

СРАВНИТЕЛЬНОЕ ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНОЕ ИССЛЕДОВАНИЕ МУТАГЕННОГО И ЦИТОТОКСИЧЕСКОГО ДЕЙСТВИЯ НИТРОЗОДИМЕТИЛАМИНА В УСЛОВИЯХ ОСТРОГО И СУБХРОНИЧЕСКОГО ВВЕДЕНИЯ С ПОМОЩЬЮ МИКРОЯДЕРНОГО ТЕСТА НА РЕТИКУЛОЦИТАХ И ЛИМФОЦИТАХ ПЕРИФЕРИЧЕСКОЙ КРОВИ БЕЛЫХ КРЫС

Томилин Н. В., Филько О. А., Храброва А. В., Соловьева Н. Е., Сизова К. В.,

Утсаль В. А., Краснов К. А.

ФГБУН Институт токсикологии ФМБА России, Санкт-Петербург

192019, Санкт-Петербург, ул. Бехтерева, д. 1, Тел. (812) 365-06-80;

e-mail: Nikolay_Tomilin@rambler.ru

УДК 615.916

Резюме:

Объектами настоящего исследования являлись лимфоциты и ретикулоциты цельной крови белых крыс.

Цель работы – сравнительная оценка мутагенного и цитотоксического действия N-нитрозодиметиламина с помощью двух вариантов микроядерного теста: на ретикулоцитах и на лимфоцитах, культивируемых в условиях цитокинетического блока.

В экспериментальных исследованиях было изучено мутагенное и цитотоксическое действие НДМА после внутрибрюшинного однократного введения в дозах 7,5, 15 и 30 мг/кг через 3 и 24 ч после инъекции и после субхронического введения в дозах 3,5 и 7 мг/кг в течение 7 и 14 суток.

В исследованиях с помощью микроядерного теста на ретикулоцитах после однократного и субхронического введения НДМА мутагенное действие зарегистрировать не удалось. Цитотоксическое действие на ретикулоцитах было зарегистрировано после субхронического введения НДМА в течение 7 и 14 суток. Снижение относительного содержания ретикулоцитов после субхронического введения позволяет предположить маскировку мутагенного действия НДМА его цитотоксичностью.

С помощью микроядерного теста на лимфоцитах в культуре с цитокинетическим блоком мутагенное действие НДМА было обнаружено через 24 ч после введения в дозах 15 и 30 мг/кг, а цитотоксическое действие проявлялось после введения в дозе 30 мг/кг.

В субхронических экспериментах после введения субтоксических доз НДМА мутагенное и цитотоксическое действие было выявлено через 7 суток при дозе 7 мг/кг, а через 14 суток дозозависимое мутагенное действие было зарегистрировано после

ежедневных инъекций в дозах 3,5 и 7 мг/кг. Цитотоксическое действие было обнаружено только после введения НДМА в дозе 7 мг/кг.

Таким образом, полученные результаты доказали возможность использования лимфоцитов крови в мониторинговых исследованиях мутагенного действия НДМА, а также высокую чувствительность, надежность и независимость от цитотоксического действия тестирования мутагенного действия НДМА с помощью микроядерного теста на лимфоцитах в культуре с цитокинетическим блоком.

Ключевые слова: Нитрозодиметиламин, мутагенность, цитотоксичность, лимфоциты, ретикулоциты, микроядерный тест.

ACUTE AND SUBCHRONIC MUTAGENIC AND CYTOTOXIC STUDIES OF NITROSODIMETHYLAMINE ON RETYCULOCYTES AND LYMPHOCYTES IN WHITE RAT BLOOD USING MICRONUCLEUS TEST

Tomilin N. V., Filko O. A., Khrabrova A. V., Solovyeva N. E., Sizova K. V.,

Utsal V. A., Krasnov K. A.

«Institute of Toxicology» of Federal Medico-Biological Agency

St. -Petersburg, Russia, 192019, ul Bekhtereva, 1 Tel. (812) 365-06-80,

e-mail: Nikolay_Tomilin@rambler.ru

The objects of this study were lymphocytes and reticulocytes of white rat blood.

The aim of this work is to compare the mutagenic and cytotoxic effects of N-nitrosodimethylamine (NDMA) using two kinds of the micronucleus test: on reticulocytes and on lymphocytes using the cytokinesis-block micronucleus (CBMN) assay.

The mutagenicity and cytotoxicity were explored after the acute intraperitoneal administration of NDMA in doses of 7.5, 15 and 30 mg/kg at 3 and 24 hours exposure and after daily administration of NDMA in doses of 3.5 and 7 mg/kg for 7 and 14 days.

In studies where a micronucleus test on reticulocytes after acute and subchronic administration of NDMA was used, mutagenicity was not detected. The cytotoxic effect on reticulocytes was shown after administering NDMA daily for 7 and 14 days. The decline of the relative content of reticulocytes after the subchronic administration suggests the masking of the mutagenic effect of NDMA by its cytotoxicity.

In case of CBMN assay, the mutagenicity of NDMA was detected in 24 hours after administration in doses of 15 and 30 mg/kg, and the cytotoxic effect was detected after an injection of 30 mg/kg.

In experiments after subchronic administration of NDMA, mutagenic and cytotoxic effects were revealed after daily injections for 7 days at a dose of 7 mg/kg, and after 14 days the mutagenicity acquired a dose-dependent character after administration in doses of 3.5 and 7 mg/kg. The cytotoxic effect was shown only at a dose of 7 mg/kg.

Thus, the obtained results proved the possibility of using lymphocytes in the monitoring studies of the mutagenic action of NDMA. Also proven were the high sensitivity and reliability of the CBMN assay method and its independence from the cytotoxic effect of testing the mutagenicity of NDMA using the micronucleus test on lymphocytes in a cytokinesis-block culture.

Key words: Nitrosodimethylamine, mutagenicity, cytotoxicity, lymphocytes, reticulocytes, micronucleus test.

ВВЕДЕНИЕ

Широкое распространение нитрозодиметиламина (НДМА), являющегося высокотоксичным гепатотоксикантом и одним из самых активных канцерогенов, требует использования специальных методов для диагностики его токсического действия [1].

НДМА используют в качестве реагента для промышленного синтеза несимметричного диметилгидразина (НДМГ), который используется в качестве топлива в ракетно-космической отрасли. НДМА обнаруживается также среди продуктов самопроизвольного распада НДМГ под действием света, влаги и кислорода окружающего воздуха вследствие своей высокой нестабильности.

Генотоксическое действие НДМА обуславливается метилированием ДНК метильным радикалом, образуемым в результате метаболической активации цитохромами P450 (преимущественно CYP2E1) в гепатоцитах. В сравнительных экспериментах с помощью теста Эймса по оценке влияния микросомальных фракций S9 крысы и человека на метаболизм НДМА было показано 8-кратное превышение частоты мутаций для микросомальной фракции печени человека по отношению к результатам, полученным с использованием фракции крысы. Это может свидетельствовать о большей опасности генотоксического воздействия НДМА на человека по сравнению с данными, получаемыми в экспериментах на животных [2]. Основными продуктами метилирования являются N7-метилгуанин (66,8–74,5%) и O6-метилгуанин (6,1–7,8 %) [3]. N7-метилгуанин ослабляет гликозидную связь, что приводит к спонтанному или энзиматическому удалению азотистых оснований и возникновению апуриновых сайтов (АП-сайты). O6-метилгуанин способен связываться с тиминном вместо цитозина, индуцируя после репликации ДНК мутацию (замену пары G–C на A–T).

Известно, что генотоксическое действие активного метаболита НДМА успешно регистрируется на лейкоцитах периферической крови с помощью метода щелочного гель-электрофореза (метод ДНК-комет), что объясняется индукцией достаточного количества АП-сайтов [4]. Эти результаты определяют премутагенное состояние ДНК, поскольку значительная часть АП-сайтов может репарироваться специальными системами клеток. Для оценки риска возникновения мутаций необходимо использовать дополнительные методы. Микроядерный тест является одним из наиболее удобных методов, способным регистрировать кластогенные и анеугенные нарушения кариотипа.

В настоящее время существует несколько вариантов микроядерного теста, в которых в качестве объекта исследования используются клетки крови (на ретикулоцитах – с помощью флуоресцентной микроскопии или проточной цитофлуорометрии, на лимфоцитах – микроядерный тест в культуре клеток с цитокинетическим блоком).

Микроядерный тест на ретикулоцитах наиболее прост для выполнения, но низкое содержание этих клеток в крови человека (около 1%) и активная их элиминация селезенкой снижает надежность этого теста. Эта же причина также затрудняет использование проточной цитофлуориметрии.

Принципиальной особенностью микроядерного теста на культуре лимфоцитов, которые культивируются в условиях цитокинетического блока, является регистрация мутаций, которые лимфоциты уже несут в организме (*in vivo*), поскольку анализируются только двуядерные клетки сразу после первого митоза в культуре [5].

Целью настоящего исследования являлась сравнительная оценка мутагенного и цитотоксического действия НДМА с помощью двух вариантов микроядерного теста – на ретикулоцитах периферической крови белых крыс и на лимфоцитах в культуре с цитокинетическим блоком.

Материалы и методы

Исследования выполняли на самцах беспородных белых крыс массой 180-220 г. Каждая группа содержала не менее 4 животных.

НДМА в виде водного раствора вводили внутрибрюшинно. При исследовании острого действия препарата использовали дозы 7,5, 15 и 30 мг/кг. Забор крови осуществляли через 3 и 24 ч после введения. В субхронических экспериментах НДМА вводили ежедневно в дозах 3,5 и 7 мг/кг в течение 14 дней.

В контрольных группах животные получали соответствующий их массе объем дистиллированной воды.

Получение культуры лимфоцитов крови белых крыс. Для получения культуры лимфоцитов клетки крови предварительно отмывали от плазматического фактора, который ингибирует их стимуляцию с помощью митогена ФГА-П. Дополнительно, для увеличения количества двуядерных лимфоцитов крысы кроме ФГА-П добавляли конканавалин А [6].

Для этого 0,5 мл крови, взятой из хвостовой вены крысы в литий-гепариновые пробирки, центрифугировали при 300g в течение 5 мин и осадок ресуспензировали в 2 мл раствора Хенкса с гепарином. Супернатант удаляли, а к осажденным клеткам добавляли 5 мл раствора Хенкса. Последнюю операцию повторяли трижды.

После последнего осаждения осадок ресуспензировали в 1 мл раствора Хенкса с гепарином.

По 0,5 мл крови, отмытой от плазмы, добавляли к 4,5 мл клеточной среды, содержащей RPMI-1640 с глутамином и гентамицином, 10% эмбриональной бычьей

сыворотки, 1% ФГА П и 20 мкг/мл конконавалина А. Спустя 44 ч к культуре добавляли цитохалазин Б в конечной концентрации 6 мкг/мл.

Через 28 ч после добавления цитохалазина Б (общее время 72 ч после посева) пробирки центрифугировали при 300g в течение 10 мин, осадок ресуспензировали в 0,56% водном растворе KCl и выдерживали при 37° С в течение 15 мин. для лизирования эритроцитов. Затем материал фиксировали в трех сменах холодного метанол-уксусного фиксатора (3:1).

После раскапывания суспензии на стекла, их высушивали и окрашивали 2 % раствором красителя Гимза в фосфатном буфере pH 6,5.

Получение препаратов для микроядерного теста на ретикулоцитах периферической крови и лимфоцитах в культуре с цитокинетическим блоком. Препараты для микроядерного теста на ретикулоцитах изготавливали по методу Хаяши [7].

На предметные стекла, предварительно покрытые акридин оранжевым, помещали 8 мкл крови и немедленно накрывали покровным стеклом. Анализ препаратов выполняли под флуоресцентным микроскопом с объективом 40x и с фильтром-кубиком NB 2A. Для каждого животного изготавливали по два препарата.

Для исследования мутагенного действия анализировали не менее 2000 ретикулоцитов. Для каждого препарата рассчитывали процентное содержание ретикулоцитов с микроядрами. Средняя величина из двух препаратов определяла частоту встречаемости микроядер для каждого животного.

Цитотоксическое действие определяли на тех же препаратах по содержанию ретикулоцитов. Количество ретикулоцитов определяли в 5 случайных полях с объективом 40x, затем вычисляли среднее число ретикулоцитов в одном поле. Далее, исходя из площади поля камеры, с учетом объема аликвоты, рассчитывали содержание ретикулоцитов в одном миллилитре крови.

Мутагенное действие на культуре лимфоцитов определяли по частоте встречаемости клеток с микроядрами в 1000 проанализированных двуядерных лимфоцитов.

Цитотоксическое действие на культуре лимфоцитов оценивали по относительному содержанию двуядерных лимфоцитов, которое рассчитывали как отношение их количества к сумме одно-, двух-, трех- и четырехядерных клеток при анализе в случайных полях не менее 500 клеток.

Статистический анализ выполняли с помощью методов параметрической и непараметрической статистики. Для иллюстрации полученных результатов на графиках приводили среднее значение и величину стандартного отклонения.

Достоверность различий данных относительного содержания двуядерных лимфоцитов и ретикулоцитов с микроядрами между контрольными и экспериментальными группами оценивали с помощью непараметрического теста Манн-Уитни. Наличие дозозависимого действия устанавливали с помощью критерия Джонкхиера-Терпстры.

Сравнение содержания двуядерных лимфоцитов и содержания ретикулоцитов в экспериментальных группах относительно контрольной группы, осуществляли с помощью параметрического критерия Даннета. Зависимость эффекта от величины дозы проверяли с помощью оценки линейного тренда (One-way ANOVA).

Результаты и обсуждение

Относительное содержание ретикулоцитов с микроядрами в крови белых крыс через 3 ч после введения НДМА в дозах 7,5, 15 и 30 мг/кг сильно варьировало внутри групп и достоверно не отличалось от значений, полученных у животных контрольной группы. Общее содержание ретикулоцитов в крови также не менялось (Рис. 1).

Это свидетельствует об отсутствии генотоксического и цитотоксического действия НДМА спустя 3 ч после введения при всех испытанных дозах.

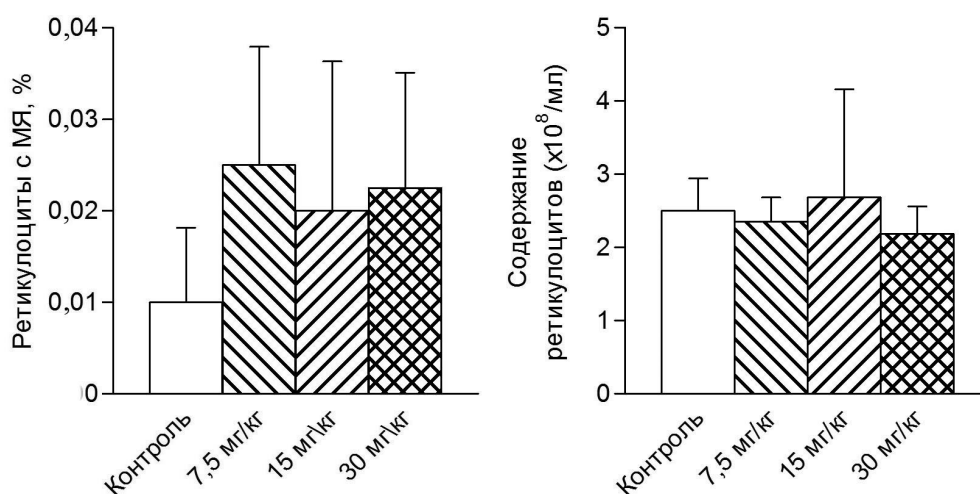


Рис. 1. Изменения относительного содержания ретикулоцитов с микроядрами (слева) и содержания ретикулоцитов (справа) в крови белых крыс через 3 ч после введения НДМА в дозах 7,5, 15 и 30 мг/кг.

Отрезки на рисунке обозначают стандартное отклонение

Аналогичная картина сохранялась и через 24 ч после введения НДМА в дозах 7,5, 15 и 30 мг/кг, хотя можно отметить некоторую недостоверную тенденцию снижения содержания ретикулоцитов при увеличении дозы введенного вещества (линейный тренд $p = 0,0973$) (Рис. 2).

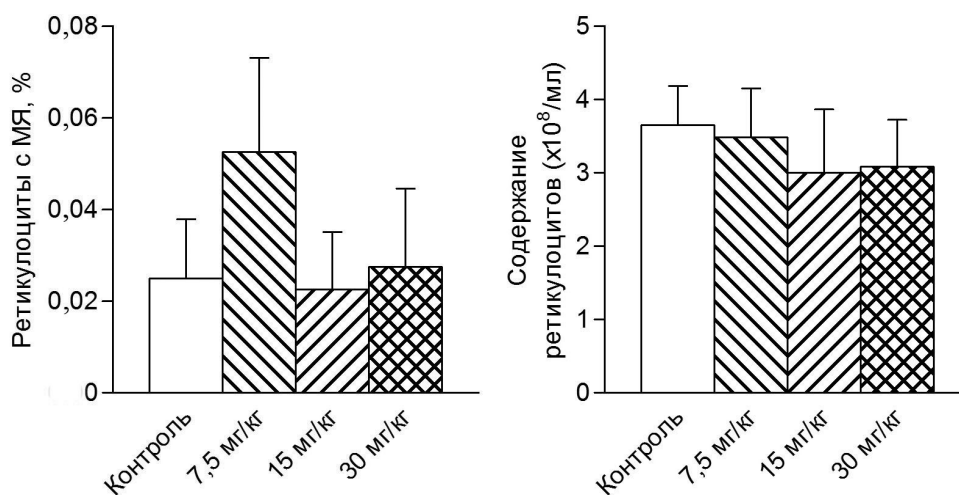


Рис. 2. Изменения относительного содержания ретикулоцитов с микроядрами (слева) и содержания ретикулоцитов (справа) в крови белых крыс через 24 ч после введения НДМА в дозах 7,5, 15 и 30 мг/кг.

Отрезки на рисунке обозначают стандартное отклонение

Изменения относительного содержания двуядерных лимфоцитов с микроядрами и их содержание через 3 и 24 ч после введения НДМА в дозах 7,5, 15 и 30 мг/кг приведены на рисунках 3 и 4.

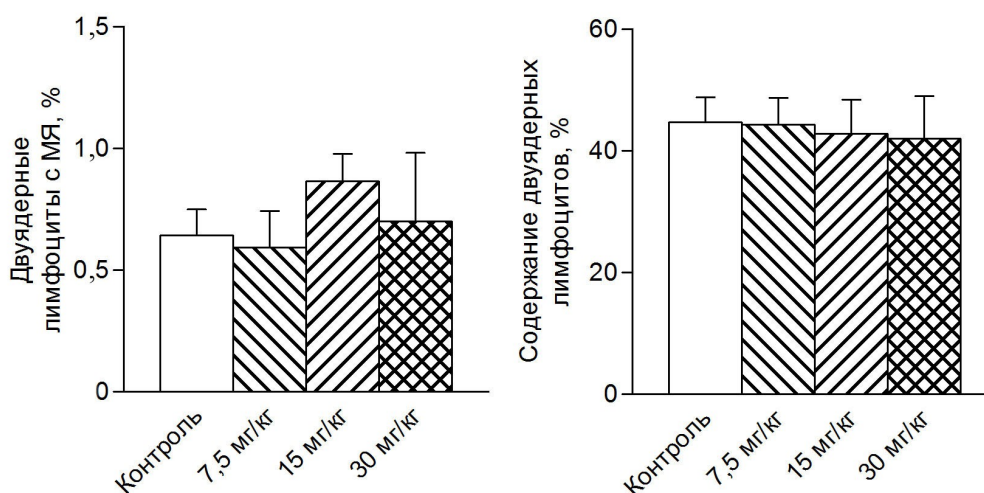


Рис. 3. Изменения относительного содержания двуядерных лимфоцитов с микроядрами (слева) и содержания двуядерных лимфоцитов (справа) через 3 ч после введения НДМА в дозах 7,5, 15 и 30 мг/кг.

Отрезки на рисунке обозначают стандартное отклонение

Отсутствие изменений в относительном содержании лимфоцитов с микроядрами и их общего содержания через 3 часа означает отсутствие мутагенного и цитотоксического действия на лимфоциты при испытанных дозах НДМА, что совпадает с данными полученными на ретикулоцитах, но вариабельность данных на лимфоцитах существенно ниже (рис. 3).

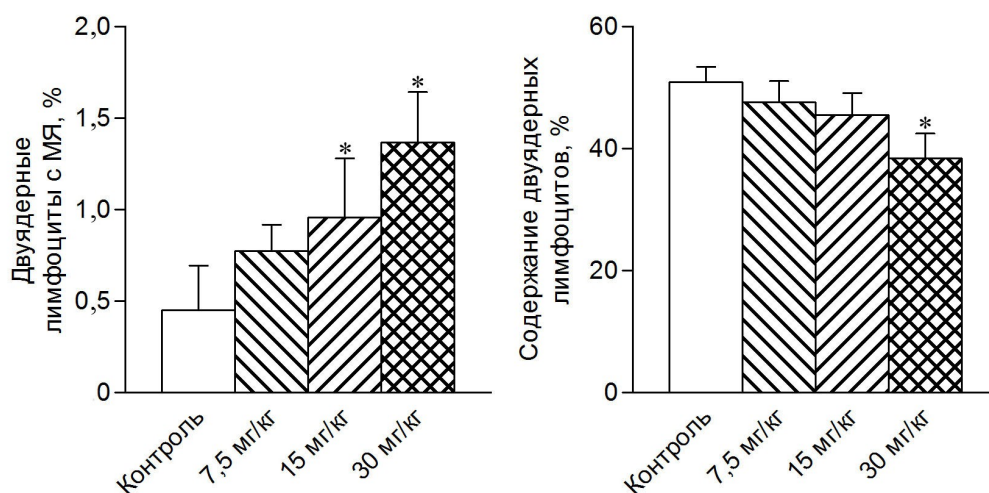


Рис. 4. Изменения относительного содержания двоядерных лимфоцитов с микроядрами (слева) и содержания двоядерных лимфоцитов (справа) в крови белых крыс через 24 ч после введения НДМА в дозах 7,5, 15 и 30 мг/кг.

* – Достоверные отличия от контроля ($p < 0,05$, критерии Манн-Уитни и Даннета)

Относительное содержание двоядерных лимфоцитов с микроядрами в культуре с цитокинетическим блоком через 24 ч после внутрибрюшинного введения НДМА в дозах 7,5, 15 и 30 мг/кг достоверно увеличивалось при дозах 15 и 30 мг/кг (Рис. 4). Зарегистрированное увеличение зависело от введенной дозы (критерий Джонкхиера-Терпстра, $p < 0,05$). Увеличение относительного содержания двоядерных лимфоцитов с микроядрами свидетельствует о генотоксическом действии НДМА через 24 ч после его введения в дозах 15 и 30 мг/кг.

Содержание двоядерных лимфоцитов снижалось в зависимости от дозы введенного животным НДМА (линейный тренд $p = 0,0003$) и достоверно отличалось при дозе 30 мг/кг от значений, полученных у животных контрольной группы, что свидетельствует о цитотоксическом действии.

Относительное содержание ретикулоцитов с микроядрами через 7 суток ежедневного введения в дозах 3,5 и 7 мг/кг не отличалось от величин в контрольной группе (Рис 5).

Содержание ретикулоцитов в крови достоверно снижалось после введения НДМА в дозах 3,5 и 7 мг/кг и зависело от величины дозы, что свидетельствует о его цитотоксическом действии (линейный тренд $p = 0,0002$) (Рис. 5).

Возможно, снижение относительного содержания ретикулоцитов с микроядрами после введения 7 мг/кг по сравнению с дозой 3,5 мг/кг препарата объясняется цитотоксическим действием НДМА.

Динамика изменений относительного содержания ретикулоцитов с микроядрами и содержания ретикулоцитов через 14 суток сходна с данными полученными через 7 суток (Рис. 6). Было также зарегистрировано дозозависимое снижение содержания ретикулоцитов, свидетельствующее о цитотоксическом действии НДМА (линейный тренд $p = 0,024$). Относительное содержание ретикулоцитов с микроядрами достоверно не изменялось, и подобно данным через семь суток было меньше при высокой дозе 7 мг/кг, что не исключает маскировку генотоксического действия цитотоксичностью.

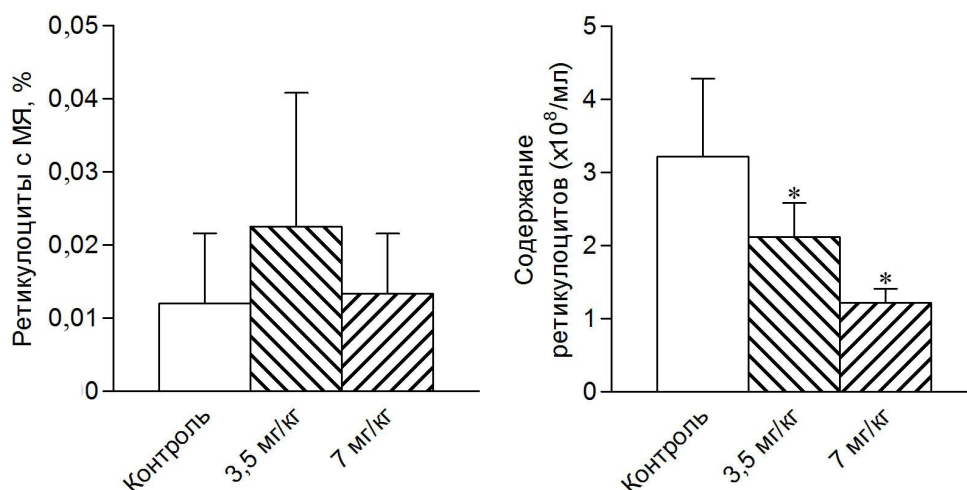


Рис. 5. Изменения относительного содержания ретикулоцитов с микроядрами (слева) и содержания ретикулоцитов (справа) в крови белых крыс через 7 суток ежедневного введения НДМА в дозах 3,5 и 7 мг/кг.

* – Достоверные отличия от контроля ($p < 0,05$, критерий Даннета)

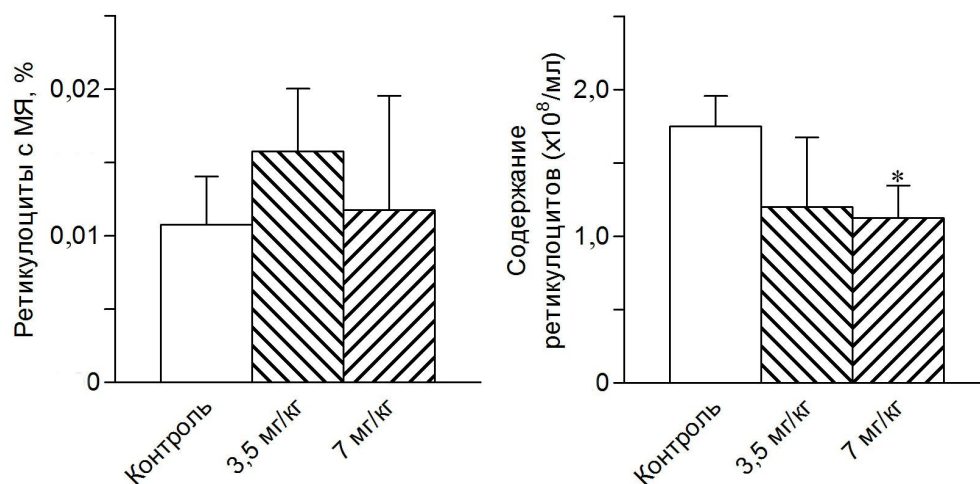


Рис. 6. Изменения относительного содержания ретикулоцитов с микроядрами (слева) и содержания ретикулоцитов (справа) в крови белых крыс через 14 суток ежедневного введения НДМА в дозах 3,5 и 7 мг/кг.

Отрезки на рисунке обозначают стандартное отклонение.

* – Достоверные отличия от контроля ($p < 0,05$, критерий Даннета)

Относительное содержание двуядерных лимфоцитов с микроядрами после 7 суток ежедневного внутрибрюшинного введения НДМА в дозах 3,5 и 7 мг/кг увеличивалось с нарастанием величины дозы, а при дозе 7 мг/кг достоверно отличалась от значения, полученного в контрольной группе (Рис. 7). Изменение содержания двуядерных лимфоцитов имело дозозависимый характер (линейный тренд $p = 0,0101$), а при введении НДМА в дозе 7 мг/кг достоверно отличалось от контроля.

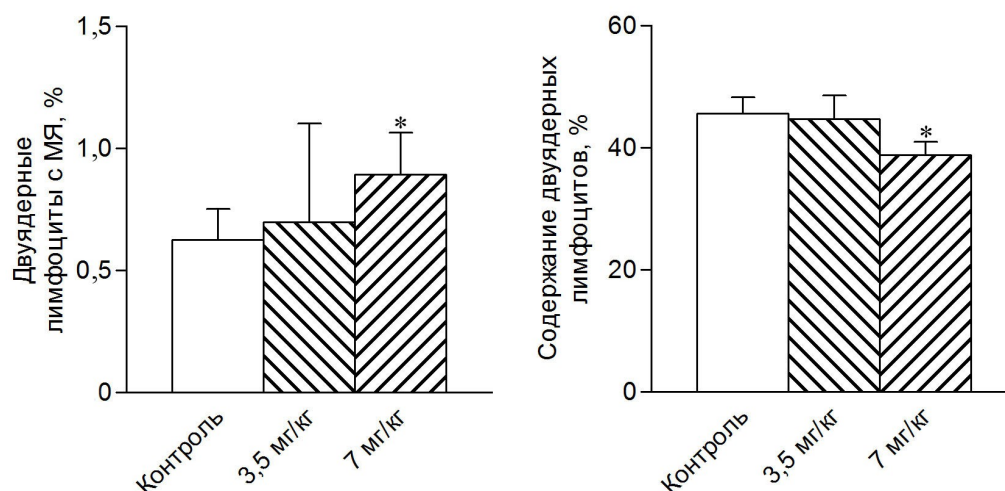


Рис. 7. Изменения относительного содержания двуядерных лимфоцитов с микроядрами (слева) и содержания двуядерных лимфоцитов (справа) в крови белых крыс через 7 суток ежедневного введения НДМА в дозах 3,5 и 7 мг/кг.

Отрезки на рисунке обозначают стандартное отклонение. * – Достоверные отличия от контроля ($p < 0,05$, критерии Манн-Уитни и Даннета)

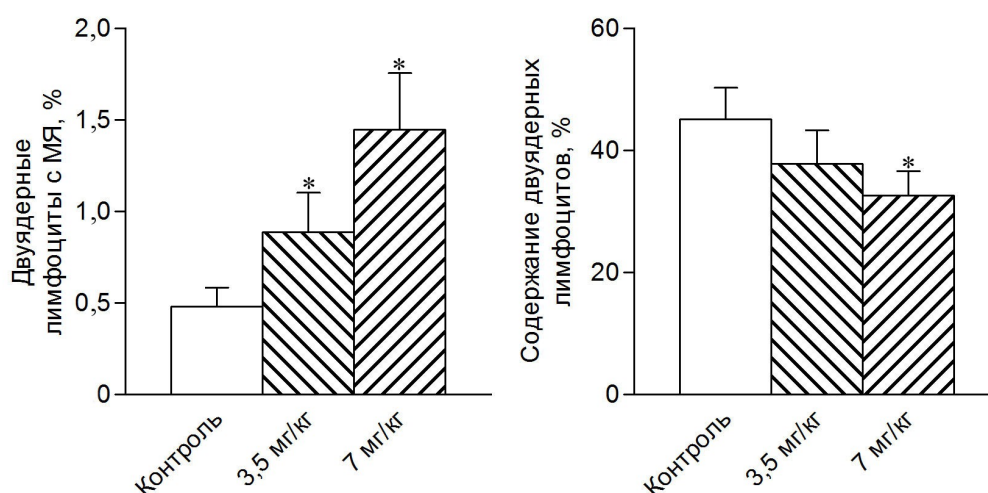


Рис. 8 – Изменения относительного содержания двуядерных лимфоцитов с микроядрами (слева) и содержания двуядерных лимфоцитов (справа) в крови белых крыс через 14 суток ежедневного введения НДМА в дозах 3,5 и 7 мг/кг.

* – Достоверные отличия от контроля ($p < 0,05$, критерии Манн-Уитни и Даннета)

Полученные результаты свидетельствуют о мутагенном и цитотоксическом действии НДМА при ежедневном введении в дозе 7 мг/кг в течение 7 суток.

Относительное содержание двуйдерных лимфоцитов с микроядрами через 14 суток после ежедневного введения НДМА в дозах 3,5 и 7 мг/кг достоверно увеличивалось с увеличением дозы (критерий Джонкхиера-Терпстра, $p < 0,05$) по сравнению с контролем и достоверные различия были получены между дозами 3,5 и 7 мг/кг (Рис. 8). Содержание двуйдерных лимфоцитов через 14 суток уменьшалось с увеличением дозы введенного вещества (линейный тренд $p = 0,0062$), достоверно отличаясь от контроля при дозе 7 мг/кг.

Несмотря на сходство динамики изменений обоих параметров после 7 и 14 суток воздействия различия между контрольными и экспериментальными группами выражены значительно сильнее через 14 суток.

Данные результаты свидетельствуют о мутагенном действии НДМА через 14 суток ежедневного введения в дозах 3,5 и 7 мг/кг и цитотоксическом действии при введении в дозе 7 мг/кг.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

В проведенных экспериментальных исследованиях было изучено мутагенное и цитотоксическое действие НДМА после внутрибрюшинного однократного введения в дозах 7,5, 15 и 30 мг/кг через 3 и 24 ч после инъекции и субхронического введения в дозах 3,5 и 7 мг/кг в течение 7 и 14 суток.

В исследованиях с помощью микроядерного теста на ретикулоцитах периферической крови крысы мутагенного действия НДМА после однократного введения и субхронического введения в течение 7 и 14 суток обнаружено не было.

Цитотоксическое действие на ретикулоцитах было зарегистрировано только после субхронического введения НДМА в течение 7 и 14 суток. Снижение относительного содержания ретикулоцитов в этом случае позволяет предположить маскировку мутагенного действия НДМА его цитотоксичностью.

С помощью микроядерного теста на лимфоцитах в культуре с цитокинетическим блоком мутагенное действие НДМА было выявлено через 24 ч после введения в дозах 15 и 30 мг/кг, а цитотоксическое действие проявлялось после введения в высокой дозе (30 мг/кг).

В экспериментах после субхронического введения НДМА мутагенное и цитотоксическое действие было выявлено через 7 суток при дозе 7 мг/кг, а через 14 суток дозозависимое мутагенное действие было зарегистрировано при введении обеих доз, а цитотоксическое действие – при дозе 7 мг/кг.

Более раннее проявление мутагенного действия свидетельствует, что ДНК повреждающее действие НДМА способно индуцировать цитотоксическое действие при высоких дозах, которое может быть связано с подавлением деления клеток и/или их гибелью. Микроядерный тест на лимфоцитах с цитокинетическим блоком продемонстрировал высокую чувствительность при регистрации мутагенного действия НДМА и независимость от его цитотоксического действия при высоких дозах.

Эти результаты доказывают, что лимфоциты являются удобными и надежными клетками для мониторинга мутагенного и цитотоксического действия НДМА.

Литература

1. N-Nitrosodimethylamine in drinking-water // Background document for development of WHO guidelines for drinking-water quality. – Geneva, Switzerland, 2008. – 29 p.
2. Hakura A., Suzuki S., Sawada S., Sugihara T., Hori Y.J., Uchida K., Kerns W.D., Sagami F., Motooka S., Satoh T. Use of human liver S9 in the Ames test: assay of three procarcinogens using human S9 derived from multiple donors // Regulatory toxicology and pharmacology – 2003. – Vol. 37 – P. 20-27.
3. Baranek D. T. Distribution of methyl and ethyl adducts following alkylation with monofunctional alkylating agents // Mutat. Res. – 1990. – Vol. 231 (1). – P. 11-30.
4. Bowen D. E., Whitwell J. H., Lillford L., Henderson D., Kidd D., Mc Garry S., Pearce G., Beevers C., Kirkland D. J. Evaluation of a multi-endpoint assay in rats, combining the bone-marrow micronucleus test, the Comet assay and the flow-cytometric peripheral blood micronucleus test. Mutat. Res. – 2011. – Vol. 722. – P. 1-19.
5. Fenech M. The in vitro micronucleus technique // Mutat. Res. – 2000. – Vol. 455 (1-2). – P. 81-95.
6. Kligerman A. D., Erexson G. L., Wilmer J. L. Development of rodent peripheral blood lymphocyte culture systems to detect cytogenetic damage in vivo // Basic Life Sci. – 1984. – Vol. 29 Pt. B. – P. 569-584.
7. Hayashi M., Morita T., Kodama Y., Sofuni T., Ishidate M., Jr. The micronucleus assay with mouse peripheral blood reticulocytes using acridine orange-coated slides // Mutat. Res. – 1990. – Vol. 245 (4). – P. 245-249.