кількісно тотожним для всіх доз.

Таблиця. Вплив ізатізону та його аналогу Idd на апоптоз і клітинний цикл клітин лінії К-562

Зразки препаратів, концентрація		Відносна кількість (%) клітин, що знаходяться у			
		стані апоптозу	фази клітинного циклу		
			G ₀ –G ₁	S	G2-M
24-годинна інкубація					
Контроль		10,03 ± 1,96	36,00 ± 2,85	57,37 ± 1,86	6,67 ± 1,42
Idd	2 мкг/мл	14,20 ± 2,15	38,23 ± 2,92	56,20 ± 2,20	5,57 ± 1,39
	20 мкг/мл	14,77 ± 3,12	41,03 ± 1,81	55,73 ± 1,54	3,53 ± 1,07
	100 мкг/мл	17,33 ± 1,77 *	43,47 ± 1,18 *	52,80 ± 1,03 *	3,77 ± 0,87
Ізатізон	2 мкг/мл	34,87 ± 5,91 *	41,93 ± 1,07	50,80 ± 1,50 *	7,27 ± 0,50
	20 мкг/мл	41,23 ± 1,89 *	45,73 ± 3,89 *	46,70 ± 2,97 *	7,43 ± 2,50
	100 мкг/мл	43,00 ± 1,61 *	36,53 ± 1,99	63,17 ± 2,12 *	0,30 ± 0,30 *
72-годинна інкубація					
Контроль		9,27 ± 0,77	48,23 ± 0,64	47,97 ± 1,25	3,80 ± 0,81
Idd	2 мкг/мл	10,73 ± 0,12	46,43 ± 0,78	50,10 ± 0,17	3,47 ± 0,71
	20 мкг/мл	8,70 ± 0,25	47,57 ± 0,78	45,63 ± 0,63	6,80 ± 0,47 *
	100 мкг/мл	11,40 ± 1,03	34,43 ± 1,22 *	61,77 ± 2,33 *	3,80 ± 1,14
Ізатізон	2 мкг/мл	10,13 ± 0,64	52,20 ± 0,78 *	43,23 ± 2,38	5,63 ± 0,45 *
	20 мкг/мл	49,80 ± 1,39 *	40,83 ± 0,39 *	53,77 ± 0,96 *	5,47 ± 0,58
	100 мкг/мл	67,97 ± 1,14 *	41,63 ± 2,05 *	54,87 ± 0,90 *	4,37 ± 1,75
120-годинна інкубація					
Контроль		12,93 ± 0,37	46,97 ± 1,04	43,63 ± 2,37	9,37 ± 1,36
Idd	2 мкг/мл	13,27 ± 1,45	46,47 ± 1,28	40,63 ± 2,42	12,90 ± 1,14 *
	20 мкг/мл	11,77 ± 1,04	47,47 ± 0,07	39,27 ± 0,77	13,27 ± 0,74 *
	100 мкг/мл	11,83 ± 1,37	43,20 ± 0,70 *	47,07 ± 1,28	10,07 ± 1,68
Ізатізон	2 мкг/мл	11,47 ± 0,67	52,30 ± 0,76 *	35,40 ± 0,86 *	12,30 ± 0,46 *
	20 мкг/мл	49,33 ± 2,27 *	46,63 ± 0,62	47,33 ± 0,12	6,03 ± 0,52 *
	100 мкг/мл	75,70 ± 3,93 *	45,73 ± 1,93	47,80 ± 1,46	6,23 ± 0,30 *

Примітки: * – розбіжності при порівнянні з показником в контролі статистично вірогідні (p < 0,05).

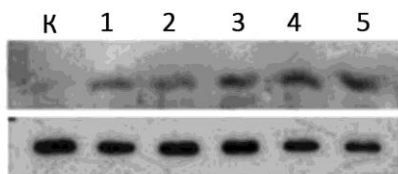
Аналог Idd, на 24-й годині інкубації тільки в дозі 100 мкг/мл, проявив достовірну проапоптичну дію.

На 3-й та 5-й день інкубації ізатізон достовірно збільшував апоптоз в дозах 20 і 100 мкг/мл. А аналог Idd проявив достовірний вплив лише в дозі 100 мкг/мл, а на 3-тю та 5-у добу індукції апоптозу не виявлено.

Вище наведені дані показують, що ізатізон проявляє апоптичну дію у культурі злоякіс-

сних клітин К-562, зупиняючи їхній поділ у фазі G₀-G₁.

На рисунку представлено дані по впливу ізатізону і його аналогів на рівень експресії каспази-3 в лізатах клітин лінії К-562. Всі комплекси ізатізону підвищували рівень каспази-3. Таким чином, проведені дослідження показали, що препарати, які ми вивчали, гальмують проліферацію злоякісних лімфоїдних клітин людини лінії К-562, шляхом запуску апоптозу.



К – контроль
1 – Ізатізон
2 – Ізатізон + срібло
3 – Срібло
4 – Ізатітоній
5 – Ізатітоній + срібло

Caspase 3, 17kDa

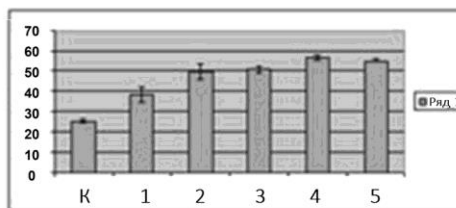


Рис. Вплив ізатізну і його аналогів на індукцію каспази-3.

Висновки

У досліджуваних дозах ізатизон проявляв достовірно апоптичну дію на 1-шу та 3-тю добу інкубації, а на 5-ту добу інкубації в дозах 20 та 100 мкг/мл. Аналог ізатизону – Idd, проявляв достовірно апоптичну дію тільки на 1-шу добу у дозі 100 мкг/мл. Вплив ізатизону і його аналогу

на фази клітинного циклу показує, що накопичення культивованих клітин відбувалось у фазі G_0 – G_1 . Дослідженнями встановлено, що під впливом ізатизону та його аналогів, запускається каспазно-залежний механізм апоптозу через ініціювання каспази-3.

References

1. Zaika L. A., Bolsunova O. I., Potopalskyi A. I. Protivirusni, protypukhlynni ta imunomoduliuuchi vlastyvoli likuvalnoho preparatu Izatizon. Kyiv : Kolohib, 2010. S. 27–36.
2. Maheshwari A., Thuluvath R. Acute hepatitis C. *Lancet*. 2008. Vol. 372. P. 321–342.
3. Bolsunova O. I., Brovarets O. O., Hovorun D. M., Zaika L. A., Potopalsky A. I. Quantum Chemical Analysis of Structural and conformational Properties of Methisazone and Prototropic Tautomerism of Isatin. *IREBIC*. 2011. Vol. 2, № 5. P. 159–165..
4. Potopalskyi A. I., Loziuk L. V. Protivovirusnyi, protyvopukholevyi preparat Izatizon. Kyiv : Naukova dumka, 1995. S. 57–64.
5. Patskovsky U. V., Negrebetskaya E. N., Chernomas A. A., Voloschuk T. P., Kitam O. E., Rubashevsky E. I., Tereschenko M. J., Nosach I. N., Potopalsky A. I. Aromatic thiosemicarbasones: their antiviral action and interferon / The decreasing of adenovirus type-1 resistance against interferon by methisazone *in vitro*. *Biopolymers & Cell*. 1996. Vol. 12, No. 2. P. 74–83.
6. Van Parijs, Abbaa A. K. Homeostasis and self-tolerance in the immune system: turning lymphocytes off. *Science*. 1998. Vol. 280. P. 243–248.
7. Bolsunova O. I., Rybalko S. L., Zaika L. A., Potopalskyi A. I. Vychennia mekhanizmiv dii preparatu Izatizon na reparatyvnu spromozhnist klityn pry eksperymentalni herpetychnii infektsii. XIX Mizhnarodna internet-konferentsiia «Veterynarni, sil'skohospodars'ki, biolohichni, khimichni nauky: stan ta perspektyvy rozvytku v XXI stolitti» (15–20 liutoho 2012).
8. Khomenko A. V. Hidroksyliuvannia kholekaltsyferolu v hepatyтах shchuriv pid diieiu prednizolonu. *Ukrainskyi biokhimichnyi zhurnal*. 2013. T. 85, № 3. S. 73–78.

ZAİKA L. A., BOLSUNOVA O. I., SAVINSKA L. O., ZAIETS V. M., LOZHKO D. M., RUBAN T. V., POTOPALSKYI A. I.

*Institute of Molecular Biology and Genetics,
Ukraine, 03143, Kyiv, Akademika Zabolotnoho str., 150*

PRO-APOPTOTIC ACTIVITY OF THE ANTIVIRAL AND ANTITUMOR DRUG IZATIZON

Aim. Apoptosis is a programmed cell death characteristic of all multicellular organisms, which is not accompanied by an inflammatory process, unlike necrosis, and is an immunologically inert process. To study the proapoptotic effect of isathizone and its analogues on the culture of the human malignant cell line K-562. **Methods.** Flow cytometry was used to detect the effects of drugs on apoptosis. The effect of drugs on caspase-3 activity was determined using Western blot. **Results.** Flow cytometry data show that isathizone and its analog Idd stopped cell division in the G_0 – G_1 phase, after which apoptosis began. The data of studies using flow cytometry show that isathizone and its analogue Idd stopped cell division in the G_0 – G_1 phase, after which apoptosis began. Studies on the effect of isathizone and its analogues on the activity of caspase-3 in the culture of malignant K-562 cells showed that all drugs initiate caspase-3. **Conclusions.** Izatizone and its analogues affect apoptosis of malignant K-562 cell cultures and can be used for further research in practical medicine.

Keywords: immunomodulatory drug izatizone, proapoptotic effect.