

Л.Н. Буценко, Н.М. Жолобак

Институт микробиологии и вирусологии им. Д.К. Заболотного НАН Украины,
ул. Академика Заболотного, 154, Киев МСП, Д03680, Украина

ВЛИЯНИЕ АМИКСИНА, ЛОРАМИКСИНА И ИХ КОМПОЗИТОВ С ДРОЖЖЕВОЙ РНК НА СПОНТАННЫЙ И ИНДУЦИРОВАННЫЙ МУТАГЕНЕЗ У *SALMONELLA TYPHIMURIUM*

*Показано, что амиксин, лорамиксин, а также их композиты с дрожжевой РНК достоверно не увеличивают частоту спонтанных мутаций у тест-штамма *S. typhimurium* TA98. Изученные вещества не обладают антимутагенной активностью относительно мутаций, индуцированных бихроматом калия у *S. typhimurium* TA98, а также не увеличивают их количества.*

Ключевые слова: амиксин, тилорон, дрожжевая РНК, *S. typhimurium* TA98, спонтанные мутации, бихромат калия.

На данный момент в Украине и России амиксин (2,7-бис(2-диэтиламиноэтокси)флюорен-9-ОН; тилорон) используется как активный и эффективный лекарственный препарат для профилактики и лечения различных острых респираторных вирусных заболеваний, в т.ч. гриппа, а также гепатитов А и Б, HSV-сосудистых заболеваний и т.д. [1, 5]. На основании исследования его канцерогенного и мутагенного действия в культуре *S. typhimurium* TA1537 был сделан вывод, что, вероятнее всего, тилорон канцерогеном не является, и только в сверхвысоких концентрациях для него характерно очень слабое мутагенное действие [12].

В наших предыдущих исследованиях было показано, что амиксин (тилорон) в комплексе с дрожжевой РНК в концентрациях значительно более низких, чем препарат сам по себе, оказывает выраженное интерферониндуцирующее и противовирусное действие как в культуре клеток, так и в организме экспериментальных животных [7, 8, 9, 10, 14]. В связи с этим, важно было определить влияние как самого комплекса, так и его составляющих на спонтанный и индуцированный мутагенез.

Целью исследования было изучение влияния амиксина, его производного лорамиксина и их композитов с дрожжевой РНК на спонтанный и индуцированный мутагенез у *S. typhimurium*.

Материалы и методы. Объектами исследования была субстанция известного противовирусного препарата амиксина, его производного – лорамиксина (любезно предоставленные к.х.н. С.А. Ляховым, Физико-химический институт им. О.А. Богатского НАН Украины, а также дрожжевая РНК и ее композиты с амиксином и лорамиксином, которые готовили, как описано [8].

© Л.Н. Буценко, Н.М. Жолобак, 2010

Генномоделирующую активность препаратов изучали в стандартном полуколичественном тесте Эймса [11] с тест-штаммом *S. typhymurium* TA98 из Депозитария микроорганизмов Института микробиологии и вирусологии им. Д.К. Заболотного НАН Украины. Тест-штамм *S. typhymurium* TA98 характеризуется наличием мутации в гистидиновом опероне: *hisD3052* (мутация типа сдвига рамки считывания), а также мутациями, повышающими его чувствительность к мутагенам: *LuvrB* – дефект репарационной системы; *rfa* – дефект синтеза липополисахарида, а также плазмиду устойчивости к ампициллину рКМ 101 [15].

С целью определения токсического влияния препаратов на *S. typhymurium* TA98 их вносили в стандартной дозе в мясо-пептонный агар (МПА). На поверхность МПА (контроль) и МПА с препаратами высевали по 0,1 мл суспензии клеток *S. typhymurium* содержащей 10^3 КОЕ/мл. Через 24 час культивирования учитывали количество колоний *S. typhymurium*. Одинаковое количество колоний в опыте и контроле свидетельствовало об отсутствии у препаратов в испытанных концентрациях токсических свойств.

Изучение влияния амиксина, лорамиксина, дрожжевой РНК и их композитов на частоту спонтанных мутаций проводили путем внесения водных растворов исследуемых веществ в соответствующих концентрациях в количестве 0,1 мл в расплавленный полужидкий агар с 0,6 % NaCl одновременно с суспензией клеток *S. typhymurium*. С целью анализа влияния препаратов на индуцированные мутации, 0,1 мл раствора бихромата калия и 0,1 мл раствора препаратов добавляли к расплавленному агару верхнего слоя одновременно с суспензией культуры *S. typhymurium* и вносили в чашку Петри на слой нижнего минимального агара, содержащего: $\text{Na}_3\text{C}_6\text{H}_5\text{O}_7$ – 2 г, KH_2PO_4 – 18 г, K_2HPO_4 – 42 г, $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ – 4 г, глюкоза – 8 г, агар-агар – 20 г, вода дистиллированная – до 1 л. Через 48 часов культивирования при температуре 37 °С учитывали количество колоний ревертантов, возникающих вследствие обратных мутаций от ауксотрофности по гистидину к прототрофности. Антимутагенную активность определяли по проценту уменьшения количества ревертантов, индуцированных бихроматом калия в присутствии препаратов в сравнении с количеством ревертантов, индуцированных только бихроматом.

Статистическая обработка данных произведена в соответствии с рекомендациями [2, 3] с использованием программного комплекса BioStat 2009 Professional 5.8.1. Числовые данные представлены в виде среднего арифметического и стандартной ошибки ($M \pm m$). Нулевую гипотезу для контрольной и опытных групп сравнения проверяли с помощью непараметрических критериев Вилкоксона – Манна – Уитни (U) и Колмогорова-Смирнова. Различия между группами считали статистически значимыми при $p < 0,05$.

Результаты и их обсуждение. Нами изучена генномоделирующая активность амиксина, лорамиксина, дрожжевой РНК и их композитов на модели бактериальной тест-системы с ауксотрофным по гистидину штаммом *S. typhymurium*. Выбор концентраций для исследования был обусловлен полученными ранее данными о токсичности и эффективной дозе указанных веществ в условиях *in vitro* и *in vivo* [7, 8]. В среднем, использованные концентрации растворов в 10 раз превышали их терапевтически эффективные и составили для амиксина и лорамиксина 50 мкг/мл, композитов амиксина или лорамиксина с дрожжевой РНК (1:10 М:М фосфата) – 250 мкг/мл и дрожжевой РНК в концентрации 200 мкг/мл.

Исследование токсического действия растворов амиксина, лорамиксина и их композитов с дрожжевой РНК, как и собственно РНК, не выявило значимых различий в количестве колоний *S. typhymurium* TA98. Проверку нулевой гипотезы об отсутствии статистически значимых различий между контролем (МПА без растворов) и опытными сериями (МПА с растворами исследуемых веществ) проводили, используя непараметрические критерии Вилкоксона-Манна-Уитни и Колмогорова-Смирнова. Значение p при сопоставлении с контролем в экспериментальных сериях составило соответственно $0,5127 < p < 1,000$ и $p = 0,9762$ (табл. 1.), что обосновывает выдвинутую нулевую гипотезу. Исходя из полученных данных, нами сделан вывод, что испытанные концентрации растворов исследуемых веществ не оказывают токсического действия на тест-штамм *S. typhymurium*.

**Влияние РНК, амиксина, лорамиксина, их композитов с дрожжевой РНК
на рост *S. typhimurium* TA98**

Вещества	Испытанные концентрации (мкг/мл)	К-во колоний (M±m)	p (при сопоставлении с контролем)	
			Критерий U	Критерий Колмогорова-Смирнова
контроль	–	83±6,96	–	–
амиксин	50	81±6,07	0,5127	0,9762
лорамиксин	50	79±5,78	0,5127	0,9762
дрожжевая РНК	200	83±4,98	0,8273	0,9762
амиксин+РНК (1:10 М:М фосфата)	250	85±4,58	1,0000	0,9762
лорамиксин+РНК (1:10 М:М фосфата)	250	83±3,06	0,8273	0,9762

Примечание: во всех сериях число опытов составило 3; условие отклонения нулевой гипотезы – уровень значимости $p < 0,05$.

Известно, что спонтанный уровень мутаций является показателем, свидетельствующим о методической точности проведения опытов и качестве использованной культуры *S. typhimurium*. Согласно литературным данным, колебания спонтанного фона мутаций в норме составляют для *S. typhimurium* TA98 от 23 до 85 колоний ревертантов на чашку [6]. При проведении исследований спонтанный фон мутаций, наблюдаемый нами, не выходил за пределы, описанные в литературе.

Для определения мутагенной активности испытанных концентраций растворов нами использован полуколичественный тест Эймса. Эмпирическим критерием наличия мутагенной активности у исследуемых веществ является двукратное превышение количества колоний-ревертантов штамма *S. typhimurium* TA98 в опыте относительно контроля (спонтанный фон мутаций) [4]. Определено, что соотношение количества колоний ревертантов к спонтанному фону мутаций во всех изученных сериях составило 0,92 – 1,18 (табл. 2). На основании полученных результатов можно сделать вывод об отсутствии мутагенной активности у исследуемых веществ. Использование критериев Вилкоксона-Манна-Уитни и Колмогорова-Смирнова для определения вероятности того, что параметры сопоставляемых выборок характеризуют одну и ту же генеральную совокупность показало отсутствие статистически значимых различий ($0,5127 < p < 1,000$ и $p = 0,9762$ соответственно) между уровнем спонтанного фона мутаций тест-штамма *S. typhimurium* TA98 в опытных сериях и в контроле, составившем $28 \pm 2,28$ колоний на чашку.

Таблица 2

**Влияние РНК, амиксина, лорамиксина и их композитов с дрожжевой РНК
на частоту спонтанных мутаций у *S. typhimurium* TA98**

Вещества	Испытанные концентрации (мкг/мл)	К-во колоний-ревертантов (M±m)	М/М спонтанного фона мутаций	p (при сопоставлении со спонтанным фоном мутаций)	
				Критерий U	Критерий Колмогорова-Смирнова
спонтанный фон мутаций	–	$28 \pm 2,28$	–	–	–
амиксин	50	$33 \pm 2,12$	1,18	0,1745	0,6974
лорамиксин	50	$31 \pm 1,70$	1,11	0,3472	0,6974
дрожжевая РНК	200	$28 \pm 2,72$	1,00	1,0000	0,9996
амиксин+РНК (1:10 М:М фосфата)	250	$27 \pm 2,72$	0,96	0,7540	0,9996
лорамиксин+РНК (1:10 М:М фосфата)	250	$26 \pm 1,00$	0,92	0,6015	0,6974

Примечание: во всех сериях число опытов составило 5; условие отклонения нулевой гипотезы – уровень значимости $p < 0,05$.

Использование бихромата калия как мутагена в концентрации 200 мкг/мл вызывало увеличение количества колоний-ревертантов *S. typhimurium* TA98 до $210 \pm 15,59$ колоний на чашку.

ку, что в 7,5 раз больше по сравнению с фоном спонтанных мутаций (табл. 3). Поскольку разницы между количеством ревертантов в опытном и контрольном вариантах не выявлено ($X_{K_2Cr_2O_4}/X$ находилось в пределах 1,01 – 1,16), а значения p при сопоставлении опытных групп с контролем с использованием критериев Вилкоксона-Манна-Уитни ($0,1266 < p < 0,8273$) и Колмогорова-Смирнова ($0,3197 < p < 0,9762$) значительно выше $p = 0,05$, нами сделан вывод, что ни амиксин, ни лорамиксин, ни дрожжевая РНК, ни их композиты не увеличивают частоту мутаций на фоне индуцированного бихроматом калия количества колоний-ревертантов у *S. typhimurium* TA98.

Таблица 3

Влияние РНК, амиксина, лорамиксина и их композитов с дрожжевой РНК на индуцированный бихроматом калия мутагенез у *S. typhimurium* TA98

Вещества	Испытанные концентрации (мкг/мл)	К-во колоний-ревертантов (M±m)	M _{K₂Cr₂O₄} /M	p (при сопоставлении с контролем)	
				Критерий U	Критерий Колмогорова-Смирнова
контроль (M _{K₂Cr₂O₄})	–	210±15,59	–	–	–
спонтанный фон мутаций		28±2,28	7,5	0,009	0,0361
амиксин	50	209±7,51	1,01	0,8273	0,9762
лорамиксин	50	199±15,59	1,06	0,5127	0,9762
дрожжевая РНК	200	181±21,94	1,16	0,2752	0,9762
амиксин+РНК (1:10 M:М фосфата)	250	181±11,55	1,16	0,1266	0,3197
лорамиксин+РНК (1:10 M:М фосфата)	250	195±8,66	1,08	0,3827	0,9762

Примечание: В контрольной и серии, определяющей спонтанный фон мутаций число опытов составило 5, во всех остальных – n = 3; использованная доза бихромата калия – 200 мкг/мл; условие отклонения нулевой гипотезы – уровень значимости $p < 0,05$.

В ряду работ, посвященных изучению биологических свойств тилорона, упоминания о его мутагенном эффекте относятся к 70-м годам прошлого столетия. Вывод о том, что тилорон в высоких концентрациях является очень слабым мутагеном, но не обладает канцерогенными свойствами, был сделан на основании экспериментов с тест-штаммом *S. typhimurium* TA1537, чувствительным к веществам, вызывающим мутацию типа замены пар нуклеотидов [12]. Авторами сделан вывод, что тилорон в высоких концентрациях (2-4 мг/чашку) ревертирует рамку считывания тест-штама TA1537. Используемые концентрации тилорона, выявившие мутагенное действие в культуре *S. typhimurium* TA1537, были в 200 раз выше тех, что вызывали 90 % угнетение жизнеспособности культуры клеток через 24 часа экспозиции [13]. Кроме того, авторы предположили, что наблюдаемая активность может быть связана с возможным присутствием примесей в препарате.

Полученные нами результаты свидетельствуют об отсутствии токсичности испытанных концентраций растворов амиксина, лорамиксина и их композитов с дрожжевой РНК для тест-культуры *S. typhimurium* TA98. Показано, что испытанные растворы не влияют на частоту спонтанных и индуцированных бихроматом калия мутаций в культуре *S. typhimurium* TA98, характеризующейся повышенной частотой мутаций и высокой чувствительностью к мутагенам в связи с наличием мутаций: *hisD3052* – сдвиг рамки считывания, *LuvrB* – дефект репарационной системы, *rfa* – дефект синтеза липополисахарида [15]. Полученные данные, свидетельствующие об отсутствии мутагенного действия исследованных растворов амиксина, лорамиксина и их композитов с дрожжевой РНК, позволяют рассматривать их как безопасные, не обладающие мутагенной активностью, а также являются обоснованием дальнейшего более углубленного изучения их противовирусной эффективности.

Інститут мікробіології і вірусології ім. Д.К. Заболотного НАН України, Київ

**ВПЛИВ АМІКСИНУ, ЛОРАМІКСИНУ ТА ЇХ КОМПЗИТИВ
З ДРІЖДЖОВОЮ РНК НА СПОНТАННИЙ ТА ІНДУКОВАНИЙ
МУТАГЕНЕЗ У *SALMONELLA TYPHYMURIUM***

Резюме

Визначено, що ні аміксин, ні його похідне лораміксин, ні їх композити з дріжджовою РНК, як і власне РНК, достовірно не збільшують частоту спонтанних мутацій у *S. typhimurium* TA98. Виявлено, що вивчені речовини не виявляють антимутагенної активності щодо мутацій, індукованих біхроматом калію у *S.typhimurium* TA98 та не збільшують їх кількість.

Ключові слова: тилорон, аміксин, дріжджова РНК, *S.typhimurium* TA98, спонтанні мутації, мутації, індуковані біхроматом калію.

L.N.Butsenko, N.M.Zholobak

Zabolotny Institute of Microbiology and Virology, National Academy of Sciences of Ukraine, Kyiv

**EFFECT OF AMYXINE, LORAMYXINE AND THEIR COMPOSITES
WITH YEAST RNA ON SPONTANEOUS AND INDUCED
MUTAGENESIS IN *SALMONELLA TYPHYMURIUM***

Summary

It was found out that amyxine, loramyxine and their composites with yeast DNA do not increase reliably the frequency of spontaneous mutations in test-strain *S.typhimurium* TA 98. The studied substances do not possess the antimutagen activity in respect of mutations, induced by potassium bichromate in *S.typhimurium* TA 98 and do not increase their quantity.

The paper is presented in Russian.

К е у w o r d s: amyxine, tiloron, yeast RNA, *S.typhimurium* TA98, spontaneous mutations, potassium bichromate.

The author's address: Butsenko L.M., Zabolotny Institute of Microbiology and Virology, National Academy of Sciences of Ukraine; 154 Acad. Zabolotny St., Kyiv, MSP, D03680, Ukraine.

1. Андронати С.А., Литвинова Л.А., Головенко Н.Я. Пероральный индуктор эндогенного интерферона «Амиксин» и его аналоги // Журн. АМН Украины. – 1999. – 5, № 1. — С. 53–66.
2. Гланц С. Медико-биологическая статистика – М.: «Практика», 1998 – 459 с.
3. Гублер Е.В., Генкин А.А. Применение непараметрических критериев статистики в медико-биологических исследованиях. – М.: «Медицина», 1973. – 142 с.
4. Дуган А.Н., Журков В.С., Абелев С.К. Критерии учета мутагенных эффектов в тесте Эймса // Цитология и генетика. – 1990. – 24, № 6. – С.41–45.
5. Ершов Ф.И., Баткаев Э.А., Головкин В.И., Киселев О.И., Турьянов М.Х. Амиксин. Применение в терапии острых и хронических вирусных заболеваний. Рекомендации для врачей. – М., 1998. – 20 с.
6. Калинина Л.М., Минсеитова С.Р. Мутагенное и ДНК-повреждающее действие бихромата калия в клетках *Escherichia coli* // Генетика. – 1983. – 19, № 12. – С. 1941–1947.
7. Карпов А.В., Жолобак Н.М. Изучение интерферогенных свойств комплексов дрожжевая РНК-тилорон в культуре клеток // Антибиотики и химиотерапия. – 1995. – 40, № 5. – С.20–23.
8. Карпов А.В., Жолобак Н.М. Продукция интерферонов I типа в организме под действием молекулярных комплексов дрожжевая РНК-тилорон // Вopr. вирусологии. – 1996. – № 1. – С. 13–16.
9. Скроцька О.І., Жолобак Н.М., Антоненко С.В., Карпов О.В., Снівак М.Я. Ефективність комплексу дріжджова РНК-тилорон при експериментальному герпетичному менингоенцефаліті // Доповіді НАН України. – 2006. – № 3. – С.181–184.
10. Скроцька О.І., Жолобак Н.М., Антоненко С.В., Снівак М.Я., Карпов О.В. Протигерпетична дія молекулярного комплексу РНК-тилорон у культурі клітин // Мікробіол. журнал. – 2007. – 69, № 3. – С. 62–68.
11. Ames B.A., McCann J., Yamasaki E. Methods for detecting carcinogens and mutagens with the *Salmonella*/mammalian – microsome mutagenicity test // Mutat. Res. – 1975. – 31. – P. 347–364.
12. Benedict W.F., Baker M.S., Haroun L., Choi E., Ames B.N. Mutagenicity of cancer chemotherapeutic agents in the *Salmonella*-microsome test // Cancer Research. – 1977. – 37. – P. 2209–2213.

13. *Benedict, W.F., Banerjee, A., Gardner, A., and Jones, P.A.* Induction of morphological transformation in mouse C3H/10T⁺/Z clone 8 cells and chromosomal damage in hamster A(T)₁C1-3 cells by cancer chemotherapeutic agents // *Cancer Res.* – 1977. – **37**. – P. 2203–2209.
14. *Karpov A.V., Zholobak N.M., Spivak N.Ya., Rybalko S.L., Antonenko S.V., Krivokhatskaya L.D.* Virus-inhibitory effect of east RNA-tilorone molecular complex in cell cultures // *Acta virologica.* – 2001. – **45**.– P.181–184.
15. *McCann J., Spingarn N.E., Kabori J., Ames B.N.* Detection of carcinogens as mutagens: bacterial tester strains with R factor plasmids // *Proc. Nat. Acad. Sci. USA.* – 1975. – **72**, № 3. – P. 979–983.

Отримано 24.04.2009