

Д. С. Песня, А. В. Романовский, И. М. Прохорова

Исследование токсического и генотоксических эффектов синтетических пищевых красителей методом Allium test

Исследовано влияние пищевых красителей в составе детского сахарного драже на живые клетки. Использовался метод Allium test. Произведена оценка токсического, митозмодифицирующего и мутагенного действия фактора. Обнаружено, что различные пищевые красители ингибируют рост корешков, угнетают митоз, индуцируют хромосомные aberrации и отставания хромосом. Степень эффектов напрямую зависит от концентрации вещества.

Ключевые слова: ана-телофазный анализ, меристематические клетки, хромосомные aberrации, Allium сера, Allium test, мутации, пищевые красители, митотический индекс, консерванты, генотоксичность, цитогенетика, токсичность.

D. S. Pesnya, A. V. Romanovsky, I. M. Prokhorova

Investigation of Toxic, Mitotoxic and Mutagenic Effects of Synthesized Food Dyes by the Allium Test

This study was conducted in order to estimate the effects of aqueous solutions of synthesized food dyes in sugar sweets on the living cells. To study toxic, mitotoxic and mutagenic effects the Allium test was chosen. The received results showed that different aqueous solutions damage a DNA and show strong cytotoxic and genotoxic activities. Effects of influence depend on concentration of solution.

Keywords: the Allium test, an ana-telophase analysis, meristematic cells, chromosome aberrations, Allium sulfur, mutations, food dyes, mitotic index, food preservatives, genotoxicity, cytogenetics, toxicity.

Введение

Наряду с загрязнением окружающей среды, следует выделить один из самых важных факторов, влияющих на состояние здоровья человека и его популяции в целом, – фактор питания. Пища современного человека является не только носителем пластических и энергетических материалов, но и источником компонентов неалиментарного (непищевого) характера, среди которых много компонентов антропогенного происхождения. Важнейшую группу подобных чужеродных веществ пищи составляет огромное количество пищевых добавок [1].

Среди них широкое распространение в пищевой промышленности получили различные красители. Их используют повсеместно для улучшения внешнего вида продуктов питания. Например, конфеты (сахарное драже, мармелад и т. д.) очень популярны среди детского контингента. Родители охотно покупают их для детей, а именно организм ребенка является очень уязвимым для химикатов, которые входят в состав сладостей. В настоящее время среди пищевых красителей наибольшее распространение получили синтетические, которые

дешевле натуральных (соки, экстракты растений и т. д.). В России допущено к использованию огромное количество синтетических пищевых добавок [3]. Между тем многие из разрешенных в стране синтетических пищевых красителей запрещены в ряде развитых государств как потенциально опасные для здоровья [4, 9]. Кроме того, в России часто не учитывается синергетическое и добавочное действие других компонентов входящих в состав продукта (ароматизаторы, эмульгаторы, стабилизаторы, консерванты и т. д.), то есть не принимается во внимание суммарное биологическое действие смеси компонентов.

Всемирная организация здравоохранения (ВОЗ) считает, что исследования токсических и генотоксических эффектов имеют большое значение, поскольку в последнее время участились случаи мертворождений и появления у новорожденных различных уродств. Возросла распространенность злокачественных заболеваний, аллергозов и других патологий. Все это обуславливает актуальность изучения пищевых добавок как одного из факторов, воздействующих на человека. Согласно ВОЗ решающее значение имеют исследования именно

готового пищевого продукта, созданного с использованием пищевой добавки, а не самой добавки [1].

В связи с вышесказанным целью настоящей работы являлось исследование токсического, митозмодифицирующего и мутагенного действия различных синтетических пищевых красителей, входящих в состав детского сахарного драже.

Материалы и методы исследования

Материалом исследования являлся детский набор разноцветного сахарного драже с игрушкой. Производитель Xiamen Ying Wan Foodstuff Co. Ltd. (Китай, сайт производителя: <http://www.en-one.com/jelly-bean>). Исследовалось драже красного, оранжевого, желтого, зеленого, голубого и белого цвета. Состав, заявленный производителем, – это сахар; сироп глюкозы; желатин; регуляторы кислотности (лимонная кислота, цитрат натрия); ароматизатор идентичный натуральному; пищевые красители: красный (Красный Очаровательный AC – E129), оранжевый (Желтый «Солнечный закат» – E110), желтый (Тартразин – E102), зеленый (Зеленый S – E142), синий (Бриллиантовый Голубой FCF – E133), белый (Диоксид титана – E171).

Для изучения действия пищевых красителей был выбран Allium test, который рекомендован экспертами Всемирной организации здравоохранения как стандарт в цитогенетическом мониторинге окружающей среды. Результаты, полученные в данном тесте, хорошо коррелируют с результатами тестов на клетках млекопитающих и человека (корреляция до 82 %) [5, 6]. Объектом исследования в данном тесте является меристема проростков корешков лука посевного – *Allium cepa* сорта Штутгартен-Ризен [2, 6, 7]. Ряд авторов рекомендует использовать Allium test для изучения токсического, митозмодифицирующего и мутагенного действия пищевых добавок [8, 9]. Например, генотоксичность тартразина уже исследовалась в Allium test [8].

Выбранная растительная тест-система экономична, так как на ней (в отличие от микроорганизмов) можно регистрировать все типы генетических повреждений: геномные, хромосомные, генные. Она позволяет выявлять как мутагены, непосредственно повреждающие ДНК, так и промутагены, то есть факторы генетически безопасные, но приобретающие му-

тагенную активность в процессе метаболизма в организме [2].

Постановка опыта

Брали навеску в 1 г сахарного драже каждого цвета и растворяли в 100 мл дистиллированной воды (концентрация 1 %). Готовили вторую концентрацию 0,2 % (0,2 г на 100 мл воды). Таким образом, получилось шесть пар растворов разных цветов, или 12 опытных вариантов.

Луковицы *A. cepa* помещались в стаканчики на 25 мл с растворами драже. Всего было поставлено четырнадцать вариантов опытов, различающихся по типу (цвету) красителя и концентрации, включая два контрольных варианта: контроль на дистиллированной воде и на 1 % растворе сахара в дистиллированной воде, чтобы проверить действие сахара на корневые меристемы *A. cepa*.

Для каждого варианта использовали повторно в соответствии с рекомендациями современного стандарта на проведение экспериментов по методу Allium test (по три луковицы для каждого варианта) [5]. Луковицы проращивали 4 дня. Затем у каждой луковицы корни срезали под основание донца.

1. Для оценки токсического действия определяли длину корней. Изменение длины корней в Allium test является показателем токсичности изучаемого фактора и используется в качестве краткосрочного скрининг-теста [6]. Данный тест можно проводить в широком диапазоне pH (3,5–11), в пределах которого не наблюдается каких-либо эффектов на росте корневой системы *A. cepa* [6]. Измеряли длину каждого корешка. Определялось среднее арифметическое ($\bar{X}$) и ошибка среднего (m) для варианта опыта. После измерений корни фиксировали в фиксаторе Кларка [2]. Для цитогенетического анализа готовили препараты (по 9 препаратов на вариант опыта) давленных корневых меристем, согласно методике [2, 3].

2. Показателем митозмодифицирующего действия фактора является митотический индекс (МИ, %) [2]. Он определяется как отношение числа делящихся клеток к общему числу рассмотренных на препарате клеток [2]. В ходе данного анализа на препаратах под микроскопом просматривали около 700–800 клеток. Среди них подсчитывали количество делящихся клеток, которые находились на разных стадиях митоза, и число не делящихся клеток (интерфаз).

Чтобы вскрыть причины изменения митотической активности, анализировали продолжительность каждой фазы митоза и определяли фазные

индексы. Фазные индексы (ПИ, % – профаза-ный индекс; МИ, % – метафазный; АИ, % – анафазный; ТИ, % – телофазный) определяют-ся как количество клеток, которые находятся на стадии профазы, метафазы и т. д., к общему количеству проанализированных митозов [2]. Проводили сравнение долей различных фаз в контрольном и опытных вариантах.

3. Мутагенное действие определяли с использованием ана-телофазного анализа [2], позволяющего изучать частоту мутаций путем учета суммы хромосомных aberrаций (ХА) и отставаний хромосом (отс.) на стадиях анафа-зы и телофазы к общей сумме ана-телофаз на препарате ($\Sigma \text{отс.} + \text{ХА}, \%$) [2]. Хромосом-ные aberrации – нарушения структуры хромо-сом – включают мосты и фрагменты, являю-щиеся следствием делеций и транслокаций. Отставания хромосом связаны с повреждением веретена деления или с нарушением поведения хромосом на веретене деления [2].

Степень мутагенного эффекта оценивали по ВМЭ (выраженности мутагенного эффек-та) [2]. ВМЭ определяется как кратность пре-вышения процента индуцированных мутаций над контрольным значением (спонтанным уровнем) и выражается в баллах. Баллы ВМЭ ранжировали по уровням мутагенного эффекта и классифицировали как сильный, средний, слабый или отсутствие [2].

Статистическую обработку результатов проводили с помощью программного пакета “Statistica” (t-test и ANOVA). За уровень зна-чимых принимали значения при $p < 0,05$ (*).

Результаты экспериментов:

Токсический эффект пищевых красите-лей

Полученные нами данные представлены в табл. 1. Достоверный токсический эффект регистрируется во всех вариантах опыта, кроме контрольных. Наибольший токсический эффект был зарегистрирован в варианте опыта с красителем Бриллиантовый Голубой FCF (E133), Диоксид титана (E171), Зеленый S (E142). Минимальный токсический эффект – в варианте с красителем Тартразин (желтый цвет, E102) и Красный Очаровательный AC (E129).

Митозмодифицирующий эффект пище-вых красителей

Причиной угнетения роста корней может являться подавление пролиферативной

активности клеток, то есть митотоксичность. Анализ митотической активности позволил зарегистрировать митотоксический эффект во всех опытных вариантах, за исключением E129 при концентрации 0,2 % (табл. 1). При митотоксическом эффекте доля клеток, которые находятся в митозе, резко падает. Максимальный митотоксический эффект был обнаружен в варианте с добавлением красителей E133 и E171.

Как видно в табл. 1, при концентрации 0,2 % на-блюдается статистически достоверное угнетение профазного индекса во всех вариантах, кроме вари-антов с E129 и E110. Это соответствует получен-ным нами данным по значению митотического ин-декса при концентрации 0,2 %. Угнетение профаз-ного индекса свидетельствует о том, что меньше клеток вступило в митоз, а также о том, что угне-тение корневого прироста и уменьшение митотиче-ского индекса связано с угнетением процессов под-готовки клетки к делению.

В табл. 1 представлены значения фазных индек-сов при концентрации пищевых красителей 1 %. Как видно, угнетение профазного индекса более значительно и статистически достоверно во всех опытных вариантах. При этом минимальные значе-ния ПИ, % наблюдаются после воздействия рас-творов, содержащих синий (E133), белый (E171) и зеленый (E142) красители. Соответствующая кар-тина наблюдается и по значению митотического индекса (конц. 1 %), который принимает мини-мальные значения после воздействия синего, бело-го и зеленого красителей. Максимальный митоток-сический эффект по показателю митотического и фазных индексов проявляет синий краситель (Бриллиантовый Голубой FCF, E133).

Значение метафазного индекса при конц. 0,2 и 1 %, как видно в табл. 1, достоверно возрастает по сравнению с контрольными вариантами во всех опытных вариантах, кроме варианта с E129. Уве-личение метафазного индекса по сравнению с кон-трольным вариантом свидетельствует о том, что синтетические пищевые красители нарушают ци-тоскелет клетки и мешают формированию веретена деления, что выражается в появлении патологиче-ских митозов.

Наиболее выражено увеличение метафазного индекса после воздействия E133 и E129 в концен-трациях 1 и 0,2 %. Следует отметить, что это со-поставимо с проведенными микроскопическими исследованиями. Именно после воздействия синего и зеленого красителей нами зарегистрированы на-рушения в расхождении хромосом на стадии мета-фазы. Пример приведен на рис. 1.



Рис. 1. Нарушение ахроматинного веретена на стадии метафазы после воздействия красителями Зеленый S и Бриллиантовый Голубой FCF (а – норма, б – патология)

Таблица 1

Данные по средней длине корешков, значению митотического и фазных индексов в контроле и при различных концентрациях экстракта *H. sosnowskyi*

Вариант опыта	Ср. длина, мм	МИ, %	ПИ, %	МИ, %	АИ, %	ТИ, %
Контроль						
Контроль	26,9±0,5	10,6±0,4	65,8±2,3	19,8±1,6	9,8±1,8	10,7±0,5
Сахароза	28,1±1,1	11,3±0,3	63,5±2,2	16,9±1,3	9,5±0,7	10,1±1,3
Концентрация драже 0,2 %						
Оранжевый	*17,5±0,5	*9,2±0,8	60,5±1,6	*28,8±2,9	12,6±0,8	15,6±1,4
Желтый	*17,9±0,3	*7,6±0,3	*57,8±1,5	*29,1±1,9	14,8±1,7	*13,1±1,1
Красный	*19,9±0,8	10,4±0,4	65,1±1,4	22,9±1,2	10,0±1,6	12,0±0,8
Зеленый	*13,6±0,6	*7,7±0,7	*44,0±3,5	*42,7±3,2	13,9±1,5	*13,3±0,6
Белый	*18,3±0,9	*7,0±0,4	*57,9±2,7	*31,1±2,7	11,6±0,9	11,0±1,5
Синий	*13,3±0,7	*5,9±0,3	*58,2±2,4	*30,9±2,0	10,7±1,4	10,8±1,6
Концентрация драже 1 %						
Оранжевый	*10,8±0,7	*6,3±0,8	*53,4±2,5	*28,5±2,7	15,2±2,6	*18,1±2,7
Желтый	*16,4±0,1	*6,2±0,6	*58,2±3,3	*28,9±2,3	17,1±3,5	12,9±2,4
Красный	*11,6±0,6	*5,3±0,2	57,7±3,1	21,8±2,0	*18,6±2,4	*20,6±2,2
Зеленый	*9,2±0,4	*5,2±0,5	*43,9±2,8	*48,3±4,4	11,9±1,6	7,8±2,1
Белый	*7,7±0,7	*3,9±0,4	*50,1±1,1	*25,2±0,6	*12,5±0,1	*15,3±1,4
Синий	*5,9±0,1	*2,0±0,3	*29,5±1,3	*50,4±3,6	10,4±0,6	12,4±3,0

Мутагенный эффект пищевых красителей

При концентрации пищевых красителей 1 % во всех опытных вариантах зарегистрировано достоверное увеличение частоты хромосомных aberrаций и отставаний по сравнению

с контрольным уровнем (табл. 2). При концентрации 0,2 % достоверного увеличения частоты хромосомных aberrаций и отставаний не отмечается только в варианте с красным красителем. Среди всех шести опытных вариантов с красителями наи-

более резко выделялись мутагенной активностью при любых концентрациях три варианта, в которых использовалось драже зеленого (Зе-

лени S, E142), желтого (Тартразин, E102) и синего цвета (Бриллиантовый Голубой FCF, E133).

Таблица 2

Данные по частоте хромосомных aberrаций и отставаний (Σ отс.+ХА, %) и уровням мутагенного эффекта

Вариант опыта	Σ отс.+ХА, %	ВМЭ, балл	Уровень МЭ
Контроль			
контроль	0,7±0,3		
сахароза	0,7±0,1*	1	☺ отсутствие
Концентрация драже 0,2 %			
Оранжевый	2,6±0,6*	4	☺ слабый
Желтый	4,6±0,5*	7	☹ средний
Красный	1,1±0,2	2	☺ отсутствие
Зеленый	4,9±0,7*	7	☹ средний
Белый	2,5±0,5*	4	☺ слабый
Синий	3,5±0,9*	5	☹ средний
Концентрация драже 1 %			
Оранжевый	3,9±0,9*	6	☹ средний
Желтый	10,9±2,5*	16	☹ сильный
Красный	2,9±0,5*	4	☺ слабый
Зеленый	11,4±1,6*	16	☹ сильный
Белый	4±0,6*	6	☹ средний
Синий	6,7±2,1*	10	☹ сильный

Условные обозначения: ☺ – отсутствие мутагенного эффекта, ☺ – слабый мутагенный эффект, ☹ – средний мутагенный эффект, ☹ – сильный мутагенный эффект.

Наиболее характерные типы хромосомных aberrаций, которые наблюдались после воздействия красителей Бриллиантовый Голубой FCF, Зеленый S и Тартразин, представлены на рис. 1, 2, 3 и 4 в сравнении с контролем. Справа в анафазе видно грубое нарушение структуры хромосом, которое выделяется наличием сразу нескольких мостов, образовавшихся в результате таких хромосомных мутаций, как транслокации и делеции (рис. 2-б). А слева в телофазе наблюдается двойной фрагмент (рис. 2-б). В варианте с зеленым драже (Зеленый S), помимо хромосомных aberrаций и отставаний хромосом была зарегистрирована

деструкция интерфазного хроматина (рис. 4), что свидетельствует о повреждении не делящихся клеток. Кроме того, после воздействия Тартразина и Зеленого S отмечалось появление микроядерных мутаций (рис. 3).

Микроядра являются предвестниками онкологических болезней и клеточной смерти. Если такие клетки не апоптируют, то могут переродиться в раковые [9].

В данном эксперименте оценивалась суммарная мутагенная активность всех компонентов сахарного драже. Как видно в табл. 2, различия в мутагенной активности обусловлены видом синтетическо-

го красителя, входящего в состав сахарного драже (все остальные компоненты одинаковы).

При этом, вероятно, мутагенный эффект продукта обусловлен не только самими красителями, но и их совместным или синергетическим действием с другими компонентами драже (ароматизатор, консервант, стабилизатор).

Таким образом, все исследованные варианты детского сахарного драже проявляют токсическое, митотоксическое и мутагенное действие в данной тест-системе. Характер и величина эффектов зависят от типа красителя и концентрации.

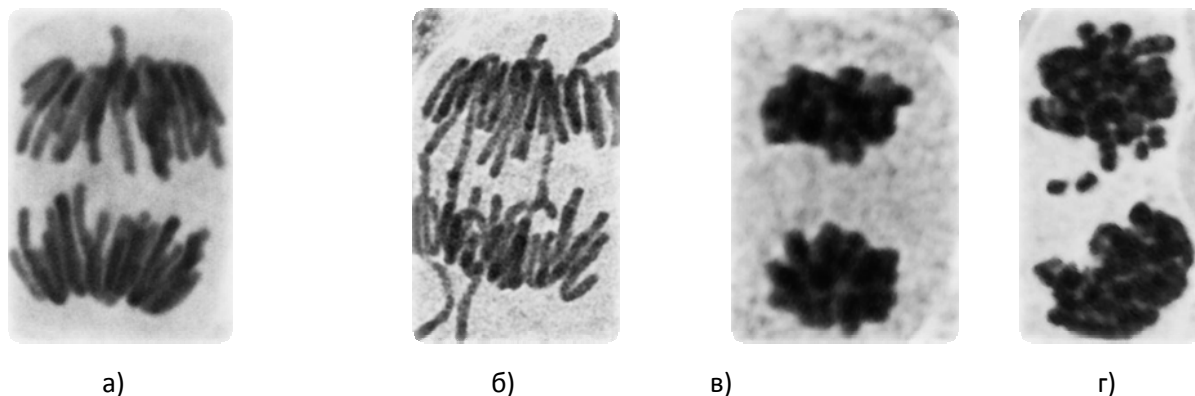


Рис. 2. Характерные типы хромосомных aberrаций для красителей: б – множественные мосты и забегания хромосом, индуцированные Зеленым S (E142), и г – фрагментация хромосом, вызванная Тартразином (E102); а и в – норма (анафаза и телофаза соответственно)

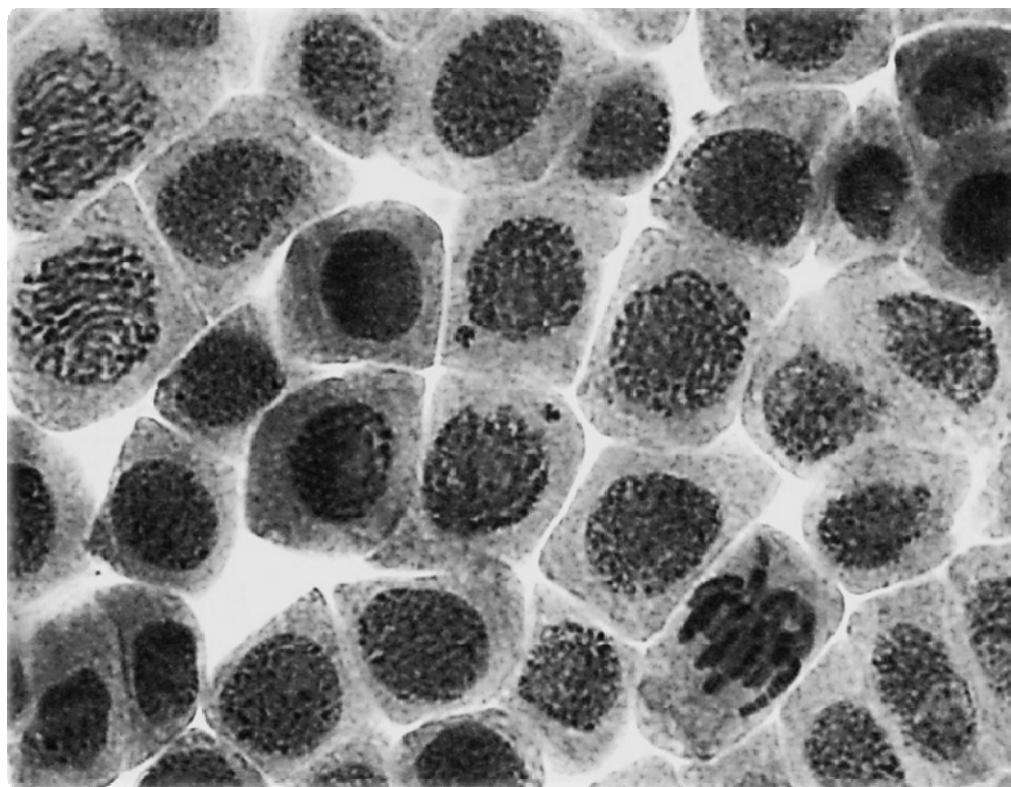


Рис. 3. Появление сестринских микроядер (в двух центральных клетках) после воздействия на меристему пищевых красителей Зелёный S (E142) и Тартразин (E102)

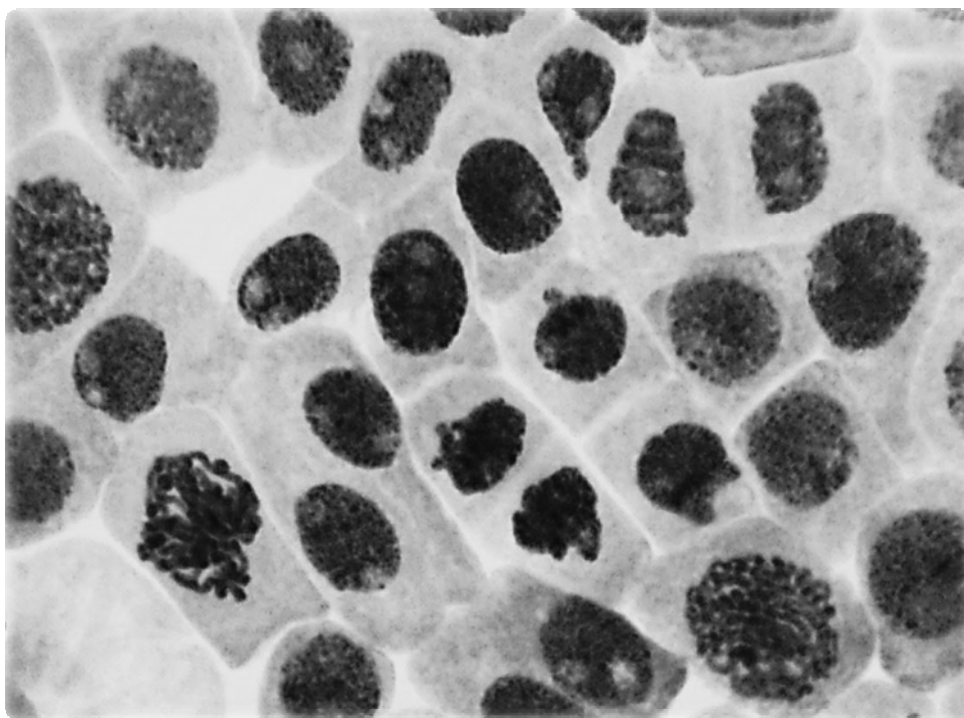


Рис. 4. Деструкция интерфазного хроматина в виде выпячиваний содержимого ядра “nuclear budding” после воздействия пищевым красителем Зеленый S (E142)

Выводы

Проведено исследование токсического, митозмодифицирующего и мутагенного действия детского набора сахарного драже с игрушкой, содержащего различные синтетические красители: Красный Очаровательный АС (E129), Желтый «Солнечный закат» (E110), Тартразин (E102), Зеленый S (E142), Бриллиантовый Голубой FCF (E133), Диоксид титана (E171). Полученные результаты позволяют сделать следующие **выводы**:

1. Все изученные виды синтетических пищевых красителей угнетают прирост корешков у *A. сера*, что свидетельствует о токсической активности всех исследованных красителей.

2. Все исследованные виды синтетических пищевых красителей снижают митотический индекс до $2,0 \pm 0,27$ % при контрольном уровне $10,6 \pm 0,56$ %, что свидетельствует о митотоксической активности данных красителей.

3. Все исследованные виды синтетических пищевых красителей вызывают хромосомные

мутации или обладают мутагенной активностью: увеличивают частоту хромосомных aberrаций и отставаний до $11,4 \pm 1,63$ %, что превышает контрольный уровень ($0,7 \pm 0,31$ %) в 16 раз. Уровень мутагенного эффекта классифицируется как сильный.

4. Уровень наблюдаемых эффектов возрастает при увеличении концентрации красителей в растворе – эффект зависит от дозы.

5. Исследованные красители обладают токсической и генотоксической активностью, а следовательно, продукты с такой добавкой могут представлять опасность для здоровья человека, и особенно детей. Наиболее высокую генотоксическую опасность представляют красители: желтый – Тартразин (E102), зеленый – Зеленый S (E142) и синий – Бриллиантовый Голубой FCF (E133).

Allium test может быть рекомендован для оценки токсического, митозмодифицирующего и мутагенного потенциала пищевых добавок и синтетических красителей.

Библиографический список

1. Булдаков, А. С. Пищевые добавки. Справочник [Текст] / А. С. Булдаков. – СПб. : «Ут», 1996. – 240 с.
2. Прохорова, И. М. Пространственная и временная динамика мутагенной активности воды оз. Неро [Текст] / И. М. Прохорова и др. – М. : Наука, 2008. – 59 с.
3. САНПИН 2.3.2.1293-03 (с изменениями от 26.05.2008 и 27.04.2009). URL : <http://www.garant.ru>

http://www.alphavit.ru/regulations/additives/2_3_2_1293_03.pdf или <http://goo.gl/IUaTx>

4. Amin K.A., Abdel Hameid II H., Abd Elsttar A.H. Effect of food azo dyes tartrazine and carmoisine on biochemical parameters related to renal, hepatic function and oxidative stress biomarkers in young male rats / K.A. Amin et al. // Food and Chemical Toxicology. – 2010. – Vol. 48. – P. 2994-2999.

5. Barberrio A., Voltolini J. C., Mello M. L. S. Standardization of bulb and root sample sizes for the Allium test / A. Barberrio, J. C. Voltolini, M. L. S. Mello // Ecotoxicology. – 2011. – Vol. 20. – P. 927-935.

6. Fiskesjo G. The Allium test as a standard in environmental monitoring / G. Fiskesjo // Hereditas. – 1985. – Vol. 102. – P. 99-112.

7. Levan A. The influence on chromosomes and mitosis of chemicals, as studied by the Allium test / A. Levan // Hereditas. – 1949. – Vol. 35. – P. 325-337.

8. Roychoudhury A., Giri A. K. Effects of certain food dyes on chromosomes of Allium cepa // Mutat. Res. – 1989. – Vol. 223. – P. 313-319.

9. Turkoglu S. Evaluation of genotoxic effects of sodium propionate, calcium propionate and potassium propionate on the root meristem cells of Allium cepa [Text] / S. Turkoglu // Food and Chem. Toxicol. – 2008. – Vol. 46. – P. 2035-2041.