

## ІНДУКУВАННЯ ХРОМОСОМНИХ АБЕРАЦІЙ У *ALLIUM CEPA* L. ЗРАЗКАМИ НОВОСИНТЕЗОВАНИХ ХАРЧОВИХ АРОМАТИЗАТОРІВ

І. Боднар<sup>1</sup>, С. Горбулінська<sup>1</sup>, О. Андрейко<sup>2</sup>, Л. Боднар<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Львівський національний університет імені Івана Франка  
вул. Грушевського, 4, Львів 79005, Україна

<sup>2</sup>Львівський науково-дослідний інститут епідеміології та гігієни  
вул. Зелена, 12, Львів 79005, Україна  
e-mail: bodivas@gmail.com

Вивчено мутагенну активність зразків деяких новосинтезованих харчових ароматизаторів: ароматизатор “Шоколад” проявляв сильну генотоксичну активність – при дозі, збільшеній у 10 разів порівняно з добовою, спостерігався токсичний ефект, при інших дозах виявлене підвищення рівня хромосомних аберацій і зниження мітотичного індексу; ароматизатор “Чорнослив” при дії допустимої добової дози та дози, збільшеної у 10 разів, індукував появу хромосомних мутацій, зростання відносної тривалості профазы. Серед хромосомних мутацій виявлені хромосомні та хроматидні фрагменти, дицентрики. Під впливом ароматизаторів “М’ята” і “Вермут” хромосомних аберацій і змін щодо мітотичного індексу не показано.

*Ключові слова:* ана-телофазний аналіз, хромосомні аберації, мітотичний індекс, харчовий ароматизатор.

Кількість відомих хімічних сполук налічує майже 10 млн і щорічно зростає на 10%. Приблизно 15% новосинтезованих речовин знаходять застосування у різних галузях людської діяльності. При цьому людина перебуває у постійному контакті з 63 тис. хімічних сполук у вигляді пестицидів, лікарських препаратів, промислових відходів, харчових добавок [5].

Деякі з харчових добавок є традиційними і використовуються людством здавна (сіль, оцет). Але, починаючи зі середини минулого століття, надзвичайно широкого застосування набули харчові добавки ідентичні натуральним і синтетичні. Їх отримують шляхом хімічного синтезу. І хоча за чистотою і складом харчових добавок здійснюється постійний контроль, усе ж вони становлять суттєву небезпеку для здоров’я людини. Більшість із них є сторонніми (чужорідними), а віддалені наслідки їхнього впливу на організм людини невідомі [3]. Харчові добавки можуть бути визначені як група природних або синтетичних речовин, що не вживаються як харчові продукти або основні компоненти їжі та що спеціально вводяться в сировину, напівпродукти або готові харчові продукти з метою вдосконалення технології, збереження природних якостей харчових продуктів, поліпшення їхніх органолептичних властивостей і стабільності при зберіганні [2]. Більшість харчових добавок не мають харчової цінності, тому в кращому випадку є біологічно інертними для організму, а в гіршому – виявляють біологічну активність [2]. Виробництво харчових добавок у світі має тенденцію до безперервного кількісного і якісного зростання: в Азії — на 10–15%, у США — на 4,4%, у країнах Європи — лише на 2% [7]. Законодавством України не встановлено обов’язкового тестування на мутагенну активність новостворених харчових добавок. Метою нашої роботи було виявити генотоксичну активність на хромосомному рівні деяких новосинтезованих ароматизаторів.

### Матеріали і методи

Матеріалом досліджень служили розчини харчових ідентично-натуральних ароматизаторів “М’ята” (компонентний склад: D-карвон, ментофуран), “Чорнослив” (компонент-

ний склад: В-дамаскон, етилбутират, ацетон, мальтол), “Шоколад” (компонентний склад: гамаокталактон, масляна кислота, етилбутират, диацетил, дигідрокумарин) і натурального ароматизатора “Вермут” (містить екстракти трав *Saturea hortensis*, *Sambucus nigra*, *Origanum majorana*, *Chamomillae romanae*, *Carduus benedictus*, *Angosturae cortex*, *Salvia sclarea*, *Citrus aurantimum*). Ароматизатори “М’ята”, “Чорнослив”, “Вермут” випускаються у вигляді прозорої рідини з відповідним запахом, ароматизатор “Шоколад” – у вигляді білого порошку.

Дослідні концентрації речовин вираховували з розрахунку добової дози на 1 кг середньої маси людини, приймаючи її за концентрацію речовини в 1 л розчину [8]. Наступні концентрації були в 10 разів більшими та в 10 разів меншими за добову дозу.

Для аналізу мутагенного впливу досліджуваних сполук використали ана-телофазний аналіз на тест-об’єкті *Allium cepa* L. Суть методу полягає у виявленні хромосомних аберацій, які виникають у меристемних клітинах корінців при пророщуванні на досліджуваних субстратах. Клітини аналізували на стадії анафази, коли відстань між ділянками хромосом на полюсах більша від розмірів самих хромосом, а також на стадії ранньої телофази – на початку утворення фрагмопласта.

Хромосомні мутації (хромосомні аберації) поділяють на внутрішньохромосомні (делеції, дуплікації, інверсії) та міжхромосомні (транслокації) – обмін ділянками між двома хромосомами. Якщо при цьому відбувається злиття залишків двох хромосом, кожен із яких містить центромеру, то виникає дицентрична хромосома (дицентрик). При обміні ділянками двох плечей однієї хромосоми виникає кільцева хромосома [1].

На стадії анафази і телофази підраховуються два типи аберацій: відставання хромосомного матеріалу (ацентричні фрагменти і кільця, відставання хромосом) і мости. Мости поділяють на хромосомні та хроматидні. Хромосомний міст – це дицентрична хромосома, яка складається з двох хроматид, найчастіше перехрещених між собою. Хроматидний міст утворюється дицентричною хроматидою. Хромосоми і хроматиди, що відстають, ідентифікуються досить легко, оскільки мають добре помітну центромеру чи неоднорідність структури, що не характерно для фрагментів [6].

Насіння кількістю 50–60 шт. розкладали на чашки Петрі, в яких містилися диски фільтрувального паперу, змочені досліджуваними зразками. Пророщували насіння при температурі 22°C. Через 3 доби, коли довжина корінців досягла 0,5–1 см, насіння промили дистильованою водою і перенесли у бюксики з фіксатором. Фіксацію проводили у вечірній час (18–20 год), коли кількість мітотичних поділів для даного виду максимальна, і повторювали свіжою сумішшю через 3–4 год. Загальна тривалість фіксації – 24 год. Для фіксації використовували фіксатор Кларка (етанол і льодяна оцтова кислота 3:1). Промивали у 96% спирті. На тривале збереження переносили у 70% спирт. Виготовляли тимчасові давлені препарати корінців цибулі. Фарбування проводили ацетоорсеїном [4]. Перегляд готових препаратів здійснювали за допомогою мікроскопа «Мікмед» при збільшенні 900 (10x90).

Під час підрахунку дотримувалися такої схеми:

- кількість корінців на зразок 12–14;
- кількість полів зору 3–4;
- кількість досліджених клітин – не менше 2000.

Підраховували мітотичний індекс (*MI*) за формулою:

$$MI = \frac{(П + М + А + Т)}{(I + П + М + А + Т)} \times 1000\%,$$

де  $\Pi$  – кількість клітин у профазі,  $M$  – у метафазі,  $A$  – в анафазі,  $T$  – кількість інтерфазних клітин.  $MI$  виражають у проміллі, тобто кількістю мітозів на тисячу клітин.

Зменшення мітотичного індексу свідчить про пригнічення процесу поділу клітини під дією досліджуваного препарату. Зменшення  $MI$  може відбуватися як за рахунок затримки клітин у мітозі, так і за рахунок вступу в поділ великої кількості клітин. Для визначення відносної тривалості кожної з фаз мітозу підраховують фазовий індекс (ФІ) за формулою.

Для профазі вона є такою:

$$\Pi = \frac{\Pi \times 100}{\Pi + M + A + T};$$

для інших фаз мітозу відповідно.

Фазовий індекс дає змогу судити про зміни у співвідношенні фаз мітозу, про зміну тривалості тої чи іншої фази. Так, збільшення кількості метафаз і, відповідно зменшення кількості ана- і телофаз свідчить про вплив препарату (субстрату) на веретено поділу, що веде до нерозходження хромосом до полюсів. Збільшення кількості профаз може відбуватися за рахунок подовження профазі або пришвидшення процесів синтезу в інтерфазі та вступу клітин у мітоз [4].

#### Результати і їхнє обговорення

На першому етапі роботи пророщували насінини цибулі ріпчастої, використовуючи як субстрат досліджувані зразки та дистильовану воду (контроль). Відсоток пророслих насінин для всіх зразків перебував на високому рівні. Фіксацію і приготування препаратів меристемних клітин проводили згідно з методикою [4].

Під час ана-телофазного аналізу на тест-об'єкті *A. сера* виявлено різні типи порушень у правильному розходженні хромосом до полюсів веретена поділу – відставання хромосом, утворення одинарних і парних фрагментів та мостів, що може бути викликано делеціями і транслокаціями хромосом (рис. 2). На рис. 1 показано правильне розходження хромосом в анафазі.

Ароматизатор “М’ята” не спричиняв зростання рівня хромосомних аберацій у меристемних клітинах корінців *A. сера*. Найбільший відсоток аберацій ( $6,52 \pm 1,68$ ) зафіксовано під впливом дози  $0,02$  г/кг (табл. 1), що в 10 разів перевищує рекомендовану дозу.

Ароматизатор “Чорнослив” індукував появу хромосомних аберацій при дії допустимої добової дози та дози, збільшеної у 10 разів. Відсоток клітин з аномаліями становив  $13,33 \pm 2,66$  для дози  $0,002$  г/кг та  $16,67 \pm 3,05$  для дози  $0,02$  г/кг (табл. 1). Найчастіше спостерігалось формування одинарних фрагментів і хромосомних мостів.

Максимальна досліджувана доза ароматизатора “Шоколад” ( $0,4$  г/кг) проявила токсичний ефект на проростання насінин цибулі ріпчастої. Інші концентрації тестованої речовини спричиняли появу хромосомних аберацій різних типів: хромосомних і хроматичних фрагментів, мостів. Відсоток аномалій становив  $24,22 \pm 2,65$  для дози  $0,04$  г/кг та  $25,88 \pm 3,80$  для дози  $0,004$  г/кг (табл. 1), що більш ніж втричі вище за показники контролю ( $7,55 \pm 1,30\%$ ).

Рівень хромосомних мутацій, спричинених дією ароматизатора “Вермут”, коливався від  $7,84 \pm 1,86\%$  до  $9,16 \pm 2,75\%$  (табл. 1), що незначно перевищує контрольні дані. Відзначено, що серед усіх виявлених аберацій найчастіше зустрічалися хромосомні та хроматидні фрагменти.

Таблиця 1

Ароматизатор	Доза, г/кг	Всього ана-телофаз	Кількість аномальних ана-телофаз					Відсоток аномальних ана-телофаз, %	t	P	
			Абсолютна кількість	—		[	□				інші
“М’ята”	0,02	92	6	1	2	—	3	—	6,52±1,68	2,56	≤0,05
	0,002	198	9	3	1	2	1	2	4,55±1,25	3,01	≤0,05
	0,0002	158	9	5	—	2	—	2	5,70±0,86	3,25	≤0,05
“Чорнослив”	0,02	120	20	8	1	2	6	3	16,67±3,05	3,34	≤0,05
	0,002	120	16	4	3	1	5	3	13,33±2,66	3,66	≤0,05
	0,0002	163	8	4	—	1	—	3	4,91±1,28	2,78	≤0,05
“Шоколад”	0,4*	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—
	0,04	128	31	16	4	5	2	4	24,22±2,65	2,98	≤0,05
	0,004	85	22	11	2	2	—	7	25,88±3,80	3,07	≤0,05
“Вермут”	0,7	106	9	4	2	—	—	3	8,49±2,69	5,01	≤0,05
	0,07	131	12	4	4	2	2	—	9,16±2,75	3,68	≤0,05
	0,007	102	8	3	2	—	—	3	7,84±1,86	3,05	≤0,05
Контроль		225	10	2	2	—	—	6	7,55±1,30		

**Примітки.** \* Доза 0,4 г/кг виявилася токсичною для *A. сера*; — — одинарний фрагмент; || — подвійний фрагмент; [ — одинарний (хроматидний) міст; □ — подвійний (хромосомний) міст.

Отже, харчові домішки “М’ята” і “Вермут” не виявляли істотного негативного впливу на проходження процесів поділу у меристемній тканині *A. сера*, тоді як ароматизатори “Чорнослив” і “Шоколад” спричиняли значне підвищення рівня хромосомних аберацій, причому останній пригнічував проростання насінин у дозі 0,4 г/кг, що свідчить про токсичний ефект компонентів даної сполуки.

Мітотичний індекс клітин меристеми корінців *A. сера*, що перебували в умовах впливу ароматизатора “М’ята”, тримався на одному рівні з контролем (табл. 2). Для концентрацій, що відповідають добовим дозам 0,002 та 0,0002 г/кг, значних відхилень за тривалістю фаз мітозу від контрольних показників не виявлено, проте під дією добової дози 0,02 г/кг спостерігалася різке зниження кількості клітин на стадії анафази та, відповідно, збільшення кількості клітин на стадіях профазі і метафази.

Під впливом ароматизатора “Чорнослив”, разом зі збільшенням дози досліджуваної речовини, простежувалося зростання відносної тривалості профазі, за рахунок чого підвищувався показник мітотичного індексу. Для добової дози 0,002 г/кг відсоток клітин на стадії профазі становив 6,93±2,25, для збільшеної в 10 разів добової дози — 7,32±2,02 (табл. 2). Водночас, для останньої дози зафіксовано зниження кількості клітин, що перебували на стадії анафази (4,65±0,68%, при показниках контролю 6,89±1,44).

Ароматизатор “Шоколад” спричиняв значне зниження мітотичного індексу в досліджуваних клітинах (61,69% та 81,01% для добових доз 0,04 та 0,004 г/кг), щодо контрольного рівня (117,76%) (табл. 2). Відносна тривалість анафази для даних концентрацій була дещо нижчою за показники контролю, тривалість інших фаз мітозу — коливалася на одному рівні з контрольними даними. Добова доза 0,4 г/кг виявилася токсичною для насінин *A. сера*.

Дія ароматизатора “Вермут” проявляється у незначному зниженні мітотичного індексу та зниженні відносної тривалості анафаз порівняно з контрольним рівнем (табл. 2). Відсоток клітин на інших стадіях мітозу перебував на одному рівні з контролем.

Отже, значні відхилення від контрольних даних за показниками мітотичного та фазових індексів проявили харчові ароматизатори “Шоколад” і “Чорнослив”. Збільшення відносної тривалості профазі та метафази свідчить про затримку процесів формування веретена поділу під дією речовин, що є компонентами даних добавок.

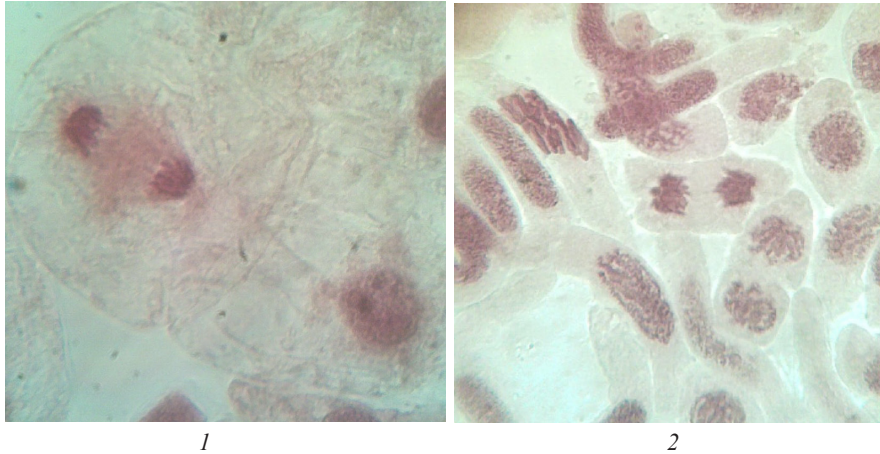


Рис. 1. Нормальне проходження анафази у клітинах меристеми корінців *A. cepa* (1, 2) при збільшенні 10x90.

Таблиця 2

Облік мітотичної активності в меристемних клітинах *A. cepa*,  
 пророщених на зразках харчових ароматизаторів

Ароматизатор	Доза, г/кг	Загальна кількість клітин	Відсоток клітин на стадії профази, %	Відсоток клітин на стадії метафази, %	Відсоток клітин на стадії анафази, %	Відсоток клітин на стадії телофази, %	МІ, ‰
“М’ята”	0,02	2436	3,45±0,84	3,58±0,82	3,78±0,48	1,40±0,85	121,92
	0,002	2894	2,78±1,21	1,72±0,36	6,85±1,35	1,44±0,61	127,85
	0,0002	2412	2,65±0,93	1,74±0,46	6,55±2,61	1,08±0,52	120,23
“Чорнослив”	0,02	2581	7,32±2,02	3,02±1,06	4,65±0,68	1,10±0,12	166,99
	0,002	2368	6,93±2,25	2,87±1,05	5,07±1,96	2,53±0,75	173,99
	0,0002	3010	2,69±1,23	2,62±0,66	5,42±2,14	0,86±0,23	115,95
“Шоколад”	0,4*	–	–	–	–	–	–
	0,04	2772	2,65±0,61	1,59±0,82	5,52±1,86	1,14±0,64	61,69
	0,004	2864	1,43±0,74	1,68±0,48	4,47±1,09	0,52±0,21	81,01
“Вермут”	0,7	2466	2,78±1,21	2,27±0,91	4,30±1,03	0,97±0,32	103,00
	0,07	3208	3,21±1,75	1,93±1,52	4,08±1,26	1,74±0,51	109,73
	0,007	2778	2,27±0,63	1,76±0,25	6,55±1,64	0,97±0,23	86,75
Контроль		3261	2,48±1,42	1,47±0,74	6,89±1,44	0,92±0,56	117,76

**Примітка.** \* Доза 0,4 г/кг виявилася токсичною для *A. cepa*.

Встановлено токсичний ефект на проростання насінин цибулі ріпчастої при дії максимальної добової дози ароматизатора “Шоколад” (0,4 г/кг). Інші концентрації тестованої речовини спричиняли появу аберацій різних типів: хромосомних і хроматидних фрагментів, мостів, що може бути пов’язано зі складовими ароматизатора “Шоколад”, а саме гамаокталактоном і дигідрокумарином. Відсоток аномалій становив 24,22±2,65 для дози 0,04 г/кг та 25,88±3,80 для дози 0,004 г/кг (табл. 2), що більш ніж утричі вище за показники контролю (7,55±1,30%). Виявлено значне зниження мітотичного індексу в досліджуваних клітинах (61,69‰ та 81,01‰ для добових доз 0,04 та 0,004 г/кг), щодо контрольного рівня (117,76‰). Відносна тривалість анафази для даних концентрацій була нижчою за показники контролю, тривалість інших фаз мітозу – коливалася на одному рівні з контрольними даними. Ароматизатор “Чорнослив” індукував також появу хромосомних аберацій при дії допустимої добової дози та дози, збільшеної у 10 разів. Відсоток клітин

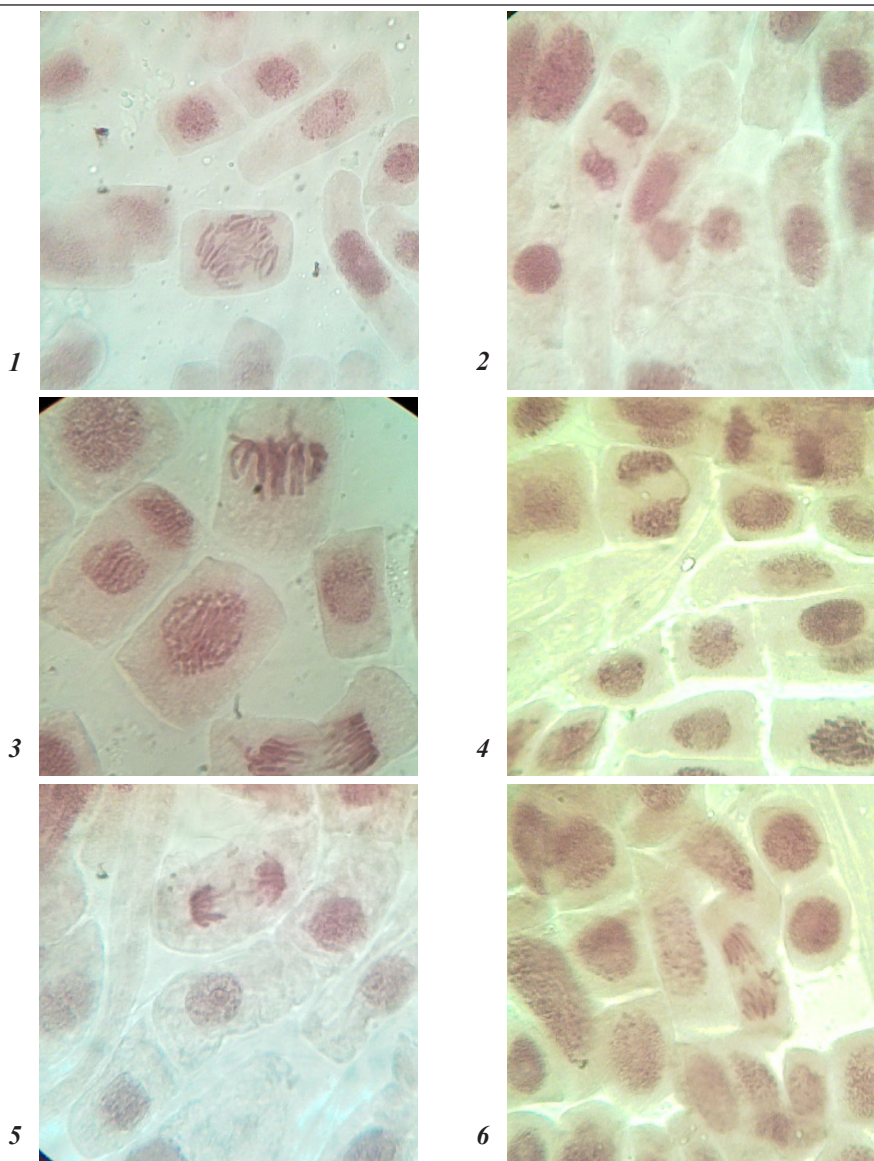


Рис. 2. Типові патології розходження хромосом до полюсів веретена поділу під час анафази на прикладі дії ароматизатора «Шоколад» (при концентрації 0,04 г/кг): 1 – порушення формування веретена поділу, 2 – делеції, 3, 4, 5 – дицентрики, 6 – фрагментація хромосом (збільшення 10x90).

із аномаліями становив  $13,33 \pm 2,66$  для дози 0,002 г/кг та  $16,67 \pm 3,05$  для дози 0,02 г/кг. Найчастіше спостерігалось формування одинарних фрагментів і хромосомних мостів, що може бути індуковано алкілюючими речовинами даного ароматизатора етилбутиратом і  $\beta$ -дамасконом. Під впливом ароматизаторів «М'ята» і «Вермут» хромосомних аберацій та змін щодо мітотичного індексу не виявлено.

СПИСОК ВИКОРИСТАНОЇ ЛІТЕРАТУРИ

1. *Бочков Н. П., Чеботарев А. Н.* Наследственность человека и мутагены внешней среды. М.: Медицина, 1989. 272 с.
2. *Булдаков А. С.* Пищевые добавки. Справочник. СПб.: Ut, 1996. 240 с.
3. *Гончаренко Т. П., Гончаренко О. Г.* Харчові добавки як об'єкт моніторингових досліджень // Екологія довкілля та безпека життєдіяльності. 2008. № 4. С. 81–84.
4. *Гостимский С. А., Дьякова М. И., Ивановская Е. В* и др. Практикум по цитогенетике. М.: МГУ, 1974. С. 20–48.
5. *Дубинин Н. П.* Новое в современной генетике. М.: Наука, 1986. 121 с.
6. *Калаев В. Н., Карпова С. С.* Цитогенетический мониторинг: методы оценки загрязнения окружающей среды и состояния генетического аппарата организма. ВГУ, 2004. 80 с.
7. *Смоляр В. І.* Токсичні ефекти харчових добавок // Проблеми харчування. 2005. № 1. С. 5–15.
8. *Стрижельчик Н. Г., Бариляк И. Р.* Мутагенные и антимутагенные свойства пищевых добавок. Харьков: ХНУ имени Каразина, 2009. 152 с.

*Стаття: надійшла до редакції 22.12.10*

*доопрацьована 09.03.11*

*прийнята до друку 11.03.11*

**INDUCTION OF CHROMOSOMAL ABERRATION IN *ALLIUM CEPA* L. BY THE STANDARDS OF NEWSYNTHESIZED FOOD FLAVOURS**

**I. Bodnar<sup>1</sup>, S. Gorbulska<sup>1</sup>, O. Andreyko<sup>2</sup>, L. Bodnar<sup>1</sup>**

*<sup>1</sup>Ivan Franko National University of Lviv  
4, Hrushevskiy St, Lviv, 79005 Ukraine*

*<sup>2</sup>Lviv Research Institute of Epidemiology and Hygiene  
12, Zelena St, Lviv, 79005 Ukraine  
e-mail: bodivas@gmail.com*

Mutagene activity of standards of some newsynthesized food flavours is studied: a flavour "Chocolate" showed strong genotoxic activity, which appeared in toxicness of megascopic in 10 times day's dose, increase of level of chromosomal aberration under the action of other doses and decline of mitotical index; flavour "Prunes" induced appearance of chromosomal mutations at the action of possible day's dose and dose megascopic in 10 times, increases of relative duration of profase. Among chromosomal aberrations the chromosomal are educed and chromatid fragments, dicentric chromosomes. Under act of flavours "Mint" and "Vermouth" of chromosomal aberrations and changes in relation to a mitotical index are not showed.

*Key words:* ana-telophase analysis, chromosomal aberration, mitotical index, food flavour.

**ИНДУЦИРОВАНИЕ ХРОМОСОМНЫХ АБЕРРАЦИЙ У *ALLIUM CEPA* L.  
ОБРАЗЦАМИ НОВОСИНТЕЗИРОВАННЫХ ПИЩЕВЫХ АРОМАТИЗАТОРОВ****И. Боднар<sup>1</sup>, С. Горбулинская<sup>1</sup>, О. Андрейко<sup>2</sup>, Л. Боднар<sup>1</sup>***<sup>1</sup>Львовский национальный университет имени Ивана Франко  
ул. Грушевского, 4, Львов 79005, Украина**<sup>2</sup>Львовский научно-исследовательский институт эпидемиологии и гигиены  
ул. Зеленая, 12, Львов 79005, Украина  
e-mail: bodivas@gmail.com*

Изучена мутагенная активность образцов некоторых новосинтезированных пищевых ароматизаторов: ароматизатор “Шоколад” показал сильную генотоксическую активность – при дозе, увеличенной в 10 раз по сравнению с суточной, проявлялся токсичный эффект, при других дозах выявлено увеличение уровня хромосомных aberrаций и снижение митотического индекса; ароматизатор “Чернослив” при действии допустимой суточной дозы и дозы, увеличенной в 10 раз, индуцировал появление хромосомных мутаций, рост относительной длительности профазы. Среди хромосомных мутаций обнаружены хромосомные и хроматидные фрагменты, дицентрики. Под воздействием ароматизаторов “Мята” и “Вермут” хромосомные aberrации и изменения относительно митотического индекса не наблюдались.

*Ключевые слова:* ана-телофазный анализ, хромосомные aberrации, митотический индекс, пищевой ароматизатор.