

УДК 575.224.4./6:578.083.5

БОДНАР І. В.¹, ЗУБКО О. С.², БОДНАР Л. С.¹

¹ Львівський національний університет імені Івана Франка,
Україна, 79005, м. Львів, вул. Грушевського, 4, e-mail: bodivas@gmail.com

² Інститут екогігієни і токсикології ім. Л.І. Медведя,
Україна, 03680, м. Київ, вул. Героїв оборони, 6

КОРЕКЦІЯ ВІТАМІННИМИ ХІМІОПРЕВЕНТЕРАМИ МУТАГЕННИХ ФОНІВ, СПРИЧИНЕНИХ ДІСЮ АРОМАТИЗАТОРІВ ПРОДУКТІВ ХАРЧУВАННЯ

Особливу групу харчових добавок становлять ароматизатори — речовини, що підсилюють смак і аромат. Їх умовно можна розділити на природні і речовини, що імітують природні: перші виділяють з фруктів, овочів і рослин у вигляді соків, есенцій або концентратів, другі отримують синтетичними і нетрадиційними шляхами. Хімічна природа останніх може бути дуже різною. Вони переважно складаються з великої кількості компонентів: ефірні олії, альдегіди, спирти, складні ефіри та ін. [1, 2].

Одним з доказових показників мутаційного процесу на клітинному рівні є виявлення хромосомних аберацій, підвищений рівень яких розглядається як хромосомна нестабільність, яка в подальшому може спричиняти розвиток злоякісних новоутворень [3]. З метою дослідження впливу ароматизаторів на геном соматичних клітин ссавців використовували метод метафазного аналізу аберацій хромосом у клітинах кісткового мозку мишей *Mus musculus* L. з допомогою рутинного забарвлення. Метод вивчення хромосом на стадії метафази є найбільш інформативним, оскільки дозволяє дослідити широкий спектр структурних і кількісних пошкоджень хромосом.

Одним з перспективних напрямків 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. 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 [4, 5]. Саме цей підхід був нами використаний для з'ясування

можливих змін щодо мутагенних активностей при одночасному згодовуванні мишам ароматизаторів та вітамінних хіміопревентерів.

Матеріали і методи

Досліджували 5 харчових ароматизаторів фірми «Etol» (Словенія): «Grapes 82085p» (до складу входять: етилацетат, 1-гексен-3-ол, ванілін, мальтодекстрин), «Chocolate 82100p» (диацетил, масляна кислота, дигідрокумарин, гамаокталактон, етилбутират), «Petit Beurre 02974» (ацетоїн, геліотропін, діацетил, масляна кислота), «Rafaelo 82129p» (пропіленгліколь, ванілін, гамаокталактон), «Aromat 22062» (природний ізоаміловий спирт, 1-гексенол, нерол, оксид ліналоолу, етилбутират, мальтол, етанол). Дослідні концентрації зразків вираховували таким чином: рекомендовану технологічну дозу, яка розрахована на 1 кг продукції, зменшували вдвічі, припускаючи, що за день людина може спожити не більше півкілограма готової продукції. Така концентрація нами названа добовою. Досліджували також дозу, збільшену в 10 разів від добової [1].

Дослідження проводили у декількох варіантах: в гострому та хронічному експерименті та при сумісній дії ароматизаторів з речовинами, що мають антимутагенні властивості (вітамінами). Речовини, що досліджували, вводили у вигляді розчину зондом внутрішньошлунково: у гострому експерименті — одноразово (експозиція — 24 години), у хронічному експерименті — протягом 10 діб з інтервалом 24 години.

Статистичну обробку даних виконували з використанням критерію Стьюдента *t*. Здійснювали кореляційний аналіз залежності мутагенного ефекту ароматизаторів від дози.

Результати та обговорення

Дію ароматизаторів на індукування хромосомних аберацій аналізували за результатами двох варіантів експерименту — хронічного та гострого. Перший етап — проводили аналіз розчинів харчових ароматизаторів і викликали появу хромосомних аберацій у клітинах кісткового мозку *M. musculus* шляхом проведення хронічного експерименту. Протягом 10 днів мишам згодували розчини зразків харчових ароматизаторів, що відповідали дозі, збільшеній в 10 разів від добової. Позитивним контролем служив циклофосфан у дозі 4 мг/кг маси тіла, при дії якого середня частота метафаз з абераціями хромосом становила $13,00 \pm 1,50\%$, що свідчить про адекватність даної тест-системи (табл. 1).

На наступному етапі досліджень проаналізували рівень хромосомних аберацій, індукованих ароматизаторами в гострому експерименті. Розчини вводили одноразово внутрішньочеревно в концентрації добової дози і/або дози, збільшеної в 10 разів від добової. Результати представлені в табл. 2. 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 серед 500 проаналізованих метафаз. Середня частота метафаз з абераціями складала $1,20 \pm 0,49\%$ (табл. 2). 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 $0,60 \pm 0,35\%$. У групі тварин, що піддавалися дії циклофосфану, відзначено статистично достовірне ($P \leq 0,001$) перевищення спонтанної частоти аберацій, що доводить адекватність використання даної тест-системи для оцінки мутагенних властивостей хімічних агентів. Середня частота метафаз за дії циклофосфану на мишей групи позитивного контролю з абераціями хромосом у клітинах кісткового мозку мишей складала $14,00 \pm 1,55\%$. В групі негативного контролю виявлено одну аберацію на 500 метафаз ($0,20 \pm 0,19\%$) (табл. 2). За дії харчового ароматизатора «Chocolate 82100р» всі аберації, що спостерігалися, були представлені одинарними фрагментами, які утворюються в результаті хроматидних делецій.

Таблиця 1

Частота хромосомних аберацій, індукованих харчовими ароматизаторами у хронічному експерименті на *Mus musculus*

Зразок	Доза, г/кг	Загальна кількість метафаз	Кількість аномальних метафаз	Частота метафаз з абераціями хромосом ($M \pm m$), %	t	P
«Grapes 82085р»	0,14	500	18	$3,60 \pm 0,83$	2,76	$\leq 0,05$
«Petit Beurre 02974»	0,28	500	22	$5,40 \pm 1,01$	3,99	$\leq 0,05$
«Rafaelo 82129р»	0,14	500	35	$7,00 \pm 1,14$	4,91	$\leq 0,05$
Позитивний контроль	4 мг/кг маси тіла	500	65	$13,00 \pm 1,50$	7,67	$\leq 0,002$
Негативний контроль		500	5	$1,00 \pm 0,44$		

Таблиця 2

Частота хромосомних аберацій, індукованих харчовими ароматизаторами в гострому експерименті на *Mus musculus*

Зразок	Досліджувана доза, г/кг	Загальна кількість метафаз	Кількість аномальних метафаз	Частота метафаз з абераціями хромосом ($M \pm m$), %	t	P
«Chocolate 82100р»	0,4	500	6	$1,20 \pm 0,49$	1,90	$\geq 0,05$
	0,04	500	3	$0,60 \pm 0,35$	1,00	$\geq 0,05$
«Grapes 82085р»	0,14	500	9	$1,80 \pm 0,59$	2,55	$\geq 0,05$
	0,014	500	5	$1,00 \pm 0,44$	1,64	$\geq 0,05$
«Rafaelo 82129р»	0,14	500	6	$1,20 \pm 0,49$	1,90	$\geq 0,05$
«Aromat 22062»	0,06	500	10	$2,00 \pm 0,63$	2,73	$\leq 0,05$
Позитивний контроль	40 мг/кг	500	70	$14,00 \pm 1,55$	8,82	$\leq 0,001$
Негативний контроль		500	1	$0,20 \pm 0,19$		

Таким чином, хронічний і гострий варіанти тесту на виявлення індукції хромосомних аберацій у *M. musculus* не виключають одне одного і є взаємодоповнюючими. В нашому експерименті з хронічним впливом вдалося виявити ширший діапазон аномалій, оскільки під час аналізу відзначено не тільки 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 метаболіти. Натомість, у гострому експерименті в основному зафіксовано утворення делеційних фрагментів, та рідше — транслокацій хромосом.

Для зниження або зняття мутагенної дії ароматизаторів використали відомі хіміопревентери з ряду вітамінів, а саме вітамін А (доза 0,1 мг/кг) і вітамін С (100 мг/кг), згодовуючи їх мишам з концентраціями ароматизаторів, що відповідають рекомендованій добовій дозі і дозі, збільшеній у 10 разів. Дози вітамінів підібрані на основі аналізу літературних даних [6]. Вітамін С є найважливішим природним антиоксидантом; його роль пов'язана, насамперед, з перехопленням супероксиданіон-радикалу кисню в водному середовищі клітини. В експериментах на мишах показано, що вітамін С в дозах від 1,56 до 200 і від 86 до 256 мг/кг знижував мутагенний ефект циклофосфаміду й інсектициду диметоату, що реєструвалися методом врахування мікроядер в еритроцитах, а в дозах 10, 20 і 40 мг/кг проявляв антикластогенний вплив щодо дії пестицидів [6]. Сполуки групи вітаміну А розглядаються як важливі елементи антиокислювальної системи організму; вони є пастками активних форм кисню, володіють антиоксидантною активністю, взаємодіють з радикалами органічних молекул, мають активуючий вплив на репарацію ДНК [7–9].

Результатами наших досліджень показано, що використання вітаміну А як хіміопревентера зумовлювало зниження аберантних метафаз за дії ароматизаторів «Grapes 82085р» та «Chocolate 82100р» до рівня контролю ($0,20 \pm 0,19\%$), що свідчить про сильні антимутагенні властивості цього вітаміну (рис.). При дослідженні харчового ароматизатора «Виноград» у 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

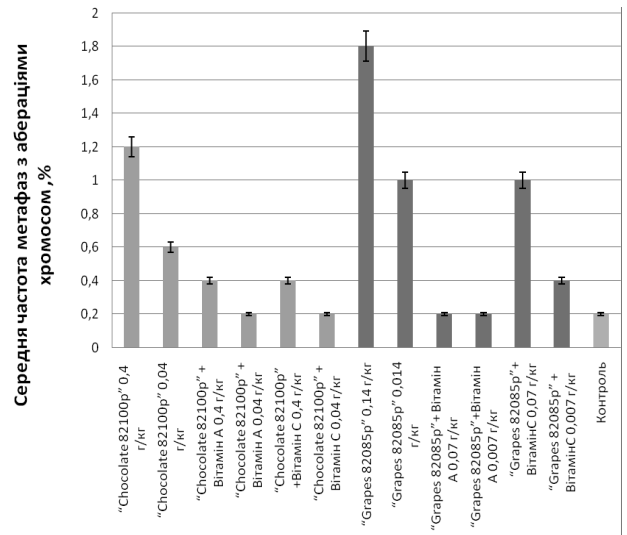


Рис. Частота аберантних метафаз у клітинах кісткового мозку *Mus musculus* при сумісному впливі ароматизаторів та вітамінів

500 метафаз ($1,00 \pm 0,44\%$). Рівень хромосомних аберацій, спричинених дією добової дози ароматизатора «Grapes 82085р» в поєднанні з хіміопревентерами, коливався від $1,00 \pm 0,44\%$ до $0,40 \pm 0,28\%$, що вдвічі нижче від даних, отриманих при дослідженні ароматизаторів без додавання вітамінів.

Висновки

Особлива небезпека використання органічних складових ароматизаторів як добавок до продуктів харчування полягає в тому, що в їх молекулах часто присутні алкільні радикали та кільцеві структури. Останні в ході метаболічних процесів можуть перетворюватися в аналоги азотистих основ, викликати збільшення кількості помилок за комплементарного злучення нуклеотидів. Такі передмутаційні зміни можуть призвести до виникнення мутацій типу заміни пар основ. Етилацетат, гамаокталактон, ацетоїн, геліотропін, диацетил, що входять до складу досліджуваних ароматизаторів, мають алкільні радикали, здатні зв'язуватися з певними ділянками макромолекул клітини (РНК, ДНК, білками). Ті алкільюючі агенти, які містять дві і більше функціональних груп у молекулі, можуть утворювати поперечні зв'язки з обома ланцюгами ДНК і спричинити їх розрив. Це пов'язано з депуринізацією пошкоджених нуклеотидів сусідніх ділянок двох ниток ДНК, з наступним одночасним виокремленням їх за допомогою ендонуклеаз. Під час «зшивання» двониткових розривів хромосом часто трапля-

ються помилки. Основні види порушень, що виникають при цьому, — делеції, транслокації та інверсії частин хромосом. Зміна кількості окремих хромосом або наборів хромосом у клітині може стати наслідком порушення процесу їх розподілу під час мітозу між двома дочірніми клітинами. В результаті утворюються клітини з більшим чи меншим набором хромосом або анеуплоїди. Серед складових ароматизаторів можуть бути такі, що здатні викликати поліплоїдію, зв'язуючись з мономерами тубуліну, блокуючи його полімеризацію і порушуючи утворення мітотичного веретена.

Забезпечення цілісності та стабільності спадкових структур має багаторівневий, системний та ієрархічний характер, який умовно можна розділити на три рівні: 1) специфічна антимутагенна система клітин — комплекс ферментів з антиоксидантною активністю (супероксидисмутаза, каталаза); кон'югуючі ферменти (глутатіонтрансферазна система); ендогенні антиоксиданти (токофероли, вітамін К, вітаміни А і С, каротиноїди, поліаміни, пуринові рибозиди); 2) репаративні системи, об'єктом яких є мутаційні ушкодження 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 та 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, що надходять ззовні. Разом з тим, за дії генотоксичних метаболітів ферментативна активність буде знижуватися. Саме тому внесення в організм додаткової кількості речовин, зокрема вітамінів, що є коферментами ензимів антиоксидантної та антимутагенної системи організму, дозволить забезпечити додатковий захист від екзогенних генотоксикантів. У цьому дослідженні отримано підтвердження такого припущення, оскільки одночасне згодовування мишам вітамінів А та С при введенні ароматизаторів продуктів харчування дозволило отримати суттєве зниження мутагенної активності останніх.

ЛІТЕРАТУРА

1. Булдаков А. С. Пищевые добавки. Справочник. — Санкт-Петербург: Ut, 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.) // Цитология и генетика. — 2013. — 47, № 1. — С. 44–49.
4. Дурнев А. Д. Мутагены и антимутагены в продуктах питания // Генетика. — 1997. — 33. — С. 165–176.
5. Никитина Л. П., Соловьева Н. В. Клиническая витаминология. — Чита: ИИЦ ЧГМА, 2002. — 66 с.
6. Дурнев А. Д., Середенин С. Б. Мутагены (скрининг и фармакологическая профилактика воздействий). — М.: Медицина, 1998. — 328 с.
7. Дворник А. С., Перерва Т. П., Кунах В. А. Антимутагенез як система захисту організму від ушкоджуючих факторів ендогенного та екзогенного походження // Цитология і генетика. — 2004. — 38, № 5. — С. 62–71.
8. 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.
9. Стрижельчик Н. Г., Бариляк И. Р. Мутагенные и антимутагенные свойства пищевых добавок. — Харьков: ХНУ имени Каразина, 2009. — 152 с.

BODNAR I.V.¹, ZUBKO O.S.², 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, Kiev, Heroiv Oborony str., 6

CORRECTION OF MUTAGEN LOAD CAUSED BY ACTION OF FOOD FLAVORS USING VITAMIN CHEMIOPREVENTERS

Aims. Food flavors — a natural or artificially-synthesized substances that enhance the flavor and aroma products, which include components with various chemical nature, which theoretically can produce mutagenic effects. Among the methods for detection of mutations on chromosomal level special place is occupied by test systems on animals. In the action of newsynthesized food flavors «Grapes 82085p», «Petit Beurre 02974», «Chocolate 82100p», «Rafaelo 82129p», «Aromat 22062» showed the induction of chromosome aberrations in metaphase bone marrow cells of white mice *Mus musculus* L. **Methods.** The study was conducted in several versions of experiments: in acute and chronic experiment and with combined action of flavors and substances with antimutagenic properties (vitamins). **Results.** The spectrum of chromosome aberrations was presented as chromosomal aberrations (deletions) and genomic mutations (aneuploidies and polipoyidies). **Conclusions.** 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.