DOI: http://dx.doi.org/10.18524/2307-4663.2018.1(41).126657

УДК 547.6:57.083.138.4:575.162

Т. О. Філіпова[1], М. Б. Галкін[1], М. Я. Головенко[2]

[1]Одеський національний університет імені І. І. Мечникова,
вул. Дворянська, 2, Одеса, 65082, Україна, тел.: +38 (0482) 63 57 61,
e-mail: tphilippova@ ukr.net
[2]Фізико-хімічний інститут імені О. В. Богатського НАН України
Люстдорфська дорога, 86, Одеса, 65080, Україна

ВИЗНАЧЕННЯ МУТАГЕННИХ ВЛАСТИВОСТЕЙ ТИЛОРОНУ – АКТИВНОГО ФАРМАЦЕВТИЧНОГО ІНГРЕДІЄНТУ АМІКСИНУ, В МІКРОПЛАНШЕТНОМУ ВАРІАНТІ ТЕСТУ ЕЙМСА

Мета *роботи – виявити можливе індукування генних мутацій за дії тилорону – активного фармацевтичного інгредієнту аміксину.* ***Методи.*** *Здатність тилорону викликати генні мутації оцінювали у тесті Еймса на штамах Salmonella typhimurium TA 98 (мутації за типом зсуву рамки зчитування) і TA 100 (точкові мутації типу заміни пар основ). Тилорон використовували у концентраціях 5, 10, 50, 100 та 250 мкг/мл. Як стандартні мутагени застосовували 2-нітрофлуорен для Salmonella typhimurium TA 98 і азид натрію для Salmonella typhimurium TA 100 у тестах без метаболічної активації. У тестах з метаболічною активацією як мутаген для обох штамів використовували 2-аміноантрацен. Експерименти проводили без та з використанням метаболічної активації. У роботі використовували тест-набір Muta-ChromoPlate kit, виробництва фірми Biotoxicity, Канада. Результати оцінювали за кількістю лунок з мутованими клітинами, що реєстрували за зміною забарвлення середовища з пурпурного на жовтий. Токсичність тилорону відносно досліджуваних штамів сальмонел оцінювали при тих самих концентраціях.* ***Результати.*** *Одержані дані показали, що за дії стандартних мутагенів відсоток лунок з мутованими клітинами дорівнював 82–91%, у той час, як у негативному контролі він не перевершував 4,2%. За дії тилорону цей показник знаходився у межах 4–16% і був у 3,3–13,0 рази нижчим за мінімальне значення – 52%, яке за протоколом мікропланшетного тесту є свідченням мутагенної активності. За усіх використаних концентрацій тилорон не впливав на ріст обох досліджуваних штамів Salmonella typhimurium.* ***Висновки.*** *Тилорон у межах використаних концентрацій не викликав генних мутацій і не чинив токсичної дії на штами S. typhimurium TA 98 та TA 100.*

Ключові слова: генні мутації, тест Еймса, тилорон, аміксин.

© Т. О. Філіпова[1], М. Б. Галкін[1], М. Я. Головенко[2], 2018

Аміксин (тилорон) – дигідрохлорид 2,7-біс[2-(диетиламіно)етокси] флуоренон-9 є низькомолекулярним синтетичним індуктором синтезу інтерферону, активність якого при пероральному введенні була вперше доведена в 1970 р. G. Mayer, R. Kruger [13].

Протягом багатьох років біологічні й хімічні властивості даної сполуки уважно вивчаються в багатьох лабораторіях світу. Дослідження тилорону за кордоном на певному етапі принесли суперечливі результати й тому викликали деякий скептицизм відносно його перспективності як протипухлинного імуностимулятора [15]. Однак, більш ніж 30-річний досвід клінічного застосування аміксину свідчить про його безпечність та ефективність до широкого кола захворювань інфекційного та неінфекційного генезу [1, 3]. Препарат здійснює пригнічувальний ефект на процеси репродукції вірусу, блокуючи адсорбцію вірусів; синтез вірус-специфічних білків і складання зрілих вірусних частинок, розпізнаючи і дискримінуючи вірусні інформаційні РНК від клітинних; пригнічує внутрішньоклітинне розмноження вірусів. Саме тому до дії тилорону чутливі практично всі РНК- та ДНК-віруси.

Аналіз робіт, присвячених з'ясуванню механізму дії тилорону і його аналогів, показав [6, 13] відсутність єдиного погляду на дане питання. Це пояснюється, певне, широким спектром його біологічної активності, множинністю мішеней в організмі, здатністю до взаємодії з різними ферментами, мембранами клітин тощо. Біологічні ефекти тилорону *in vitro* спочатку пов'язувалися з його здатністю індукувати інтерферон, проте пізніше було показано відсутність кореляції між рівнем індукованого інтерферону і ступенем противірусного захисту [8].

Було встановлено [19], що однією з ключових стадій біологічної дії тилорону є його взаємодія з нуклеїновими кислотами та олігонуклеотидами. В розчинах тилорон утворює стабільні нековалентні комплекси з ДНК, які виникають завдяки проникненню молекул сполуки між парами основ ДНК (комплекси інтеркалярного типу). Існує припущення, що механізм індукції синтезу інтерферону за допомогою тилорону зумовлено модифікацією інертних гомологічних нуклеїнових кислот в активні стимулятори інтерфероногенезу [12].

Збільшення відстані між парами азотистих основ у місці інтеркаляції ліганду супроводжується зміною кута між цими парами основ, що призводить до локального розкручування подвійної спіралі [10]. Методом мікрокалориметричного титрування було встановлено, що зв'язування з ДНК тилорону є екзотермічним процесом [16]. Основний сприятливий внесок у взаємодію має гідрофобна складова вільної енергії. Стабілізація інтеркаляційного комплексу відбувається в основному за рахунок Ван-дер- ваальсових взаємодій. Такий тип інтеркаляції викликає зміни в топології ДНК (розкручування), що веде до мутацій і впливає на функції ДНК, тому препарати, що вміщують субстанцію тилорону, безумовно, заслуговують на пильну увагу генетиків.

У літературі є суперечливі відомості щодо мутагенності тилорону: від визнання його мутагеном до опису антимутагенних властивостей. Згадки про його мутагенну дію відносяться до 70-х років минулого століття [5]. Автори на підставі експериментів з тест-штамом *S. typhimurium* ТА 1537, чутливим

до речовин, що викликають мутацію типу заміни пар нуклеотидів зазначали, що тилорон у високих концентраціях є дуже слабким мутагеном, але не має канцерогенних властивостей. Крім того, автори припустили, що зазначена активність може бути пов'язана з присутністю домішок у препараті.

З появою в арсеналі дослідників нового, більш чутливого та специфічного методу (SOS-хромотест), заснованого на сучасних уявленнях про механізм мутаційного процесу, як наслідку функціонування SOS-репарації показало [18] відсутність мутагенної дії у тилорону. В іншій роботі [2] було вивчено вплив аміксину на спонтанний та індукований мутагенез у *S. typhymurium*. Отримані авторами результати свідчать про відсутність токсичності випробуваної концентрації (50 мкг/мл) розчину аміксину для тест-культури *S. typhimurium* ТА 98. Показано, що випробуваний розчин не впливає на частоту спонтанних і індукованих біхроматом калію мутацій в культурі *S. typhimurium* ТА 98, яка характеризується підвищеною частотою мутацій і високою чутливістю до мутагенів [14].

У зв'язку з гармонізацією українського і європейського законодавства в галузі регулювання обігу лікарських засобів в Україні зросли вимоги до якості доказової бази з безпеки і, зокрема, генотоксичності лікарських засобів, що відображено в Наказі МОЗ України № 944 від 14.12.2009 р. "Про затвердження порядку проведення доклінічного вивчення лікарськіх засобів та експертизи матеріалів доклінічного вивчення лікарських засобів". Керівний документ Європейського Медичного Агентства [9] рекомендує набір методів, що дозволяють реєструвати всі типи генетичних змін. Особлива увага при цьому приділяється методам тестування речовин з використанням мікроорганізмів, як тест-об’єктів. Вони набули досить широкого застосування, так як мікроорганізми розмножуються швидко, утримувати їх досить просто і порівняно дешево. Одним з експрес-методів для виявлення мутагенної активності є тест Еймса, що базується на використанні штамів *Salmonella typhimurium* ауксотрофних за гістидином та здатних під дією мутагенів ревертувати до прототрофності. Ці тест-штами було сконструйовано Еймсом і співавт. [4] спеціально для скринінгових програм досліджень потенційної мутагенної активності чинників навколишнього середовища. Методами генно-інженерних маніпуляцій в геном бактеріальної клітини були введені спеціальні мутації, що забезпечують, з одного боку, максимальну чутливість тест-організмів до дії мутагенних агентів, молекули яких мають різноманітну величину і форму, з іншого – виявлення мутагенних агентів з різними механізмами дії. Так як малігнізація часто пов'язана з пошкодженням ДНК, цей тест також використовується як експресний метод оцінки канцерогенного потенціалу різних хімічних сполук і може бути доповненням стандартного тесту на гризунах.

Мета даних досліджень – виявити можливе індукування генних мутацій за дії тилорону – активного фармацевтичного інгредієнту аміксину.

Матеріали та методи

В дослідах було використано тилорон тверду порошкоподібну речовину, із високим рівнем розчинення у воді виробництва ТДВ «ІНТЕРХІМ». Сполуку досліджували у концентраціях 5, 10, 50, 100 та 250 мкг/мл. У контроль-

ному фоновому варіанті у лунку вносили відповідний об'єм стерильної води.

Визначення наявності мутагенних властивостей у тилорону проводили у мікропланшетному варіанті тесту Еймса з використанням тест-наборів (Muta-ChromoPlate kit, Biotoxicity, Канада). До їх ключових переваг слід віднести: наявність якісних та сертифікованих штамів *S. typhimurium* TA 98 (мутації за типом зсуву рамки зчитування) і TA 100 (мутації типу заміни пар основ); витрата невеликої кількості досліджуваної хімічної речовини, а також можливість автоматизації низки стадій при проведенні великих скринінгових програм. Зручності надає і те, що цей набір містить стандартизовану постмітоходріальну фракцію (S9) печінки щурів, індукованих Aroclor 1254, та НАДФ-Н генеруючу систему, що дає можливість оцінити активність речовини без та з метаболічною активацією (+S9).

У дослідженні використано флуктуаційний варіант тесту Еймса, який базується на визначенні ревертованих бактерій за їх метаболічною активністю [9]. Негативним контролем є кількість спонтанних ревертантних лунок з проб, що не містили досліджуваної сполуки. Позитивний контроль базується на використанні стандартних мутагенів: 2-нітрофлуорену для *Salmonella typhimurium* TA 98 і азиду натрію для *Salmonella typhimurium* TA 100 у тестах без метаболічної активації. У тестах з метаболічною активацією як мутаген для обох штамів використовували 2-аміноантрацен.

Усі дослідження здійснювали у трьох повторах. Результати враховували при наявності мутагенних ефектів у всіх варіантах позитивного контролю і при нормальному фоновому рівні. Досліди проводили у відповідності до інструкції фірми виробника тест-набору.

Інкубацію тест-штамів *S. typhimurium* з досліджуваними сполуками проводили у 24-лункових планшетах впродовж 100 хв у середовищі з гістидином. У кожному планшеті одну лунку відводили на контроль стерильності, дві лунки на позитивний контроль та по три лунки – на негативний контроль і кожну з концентрацій досліджуваних речовин. По закінченню інкубації матеріал з кожного варіанту досліду вносили у 48 лунок 96-лункових мікропланшетів. Культивування проводили впродовж 72 годин у середовищі з індикатором pH (бромкрезоловий пурпурний), яке не містило гістидину, що забезпечувало ріст тільки ревертованих клітин *S. typhimurium.* Оцінка отриманих даних базувалася на підрахунку кількості лунок, в яких спостерігається зміна кольору середовища з пурпурного на жовтий. Негативним результатом (відсутність мутагенної активності) вважається наявність менш ніж 15 ревертантних лунок серед 48 лунок, позитивним (наявність мутагенної активності) – 25 і більше ревертантних лунок серед 48 лунок і пряма залежність ефекту від концентрації досліджуваної сполуки.

Ріст тест-штамів у присутності різних концентрацій тилорону оцінювали спектрофотометричним методом [17]. Культивування здійснювали у 96-лункових планшетах впродовж доби у середовищі з гістидином, яке забезпечує ріст штамів сальмонел, ауксотрофних за цією амінокислотою. Оптичну густину вимірювали на спектрофотометрі μQuant, (Bio-Tek, США) за довжини хвилі 540 нм.

Для опрацювання вихідних даних розраховували стандартне відхилен-

ня показника числа позитивних лунок на концентрацію. Воно є стандартним відхиленням середнього значення числа позитивних лунок на тестовану конценрацію, і кратність перевищення щодо нульової лінії, яке визначалося як відношення середнього значення числа позитивних лунок на тестовану концентрацію до нульової лінії негативного контролю (розчинник). При цьому нульова лінія обчислювалася складанням середнього числа позитивних лунок для негативного контролю і значення стандартного відхилення.

Результати та їх обговорення

Використана у роботі експериментальна токсикологічна модель відповідала загальним цілям програми досліджень безпеки лікарських засобів і вміщувала визначення дії прямих мутагенів (варіант без метаболічної активації сполук) та промутагенів (ефект, яких пов'язаний з утворенням мутагенних метаболітів), а також аналогічну процедуру для контрольного варіанту, тобто розчинника.

Експерименти проводили в двох паралельних варіантах – без метаболічної активації та з активацією мікросомною сумішшю (S9 mix). У варіантах без метаболічної активації реєстрували дію прямих мутагенів – сполук, які індукують мутації за рахунок активності первинної структури досліджуваної речовини. Дію ж промутагенів – речовин, ефект яких зумовлений утворенням мутагенних метаболітів – реєстрували у варіантах експерименту з метаболічною активацією.

Одержані дані показали, що за дії стандартних мутагенів відсоток лунок з мутованими клітинами дорівнював 82–91%, у той час, як у негативному контролі він не перевершував 4,2%. Типовий вигляд планшету з негативним і позитивними контролями наведений на рисунку.

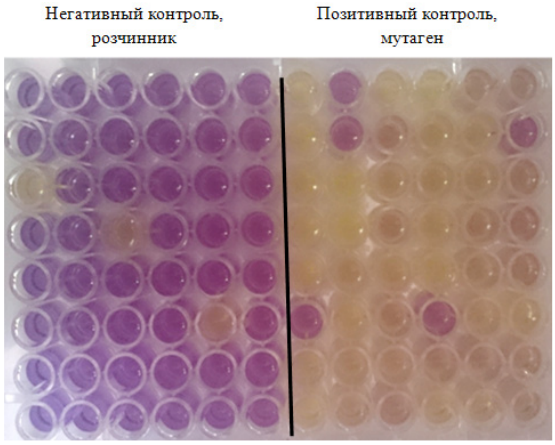

Рис. Фото планшету з негативним і позитивним контролями
Примітка: жовте забарвлення – лунки що містять ревертовані клітини, пурпурне забарвлення – лунки що не містять ревертованих клітин

Fig. Photo of plate with negative and positive control
Note: yellow – wells with revertant cells, purple – wells without revertant cells

Контрольні дані, одержані з використанням штамів *Salmonella typhimurium* ТА 98 і ТА 100 наведені у табл. 1. Стандартними мутагенами для штамів було використано 2-нітрофлуорен та азид натрію, відповідно.

Таблиця 1

Контрольні показники для штамів *Salmonella typhimurium* (кількість лунок з ревертантами серед 48, M ± m, n = 3)

Table 1

Control parameters for *Salmonella typhimurium* strains (number of wells with revertant from 48, M ± m, n = 3)

Варіант	Контроль стерильності	Негативний контроль (розчинник)	Позитивний контроль (мутаген)
ТА 98 без активації	0	1,0 ± 0	39,5 ± 3,0*
ТА 98 з активацією	0	1,7 ± 0,3	43,3 ± 3,7*
ТА 100 без активації	0	2,0 ± 0,4	43,5 ± 2,0*
ТА 100 з активацією	0	1,3 ± 0,2	41,0 ± 3,7*

Примітка: * – різниця достовірна у порівнянні з негативним контролем
Note: * – the differences were significant in comparison with negative control

Як показують результати експериментів, у контрольному (негативному) варіанті частота спонтанних мутацій не перевищувала стандартного рівня, відповідного до генетичних особливостей кожного з референтних штамів [14]. Для обох штамів нами отримано (табл. 1) близькі за значенням дані щодо контролю стерильності, негативного контролю (розчинник) та позитивного контролю (відповідні мутагени).

Незважаючи на те, що в обох випадках дані дослідження мутагенної активності зразків тилорону (табл. 2) дещо перевищують аналогічні показники контролю (табл. 1), можна зробити висновок, що в межах чутливості даного методу, сполука не є мутагеном прямої або непрямої дії, яка спроможна індукувати мутації типу зсуву рамки зчитування генетичної інформації або заміни пар основ.

Таблиця 2

Активність тилорону у тесті Muta-ChromoPlate kit з *S. typhimurium* (кількість лунок з ревертантами серед 48, M ± m, n = 3)

Table 2

Activity of tilorone in the test Muta-ChromoPlate kit with *S. typhimurium* (number of wells with revertant from 48, M ± m, n = 3)

Варіант	Концентрація тилорону, мкг/мл				
	5	10	50	100	250
ТА 98 без активації	3,7 ± 0,4	4,0 ± 0,5	4,3 ±0,4	5,7 ± 1,3	4,7 ± 0,6
ТА 98 з активацією	3,3 ± 0,6	4,3 ± 0,3	3,3 ± 0,2	3,7 ± 1,1	2,3 ± 0,3
ТА100 без активації	5,7 ± 0,3	6,0 ± 0,7	7,0 ± 1,0	6,7 ± 0,5	7,7 ± 0,7
ТА 100 з активацією	2,0 ± 0,0	6,0 ± 0,5	3,3 ± 0,4	4,0 ± 0,3	2,0 ± 0,3

Негативний результат у тесті з активацією свідчить про відсутність мутагенної активності також у метаболітів досліджуваної сполуки. Цей факт не є незвичайним так як відомо, що тилорон піддається незначному окисному метаболізму (N-деалкілюванню) в організмах експериментальних тварин та людини і не утворює реакційноздатних метаболітів [11].

З метою встановлення можливого токсичного впливу аміксину на досліджувані штами, що є необхідним для валідації тест-методу, визначали ріст *S. typhimurium* TA 98 і TA 100 у присутності вивчених у тестах на мутагенність концентрацій сполуки. Культивування здійснювали впродовж 24 годин у рідкому живильному середовищі. Ріст штамів *S. typhimurium* оцінювали спектрофотометрично. Результати цього дослідження наведені у табл. 3.

Таблиця 3

Вплив тилорону на ріст тест-штамів *Salmonella typhimurium* ($ОГ_{540}$, M±m, n=3)

Table 3

Influence of tilorone on the growth of *Salmonella typhimurium* strains (OD_{540}, M±m, n=3)

Штам	Контроль	Концентрація, мкг/мл				
		5	10	50	100	250
TA 98	0,64± 0,07	0,64±0,06	0,62±0,07	0,63±0,06	0,63±0,05	0,65±0,05
TA 100	0,38 ± 0,05	0,39±0,03	0,38±0,04	0,38±0,02	0,37±0,04	0,37±0,03

Отримані результати показали, що тилорон за усіх використаних концентрацій не впливає на ріст обох досліджуваних штамів *Salmonella typhimurium.* Тобто, аміксин не є токсичним для тест-штамів у діапазоні концентрацій 5–250 мкг/мл.

Аналіз отриманих результатів показав, що досліджувана речовина не виявила здатності індукувати генні мутації у використаних нами тест-організмів. Система метаболічної активації також не була ефективною, тобто, тилорон не є ні «прямим», ні «непрямим» мутагеном для штамів *S. typhimurium.* Незначне перевищення середнього числа ревертантів у дослідах щодо контролю (табл. 1–3) статистично є недостовірним. Чутливість обох тест-штамів щодо досліджуваних речовин виявилася приблизно однаковою, тобто перевищення контрольних значень в обох варіантах дослідів практично не мінялося, що свідчить про однозначність дії цих сполук. Загальним для всього експерименту також є відсутність перевищення числа ревертантів в дослідних варіантах на максимальних дозах. Додаткове тестування цих сполук у різних концентраціях на ріст штамів *Salmonella typhimurium* показало відсутність такої дії.

Таким чином, дані, отримані в ході проведення мікропланшетного варіанту тесту Еймса (Muta-ChromoPlate kit) на штамах *Salmonella typhimurium* TA 98 і TA 100 свідчать про відсутність мутагенної активності тилорону у вивчених концентраціях, що підтверджує дані отримані іншими авторами [2, 18], з використанням інших методичних прийомів. У зв'язку з цим, наявність у препарату канцерогенних властивостей, пов'язаних з генотоксичністю, є також малоймовірною.

Т. О. Филиппова[1], Н. Б. Галкин[1], Н. Я. Головенко[2]
[1]Одесский национальный университет имени И.И. Мечникова,
ул. Дворянская, 2, Одесса, 65082, Украина, тел.: +38 (0482) 63 57 61,
e-mail: tphilippova@ ukr.net
[2]Физико-химический институт имени А.В. Богатского НАН Украины
Люстдорфская дорога, 86, Одесса, 65080, Украина

ОПРЕДЕЛЕНИЕ МУТАГЕННЫХ СВОЙСТВ ТИЛОРОНА – АКТИВНОГО ФАРМАЦЕВТИЧЕСКОГО ИНГРЕДИЕНТА АМИКСИНА, В МИКРОПЛАНШЕТНОМ ВАРИАНТЕ ТЕСТА ЭЙМСА

Реферат

Цель *работы – выявить возможность индукции генных мутаций при действии тилорона – активного фармацевтического ингредиента амиксина.* ***Методы.*** *Способность тилорона вызывать генные мутации оценивали в тесте Эймса на штаммах Salmonella typhimurium TA 98 (мутации типа сдвига рамки считывания) и TA 100 (точечные мутации типа замены пар оснований). Тилорон исследовали в концентрациях 5, 10, 50, 100 та 250 мкг/мл. В качестве стандартных мутагенов использовали 2-нитрофлуорен для Salmonella typhimurium TA 98 и азид натрия для Salmonella typhimurium TA 100 в тестах без метаболической активации. В тестах с метаболической активацией мутагеном для обоих штаммов служил 2-аминоантрацен. Эксперименты проводили без и с использованием метаболической активации. В работе использовали тест-набор Muta-ChromoPlate kit, производства фирмы Biotoxicity, Канада. Токсичность тилорона в отношении использованных штаммов сальмонелл оценивали при тех же концентрациях.* ***Результаты.*** *Полученные данные показали, что при действии стандартных мутагенов процент лунок с мутировавшими клетками достигал 82–91%, в то время как в отрицательном контроле он не превышал 4,2%. При действии тилорона этот показатель находился в границах 4–16% и был в 3,3–13,0 раз ниже минимального значения – 52%, которое по протоколу микропланшетного теста является свидетельством мутагенной активности. При всех использованных концентрациях тилорон не влиял на рост обоих штаммов Salmonella typhimurium.* ***Выводы.*** *Тилорон в интервале использованных концентраций не вызывал генных мутаций и не оказывал токсического действия на штаммы S. typhimurium TA 98 и TA 100.*

Ключевые слова: генные мутации, тест Эймса, тилорон, амиксин.

T. O. Filipova[1], M. B. Galkin[1], M. Ya. Golovenko[2]
[1]Odesa National Mechnykov University,
2, Dvoryanska str, Odesa, 65082, Ukraine, phone: +38 (0482) 63 57 61,
e-mail: tphilippova@ukr.net
[2]A.V. Bogatsky Physico-Chemical Institute of NASU
86, Lustdorfska doroga, Odessa, 65080, Ukraine

MUTAGENIC ACTIVITY OF TILORONE – ACTIVE PHARMACEUTICAL SUBSTANCE OF AMIXIN IN MICROTITER PLATE VARIANT OF AMES TEST

Summary
Aim *– to discover potential mutagenic activity of tilorone – active pharmaceutical substance of amixin.* ***Methods.*** *Mutagenic activity of tilorone was studied in the Ames test on Salmonella typhimurium TA 98 (frame-shift mutations) and TA 100 (Dot mutations – base pars change). Tilorone was examined in concentrations 5, 10, 50, 100 and 250 μg/ml. As standard mutagens, 2-nitrofluorene was used for Salmonella typhimurium TA 98 and sodium azide for Salmonella typhimurium TA 100 in tests without metabolic activation. In tests with metabolic activation, mutagen for both strains served as 2-aminoanthracene. The experiment was carried out with and without metabolic activation. In this work Muta-ChromoPlate kit (Biotoxicity, Canada) was used. Tilorone toxicity against salmonella strains was calculated at the same concentrations.* ***Results.*** *The obtained data show that in presence of standard mutagenic compounds amount of wells with mutated cells were 82–91%. At the same time in negative control this amount was not higher than 4.2%. In presence of tilorone amount of wells where mutated cells were detected, it was 4–16% – 3.3–13.0 times lower then the minimum value – 52%, which, according to protocol of micro titer plate test, is the evidence of mutagenic activity. In presence of all tilorone concentrations there is not any inhibition of bath growth of used Salmonella typhimurium strains.* ***Conclusions.*** *Tilorone in the range of used concentration did not posses any mutagenic activity or toxicity on S. typhimurium TA 98 та TA 100.*

Key world: genetic mutation, Ames test, tilorone, amixin.

СПИСОК ВИКОРИСТАНОЇ ЛІТЕРАТУРИ

1. *Бабаченко И. В., Левина А. С., Ушакова Г. М., Копылова А. В.* Опыт применения Амиксина® в комплексной терапии хронических герпесвирусных инфекций у часто болеющих детей // Детские инфекции. – 2012. – Т. 11, № 2. – С. 34–37.

2. *Буценко Л. Н., Жолобак Н. М.* Влияние амиксина, лорамиксина и их композитов с дрожжевой РНК на спонтанный и индуцированный мутагенез у *Salmonella typhymurium* // Мікробіол. журн. – 2010. – Т. 72, № 4. – С. 44–49.

3. *Жолобак Н. М.* Состояние и перспективы современной противовирусной терапии // Научный медицинский вестник. – 2016. – № 1(3). – С. 89–105.

4. *Ames B. N., McCann J., Yamasaki E.* Method for Detecting Carcinogens and Mutagens with the Salmonella mammalian-microsome mutagenicity test // Mutat. Res. – 1975. – V. 161. – P. 347–364.

5. *Benedict W. F., Baker M. S., Haroun L., Choi E., Ames B. N.* Mutagenicity of cancer chemotherapeutic agents in the Salmonella-microsome test // Cancer Res. –1977. – V. 37. – P. 2209–2213.

6. *Chandra P., Woltersdorf M., Wright G. J.* Tilorone hydrochloride. Ed.: F.E. Hahn, In: Antibiotics V/2, Mechanism of Action of Antieukaryotic and Antiviral Agents. Ed.: F.E. Hahn, Springer, Berlin. 1979, P. 385–413.

7. *Curieux F., Marzin D., Erb F.* Study of the genotoxic activity of five chlorinated propanones using the SOS chromotest, the Ames-fluctuation test and the newt micronucleus test // Mutat. Res. – 1994. – V. 341. – P. 1–15.

8. *Giron D. J., Schmidt J. H., Pindak F. F.* Tilorone hydrochloride: Lack of correlation between interferone induction and viral protection // Antimicrob. Agents and Chemoterapy. – 1972. – V. 1, № 1. – P. 78–79.

9. *Guidance* for Industry. S2(R1) Genotoxicity Testing and Data Interpretation for Pharmaceuticals Intended for Human Use. June 2012. ICH. 31 p.

10. *Hendry L. B., Mahesh V. B., Bransome E. D. Jr., Ewing D. E.* Small molecule intercalation with double stranded DNA: Implications for normal gene regulation and for predicting the biological efficacy and genotoxicity of drugs and other chemicals // Mutat. Res. – 2007. – V. 623. – P. 53–71.

11. *Hoenig V, Préteux F.* Hepatic disposition of tilorone hydrochloride in the rat // Xenobiotica. – 1977. – V. 7(6). – P. 339–344.

12. *Johnston M., Stollar B, Torrence P., Witkop B.* Structural features of double-stranded polyribonucleotides required for immunological specificity and interferon induction. (antibody to double-stranded RNA/recognition of nucleic acids) // PNAS. – 1975. – V. 72, No. 11. – P. 4564–4568.

13. *Mayer G., Kruger R.* Tilorone hydrochloride: mode de action // Science. – 1970. – V. 169. – P. 1214–1215.

14. *McCann J., Spingarn N. E., Kobori J., Ames B. N.* Detection of carcinogens as mutagens: bacterial tester strains with R factor plasmids // PNAS. – 1975. – 72, № 3. – P. 979–983.

15. *Munson A. E., Munson J. A., Regelson W., Wampler, G. L.* Effect of Tilorone Hydrochloride and Congeners on Reticuloendothelial System, Tumors, and the Immune Response // Cancer Res. – 1972. – V. 32, № 7. – P. 1397–1403.

16. *Nishimura T., Okobira T., Kelly A. M.* et al. DNA binding of tilorone: 1H NMR and calorimetric studies of the intercalation // Biochemistry. – 2007. – V. 46, №. 27. – P. 8156–8163.

17. *Physical* Methods for Microorganisms Detection / Ed.: Wilfred H. Nelson. CRC Press Inc. 1991, 155 p.

18. *Rempola B., Demkowicz-Dobrzafiski K., Fikus M.* Genotoxicity assessment of low-molecular weight interferon inducers by the SOS Chromotest // Mutat. Res. – 1986. – V. 172. – P. 47–50.

19. *Sturm J., Srieber L., Daune M.* Binding of ligands to a one-dimensional heterogeneous lattice II. Intercalation of tilorone with DNA and polynucleotide // Biopolymers. – 1981. – V. 20. – P. 765–782.

Referens

1. Babachenko I. V., Levina A. S., Ushakova G. M., Kopylova A. V. The experience of Amixin® in the treatment of chronic herpes virus infections in sickly children. Childrens Infections. 2012;11(2):34–37. (In Russian)

2. Butsenko LN, Zholobak NM. Effect of Amyxine, Loramyxine and Their Composites with Yeast RNA on Spontaneous and Induced Mutagenesis in Salmonella typhymurium. Microbiol. Zhurn. 2010;72(4):44–49. (In Russian)

3. Zholobak N. M. The state and prospects of the modern-day antiviral therapy. Scientific Medical Bulletin. 2016;1(3):89–105. (In Russian)

4. Ames BN., McCann J, Yamasaki E. Method for Detecting Carcinogens and Mutagens with the Salmonella mammalian-microsome mutagenicity test. Mutat. Res. 1975;161:347–364.

5. Benedict WF, Baker MS, Haroun L, Choi E, Ames BN. Mutagenicity of cancer chemotherapeutic agents in the Salmonella-microsome test. Cancer Res. 1977;37: 2209–2213.

6. Chandra P, Woltersdorf M, Wright GJ. Tilorone hydrochloride. Ed.: F.E. Hahn, In: Antibiotics V/2, Mechanism of Action of Antieukaryotic and Antiviral Agents. Ed.: F.E. Hahn, Springer, Berlin, 1979:385–413.

7. Curieux F, Marzin D, Erb F. Study of the genotoxic activity of five chlorinated propanones using the SOS chromotest, the Ames-fluctuation test and the newt micronucleus test. Mutat. Res. 1994;341:1–15.

8. Giron DJ, Schmidt JH, Pindak FF. Tilorone hydrochloride: Lack of correlation between interferone induction and viral protection Antimicrob. Agents and Chemoterapy. 1972;1(1):78–79.

9. Guidance for Industry. S2(R1) Genotoxicity Testing and Data Interpretation for Pharmaceuticals Intended for Human Use. June 2012. ICH. 31 p.

10. Hendry LB, Mahesh VB, Bransome EDJr, Ewing DE. Small molecule intercalation with double stranded DNA: Implications for normal gene regulation and for predicting the biological efficacy and genotoxicity of drugs and other chemicals. Mutat. Res. 2007;623:53–71.

11. Hoenig V, Préteux F. Hepatic disposition of tilorone hydrochloride in the rat. Xenobiotica. 1977;7(6):339–344.

12. Johnston M, Stollar B, Torrence P, Witkop B. Structural features of double-stranded polyribonucleotides required for immunological specificity and interferon induction. (antibody to double-stranded RNA/recognition of nucleic acids) PNAS. 1975:72(11):4564–4568.

13. Mayer G, Kruger R. Tilorone hydrochloride: mode de action. Science. 1970;169:1214–1215.

14. McCann J, Spingarn NE, Kobori J, Ames BN. Detection of carcinogens as mutagens: bacterial tester strains with R factor plasmids. PNAS. 1975;72(3): 979–983.

15. Munson AE, Munson JA, Regelson W, Wampler, GL. Effect of Tilorone Hydrochloride and Congeners on Reticuloendothelial System, Tumors, and the Immune Response. Cancer Res. 1972;32(7):1397–1403.

16. Nishimura T, Okobira T, Kelly AM. et al. DNA binding of tilorone: 1H NMR and calorimetric studies of the intercalation. Biochemistry. 2007;46(27):8156–8163.

17. Physical Methods for Microorganisms Detection / Ed.: Wilfred H. Nelson. CRC Press Inc., 1991:155 p.

18. Rempola B, Demkowicz-Dobrzafiski K, Fikus M. Genotoxicity assessment of low-molecular weight interferon inducers by the SOS Chromotest. Mutat. Res. 1986;172:P. 47–50.

19. Sturm J, Srieber L Daune M. Binding of ligands to a one-dimensional heterogeneous lattice II. Intercalation of tilorone with DNA and polynucleotide. Biopolymers. 1981;20:765–782.

Стаття надійшла до редакції 14.02.2018 р.