

ВИЯВЛЕННЯ ЗМІН НА ХРОМОСОМНОМУ РІВНІ В ЕУКАРІОТИЧНИХ ОРГАНІЗМІВ

ЗА ДІЇ СИНТЕТИЧНИХ АРОМАТИЗАТОРІВ ПРОДУКТІВ ХАРЧУВАННЯ ТА КОРИГУВАННЯ ЇХ ЗА ДОПОМОГОЮ ВІТАМІННИХ ХІМІОПРЕВЕНТЕРІВ

Серед харчових добавок особливу групу становлять ароматизатори – речовини, що підсилюють смак і аромат готового продукту, вони полікомпонентні, тобто складаються з великої кількості хімічних сполук [1]. Фірма-виробники переважно не розголошують повний перелік інгредієнтів ароматизаторів, а якщо його перераховують, то не вказують кількість того чи іншого складового в 1 г ароматизатора. Крім того, мутагенні та 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 його сумарної мутагенної активності при різних концентраціях. В Україні використання харчових добавок можливе лише після їх реєстрації центральним органом виконавчої влади у сфері охорони здоров'я, проте висновок про генотоксичну безпеку харчових добавок не є обов'язковим. Хоча саме біотестування для визначення генотоксичних властивостей на різних тест-об'єктах набуває все більшого значення, адже дозволяє з'ясувати мутагенну чи/або цитотоксичну, чи/або канцерогенну дію досліджуваних зразків. Одним з доказових показників мутаційного процесу на клітинному рівні є виявлення хромосомних аберацій, підвищений рівень яких розглядається як хромосомна нестабільність, яка в подальшому може спричинити розвиток злоякісних новоутворень [2].

Перспективним напрямком сьогодення є виробництво функціональних продуктів харчування, які не лише забезпечують фізіологічні потреби організму в поживних речовинах і енергії, але й мають профілактичне або й лікувальне значення. Серед речовин з антимутагенним ефектом є вітаміни, антиоксиданти (Е, А, аскорбінова кислота, бетакаротин), біологічні пігменти (гемо-

глобін, хлорофіли і цитохроми, лікопен), поліфеноли (флавоноїди, таніни, катехіни й інші циклічні спирти), сполуки, що містять сірку, селен та ін. [3, 4]. Вітаміни, зокрема А та С, є незамінними факторами живлення, які забезпечують нормальний розвиток організму, служать необхідним захистом для тварин і людини та можуть бути використані для зняття або зменшення сумарних мутагенних фонів. Цей підхід був використаний нами для з'ясування можливих змін щодо мутагенних активностей при одночасному згодовуванні мишам ароматизаторів та вітамінних хіміопревентерів.

Матеріали і методи

Досліджували 5 харчових ароматизаторів: «Grapes 82085р» (до складу входять: етилацетат, 1-гексен-3-ол, ванілін, мальтодекстрин), «Chocolate 82100р» (диацетил, масляна кислота, дигідрокумарин, гамаокталактон, етилбутират), «Petit Beurre 02974» (ацетоїн, геліотропін, диацетил, масляна кислота), «Rafaelo 82129р» (пропіленгліколь, ванілін, гамаокталактон), «Aromat 22062» (ізоаміловий спирт, 1-гексенол, нерол, оксид ліналоолу, етилбутират, мальтол, етанол). У роботі використовували такі дози: рекомендована виробником добова доза та добова доза, збільшена в 10 разів.

Дослідження проводили на двох еукаріотичних тест-об'єктах: білі нелінійні миші *Mus musculus* та насіння цибулі ріпчастої *Allium cepa*. Для виявлення впливу ароматизаторів на геном соматичних клітин ссавців використовували метод метафазного аналізу аберацій хромосом у клітинах кісткового мозку мишей [5]. Для виявлення генотоксичного та цитотоксичного впливу розчинів ароматизаторів на геном цибулі використовували метод ана-телофазного аналізу хромосомних аберацій у клітинах кореневої меристеми проростків [4]. Статистичну обробку ре-

зультатів проводили з використанням критерію Стьюдента t .

Результати та обговорення

Під час використання ана-телофазного аналізу на *Allium cepa* було виявлено різні типи порушень в нормальному розходженні хромосом до полюсів (утворення одиночних та парних фрагментів, мостів), які виникають у результаті делецій та транслокацій хромосом за дії сумішей хімічних сполук, що входять до складу ароматизаторів. Серед інших аномалій зустрічалися відставання хромосом на стадії анафази, багатоплюсність, що може свідчити про порушення формування веретена поділу.

За дії ароматизатора «Rafaelo 82129p» показники частоти хромосомних аберацій становили $5,0 \pm 1,22$ для концентрації $0,14$ г/кг і $3,8 \pm 1,51$ для концентрації $0,014$ г/кг (табл.). Статистично достовірне перевищення показано лише для дози, збільшеної у 10 разів. За дії цього ароматизатора спостерігався весь спектр можливих хромосомних порушень, які індукуються процесами делецій, транслокацій і порушеннями формування веретена поділу. Ароматизатор «Grapes 82085p» індукував появу аберацій хромосом як за дії допустимої добової дози, так і дози, збільшеної в 10 разів. Процент клітин з аномаліями складав $4,1 \pm 0,15$ для дози $0,14$ г/кг (статистично підтвержене перевищення) і $2,4 \pm 0,09$ для дози $0,014$ г/кг (табл.). Найчастіше спостерігалось формування одинарних та подвійних фрагментів, які є результатом делецій. Рівень хромосомних мутацій, які викликані дією ароматизатора «Petit Beurre 02974p», коливався від $0,8 \pm 0,12$ до $1,6 \pm 0,09$, що незначно перевищував контрольні показники. При концентрації, яка відповідає рекомендованій добовій дозі, різниці в індукуванні

мутацій зі спонтанним рівнем не виявлено. Максимальна досліджувана нами добова доза ароматизатора «Chocolate 82100p» ($0,4$ г/кг) проявила токсичний ефект на проростання насіння цибулі ріпчастої. Інші концентрації викликали появу хромосомних аберацій різних типів: хромосомних і хроматидних фрагментів, мостів. Процент аномалій складав $3,26 \pm 1,21$ для дози $0,04$ г/кг, проте статистична різниця неістотна (табл.).

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 повинна базуватися не лише на результатах однієї тест-системи. Суттєвим доповненням до розуміння мутагенної дії сумішей хімічних речовин є використання тестів на свавцях, шляхи метаболічних процесів яких є максимально наближеними до відповідних у людини. Тому наступним етапом експерименту було проведення аналізу здатності розчинів харчових ароматизаторів викликати появу хромосомних аберацій у клітинах кісткового мозку *Mus musculus* шляхом проведення як хронічного, так і гострого експериментів.

При проведенні хронічного експерименту мишам впродовж 10 днів згодовували розчини зразків ароматизаторів, що відповідали дозі, збільшеній у 10 разів від добової. Було виявлено різні типи порушень у правильному розходженні хромосом, а також зміну числа хромосом (анеплоїдію, поліплоїдію). Відсоток аномальних метафаз за дії харчового ароматизатора «Grapes 82085p» становив $4,37 \pm 0,93$, що більше, ніж у 4 рази перевищує показники контролю ($1,00 \pm$

Таблиця

Частота хромосомних аберацій, індукованих харчовими ароматизаторами на *A. cepa*

Досліджуваний зразок	Доза, г/кг	Всього анателофаз	Кількість аномальних анателофаз	$M \pm m$	Достовірність, t
«Grapes 82085p»	0,14	146	6	$4,1 \pm 1,64$	2,90*
	0,014	125	3	$2,4 \pm 1,37$	1,24
«Petit Beurre 02974p»	0,28	125	2	$1,6 \pm 1,12$	0,82
	0,028	130	1	$0,77 \pm 0,11$	0,36
«Rafaelo 82129p»	0,14	160	8	$5,00 \pm 1,22$	3,44*
	0,014	130	4	$3,8 \pm 1,51$	2,04
«Chocolate 82100p»	0,4	—	—	—	—
	0,04	215	7	$3,26 \pm 1,21$	2,08
Контроль		156	1	$0,64 \pm 0,34$	

Примітка. * – рівень достовірності $p \geq 0,95$.

0,44). Серед досліджених метафаз виявлено 5, в яких кількість хромосом у метафазній пластинці становила 20 або 60, тобто n та $3n$ (рис. 1, А). Такі зміни можуть бути пов'язані з порушенням формування веретена поділу, в результаті чого відбувається неправильне розходження хромосом. Харчовий ароматизатор «Petit Veurre 02974» спричиняв появу хромосомних аберацій різних типів: зміни числа набору хромосом (геномні мутації) та зміни числа окремих хромосом (анеуплоїдія). Відзначено 6 метафаз, в яких набір хромосом був $2n-2$ (рис. 1, Б). Серед всіх проаналізованих даних найвищі показники мутагенності виявив порошкоподібний харчовий ароматизатор «Rafaelo 82129р». При концентрації 0,14 г/кг цей показник становив $6,97 \pm 1,25$, що перевищує контрольні дані ($1,00 \pm 0,44$) майже у 7 разів.

При гострому експерименті розчини вводили мишам одноразово внутрішньочеревно в концентрації добової дози і/або дози, збільшеної в 10 разів від добової. При дослідженні харчового ароматизатора «Chocolate 82100р» в концентрації, що відповідає збільшеній у 10 разів добовій дозі (0,4 г/кг), виявлено шість метафазних пластинок з абераціями хромосом. Середня частота метафаз з абераціями складала $1,20 \pm 0,49\%$. За дії харчового ароматизатора «Chocolate 82100р» в концентрації, що відповідає рекомендованій добовій дозі (0,04 г/кг), виявлено три метафазні пластинки з абераціями хромосом серед проаналізованих метафаз. Середня частота метафаз з абераціями складала $0,62 \pm 0,31\%$. У групі негативного контролю виявлено дві аберації ($0,27 \pm 0,11\%$). За дії харчового ароматизатора «Chocolate 82100р» всі аберації були представле-

ні одинарними фрагментами, які утворюються в результаті хроматидних делецій. Середня частота метафаз з абераціями хромосом для максимальної досліджуваної дози ароматизатора «Grapes 82085р» (0,14 г/кг) становила $1,80 \pm 0,59\%$, що в дев'ять разів перевищує показники негативного контролю ($0,20 \pm 0,19\%$). За дії концентрації, що відповідає рекомендованій добовій дозі, виявлено п'ять метафазних пластинок з абераціями (а саме делеційними фрагментами) хромосом на 500 проаналізованих метафаз ($1,00 \pm 0,44$), що в 5 разів вище за показники контролю. Ароматизатори «Aromat 22062» та «Rafaelo 82129р» в дозах, що відповідають рекомендованій добовій та збільшеній в 10 разів, спричиняли підвищення рівня хромосомних аберацій до значень $2,04 \pm 1,89$ та $1,27 \pm 1,34$ відповідно, що у 10 і 6 разів перевищує спонтанний рівень ($0,2 \pm 0,19$). За дії досліджуваних харчових ароматизаторів при всіх дозах загибелі тварин і клінічних симптомів інтоксикації не спостерігалось. Поведінка піддослідних мишей не відрізнялася від контрольних.

Два методичних підходи тесту на виявлення індукції хромосомних аберацій у *M. musculus* не виключають один одного і є взаємодоповнючими. В нашому експерименті з хронічним впливом вдалося виявити ширший діапазон аномалій, оскільки за час аналізу фіксувалися не лише мутації окремих хромосом, але й геномні мутації (полі- та анеуплоїдії). Це може свідчити про порушення функціонування веретена поділу та нерозходження хромосом як результат тривалого впливу мутагенних агентів, серед яких можуть бути і самі складові ароматизаторів, і їх метаболі-

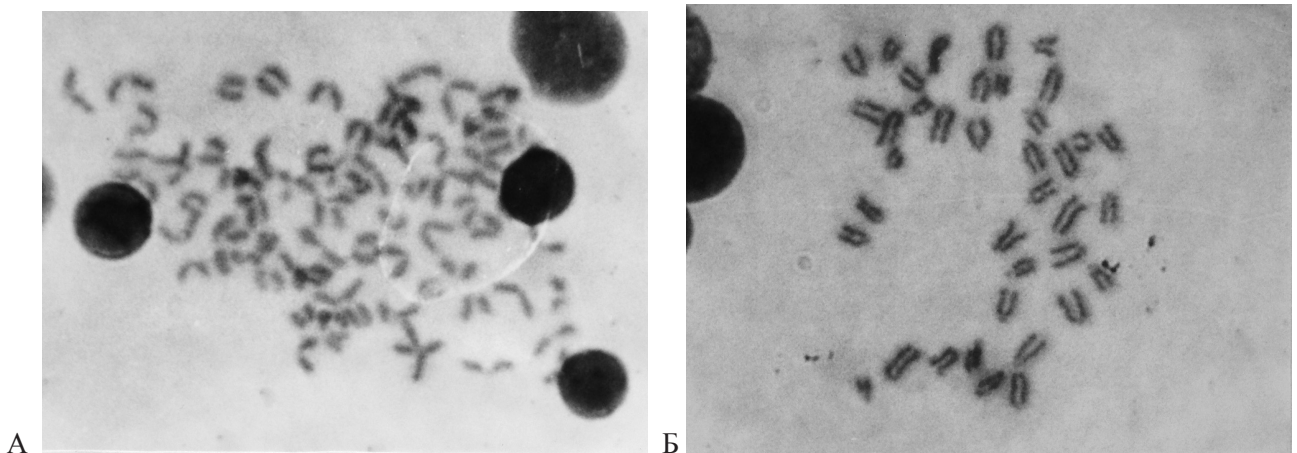


Рис. 1. Зміни на хромосомному рівні у *Mus musculus* за дії ароматизатора «Grapes 82085р» (А – $3n$) та ароматизатора «Rafaelo 82129р» (Б – $2n-2$). Норма $2n-40$ хромосом. Збільшення 15×90

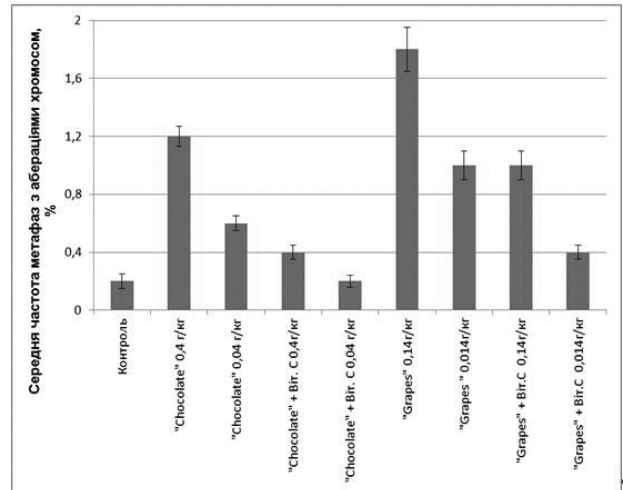
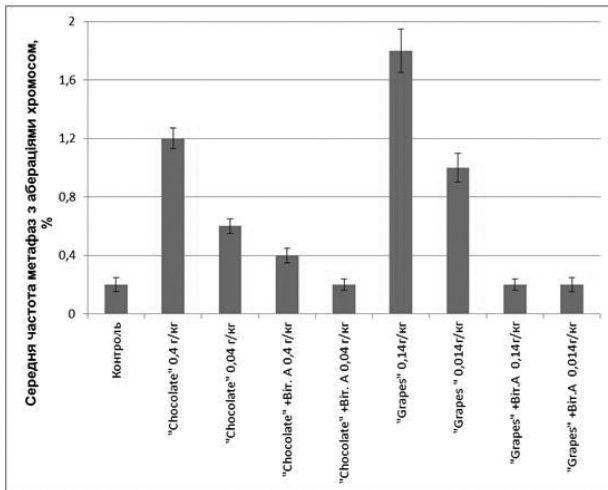


Рис. 2. Частота абертних метафаз у клітинах кісткового мозку *Mus musculus* при сумісному згодовуванні ароматизаторів «Chocolate 82100» та «Grapes 82085p» з вітамінами А і С

ти. Натомість, в гострому експерименті в основному зафіксовано утворення делеційних фрагментів та, рідше, транслокацій хромосом.

Для корекції мутагенних фонів нами використані відомі хіміопревертери з ряду вітамінів, а саме вітаміни А (доза 0,1 мг/кг) і С (100 мг/кг). Вітамін С є найважливішим природним антиоксидантом; його роль пов'язана, насамперед, з перехопленням супероксиданіон-радикалу кисню в водному середовищі клітини [6, 7]. Сполуки групи вітаміну А розглядаються як важливі елементи антиокислювальної системи організму; вони є пастками активних форм кисню, мають антиоксидантну активність, взаємодіють з радикалами органічних молекул, мають активуючий вплив на процеси репарації ДНК [5, 8–10]. Результати наших досліджень показали, що при одночасному згодовуванні мишам ароматизатора та вітаміну А як хіміопревертера спостерігалося зниження абертних метафаз за дії ароматизаторів «Grapes 82085p» та «Chocolate 82100p» до рівня контролю ($0,20 \pm 0,19\%$), що свідчить про сильні антимутагенні властивості цього вітаміну. При дослідженні харчового ароматизатора «Grapes 82085p» в концентрації, що відповідає збільшеній у 10 разів добовій дозі (0,14 г/кг), в поєднанні з вітаміном С виявлено п'ять метафазних пластинок з абераціями хромосом на 500 метафаз ($1,00 \pm 0,44\%$). Рівень хромосомних аберацій, спричинених дією добової дози ароматизатора «Grapes 82085p» в поєднанні з хіміопревертерами, коливався від $1,00 \pm 0,44\%$ до $0,40 \pm 0,28\%$, що вдвічі нижче від даних, отриманих при дослідженні ароматизаторів без додаван-

ня вітамінів (рис. 2). Рівень хромосомних мутацій, спричинених дією ароматизатора «Chocolate 82100p» в поєднанні з хіміопревертерами, коливався від $0,40 \pm 0,28\%$ до $0,20 \pm 0,19\%$, що значно перевищує дані негативного контролю.

Висновки

Як при використанні рослинного тест-об'єкта *Allium cepa*, так і при експериментах на мишах *Mus musculus* нами виявлено індукування хромосомних аберацій у проліферативних клітинах для дози, яка перевищувала в 10 разів технологічно рекомендовану добову, при вивченні всіх ароматизаторів, і для дози, яка відповідала рекомендованій добовій, при дослідженні ароматизаторів «Chocolate 82100p», «Grapes 82085p», «Aromat 22062p», «Rafaelo 82129p». Найвищі показники мутагенності зафіксовані для ароматизатора «Rafaelo 82129p». До складу цього ароматизатора входять такі хімічні сполуки, як пропіленгліколь, ванілін і гамаокталактон, проте кількісну характеристику складових виробник не розголошує, тим більше, немає даних щодо вивчення суміші цих ксенобіотиків на мутагенність. Виходячи з аналізу літературних даних, мутагенність ароматизатора «Rafaelo 82129p» більшою мірою може залежати від ваніліну. За одночасного згодовування мишам ароматизаторів та хіміопревертерів (вітамінів А та С) виявлено зниження мутагенної активності за дії дози ароматизатора, що відповідає рекомендованій добовій, – до рівня контролю, за дії дози ароматизатора, збільшеної в 10 разів від рекомендованої, – в межах 40–50%.

ЛІТЕРАТУРА

1. Булдаков А.С. Пищевые добавки. Справочник. – Санкт-Петербург, 1996. – 240 с.
2. Скурихин И.М., Нечаев А.П. Все о пище с точки зрения химика: Справочное изд. – М.: Высшая школа, 1991. – 288 с.
3. Верголяс М.Р., Луценко Т.В., Гончарук В.В. Цитотоксичний вплив хлорфенолів на клітини кореневої меристеми насіння цибулі батуну (*Allium fistulosum* L.) // Цитологія і генетика. – 2013. – 47, № 1. – С. 44–49.
4. 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.
5. Петрова О.А., Липатов Г.Я., Адриановский В.И., Береснева О.Ю. Результаты оценки антимутагенных свойств различных антиоксидантов // Современные наукоемкие технологии. – 2005. – № 8. – С. 91–92.
6. Дворник А.С., Перерва Т.П., Кунах В.А. Антимутагенез як система захисту організму від ушкоджуючих факторів ендогенного та екзогенного походження // Цитологія і генетика. – 2004. – 38, № 5. – С. 62–71.
7. Дурнев А.Д., Середенин С.Б. Мутагены (скрининг и фармакологическая профилактика воздействий). – М.: Медицина, 1998. – 328 с.
8. Дурнев А.Д. Мутагены и антимутагены в продуктах питания // Генетика. – 1997. – 33. – С. 165–176.
9. Никитина Л.П., Соловьева Н.В. Клиническая витаминология. – Чита: ИИЦ ЧГМА, 2002. – 66 с.
10. Стрижельчик Н.Г., Барияк И.Р. Мутагенные и антимутагенные свойства пищевых добавок. – Харьков: ХНУ имени Каравина, 2009. – 152 с.

BODNAR I.V.¹, ZUBKO O.S.², SHCHERBAKOVA O.V.¹, GORBULINSKA S.M.¹, BODNAR L.S.¹

¹ Ivan Franko National University of Lviv,

Ukraine, 79005, Lviv, Hrushevskogo str., 4, e-mail: bodivas@gmail.com

² Medved's Institute of Ecohygiene and Toxicology,

Ukraine, 03680, Kyiv, Heroiv oborony str., 6

DETECTION OF CHANGES IN CHROMOSOMAL LEVEL IN EUKARYOTIC ORGANISMS UNDER THE INFLUENCE OF FOOD SYNTHETIC FLAVORS AND CORRECTING THEM WITH VITAMIN CHEMIOPROTECTORS

Aim. To identify changes of chromosomal level in eukaryotic organisms with the influence of synthetic flavors and possible correction of these changes with the influence of vitamin chemical preventors. **Methods.** Ana-telophase analysis on root meristem cells of onion *Allium cepa* L. and metaphase analysis on bone marrow cells of white mice *Mus musculus* L. in chronic and acute experiment. **Results.** We have shown the induction of chromosome aberrations in metaphase bone marrow cells of white mice *Mus musculus* L. and root meristem cells of onion *Allium cepa* L. by newsynthesized food flavorings «Grapes 82085p», «Petit Beurre 02974», «Chocolate 82100p», «Rafaelo 82129p», «Aromat 22062». The highest mutagen effect was identified for «Rafaelo 82129p» flavor. For correction of mutagenic background we have used the vitamin chemical preventors (vit. A and C) which reduced or removed to spontaneous levels of induction of chromosomal aberration in *Mus musculus* L. **Conclusions.** We have identified the induction of chromosomal aberrations in proliferative cells of plant object *Allium cepa* and animal cells of *Mus musculus* with the influence of different doses of flavors. Simultaneous feeding of mice by flavorings and vitamins A and C showed a reduction in mutagenic activity for doses of flavor that corresponds to the recommended daily – to the level of control, for dose, increased in 10 times of the recommended – in the range of 40–50%.

Keywords: chromosome aberrations, food flavorings, mutagenic activity, antimutagens.