

ИССЛЕДОВАНИЕ МУТАГЕННОГО ПОТЕНЦИАЛА РНК-СОДЕРЖАЩЕГО ПРЕПАРАТА RN-13 В ТЕСТЕ ЭЙМСА

З. Т. Шульгау, Т. Н. Криворучко, О. В. Толмачева, Ш. Д. Сергазы, Б. А. Сагиндыкова, А. Е. Гуляев

Целью исследования явилась апробация мутагенных свойств РНК-содержащего препарата RN-13 в тесте на индукцию генных мутаций (тест Эймса) на четырех штаммах *Salmonella typhimurium* TA98, TA100, TA1535, TA1537. Ни для одного штамма *Salmonella typhimurium* не обнаружено статистически значимого дозозависимого увеличения числа колоний ревертантов в присутствии исследуемого препарата в изученном диапазоне доз от 4,0 до 40,0 мг/мл относительно базового уровня спонтанных мутаций. РНК-содержащий препарат RN-13 в исследованном диапазоне доз в отношении штаммов TA98, TA100, TA1535, TA1537 *Salmonella typhimurium* мутагенной активностью не обладает.

Ключевые слова: RN-13, РНК-препарат, тест Эймса, мутагенные свойства.

ВВЕДЕНИЕ

Разработка биологически активных субстанций на основе олигонуклеотидов ведется в последние несколько лет довольно интенсивно. Открытие микроРНК (англ. miRNAs, microribonucleic acid) в качестве важных регулирующих агентов для экспрессии генов расширило терапевтические возможности для исследования олигонуклеотидов. Существуют сведения о возможности влияния miRNAs на течение возраст-ассоциированных заболеваний, таких как сердечно-сосудистые и нейродегенеративные заболевания [1–2]. Сформировалась целая область экспериментальной терапии на основе РНК-препаратов, что является предметом нескольких трансляционных исследований [3–5].

Основную массу РНК-препаратов составляют различные варианты микроРНК (mRNAs), получаемых методами РНК-интерференции и составляющих перспективный класс регуляторных молекул, однако определенное значение среди РНК-содержащих субстанций сохраняют и РНК-препараты – «нативные органопрпараты». В качестве типичного примера можно назвать биологически активные субстанции, известные как экстракты РНК. Биологически активные

субстанции на основе РНК в настоящее время благодаря своему уникальному спектру действия широко применяются в качестве биологически активных добавок (БАД). Разнообразное влияние различных видов РНК на отдельные системы отражено в большом количестве данных литературы об использовании нуклеотидов РНК в условиях, когда они являются парамедицинскими препаратами, например, косметическими, гомеопатическими средствами или БАД [6]. В то же время в последние годы начались интенсивные исследования возможности использования РНК в качестве лекарственных средств [7–8].

Следует указать, что ранее РНК-содержащие субстанции в виде органопрепаратов достаточно широко использовались в комплексной терапии различных возраст-ассоциированных болезней. Так, существует целая комбинация парамедицинских препаратов под условным названием «Regeneresen», которые содержат в качестве действующего вещества органоспецифичные РНК из органов молодых телят и РНК из дрожжей. Более 50 лет назад профессор Dyckerhoff начал заниматься в Германии разработкой концепции лечения

STUDY OF MUTAGENIC POTENTIAL OF RNA-CONTAINING DRUG RN-13 IN AMES TEST

Z. T. Shulgau, T. N. Krivoruchko, O. V. Tolmacheva, Sh. D. Sergazy, B. A. Sagindykova, A. E. Gulyaev

The mutagenic properties of the RNA-containing drug RN-13 were studied in the gene mutation induction test (Ames test) on four strains of *Salmonella typhimurium* TA98, TA100, TA1535, TA1537. No statistically significant dose-dependent increase in the number of revertant colonies was observed for any strain of *Salmonella typhimurium* in the presence of the study drug in the studied range of doses from 4.0 to 40.0 mg/ml relative to the baseline level of spontaneous mutations. RNA-containing drug RN-13 in the studied dose range for strains TA98, TA100, TA1535, TA1537 *Salmonella typhimurium* does not have mutagenic activity.

Keywords: RN-13, RNA-containing drugs, Ames test, mutagenic properties.

хронических и дегенеративных заболеваний, основанного на принципе регенерации [6]. Из клеток органов молодых телят он выделил РНК, которые после очистки, стабилизации и стерилизации использовались в лечении хронических и дегенеративных заболеваний в контексте натуропатической медицины последние 60 лет.

Многочисленные описания положительного клинического эффекта препаратов «Regeneresen» содержатся в описаниях германских клиник. Во всех случаях констатируется наличие у РНК-содержащих субстанций способности стимулировать регенеративные процессы при различных, в том числе и возраст-ассоциированных патологических состояниях. Так, в рамках клинических исследований РНК-содержащих препаратов было установлено статистически значимое подавление хронических иммуно-воспалительных реакций, типичных в течение процесса старения организма [6].

Таким образом, известные к настоящему времени свойства РНК в биодобавках послужили толчком к проведению исследований с целью выявления их лечебных свойств и создания на их основе эффективных лекарственных средств. Между тем при активном использовании РНК-препаратов не исключена возможность развития мутагенного эффекта и степень риска должна быть оценена, чему собственно и посвящена настоящая работа.

Цель работы – апробировать мутагенные свойства РНК-содержащего препарата RN-13 в тесте на индукцию генных мутаций (тест Эймса) на четырех штаммах *Salmonella typhimurium* TA98, TA100, TA1535, TA1537.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Объектом исследования явился РНК-содержащий препарат RN-13 (Dyckerhoff Pharma GmbH & Co. KG, Cologne, Germany), который помимо РНК дрожжей содержит РНК крупного рогатого скота из следующих органов: сосудистая стенка, кора головного мозга, сердце, гипофиз, гипоталамус, печень, селезенка, кора надпочечников, почки, яичники, плацента, семенники, таламус. Одна ампула препарата RN-13 объемом 5 мл содержит 6,3 мг натриевой соли рибонуклеиновой кислоты телянка и дрожжей.

Оценка мутагенных свойств РНК-содержащего препарата RN-13 осуществлена в тесте Эймса на *Salmonella typhimurium* в микропланшетном формате (набор Ames MPF™ Penta I, Xenometrix, Switzerland) [9–13]. Штаммы бактерий, входящие в набор, соответствуют требованиям руководства по оценке химических соединений OECD 471.

Для оценки мутагенности в тесте Эймса использовали штаммы бактерий *Salmonella typhimurium*, в гистидиновый оперон которых внесены точковые мутации, ведущие к нарушению синтеза гистидина, и неспособности бактерий к росту на среде, не содержащей гистидин. Индукция в результате мутагенного воздействия обратных мутаций по типу замены пар оснований или сдвига рамки считывания в гене His этих тестерных штаммов приводит к реверсии прототрофности бактерий по этим аминокислотам и способности к росту на безгистидиновой среде. Тестерные штаммы подвергали воздействию различных концентраций исследуемых образцов и выращивали на среде, не содержащей гистидин. Мутагенный потенциал оценивали по индукции ревертантов от ауксотрофности по гистидину к прототрофности, способных к выживанию и росту на безгистидиновой среде. Штаммы *Salmonella typhimurium* TA100, TA1535

позволяют регистрировать индукцию мутаций по типу замены пар оснований, штаммы *Salmonella typhimurium* TA98 и TA1537 – мутаций по типу сдвига рамки считывания [9–13].

Около 107 бактерий *Salmonella typhimurium* подвергали воздействию тестируемого образца в 6 концентрациях (а также воздействию позитивного и негативного контролей) в течение 90 мин (время, достаточное для прохождения двух клеточных делений) в среде, содержащей гистидин. Через 90 мин экспонированные культуры разводили в pH-индикаторной среде, не содержащей гистидин, и разливали по 48 лункам 384-луночной микротитровальной планшеты. В течение двух дней бактерии, претерпевшие реверсию к прототрофности по этим аминокислотам, формировали колонии. Продукты метаболизма бактерий снижали значение pH-индикаторной среды, что приводило к изменению ее цвета в лунках. Для каждой концентрации тестируемого образца проводился подсчет количества лунок с ревертантными колониями, полученные показатели сравнивались с показателем для негативного (растворитель) контроля. Для статистической обработки данных каждая концентрация исследовалась в трех повторностях. Диапазон исследованных доз РНК-содержащего препарата RN-13 составил от 4,0 мг/мл до 40 мг/мл (4, 8, 10, 20, 30 и 40 мг/мл).

Расчеты производили с помощью таблицы калькуляции Excel (Ames_Calculation_Sheet_Ver2_03.xls). Рассчитывали следующие параметры: «среднее число позитивных лунок на концентрацию», которое составляет среднее значение числа позитивных лунок от трех повторностей на одну тестируемую концентрацию; «стандартное отклонение показателя числа позитивных лунок на концентрацию», которое представляет стандартное отклонение среднего значения числа позитивных лунок на тестируемую концентрацию; «кратность превышения относительно нулевой линии», которое определяется как отношение среднего значения числа позитивных лунок на тестируемую концентрацию к нулевой линии негативного (растворитель) контроля. Нулевая линия вычисляется сложением среднего значения числа позитивных лунок для негативного контроля и значения стандартного отклонения. Как правило, кратность превышения числа ревертантов относительно нулевой линии менее чем 2,0 не рассматривается как позитивный эффект, поскольку различия не считаются достоверными. Образец, для которого выявлена концентрационная зависимость эффекта или кратность превышения относительно нулевой линии более чем 2,0, классифицируется как мутаген. T-test Стьюдента (односторонний, непарный) использован для определения статистически значимых различий при уровне $p = 0,05$.

Увеличение количества ревертантных колоний под действием тестируемого образца по сравнению с негативным контролем свидетельствует о том, что образец проявляет мутагенную активность в тесте Ames MPF™ Penta I.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

Диапазон исследованных доз РНК-содержащего препарата RN-13 составил от 4,0 до 40,0 мг/мл (4; 8; 10; 20; 30 и 40 мг/мл). Результаты исследования мутагенных свойств РНК-содержащего препарата RN-13 в тесте Эймса в отношении *Salmonella typhimurium* TA98 представлены в табл. 1.

Результаты исследования мутагенных свойств РНК-содержащего препарата RN-13 в тесте Эймса в отношении *Salmonella typhimurium* TA98

Концентрация РНК-содержащей субстанции RN-13, мг/мл	Число повторностей, n	Среднее количество позитивных лунок, m	Стандартное отклонение показателя числа позитивных лунок, SD	Нулевая линия	Кратность превышения (нулевой линии)	t-test, p-значение (непарный, односторонний)
0	6	6,33	1,03	7,37		
4	3	7,00	2,00		0,95	0,2582
8	3	5,67	0,58		0,77	0,1712
10	3	5,67	1,53		0,77	0,2281
20	3	7,00	1,00		0,95	0,1938
30	3	5,00	4,00		0,68	0,2206
40	3	7,33	1,53		1,00	0,1377
Позитивный контроль (2-нитрофлюорен)	3	48,00	0,00			

Из представленных результатов видно, что РНК-содержащий препарат RN-13 в исследуемом диапазоне доз не способствует увеличению числа колоний ревертантов относительно базового уровня спонтанных мутаций. Среднее количество позитивных лунок не отличается от аналогичного значения в негативном контроле. Кратность превышения относительно нулевой линии в иссле-

дуемом диапазоне доз РНК-содержащего препарата RN-13 составляет менее 2,0, поэтому различия не считаются статистически значимыми (уровень значимости $p > 0,05$).

Результаты исследования мутагенных свойств РНК-содержащего препарата RN-13 в тесте Эймса в отношении *Salmonella typhimurium* TA100 представлены в табл. 2.

Таблица 2

Результаты исследования мутагенных свойств РНК-содержащего препарата RN-13 в тесте Эймса в отношении *Salmonella typhimurium* TA100

Концентрация РНК-содержащей субстанции RN-13, мг/мл	Число повторностей, n	Среднее количество позитивных лунок, m	Стандартное отклонение показателя числа позитивных лунок, SD	Нулевая линия	Кратность превышения (нулевой линии)	t-test, p-значение (непарный, односторонний)
0	6	5,33	1,63	6,97		
4	3	4,67	0,58		0,67	0,2632
8	3	7,00	1,00		1,00	0,0776
10	3	7,33	2,08		1,05	0,0773
20	3	4,33	0,58		0,62	0,1753
30	3	4,67	0,58		0,67	0,2632
40	3	7,00	1,00		1,00	0,0776
Позитивный контроль (N-оксид 4-нитрохиолин)	3	45,33	0,58			

Из представленных результатов видно, что РНК-содержащий препарат RN-13 в исследуемом диапазоне доз не способствует увеличению числа колоний ревертантов относительно базового уровня спонтанных мутаций. Среднее количество позитивных лунок не отличается от аналогичного значения в негативном контроле. Кратность превышения относительно нулевой линии в иссле-

дуемом диапазоне доз РНК-содержащего препарата RN-13 составляет менее 2,0, поэтому различия не считаются статистически значимыми (уровень значимости $p > 0,05$).

Результаты исследования мутагенных свойств РНК-содержащего препарата RN-13 в тесте Эймса в отношении *Salmonella typhimurium* TA1535 представлены в табл. 3.

Результаты исследования мутагенных свойств РНК-содержащего препарата RN-1 в тесте Эймса в отношении *Salmonella typhimurium* TA1535

Концентрация РНК-содержащей субстанции RN-13, мг/мл	Число повторностей, n	Среднее количество позитивных лунок, m	Стандартное отклонение показателя числа позитивных лунок, SD	Нулевая линия	Кратность превышения (нулевой линии)	t-test, p-значение (непарный, односторонний)
0	6	1,50	0,55	2,05		
4	3	1,67	0,58		0,81	0,3423
8	3	2,33	1,53		1,14	0,1248
10	3	1,67	1,53		0,81	0,4045
20	3	2,00	1,00		0,98	0,1753
30	3	1,33	0,58		0,65	0,3423
40	3	1,00	1,00		0,49	0,1753
Позитивный контроль (N ⁴ -аминоцитидин)	3	48,00	0,00			

Из представленных результатов видно, что РНК-содержащий препарат RN-13 в исследуемом диапазоне доз не способствуют увеличению числа колоний ревертантов относительно базового уровня спонтанных мутаций. Среднее количество позитивных лунок не отличается от аналогичного значения в негативном контроле. Кратность превышения относительно нулевой линии в иссле-

дуемом диапазоне доз РНК-содержащего препарата RN-13 составляет менее 2,0, поэтому различия не считаются статистически значимыми (уровень значимости $p > 0,05$).

Результаты исследования мутагенных свойств РНК-содержащего препарата RN-13 в тесте Эймса в отношении *Salmonella typhimurium* TA1537 представлены в табл. 4.

Таблица 4

Результаты исследования мутагенных свойств РНК-содержащего препарата RN-13 в тесте Эймса в отношении *Salmonella typhimurium* TA1537

Концентрация РНК-содержащей субстанции RN-13, мг/мл	Число повторностей, n	Среднее количество позитивных лунок, m	Стандартное отклонение показателя числа позитивных лунок, SD	Нулевая линия	Кратность превышения (нулевой линии)	t-test, p-значение (непарный, односторонний)
0	6	6,33	1,03	7,37		
4	3	7,33	1,53		1,00	0,1377
8	3	6,33	0,58		0,86	0,5000
10	3	6,67	1,15		0,91	0,3363
20	3	5,67	0,58		0,77	0,1712
30	3	7,00	1,73		0,95	0,2414
40	3	7,33	0,58		1,00	0,0852
Позитивный контроль (9-аминоакридин)	3	48,00	0,00			

Из представленных результатов видно, что РНК-содержащий препарат RN-13 в исследуемом диапазоне доз не способствует увеличению числа колоний ревертантов относительно базового уровня спонтанных мутаций. Среднее количество позитивных лунок во всех исследованных концентрациях РНК-содержащего

препарата RN-13 не отличается от аналогичного значения в негативном контроле. Кратность превышения относительно нулевой линии в исследуемом диапазоне доз РНК-содержащей субстанции RN-13 составляет менее 2,0, поэтому различия не считаются статистически значимыми (уровень значимости $p > 0,05$).

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Изучены мутагенные свойства РНК-содержащего препарата RN-13 в тесте Эймса в отношении штаммов *Salmonella typhimurium* TA98, TA100, TA1535, TA1537. Ни для одного штамма *Salmonella typhimurium* не обнаружено статистически значимого дозозависимого увеличения числа колоний ревертантов в присутствии исследуемого препарата в изученном диапазоне доз

от 4,0 до 40,0 мг/мл относительно базового уровня спонтанных мутаций. Таким образом, на основании отрицательного ответа, полученного в тесте Эймса, можно сделать вывод, что РНК-содержащий препарат RN-13 в исследованном диапазоне доз от 4,0 до 40,0 мг/мл (4; 8; 10; 20; 30 и 40 мг/мл) в отношении штаммов TA98, TA100, TA1535, TA1537 *Salmonella typhimurium* мутагенной активностью не обладает.

ЛИТЕРАТУРА

1. Dimmeler S., Nicotera P. MicroRNAs in age-related diseases // *EMBO molecular medicine*. 2013. Vol. 5. № 2. P. 180–190.
2. Smith-Vikos T., Slack F. J. MicroRNAs and their roles in aging // *Journal of cell science*. 2012. Vol. 125. P. 7–17.
3. Baumann V., Winkler J. miRNA-based therapies: strategies and delivery platforms for oligonucleotide and non-oligonucleotide agents // *Future medicinal chemistry*. 2014. Vol. 6. № 17. P. 1967–1984.
4. Sehgal A., Vaishnav A., Fitzgerald K. Liver as a target for oligonucleotide therapeutics // *Journal of hepatology*. 2013. Vol. 59. Issue 6. P. 1354–1359.
5. Zeliadt N. Big pharma shows signs of renewed interest in RNAi drugs // *Nature Medicine*. 2014. Vol. 20. № 2. P.109.
6. Stommel G., Schuehle S., Schuehle K. H., Rainsford K. D. Therapeutic Effects of Ribonucleinate (Ribonucleotides) in Immuno-Inflammatory and Arthritic Diseases // *Prog Drug Res*. 2015. Vol. 70. P. 35–89.
7. Sullenger B. A., Gilboa E. Emerging clinical applications of RNA // *Nature*. 2002. Vol. 418. P. 252–258.
8. Coaker H. Team demonstrates the rational design of drugs from RNA sequence // *Future Med Chem*. 2014. Vol. 6 (5). P. 495.
9. Ames B. N., McCann J., Yamasaki E. Methods for Detecting Carcinogens and Mutagens with the *Salmonella/Mammalian-Microsome Mutagenicity Test* // *Mutation Res*. 1975. Vol. 31. P. 347–364.
10. Maron D. M., Ames B. N. Revised Methods for the *Salmonella Mutagenicity Test* // *Mutation Res*. 1983. Vol. 113. P. 173–215.
11. Gatehouse D., Haworth S., Cebula T., Gocke E., Kier L., Matsushima T., Melcion C., Nohmi T., Venitt S., Zeiger E. Recommendations for the Performance of Bacterial Mutation Assays // *Mutation Res*. 1994. Vol. 312. P. 217–233.
12. Flückiger-Isler S., Kamber M. Direct comparison of the Ames microplate format (MPF) test in liquid medium with the standard Ames pre-incubation assay on agar plates by use of equivocal to weakly positive test compounds // *Mutation Res*. 2012. Vol. 747. № 1. P. 36–45.
13. Kamber M., Flückiger-Isler S., Engelhardt G., Jaekh R., Zeiger E. Comparison of the Ames II and traditional Ames test responses with respect to mutagenicity, strain specificities, need for metabolism and correlation with rodent carcinogenicity // *Mutagenesis*. 2009. Vol. 24. № 4. P. 359–366.

СВЕДЕНИЯ ОБ АВТОРАХ

Шульгау Зарина Токтамысовна – кандидат медицинских наук, заведующая лабораторией токсикологии и фармакологии РГП «Национальный центр биотехнологии», Казахстан, г. Астана; e-mail: shulgau@biocenter.kz.

Криворучко Татьяна Николаевна – научный сотрудник РГП «Национальный центр биотехнологии», Казахстан, г. Астана; e-mail: krivoruchko@biocenter.kz.

Толмачева Ольга Владимировна – заведующая виварием РГП «Национальный центр биотехнологии», Казахстан, г. Астана; e-mail: tolmatcheva@biocenter.kz.

Сергазы Шынгыс Даулетханулы – младший научный сотрудник РГП «Национальный центр биотехнологии», Казахстан, г. Астана; e-mail: shyngys.sergazy@nu.edu.kz.

Сагиндыкова Баян Ахметовна – доктор фармакологических наук, профессор, научный консультант лаборатории токсикологии и фармакологии РГП «Национальный центр биотехнологии», Казахстан, г. Астана; e-mail: sagindik.ba@mail.ru.

Гуляев Александр Евгеньевич – доктор медицинских наук, профессор, научный консультант лаборатории токсикологии и фармакологии РГП «Национальный центр биотехнологии», Казахстан, г. Астана; e-mail: akin@mail.ru.

ABOUT THE AUTHORS

Shulgau Zarina Toktamysovna – PhD (Medicine), Head of Toxicology and Pharmacology Laboratory, National Center for Biotechnology, Astana, Kazakhstan; e-mail: shulgau@biocenter.kz.

Krivoruchko Tatyana Nikolaevna – Researcher, National Center for Biotechnology, Astana, Kazakhstan; e-mail: krivoruchko@biocenter.kz.

Tolmacheva Olga Vladimirovna – Head of the Vivarium, National Center for Biotechnology, Astana, Kazakhstan; e-mail: tolmatcheva@biocenter.kz.

Sergazy Shyngys Dauletkhanuly – Junior Researcher, National Center for Biotechnology, Astana, Kazakhstan; e-mail: shyngys.sergazy@nu.edu.kz.

Sagindykova Bayan Akhmetovna – Doctor of Science (Pharmacy), Professor, Academic Adviser, Toxicology and Pharmacology Laboratory, National Center for Biotechnology, Astana, Kazakhstan; e-mail: sagindik.ba@mail.ru.

Gulyaev Aleksandr Evgenyevich – Doctor of Science (Medicine), Professor, Academic Adviser, Toxicology and Pharmacology Laboratory, National Center for Biotechnology, Astana, Kazakhstan; e-mail: akin@mail.ru.