
ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНЫЕ СТАТЬИ

ОЦЕНКА ЗАВИСИМОСТИ “ДОЗА–ОТВЕТ” ПРИ ГЕНОТОКСИЧЕСКОМ
ВОЗДЕЙСТВИИ МИТОМИЦИНА С НА ПРИМЕРЕ
АроЕ-НОКАУТНЫХ МЫШЕЙ

© 2023 г. М. А. Асанов¹*, Д. К. Шишкова¹, А. О. Поддубняк¹, М. Ю. Синицкий¹,
А. В. Синицкая¹, М. В. Хуторная¹, А. В. Понасенко¹

¹ Научно-исследовательский институт комплексных проблем сердечно-сосудистых заболеваний,
Кемерово, Россия

*E-mail: asmaks988@gmail.com

Поступила в редакцию 15.06.2023 г.

После доработки 25.08.2023 г.

Принята к публикации 25.08.2023 г.

Полихроматофильные эритроциты (ПХЭ) являются подходящей мишенью для оценки уровня острого и хронического генотоксического стресса в моделях *in vivo*. Для индукции генотоксического стресса в эксперименте широко применяется митомицин С (ММС) — алкилирующий агент, приводящий к образованию поперечных сшивок молекулы ДНК. Микроядерный тест в полихромных эритроцитах хорошо зарекомендовал себя в качестве стандартного анализа для оценки генотоксических эффектов на хромосомном уровне у мышей. Вместе с тем большинство имеющихся исследований направлено на изучение острого генотоксического стресса, обусловленного высокими дозами мутагенов, в то время как исследования, направленных на изучение хронического воздействия ММС, крайне мало. Цель данного исследования — определение генотоксического потенциала ММС без цитотоксического эффекта при хроническом воздействии на мышей, нокаутных по гену аполипопротеина Е (АроЕ^{-/-}). В исследование были включены четыре группы АроЕ-нокаутных мышей, получавших инъекции двух различных доз ММС (0.1 и 0.5 мг/кг) в хвостовую вену один и три раза в неделю, а также две контрольные группы. Каждая группа состояла из четырех самок и одного самца. Для оценки генотоксических эффектов готовили препараты костного мозга, на каждом образце подсчитывали 1000 ПХЭ, выявляли ПХЭ с микроядрами и рассчитывали долю ретикулоцитов. Доза 0.5 мг/кг показала явный цитотоксический эффект, выраженный в нарушении эритропоэза, а именно в уменьшении доли ретикулоцитов. Доза 0.1 мг/кг вызывала выраженный генотоксический, но не цитотоксический эффект. Полученные в ходе настоящего исследования результаты могут быть полезны при выборе дозы ММС для проведения экспериментов, требующих моделирования хронического генотоксического стресса у лабораторных животных.

Ключевые слова: микроядра, генотоксические эффекты, эритроциты, ретикулоциты, митомицин С

DOI: 10.31857/S0869813923090029, **EDN:** OSJMIA

ВВЕДЕНИЕ

Митомицин С (ММС) — противоопухолевый антибиотик, обнаруженный в 1950-х годах в ферментированных культурах *Streptomyces caespitosus* и широко используемый при лечении онкологических заболеваний [1]. Как алкилирующий

агент ММС оказывает цитотоксическое и генотоксическое воздействие на клетки млекопитающих. На молекулярном уровне восстановительная активация ММС приводит к образованию его производного, митозена, который посредством реакции N-алкилирования взаимодействует с молекулой ДНК, приводя к образованию поперечных сшивок между ее нитями. Кроме того, ММС может инициировать образование активных форм кислорода и азота, вызывающих окислительный и нитрозивный стресс [2–4]. Кроме того, ММС в низких дозах является причиной преждевременного клеточного старения [5]. Следует отметить, что большинство имеющихся исследований направлено на изучение острого генотоксического стресса, обусловленного высокими дозами ММС [6, 7], в то время как исследований, направленных на изучение хронического воздействия ММС, крайне мало.

Микроядерный тест *in vivo* хорошо зарекомендовал в качестве стандартного анализа для оценки генотоксических эффектов на хромосомном уровне у различных лабораторных животных, при этом мыши являются наиболее широко используемыми в подобных экспериментах видами грызунов [8], а полихроматофильные эритроциты (ПХЭ) являются подходящей мишенью для оценки уровня острого и хронического генотоксического стресса [9]. Особый интерес представляет изучение уровня генотоксического стресса у гиперлипидемических мышей, нокаутных по гену аполипопротеина Е (ApoE^{-/-}), используемых при изучении патогенеза различных сердечно-сосудистых заболеваний [10, 11]. Ряд проведенных ранее экспериментов показал, что ММС-индуцированный генотоксический стресс может приводить к развитию эндотелиальной дисфункции (являющейся триггером атеросклероза) в экспериментах *in vitro* [12, 13], при этом остается неизученным вопрос, будет ли ММС вызвать схожие эффекты у лабораторных животных.

Целью данного исследования явилось определение генотоксического потенциала ММС без цитотоксического эффекта при хроническом воздействии на ApoE-нокаутных мышах.

МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Моделирование генотоксического стресса

В исследование были использованы ApoE-нокаутные мыши в возрасте 1.5 года, полученные из вивария отдела экспериментальной медицины НИИ комплексных проблем сердечно-сосудистых заболеваний (Кемерово, Россия). Были сформированы четыре экспериментальные группы, включавшие по пять мышей (четыре самки и один самец), получавших инъекции двух различных доз ММС (AppliChem, Испания, 0.1 и 0.5 мг/кг) в хвостовую вену один и три раза в неделю в течение месяца, а также две контрольные группы (получавшие инъекции 0.9%-ного раствора NaCl один и три раза в неделю на протяжении всего эксперимента). Раствор ММС готовили непосредственно перед использованием (*ex tempore*). Дозы ММС определяли эмпирически с учетом литературных данных [14, 15]. Дозу препарата, рассчитанную для каждого животного, разводили в 0.9%-ном растворе NaCl. В ходе эксперимента животных перед введением препарата взвешивали и корректировали дозы препарата. Еда и вода были доступны на протяжении всего эксперимента.

Преимущество в количестве самок в исследуемых группах было обосновано тем, что самки данной линии характеризуются более медленным развитием атеросклероза.

Извлечение костного мозга

Эвтаназия животных осуществлялась с применением двуокси углерода. Вскрытие проводили через семь дней от последнего введения ММС. После выделения



Рис. 1. Препарат смыва костного мозга из бедренной кости мышей (а – нормохроматофильный эритроцит; b – полихроматофильный эритроцит с микроядром; с – полихроматофильный эритроцит без аномалий).

бедренной кости и ее полного очищения от мышечной ткани, удаляли эпифизы, проводили смыв костного мозга 1 мл эмбриональной телячьей сыворотки (Sigma-Aldrich, США). Полученную суспензию центрифугировали при 1000 об./мин на протяжении 5 мин, надосадочную жидкость удаляли и добавляли 500 мкл свежей сыворотки, после чего снова центрифугировали и частично удаляли надосадочную жидкость, оставляя примерно 50–100 мкл.

Подготовка цитогенетических препаратов

Небольшую каплю полученной суспензии с помощью дозатора помещали на край обезжиренного предметного стекла и растягивали каплю по всей его поверхности с помощью другого предметного стекла. После высушивания на воздухе препараты фиксировали метанолом в течение 5 мин. Препараты окрашивали 2%-ным раствором красителя Гимза в течение 10 мин, промывали проточной водой и высушивали на воздухе.

Анализ цитогенетических препаратов

Препараты анализировали на микроскопе Axiostar Plus (Zeiss, Германия) при увеличении в 1000 раз. На каждом препарате подсчитывали 200 эритроцитов, определяли количество нормохроматофильных эритроцитов и ПХЭ, после чего рассчитывали долю ПХЭ. Для оценки уровня генотоксического стресса на каждом препарате подсчитывали еще 1000 ПХЭ и отмечали ПХЭ с микроядрами (МЯ) (рис. 1).

Статистический анализ

Статистический анализ проводили с использованием программного обеспечения StatSoft STATISTICA 10.0. Оценка нормальности распределения по методу Колмогорова–Смирнова показало, что распределение данных по всем изученным показателям не соответствует нормальному. Следовательно, для сравнения групп

применяли Н-критерий Краскела–Уоллиса. Различия между группами считали значимыми при $p < 0.05$.

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

В результате проведенного исследования было показано несколько достоверных различий по уровню ПХЭ с МЯ между экспериментальными и контрольными группами (рис. 2а). При однократном введении ММС ПХЭ с хромосомными повреждениями более чем в два раза чаще встречались в группах мышей, экспонированных обеими дозами ММС (0.1 и 0.5 мг/кг) по сравнению с контрольными группами. Экспериментальные группы как при однократном, так и при трехкратном введении ММС не имели статистически подтвержденные различия ($p > 0.05$) по количеству клеток с цитогенетическими аномалиями.

Для понимания изменения гемопоэза, а именно эритропоэза, в ответ на ММС-индуцированный генотоксический стресс, дополнительно было проанализировано 200 эритроцитов и подсчитана доля ПХЭ от общего числа эритроцитов. Было установлено, что у мышей из экспериментальных групп доля ПХЭ была на 10% и более ниже, чем у мышей из контрольных групп, однако статистически значимые различия с контролем были отмечены только у животных, получавших трехкратную инъекцию ММС в дозировке 0.5 мг/кг (рис. 2б). Следует отметить, что доля ПХЭ в контрольных группах составляла примерно 50%.

ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ

Генотоксический стресс приводит к серьезным последствиям для здоровья человека, связанным с тератогенными, мутагенными и канцерогенными эффектами, возникающими в результате хромосомных нарушений в соответствующих тканях. При анализе способности того или иного агента инициировать повреждение ДНК, или при оценке существующих повреждений, могут быть использованы различные цитогенетические тесты. Они применимы как к клеткам в экспериментах *in vitro*, так и к моделям *in vivo* с участием мелких млекопитающих. Преимущество цитогенетических тестов заключается в возможности учета генетических повреждений на уровне отдельной клетки, что позволяет определять клеточную кинетику кластогена и устанавливать зависимость “доза–эффект”. Оценка “доза–эффект” является одним из этапов в оценке рисков, связанных с воздействием химических веществ и факторов окружающей среды, индуцирующих обратимые и необратимые изменения в организме [16].

Микроядерный тест широко используется в генетической токсикологии и применяется, в том числе, при разработке и тестировании лекарственных препаратов. Микроядерный тест и FISH метод (флуоресцентная гибридизация *in situ*) остаются одними из основных методов оценки влияния мутагенных факторов на геномную нестабильность [15]. Такие цитогенетические аномалии, как микроядро, протрузия и нуклеоплазменный мост учитываются в анализе эритроцитов рыб и птиц для обнаружения генотоксических факторов в окружающей среде [22, 23]. *In vivo* анализ уровня МЯ в эритроцитах млекопитающих (главным образом крыс и мышей), полученных из периферической крови или костного мозга, широко используется для выявления повреждений хромосом или митотического аппарата эритробластов, вызванных исследуемым химическим веществом [17], в основном определяя частоту встречаемости микроядер [24, 25]. В процессе превращения эритробласта костного мозга в незрелый эритроцит (иногда также называемый ПХЭ или ретикулоцитом) в цитоплазме возможно появление МЯ, являющихся маркерами повреждения генетического аппарата клетки [17, 18]. Визуализация МЯ в таких клетках облегчается тем, что у них отсутствует основное ядро.

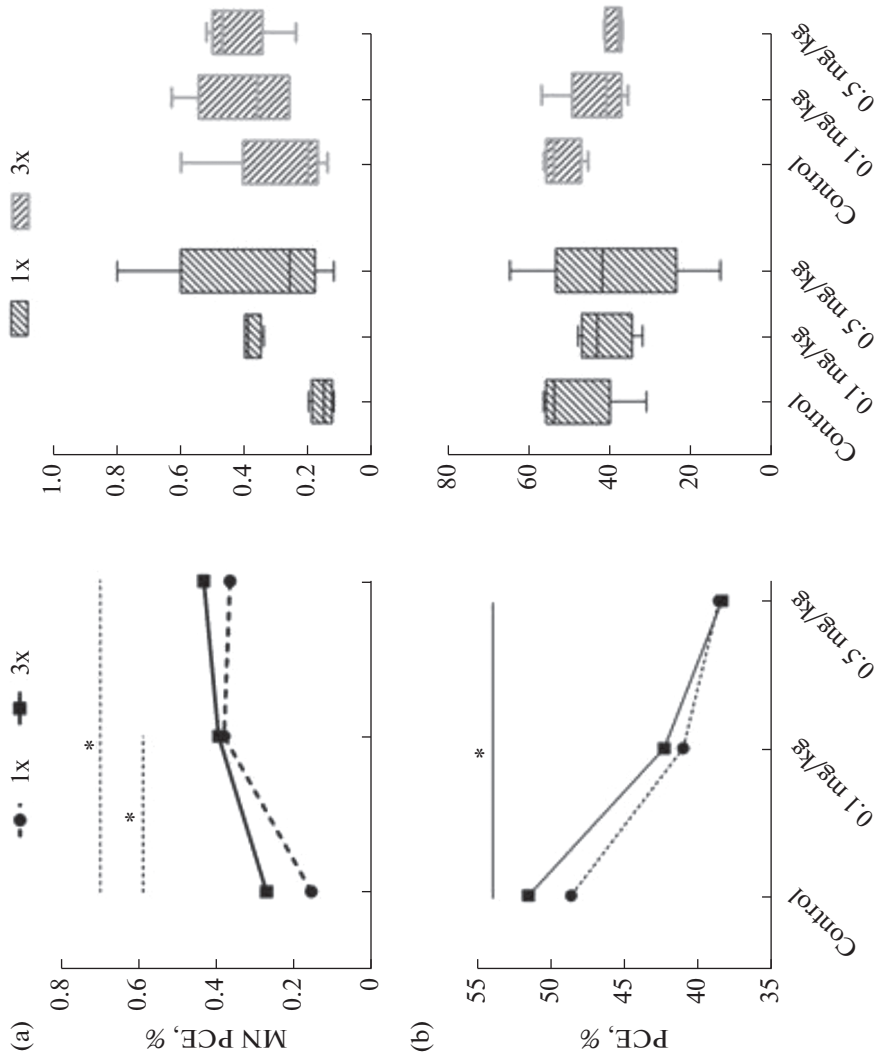


Рис. 2. Кривая доза–эффект: (а) – процентное содержание полихроматофильных эритроцитов с микроядром, (б) – доля полихроматофильных эритроцитов на 200 клеток (* – достоверное различие между группами при однократном введении митомцина С); Control – контрольная группа; MN – micropuclei – микроядро; PCE – polychromatic erythrocyte – полихроматофильный эритроцит.

Различные по своему типу и механизму действия мутагенные агенты по разному влияют на образование МЯ в ПХЭ. Повреждения ДНК, вызванные различными экзогенными и эндогенными факторами, накапливаются в клетке до тех пор, пока не привьсят возможности систем репарации повреждений ДНК. В этом контексте важно понимать механизмы и последствия генотоксического стресса, вызванного хроническим низкодозовым воздействием различных мутагенных агентов на живые организмы. В нашем исследовании было показано, что ММС в концентрации 0.1 мг/кг вызывает выраженный генотоксический, но не цитотоксический эффект у гиперлипидемических мышей (что выражается в значимом увеличении частоты ПХЭ с МЯ, с одновременным отсутствием изменения доли ПХЭ). В то же самое время доза 0.5 мг/кг обладала выраженными цитотоксическими эффектами, вызывая нарушение эритропоэза (а именно снижение доли ретикулоцитов), при этом уровень ПХЭ с МЯ статистически значимо не различался с данным показателем для дозы 0.1 мг/кг. Полученные нами результаты отличаются от данных, полученных в ходе экспериментов по моделированию острого генотоксического стресса, выполненных рядом исследователей. В частности, был изучен уровень ПХЭ с МЯ у крыс линии Wistar, получавших инъекции ММС в концентрации 0.5, 1 и 2 мг/кг внутривентриально, с периодичностью один раз в сутки (всего было выполнено две инъекции). Было показано, что только концентрации 1 и 2 мг/кг вызвали значимое повышение уровня повреждения ДНК по сравнению с неэкспонируемым контролем, в то время как концентрации 0.5 мг/кг при двукратном внутривентриальном введении не вызвала развития генотоксического стресса у животных. Более того, ежедневные (на протяжении 13 дней) внутривентриальные инъекции ММС в концентрации 0.1 мг/кг (с забором периферической крови каждые 24 ч) также не приводили к изменению как уровня ПХЭ с МЯ, так и доли ПХЭ [19].

Morales-Ramírez и соавт. [20] в своем обзоре сравнивали различия в кинетике и механизмах образования ПХЭ с МЯ и цитотоксичности различных противоопухолевых и генотоксических агентов в периферической крови мышей *in vivo*. Минимальной дозой ММС, при которой наблюдалось максимальное снижение доли ПХЭ, явилась концентрация 1.5 мкМ/кг, а также была показана корреляция между генотоксическим и цитотоксическим действием ММС. Также установлено, что внутривентриальные инъекции ММС в концентрации 1 мг/кг (пять инъекций в течение недели) не вызывают изменений в биохимических и цитологических показателях периферической крови NQO1^{-/-}, NQO1^{+/-} и NQO2^{-/-} мышей, а также гистологической характеристики их костного мозга [21].

Таким образом, в результате проведенного исследования показано, что дозировка ММС в концентрации 0.1 мг/кг является оптимальной для моделирования хронического генотоксического стресса у мышей. Высоких доз (более 0.5 мг/кг) следует, по видимому, избегать, так как они могут вызвать цитотоксические эффекты и нарушение эритропоэза. Сверхнизкие дозы (менее 0.1 мг/кг), вероятно, даже безопаснее, и их эффект в контексте моделирования генотоксического эффекта следует изучить в будущих исследованиях. Полученные в ходе настоящего исследования результаты могут быть полезны при выборе дозы ММС для проведения экспериментов, требующих моделирования хронического генотоксического стресса у лабораторных животных.

СОБЛЮДЕНИЕ ЭТИЧЕСКИХ СТАНДАРТОВ

Исследование проводилось в соответствии с рекомендациями Хельсинкской декларации и принципами гуманности, изложенными в Правилах проведения работ с использованием экспериментальных животных. Протокол исследования одобрен

локальным этическим комитетом НИИ комплексных проблем сердечно-сосудистых заболеваний.

ИСТОЧНИКИ ФИНАНСИРОВАНИЯ

Исследование выполнено при поддержке комплексной программы фундаментальных научных исследований СО РАН в рамках фундаментальной темы НИИ КПССЗ № 0419-2022-0001 “Молекулярные, клеточные и биомеханические механизмы патогенеза сердечно-сосудистых заболеваний в разработке новых методов лечения заболеваний сердечно-сосудистой системы на основе персонализированной фармакотерапии, внедрения малоинвазивных медицинских изделий, биоматериалов и тканеинженерных имплантатов”.

КОНФЛИКТ ИНТЕРЕСОВ

Авторы декларируют отсутствие явных и потенциальных конфликтов интересов, связанных с публикацией данной статьи.

ВКЛАД АВТОРОВ

Идея работы и планирование эксперимента (М.Ю.С.), проведение эксперимента (Д.К.Ш., А.В.С., А.О.П., М.В.Х.), обработка данных (М.А.А.), написание манускрипта (М.А.А.), редактирование манускрипта (А.В.П.).

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. *Sassi A, Boubaker J, Loussaief A, Jomaa K, Ghedira K, Chekir-Ghedira L* (2021) Protective effect of chrysin, a dietary flavone against genotoxic and oxidative damage induced by Mitomycin C in Balb/C mice. *Nutr Cancer* 73(2): 329–338.
<https://doi.org/10.1080/01635581.2020.1749289>
2. *Mokdad Bzeouich I, Mustapha N, Maatouk M, Ghedira K, Ghoul M, Chekir-Ghedira L* (2016) Genotoxic and anti-genotoxic effects of esculin and its oligomer fractions against mitomycin C-induced DNA damages in mice. *Regul Toxicol Pharm* 82: 48–52.
<https://doi.org/10.1016/j.yrtph.2016.11.002>
3. *Timocin T, Arslan M, Basri Ila H* (2021) Evaluation of in vitro and in vivo genotoxic and antigenotoxic effects of *Rhus coriaria*. *Drug Chem Toxicol* 44(4): 409–417.
<https://doi.org/10.1080/01480545.2019.1593433>
4. *Yuzbasioglu D, Mamur S, Avuloglu-Yilmaz E, Erikel E, Celebi-Keskin A, Unal F* (2021) Evaluation of the genotoxic and antigenotoxic effects of exopolysaccharide pullulan in human lymphocytes in vitro. *Mutat Res Genet Toxicol Environ Mutagen* 870–871: 503391.
<https://doi.org/10.1016/j.mrgentox.2021.503391>
5. *Lin LT, Chen JT, Lu DW, Tai MC, Liang CM, Chen CL, Pao SI, Hsu CK, Chen YH* (2020) Antifibrotic role of low-dose mitomycin-c-induced cellular senescence in trabeculectomy models. *PLoS One* 15(6): e0234706.
<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0234706>
6. *Itoh K, Masumori S, Mukai D, Sakakibara H, Yasuda M, Shimoi K* (2019) Dosage time affects alkylating agents induced micronuclei in mouse peripheral blood reticulocytes through the function of erythropoietin. *J Toxicol Sci* 44(4): 273–282.
<https://doi.org/10.2131/jts.44.273>
7. *Digkas EN, Chrisafi S, Passadaki T, Tsalkidis A, Hatzimichail A, Vargemezis V, Lialiaris TS* (2010) *In vitro* and *in vivo* cytogenetic effects of recombinant human erythropoietin on the frequency of sister chromatid exchanges alone or in combination with mitomycin C. *Chemotherapy* 56(3): 239–247.
<https://doi.org/10.1159/000316849>
8. *Díez-Quijada L, Llana-Ruiz-Cabello M, Cătunescu GM, Puerto M, Moyano R, Jos A, Cameán AM* (2019) *In vivo* genotoxicity evaluation of cylindrospermopsin in rats using a combined micronucleus and comet assay. *Food Chem Toxicol* 132: 110664.
<https://doi.org/10.1016/j.fct.2019.110664>
9. *Jain AK, Pandey AK* (2019) *In Vivo* Micronucleus Assay in Mouse Bone Marrow. *Methods Mol Biol* 2031: 135–146.
https://doi.org/10.1007/978-1-4939-9646-9_7

10. Roque CR, Sampaio LR, Ito MN, Pinto DV, Caminha JSR, Nunes PIG, Raposo RS, Santos FA, Windmüller CC, Crespo-Lopez ME, Alvarez-Leite JJ, Oriá RB, Pinheiro RF (2021) Methylmercury chronic exposure affects the expression of DNA single-strand break repair genes, induces oxidative stress, and chromosomal abnormalities in young dyslipidemic ApoE knockout mice. *Toxicology* 464: 152992. <https://doi.org/10.1016/j.tox.2021.152992>
11. Jacobsen NR, Møller P, Jensen KA, Vogel U, Ladefoged O, Loft S, Wallin H (2009) Lung inflammation and genotoxicity following pulmonary exposure to nanoparticles in ApoE^{-/-} mice. Part Fibre Toxicol 6: 2. <https://doi.org/10.1186/1743-8977-6-2>
12. Кутихин АГ, Синицкий МЮ, Понасенко АВ (2017) Роль мутагенеза в развитии атеросклероза. Комплексные проблемы сердечно-сосудистых заболеваний 1: 92–101. [Kutikhin AG, Sinitsky MY, Ponosenko AV (2017) The role of mutagenesis in atherosclerosis. *Complex Issues Cardiovasc Diseases* 1: 92–101. (In Russ)]. <https://doi.org/10.17802/2306-1278-2017-1-92-101>
13. Sinitsky MY, Tsepokina AV, Kutikhin AG, Shishkova DK, Ponosenko AV (2021) The gene expression profile in endothelial cells exposed to mitomycin C. *Biochemistry (Moscow) Series B: Biomed Chem* 15(3): 255–261. <https://doi.org/10.1134/S1990750821030100>
14. Adikesavan AK, Barrios R, Jaiswal AK (2007) In vivo role of NAD(P)H:quinone oxidoreductase 1 in metabolic activation of mitomycin C and bone marrow cytotoxicity. *Cancer Res* 67(17): 7966–7971. <https://doi.org/10.1158/0008-5472>
15. Cammerer Z, Elhajouji A, Suter W (2007) In vivo micronucleus test with flow cytometry after acute and chronic exposures of rats to chemicals. *Mutat Res* 626(1–2): 26–33. <https://doi.org/10.1016/j.mrgentox.2006.08.004>
16. Chen Q, Riviere JE, Lin Z (2022) Toxicokinetics, dose-response, and risk assessment of nanomaterials: Methodology, challenges, and future perspectives. *Wiley Interdiscip Rev Nanomed Nanobiotechnol* 14(6): e1808. <https://doi.org/10.1002/wnan.1808>
17. ГОСТ 34660-2020. Микроядерный анализ на эритроцитах млекопитающих.
18. Quezada-Vidal J, Ortiz-Muñiz R, Cervantes-Ríos E, Cruz-Vallejo V, Morales-Ramírez P (2020) In vivo kinetics of the genotoxic and cytotoxic activities of cladribine and clofarabine. *Environ Mol Mutagen* 61(9): 922–927. <https://doi.org/10.1002/em.22394>
19. Cammerer Z, Elhajouji A, Suter W (2006) In vivo micronucleus test with flow cytometry after acute and chronic exposures of rats to chemicals. *Mutat Res* 626(1–2): 26–33. <https://doi.org/10.1016/j.mrgentox.2006.08.004>
20. Morales-Ramírez P, Vallarino-Kelly T, Cruz-Vallejo V (2014) Kinetics of micronucleus induction and cytotoxicity caused by distinct antineoplastics and alkylating agents *in vivo*. *Toxicol Lett* 224(3): 319–325. <https://doi.org/10.1016/j.toxlet.2013.11.012>
21. Adikesavan AK, Barrios R, Jaiswal AK (2007) In vivo role of NAD(P)H:quinone oxidoreductase 1 in metabolic activation of mitomycin C and bone marrow cytotoxicity. *Cancer Res* 67(17): 7966–7971. <https://doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-06-4480>
22. Anbumani S, Mohankumar MN (2015) Nucleoplasmic bridges and tailed nuclei are signatures of radiation exposure in *Oreochromis mossambicus* using erythrocyte micronucleus cytome assay (EMNCA). *Environ Sci Pollut Res* 22: 18425–18436. <https://doi.org/10.1007/s11356-015-5107-1>
23. Mendez SE, Quero AAM, Gorla NBM (2022) Erythrocyte micronucleus cytome assay in *Passer domesticus* and environmental remote sensing for inferring the quality of wild, rural, and urban areas. *Environ Monit Assess* 194: 852. <https://doi.org/10.1007/s10661-022-10488-9>
24. El-Alfy NZ, Alqosaibi AI, Mahmoud MF, El-Ashry SR (2016) An analysis of micronuclei and DNA damage induced by metotrexate treatment of male albino mice. *Egypt J Hospit Med* 65: 504–514.
25. Labash C, Avlasevich SL, Carlson K, Berg A, Torous DK (2016) Mouse Pig-a and micronucleus assays respond to N-ethyl- N-nitrosourea, benzo[a]pyrene, and ethyl carbamate, but not pyrene or methyl carbamate. *Environment Mol Mutagen* 57(1): 28–40. <https://doi.org/10.1002/em.21965>

Dose-Response of the Mitomycin C Genotoxic Effect on the ApoE Knockout Mice

**M. A. Asanov^{a,*}, D. K. Shishkova^a, A. O. Poddubnyak^a, M. Y. Sinitsky^a, A. V. Sinitskaya^a,
M. V. Khutornaya^a, and A. V. Ponasenko^a**

^aResearch Institute for Complex Issues of Cardiovascular Diseases, Kemerovo, Russia

**e-mail: asmaks988@gmail.com*

Polychromic erythrocytes have been accepted as a suitable target for micronucleus (MN) evaluation in both acute and cumulative injury. Mitomycin C (MMC) also has a wide range of genotoxicity, including inhibition of DNA synthesis, clastogenesis and mutagenesis. As an immediate clastogen requiring exclusively intracellular reductive activation, MMC initiates efficient DNA crosslinking. The *in vivo* micronucleus assay has established itself as a standard assay for evaluating chromosomal genotoxicity in mouse erythrocytes. Most of the studies are focused on the study of acute effects, which is caused by high doses of the mutagen. In turn, there are no or very few studies aimed at studying the chronic effects of MMC. The aim of the study is to create a chronic genotoxic effect of MMC without lethal outcome in ApoE^{-/-} mice when selecting the optimal dose of MMC. The design of the study included 6 groups of ApoE^{-/-} mice, two doses of MMC at a concentration of 0.1 and 0.5 mg/kg, single and three doses. Each group consisted of four females and one male. To assess genotoxicity, 1000 polychromic erythrocytes (PChE) extracted from the femoral bone marrow were counted on each sample, PChE with micronuclei were detected, and the proportion of reticulocytes was counted. A dose of 0.5 mg/kg showed a clear cytotoxic effect, expressed in a violation of erythropoiesis, and more precisely in a decrease in the proportion of reticulocytes. In our study, the concentration of the mutagen, namely 0.1 mg/kg, was shown to cause a clear genotoxic effect without reaching the threshold of cytotoxicity. Dose-response studies in rodents can provide useful information on the mechanisms of toxicity and dose selection for long-term toxicity studies.

Keywords: micronucleus, genotoxicity, erythrocyte, mitomycin, reticulocyte