

ДОЦІЛЬНІСТЬ ВИКОРИСТАННЯ ВІТАМІННИХ ХІМІОПРЕВЕНТЕРІВ ДЛЯ КОРЕГУВАННЯ ІНДУКЦІЇ ХРОМОСОМНИХ АБЕРАЦІЙ СИНТЕТИЧНИМ ХАРЧОВИМ АРОМАТИЗАТОРОМ «КАРАМЕЛЬ»

І. Боднар, С. Горбулінська, Л. Боднар

Львівський національний університет імені Івана Франка
вул. Грушевського, 4, Львів 79005, Україна
e-mail: bodnarlidia@ukr.net

За дії ароматизатора «Карамель» виявлено в меристемних клітинах апікальної частини корінців *Allium cepa* індукування одинарних і парних фрагментів, а також дицентриків, які з'являються в результаті таких хромосомних аберацій як делеції та транслокації. У тесті на *Drosophila melanogaster* за різних концентрацій ароматизатора виявлено індукування пізніх домінантних летальних мутацій і підвищення появи незапліднених яєць, які можуть з'являтися внаслідок пошкодження сперматозоїдів або зниження статевої активності самців. Під час дослідження здатності розчинів ароматизатора індукувати хромосомні мутації в клітинах кісткового мозку *Mus musculus* виявлено широкий діапазон аномалій, який включав не лише мутації хромосом, але й геномні мутації. Це може свідчити про порушення функціонування веретена поділу та нерозходження хромосом у результаті впливу мутагенних агентів, серед яких можуть бути як самі складові ароматизаторів, так і їхні метаболіти, які з'являються у процесі біотрансформації в організмі ссавців. Результатами наших досліджень також показано, що за сумісного використання ароматизатора «Карамель» і вітамінів А або С як хіміопревентерів спостерігається зниження появи абераційних метафаз та індукування домінантних летальних мутацій.

Ключові слова: мутагенність, хромосомні аберації, хіміопревентери, харчові ароматизатори, домінантні летальні мутації

Сучасне харчування пов'язане з широким використанням харчових добавок, особливо групу серед яких становлять ароматизатори – речовини, які підсилюють смак і аромат готового продукту. Вони полікомпонентні, тобто складаються з певної кількості хімічних сполук, які далеко не завжди є безпечними для людини. Перелік інгредієнтів ароматизаторів включає речовини, які можуть мати як мутагенну, так і канцерогенну дію [1, 3, 9]. Окрім того, мутагенні й токсичні властивості компонентів ароматизаторів не завжди характеризуються простою сумою мутагенних властивостей кожного з них. Тому важливим підходом щодо розуміння мутагенного навантаження на геном людини, яке може нести той чи інший ароматизатор, є вивчення саме сумісної мутагенної активності його складових за різних концентрацій. Біотестування синтетичних складових продуктів харчування для визначення їхніх генотоксичних властивостей на різних тест-об'єктах набуває дедалі більшого значення, адже дає змогу з'ясувати мутагенну та/або цитотоксичну, та/або канцерогенну дію досліджуваних зразків, проте висновок про генотоксичну безпеку харчових добавок в Україні не є обов'язковим. Доказовим показником мутаційного процесу на клітинному рівні є виявлення хромосомних мутацій, підвищений рівень яких розглядається як хромосомна нестабільність, яка в подальшому може спричинити розвиток злоякісних новоутворень [2, 6].

Ароматизатор «Карамель» або цукровий колер виготовляють за участі солей амоніаку або солей амонію. Серед складових харчового ароматизатора «Карамель» є азотовмісні

гетероцикли, серед яких і 4-метилімідазол. Це гетероциклічна органічна сполука, що є похідним імідазолу, в якому атом водню в 4 положенні заміщений на метильну групу. Ця сполука може утворюватися під час карамелізації цукру, а також у інших смажених продуктах, у процесі ферментації. Інтерес до 4-метилімідазолу викликаний тим, що ця речовина була виявлена в карамельних барвниках, які зазвичай використовують під час приготування харчових продуктів і напоїв, а саме темне пиво, Coca-Cola, Pepsi – можуть містити більш ніж 100 мкг 4-метилімідазолу на порцію в 300 мл [12]. Дослідження National Toxicology Program показало, що високі дози 4-метилімідазолу є канцерогенними для мишей і щурів, тому його внесено до списку можливих канцерогенних речовин. Схожий ефект було отримано і для ізомеру 2-метилімідазол, який також виявлений у карамельних барвниках. Станом на сьогоднішній день спосіб виготовлення карамельних барвників, які застосовуються у Європі, є незмінним, вміст 4-метилімідазолу зберігається на попередньому рівні [12].

Виробництво функціональних продуктів харчування, які не лише забезпечують фізіологічні потреби організму в поживних речовинах і енергії, але й мають профілактичне або навіть лікувальне значення, є одним із перспективних напрямків харчової промисловості сьогодення. Серед речовин з антимуагенним ефектом є вітаміни, антиоксиданти (Е, А, аскорбінова кислота, бетакаротин), біологічні пігменти (гемоглобін, хлорофіли і цитохроми, лікопен), поліфеноли (флавоноїди, таніни, катехіни й інші циклічні сполуки), сполуки, що містять сірку, селен та ін. [4, 5]. Вітаміни, зокрема, А та С, є незамінними факторами живлення, які забезпечують нормальний розвиток організму, є необхідним захистом для тварин і людини та можуть бути використані для зняття або зменшення сумарних мутагенних фонів [10]. Цей підхід було нами використано для з'ясування можливих змін щодо мутагенної активності синтетичного харчового ароматизатора «Карамель» за одночасної дії ароматизатора та вітамінних хіміопревентерів.

Матеріали та методи

У роботі досліджували генотоксичну активність синтетичного харчового ароматизатора «Карамель» 700012 фірми ETOI. Добову дозу, рекомендовану виробником, яка розрахована на 1 кг готової продукції, приймали за 1 % (0,14 мг/л), збільшену в десять разів – за 10 % (1,4 мг/л). Компонентний склад ароматизатора «Карамель» включає: 4-метилімідазол, поліциклічні вуглеводи копильного диму, екстракт дуба, а також домішки – аміачний азот, діоксин сірки, фосфати, важкі метали, які з'являються внаслідок виробництва (виробник дає перелік хімічних складових без кількісного представлення в 1 г ароматизатора). Для зниження індукування мутагенної дії ароматизатора використовували відомі хіміопревентери з деяких вітамінів, а саме вітамін А (доза 0,1 мг/кг) та вітамін С (доза 100 мг/кг).

Дослідження проводили на трьох еукаріотичних тест-об'єктах: *Mus musculus*, *Drosophila melanogaster* та насіння цибулі ріпчастої *Allium cepa*. Рослинні тест-системи в даний час отримують дедалі більшу розповсюдженість під час оцінки мутагенності, показано чітку кореляцію результатів цих систем із тваринними тест-системами. Для виявлення генотоксичного і цитотоксичного впливу розчинів ароматизатора «Карамель» на геном цибулі використовували метод ана-телофазного аналізу хромосомних аберацій у клітинах кореневої меристеми. У цьому тесті рееструються хромосомні мутації типу делецій і транслокацій, а також порушення веретена поділу за частотою відставання хромосом, багатопольності й асиметричних мітозів. Окрім того, одночасно можна фіксувати появу мікроядер, які утворюються з ацентричних фрагментів [7].

Дрозофіла є одним із найкраще вивчених модельних об'єктів генетики вищих еукаріот. Основні біохімічні процеси в клітинах дрозофіли та ссавців майже ідентичні, у про-

песі метаболізму у дрозоділі також відбувається мікросомальна активація речовин. Це дає змогу виявляти промутагени, які набувають генотоксичності у процесі метаболізму. У даній роботі дрозоділі використовували для виявлення індукування домінантних летальних мутацій (ДЛМ) у процесі сперматогенезу. Домінантні летальні мутації, які виявляються за дії хімічних сполук у сперматозоїдах, призводять до смерті зиготи, – це може відбуватися за рахунок дефіциту хромосомного матеріалу в геномі або за рахунок різноманітних пошкоджень, які приводять до блокування процесів редуплікації. Даним методом фіксують пізні ембріональні леталі (яйця коричневого, жовтого кольору) та ранні ембріональні леталі (яйця білого кольору, всередині у них видно білі непрозорі ущільнення ембріона). Також за дії на мух мутагенами підвищується імовірність незапліднених яєць унаслідок фізіологічного пошкодження сперматозоїдів або зниження статевої активності самців [8].

Індукування хромосомних аберацій у клітинах кісткового мозку *Mus musculus* проводили на молодих білих статевозрілих самцях масою 18–20 г. Досліджуваний зразок вводили перорально одноразово у вигляді водного розчину по 0,4 мл в дозах 1,4 та 0,14 мг/кг за допомогою металевго зонда. Препарати метафазних хромосом клітин кісткового мозку готували за методом Н.У. Evans [11]. Препарати забарвлювали розчином барвника Гімза. Аналізували по 500–700 метафаз на кожну з концентрацій. Статистичну обробку результатів проводили з використанням критерію Стьюдента *t*.

Результати і їхнє обговорення

Аналіз результатів ана-телофазного тесту на *Allium cepa* зразків ароматизатора «Карамель» показав різні типи порушень у правильному розходженні хромосом до полюсів веретена поділу (відставання хромосом, утворення одинарних фрагментів і дицентриків). Такі аномальні ана-телофази виявляються внаслідок делецій і транслокацій хромосом. Токсична дія не була зафіксована, відсоток пророслих насінин для всіх зразків перебував на високому рівні. Контролем була дистильована вода.

Як при 1 % концентрації, так і при 10 % рівень хромосомних аберацій за дії ароматизатора перевищував значення контролю (табл. 1). При 1 % концентрації показники індукування хромосомних мутацій становили $3,3 \pm 2,19$ (контроль $1,12 \pm 2,19$). Серед аномалій найчастіше траплялися хромосомні мости – парні дицентрики, які складаються з двох, переважно перехресних хроматид. Це результат транслокацій. Під час вивчення зразків 10 % концентрації показники хромосомних мутацій були ще вищими і становили $3,96 \pm 1,98$. Окрім дицентриків, нами виявлені ацентричні фрагменти хроматидного походження та парні фрагменти ізохроматидного або хромосомного походження. За дії цих зразків нами було зафіксовано чотири мікроядра, які переважно утворюються з ацентричних фрагментів. У всіх проведених дослідях цитотоксичної дії зразків ароматизатора «Карамель» нами не виявлено.

При комбінації ароматизатора «Карамель» з вітаміном С або вітаміном А у тесті на меристемних клітинах *Allium cepa* виявлено зниження індукування хромосомних мутацій. Проте зняти мутагенність до рівня контролю не вдалося, поєднання ароматизатора з вітаміном А знижувало частоту хромосомних аберацій приблизно на 30–50 %, а з вітаміном С – приблизно на 30–40 % (табл. 1).

Таким чином, результати досліджень показали чутливість ана-телофазного тесту на *A. cepa* для виявлення сумарної мутагенної активності ароматизаторів харчової промисловості як своєрідних хімічних композицій. Проте екстраполяція отриманих результатів щодо людини має базуватися не лише на результатах однієї тест-системи. Суттєвим доповненням до розуміння мутагенної дії сумішей хімічних речовин є

використання тестів на дрозоділі, шляхи метаболічних процесів якої є наближеними до відповідних у людини. Тому наступним етапом експерименту було проведення аналізу здатності розчинів харчового ароматизатора «Карамель» викликати появу домінантних летальних мутацій у *Drosophila melanogaster*.

Таблиця 1

Частота хромосомних аберацій, індукованих харчовим ароматизатором «Карамель» у меристемних клітинах корінців насінин *A. sepa*

| Досліджуваний зразок | Всього ана-телофаз | Кількість аномальних ана-телофаз | Частота хромосомних аберацій, % | P |
|----------------------|--------------------|----------------------------------|---------------------------------|-------|
| Карамель 1% | 424 | 14 | 3,30±2,19 | ≤0,05 |
| Карамель 10% | 454 | 18 | 3,96±1,98 | ≤0,05 |
| Карамель 1% +A | 428 | 10 | 2,33±1,11 | ≥0,05 |
| Карамель 10%+A | 404 | 8 | 1,98±1,22 | ≥0,05 |
| Карамель 1% +C | 406 | 9 | 2,22±1,31 | ≥0,05 |
| Карамель 10%+C | 426 | 10 | 2,34±1,72 | ≥0,05 |
| Контроль | 534 | 6 | 1,12±2,19 | |

Частоту домінантних летальних мутацій вивчали на *D. melanogaster* за допомогою внесення зразків ароматизатора «Карамель» у поживне середовище та згодуючи личинок. Контролем служило стандартне поживне середовище без внесення зразків. Частоту домінантних летальних мутацій обчислювали з урахуванням появи незапліднених яєць, яєць із ранніми та пізніми мутаціями, які значно відрізнялися за кольором. Нами зафіксоване підвищення відсотків незапліднених яєць порівняно з контролем. Найвищий рівень таких аномалій виявлено при дослідженні зразка «Карамель» з концентрацією, в 10 разів вищою від добової – відсоток незапліднених яєць перевищував контрольні показники у 3 рази (табл. 2). Удвічі зафіксоване підвищення відсотків яєць із ранніми домінантними летальними мутаціями порівняно з контролем як під час вивчення добової дози, так і при збільшеній дозі в 10 разів. Проте найвищі показники смертності яєць виявлено з пізніми домінантними летальними мутаціями – порівняно з контролем індукування збільшене у 5–6 разів. За сумісної дії ароматизатора «Карамель» з вітаміном А спостерігалось часткове зниження відсотків індукування домінантних летальних мутацій, проте не до спонтанного рівня.

Таблиця 2

Індукція домінантних летальних мутацій у *D. melanogaster* за дії харчового ароматизатора «Карамель»

| Досліджуваний зразок | Кількість відкладених яєць | Відсоток незапліднених яєць% | Відсоток яєць із раннім ДЛМ, % | Відсоток яєць із пізнім ДЛМ, % | Частота ДЛМ % | Коефіцієнт Стьюдента, t |
|----------------------|----------------------------|------------------------------|--------------------------------|--------------------------------|---------------|-------------------------|
| Карамель 1% | 1109 | 2,7 | 1,3 | 2,1 | 6,1±0,69 | 3,28 |
| Карамель 10% | 1076 | 3,9 | 1,4 | 2,4 | 7,7±1,64 | 2,96 |
| Карамель 1% +A | 1022 | 2,1 | 1,6 | 1,0 | 4,7±2,03 | 3,35 |
| Карамель 10% +A | 1187 | 1,5 | 1,1 | 1,3 | 3,9±0,72 | 3,1 |
| Контроль | 1253 | 1,3 | 0,6 | 0,4 | 2,3±0,8 | – |

Проведено аналіз здатності розчину харчового ароматизатора «Карамель» індукувати появу хромосомних мутацій у клітинах кісткового мозку *Mus musculus*. Середня частота метафаз із абераціями хромосом для максимально досліджуваної добової дози ароматизатора становив 1,47±0,49 %, що у 2,94 разу перевищує показники контролю (0,50±0,29 %). Серед аномалій було зафіксовано чотири метафазні пластинки з анеуплоїдією – 39 хромосом, три каріотиби – по 41 хромосомі, дві метафазні з 42 хромосомами та один поліплоїд

з анеуплоїдією – 78 хромосом (нормальний каріотип миші $2n=40$). За дії концентрації, яка відповідає добовій дозі, частота хромосомних аберацій становила $1,15 \pm 0,19$, що майже утричі перевищує контроль (табл. 3). Серед аберацій за дії добової дози виявлено два анеуплоїди – по 38 хромосом із делеційними фрагментами, три анеуплоїди по 37 хромосом, а у двох випадках – каріотип становив 43 хромосоми. У контролі зафіксовано три випадки анеуплоїдів. Під час одночасного згодовування мишей досліджуваними зразками з вітамінними хіміопревертентами отримали позитивну динаміку. Так, під час згодовування мишей зразком 10 % концентрації ароматизатора з вітаміном С зафіксоване зменшення кількості аномальних метафаз у клітинах кісткового мозку приблизно удвічі. За одночасного згодовування 1 % зразком ароматизатора з вітаміном С кількість аномальних аберацій наблизилася до спонтанного рівня (табл. 3). Зменшення кількості аномальних метафаз виявлено і під час згодовування мишам зразків ароматизатора з вітаміном А, проте у разі поєднання вітаміну А з 1 % зразком «Карамелі» антимуагенної дії не виявлено. Таким чином, у нашому експерименті вдалося виявити широкий діапазон аномалій, оскільки за час аналізу фіксувалися не лише мутації окремих хромосом, але й геномні мутації (політа анеуплоїдії). Це може свідчити про порушення функціонування веретена поділу та нерозходження хромосом як результат впливу мутагенних агентів, серед яких можуть бути і самі складові ароматизаторів, і їхні метаболіти.

Таблиця 3

Рівні хромосомних аберацій у клітинах кісткового мозку *Mus musculus*,
індуковані харчовим ароматизатором «Карамель»

| Досліджуваний зразок | Загальна кількість метафаз | Загальна кількість аномальних метафаз | Частота хромосомних аберацій, % | P |
|----------------------|----------------------------|---------------------------------------|---------------------------------|-------------|
| Карамель 1% | 606 | 7 | $1,15 \pm 0,19$ | $\leq 0,05$ |
| Карамель 10% | 676 | 10 | $1,47 \pm 0,49$ | $\geq 0,05$ |
| Карамель 1% +А | 528 | 6 | $1,13 \pm 1,11$ | $\leq 0,05$ |
| Карамель 10%+А | 534 | 4 | $0,74 \pm 0,22$ | $\leq 0,05$ |
| Карамель 1% +С | 576 | 3 | $0,52 \pm 0,31$ | $\leq 0,05$ |
| Карамель 10%+С | 516 | 4 | $0,78 \pm 0,72$ | $\leq 0,05$ |
| Контроль | 758 | 3 | $0,39 \pm 0,29$ | |

Проаналізовано сумісну мутагенну активність зразків ароматизатора «Карамель», який безпосередньо застосовується в кондитерському виробництві. Як при використанні рослинного тест-об'єкта *Allium cepa*, так і в експериментах на тваринному об'єкті *Mus musculus*, виявлено індукування хромосомних аберацій у проліферативних клітинах за дії даного ароматизатора для обох досліджуваних доз. У меристемних клітинах апікальної частини корінців *Allium cepa* виявлено утворення одинарних, парних фрагментів і дицентриків, які можуть виникати в результаті таких хромосомних аберацій як делеції та транслокації. У тесті на *Drosophila melanogaster* за різних концентрацій ароматизатора виявлено індукування домінантних летальних мутацій, які виникають за дії хімічних сполук у сперматозоїдах, вони можуть приводити до дефіциту хромосомного матеріалу в геномі і, часто, до смерті зиготи. Вважати стимулюючою дією хромосомних і домінантних летальних мутацій лише за рахунок 4-метилімідазолу не варто, оскільки зразки ароматизатора «Карамель» містять суміш хімічних речовин, серед яких є й інші азотовмісні поліциклічні вуглеводи та домішки.

Забезпечення цілісності та стабільності спадкових структур має багаторівневий, системний та ієрархічний характер, який умовно можна розділити на три рівні: 1) специфічна антимуагенна система клітин – комплекс ферментів з антиоксидантною активністю

(супероксиддисмутаза, каталаза); кон'югуючі ферменти (глутатіонтрансферазна система); ендogenous антиоксиданти (токофероли, вітамін К, вітаміни А і С, каротиноїди, поліаміни, пуринові рибозиди); 2) репаративні системи, об'єктом яких є премутаційні пошкодження ДНК; 3) захисно-відновні системи, які працюють на рівні організму (гормони, пігменти, плазма крові). Функціонування в організмі ферментних систем, які здійснюють метаболічну активацію багатьох ксенобіотиків, робить неоднозначний внесок у роботу антимутагенного апарату. Кінцевим результатом перетворення кожного конкретного мутагену може бути як його знешкодження, так і утворення нових, більш генотоксичних сполук. Фенотип антиоксидантної системи визначається активністю ферментів антиоксидантного захисту і стійкістю тканин до індукції перекисного окиснення ліпідів. Характерною особливістю антимутагенної системи організму є те, що кількість багатьох метаболізуючих ферментів підвищується відповідно до збільшення рівня чужорідних сполук, які надходять ззовні. Саме тому внесення в організм додаткової кількості речовин, зокрема, вітамінів, що є коферментами ензимів антиоксидантної й антимутагенної системи організму, дає змогу забезпечити додатковий захист від екзогенних генотоксикантів. У даному дослідженні отримано підтвердження такого припущення, оскільки одночасне додаткове згодовування мишам вітамінів А та С й ароматизатора «Карамель» дало змогу отримати суттєве зниження появи абераційних метафаз та індукування домінуючих летальних мутацій.

СПИСОК ВИКОРИСТАНОЇ ЛІТЕРАТУРИ

1. Боднар І. В., Андрейко О. Ю., Боднар Л. С. Виявлення змін на генному рівні у *Salmonella typhimurium* за дії ароматизаторів продуктів харчування // Вісн. Харків. ун-ту. Сер. біол. 2015. Вип. 18. № 1079. С. 65–70.
2. Боднар І. В., Зубко О. С., Щербаківа О. В. та ін. Виявлення змін на хромосомному рівні в еукаріотичних організмів за дії синтетичних ароматизаторів продуктів харчування та корегування їх за допомогою вітамінних хіміопревентерів // Фактори експериментальної еволюції організмів: зб. наук. праць. К., 2016. Т. 18. С. 67–71.
3. Булдаков А. С. Пищевые добавки: справочник. СПб., 1996. 240 с.
4. Гончаренко Т.П., Гончаренко О. Г. Харчові добавки як об'єкт моніторингових досліджень // Екологія довкілля та безпека життєдіяльності. 2008. № 4. С. 81–84.
5. Дурнев А. Д., Середенін С. Б. Мутагени (скрининг і фармакологічна профілактика впливів). М.: Медицина, 1998. 328 с.
6. Дурнев А. Д. Мутагени і антимутагени в продуктах харчування // Генетика. 1997. 33. С. 165–176.
7. Калаев В. Н., Карпова С. С. Цитогенетический мониторинг: методы оценки загрязнения окружающей среды и состояния генетического аппарата организма. Воронеж: ВГУ, 2004. 80 с.
8. Прохорова И. М., Фомичева П. Н., Ковалева М. И. Оценка митотоксического и мутагенного действия факторов окружающей среды: метод. указания. Ярославль: ЯрГУ, 2003. С. 23–26.
9. Смоляр В. І. Токсичні ефекти харчових добавок // Проблеми харчування. 2005. № 1. С. 5–15.
10. Стрижельчик Н. Г., Бариляк І. Р. Мутагенные и антимутагенные свойства пищевых добавок. Харьков: ХНУ им. Каразина, 2009. 152 с.
11. Evans H. J. Cytological methods for detecting chemical mutagens. In: Hollaender A. ed. Chemical mutagens: principles and methods for their detection // New York; London; Plenum Press. 1976. 4. P. 1–29.

12. *Jacobson M. F.* Petition to Bar the Use of Caramel Colorings Produced With Ammonia and Containing the Carcinogens 2-Methylimidazole and 4- Methylimidazole // Center for Science in the Public Interest, 2011. 37 p.

Стаття: надійшла до редакції 28.04.17

доопрацьована 28.09.17

прийнята до друку 06.10.17

**EXPEDIENCY OF USE VITAMIN CHEMIOPROTECTORS
FOR CORRECTION OF CHROMOSOME ABERRATION INDUCED
BY FOOD SYNTHETIC FLAVORS “CAMEL”**

I. Bodnar, S. Gorbulinska, L. Bodnar

*Ivan Franko National University of Lviv
4, Hrushevskiy St., Lviv 79005, Ukraine*

e-mail: bodnarlidia@ukr.net

Flavors “Caramel” induced in root meristem cells of onion *Allium cepa* L. single and paired fragments of chromosome and dicentric chromosomes, which are the result of chromosomal aberrations such as deletions and translocations. It was found induction of dominant lethal mutations and unfertilized eggs by different concentration of flavors in *Drosophila melanogaster* test. As well as under flavors influence we have shown the induction of a wide range of chromosome aberrations in metaphase bone marrow cells of white mice *Mus musculus* L., which included not only chromosomes but also genomic mutations. This could be evidence of spindle apparatus disruption and chromosomes nondisjunction as an influence of mutagenic agents, which may include a flavoring component themselves as well as their metabolites appearing in the biotransformation in mammal’s organism. We observed a partial decrease of aberrant metaphases and dominant lethal mutations after vitamin A and C application.

Keywords: mutagenicity, chromosome aberrations, chemical preventers, flavors, dominant lethal mutations