

УДК 547.94:575.155:612.017:615.2

Л. А. Занка, О. И. Болсунова, Ю. В. Пацковский, Е. Л. Рубашевский,
С. Т. Дядюн, С. Л. Рыбалко, А. И. Потопальский**Антивирусный препарат изатизон не обладает мутагенным действием и стимулирует пролиферацию клеток иммунной системы**

На экспериментальных моделях изучено мутагенное действие антивирусного препарата изатизона. Показано, что он не обладает мутагенным эффектом как на уровне хромосомных aberrаций, так и в отношении частоты генных мутаций устойчивости к 6-меркаптопурину. В культуре клеток, инфицированных вирусом герпеса простого (тип 1), наблюдали достоверное увеличение частоты хромосомных aberrаций. Изатизон одновременно с ингибированием репродукции вируса снижал количество хромосомных аномалий до уровня контроля. Обнаружена стимуляция изатизоном пролиферативной активности лимфоцитов как в культуре клеток СЕМ-4, так и в опытах на цыплятах-Бройлерах 6, что коррелировало с увеличением продуктивности птиц. Предполагается, что антивирусное действие изатизона обусловлено его влиянием на инфицированные клетки, а также на клетки иммунной системы.

Введение. В настоящее время проводится интенсивный поиск антивирусных препаратов, которые могли бы широко использоваться в ветеринарии и медицине. К таким препаратам относятся производные и аналоги изатина [1]. Последние ввиду их плохой растворимости в водных растворителях и токсичности при пероральном введении в высоких дозах не нашли своего применения [2]. Потопальскому и соавт. [3] удалось создать растворимую форму N-метил-изатин-тиосемикарбазона (метисазона), в результате чего был получен антивирусный препарат изатизон. Препарат обладает широким антивирусным спектром (грипп, вирусы герпеса и проч.) и нетоксичен, в отличие от известных химиопрепаратов, что, учитывая простое и доступное производство, сделало изатизон единственным антивирусным средством, которое довольно успешно испытывается в сельском хозяйстве. С другой стороны, механизм антивирусного действия изатизона и его аналога метисазона до сих пор остается неизвестным [3], что лимитирует как использование препарата, так и создание на его основе новых эффективных антивирусных средств. В настоящей работе показано, что, поскольку препарат не является индуктором интерферона, механизм его антивирусного действия может реализоваться путем стимуляции защитных функций как отдельных клеток в культуре, так и клеток иммунной системы целого организма.

Материалы и методы. В работе использовали изатизон производства Уманского витаминного завода (Украина) в стандартной расфасовке для ингаляционного применения. Чистоту препарата проверяли методами тонкослойной хроматографии на пластинках «Силуфол УФ-254» («Chemarol», Чехия) в системах органических растворителей. Токсичность препарата определяли в опытах на мышках линии BALB/c в соответствии с общепринятыми критериями [3]. Токсичность препарата на клетках устанавливали цитоморфологическим и радиоизотопным (по уровню ингибирования включения ³H-тимидина в клеточную ДНК) методами.

В экспериментах *in vitro* применяли культуры опухолевых клеток HeLa S3, HeLa, Her-2, K-562, L-969, Vero, клетки китайского хомячка (линия BL1D-II-FAF 28, клон 237A), клеточную культуру Т-лимфоцитов человека СЕМ-4. Все линии клеток получены из клеточного банка Института экспериментальной патологии, онкологии и радиобиологии НАН Украины. В экспериментах по мутагенезу использовали также первичную трипсицированную культуру фибробластов эмбрионов человека. Клетки культивировали на модифицированной среде Игла с глутамином с добавлением 10 % эмбриональной сыворотки телят, включающей антибиотики (пенициллин: стрептомицин — 100:400 ед/мл), как описано ранее [4]. Клетки СЕМ-4 культивировали на среде RPMI-1640 («Serva», Германия) с глутамином и 10 % эмбриональной сыворотки телят («Sigma», США) и гентамицином (20 ед/мл).

Для заражения клеток в культуре использовали лиофилизированный вирус герпеса простого 1-го антигенного типа (ВПГ1), штамм VC, инфекционный титр по цитопатическому действию (ТЦД) на культуре клеток Vero составил $5 \lg$ ТЦД₅₀/0,1 мл (получен из Института вирусологии им. Д. И. Ивановского РАМН (Москва)). Препарат вируса (0,1 мл) вносили в пробирки с культурой клеток, после адсорбции вируса (1 ч) добавляли изатизон в соответствующих разведениях. Клетки инкубировали при 37 °С в течение суток, затем лизировали трехкратным замораживанием — оттаиванием. Далее тестировали продукцию вирусного антигена иммуноферментным методом с применением моноклональных антител к белку gD (Институт молекулярной диагностики, Москва) в соответствии с общепринятыми подходами [5]. В другой серии опытов клетки фиксировали для определения частоты хромосомных aberrаций.

Мутагенное действие изатизона и его компонентов исследовали по описанному методу на модели клеточных клонов, у которых возникала устойчивость к 6-меркаптопурину [6]. Для определения мутагенного действия препарата клетки китайского хомячка культивировали в среде, содержащей изатизон, в течение 3 сут. Затем часть из них рассеивали на полноценную питательную среду и культивировали в течение 7 сут для выявления эффективности клонирования, а часть клеток культивировали на протяжении 14 дней на селективной среде (как селективный агент использовали 6-меркаптопурин фирмы «Sigma» в конечной концентрации 30 мкг/мл). Контролем служили интактные клетки китайского хомячка.

Влияние различных доз изатизона на митотический режим человеческой эмбриональной ткани изучали, как описано ранее [7]. Аномальные митозы регистрировали по методу [8] в модификации [9] с помощью анафазного анализа.

Действие изатизона на пролиферативную активность лимфоцитов исследовали в суспензионной культуре Т-клеток линии СЕМ-4 по включению аномального основания, тимидинового аналога 5-бром-2-дезоксинуридина (БДУ, «Sigma»), в клеточную ДНК, используя при этом моноклональные антитела против БДУ и комплекс пероксидаза — антипероксидаза (ПАП-комплекс) фирмы «Boehringer Mannheim» (Германия) для иммуноферментного анализа. Результаты учитывали по степени окраски клеток диаминобензидином на денситометре Мультискан МСС-340 («Titertek», Нидерланды).

Для тестирования продукции интерферона под воздействием изатизона клетки линии СЕМ-4 инкубировали в течение 24 ч после действия препарата, а затем культуральную среду проверяли на противовирусную активность в системе вирус везикулярного стоматита — клетки L-929. Титр интерферона выражали в разведениях культуральной среды, ингибирующей репродукцию вируса. В качестве контрольного индуктора интерферона использо-

вали рекомбинантный интерлейкин-2 (НИИ биоорганической химии РАН, Москва), а как стандарт — рекомбинантный интерферон альфа-2 человека (лаферон), любезно предоставленный проф. В. А. Кордюмом (Институт молекулярной биологии и генетики НАН Украины).

Часть экспериментальной работы выполняли на цыплятах-Бройлерах б. Опытную группу в возрасте 30 дней обрабатывали аэрозолем изатизона (в течение трех суток, один раз в сутки) при помощи аппарата ДАГ-3 (40 мин из расчета 1 мл/м³), а контрольную группу — физраствором в той же дозе и экспозиции. На 15-й день после первой обработки у контрольной и опытной птиц из подкрыльцовой вены брали порцию крови для исследований. На 30-й день после начала опыта птиц забивали, и материал отбирали для повторного анализа.

Содержание нуклеиновых кислот в органах иммунной системы анализировали по методу [10]. Кроме того, в процессе эксперимента измеряли прирост живой массы цыплят.

Лимфоциты периферической крови цыплят выделяли в стерильных условиях центрифугированием в градиенте плотности фиколл — верографин [11]. После отмывания клетки ресуспендировали в среде RPMI-1640, содержащей 2 mM L-глутамин («Serva»), 15 mM HEPES («Calbiochem», США) и 20 мкг/мл гентамицина («Sigma»). Клетки в концентрации 1 млн/мл вносили в иммунологические планшеты и инкубировали при 37 °C в течение 72 ч в отсутствие и в присутствии 5 мкг/мл фитогемагглютина (ФГА, «Serva»). Жизнеспособность клеток, которая была не менее 96 %, оценивали при помощи окраски 0,02 %-м раствором трипанового синего («Fluka», Швейцария). Для учета реакции бласттрансформации использовали ³H-тимидин (ПО «Изотоп», С.-Петербург, Россия) с конечной активностью 0,04 МБк/мл. Метку вносили на 4 ч, затем пробы осаждали на фильтры с использованием полуавтоматического харвестера («Titertek», Нидерланды). Радиоактивность образцов измеряли на счетчике «Betaplate» («LKB-Pharmacia», Швеция). Каждую пробу ставили не менее чем в пяти повторностях и результаты подвергали статистической обработке.

Результаты и обсуждение. Анализ экспериментальных данных по изучению влияния изатизона на митотический режим человеческой эмбриональной ткани показал (табл. 1), что препарат в концентрации свыше 100 мкМ вызывал полную деструкцию клеточного монослоя и гибель клеток. При концентрациях изатизона в пределах от 5 до 50 мкМ наблюдалось сохранение клеточного монослоя, однако митотическая активность клеток оказалась достоверно сниженной (табл. 1). Графическая экстраполяция полученных нами результатов показала, что значение ТЦД50 (доза препарата, ингибирующая митотическую активность на 50 %) для изатизона

Таблица 1
Влияние изатизона и вируса герпеса на митотический режим человеческой эмбриональной ткани

Обработка клеток	Митотический индекс, %	Аномальные митозы, %	Производство ВПГ1, lg ТЦД50
Культура клеток (контроль)	6,0±0,04	11,1±3,0	—
Изатизон, 500 мкМ	Дегенерация монослоя	—	—
Изатизон, 50 мкМ	2,0±0,07**	0	—
Изатизон, 5 мкМ	4,6±0,03**	14,3±3,1	—
ВПГ1	1,6±0,06**	25,0±5,1*	6,5
Изатизон, 50 мкМ + ВПГ1	9,0±0,05**	11,2±3,0	0,5
Изатизон, 5 мкМ + ВПГ1	5,3±0,04	18,7±3,7	1,5

* p < 0,01;

** p < 0,001.

равно 20 ± 10 мкМ. Это соответствует литературным данным для метисазона [3]. Аналогичные результаты были получены при исследовании действия препарата на синтез клеточной ДНК (^3H -тимидин использован в качестве предшественника ДНК). Токсичность препарата для разных линий клеток оказалась примерно одинаковой и колебалась в указанных выше пределах значений ТЦД₅₀.

В проведенных нами экспериментах препарат не оказывал существенного влияния на частоту хромосомных aberrаций (табл. 1), что свидетельствует об отсутствии мутагенных свойств у изатизона. Из литературных данных известно, что ВПГ1 обладает мутагенным действием, в том числе на уровне хромосомных aberrаций в инфицированной культуре клеток [9]. В наших экспериментах заражение ВПГ1 также приводило к достоверному возрастанию числа аномальных митозов по сравнению с контролем при одновременном снижении митотического индекса инфицированной культуры (табл. 1). Последнее обусловлено подавлением синтеза клеточной ДНК на фоне возрастания синтеза вирусной ДНК. Применение изатизона вызвало подавление репродукции вируса с одновременным возрастанием митотического индекса инфицированных клеток и снижением частоты аномальных метафаз. То есть в условиях инфицирования препарат обладал антимутагенным действием, блокируя размножение ВПГ1, выступающего в роли мутагенного фактора (табл. 1).

На модели индукции точечных мутаций по гену гуанингипоксантин-фосфорибозилтрансферазы (ГФРТ) мы также не выявили мутагенного действия изатизона. При этом объектом исследования служили культивируемые клетки китайского хомячка. Поскольку для обнаружения мутантов необходима длительная экспозиция клеточных клонов на ростовой среде, мы исследовали токсическое влияние изатизона в условиях хронического опыта. Через 4—6 сут после экспозиции при концентрации изатизона 500 мкМ клетки погибли. Добавление в питательную среду препарата в концентрациях 250 и 125 мкМ приводило к гибели клеток на 10—12-й день. Экспозиция клеток на среде с концентрацией изатизона ниже 12,5 мкМ не отражалась на их жизнеспособности. Поэтому такая концентрация препарата, равная примерно 1/2 ТЦД₅₀ для изатизона, и была избрана для дальнейших экспериментов по индукции точечных мутаций.

Данные по определению эффективности клонирования клеток после трехсуточной экспозиции в присутствии препарата представлены в табл. 2. Из анализа результатов следует, что показатели контроля и опыта достоверно не различаются. Имеющиеся отличия между ними не превышают нормально допустимых отклонений. Таким образом, препарат в концентрации 1/2 ТЦД₅₀ не оказывает влияния на жизнеспособность клеток. Как показали дальнейшие исследования, он не является мутагеном и с точки

Таблица 2
Определение эффективности клонирования клеток в присутствии 12,5 мкМ изатизона

Вариант	Общее число клеток	Число клонов	Показатель эффективности клонирования, %	Отношение опыта/контроль
1. Контроль	750	101	13,47	0,83
Опыт	750	84	11,20	
2. Контроль	750	185	24,67	0,77
Опыт	1000	190	19,00	
3. Контроль	1250	364	29,12	1,62
Опыт	1000	471	47,10	

Таблица 3
Частота мутаций по гену ГФРТ* в присутствии 12,5 мкМ изатизона

Вариант	Число клеток, $\cdot 10^3$	Частота мутаций, $\cdot 10^5$	Отношение опыт/контроль
1. Контроль	50	31,66	0,75
Опыт	50	23,84	
2. Контроль	50	22,46	0,65
Опыт	50	14,66	
3. Контроль	50	17,20	1,22
Опыт	50	20,92	

* ГФРТ — гуанингипоксантинфосфорибозилтрансфераза.

Таблица 4
Бласттрансформация лимфоцитов периферической крови цыплят после обработки изатизоном

Возраст птены, дни	Контроль		Опыт	
	Без ФГА	В присутствии ФГА	Без ФГА	В присутствии ФГА
45	1649,5±198,2	2120,0±120,0	2780,8±287,9*	2212,2±217,3
60	1608,5±158,1	1756,4±236,7	1934,4±236,7	1699,0±163,4

* $p < 0,01$.

зрения индукции генных мутаций (табл. 3). Отклонения между контролем и опытом недостоверны. Из этого следует, что изатизону (и его компонентам) не присуща мутагенная активность и он не содержит заметных мутагенных примесей. Этот факт имеет важное практическое значение с позиции оценки степени риска использования препарата в медицине.

В дальнейшем для выявления митогенных свойств препарата исследовали его влияние на пролиферативную активность суспензионной культуры Т-клеток линии СЕМ-4. Показано, что препарат достоверно стимулировал включение БДУ в ДНК лимфоцитов в зависимости от дозы в пределах концентраций 1/5—1/2 ТЦД50 (максимально — в 2,5 раза).

Исходя из полученных данных мы предположили, что изатизон может усиливать пролиферативную активность лейкоцитов и в условиях *in vivo*. Чтобы удостовериться в этом, была изучена реакция бласттрансформации лейкоцитов периферической крови цыплят после ингаляционного применения препарата. Как видно из данных, представленных в табл. 4, спонтанная пролиферативная активность лимфоцитов периферической крови опытных цыплят (обработанных терапевтической дозой препарата) в возрасте 45 дней достоверно выше, чем у контрольных. Анализ тех же цыплят в 60-дневном возрасте не показал явного увеличения индекса РБТЛ, однако наблюдалась тенденция к возрастанию этого показателя примерно на 20 % по сравнению с контролем. Следует отметить и тот факт, что при изучении влияния митогена ФГА (5 мкг/мл) на лимфоциты птиц, получавших препарат, достоверных различий между опытом и контролем нами не обнаружено.

Изучение влияния изатизона (табл. 5) на синтез нуклеиновых кислот в клетках селезенки продемонстрировало, что препарат с высокой степенью достоверности ($p < 0,001$) стимулировал накопление ДНК и РНК.

Поскольку мы обнаружили стимулирующее действие изатизона на

Таблица 5
Влияние изатизона на содержание нуклеиновых кислот в селезенке 60-дневных цыплят
(мг/г сырой массы)

Нуклеиновая кислота	Контроль	Опыт
ДНК	51,53±6,36	61,73±1,255*
РНК	46,40±1,34	67,17±3,265*

* $p < 0,001$.

лимфоциты как *in vitro*, так и *in vivo*, можно допустить, что он способен усиливать и защитные функции организма, обладая иммуностимулирующим действием. Так как иммуностимуляция обычно сопровождается усилением синтеза ряда эндогенных иммуномодуляторов, в частности интерферона, мы проверили действие препарата на индукцию интерферона в клетках линии СЕМ-4 *in vitro*. При этом не выявлено способности изатизона индуцировать интерферон. Титры интерферона в культуральной среде после обработки клеток препаратом не превышали значений 1 : 40, что существенно не отличалось от необработанного контроля. Стандартные индукторы интерферона (например, рекомбинантный интерлейкин-2) вызывали достоверное увеличение синтеза лейкоцитарного интерферона в 4—100 раз в зависимости от концентраций.

Соответственно полученным нами данным эффект изатизона на пролиферацию клеток различается. Иммунокомпетентные клетки, в частности лимфоциты, реагируют на присутствие нетоксичных доз препарата усилением их пролиферативной активности. С другой стороны, на нелимфоидных клетках других линий, использованных в работе, митогенное действие нетоксичных (антивирусных) концентраций препарата не обнаружено. Такая селективность в биологическом действии изатизона пока непонятна, как и неизвестен механизм его антивирусного действия [3]. Однако, поскольку в условиях как *in vitro*, так и *in vivo* наблюдается иммуностимулирующий и антивирусный эффект препарата [3], можно предположить, что изатизон выступает в роли специфического регулятора клеточных функций, усиливая резистентность отдельных клеток, а также организма в целом к вирусной инфекции. Следствием подобного эффекта может быть существенное возрастание общей резистентности организма животных и птиц, о чем свидетельствуют данные о приросте живой массы. Как показали результаты эксперимента, аэрозольная обработка препаратом способствовала ускорению роста цыплят-бройлеров (в возрасте 45—60 дней) на 15—25 % по сравнению с контролем.

Таким образом, антивирусный препарат изатизон не обладает мутагенным действием и в то же время является иммуностимулятором, селективно усиливая пролиферацию лимфоидных клеток.

Работа выполнена при финансовой поддержке Государственного комитета по вопросам науки и технологий Украины (проект N 1.07.01/003) и Министерства здравоохранения Украины (проект N VA 01001890).

Л. А. Зайка, О. Н. Болсунова, Ю. В. Пацковский,
С. Л. Рубашевский, С. Т. Дядюн, С. Л. Рибалко, А. І. Потопальський

АНТИВИРУСНЫЙ ПРЕПАРАТ ИЗАТИЗОН НЕ СПРИЧИНЯЕТ МУТАГЕННОГО ЭФФЕКТА И СТИМУЛИРУЕТ ПРОЛИФЕРАЦИЮ КЛЕТКИ ИМУННОЙ СИСТЕМЫ

Резюме

На экспериментальных моделях выявляли мутагенную дію антивірусного препарату ізатизону. Показано, що препарат не виявляє мутагенної дії як на рівні хромосомних аберацій, так і

стосовно частоти генних мутацій стійкості до 6-меркаптопурину. В культурі клітин, інфікованих вірусом герпесу простого (тип 1), спостерегами достовірно збільшення частоти хромосомних аберацій. Ізатизон одночасно з пригніченням репродукції вірусу знижував кількість хромосомних аномалій. Під дією препарату виявлено стимуляцію проліферативної активності лейкоцитів як у культурі клітин СЕМ-4, так і в дослідях на курчатах-Бройлерах 6, що корелювало зі збільшенням продуктивності птахів. Припускається, що антивірусна дія ізатизону обумовлена його впливом на інфіковані клітини, а також на клітини імунної системи.

*L. A. Zaika, O. I. Bolsunova, Yu. V. Patskovsky,
E. L. Rubashevsky, S. T. Diadiun, S. L. Ribalko, A. I. Potopalsky*

THE ANTIVIRAL DRUG IZATIZON POSSESSES NO MUTAGENIC ACTION AND STIMULATES PROLIFERATION OF CELLS OF IMMUNE SYSTEM

Summary

It has been studied the mutagenic effect of the antiviral drug Izatizon using experimental models. The drug has been shown to possess no mutagenic activity on the level of both chromosome aberrations and gene resistant mutations to 6-mercaptapurine. On a cell culture infected by Herpes simplex virus, type 1, the increase of chromosome aberrations frequency has been observed. Izatizon, being an inhibitor of the viral infection, simultaneously decreased the frequency of chromosome abnormalities. It is been revealed the selective stimulation of cell proliferation on both T-cell culture of СЕМ-4 line and leukocytes of chicken-Broiler-6, what was correlated with increasing of birds productivity after Izatizon application. Actually, the antiviral effect of Izatizon is due to its influence as on virus-infected cells as on cells of immune system.

СПИСОК ЛІТЕРАТУРИ

1. *Levinson W.* Inhibition of viruses, tumors and pathogenic microorganisms by izatin-thiosemicarbazone and other thiosemicarbazones // *Selective inhibitors of viral functions* / Ed. W.A. Carter. — London: CRC press, 1973.—P. 213—226.
2. *Индулен М. К.* Химические ингибиторы вирусов и механизм их действия // *Изв. АН Латв. ССР.*—1972.—№ 9.—С. 82—87.
3. *Потопальський А. И., Лозюк Л. В., Миролюбова А. Н., Бесарабов Б. Ф.* Противовирусный, противоопухолевый и антилейкозный препарат изатизон. — Киев: Наук. думка, 1991.—192 с.
4. *Рубашевский Е. Л.* Плазмида pBR325tk как мутаген // *Цитология и генетика.*—1986.—20, № 1.—С. 76—78.
5. *Пастер Е. У., Овод В. В., Позур В. К., Вихоть Н. Е.* Иммунология: Практикум. — Киев: Выща шк., 1989.—304 с.
6. *Рубашевский Е. Л., Лукаш Л. Л., Пацковский Ю. В. и др.* Индукция мутаций резистентности к 6-меркаптопурину в клетках китайского комьячка под действием рекомбинантной плазмиды pAins, содержащей ген инсулина человека // *Цитология и генетика.*—1993.—27, № 3.—С. 63—68.
7. *Роскин Г. И., Левинсон М. Б.* Микроскопическая техника. — М.: Медицина, 1957.—С. 189—191.
8. *Алов И. А.* Аномальные митозы // *Вестник АМН СССР.*—1965.—№ 11.—С. 58—62.
9. *Блюмкин В. Н., Жданов В. М.* Влияние вирусов на хромосомный аппарат и деление клеток. — М.: Медицина, 1973.—С. 17—25.
10. *Климов Н. В., Коромыслов Г. Ф.* Метод количественного определения нуклеиновых кислот в крови, ее компонентах и тканях животных // *Бюл. ВИНБМ.*—1970.—Вып. 8.—С. 143—148.
11. *Тейлор П., Томас Д., Миллз Л.* Лимфоциты. — М.: Мир, 1990.—222 с.

Ин-т молекуляр. биологии и генетики НАН Украины, Киев
Киев. НИИ эпидемиологии и инфекц. болезней МЗ Украины

Поступила в редакцию
20.04.95