

Тканевые препараты

УДК 619:615.36:575.224.46

doi: 10.15389/agrobiology.2024.6.1192rus

ИССЛЕДОВАНИЕ АНТИМУТАГЕННОГО ДЕЙСТВИЯ ГИДРОФИЛЬНОЙ КРИОФРАКЦИИ СЕЛЕЗЕНКИ КРУПНОГО РОГАТОГО СКОТА*

Г.А. ВОСТРОИЛОВА ✉, С.В. ШАБУНИН, Д.И. ШАБАНОВ,
Н.А. ХОХЛОВА, А.А. КОРЧАГИНА, М.Ю. СЫРОМЯТИКОВ, А.В. НЕКРАСОВ,
М.А. СЕЛЮТИНА, Д.Д. МОРОЗОВА

Высокие производственные нагрузки и ухудшение экологической обстановки приводят к усилению действия различных факторов, которые способны вызывать мутации в клетках сельскохозяйственных животных. Накопление мутаций приводит к возникновению заболеваний, нарушению иммунных функций, снижению набора массы, частичной или полной стерильности, потере ценных признаков породы, вызывает гибель, а также отражается на следующих поколениях. Одним из способов снижения накопления повреждений ДНК в организме считают применение препаратов, обладающих антимутагенным действием. Фармакологические субстанции, полученные из тканей животных, например селезенки крупного рогатого скота (КРС), могут стать перспективной основой для препаратов с такими свойствами. В настоящей работе впервые установлено антимутагенное действие гидрофильной криофракции селезенки КРС на клетки костного мозга мышей, а также ДНК-защитное действие по отношению к митохондриальной ДНК (мтДНК) печени мышей в условиях цитогенетической нестабильности, индуцированной экспериментальным мутагеном митомицином С. Также показано влияние гидрофильной криофракции селезенки КРС на некоторые маркеры окислительного стресса в клетках печени мышей при введении животным митомицина С. Целью работы было определение влияния гидрофильной криофракции селезенки крупного рогатого скота на цитогенетическую стабильность клеток костного мозга и целостность мтДНК печени мышей, а также оценка ее антимутагенного и ДНК-протекторного действия на мышцах с индуцированной митомицином С (ММС) цитогенетической нестабильностью. Гидрофильная криофракция селезенки КРС (ГКСК) была получена в ФГБНУ ВНИВИПФиТ. Положительным контролем служил препарат Митомицин С Киова («Kyowa Hakko Kogyo Co., Ltd», Япония), содержащий в качестве действующего вещества митомицин. Опыты проводили в 2024 году. Использовали самцов белых беспородных мышей (*Mus albus officinarum*) ($n = 30$) с массой тела $26,0 \pm 2,0$ г. Были сформированы пять групп животных ($n = 6$). В I группе (отрицательный контроль) животным однократно внутримышечно вводили стерильный изотонический раствор хлорида натрия в объеме 0,1 мл. Во II группе мыши получали однократно внутримышечную инъекцию ГКСК в дозе 0,5 мл/кг в объеме 0,1 мл. Животным III группы вводили 3-кратно внутримышечно с интервалом в 24 ч ГКСК в дозе 0,5 мл/кг в объеме 0,1 мл и совместно с последней инъекцией ГКСК однократно внутривнутрибрюшинно ММС в дозе 10 мг/кг в объеме 0,5 мл. Животным IV группы вводили внутримышечно однократно ГКСК в дозе 0,5 мл/кг в объеме 0,1 мл и однократно внутривнутрибрюшинно ММС аналогично III группе. Мыши из V группы (положительный контроль) получали однократно интраперитонеально ММС в дозе 10 мг/кг в объеме 0,5 мл. Мышей выводили из эксперимента через 24 ч после последней инъекции посредством передозировки углекислого газа в специальной камере. Для исследования частоты полихроматофильных эритроцитов (ПХЭ) с микроядрами (микроядерного теста) клетки костного мозга из бедренных костей добавляли к инактивированной фетальной телячьей сыворотке («БиолоТ», Россия) и наносили на предметные стекла, далее препараты высушивали и окрашивали по Папенгейму. Исследовали частоту ПХЭ с микроядрами на 1000 ПХЭ, также учитывали отношение ПХЭ к нормохромным эритроцитам (НЭ). Относительное количество повреждений в мтДНК оценивали методом qPCR. Для этого выделяли тотальную ДНК из 25 мг гомогенизированной печени мышей при помощи набора ПРОБА-ГС («ДНК-технология», Россия). Расчет повреждений мтДНК проводили в участках, кодирующих 12S и 16S рРНК (12S-16S) и ген ND5 (ND5). Суммарное относительное содержание внутриклеточных активных форм кислорода (АФК) определяли с помощью клеточного зонда — 2',7'-дихлордигидрофлуоресцеиндиацетата («Sigma-Aldrich», США), который, окисляясь внутри живых клеток, образует флуоресцирующую форму (DCF), детектируемую с помощью спектрофлуориметра RF-5301 («Shimadzu», Япония). Содержание внутриклеточных АФК оценивали в суспензии клеток печени мышей (3×10^6 кл/мл). Концентрацию малонового диальдегида (МДА) определяли в гомогенате печени мышей с помощью спектрофотометра UV-1700 («Shimadzu», Япония) по окрашиванию раствора при $\lambda = 535$ нм триметиновым комплексом. В результате экспериментов мы не обнаружили значимых отличий от негативного контроля всех исследуемых параметров у мышей из II группы. Так во II группе частота ПХЭ с микроядрами составляла $0,41 \pm 0,080$ %, количество повреждений мтДНК во фрагментах

* Исследование выполнено за счет гранта Российского научного фонда № 24-26-00034, <https://rscf.ru/project/24-26-00034/>.

12S-16S и ND5 — соответственно $0,0 \pm 0,92$ и $2,2 \pm 0,45$. Введение ММС в V группе приводило к увеличению частоты ПХЭ с микроядрами в костном мозге мышей до $11,20 \pm 1,000$ %. Количество повреждений мтДНК печени возрастало до $4,1 \pm 0,44$ и $4,2 \pm 0,30$ во фрагментах 12S-16S и ND5, что сопровождалось увеличением содержания внутриклеточных АФК до $314,0 \pm 44,20$ отн. ед и концентрации МДА до $1,7 \pm 0,15$ мкмоль/г. При этом курсовое введение ГКСК вместе с ММС (III группа) снижало частоту ПХЭ с микроядрами на 27,4 % ($p < 0,05$) до $8,20 \pm 1,070$ %, а также повреждение мтДНК на 89,7 % ($p < 0,05$) во фрагменте 12S-16S до $0,4 \pm 1,27$ относительно позитивного контроля. Выявленные изменения в III группе могли быть частично обусловлены обнаруженным нами снижением содержания внутриклеточных АФК на 58,1 % ($p < 0,005$) до $131,7 \pm 9,84$ отн. ед. и концентрации МДА на 58,6 % ($p < 0,005$) до $0,7 \pm 0,08$ мкмоль/г в печени мышей относительно позитивного контроля. Эти данные свидетельствуют о наличии у гидрофильной криофракции селезенки КРС антимуtagenных, ДНК-протекторных свойств, которые, вероятно, обусловлены ее антиокислительным действием за счет активации систем антиоксидантной защиты.

Ключевые слова: гидрофильная криофракция селезенки КРС, мутагенность, антимуtagenное действие, повреждение ДНК, митохондриальная ДНК, митомицин, микроядерный тест, свободнорадикальное окисление, мышцы.

В условиях интенсификации сельского хозяйства животные подвергаются воздействию множества стресс-факторов, что ведет к возрастанию нагрузки на организм. Широкая химизация промышленности и сельского хозяйства, нарушение технологических цепочек, а также ухудшение экологической обстановки приводят к активному распространению мутагенов в окружающей среде и производственных цепочках, что становится причиной возникновения множества патологий (1, 2).

Ряд заболеваний различной этиологии (вирусной, бактериальной, паразитарной и др.) также может повышать нагрузку на целостность генетического аппарата животных и стимулировать увеличение количества мутаций (3-5). Нарушение процессов обмена веществ и окислительный стресс стимулируют образование токсических эндогенных соединений, обладающих мутагенным действием, которые индуцируют повреждение молекул ДНК, например малонового диальдегида (5, 6). Мутации, возникающие в соматических и половых клетках в течение жизни животного, способны приводить к канцерогенезу, гибели клеток, нарушениям обмена веществ и функционирования внутриклеточных процессов, вызывая каскад изменений: усиление дегградации ДНК, нарушение выработки цитокинов и процессов фагоцитоза, угнетение факторов иммунитета (7-10). В результате повреждения генетического аппарата высока вероятность передачи возникших мутаций потомству, снижения фертильности продуктивных животных, гибели потомства, потери ценных признаков сельскохозяйственных пород. Эти факторы в конечном итоге приводят к экономическим потерям (10, 11). Поэтому большую значимость приобретает поиск природных антимуtagenов, способных предотвратить вредное действие мутагенных факторов, а также способов их применения (12).

Для современного сельского хозяйства актуально создание протективных лекарственных средств, обладающих антимуtagenным эффектом. Антимуtagenез — биологическое явление подавления мутационного процесса, выражающееся в снижении частоты спонтанного и индуцированного мутирования под действием природных и синтетических соединений (13).

Поскольку некоторые ткани животных содержат большое количество гормонов, цитокинов и других биологически активных веществ, в ряде исследований были показаны иммуномодулирующие, антиоксидантные, цито- и радиопротекторные свойства препаратов, содержащих различные экстракты этих тканей, например селезенки крупного рогатого скота (КРС), что делает их перспективными для изучения антимуtagenных свойств (14, 15). Вместе с тем антимуtagenное действие фармацевтических субстанций животного происхождения при генотоксическом воздействии, индуциро-

ванном химическими мутагенами, изучено недостаточно.

Поскольку процесс мутагенеза можно существенно модифицировать в сторону снижения мутагенных эффектов, направленный поиск антимутагенов представляет актуальную тему для исследования. Полученные сведения могут быть использованы для создания функциональных продуктов с антимутагенными свойствами и разработки эффективных лекарственных препаратов с генопротекторным действием.

Митомицин С (ММС) — антибиотик, применяемый в противоопухолевой терапии, который используется для экспериментального моделирования цитогенетической нестабильности (16). Мутагенное действие ММС хорошо проявляется на клетках, обладающих высокой пролиферативной активностью, например клетках костного мозга или печени мышей, что делает их удобной тест-системой для исследования биологических свойств фармацевтических субстанций (17).

В настоящей работе впервые установлено антимутагенное действие гидрофильной криофракции селезенки КРС на клетки костного мозга мышей, а также ДНК-защитное действие по отношению к митохондриальной ДНК печени мышей в условиях цитогенетической нестабильности, индуцированной экспериментальным мутагеном митомицином С. Также показано влияние гидрофильной криофракции селезенки КРС на некоторые маркеры окислительного стресса в клетках печени мышей при введении животным митомицина С.

Целью работы было определение влияния гидрофильной криофракции селезенки крупного рогатого скота на цитогенетическую стабильность клеток костного мозга и целостность мтДНК печени мышей, а также оценка ее антимутагенного и ДНК-протекторного действия на мышцах с индуцированной митомицином С цитогенетической нестабильностью.

Методика. Гидрофильная криофракция селезенки КРС (ГКСК) была получена во Всероссийском научно-исследовательском ветеринарном институте патологии, фармакологии и терапии (ФГБНУ ВНИВИПФиТ). Положительным контролем служил препарат Митомицин С Киова («Kyowa Hakko Kogyo Co., Ltd», Япония), содержащий в качестве действующего вещества митомицин.

В опытах использовали самцов белых беспородных мышей (*Mus albus officinarum*) ($n = 30$) с массой тела $26,0 \pm 2,0$ г, которых разводили в виварии ФГБНУ ВНИВИПФиТ (2024 год). Подопытные животные содержались в стандартных условиях вивария (температура воздуха 18–23 °С, относительная влажность 45–60 %). Доступ к воде и корму был свободным. Все процедуры с животными, предусмотренные в исследовании, были рассмотрены и одобрены на заседании биоэтической комиссии ФГБНУ ВНИВИПФиТ до начала экспериментальной работы и соответствовали правилам, принятым в European Convention for the Protection of Vertebrate Animals used for Experimental and other Scientific Purposes (ETS 123), Strasbourg, 1986; Директиве 2010/63/EU Европейского парламента и совета Европейского Союза от 22 сентября 2010 года по охране животных, используемых в научных целях; Guide for the Care and Use of Laboratory Animals, Washington (DC), 1996; Этическом кодексе ветеринарного врача Российской Федерации, рекомендованном на XIII Московском международном ветеринарном конгрессе Ассоциации практикующих ветеринарных врачей России, 2005 год.

Были сформированы пять экспериментальных групп животных ($n = 6$ в каждой группе). В I группе (отрицательный контроль) животным однократно внутримышечно вводили стерильный изотонический раствор хлорида натрия в объеме 0,1 мл. Во II группе мыши получали однократно внут-

римышечную инъекцию ГКСК в дозе 0,5 мл/кг в объеме 0,1 мл. Животным III группы вводили трехкратно внутримышечно с интервалом в 24 ч ГКСК в дозе 0,5 мл/кг в объеме 0,1 мл и совместно с последней инъекцией ГКСК однократно внутривнутрибрюшинно ММС в дозе 10 мг/кг в объеме 0,5 мл. Животным IV группы вводили внутримышечно однократно ГКСК в дозе 0,5 мл/кг в объеме 0,1 мл и однократно внутривнутрибрюшинно ММС аналогично III группе. Мыши из V группы (положительный контроль) получали однократно интраперитонеально ММС в дозе 10 мг/кг в объеме 0,5 мл. Мышей выводили из эксперимента через 24 ч после последней инъекции посредством передозировки углекислого газа в специальной камере.

Для проведения микроядерного теста (определение частоты полихроматофильных эритроцитов — ПХЭ с микроядрами в костном мозге мышшей как один из методов, рекомендуемых при оценке мутагенного действия веществ) (18) клетки костного мозга, полученные из бедренных костей, добавляли к инактивированной фетальной телячьей сыворотке («БиолоТ», Россия) и наносили на предметные стекла, далее препараты высушивали и окрашивали по Папенгейму. Препараты костного мозга изучали при увеличении $\times 1000$ (микроскоп Микромед-3, «Микромед», Китай). Исследовали частоту ПХЭ с микроядрами на 1000 ПХЭ, всего изучали 2000 ПХЭ на животное. Также учитывали долю ПХЭ относительно нормохромных эритроцитов (НЭ) при общем подсчете 500 эритроцитов, которая может быть использована в качестве маркера токсичности исследуемых препаратов (17, 19).

Относительное число повреждений в мтДНК оценивали методом qPCR, который позволяет проводить специфичное для последовательности обнаружение и точную количественную оценку повреждений в длинных участках митохондриальных ДНК (20). Для этого выделяли тотальную ДНК из 25 мг гомогенизированной печени мышшей при помощи набора ПРОБА-ГС (ООО «ДНК-технология», Россия), следуя инструкции производителя. Число повреждений мтДНК измеряли с помощью qPCR длинных фрагментов с использованием ПЦР смеси 5x qPCRmix-HS SYBR (ЗАО «Евроген», Россия) на амплификаторе DPlite 4 (ООО «ДНК-технология», Россия) (21). Режим амплификации был следующим: 3 мин при 95 °С (общая денатурация); 30 с при 95 °С (денатурация), 30 с при 57 °С (отжиг праймеров), 30 с при 72 °С (элонгация) (38 циклов); 5 с при 72 °С (общая элонгация).

Расчет повреждений мтДНК проводили в участках, кодирующих 12S и 16S рРНК (12S-16S) и ген *ND5* (ND5), которые проявляют чувствительность к повреждению, с использованием опубликованных ранее праймеров (21):

Фрагмент	Прямой праймер 5'→3'	Обратный праймер 5'→3'	Длина фрагмента, п.н.
12S-16S	ТАААТТTCGTCGCCAGCCACC	GTTGACACGTTTTACGCCGA (short) ATGCTACCTTTGCACGGTCA (long)	72 1739
ND5	ТСАТТСТТСТАСТАТССССААТСС	ATGTGGTGGTGTACAGTGGG (short) TGGTTTGGGAGATTGGTTGATG (long)	81 1942
16S-Nd1	ACGAGGGTССААСТГТСТСТТА	AGCTCCATAGGGTCTTCTCGT	97
Gapdh	GGCTCCCTAGGCCCTCTG	TCCCAACTCGCCCCCAACA	84

Число повреждений в мтДНК нормировали на 10000 п.н. по формуле:

$$DmtDNA = \frac{(1 - 2^{-(\Delta_{long} - \Delta_{short})}) \times \text{fragment length (bp)}}{10000}$$

где DmtDNA — число повреждений мтДНК на 10000 п.н., Δ_{long} — разница между C_q контрольных и опытных длинных фрагментов, Δ_{short} — разница между C_q контрольных и опытных коротких фрагментов.

За контрольный показатель C_q принимали число повреждений в мтДНК мышшей из I группы.

Число повреждений рассчитывали с помощью программного обес-

печени Microsoft Excel. Для определения DmtDNA использовали по четыре мыши из группы (22).

Число копий мтДНК определяли с помощью qPCR, используя фрагмент мтДНК, кодирующий гены 16S и Nd1 (16S-Nd1) и ядерный ген *gapdh* в качестве референса (21, 22).

Нормализованный уровень мтДНК (NLmtDNA) относительно ядерной ДНК рассчитывали по формуле (22):

$$NLmtDNA = 2^{-\Delta\Delta Cq}.$$

Суммарное относительное содержание внутриклеточных активных форм кислорода (АФК) определяли с помощью клеточного зонда — 2',7'-дихлордигидрофлуоресцеиндиацетата («Sigma-Aldrich», США), который окисляется внутри живых клеток, образует флуоресцирующую форму (DCF), детектируемую с помощью спектрофлуориметра RF-5301 («Shimadzu», Япония).

Суспензию клеток печени получали посредством гомогенизации 200 мг печени в 3 мл буферного раствора Хенкса (рН 7,4) с помощью ручного пестикового гомогенизатора (23). Концентрацию клеток в суспензии определяли с использованием камеры Горяева.

Содержание внутриклеточных АФК оценивали в суспензии клеток печени мышей (3×10^6 кл/мл). Для этого клетки инкубировали в темноте в течение 30 мин при 37 °С с флуоресцентным зондом в конечной концентрации 10 мкмоль/л в растворе Хенкса (рН 7,4), дважды отмывали от не поглощенного флуоресцентного зонда центрифугированием (СМ-50, «ELMI», Эстония) и определяли интенсивность флуоресценции образцов с помощью спектрофлуориметра при длине волны возбуждения $\lambda = 488$ нм и испускания — $\lambda = 520$ нм (24). Содержание внутриклеточных АФК выражали в относительных единицах (отн. ед.) интенсивности флуоресценции DCF (DCF).

Концентрацию МДА (мкмоль/г белка) определяли в гомогенате печени мышей с помощью спектрофотометра UV-1700 («Shimadzu», Япония) при $\lambda = 535$ нм по окрашиванию раствора триметиновым комплексом, который образуется после взаимодействия МДА с тиобарбитуровой кислотой (25). Для расчета концентрации МДА количество белка в гомогенате печени определяли с помощью набора «Общий белок — Ольвекс» (ООО «Ольвекс Диагностикум», Россия).

Статистическую обработку данных проводили с помощью пакетов программы STATISTICA 10 («StatSoft, Inc.», США). Сравнение выборок осуществляли с использованием парного U-теста Мана-Уитни, поскольку исследуемые параметры не соответствовали нормальному распределению. Полученные результаты представляли как среднее арифметическое (M) и стандартную ошибку среднего ($\pm SEM$).

Результаты. В результате проведенных исследований мы оценили частоту ПХЭ с микроядрами в костном мозге мышей (рис. 1).

Введение ГКСК не индуцировало статистически значимого изменения частоты ПХЭ с микроядрами относительно отрицательного контроля: значение показателя в I группе составило $0,47 \pm 0,140$ %, во II группе — $0,41 \pm 0,080$ % (рис. 2). Введение ММС в дозе 10 мг/кг вызывало значимое ($p < 0,005$) увеличение ПХЭ с микроядрами в костном мозге мышей в группах III, IV и V относительно отрицательного контроля: значения составляли соответственно $8,15 \pm 1,070$, $10,12 \pm 1,200$ и $11,23 \pm 1,000$ %. При этом курсовое введение ГКСК (III группа) вызвало значимого ($p < 0,05$) снижения показателя на 27,4 % относительно мышей, которые получали только ММС (V группа). Вместе с тем в IV группе однократная совместная инъекция ГКСК и ММС не вызывала значимого снижения доли ПХЭ с микроядрами отно-

сительно положительного контроля. Таким образом, ГКСК при ее курсовом применении оказала антимуtagenное действие на животных с цитогенетической нестабильностью, индуцированной высокими дозами ММС.

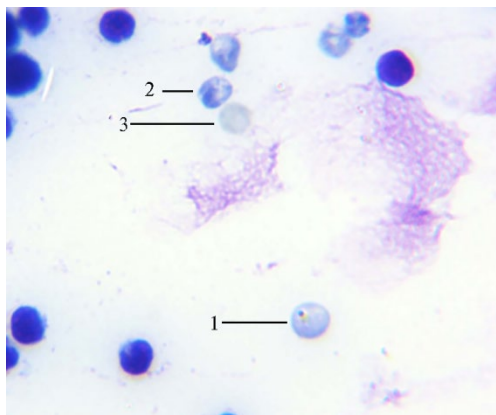


Рис. 1. Микрофотография препарата костного мозга белой беспородной мыши (*Mus albus officinarum*): 1 — полихроматофильный эритроцит с микроядром, 2 — полихроматофильный эритроцит, 3 — нормохромный эритроцит (микроскоп Микромед-3, «Микромед», Китай; окрашивание по Папенгейму, увеличение $\times 1000$).

В костном мозге мышей из I группы ПХЭ составили $48,6 \pm 2,53$ %. Применение ГКСК (II группа) не вызывало значимых изменений — $46,2 \pm 1,93$ %. Введение ММС индуцировало значимое ($p < 0,01$) снижение доли ПХЭ: она составила соответственно $36,7 \pm 3,67$, $31,5 \pm 5,25$ и $30,9 \pm 5,55$ % в III, IV и V группах. При этом курсовое или однократное применение ГКСК не приводило к значимым изменениям в содержании ПХЭ, что может свидетельствовать об отсутствии антитоксического действия ГКСК по отношению к пролиферирующим клеткам эритроидного ряда в костном мозге животных при индуцированной ММС цитотоксичности.

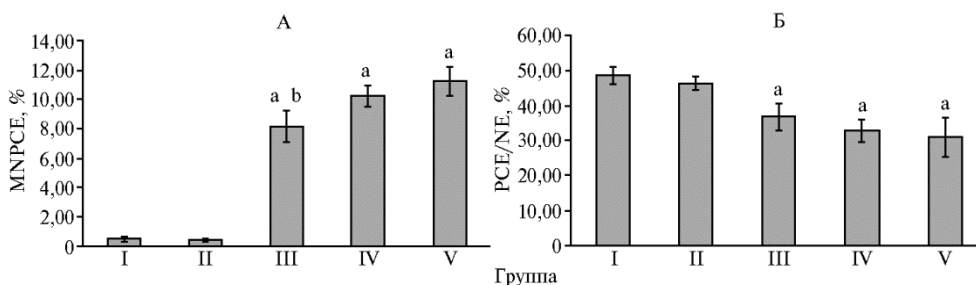


Рис. 2. Частота полихроматофильных эритроцитов с микроядрами (MNPCE) (A) и доля полихроматофильных эритроцитов относительно нормохромных эритроцитов (PCE/NE) (Б) в костном мозге белых беспородных мышей (*Mus albus officinarum*) под влиянием гидрофильной криофракции селезенки крупного рогатого скота ($n = 6$, $M \pm SEM$). Описание групп см. в разделе «Методика».

^{a, b} Статистически значимые ($p < 0,05$) отличия соответственно от I группы и от V группы.

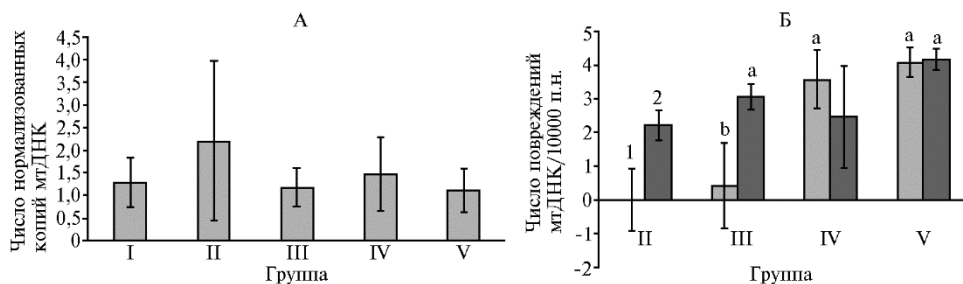


Рис. 3. Число нормализованных копий мтДНК (относительное число копий мтДНК, нормализованное по ядерному гену *gapdh*) (A) и относительное число повреждений мтДНК (число повреждений в мтДНК относительно 10 000 п.н.) (Б) в печени белых беспородных мышей (*Mus albus officinarum*) под влиянием гидрофильной криофракции селезенки крупного рогатого скота: 1 — участок мтДНК, содержащий гены 12S-16S, 2 — участок мтДНК, содержащий ген Nd5 ($n = 4$, $M \pm SEM$). Описание групп см. в разделе «Методика».

^{a, b} Статистически значимые ($p < 0,05$) отличия соответственно от I группы и от V группы.

Далее мы определили влияние ГКСК на митохондриальный биогенез

в печени мышей, который можно оценить по числу копий мтДНК в образце (рис. 3, А) (26). Ранее мы показали, что введение ММС в дозе 10 мг/кг сохраняло митохондриальный биогенез в печени мышей, значения которого не отличались от показателей в отрицательном контроле (27). В настоящем исследовании введение ГКСК отдельно или совместно с ММС не приводило к статистически значимому изменению числа копий мтДНК. Таким образом, не наблюдалось изменения митохондриального биогенеза во всех исследованных группах.

Помимо этого, было определено число повреждений мтДНК в участках 12S-16S и ND5 (см. рис. 3, Б). Введение ГКСК не вызывало изменения относительного числа повреждений мтДНК как в 12S-16S, так и в ND5 фрагментах — соответственно $0,0 \pm 0,92$ и $2,2 \pm 0,45$ повреждений. При этом внутрибрюшинная инъекция ММС (группа V) индуцировала увеличение числа повреждений мтДНК в 4 раза ($p < 0,05$) в обоих фрагментах мтДНК. Так, в 12S-16S число повреждений составило $4,1 \pm 0,44$, в ND5 — $4,2 \pm 0,30$. Курсовое применение ГКСК перед инъекцией ММС индуцировало статистически значимое ($p < 0,05$) снижение числа повреждений мтДНК на 89,7 % во фрагменте 12S-16S до $0,4 \pm 1,27$. В то же время число повреждений мтДНК в ND5 составило $3,1 \pm 0,38$, что было в 3 раза выше ($p < 0,05$) показателя отрицательного контроля и не имело значимых отличий от числа повреждений мтДНК мышей в группе положительного контроля. При этом однократное введение ГКСК в IV группе не вызывало статистически значимого снижения числа повреждений мтДНК, индуцированных применением ММС. Так, во фрагменте 12S-16S оно составило $3,6 \pm 0,85$, а в ND5 — $2,5 \pm 1,52$. Таким образом, курсовое введение ГКСК мышам индуцировало в клетках печени снижение числа повреждений мтДНК, вызванных ММС.

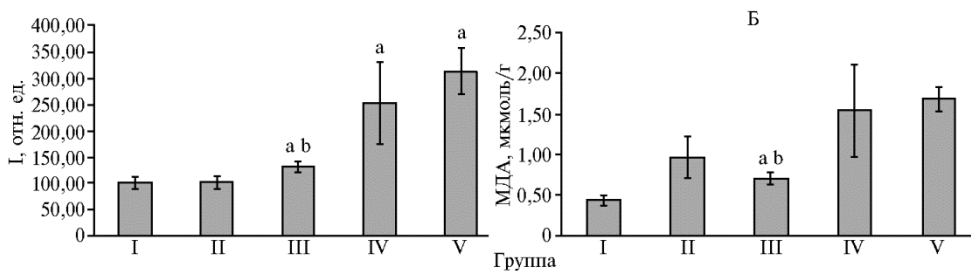


Рис. 4. Относительное содержание внутриклеточных АФК (I — интенсивность флуоресценции DCF при $\lambda = 488$ нм) (А) и концентрация малонового диальдегида (МДА) (Б) в клетках печени белых беспородных мышей (*Mus albus officinarum*) под влиянием гидрофильной криофракции селезенки крупного рогатого скота ($n = 6$, $M \pm SEM$). Описание групп см. в разделе «Методика».

a, b Статистически значимые ($p < 0,005$) отличия соответственно от I группы и от V группы.

Поскольку ММС способен вызывать повреждение ДНК не только посредством образования аддуктов с ДНК, но и через индукцию окислительного стресса в организме (28), мы оценили относительное содержание внутриклеточных АФК в клетках печени мышей (рис. 4, А). В I группе I_{DCF} составляла $100,3 \pm 11,02$ отн. ед., и введение ГКСК (II группа) не приводило к изменению содержания внутриклеточных АФК. В то же время инъекция ММС вызывала значимое ($p < 0,05$ для III группы и $p < 0,005$ для IV и V групп) увеличение I_{DCF} относительно I группы. Так, у мышей в III, IV и V группах величина I_{DCF} составила соответственно $131,7 \pm 9,84$; $253,8 \pm 78,69$ и $314,0 \pm 44,21$ отн. ед. При этом в III группе мы обнаружили значимое ($p < 0,005$) снижение I_{DCF} на 58,1 % относительно положительного контроля. Следовательно, курсовое применение ГКСК перед введением ММС

вызывало уменьшение содержания внутриклеточных АФК в клетках печени мышей, что может быть свидетельством снижения окислительного стресса в организме мышей.

Другим маркером активности окислительных процессов в организме животных может служить изменение концентрации МДА (25), поэтому мы определили содержание МДА в печени мышей исследуемых групп (см. рис. 4, Б). В I группе этот показатель составил $0,4 \pm 0,06$ мкмоль/г. Во II группе показатель незначимо возростал до $1,0 \pm 0,26$ мкмоль/г. Количество МДА в печени мышей, получивших инъекцию ММС, статистически значимо увеличилось в III группе ($p < 0,05$) и в IV-V группах ($p < 0,005$). Содержание МДА в группе положительного контроля составило $1,7 \pm 0,15$ мкмоль/г. Трехкратное введение ГКСК в III группе приводило к достоверному ($p < 0,005$) снижению показателя на 58,6 % ($0,7 \pm 0,08$ мкмоль/г) относительно положительного контроля. Однократное применение ГКСК вместе с ММС (IV группа) не вызывало снижения содержания МДА в печени мышей, которое составило $1,5 \pm 0,56$ мкмоль/г.

Таким образом, при многократном введении ГКСК мышам с индуцированным ММС свободнорадикальным окислением наблюдалось снижение окислительного стресса в печени, что согласуется с данными по снижению содержания внутриклеточных АФК в клетках печени мышей.

Мы установили отсутствие мутагенного действия ГКСК на клетки костного мозга мышей, определяемого по частоте ПХЭ с микроядрами, вместе с сохранением целостности мтДНК печени животных. Помимо этого, не наблюдалась стимуляция свободнорадикального окисления в клетках печени у мышей из II группы. Представленные данные согласуются с материалами публикаций, свидетельствующими об отсутствии мутагенного действия, а также снижении окислительного стресса в доклинических исследованиях безопасности некоторых тканевых препаратов, основанных на экстрактах плаценты свиньи или лейкоцитов быка (29, 30).

Курсовое введение ГКСК в дозе 0,5 мл/кг мышам из III группы приводило к снижению частоты ПХЭ с микроядрами у животных, получивших высокую дозу ММС. Эти данные могут свидетельствовать об антимуtagenном действии фармакологической субстанции ГКСК, что соответствует полученным ранее данным о снижении частоты ПХЭ с микроядрами после применения препарата кластогена — циклофосфамида на мышах, которым вводили препарат аминоселетон, содержащий гидрофильную фракцию селезенки КРС (31). В других исследованиях также было обнаружено уменьшение частоты эритроцитов с микроядрами после использования экстракта селезенки КРС на мышах, подвергнутых радиационному облучению, что подтверждает полученные нами данные (32).

Причиной образования микроядер становится нарушение расхождения хромосом или их фрагментов в дочерние клетки в процессе деления (33). В свою очередь, кластогенное действие веществ может проявляться посредством прямого разрушения цепочки ДНК, образования нуклеотидных сшивок или модификации нуклеотидов, что в результате действия механизмов репарации приводит к формированию фрагментов хромосом (34). Антибиотик-алкилятор ДНК ММС может выступать индуктором образования разрывов в ДНК, он способен оказывать влияние как на ядерную, так и на митохондриальную ДНК (35, 36). Поэтому обнаруженное нами снижение числа повреждений мтДНК во фрагменте 12S-16S у мышей, получивших трехкратную инъекцию ГКСК перед введением ММС (III группа), указывает на ДНК-протекторное действие ГКСК, которое, по-видимому, обуславливает антимуtagenный эффект исследуемой фармакологической

субстанции. В нескольких работах было показано уменьшение индуцированного радиацией повреждения ДНК в костном мозге, печени и других органах мышей под действием экстракта человеческой плаценты, что подтверждает полученные нами данные (37, 38).

Помимо этого, ММС способен вызывать повреждение ДНК не только в реакциях прямого алкилирования, но и через индукцию свободно-радикального окисления в организме после метаболической активации антибиотика *in vivo* (39). В связи с тем, что в митохондриях нет сложных систем репарации ДНК, присущих ядру эукариотической клетки, мтДНК проявляет высокую чувствительность к повреждению со стороны АФК и других свободных радикалов (26, 40). То есть выявленное нами увеличение числа повреждений мтДНК в печени мышей после введения ММС частично может быть обусловлено повышенной генерацией АФК в клетках печени, что подтверждается данными об увеличении Irsf и концентрации МДА в печени мышей. Вместе с тем снижение этих параметров у мышей из III группы относительно положительного контроля может свидетельствовать об уменьшении свободнорадикального стресса в организме мышей с ММС под действием ГКСК, которое, вероятно, проявляется за счет антиоксидантного действия исследуемой фармакологической субстанции. Действительно, ряд исследований тканевых препаратов, в том числе содержащих ГКСК, демонстрируют снижение процессов свободнорадикального окисления и стимуляции различных систем антиоксидантной защиты (31, 41). Таким образом, один из механизмов обнаруженного нами антимуtagenного и ДНК-протекторного действия ГКСК может проявляться через снижение окислительного стресса, вероятно, связанного с активизацией систем антиоксидантной защиты.

Итак, гидрофильная криофракция селезенки крупного рогатого скота не проявляла собственного мутагенного и ДНК-повреждающего действия в опытах на белых беспородных мышях. Введение исследуемой фармакологической субстанции сохраняло процессы свободнорадикального окисления сходными с таковыми у здоровых мышей из группы отрицательного контроля. Курсовое введение гидрофильной криофракции селезенки крупного рогатого с кота перед индукцией цитогенетической нестабильности, окислительного стресса и повреждения ДНК клеток с помощью митомицина С вызывало значимое снижение интенсивности этих процессов, оцениваемых по частоте полихроматофильных эритроцитов с микроядрами в костном мозге (на 27,4 %), относительному содержанию внутриклеточных активных форм кислорода (на 58,1 %), концентрации малонового диальдегида (на 58,6 %) и числу повреждений в мтДНК клеток печени мышей (на 89,7 % во фрагменте 12S-16S) ($p < 0,05$). Эти данные свидетельствуют о наличии у гидрофильной криофракции селезенки крупного рогатого скота антимуtagenных, ДНК-протекторных свойств, которые обусловлены ее антиоксидантным действием, вероятно, за счет активации систем антиоксидантной защиты.

ЛИТЕРАТУРА

1. Дурнев А.Д. Антимуtagenез и антимуtagenны. *Физиология человека*, 2018, 44(3): 116-137 (doi: 10.7868/S013116461803013X).
2. *Genetic toxicology: principles and methods* /J.M. Parry, E.M. Parry (eds.). Humana Press, NY, 2012 (doi: 10.1007/978-1-61779-421-6).
3. Hatta M.N.A., Hanif E.A. Chin S.F., Neoh H.M. Pathogens and carcinogenesis: a review. *Biology*, 2021, 10(6): 533 (doi: 10.3390/biology10060533).
4. Vijg J., Suh Y. Genome instability and aging. *Annual Review of Physiology*, 2013, 75: 645-668 (doi: 10.1146/annurev-physiol-030212-183715).

5. Kay J., Thadhani E., Samson L., Engelward B. Inflammation-induced DNA damage, mutations and cancer. *DNA Repair*, 2019, 83: 102673 (doi: 10.1016/j.dnarep.2019.102673).
6. Thada V., Greenberg R.A. Unpaved roads: how the DNA damage response navigates endogenous genotoxins. *DNA Repair*, 2022, 118: 103383 (doi: 10.1016/j.dnarep.2022.103383).
7. Turnbull H.E., Lax N.Z., Diodato D., Ansoorge O., Turnbull D.M. The mitochondrial brain: From mitochondrial genome to neurodegeneration. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular Basis of Disease*, 2010, 1802(1): 111-121 (doi: 10.1016/j.bbadis.2009.07.010).
8. Vaz-Drago R., Custódio N., Carmo-Fonseca M. Deep intronic mutations and human disease. *Human Genetics*, 2017, 136: 1093-1111 (doi: 10.1007/s00439-017-1809-4).
9. Martincorena I., Campbell P.J. Somatic mutation in cancer and normal cells. *Science*, 2015, 349(6255): 1483-1489 (doi: 10.1126/science.aab4082).
10. Jennings R.L., Griffin D.K., O'Connor R.E. A new approach for accurate detection of chromosome rearrangements that affect fertility in cattle. *Animals*, 2020, 10(1): 114 (doi: 10.3390/ani10010114).
11. Udroui I., Sgura A. Cytogenetic tests for animal production: state of the art and perspectives. *Animal Genetics*, 2017, 48(5): 505-515 (doi: 10.1111/age.12581).
12. Malik S., Kaur K., Prasad S., Jha N.K., Kumar V. A perspective review on medicinal plant resources for their antimutagenic potentials. *Environmental Science and Pollution Research*, 2022, 29: 62014-62029 (doi: 10.1007/s11356-021-16057-w).
13. Гончарова Р.И., Кужир Т.Д. Молекулярные основы применения антимуагенов в качестве антиканцерогенов. *Экологическая генетика*, 2005, 3(3): 19-32.
14. Шабунин С.В., Беляев В.И., Востроилова Г.А., Кабицкий С.Н. *Органопрепараты (лекарственные препараты из органов и тканей животных)*. Воронеж, 2013.
15. Федуллова Л.В., Василевская Е.Р. Перспективные источники природных стимуляторов иммунитета. *Мясные технологии*, 2016, 12(168): 37-39.
16. Maatouk M., Mustapha N., Mokdad-Bzeouch I., Chaaban H., Ioannou I., Ghedira K., Ghoul M., Chekir-Ghedira L. Heated naringin mitigate the genotoxicity effect of Mitomycin C in BALB/c mice through enhancing the antioxidant status. *Biomedicine and Pharmacotherapy*, 2018, 97: 1417-1423 (doi: 10.1016/j.biopha.2017.11.027).
17. *Руководство по проведению доклинических исследований лекарственных средств. Часть первая /Под ред. А.Н. Миронова и др. М., 2012.*
18. Jain A.K., Pandey A.K. In vivo micronucleus assay in mouse bone marrow In: *Genotoxicity assessment. Methods in molecular biology, vol. 2031 /A. Dhawan, M. Bajpayee (eds.)*. Humana New York, NY, 2019: 135-146 (doi: 10.1007/978-1-4939-9646-9_7).
19. Suzuki Y., Nagae Y., Li J., Sakaba H., Mozawa K., Takahashi A., Shimizu H. The micronucleus test and erythropoiesis. Effects of erythropoietin and a mutagen on the ratio of polychromatic to normochromatic erythrocytes (P/N ratio). *Mutagenesis*, 1989, 4(6): 420-424 (doi: 10.1093/mutage/4.6.420).
20. Lehle S., Hildebrand D.G., Merz B., Malak P.N., Becker M.S., Schmezer P., Essmann F., Schulze-Osthoff K., Rothfuss O. LORD-Q: a long-run real-time PCR-based DNA-damage quantification method for nuclear and mitochondrial genome analysis. *Nucleic Acids Research*, 2014, 42(6): e41 (doi: 10.1093/nar/gkt1349).
21. Gureev A.P., Shaforostova E.A., Starkov A.A., Popov V.N. Simplified qPCR method for detecting excessive mtDNA damage induced by exogenous factors. *Toxicology*, 2017, 382: 67-74 (doi: 10.1016/j.tox.2017.03.010).
22. Хорольская В.Г., Гурев А.П., Шафоростова Е.А., Попов В.Н. Влияние фенофибрата на генотоксичность в мозге и печени и на экспрессию генов, регулирующих метаболизм жирных кислот, у мышей. *Биомедицинская химия*, 2019, 65(5): 388-397 (doi: 10.18097/PBMC20196505388).
23. Lee S.M., Schelcher C., Demmel M., Hauner M., Thasler W.E. Isolation of human hepatocytes by a two-step collagenase perfusion procedure. *Journal of Visualized Experiments*, 2013, 3(79): 50615 (doi: 10.3791/50615).
24. Eruslanov E., Kusmartsev S. Identification of ROS using oxidized DCFDA and flow-cytometry In: *Advanced protocols in oxidative stress II. Methods in molecular biology, vol. 594 /D. Armstrong (ed.)*. Humana Totowa, NJ, 2010: 57-72 (doi: 10.1007/978-1-60761-411-1_4).
25. Рецкий М.И., Шабунин С.В., Блинецова Г.Н., Рогачева Т.Е., Ермолова Т.Г., Фоменко О.Ю., Братченко Э.В., Дубовцев В.Ю., Каверин Н.Н., Цебржинский О.И. *Методические положения по изучению процессов свободнорадикального окисления и системы антиоксидантной защиты организма*. Воронеж, 2010.
26. Rothfuss O., Gasser T., Patenge N. Analysis of differential DNA damage in the mitochondrial genome employing a semi-long run real-time PCR approach. *Nucleic Acids Research*, 2010, 38(4): e24 (doi: 10.1093/nar/gkp1082).
27. Шабанов Д.И., Востроилова Г.А., Михайлов Е.В., Сыромятников М.Ю., Корчагина А.А., Селютина М.А. Исследование влияния митомицина на уровень повреждений митохондриальной ДНК у мышей in vivo. *Ветеринарный фармакологический вестник*, 2023, 2(23): 12-23 (doi: 10.17238/issn2541-8203.2023.2.12).

28. Paz M.M., Pritsos C.A. The molecular toxicology of mitomycin C. *Advances in Molecular Toxicology*, 2012, 6: 243-299 (doi: 10.1016/B978-0-444-59389-4.00007-0).
29. Mitsui Y., Bagchi M., Marone P.A., Moriyama H., Bagchi D. Safety and toxicological evaluation of a novel, fermented, peptide-enriched, hydrolyzed swine placenta extract powder. *Toxicology Mechanisms and Methods*, 2015, 25(1): 13-20 (doi: 10.3109/15376516.2014.971139).
30. Polonini H., Gonçalves A.E.d.S.S., Dijkers E., Ferreira A.d.O. Characterization and safety profile of transfer factors peptides, a nutritional supplement for immune system regulation. *Biomolecules*, 2021, 11: 665 (doi: 10.3390/biom11050665).
31. Шабунин С.В., Востроилова Г.А., Паршин П.А., Шабанов Д.И., Хохлова Н.А. Анти-кластогенная активность аминокислоты при воздействии циклофосамада на костный мозг мышей. *Сельскохозяйственная биология*, 2021, 56(4): 763-771 (doi: 10.15389/agrobiology.2021.4.763rus).
32. Дычко К.А., Рыжова Г.Л., Кравцова С.С., Кирьянова Н.Л., Кувшинов Н.Н., Гриднева В.И. *Способ получения средства с адаптогенным и противолучевым действием. Патент RU 2142284 C1 (РФ) А61К 35/28. Томский государственный университет (РФ). № 95110155/14. Заявл. 14.06.1995. Оpubл. 10.12.1999.*
33. Hayashi M. The micronucleus test — most widely used in vivo genotoxicity test. *Genes and Environment*, 2016, 38: 18 (doi: 10.1186/s41021-016-0044-x).
34. Chatterjee N., Walker G.C. Mechanisms of DNA damage, repair, and mutagenesis. *Environmental and Molecular Mutagenesis*, 2017, 58(5): 235-263 (doi: 10.1002/em.22087).
35. Pritsos C.A., Briggs L.A., Gustafson D.L. A new cellular target for mitomycin C: a case for mitochondrial DNA. *Journal of Cancer Research and Clinical Oncology*, 1997, 9(6-7): 333-337.
36. Sinitisky M., Asanov M., Sinitiskaya A., Shishkova D., Khutornaya M., Minina V., Ponasenko A. Atorvastatin can modulate DNA damage repair in endothelial cells exposed to mitomycin C. *International Journal of Molecular Sciences*, 2023, 24(7): 6783 (doi: 10.3390/ijms24076783).
37. Oh E., Jung W., Sul D. DNA damage and protective effects of placental extracts in blood lymphocytes and lymphoid organs of mice exposed to gamma irradiation. *Journal of Radiation Research and Applied Sciences*, 2023, 16(2): 100557 (doi: 10.1016/j.jrras.2023.100557).
38. Kawakatsu M., Urata Y., Goto S., Ono Y., Li T.S. Placental extract protects bone marrow-derived stem/progenitor cells against radiation injury through anti-inflammatory activity. *Journal of Radiation Research*, 2013, 54(2): 268-276 (doi: 10.1093/jrr/rrs105).
39. Wang Y., Gray J.P., Mishin V., Heck D.E., Laskin D.L., Laskin J.D. Distinct roles of cytochrome P450 reductase in mitomycin C redox cycling and cytotoxicity. *Molecular Cancer Therapeutics*, 2010, 9(6): 1852-1863 (doi: 10.1158/1535-7163.MCT-09-1098).
40. Huang Z., Chen Y., Zhang Y. Mitochondrial reactive oxygen species cause major oxidative mitochondrial DNA damages and repair pathways. *Journal of Biosciences*, 2020, 45: 84 (doi: 10.1007/s12038-020-00055-0).
41. Shen L.H., Fan L., Zhang Y., Zhu Y.K., Zong X.-L., Peng G.-N., Cao S.-Z. Protective effect and mechanism of placenta extract on liver. *Nutrients*, 2022, 14(23): 5071 (doi: 10.3390/nu14235071).

ФГБНУ Всероссийский научно-исследовательский ветеринарный институт патологии, фармакологии и терапии,
394087 Россия, г. Воронеж, ул. Ломоносова, 114-б,
e-mail: gvostroilova@mail.ru ✉, vniVIPat@mail.ru, am7d@mail.ru,
nina_xoxlova@mail.ru, a.a.korch@mail.ru, mihan.vrn@mail.ru,
artem_artem_nekrasov@inbox.ru, mariya.selutina849@gmail.com,
dianalubad36@mail.ru

Поступила в редакцию
27 мая 2024 года

Sel'skokhozyaistvennaya biologiya [Agricultural Biology], 2024, V. 59, № 6, pp. 1192-1203

STUDY OF ANTIMUTAGENIC EFFECT OF HYDROPHILIC CRYOFRACTION OF BOVINE SPLEEN

G.A. Vostroilova ✉, S.V. Shabunin, D.I. Shabanov, N.A. Khokhlova, A.A. Korchagina, M.Yu. Syromyatnikov, A.V. Nekrasov, M.A. Selutina, D.D. Morozova

All-Russian Research Veterinary Institute of Pathology, Pharmacology and Therapy, 114-b, ul. Lomonosova, Voronezh, 394087 Russia, e-mail gvostroilova@mail.ru (✉ corresponding author), vniVIPat@mail.ru, am7d@mail.ru, nina_xoxlova@mail.ru, a.a.korch@mail.ru, mihan.vrn@mail.ru, artem_artem_nekrasov@inbox.ru, mariya.selutina849@gmail.com, dianalubad36@mail.ru

ORCID:

Vostroilova G.A. orcid.org/0000-0002-2960-038X
Shabunin S.V. orcid.org/0000-0002-2689-6998
Shabanov D.I. orcid.org/0000-0002-1574-1317
Khokhlova N.A. orcid.org/0000-0001-6861-2554
Korchagina A.A. orcid.org/0000-0002-8561-417X

Syromyatnikov M.Yu. orcid.org/0000-0001-9028-0613
Nekrasov A.V. orcid.org/0000-0002-5957-1583
Selutina M.A. orcid.org/0009-0005-8500-1786
Morozova D.D. orcid.org/0009-0004-9721-9400

The authors declare no conflict of interests

Abstract

High production loads and deterioration of the environmental situation lead to an increase in the effect of various factors that can cause mutations in the cells of farm animals. The accumulation of mutations leads to the occurrence of diseases, disruption of immune functions, decreased weight gain, partial or complete sterility, loss of valuable breed traits, causes death and also affects the next generations. The use of drugs with an antimutagenic effect is considered to be one of the ways to reduce the accumulation of DNA damage in the body. Pharmacological substances obtained from animal tissues, such as bovine spleen, can become a promising basis for drugs with such properties. In this work, we have established the antimutagenic effect of hydrophilic cryofraction of bovine spleen on bone marrow cells of mice for the first time, as well as the DNA-protective effect on mitochondrial DNA (mtDNA) of mouse liver under conditions of cytogenetic instability induced by the experimental mutagen mitomycin C. We have also shown the effect of hydrophilic cryofraction of bovine spleen on some markers of oxidative stress in mouse liver cells upon administration of mitomycin C to animals. The aim of the work was to determine the effect of hydrophilic cryofraction of bovine spleen on the cytogenetic stability of bone marrow cells and the integrity of mtDNA of mouse liver, as well as to assess its antimutagenic and DNA-protective effects on mice with mitomycin C (MMC)-induced cytogenetic instability. Hydrophilic cryofraction of bovine spleen (HCBS) was obtained at the FSBSI ARVRIPP&T. The positive control was the drug Mitomycin C Kyowa (Kyowa Hakko Kogyo Co., Ltd, Japan), containing mitomycin as the active substance. The experiments were conducted in 2024. Male white outbred mice (*Mus albus officinarum*) ($n = 30$) weighing 26.0 ± 2.0 g were used. Five groups of animals ($n = 6$) were formed. In group I (negative control), the animals were given a single intramuscular injection of sterile isotonic sodium chloride solution in a volume of 0.1 ml. In group II, the mice were given a single intramuscular injection of HCBS at a dose of 0.5 ml/kg in a volume of 0.1 ml. The animals of group III were administered HCBS at a dose of 0.5 ml/kg in a volume of 0.1 ml and together with the last injection of HCBS intramuscularly three times with an interval of 24 h, a single intraperitoneal injection of MMC at a dose of 10 mg/kg in a volume of 0.5 ml. The animals of group IV were administered HCBS at a dose of 0.5 ml/kg in a volume of 0.1 ml intramuscularly once and a single intraperitoneal injection of MMC similarly to group III. The mice from group V (positive control) were given a single intraperitoneal injection of MMC at a dose of 10 mg/kg in a volume of 0.5 ml. The mice were eliminated from the experiment 24 hours after the last injection by means of an overdose of carbon dioxide in a special chamber. To study the frequency of polychromatophilic erythrocytes (PCE) with micronuclei (micronucleus test), bone marrow cells from femurs were added to inactivated fetal bovine serum (BioloT, Russia) and applied to glass slides, then the preparations were dried and stained according to Papenheim. The frequency of PCE with micronuclei per 1000 PCE was studied, and the ratio of PCE to normochromic erythrocytes (NE) was also accounted. The relative number of damages in mtDNA was estimated by qPCR. For this purpose, total DNA was isolated from 25 mg of homogenized mouse liver using the PROBA-GS kit (DNA Technology, Russia). Calculation of mtDNA damage was performed in the regions encoding the 12S and 16S rRNA (12S-16S) and the ND5 gene (ND5). The total relative content of intracellular reactive oxygen species (ROS) was determined using a cellular probe, 2',7'-dichlorodihydrofluorescein diacetate (Sigma-Aldrich, USA), which, when oxidized inside living cells, forms a fluorescent form (DCF) detected using a RF-5301 spectrofluorimeter (Shimadzu, Japan). The content of intracellular ROS was estimated in a suspension of mouse liver cells (3×10^6 cells/ml). The concentration of malondialdehyde (MDA) was determined in mouse liver homogenate using a UV-1700 spectrophotometer (Shimadzu, Japan) by staining the solution at $\lambda = 535$ nm with trimethine complex. As a result of the experiments, we did not find any significant differences from the negative control of all the studied parameters in the mice from group II. Thus, in group II, the frequency of PCE with micronuclei was 0.41 ± 0.080 %, the number of mtDNA damages in the 12S-16S and ND5 fragments was 0.0 ± 0.92 and 2.2 ± 0.45 , respectively. The introduction of MMC in group V led to an increase in the frequency of PCE with micronuclei in the bone marrow of mice to 11.20 ± 1.000 %. The number of mtDNA damages in the liver increased to 4.1 ± 0.44 and 4.2 ± 0.30 in the 12S-16S and ND5 fragments, which was accompanied by an increase in the content of intracellular ROS to 314.0 ± 44.20 r.u. and the MDA concentration — to 1.7 ± 0.15 $\mu\text{mol/g}$. In this case, the course administration of HCBS together with MMC (group III) reduced the frequency of PCE with micronuclei by 27.4 % ($p < 0.05$) to 8.20 ± 1.070 %, as well as the mtDNA damages by 89.7 % ($p < 0.05$) in the 12S-16S fragment to 0.4 ± 1.27 compared to the positive control. The changes revealed in group III could be partially due to the observed decrease in the content of intracellular ROS by 58.1 % ($p < 0.005$) to 131.7 ± 9.84 r.u. and the concentration of MDA by 58.6 % ($p < 0.005$) to 0.7 ± 0.08 $\mu\text{mol/g}$ in the liver of mice vs. the positive control. These data indicate that the hydrophilic cryofraction of bovine spleen has antimutagenic and DNA-protective properties, which are probably due to its antioxidant action caused by the activation of antioxidant defense systems.

Keywords: hydrophilic cryofraction of bovine spleen, mutagenicity, antimutagenic effect, DNA damage, mitochondrial DNA, mitomycin, micronucleus test, free radical oxidation, mice.