

DOI: <https://doi.org/10.17816/ecogen117502>

Научная статья

Оценка генотоксического действия коммерческого образца тартразина с применением системы метаболической активации в культуре лимфоцитов человека в условиях цитокинетического блока



Т.А. Никитина, М.А. Коняшкина, Ф.И. Ингель, Л.В. Ахальцева

Центр стратегического планирования и управления медико-биологическими рисками здоровью, Москва, Россия

Расширение спектра применения пищевых добавок и, в частности, пищевых красителей, повышает риск увеличения экспозиции человека к генотоксикантам, поскольку в реальной жизни в контакте с человеком находятся не чистые вещества с доказанной генетической безопасностью, а сложные смеси неизвестного состава, даже незначительные примеси в которых могут стать дополнительным источником либо модификатором эффектов нестабильности генома. Особую тревогу в этом аспекте вызывают синтетические пищевые красители азо- и diazosоединения, которые могут быть трансформированы микрофлорой кишечника человека с образованием генотоксикантов.

Цель работы — оценка генотоксических эффектов 0–2 мг/мл пищевого красителя «Тартразин» (E102), приобретенного в розничной сети, в микроядерном тесте на клетках крови человека, культивированных в условиях цитокинетического блока параллельно в присутствии системы метаболической активации S9 гепатоцитов крыс и без нее.

Генотоксические эффекты обнаружены в культурах без метаболической активации при действии 0,0000256–0,00064 мг/мл и 0,4 мг/мл тартразина, а в присутствии S9 — при 0,0000256, 0,000128 мг/мл и 0,16 мг/мл тартразина. Впервые выявлена дозозависимая супрессия митотической и пролиферативной активности лимфоцитов, а также дозозависимая U-образная кривая изменения частоты апоптоза. Полученные данные свидетельствуют о генотоксической активности изученного образца. Обсуждается необходимость системы оценки генотоксичности реальных смесей пищевых красителей, приобретенных в торговой сети.

Ключевые слова: пищевой краситель E102 тартразин; первичная культура крови человека; цитомный анализ; микроядерный тест; пролиферация; апоптоз.

Как цитировать:

Никитина Т.А., Коняшкина М.А., Ингель Ф.И., Ахальцева Л.В. Оценка генотоксического действия коммерческого образца тартразина с применением системы метаболической активации в культуре лимфоцитов человека в условиях цитокинетического блока // Экологическая генетика. 2023. Т. 21. № 1. С. 41–51. DOI: <https://doi.org/10.17816/ecogen117502>

DOI: <https://doi.org/10.17816/ecogen117502>

Research Article

Evaluation of the genotoxic effect of tartrazine using a metabolic activation system in human lymphocyte culture under cytokinetic block conditions

Tatyana A. Nikitina, Mariya A. Konyashkina, Faina I. Ingel, Lyudmila V. Akhaltseva

Centre for Strategic Planning and Management of Biomedical Health Risks, Moscow, Russia

The expansion of the spectrum of use of food additives and, in particular, food dyes (FD), increases the risk of increasing human exposure to genotoxicants. Since in real life, not pure substances with proven genetic safety are in contact with a person, but complex mixtures of unknown composition, even minor impurities in which can become an additional source or modifier of genome instability effects. Of particular concern in this aspect are synthetic FD azo and diazo compounds which can be transformed by human intestinal microflora to some forms of genotoxicants. The purpose of the work is to evaluate the genotoxic effects of 0–2 mg/mL of Tartrazine FD (E102) purchased in a retail network in a micronucleus test on human blood cells cultured under cytokinetic block conditions in parallel in presence and without rat S9 hepatocyte metabolic activation system.

Genotoxic effects were found in cultures without metabolic activation at 0.0000256–0,00064 mg/mL and 0.4 mg/mL of tartrazine, and in the presence of S9 — at 0.0000256 mg/mL, 0,000128 mg/mL and 0.16 mg/mL of tartrazine. For the first time, a dose-dependent suppression of mitotic and proliferative activity of lymphocytes induced by the tested tartrazine sample was revealed, as well as a dose-dependent U-shaped curve in the frequency of apoptosis. The data obtained indicate the presence of genotoxic activity of the studied sample.

We discuss the necessity to create the system for evaluation the genotoxic safety of FD real mixtures from a retail network.

Keywords: food coloring E102 tartrazine; primary culture of human blood; cytomic analysis; micronuclear test; proliferation; apoptosis.

To cite this article:

Nikitina TA, Konyashkina MA, Ingel FI, Akhaltseva LV. Evaluation of the genotoxic effect of tartrazine using a metabolic activation system in human lymphocyte culture under cytokinetic block conditions. *Ecological genetics*. 2023;21(1):41–51. DOI: <https://doi.org/10.17816/ecogen117502>

Received: 13.12.2022

Accepted: 09.03.2023

Published: 31.03.2023

ВВЕДЕНИЕ

В настоящее время активное использование пищевых красителей (ПК) при производстве продуктов питания — актуальная и обсуждаемая во всем мире проблема. Использование синтетических ПК, в разное время разрешенных к применению, не снимает с повестки дня вопрос об их генетической безопасности. В мире, как и в Российской Федерации (РФ), такие исследования проводятся с 60-х годов прошлого века на разных тест-объектах, тем не менее до сих пор нет единой системы оценки потенциального генотоксического эффекта реально используемых красителей.

Собственный анализ более 300 публикаций, имеющих в открытом доступе, и 7 международных баз данных продемонстрировал наличие для всех синтетических ПК, разрешенных к применению в РФ и в мире, как положительных, так и отрицательных результатов оценки генотоксических эффектов в большинстве из использованных стандартных тест-систем [1]. Среди всех типов ПК особое внимание привлекает группа азокрасителей как наиболее широко используемых. Так, например, Красный очаровательный E129, Тартразин E102 и Желтый солнечный закат E110 в США составляют до 90 % потребления всех ПК [2].

В исследованиях генотоксичности тартразина на культуре лимфоцитов человека эффект был выявлен в диапазоне концентраций 0,001–2,5 мг/мл [3–6], но отсутствовал в концентрациях 0,0036–1,44 мг/мл [7]. Кроме этого, имеется разрозненная информация о цитотоксичности тартразина в культуре лимфоцитов человека — его супрессии митотической активности лимфоцитов, а также снижении их выживаемости в культуре, определенной по окраске трипановым синим и фикоколл-тесту [3, 4, 6–8].

Противоречивые данные о генотоксической активности тартразина поднимают вопрос о безопасности применения E102 в качестве ПК.

В связи с этим *цель настоящей работы* состоит в анализе генотоксических эффектов синтетического ПК тартразина (E102), разрешенного к применению в РФ и приобретенного в розничной сети (поскольку к реальному потребителю попадают сложные смеси неизвестного состава, а качественные различия в описанных генотоксических эффектах могут быть связаны с наличием примесей). Инструментом для достижения этой цели выбрана первичная культура цельной крови человека *ex vivo* [10–14], в которой клетки культивированы в условиях цитокинетического блока параллельно в присутствии системы метаболической активации S9 гепатоцитов крыс и без нее.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Образец тартразина, использованный в работе, произведен на заводе Roha Dyecem PVT. LTD (Индия) в 2019 г. со сроком годности до 2024 г. Краситель соответствует Техническому регламенту Евразийского экономического союза (табл. 1) — анализ произведен в заводской лаборатории по заказу дистрибьютера — ООО «Роха Дайкем».

Генотоксическую активность тартразина изучали в культуре лимфоцитов человека в концентрациях 0–2 мг/мл с использованием системы метаболической активации S9 гепатоцитов крыс и без нее. При выборе диапазона концентраций тартразина руководствовались диапазоном доз для нетоксичных веществ в токсикологических экспериментах на животных [14].

Таблица 1. Сертификат анализа о соответствии красителя Техническому регламенту Евразийского экономического союза

Table 1. Certificate of analysis on the compliance of the dye with the Technical Regulations of the Eurasian Economic Union

| Компонент продукта | Тартразин E102, серия 1007284496-100728554 |
|--|---|
| Содержание красящих веществ, % | 88,370 |
| Вещества, не растворимые в воде, % | 0,048 |
| Вспомогательные красящие вещества, % | <1,00 |
| Экстрагируемые эфиром вещества, % | <0,200 |
| Органические компоненты, исключая окрашивающие вещества, %: | |
| • 4-гидразинобензол сульфоновая кислота; | |
| • 4-аминобензол-1-сульфоновая кислота; | |
| • 5-окси-1-(4-сульфобензил)-2-пиразолин-3-карбоновая кислота; | <0,500 |
| • 4,4'-диазоаминоди(бензольная сульфоновая кислота); | |
| • тетрагидроксисукциновая кислота | |
| Несульфированные основные ароматические амины (в расчетах анилин), % | <0,010 |
| Свинец (Pb), мг/кг | <2,00 |
| Мышьяк (As), мг/кг | <1,00 |
| Ртуть (Hg), мг/кг | <1,00 |
| Кадмий (Cd), мг/кг | <1,00 |

Постановка эксперимента

Венозную кровь здорового молодого некурящего донора отбирали в специализированной клинике после подписания информированного согласия на участие в работе. 400 мкл цельной крови культивировали в 3,6 мл среды F10, содержащей 20 % инактивированной сыворотки крови крупного рогатого скота и 7,5 мкл/мл фитогемагглютинаина (ПанЭко, РФ) при 37 °C в течение 72 ч. На 24-м часу в культуры вводили водные растворы тартразина, доводя общий объем культуры стерильной дистиллированной водой. Цитохалазин В (ПанЭко, РФ) до конечной концентрации 6 мкг/мл вводили в культуру на 44-м часу. В параллельные для каждой концентрации культуры на 48-м часу эксперимента вводили 200 мкл фракции S9 печени крыс Wistar с коферментами [15]. Через 3 ч инкубации при 37 °C клетки дважды стерильно отмывали от S9 средой F10, которую после этого заменяли на свежую, содержащую тартразин, фитогемагглютинин (ФГА), цитохалазин В, и культивирование при 37 °C продолжали еще 21 ч.

В качестве контроля использовали дистиллированную воду.

Клетки фиксировали с использованием предварительной гипотонии [12], раскапывали на замороженные предметные стекла, высушивали на воздухе и окрашивали азур-эозином по Романовскому.

Цитомный анализ шифрованных препаратов проводили с использованием расширенного протокола регистрируемых показателей [16]. На каждом стекле при подсчете 500 клеток определяли спектр клеточных популяций ядерных клеток, а также митотическую активность и частоту клеток в состоянии апоптоза. В протоколе отмечали количество клеток с 1–4 ядрами и более, а также клетки с микроядрами, нуклеоплазменными мостами (НПМ) и ядерными протрузиями в них. Частоту двухъядерных клеток с микроядрами и другими повреждениями оценивали при подсчете 1000 клеток.

Для анализа выбирали только те поля зрения, на которых все клетки лежали отдельно, учитывая только клетки с четкой цитоплазмой, причем такие, в которых можно было подсчитать количество ядер и определить другие ядерные аномалии. Поля зрения, не соответствующие этим критериям, пропускали [12].

Статистический анализ результатов проводили в стандартном пакете программ Statistica 10.2 (Statsoft). Для сравнения эффектов с контролем и для парных сравнений использовали критерий χ^2 , а для сравнения эффектов культивирования в присутствии S9 и без нее применяли непараметрический критерий Манна – Уитни. Значимыми считали различия при $p \leq 0,05$.

РЕЗУЛЬТАТЫ

Уровни генотоксических эффектов цитогенетических показателей в культуре лимфоцитов человека приведены в табл. 2.

Как видно в табл. 2, в вариантах без метаболической активации возрастала доля двухъядерных клеток с микроядрами при экспозиции к 0,000256 и 0,00064 мг/мл тартразина. При действии тартразина в концентрациях 0,000256 и 0,4 мг/мл наблюдали повышение частоты двухъядерных клеток с ядерными протрузиями. При действии 0,00064 мг/мл отмечено значимое повышение над контролем частот двухъядерных клеток с НПМ и трехъядерных клеток с микроядрами.

Кроме того, в культурах без дополнительной метаболической активации, экспонированных к 0,4 мг/мл тартразина, значимо по сравнению с контролем возрастала доля ускоренно делящихся (клеток второго и последующих митозов: трехъядерных, четырехъядерных и полиядерных) клеток с протрузиями, а при экспозиции к 0,08 мг/мл — доля полиядерных клеток с микроядрами.

В параллельных культурах, содержащих S9, частота двухъядерных клеток с микроядрами значимо увеличивалась по сравнению со своим контролем при действии тартразина в концентрациях 0,000256, 0,00128 мг/мл и 0,16 мг/мл. При этом доля клеток с ядерными протрузиями по сравнению с контролем для этой серии эксперимента возрастала на тех же концентрациях. Интересно, что при экспозиции культуры к самой низкой из использованных концентрации тартразина (0,000256 мг/мл) значимо увеличивалась над контролем частота двухъядерных клеток с НПМ. В то же время в ускоренно делящихся клетках изменения уровней повреждений относительно контроля не выявлены.

При сравнении цитогенетических эффектов по всем концентрациям тартразина в присутствии S9 и без нее (сравнение проводили по 6 концентрациям, так как на двух высоких концентрациях при добавлении S9 наблюдалась массовая гибель клеток) не выявлено достоверных различий между частотами двухъядерных клеток с микроядрами, НПМ и ядерными протрузиями, а также двухъядерных и делящихся клеток со всеми повреждениями (рис. 1), что предполагает генотоксическое действие изученного образца тартразина и/или его метаболитов.

Цитомный анализ предоставляет возможность учета влияния изучаемого соединения на процессы пролиферации клеток в культуре. При экспозиции к высоким концентрациям тартразина (0,00064, 0,016, 0,08 и 0,4 мг/мл) наблюдали статистически значимое снижение доли двухъядерных клеток (1-й митоз) в спектре клеточных популяций по сравнению с собственным контролем, свидетельствующее о подавлении пролиферативной активности (рис. 2). Кроме того, достоверно снижалась доля четырехъядерных клеток при действии тартразина в концентрации 0,0032 мг/мл. Частоты трехъядерных (индикатор анеуплоидии) и полиядерных (среди них клетки с нечетным числом ядер — анеуплоидные) клеток значимо увеличивались при действии 0,08 мг/мл тартразина.

Таблица 2. Эффекты нестабильности генома в первичных культурах клеток цельной крови человека при воздействии тартразина без и в присутствии фракции S9 гепатоцитов крыс

Table 2. Effects of genome instability in primary human whole blood cell cultures, exposed to tartrazine under conditions without and in the presence of the S9 fraction of rat hepatocytes

| Концентрация, мг/мл | Цитогенетические показатели, % | | | | | | | | | | | | | | |
|-----------------------------|--------------------------------|---------------|----------------|------------------|---------------|------|------------------|---------------|-------|------------------|---------------|-------|--------------------|---------------|-------|
| | 1-ядерные клетки | | | 2-ядерные клетки | | | 3-ядерные клетки | | | 4-ядерные клетки | | | полиядерные клетки | | |
| | МЯ | ядерн. протр. | внутренний НПМ | МЯ | ядерн. протр. | НПМ | МЯ | ядерн. протр. | НПМ | МЯ | ядерн. протр. | НПМ | МЯ | ядерн. протр. | НПМ |
| Тартразин без применения S9 | | | | | | | | | | | | | | | |
| 0 | 0,4 | 0,81 | 0,4 | 0,6 | 0,5 | 0,3 | 19,23 | 0 | 15,38 | 17,95 | 2,56 | 43,59 | 42,86 | 0 | 71,43 |
| 0,0000256 | 0,83 | 0,1 | 0,41 | 2* | 2,4* | 1 | 9,38 | 12,50 | 18,75 | 33,33 | 4,17 | 20,83 | 25 | 25 | 25 |
| 0,000128 | 0,4 | 0 | 0 | 1,4 | 0,3 | 1 | 9,68 | 0 | 12,90 | 11,11 | 3,70 | 18,52 | 11,11 | 0 | 11,11 |
| 0,00064 | 0,35 | 0 | 0 | 2* | 0,5 | 1,8* | 100* | 12 | 24 | 11,43 | 2,86 | 22,86 | 22,22 | 0 | 11,11 |
| 0,0032 | 0,39 | 0 | 0 | 0,3 | 0,3 | 0,2 | 5,56 | 0 | 0 | 23,53 | 11,76 | 35,29 | 8,33 | 8,33 | 83,33 |
| 0,016 | 2,2 | 0,36 | 0 | 0,6 | 0,8 | 0,4 | 8,82 | 11,76 | 2,94 | 23,26 | 4,65 | 20,93 | 7,69 | 13,79 | 15,38 |
| 0,08 | 1,4 | 0,47 | 0 | 0,7 | 0,2 | 0 | 2,27 | 6,82 | 4,55 | 1,89 | 5,66 | 3,77 | 10,34 | 10,34 | 13,79 |
| 0,4 | 0 | 0 | 0,69 | 1,3 | 3* | 0,6 | 17,39 | 26,09* | 4,35 | 7,89 | 15,79* | 2,63 | 0 | 0 | 0 |
| 2 | 0,74 | 0 | 0 | 1,3 | 0,6 | 0,4 | 0 | 0 | 6,25 | 6,67 | 0 | 3,33 | 0 | 0 | 0 |
| Тартразин с применением S9 | | | | | | | | | | | | | | | |
| 0 | 0,28 | 1,4 | 0 | 0,8 | 0,6 | 0,9 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0,00 | 0 | 0 |
| 0,0000256 | 1,59 | 1,59 | 0 | 5,2* | 3,4* | 2,5* | 40 | 0 | 20 | 0 | 0 | 0 | 0,00 | 0 | 0 |
| 0,000128 | 1,11 | 1,77 | 0,22 | 4,4* | 2,9* | 1,1 | 0 | 0 | 20 | 0 | 0 | 0 | 0,00 | 0 | 0 |
| 0,00064 | 1,14 | 1,14 | 0 | 0,4 | 0,7 | 0,3 | 1,89 | 3,77 | 3,77 | 1,79 | 10,71 | 5,36 | 11,11 | 0 | 0 |
| 0,0032 | 1,33 | 0,27 | 0 | 0,4 | 0,1 | 0,1 | 11,11 | 11,11 | 11,11 | 20 | 13,33 | 20 | 28,57 | 0 | 14,29 |
| 0,016 | 0,46 | 0,46 | 0,23 | 7,2* | 3,2* | 1,4 | 14,29 | 0 | 14,29 | 50 | 0 | 50 | 0,00 | 0 | 0 |
| 0,08 | 0,55 | 0 | 0 | 0,5 | 0,7 | 0,3 | 16,67 | 16,67 | 50 | 22,22 | 11,11 | 44,44 | 100* | 0 | 0 |

*Различия с собственным контролем значимы при $p \leq 0,5$. *Примечание.* МЯ — микроядра; НПМ — нуклеоплазменный мост; ядерн. протр. — ядерные протрузии.

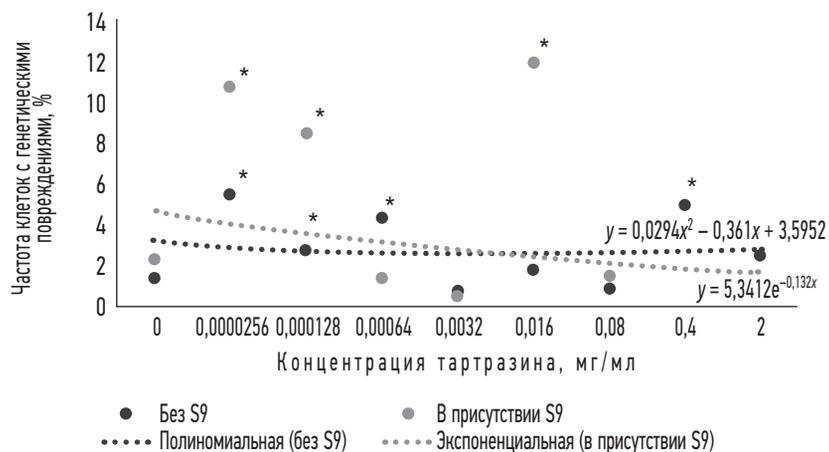


Рис. 1. Суммарный цитогенетический эффект тартразина без и в присутствии S9. *Различия с собственным контролем значимы ($\chi^2, p < 0,5$)
Fig. 1. Total cytogenetic effect of tartrazine without and in the presence of S9. *Differences with own control are significant ($\chi^2, p < 0,5$)

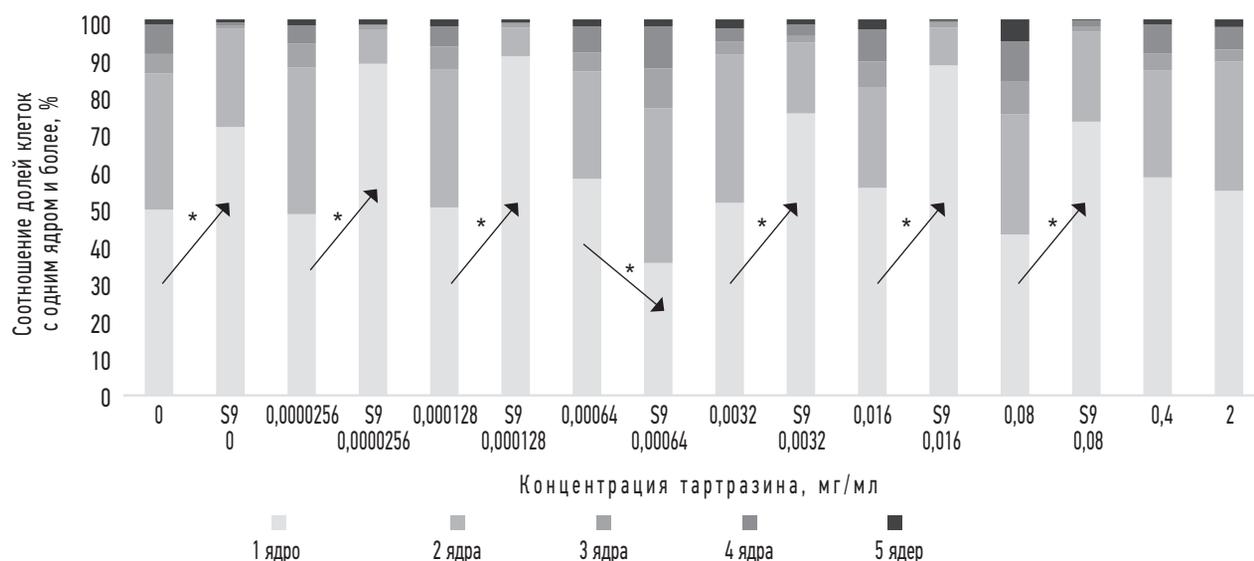


Рис. 2. Спектр клеточных популяций в культурах крови человека, экспонированных к тартразину без и в присутствии микросомальной фракции S9. *Различия между способами культивирования значимы по критерию χ^2

Fig. 2. Spectrum of cell populations in human blood cultures exposed to tartrazine without and in the presence of microsomal fraction S9. *Differences between cultivation methods are significant, the χ^2 criterion

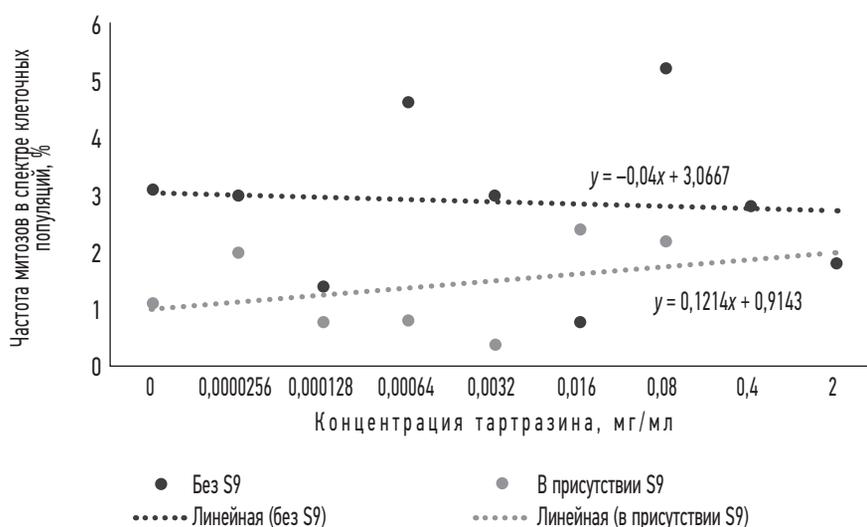


Рис. 3. Митотическая активность лимфоцитов в культурах крови человека при воздействии тартразина в присутствии S9 и без нее

Fig. 3. Mitotic activity of cells in human blood cultures, exposed to tartrazine in the presence and without of S9

В культурах, содержащих S9, выявлено снижение пролиферативной активности клеток по сравнению с действием только тартразина и собственным контролем в концентрациях 0,0000256, 0,000128 и 0,0032, 0,016 мг/мл. Дозовые кривые значительно различались как по доле двухъядерных ($p \leq 0,03$), трехъядерных ($p \leq 0,03$), четырехъядерных ($p \leq 0,03$) и полиядерных ($p \leq 0,01$), так и всех делящихся клеток ($p \leq 0,03$).

В культурах, содержащих S9, митотическая активность была ниже (рис. 3), чем в культурах без активации ($p \leq 0,04$), что сопровождалось подавлением второго и последующих митозов. Это видно по снижению доли трехъядерных клеток и более в спектре клеточных популяций (рис. 2) и, вероятнее всего, связано с активностью S9.

ОБСУЖДЕНИЕ ПОЛУЧЕННЫХ РЕЗУЛЬТАТОВ

Изучению генотоксической активности E102 на культуре клеток крови человека посвящено очень мало публикаций и практически все они процитированы в данной работе. Их анализ, прежде всего, показал, что в экспериментах *in vivo* исследования велись, преимущественно, в диапазоне высоких концентраций, сопоставимых с предельными уровнями воздействия [1]. Так, Z. Sekeroglu с соавт. [4] показали, что тартразин в концентрации 2,5 мг/мл повышал частоту двухъядерных клеток с микроядрами, а в концентрации 1,5 и 2,5 мг/мл — частоту хромосомных aberrаций. A. Haveric и соавт. [5] в том

же тесте наблюдали достоверное увеличение частоты клеток с НПМ при действии 5 и 10 ммоль тартразина (что соответствует 0,9 и 1,8 мг/мл). В работе V.S. Zhurkov и соавт. [17] частота aberrаций хромосом в культуре лимфоцитов человека при экспозиции к 0,001–1 мг/мл тартразина показывала динамику и уровни эффекта, близкие к результатам нашей работы.

Р. Mrountoukas и соавт. [7] эффекты тартразина в концентрациях 0,0036–1,44 мг/мл оценивали по частоте сестринских хроматидных обменов в культуре лимфоцитов человека — генотоксический эффект выявлен не был, но в концентрациях 0,7 и 1,44 мг/мл обнаружено статистически значимое снижение митотической активности. В двух других исследованиях, проводимых с использованием микросомальной фракции S9 печени крыс и человека и без них, тоже наблюдали снижение митотической активности под действием тартразина в концентрации 2,5 мг/мл, но только в отсутствие S9 [4, 8].

Таким образом, в доступной литературе удалось найти описание всего двух типов эффектов, представленных: а) кластогенными и, возможно, анеугенными механизмами возникновения повреждений ДНК, индуцированных тартразином *in vitro*, которые наблюдали, в основном, при экспозиции к высоким концентрациям; б) снижением митотической активности в культурах без дополнительной метаболической активации.

Результаты настоящего исследования качественно согласуются с данными, полученными ранее. Однако в отличие от исследования V.S. Zhurkov и соавт. [17] в нашей работе эффекты выявлены в концентрациях, значительно более низких, чем эффективные в других исследованиях, демонстрируя высокий генотоксический потенциал тартразина (или примесей, присутствующих в ПК, приобретенном в торговой сети). В присутствии S9 значимое превышение уровня собственного контроля в нашей работе выявлено в тех же концентрациях, в которых эти эффекты проявлялись без S9, но частота двухъядерных клеток с микроядрами — международного признанного маркера генотоксических эффектов — в присутствии S9 была достоверно выше, чем в культурах без S9 (результат получен путем парных сравнений). Этот феномен можно расценивать двояко:

- как доказательство того, что при метаболической активации тартразина и/или примесей, содержащихся в изученном образце, возникают новые генотоксические соединения, причем описанные различия проявились только в диапазоне низких концентраций, что позволяет предположить возможность истощения метаболизирующего потенциала S9 при контакте с высокими концентрациями тартразина и/или его примесей. Феномен истощения активности S9 может иметь значение для обоснования концентраций и условий экспозиции в экспериментах *in vitro*;

- снижение частоты двухъядерных клеток с микроядрами при действии высоких концентраций тартразина может быть связано с другими феноменами, в частности, с активацией апоптоза на высоких уровнях воздействия, либо с токсическими эффектами.

Важную информацию о генотоксической активности вещества дает анализ митотической и пролиферативной активности клеток в культуре. Используемый в нашей работе расширенный протокол цитомного анализа позволяет определять сдвиги в спектре клеточных популяций с учетом числа клеточных циклов, пройденных в культуре за время экспозиции к цитохалазину В [12], а также частоты клеток в состоянии митоза и апоптоза. Так, в цитируемых публикациях показано дозозависимое снижение митотической активности, а в нашей работе подобный эффект обнаружен не был ни в культурах, содержащих S9, ни в культурах без нее (рис. 3).

Анализ спектра клеточных популяций в культуре экспонированной к тартразину показал задержку 2-го митоза и более поздних на отдельных концентрациях как без, так и в присутствии S9 (снижение доли трех-, четырех- и полиядерных клеток). Кроме того, в присутствии S9 мы наблюдали четко выраженный феномен задержки 1-го митоза (более значительное уменьшение доли двухъядерных и увеличение доли одноядерных клеток, чем в культурах без активации) (рис. 1). Эти эффекты торможения пролиферации оказывают существенное влияние на возможность обнаружения генетических повреждений практически во всех цитогенетических методах, основанных на учете последствий повреждения ДНК в делящихся клетках.

В работе Y. Abd-Elhakim с соавт. [18] показано увеличение биохимических маркеров апоптоза, а также обнаружены гистологические изменения в печени и почках крыс, получавших 75 мг/кг (10-кратно превышенную допустимую суточную дозу) тартразина в течении 90 дней. В работе B. Raposa и соавт. [19] показано влияние тартразина в дозах 0,092–0,92 мг/мл на увеличение транскрипционных факторов и протеинкиназ в печени мышей, связанных с пролиферацией и апоптозом. В нашем исследовании в культурах без S9 наблюдалось U-образное изменение частоты клеток в состоянии апоптоза: высокий уровень на самой низкой исследуемой концентрации 0,0000256 мг/мл, достоверное уменьшение при экспозиции к тартразину в концентрациях ниже 0,08 мг/мл и увеличение доли таких клеток на максимальных концентрациях ПК. При этом в культурах с S9 наблюдалось отчетливое линейное снижение частоты апоптотических клеток в спектре клеточных популяций (рис. 4). Мы полагаем, что отличия собственных данных от обнаруженных в цитированных работах могут быть обусловлены (кроме наличия примесей в изученном образце ПК) разницей в концентрациях тартразина, использованных в исследованиях: высокими и очень высокими уровнями

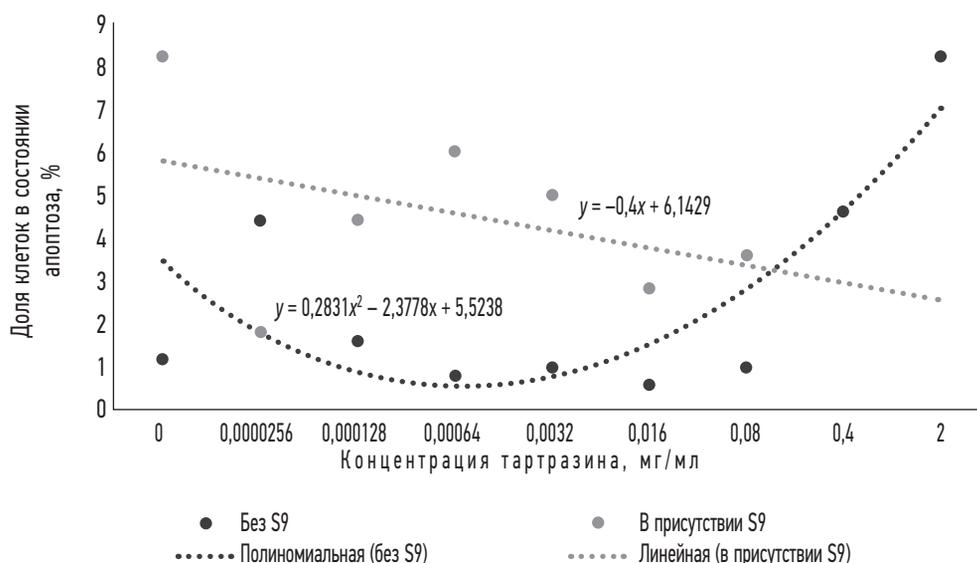


Рис. 4. Изменение уровня апоптоза под действием тартразина в присутствии S9 и без нее
Fig. 4. Changes in the level of apoptosis under the action of tartrazine in the presence of S9 and without it

воздействия в публикациях [18, 19] и широким диапазоном доз, начиная с 0,0000256 мг/мл (приблизительно одна трехсотая допустимой суточной дозы), в нашей работе.

Известно, что ингибирование апоптоза ведет к накоплению генетических повреждений, усиливая вероятность канцерогенеза. Потенциальную канцерогенность тартразина предположили В.М. Soares и соавт. [3], в эксперименте показав сохранение уровня генотоксических повреждений после окончания процессов репарации при экспозиции к 0,045 и 2,9 мг/мл тартразина. Еще в одном исследовании показан синергический эффект тартразина при совместном действии с канцерогеном диметилбензантраценом у крыс в дозах 0,005–0,2 мг/мл, оцениваемый морфологически по снижению уровня антиоксидантных ферментов и по уровню биомаркеров альфа-фетопротеина и ракового антигена CA15-3 [20].

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

В нашей работе изучено генотоксическое действие ПК тартразин (E 102) 88,37 % чистоты (по спецификации), приобретенного в розничной сети.

Результаты исследования выявили генотоксические эффекты на самых малых из исследуемых до настоящего времени концентрациях от 0,0000256 до 0,00064 мг/мл (частоты двухъядерных клеток с микроядрами, нуклеоплазменными мостами и ядерными протрузиями), которые можно отнести как к действию самого тартразина и/или его метаболитов, полученных при действии системы метаболической активации S9, так и примесей, содержащихся в изученном образце, и их метаболитов.

Важно понимать, что цель настоящей работы состояла в оценке генетической безопасности именно реальной

смеси неизвестного состава, присутствующего на рынке под общим названием «Пищевой краситель Тартразин», а не чистого вещества азокрасителя тартразина *per se* (вещества с чистотой 99,9 % — такие данные в литературе имеются). Поэтому настоящее исследование, подтвердившее и дополнившее ранее опубликованные результаты других исследований, свидетельствует не только о повышенном канцерогенном риске изученного коммерческого образца тартразина *in vitro*. Мы полагаем, что поскольку изученный образец тартразина был куплен в выбранном случайным образом месте продажи розничной сети, вероятность контакта конкретно этой смеси с человеком достаточно велика и определяется объемом поставки ПК в РФ (собственного производства ПК в стране нет). Поскольку в реальной жизни в контакт с человеком вступают именно сложные смеси ПК, не прошедшие стандартизованную оценку генетической безопасности вещества высокой степени чистоты (к сожалению, в настоящее время на законодательном уровне такая система в РФ пока не существует), проведенное исследование актуализирует разработку системы оценки генетической безопасности именно тех реальных смесей (существенно отличающихся по химическому составу от чистых веществ — см., например, табл. 1), которые имеются на рынке, а значит используются при приготовлении пищи не только различными пищевыми комбинатами, но и в домашних условиях.

Мы полагаем, что будущая система оценки генетической безопасности пищевых добавок должна строиться по правилам изучения сложной неидентифицированной смеси как единого соединения, как это принято в токсикологических исследованиях, и использовать стандартный, определенный международными рекомендациями, набор тестов.

ДОПОЛНИТЕЛЬНАЯ ИНФОРМАЦИЯ

Благодарности. За внимательный разбор статьи и ценные замечания коллектив авторов благодарит рецензентов журнала и кандидата медицинских наук ведущего научного сотрудника отдела профилактической токсикологии и медико-биологических исследований ФГБУ «ЦСП» ФМБА России В.В. Юрченко.

Вклад авторов. Все авторы внесли существенный вклад в разработку концепции, проведение исследования и подготовку статьи, прочли и одобрили финальную версию перед публикацией. Вклад каждого автора: Т.А. Никитина — проведение исследования, обработка данных, анализ полученных результатов, написание данных; М.А. Коняшкина — проведение исследования, обзор литературы, обработка результатов, анализ полученных данных, написание текста; Ф.И. Ингель — проведение исследования, концепция и дизайн исследования, написание текста, утверждение окончательного варианта статьи; Л.В. Ахальцева — подготовка и редактирование текста, утверждение окончательного варианта статьи.

Источник финансирования. Авторы заявляют об отсутствии внешнего финансирования при проведении исследования.

Конфликт интересов. Авторы декларируют отсутствие явных и потенциальных конфликтов интересов, связанных с публикацией настоящей статьи.

ADDITIONAL INFORMATION

Acknowledgments. For the careful analysis of the article and valuable comments, the team of authors thanks the reviewers of the journal and the candidate of Medical Sciences, the leading researcher of the Department of Preventive Toxicology and Biomedical Research of the Centre for Strategic Planning and Management of Biomedical Health Risks of the Federal Medical Biological Agency of Russia V.V. Yurchenko.

Author contribution. Thereby, all authors made a substantial contribution to the conception of the study, acquisition, analysis, interpretation of data for the work, drafting and revising the article, final approval of the version to be published and agree to be accountable for all aspects of the study. Contribution of each author: T.A. Nikitina — conducting research, data processing, analysis of the results obtained, writing data; M.A. Konyashkina — conducting research, literature review, processing results, analysis of the data obtained, writing text; F.I. Ingel — conducting research, concept and design of research, writing text, approval of the final version of the article; L.V. Akhaltseva — preparation and editing of the text, approval of the final version of the article.

Funding source. This study was not supported by any external sources of funding.

Competing interests. The authors declare that they have no competing interests.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Юрченко В.В., Ингель Ф.И., Ахальцева Л.В., и др. Безопасность синтетических пищевых красителей. Обзор литературы // Экологическая генетика. 2021. Т. 19, № 4. С. 323–341. DOI: 10.17816/ecogen79399
2. Kobylewski S., Jacobson M.F. Toxicology of food dyes // Int J Occup Environ Health. 2012. Vol. 18, No. 3. P. 220–246. DOI: 10.1179/1077352512Z.00000000034
3. Soares B.M., Araújo T.M., Ramos J.A., et al. Effects on DNA repair in human lymphocytes exposed to the food dye tartrazine yellow // Anticancer. 2015. Vol. 35, No. 3 P. 1465–1474.
4. Sekeroglu Z., Gunes B., Kontas Yedier S., et al. Effects of tartrazine on proliferation and genetic damage in human lymphocytes // Toxicol Mech Methods. 2017. Vol. 27, No. 5. P. 370–375. DOI: 10.1080/15376516.2017.1296051
5. Haveric A., Inajetovic D., Vareskic A., et al. *In vitro* analysis of tartrazine genotoxicity and cytotoxicity // Genetics & Applications. 2017. Vol. 1, No. 1. P. 37–43. DOI: 10.31383/ga.vol1iss1pp37-43
6. Floriano J.M., Rosa E., Amaral Q.D.F., et al. Is tartrazine really safe? *In silico* and *ex vivo* toxicological studies in human leukocytes: a question of dose // Toxicol Res (Camb). 2018. Vol. 7, No. 6. С. 1128–1134. DOI: 10.1039/c8tx00034d
7. Mpountoukas P., Pantazaki A., Kostareli E., et al. Cytogenetic evaluation and DNA interaction studies of the food colorants amaranth, erythrosine and tartrazine // Food Chem Toxicol. 2010. Vol. 48, No. 10. P. 2934–2944. DOI: 10.1016/j.fct.2010.07.030
8. Vaidya V.G., Godbole N.M. Mutagenicity study of four colours using human leucocyte and mouse micronucleus test systems. Proc. Int. Simp. Environ. Agents. Biological Effects. India, Huderabad: Osmaniyan Univ, 1978.
9. Gonzalez L., Sanderson B.J. S., Kirsch-Volders M. Adaptations of the *in vitro* MN assay for the genotoxicity assessment of nanomaterials // Mutagenesis. 2011. Vol. 26, No.1. P. 185–191. DOI: 10.1093/mutage/geq088
10. Fenech M., Chang W.P., Kirsch-Volders M., et al. HUMN project: detailed description of the scoring criteria for the cytokinesis-block micronucleus assay using isolated human lymphocyte cultures // Mutat Res. 2003. Vol. 534, No. 1–2. P. 65–75. DOI: 10.1016/s1383-5718(02)00249-8
11. Ингель Ф.И. Перспективы использования микроядерного теста на лимфоцитах крови человека, культивируемых в условиях цитокинетического блока. Часть 1. Факторы среды и индивидуальные особенности в системе оценки нестабильности генома человека // Экологическая генетика. 2006. Т. 4, № 3. С. 7–19. DOI: 10.17816/ecogen437-19
12. Ингель Ф. И., Юрченко В. В., Гуськов А. С., и др. Показатели пролиферативной активности и их связь с генетическими повреждениями лимфоцитов крови при культивировании в условиях цитокинетического блока // Вестник Российской академии медицинских наук. 2006. № 4. С. 41–45.
13. Fenech M. Cytokinesis-block micronucleus assay evolves into a «cytome» assay of chromosomal instability, mitotic dysfunction and cell death // Mutat Res. 2006. Vol. 600. No. 1–2. P. 58–66. DOI: 10.1016/j.mrfmmm.2006.05.028

14. Ахальцева Л.В., Юрченко В.В., Юрцева Н.А., Коняшкина М.А. Оценка генотоксичности пищевого красителя тартразина в микроядерном тесте *in vivo* // Гигиена и санитария. 2022. Т. 101, № 7. С. 798–801. DOI: 10.47470/0016-9900-2022-101-7-798-801
15. Еропкин М.Ю., Еропкина Е.М. Модель биотрансформации ксенобиотиков *in vitro*: действие фракции печени S9 на токсичность ряда противовирусных препаратов // Токсикологический вестник. 2008. № 5 С. 35–39.
16. Ингель Ф.И. Перспективы использования микроядерного теста на лимфоцитах крови человека, культивируемых в условиях цитокинетического блока. Часть 2. Факторы среды и индивидуальные особенности в системе оценки нестабильности генома человека // Экологическая генетика. 2006. Т. 4, № 4. С. 38–54. DOI: 10.17816/ecogen4438-54
17. Zhurkov V.S., Yakovenko K.N. The culture of human lymphocytes as a test subject for evaluation of mutagenic activity

- of chemicals // *Mutat Res.* 1976. Vol. 41, No. 1. P. 107–112. DOI: 10.1016/0027-5107(76)90080-4
18. Abd-Elhakim Y.M., Gihan G.M., Hashem M.M., et al. Influence of the long-term exposure to tartrazine and chlorophyll on the fibrogenic signalling pathway in liver and kidney of rats: the expression patterns of collagen 1- α , TGF β -1, fibronectin, and caspase-3 genes // *Environ Sci Pollut Res Int.* 2019. Vol. 26, No. 12. P. 12368–12378. DOI: 10.1007/s11356-019-04734-w
19. Raposa B., Pónusz R., Gerencsér G., et al. Food additives: Sodium benzoate, potassium sorbate, azorubine, and tartrazine modify the expression of NF κ B, GADD45 α , and MAPK8 genes // *Physiol Int.* 2016. Vol. 103, No. 3. P. 334–343. DOI: 10.1556/2060.103.2016.3.6
20. Zingue S., Mindang E.L.N., Awounfack F.C., et al. Oral administration of tartrazine (E102) accelerates the incidence and the development of 7,12-dimethylbenz(a) anthracene (DMBA)-induced breast cancer in rats // *BMC Complement Med Ther.* 2021. Vol. 21. P. 303. DOI: 10.1186/s12906-021-03490-0

REFERENCES

1. Yurchenko VV, Ingel FI, Akhaltseva LV, et al. Genotoxic safety of synthetic food colours. Review. *Ecological genetics.* 2021;19(4): 323–341. (In Russ.) DOI: 10.17816/ecogen79399
2. Kobylewski S, Jacobson MF. Toxicology of food dyes. *Int J Occup Environ Health.* 2012;18(3):220–246. DOI: 10.1179/1077352512Z.00000000034
3. Soares BM, Araújo TM, Ramos JA, et al. Effects on DNA repair in human lymphocytes exposed to the food dye tartrazine yellow. *Anticancer.* 2015;35(3):1465–1474.
4. Sekeroglu Z, Gunes B, Kontas Yedier S, et al. Effects of tartrazine on proliferation and genetic damage in human lymphocytes. *Toxicol Mech Methods.* 2017;27(5):370–375. DOI: 10.1080/15376516.2017.1296051
5. Haveric A, Inajetovic D, Vareskic A, et al. *In vitro* analysis of tartrazine genotoxicity and cytotoxicity. *Genetics & Applications.* 2017;1(1):37–43. DOI: 10.31383/ga.vol1iss1pp37-43
6. Floriano JM, Rosa E, Amaral QDF, et al. Is tartrazine really safe? *In silico* and *ex vivo* toxicological studies in human leukocytes: a question of dose. *Toxicol Res (Camb).* 2018;7(6):1128–1134. DOI: 10.1039/c8tx00034d
7. Mpountoukas P, Pantazaki A, Kostareli E, et al. Cytogenetic evaluation and DNA interaction studies of the food colorants amaranth, erythrosine and tartrazine. *Food Chem Toxicol.* 2010;48(10): 2934–2944. DOI: 10.1016/j.fct.2010.07.030
8. Vaidya VG, Godbole NM. *Mutagenicity study of four colours using human leucocyte and mouse micronucleus test systems.* Proc. Int. Simp. Environ. Agents. Biological Effects. India, Huderabad: Osmanian Univ, 1978.
9. Gonzalez L, Sanderson BJS, Kirsch-Volders M. Adaptations of the *in vitro* MN assay for the genotoxicity assessment of nanomaterials. *Mutagenesis.* 2011;26(1):185–191. DOI: 10.1093/mutage/geq088
10. Fenech M, Chang WP, Kirsch-Volders M, et al. HUMN project: detailed description of the scoring criteria for the cytokinesis-block micronucleus assay using isolated human lymphocyte cultures. *Mutat Res.* 2003;534(1–2):65–75. DOI: 10.1016/s1383-5718(02)00249-8
11. Ingel FI. Perspectives of micronuclear test in human lymphocytes cultivated in cytogenetic block conditions. Part 1: Cell proliferation. *Ecological Genetics.* 2006;4(3):7–19. (In Russ.) DOI: 10.17816/ecogen437-19
12. Ingel' FI, Yurchenko VV, Gus'kov AS, et al. Proliferative activity parameters and their correlation with genetic damage of blood lymphocytes during cultivation under the conditions of cytokinetic block. *Annals of the Russian Academy of Medical Sciences.* 2006;4:41–45. (In Russ.)
13. Fenech M. Cytokinesis-block micronucleus assay evolves into a “cytome” assay of chromosomal instability, mitotic dysfunction and cell death. *Mutat. Res.* 2006;600(1–2):58–66. DOI: 10.1016/j.mrfmmm.2006.05.028
14. Akhal'tseva LV, Yurchenko VV, Yurtseva NA, Konyashkina MA. Evaluation of the genotoxicity of the food dye tartrazine in a micronucleus test *in vivo*. *Hygiene and Sanitation.* 2022;101(7):798–801. (In Russ.) DOI: 10.47470/0016-9900-2022-101-7-798-801
15. Eropkin MY, Eropkina EM. Model of biotransformation of xenobiotics *in vitro*: effect of liver fraction S9 on toxicity of some of the viral preparations. *Toxicological Review.* 2008;5:35–39. (In Russ.)
16. Ingel FI. Environmental factors and individual features in system of evaluation of human genome instability. Part 2. Additional capability of the test the technique for cytogenetic analysis. *Ecological Genetics.* 2006;4(4):38–54. (In Russ.) DOI: 10.17816/ecogen4438-54
17. Zhurkov VS, Yakovenko KN. The culture of human lymphocytes as a test subject for evaluation of mutagenic activity of chemicals *Mutat. Res.* 1976;41(1):107–112. DOI: 10.1016/0027-5107(76)90080-4.
18. Abd-Elhakim YM, Gihan GM, Hashem MM, et al. Influence of the long-term exposure to tartrazine and chlorophyll on the fibrogenic signalling pathway in liver and kidney of rats: the expression patterns of collagen 1- α , TGF β -1, fibronectin, and caspase-3 genes. *Environ Sci Pollut Res Int.* 2019;26(12):12368–12378. DOI: 10.1007/s11356-019-04734-w
19. Raposa B, Pónusz R, Gerencsér G, et al. Food additives: Sodium benzoate, potassium sorbate, azorubine, and tartrazine modify the expression of NF κ B, GADD45 α , and MAPK8 genes. *Physiol Int.* 2016;103(3):334–343. DOI: 10.1556/2060.103.2016.3.6
20. Zingue S, Mindang ELN, Awounfack FC, et al. Oral administration of tartrazine (E102) accelerates the incidence and the development of 7,12-dimethylbenz(a) anthracene (DMBA)-induced breast cancer in rats. *BMC Complement Med Ther.* 2021;21:303. DOI: 10.1186/s12906-021-03490-0

ОБ АВТОРАХ

***Татьяна Александровна Никитина**, биолог, отдел профилактической токсикологии и медико-биологических исследований; адрес: Россия, 119121, Москва, ул. Погодинская, д. 10, стр. 1; ORCID: <https://orcid.org/0000-0003-0866-5990>; eLibrary SPIN: 9106-5076; e-mail: TNikitina@cspmz.ru

Мария Александровна Коняшкина, канд. биол. наук, научн. сотр., отдел профилактической токсикологии и медико-биологических исследований; ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-8319-1329>; Scopus Author ID: 8142882800; eLibrary SPIN: 7559-9045; e-mail: MKonyashkina@cspmz.ru

Фаина Исааковна Ингель, д-р биол. наук, вед. научн. сотр., отдел профилактической токсикологии и медико-биологических исследований; ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-2262-6800>; Scopus Author ID: 57205760994; eLibrary SPIN: 1013-7006; e-mail: FIngel@cspmz.ru

Людмила Вячеславовна Ахальцева, канд. биол. наук, ст. научн. сотр., отдел профилактической токсикологии и медико-биологических исследований; ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-3619-3858>; Scopus Author ID: 57138478700; eLibrary SPIN: 7049-0003; e-mail: LAhalceva@cspmz.ru

AUTHORS' INFO

***Tatyana A. Nikitina**, biologist, Department of Preventive Toxicology and Biomedical Research; address: 10/1 Pogodinskaya st., Moscow, 119121, Russia; ORCID: <https://orcid.org/0000-0003-0866-5990>; eLibrary SPIN: 9106-5076; e-mail: TNikitina@cspmz.ru

Mariya A. Konyashkina, Cand. Sci. (Med.), research associate of the Department of Preventive Toxicology and Biomedical Research; ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-8319-1329>; Scopus Author ID: 8142882800; eLibrary SPIN: 7559-9045; e-mail: MKonyashkina@cspmz.ru

Faina I. Ingel, Dr. Sci. (Biol.), leading research associate of the Department of Preventive Toxicology and Biomedical Research; ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-2262-6800>; Scopus Author ID: 57205760994; eLibrary SPIN: 1013-7006; e-mail: FIngel@cspmz.ru

Lyudmila V. Akhaltseva, Cand. Sci. (Biol.), senior research associate of the Department of Preventive Toxicology and Biomedical Research; ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-3619-3858>; Scopus Author ID: 57138478700; eLibrary SPIN: 7049-0003; e-mail: LAhalceva@cspmz.ru

* Автор, ответственный за переписку / Corresponding author