

УДК 57.086:575.1:576.08:57.042:613.6

## НОВЫЙ НЕИВАЗИВНЫЙ МИКРОЯДЕРНЫЙ ТЕСТ НА РЕКТАЛЬНЫХ ЭПИТЕЛИОЦИТАХ КРЫС

© 2025 г. Л. П. Сычева\*, Ю. А. Федотов, Ю. В. Копалиани, Д. В. Гурьев

Государственный научный центр Российской Федерации — Федеральный медицинский биофизический центр  
имени А. И. Бурназяна, Москва, 123182, Россия

\*E-mail: lpsycheva@mail.ru

Поступила в редакцию 21.04.2025

После доработки 05.05.2025

Принята к публикации 15.05.2025

В настоящее время общепринятым и наиболее распространенным методом оценки мутагенности различных факторов является микроядерный тест на полихроматофильных эритроцитах костного мозга мышей или крыс. Однако для некоторых химических факторов уровень эффекта в костном мозге может быть ниже или отсутствовать по сравнению с другими органами. В последнее время стали использовать методы оценки генотоксичности в негемопозитических органах. Восьмая международная рабочая группа по тестированию генотоксичности рекомендует применять микроядерный тест на клетках желудочно-кишечного тракта при изучении плохо всасывающихся или быстро распадающихся в толстой кишке веществ (Beevers et al., 2023). Этот метод предусматривает анализ клеток животных после декапитации. Мы впервые предлагаем метод прижизненной оценки мутагенного эффекта факторов у экспериментальных животных. В работе подробно описаны временные аспекты метода, условия взятия ректальных клеток, способ фиксации, окраски и анализа. Апробация метода проведена в экспериментах по оценке эффекта тритиевой воды и нейтронного излучения.

**Ключевые слова:** генотоксичность, микроядра, мутагенный эффект, новый микроядерный тест, протрузии ядра, ректальные эпителиоциты, толстая кишка, цитогенетический тест

DOI: 10.7868/S3034606125030072

В наши дни появляется все больше новых технологий, химических, физических и биологических факторов, потенциально опасных для здоровья человека. Для предотвращения негативных эффектов разработана система тестирования действия этих факторов на организм человека и создания регламентов, позволяющая минимизировать риски (Оценка токсичности и опасности, 2014).

Методы оценки факторов *in vivo* основаны на исследовании органов и клеток животных после декапитации, что предполагает однократное исследование для каждого животного. Для решения ряда задач в области генетической токсикологии, особенно для изучения временных характеристик действия токсикантов, необходим метод, позволяющий исследовать клетки животного многократно прижизненно. У человека таким методом, хорошо зарекомендовавшим себя во многих исследованиях, является буккальный микроядерный цитомный тест. Анализируют также назальный эпителий (Wultsch et al., 2019), цер-

викальные клетки (Nersesyan et al., 2020), трахеальный эпителий, полученный при браш-биопсии (Стацук и др., 2011). Однако у крыс практически невозможно собрать эти клетки. Буккальный эпителий крыс значительно отличается от эпителия человека. Кератинизированные поверхностные клетки эпителия внутренней стороны щеки плотно соединены между собой, что не позволяет собрать их с поверхности щеки — на препарат попадают только единичные безъядерные клетки. В связи с этим многочисленные попытки разработать цитомный анализ буккального эпителия крыс пока не дали результата. Нам также не удалось приготовить препараты клеток назального эпителия и эпителия роговицы. Однако в качестве замены оказалось возможным прижизненно собирать клетки ректального эпителия.

Следует отметить важный аспект анализа клеток ректального эпителия как перспективного метода прогноза канцерогенности (Nicolouzakakis et al., 2018). Колоректальный рак является второй по значимости причиной смерти от рака

у женщин и третьей — у мужчин (Brody, 2015), причем 28 % всех случаев колоректального рака составляет рак прямой кишки (Thanikachalam, Khan, 2019).

Микроядра, как результат разрыва ДНК или потери хромосом, являются важным индикатором канцерогенеза. Накоплены многочисленные данные об увеличении частоты клеток с микроядрами у пациентов с разными видами рака, и особенно, колоректального, по сравнению с контрольной группой (Fenech et al., 2021). Для прогностических целей в отношении индукции канцерогенных эффектов буккальные эпителиоциты оказались более информативны, чем клетки крови (лимфоциты). Микроядерный тест на ректальных эпителиоцитах, по-видимому, может быть еще более информативным методом при прогнозировании колоректального рака. Этот метод также может быть полезен при тестировании мутагенных и канцерогенных свойств лекарственных препаратов при ректальном введении.

Цель настоящей работы — подробное описание разработанного нами микроядерного теста на ректальных эпителиоцитах крыс: временных параметров эксперимента, подготовки и анализа клеток для оценки цитогенетического эффекта. Насколько нам известно, неинвазивный метод прижизненного цитогенетического анализа ректальных эпителиоцитов крыс разработан впервые.

## МАТЕРИАЛ И МЕТОДИКА

**Животные.** Исследования проведены на самцах крыс Wistar, полученных из НПП «Питомник лабораторных животных» ФИБХ РАН массой 280—400 г. Крыс содержали в стандартных условиях вивария при свободном доступе к воде и пище в контролируемых условиях окружающей среды: при температуре воздуха 18—22 °С и относительной влажности 40—60 %.

**Условия эксперимента.** Апробация метода проведена в экспериментах по воздействию на крыс тритиевой воды (химическая формула: НТО) и нейтронного излучения. В эксперименте с тритием крысы получали без ограничений питьевую воду, содержащую НТО с удельной активностью 200 кБк/л в сутки в течение 30 суток (группа 2).

Облучение крыс нейтронами с энергией до 14,1 МэВ проводили на нейтронном генераторе НГ-24. При мощности поглощенной дозы 3.9 мГр/с и раз-

ным временным диапазоном поглощенные дозы оставили 4.2, 4.6, 6.5 Гр (группы 4—6).

Контрольные животные в обоих экспериментах получали питьевую воду (группы 1, 3, 7). В каждой группе было от 5 до 12 крыс (табл. 1).

**Получение клеток для анализа.** *Время взятия клеток после воздействия.* Микроядра, протрузии ядра, двоядерные клетки и сдвоенные ядра можно увидеть в клетках только после деления, поэтому большое значение имеет время обновления ткани. В стандартном микроядерном тесте для полихроматофильных эритроцитов костного мозга это время составляет около 24 ч. В результате радиографических исследований показано, что цилиндрические клетки кишечника, происходящие из клеток-предшественников, делящихся в криптах, появляются на поверхности ворсинок в течение одного дня. Через 3 сут они достигают верхушек ворсинок и слущиваются в просвет кишки. Таким образом, у экспериментальных животных эпителий кишки полностью обновляется каждые 3 сут. У человека обновление происходит каждые пять или шесть суток (Хэм, Кормак, 1983).

При однократном воздействии клетки ректального эпителия следует брать на третьи сутки после воздействия, как это было сделано в эксперименте с облучением нейтронами. При длительном содержании крыс, получавших с водой НТО, мы брали клетки ректального эпителия сразу после окончания воздействия. В обоих экспериментах получены достоверные различия между данными контрольных и экспериментальных групп.

*Условия получения ректальных клеток прижизненно.* Важное условие — не кормить животных в течение 8—16 ч. В этом случае прямая кишка и анус свободны от фекальных масс. Большое значение имеет способ обездвиживания животного. Мы применяли два способа получения клеток: при усыплении крысы смесью наркотизирующих препаратов золетила и рометара (1:1, внутримышечное введение по 0.1 мл на крысу) и применение эфирного наркоза. Оба способа показали одинаково приемлемые результаты.

*Способ сбора клеток* апробировали на умерщвленных животных. Сравнивали возможность сбора клеток разными инструментами: несколькими видами щеточек и шпателей, представленных на рис. 1. Лучшим инструментом оказался урогенитальный зонд (рис. 1а), которым можно



**Рис. 1.** Инструменты для взятия ректального эпителия: *а* — зонд урогенитальный (цитощетка, тип Д-1 с шариком одноразовый) 5 мм; *б* — щеточка для ресниц одноразовая, 7 мм; *в, г* — микробраши для бровей, диаметр 1.5 и 2 мм; *д* — межзубной цилиндрический ершик; *е–з* — пластиковые и металлические шпатели; *и* — ватные палочки. Расположены слева направо в сторону ухудшения качества мазков.

быстро собрать клетки в достаточном количестве, не травмируя прямую кишку. Из других инструментов также можно использовать одноразовые щеточки для ресниц (рис. 1*б*). Микробраши для бровей (рис. 1*в, г*) не травматичны, но собирают меньше клеток. При использовании остальных инструментов был получен менее качественный результат.

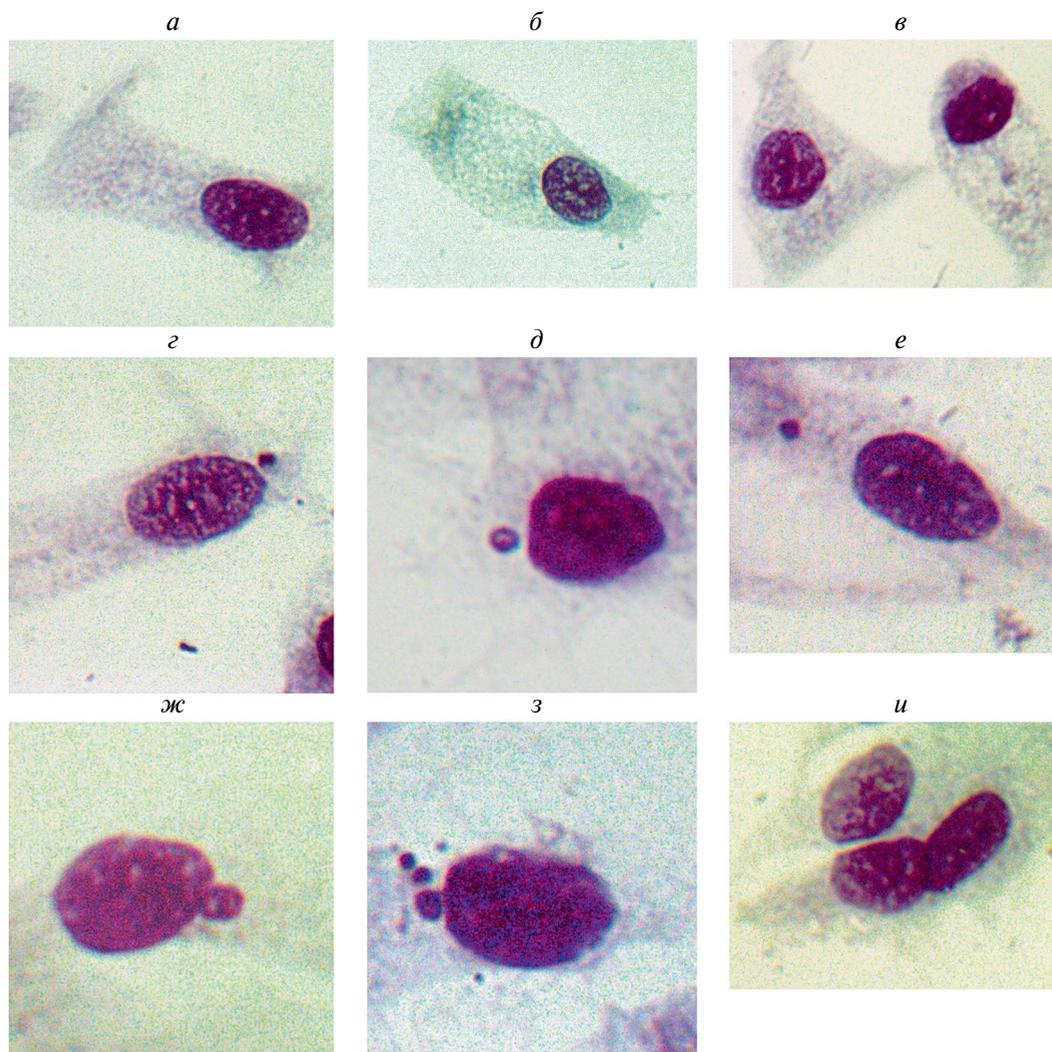
*Нанесение клеток на стекло.* Урогенитальный зонд погружали в дистиллированную воду и легким вращательным движением вводили в прямую кишку приблизительно на 1.5–2 см и так же выводили. Собранные клетки наносили на предметное стекло. Препараты высушивали.

*Фиксацию и окраску ректальных эпителиоцитов* проводили в соответствии с рекомендациями для микроядерного теста на буккальном эпителии (Оценка состояния здоровья, 2020). Фиксацию клеток проводили смесью этанола и ледяной уксусной кислоты в соотношении 3:1 в течение 10 мин. Дополнительно оценивали фиксацию клеток смесью метанола и уксусной кислоты в том же соотношении и в течение того же времени. Оба фиксатора показали сопоставимые результаты.

Учитывая, что метанол, как ядовитое вещество, требует особых условий получения и хра-

нения, можно рекомендовать его замену распространенным фиксатором этанолом. Препараты окрашивали 2 %-ным ацетоорсеином (Orcein Merck, Германия) в термостате в течение 1 ч при 45 °С. Однако следует учитывать длительность хранения красителя: при длительном хранении время окраски нужно увеличивать. Препараты промывали в двух сменах дистиллированной воды. Цитоплазму докрасивали 1 %-ным светлым зеленым (Light Green SF Yellowish, Sigma-Aldrich) приблизительно 30 с. Время окраски выбирали при визуализации клеток под микроскопом. Препараты промывали в двух сменах дистиллированной воды. Микрофотографии клеток ректального эпителия представлены на рис. 2.

*Анализ препаратов.* Микроскопический анализ зашифрованных препаратов проводили при увеличении объектива 100× (с масляной иммерсией). Анализировали по 1000 ректальных эпителиоцитов от каждого животного, определяли клетки с микроядрами, протрузиями ядра, суммой цитогенетических нарушений и сдвоенными ядрами. Полученные результаты статистически обрабатывали в программе Statistica 10.0 (StatSoft, Inc.). Межгрупповые сравнения проводили с помощью критерия Манна–Уитни при уровне значимости  $p < 0.05$ .



**Рис. 2.** Ректальные эпителиоциты крыс после воздействия нейтронного облучения в дозе 6.5 Гр: *a–в* — эпителиальные клетки без повреждений; *г–е* — клетки с микроядром; *ж* — клетка с ядерной протрузией; *з* — клетка с протрузией и двумя микроядрами; *и* — клетка со сдвоенным ядром. Окраска ацетоорсеином и светлым зеленым. Увеличение объектива 100×.

## РЕЗУЛЬТАТЫ

**Контрольные группы животных.** Результаты апробации метода при действии НТО и нейтронного излучения представлены в табл. 1. Частота ректальных эпителиоцитов с микроядрами у интактных крыс в первом эксперименте составила  $1.6 \pm 0.7\%$ , во втором —  $1.5 \pm 0.6\%$ , у контрольных животных в целом (11 животных) —  $1.55 \pm 0.41\%$ . Частота эпителиоцитов с протрузиями ядра составила  $0.45 \pm 0.37\%$ , суммарная частота эпителиоцитов с цитогенетическими нарушениями —  $2.0 \pm 0.47\%$ . Максимальная частота клеток с микроядрами, протрузиями или суммарно с цитогенетическими

нарушениями у отдельных животных варьировала в пределах 0—4%.

**Действие НТО.** Запаивание крыс тритиевой водой с относительно низкой объемной активностью 200 кБк/л в течение 30 суток повышало частоту полихроматофильных эритроцитов костного мозга по сравнению с контролем в 2.2 раза, однако различия между контрольной и экспериментальной группами не были статистически достоверны. Эффект НТО в ректальных эпителиоцитах был в 3.3 раза выше, чем в контроле ( $p < 0.001$ ). Различия цитогенетического эффекта НТО в клетках костного мозга и прямой кишки статистически не значимы.

**Таблица 1.** Результаты цитогенетического анализа ректальных эпителиоцитов крыс и полихроматофильных эритроцитов костного мозга на третьи сутки после экспериментальных воздействий

№ группы	Число крыс	Фактор	Частота цитогенетических нарушений, ‰			
			Частота клеток с микроядрами	Частота клеток с протрузиями ядра	Частота клеток со сдвоенными ядрами	Всего цитогенетических нарушений
Тритий, ректальный эпителий						
1	5	Контроль	1.6 ± 0.7 (-0.28; 3.5)	1,0 ± 0.8 (-1.15; 3.15)	0	2.6 ± 0.8 (0.52; 4.68)
2	6	НТО, 200 кБк/кг в сутки	5.3 ± 1.5 (1.6; 9.1)*	2.3 ± 0.8 (0.2; 4.5)		7.7 ± 1.8 (3.0; 12.3)*
Тритий, полихроматофильные эритроциты костного мозга						
1	5	Контроль	2.6 ± 0.74 (0.52; 4.68)	0	0	2.6 ± 0.74 (0.52; 4.68)
2	6	НТО, 200 кБк/кг в сутки	5.8 ± 1.1 (2.9; 8.8)			5.8 ± 1.1 (2.9; 8.8)
Нейтронное излучение, ректальный эпителий						
3	6	Контроль	1.5 ± 0.56 (0.05; 2.95)	0	0	1.5 ± 0.56 (0.05; 2.95)
4	10	4.2 Гр	13.8 ± 2.8 (7.52; 20.1)*	1.1 ± 0.59 (-0.23; 2.43)		14.9 ± 3.0 (8.02; 21.8)*, a
5	6	4.6 Гр	15.3 ± 3.5 (6.39; 24.3)*	0.67 ± 0.21 (0.12; 1.21)	0.83 ± 0.65 (-0.84; 2.51)	16.7 ± 3.79 (6.91; 26.4)*, a
6	12	6.5 Гр	17.0 ± 3.09 (10.2; 23.8)*	2.92 ± 0.81 (1.13; 4.70)	0.5 ± 0.23 (-0.00; 1.01)	20.5 ± 3.26 (13.3; 27.7)*
Объединенный контроль						
7 (1 + 3)	11	Контроль	1.55 ± 0.41 (0.63; 2.46)	0.45 ± 0.37 (-0.36; 1.27)	0	2.0 ± 0.47 (0.96; 3.04)

\* Статистические значимые отличия от соответствующего контроля по критерию хи-квадрат для  $p < 0.001$ ; a — достоверные отличия от группы 6 ( $p < 0.01$ ). Даны средние значения с ошибками, в скобках указан размах значений.

**Действие нейтронного излучения.** Нейтронное излучение в высоких дозах 4.2, 4.6 и 6.5 Гр индуцирует дозозависимое повышение частоты ректальных эпителиоцитов с цитогенетическими нарушениями в 9.9, 11.1 и 13.7 раза соответственно. В основном, это клетки с микроядрами, но в небольшом количестве появляются клетки с протрузиями ядра и сдвоенными ядрами. В группах 4 и 5 эффект ниже по сравнению с группой 6 ( $p < 0.01$ ).

### ОБСУЖДЕНИЕ

Одной из основных проблем генетической токсикологии остается оценка генотоксического эффекта различных факторов в клетках разных органов и тканей. Важным является определение закономерностей чувствительности разных типов клеток, определение значимости повреждения приоритетных типов клеток для развития заболеваний. Этот вопрос на протяжении многих лет рассматри-

вается почти на всех заседаниях международной рабочей группы по тестированию мутагенов.

Восьмая международная рабочая группа установила, что микроядерный тест на клетках желудочно-кишечного тракта может быть полезным при тестировании плохо всасывающихся веществ или быстро распадающихся анеугенов и генотоксических метаболитов, образующихся в толстой кишке (Beevers et al., 2023). При этом во внимание был взят метод получения клеток животных при аутопсии путем выделения толстой и прямой кишки и фиксации их в 10 %-ном нейтральном формалине с последующей диссоциацией клеток в 1М КОН (Ohyama et al., 2023).

Мы также использовали этот подход, начиная с 2001 года, диссоциацию проводили 50 %-ным раствором КОН (Сычева, Журков, 2007). Следует отметить, что время диссоциации и подбор концентрации диссоциирующего раствора зависит от длительности фиксации органов в формалине.

В нашей работе мы, по-видимому, впервые предлагаем неинвазивный метод (прижизненное получение клеток у животных под наркозом) приготовления препаратов эпителиоцитов прямой кишки для анализа цитогенетического эффекта. По данным литературы частота эпителиальных клеток толстой кишки с микроядрами у интактных крыс на препаратах, полученных после фиксации формалином, составила 1.5‰ (Сычева, Журков, 2007). По данным двух экспериментов Охуама с соавторами (2023) эта величина соответствует 1‰. Фоновый уровень частоты клеток с микроядрами у интактных крыс в данном исследовании составил  $1.5 \pm 0.41$ ‰.

Ранее с помощью микроядерного метода нами был выявлен цитогенетический эффект 1,2-диметилгидразина, 1,2-дибром-3-хлорпропана, 1,2-дибромпропана и 1,1,3-трибромпропана (Сычева, Журков, 2007). Во всех экспериментах зависимость эффекта веществ от дозы была линейной. Более высокий коэффициент регрессионных уравнений  $\beta$  рассчитан для канцерогена толстой кишки 1,2-диметилгидразина (0.47) и канцерогена желудочно-кишечного тракта 1,2-дибром-3-хлорпропана (0.06). В настоящей работе апробация метода проведена на животных, подвергнутых действию трития и нейтронного облучения.

В первом эксперименте установлено более чем трехкратное увеличение числа эпителиоцитов с микроядрами по сравнению с контрольными животными при относительно невысокой объемной активности трития 200 кБк/кг в сутки ( $p < 0.001$ ). В то же время эффект, определенный с помощью общепринятого метода в полихроматофильных эритроцитах костного мозга, статистически не значим. Облучение крыс нейтронами вызывало дозозависимое увеличение числа эпителиальных клеток с микроядрами. Отмечено увеличение данного показателя по сравнению с контролем более чем в 8 раз.

Метод может применяться для неинвазивного анализа цитогенетических нарушений при действии любых факторов. Особенно важно, что с его помощью можно определять временные параметры развития цитогенетического эффекта. Клетки у животных можно брать неоднократно с учетом их обновления в течение трех суток. Еще одним преимуществом данного метода является возможность использовать одних и тех же животных как контрольных в начале эксперимента и как группу воздействия в конце эксперимента. В настоящее

время это единственный метод прижизненного исследования цитогенетического эффекта у экспериментальных животных. Он позволяет подойти к решению вопроса элиминации клеток с микроядрами и другими цитогенетическими нарушениями. Анализ цитогенетических нарушений может быть полезен при изучении развития опухолей и оценке противоопухолевых препаратов и технологий. Его можно использовать не только для анализа развития цитогенетического, но и цитотоксического эффекта, а также при проведении цитохимических исследований на суспензии клеток толстой кишки.

Полученные результаты свидетельствуют, что микроядерный тест на ректальных эпителиоцитах крыс — удобный, простой метод цитогенетического анализа, для ряда токсикантов более чувствительный, чем общепринятый анализ микроядер полихроматофильных эритроцитов костного мозга.

## СОБЛЮДЕНИЕ ЭТИЧЕСКИХ СТАНДАРТОВ

Все эксперименты были проведены в соответствии с положениями Директивы 2010/63/EU Европейского парламента и Совета ЕС по охране животных, используемых в научных целях. Протоколы экспериментов утверждены локальным этическим комитетом ФГБУ ГНЦ ФМБЦ им. А. И. Бурназяна» (№ 28 от 14 ноября 2023 г.; № 30 от 4 декабря 2023 г.).

## КОНФЛИКТ ИНТЕРЕСОВ

Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

## ИНФОРМАЦИЯ О ВКЛАДЕ АВТОРОВ

Сбор, анализ и обобщение данных литературы — Л. П. Сычева, Д. В. Гурьев; разработка метода, создание модели исследования — Л. П. Сычева; планирование исследований — Д. В. Гурьев, Ю. А. Федотов; апробация метода в экспериментальных исследованиях — Л. П. Сычева, Ю. В. Копалиани, Ю. А. Федотов, Д. В. Гурьев; проведение сравнительного анализа, обобщение и интерпретация результатов исследования, формулировка выводов — Л. П. Сычева, Ю. А. Федотов, Д. В. Гурьев; подготовка текста рукописи, таблиц и графиков — Л. П. Сычева; редактирование текста — Д. В. Гурьев.

## СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

- Оценка состояния здоровья персонала предприятий, осуществляющих деятельность по обращению с отработавшим ядерным топливом и радиоактивными отходами. Методические рекомендации. МР ФМБА России. 12.031. 2020.* <https://fmbafmbc.ru/scientific-activities/publishing/publisher/> (*Assessment of the health status of personnel of enterprises handling spent nuclear fuel and radioactive waste. Methodological recommendations; MR FMBA of Russia 12.031. 2020.* <https://fmbafmbc.ru/scientific-activities/publishing/publisher/>)
- Оценка токсичности и опасности химических веществ и их смесей для здоровья человека: руководство. 2014. М.: Федеральный центр гигиены и эпидемиологии Роспотребнадзора. 639 с.* (*Assessment of toxicity and hazard of chemicals and their mixtures for human health: Guide. 2014. M.: Federal Center for Hygiene and Epidemiology of Rospotrebnadzor. 639 p.*)
- Стацук Т. А., Ловачева О. В., Евгущенко Г. В., Сычёва Л. П., Коваленко М. А.* 2011. Кариологические показатели клеток бронхиального эпителия у больных туберкулезом, онкологическими и неспецифическими заболеваниями легких. Туберкулез и болезни легких. Т. 88. № 2. С. 30 (*Statsuk T. A., Lovacheva O. V., Evgushchenko G. V., Sycheva L. P., Kovalenko M. A.* 2011. Karyological end points of bronchial epithelial cells in patients with tuberculosis, oncological and non-specific lung diseases. Tuberculosis and lung diseases. V. 88. No 2. P. 30.)
- Сычева Л. П., Журков В. С.* 2007. Микроядерный тест на клетках органов желудочно-кишечного тракта. В кн.: Полиорганный микроядерный тест в эколого-гигиенических исследованиях. М.: Гениус. С. 17. (*Sycheva L. P., Zhurkov V. S.* 2007. Micronucleus assay on the cells of gastrointestinal tract. In: Polyorgan micronucleus assay in ecological and hygienic studies. Moscow: Genius. P. 17.)
- Хэм А., Кормак Д.* Гистология / пер с англ. 1983. М.: Мир. Т. 4. (*Ham A., Cormack D.* Histology. 1983. Moscow: Mir. V. 4.)
- Beevers C., Uno Y., Meurer K., Hamada S., Hashimoto K., Kirkland D., LeBaron M.J., Le Curieux F., Le Hegarat L., Martus H.J., Masumura K., Ohyama W., Roberts D.J., Vasquez M., Whitwell J., Witt K.L.* 2023. *In vivo* genotoxicity testing strategies: Report from the 8th International Workshop on Genotoxicity Testing (IWGT). Environ. Mol. Mutagen. <https://doi.org/10.1002/em.22578>
- Brody H.* 2015. Colorectal cancer. Nature. V. 521. P. S1.
- Fenech M., Knasmueller S., Knudsen L. E., Kirsch-Volders M., Deo P., Franzke B., Stopper H., Andreassi M. G., Bolognesi C., Dhillon V.S., Laffon B., Wagner K.H., Bonassi S.* 2021. "Micronuclei and Disease" special issue: Aims, scope, and synthesis of outcomes. Mutat. Res. Rev. Mutat. Res. V. 788. Article ID: 108384. <https://doi.org/10.1016/j.mrrev.2021.108384>
- Nersesyan A., Muradyan R., Kundi M., Fenech M., Bolognesi C., Knasmueller S.* 2020. Smoking causes induction of micronuclei and other nuclear anomalies in cervical cells. Int. J. Hyg. Environ. Health. V. 226. Article ID: 113492. <https://doi.org/10.1016/j.ijheh.2020.113492>
- Nikolouzakis T.K., Vassilopoulou L., Fragkiadaki P., Mariolis Sapsakos T., Papadakis G.Z., Spandidos D.A., Tsatsakis A.M., Tsioussis J.* 2018. Improving diagnosis, prognosis and prediction by using biomarkers in CRC patients (Review). Oncol. Rep. V. 39. P. 2455. <https://doi.org/10.3892/or.2018.6330>
- Ohyama W., Fujiishi Y., Okada E., Narumi K., Hayashi M.* 2023. Micronucleus test using formalin-fixed rat glandular stomach and colon. Genes Environ. V. 45. P. 4. <https://doi.org/10.1186/s41021-023-00259-4>
- Thanikachalam K., Khan G.* 2019. Colorectal Cancer and Nutrition. Nutrients. V. 11. P. 164. <https://doi.org/10.3390/nu11010164>
- Wultsch G., Nersesyan A., Kundi M., Al-Serori H., Knasmüller S.* 2019. Induction of chromosomal damage in exfoliated buccal and nasal cells of road markers. J. Toxicol. Environ. Health. V. 82. P. 969. <https://doi.org/10.1080/15287394.2019.1673578>

## A NEW NON-INVASIVE MICRONUCLEUS TEST ON RAT RECTAL EPITHELIAL CELLS

L. P. Sycheva\*, Yu. A. Fedotov, Yu. V. Kopaliani, D. V. Guryev

*State Research Center — Burnasyan Federal Medical Biophysical Center of Federal Medical Biological Agency,  
123182, Moscow, Russia*

*\*e-mail: lpsycheva@mail.ru*

Currently, the generally accepted and most widespread method for assessing the mutagenicity of various factors is the micronucleus assay on polychromatophilic erythrocytes of the bone marrow of mice or rats. However, for some chemical factors, the level of effect in the bone marrow may be lower or absent, compared to other organs. Recently, methods for assessing genotoxicity in non-hematopoietic organs have been introduced. The Eighth International Working Group on Genotoxicity Testing (Beevers et al., 2023) recommends using the micronucleus assay on gastrointestinal cells when testing substances that are poorly absorbed or rapidly disintegrate in the colon. However, this method involves analyzing cells after killing the animals. We are the first to propose a method for intravital assessment of the mutagenic effect of factors in experimental animals. The work describes in detail the timing aspects of the method, the conditions for collecting rectal cells, the method of fixation, staining and analysis. The method was tested in experiments to assess the effect of tritium water and neutron radiation.

**Keywords:** genotoxicity, micronuclei, mutagenic effect, new micronucleus assay, nuclear protrusions, rectal epithelial cells, colon, cytogenetic assay