

DOI: <https://doi.org/10.17816/humeco642804>

EDN: ODZVNZ



Генотоксические эффекты коммерческого образца пищевого красителя на основе понсо 4R в микроядерном тесте на культуре крови человека

Т.А. Никинина, М.А. Коняшкин, Ф.И. Ингель, Л.В. Ахальцева

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

АННОТАЦИЯ

Обоснование. Традиционно оценку генетической безопасности пищевых добавок проводят только с использованием веществ высокой степени чистоты. В Российской Федерации, согласно требованиям Технического регламента Таможенного союза, контроль генотоксичности разрешённых к применению пищевых красителей не предусмотрен. Регламент ограничивается определением содержания основного красящего вещества и отдельных компонентов состава. Однако такой подход является недостаточным, поскольку он не учитывает возможное присутствие токсичных и генотоксичных примесей в составе пищевых красителей.

Цель. Оценить генетическую безопасность пищевого красителя на основе понсо 4R (E124), поступившего в розничную торговлю, с использованием микроядерного теста на цельной крови человека, культивируемой в условиях цитокинетического блока, как в присутствии системы метаболической активации, так и без неё.

Материалы и методы. Краситель на основе понсо 4R приобретён в розничной торговой сети. Клетки здорового донора культивировали в условиях цитокинетического блока параллельно в присутствии системы метаболической активации S9 гепатоцитов крыс и без неё при воздействии красителя на клетки в диапазоне концентраций от 0 до 2 мг/мл. Цитомный анализ проводили по расширенному протоколу микроядерного теста. Для статистической обработки использовали критерии χ^2 и Манна–Уитни.

Результаты. Статистически значимое увеличение частоты клеток с генетическими повреждениями в культурах крови наблюдали по U-образному типу зависимости: без метаболической активации — при воздействии красителя в концентрациях 0,000 025 6, 0,000 64 и 0,4 мг/мл; в условиях метаболической активации — при концентрациях 0,000 025 6, 0,000 128 и 0,016 мг/мл. Кроме того, в присутствии фракции S9 также обнаружены увеличение частоты 3-ядерных клеток, стимуляция митотической активности и супрессия апоптоза.

Заключение. Генотоксические эффекты пищевого красителя на основе понсо 4R, приобретённого в розничной торговле, выявлены на уровне допустимой суточной дозы для человека и ниже. Представленный подход может стать основой для разработки системы оценки генетической безопасности пищевых красителей и добавок.

Ключевые слова: пищевой краситель на основе понсо 4R; E124; цельная кровь человека, культивируемая с цитохалазином В; первичная культура; S9 гепатоцитов крыс; цитомный анализ в микроядерном тесте; повреждения ДНК; пролиферация; апоптоз.

Как цитировать:

Никинина Т.А., Коняшкин М.А., Ингель Ф.И., Ахальцева Л.В. Генотоксические эффекты коммерческого образца пищевого красителя на основе понсо 4R в микроядерном тесте на культуре крови человека // Экология человека. 2024. Т. 31, № 12. С. 893–905. DOI: 10.17816/humeco642804 EDN: ODZVNZ

DOI: <https://doi.org/10.17816/humeco642804>

EDN: ODZVNZ

Genotoxic Effects of Commercial Sample of Ponceau 4R-Based Food Colorant in Micronucleus Assay on Human Whole Blood Culture

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

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

ABSTRACT

BACKGROUND: Genetic safety assessments of food additives have traditionally been conducted using highly purified substances. In the Russian Federation, according to the requirements of the Customs Union Technical Regulation, genotoxicity testing of approved food colorants is not mandatory. The regulation is limited to determining the content of the main colorant component and select constituents. However, this approach is insufficient, as it does not account for the possible presence of toxic and genotoxic impurities in food colorants.

AIM: To evaluate the genetic safety of a commercially available Ponceau 4R (E124)-based food colorant using the micronucleus assay on human whole blood culture with cytokinesis block, both in the presence and absence of a metabolic activation system.

METHODS: The Ponceau 4R-based colorant was purchased in a retail store. The cells from a healthy donor were cultured under cytokinesis-block conditions with and without S9 rat liver metabolic activation, exposed to the colorant at concentrations ranging from 0 to 2 mg/mL. Cytome assay was performed using an extended micronucleus assay protocol. Statistical analysis was conducted using the χ^2 test and the Mann–Whitney *U* test.

RESULTS: A statistically significant increase in the frequency of cells with genetic damage was observed, following a U-shaped dose–response pattern. Without metabolic activation, significant effects were found at concentrations of 0.0000256, 0.00064, and 0.4 mg/mL; with S9 activation, at concentrations of 0.0000256, 0.000128, and 0.016 mg/mL. In addition, in the presence of the S9 fraction, an increased frequency of trinucleated cells, stimulation of mitotic activity, and suppression of apoptosis were also observed.

CONCLUSION: Genotoxic effects of the Ponceau 4R-based food colorant obtained from the retail market were detected at or below the acceptable daily intake level for humans. The proposed approach may serve as a foundation for the development of a system for genetic safety assessment of food colorants and additives.

Keywords: Ponceau 4R-based food colorant; E124; human whole blood cultured with cytochalasin B; primary culture; rat liver S9 fraction; cytome assay in micronucleus test; DNA damage; proliferation; apoptosis.

To cite this article:

Nikitina TA, Konyashkina MA, Ingel FI, Akhaltseva LV. Genotoxic effects of commercial sample of ponceau 4R-based food colorant in micronucleus assay on human whole blood culture. *Ekologiya cheloveka (Human Ecology)*. 2024;31(12):895–907. DOI: 10.17816/humeco642804 EDN: ODZVNZ

Submitted: 11.12.2024

Accepted: 14.05.2025

Published online: 06.06.2025

DOI: <https://doi.org/10.17816/humeco642804>

EDN: ODZVNZ

基于庞索4R的商业食品色素在人全血培养微核试验中的遗传毒性效应

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

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

摘要

论证。传统上，食品添加剂的遗传安全性评估仅使用高纯度物质进行。在俄罗斯联邦，根据关税同盟技术法规的规定，现行制度并未规定对获准使用的食品色素进行遗传毒性控制。相关法规仅规定主要着色成分及部分组分的含量要求。然而，这种方法存在局限性，因其忽视了食品色素中可能存在的有毒或具有遗传毒性的杂质。

目的。采用在人全血中进行的、结合细胞有丝分裂阻断条件的微核试验，在有/无代谢激活系统的条件下，评估零售渠道获得的基于庞索4R (E124) 的食品色素的遗传安全性。

材料与amp;方法。所用基于庞索4R的食品色素购自零售渠道。在细胞有丝分裂阻断条件下，将健康供体的细胞分别在有或无大鼠肝脏S9代谢激活系统的情况下进行培养，并在0 - 2 mg/mL的浓度范围内暴露于该食品色素。细胞学分析依据扩展微核试验方案进行。统计处理采用 χ^2 检验与Mann - Whitney U检验。

结果。在血液培养中观察到带有遗传损伤的细胞频率呈“U”型依赖关系显著上升：在无代谢激活条件下，于0.0000256、0.00064和0.4 mg/mL浓度下出现显著增加；在代谢激活条件下，于0.0000256、0.000128和0.016 mg/mL浓度下出现显著增加。此外，在S9存在条件下还观察到三核细胞频率升高、有丝分裂活性增强以及细胞凋亡的抑制作用。

结论。零售渠道获得的庞索4R食品色素在接近或低于人类每日允许摄入量的水平下已表现出遗传毒性效应。所采用的方法可作为建立食品色素及添加剂遗传安全性评价体系的基础。

关键词：庞索4R食品色素；E124；加用细胞松弛素B的人全血培养；原代细胞培养；大鼠肝S9代谢激活系统；微核试验细胞学分析；DNA损伤；细胞增殖；细胞凋亡。

引用本文：

Nikitina TA, Konyashkina MA, Ingel FI, Akhaltseva LV. 基于庞索4R的商业食品色素在人全血培养微核试验中的遗传毒性效应. *Ekologiya cheloveka (Human Ecology)*. 2024;31(12):895-907. DOI: 10.17816/humeco642804 EDN: ODZVNZ

收到: 11.12.2024

接受: 14.05.2025

发布日期: 06.06.2025

ОБОСНОВАНИЕ

Понсо 4R — водорастворимый пищевой азокраситель (синонимы: пунцовый 4R, пищевой красный 7, кошенилевый красный, новый кокцин), зарегистрированный в качестве пищевой добавки E124. Обычно его синтезируют из ароматических углеводов. Разрешён к применению в большинстве стран Европейского союза и Российской Федерации (РФ), однако запрещён в Финляндии, Норвегии и Соединённых Штатах Америки (США) [1]. Понсо 4R используют для улучшения внешнего вида пищевых продуктов. Его добавляют в свежую и приготовленную рыбу, колбасные изделия, кондитерские изделия (включая печенье, варенье, мороженое, декоративные элементы тортов), мясные и фруктовые консервы, а также газированные напитки¹. Иногда понсо 4R комбинируют с иными красителями, заметно расширяя палитру для придания продуктам оранжевых, фиолетовых или даже зелёных оттенков.

В 1983 году Совместный комитет экспертов по пищевым добавкам Продовольственной и сельскохозяйственной Организации Объединённых Наций и Всемирной организации здравоохранения, а в 1984 году Научный комитет по пище при Европейской комиссии рекомендовали допустимую суточную дозу для понсо 4R, которая составила 4 мг/кг. Эта норма для человека действовала до 2009 года. Тем не менее в 1993 году К. Agarwal и соавт. [2], на основании анализа данных литературы и результатов собственных исследований, предложили исключить понсо 4R из списка разрешённых к применению пищевых красителей. Кроме того, в некоторых исследованиях установлена возможная связь между употреблением синтетических азокрасителей, включая понсо 4R, и развитием гиперактивного поведения детей [3, 4]. Впоследствии в Европейском союзе введено законодательное требование о маркировке пищевых продуктов, содержащих шесть синтетических красителей (татразин, хинолиновый жёлтый, жёлтый «солнечный закат», понсо 4R, красный очаровательный АС и кармуазин), потенциально способных вызывать гиперактивность. Такие продукты сопровождаются предупреждением о возможном негативном влиянии на внимание и поведение у детей². В 2009 году допустимую суточную дозу понсо 4R пересмотрели, её снизили до 0,7 мг/кг в связи с обеспокоенностью потенциальными неблагоприятными эффектами для здоровья [5].

Существует утверждённая стандартизированная

система (батарея тестов) краткосрочного тестирования мутагенных свойств веществ, включающая комплекс методов оценки генотоксичности *in vitro* и *in vivo*. Для исследований *in vitro* рекомендуемой считают комбинацию теста Эймса и микроядерного теста на культуре млекопитающих. Согласно литературным данным, 962 известных канцерогена и генотоксиканта продемонстрировали положительные результаты в этих тестах. Применение данной комбинации позволяет эффективно выявлять генные мутации, хромосомные повреждения и анеуплоидию [6].

Анализ существующих исследований генотоксичности красителя выявил противоречивые результаты [7]. Так, понсо 4R не обладал генотоксической активностью в концентрациях от 0,3 до 10 мг/чашку в тесте Эймса с использованием *Escherichia coli* и в тесте на индукцию конверсии генов у дрожжей [8–16]. В нашем исследовании в тесте Эймса понсо 4R также не проявил генотоксичности. Однако на культуре фибробластов китайского хомяка в концентрации 1 мг/мл он способствовал повышению плоидности и вызывал структурные aberrации хромосом [8]. В микроядерном тесте *in vivo* на костном мозге мышей генотоксическое действие красителя обнаружено в дозах, начиная с 4 мг/кг [2, 17, 18], тогда как в других исследованиях наблюдали отсутствие эффекта при дозах, начиная с 25 мг/кг [19, 20].

Тест ДНК-комет — один из самых используемых методов для оценки генотоксичности понсо 4R. Увеличение фрагментации ДНК обнаружено в нескольких органах мышей, начиная с дозы 10 мг/кг [21, 22], однако в других исследованиях зафиксировано отсутствие эффекта у трансгенных мышей при экспозиции в дозах от 250 мг/кг, а также у крыс от 10 мг/кг [22–24]. Указанные расхождения могут быть обусловлены цитотоксическими и токсическими свойствами красителя, а также особенностями его метаболизма в организме экспериментальных животных.

Микроядерный тест на культуре лимфоцитов крови человека с применением цитокинетического блока — один из наиболее информативных индикаторов эффектов нестабильности генома, поскольку позволяет учесть не только повреждения ДНК, но и связанные с ними изменения пролиферации и клеточной гибели [25, 26]. В открытой научной литературе мы нашли только одно исследование, в котором оценивали эффекты понсо 4R с использованием данного теста [27]. В работе зафиксировано дозозависимое увеличение частоты клеток с микроядрами при воздействии концентрации красителя 0,1–0,5 мг/мл. При этом минимальная применённая концентрация соответствовала содержанию, разрешённому к использованию в Индии, но приблизительно в 100 раз превышала пересмотренную в 2009 году допустимую суточную дозу для человека [5]. Важной особенностью большинства исследований, проводимых на культуре крови с использованием пищевых красителей, является отсутствие дополнительной метаболической активации, которая может

¹ Технический регламент Таможенного союза № 58 от 20 июля 2012 г. «Требования безопасности пищевых добавок, ароматизаторов и технологических вспомогательных средств». Евразийская экономическая комиссия. Режим доступа: https://eec.eaeunion.org/upload/medialibrary/90d/P_58.pdf Дата обращения: 12.11.2024.

² Regulation (EC) No. 1333/2008 of the European Parliament and the Council of 16 December 2008 “Food additives”. Official Journal of the European Union. L 354:16–33. Режим доступа: https://www.legislation.gov.uk/eur/2008/1333/contents?utm_source=chatgpt.com Дата обращения: 12.11.2024.

существенно модифицировать эффекты нестабильности генома. Следует добавить, что в собственных исследованиях в микроядерном тесте на мышах *in vivo* найден генотоксический эффект трёх образцов понсо 4R, приобретённых в сети розничной торговли, при пероральном введении в диапазоне доз 125–2000 мг/кг [18].

Доступные экспериментальные данные указывают на наличие генотоксической активности понсо 4R, проявляющейся как у химически чистого вещества, так и у образцов, приобретённых в розничной торговой сети или экстрагированных из пищевых продуктов, потенциально содержащих примеси. Генотоксические эффекты наблюдали при сравнительно высоких дозах: *in vitro* — начиная с концентрации 0,1 мг/мл, и *in vivo* — при введении от 4 мг/кг массы тела животных, что соответствует 0,004 мг/мл в условиях культуры клеток. Эти данные обуславливают необходимость дополнительного экспериментального подтверждения и оценки возможных рисков, связанных с использованием данного красителя в продуктах питания.

Цель

Оценить генетическую безопасность пищевого красителя на основе понсо 4R (E124), поступившего в розничную торговлю, с использованием микроядерного теста на цельной крови человека, культивируемой в условиях цитокинетического блока, как в присутствии системы метаболической активации, так и без неё.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Дизайн исследования

Проведено экспериментальное одноцентровое неослепленное контролируемое исследование.

Изучено действие пищевого красителя в широком диапазоне концентраций на клетках цельной крови человека, культивированных в условиях цитокинетического блока в присутствии или без системы метаболической активации гепатоцитов крыс S9, в соответствии с руководством [28].

Образец красителя на основе понсо 4R, использованный в работе, приобретён в розничной торговой сети г. Москвы. Краситель произведён на заводе Roha Dyechem PVT. LTD (Индия) в 2019 году со сроком годности до 2024 года. Российский дистрибьютер предоставил также Декларацию от 21.09.2018 (действительна в течение 3 лет) о соответствии красителя Техническому регламенту Евразийского экономического союза (табл. 1), выданную на основании результатов анализов, выполненных в независимой испытательной лаборатории по заказу дистрибьютера.

Условия проведения

Исследование проведено на базе ФГБУ «Центр стратегического планирования и управления медико-биологическими рисками здоровью» Федерального

медико-биологического агентства.

Описание эксперимента

Для оценки генотоксической активности пищевого красителя без и в присутствии системы метаболической активации S9 при выборе концентраций ориентировались на допустимые дозы, применяемые в токсикологических экспериментах на животных. В качестве положительного контроля использовали митомидин С (0,01 мкг/мл), а отрицательного контроля — дистиллированную воду.

Четыреста микролитров цельной крови (брали у одного из авторов исследования, подписавшего добровольное информированное согласие) помещали в 3,6 мл питательной среды F-10® («ПанЭко», РФ), дополненной 20% инактивированной сывороткой крови крупного рогатого скота («ПанЭко», РФ) и 7,5 мкл/мл фитогемагглютинаина («ПанЭко», РФ). Культивирование проводили при 37 °С в течение 72 часов. Спустя 24 часа после начала культивирования в культуру вводили водные растворы пищевого красителя, предварительно отфильтрованные через мембранный фильтр [регенерированная целлюлоза, 0,22 мкм, 47 мм, (GVS SpA, Италия)], балансируя её общий объём стерильной дистиллированной водой. Цитохалазин В («ПанЭко», РФ) до конечной концентрации 6 мкг/мл

Таблица 1. Сертификат анализа на соответствие красителя требованиям Техническому регламенту Евразийского экономического союза

Table 1. Certificate of analysis for compliance of the colorant with the Technical Regulations of the Eurasian Economic Union

Компонент продукта Product component	Понсо 4R, серия 1007284496-100728554 Ponceau 4R, batch 1007284496-100728554
Содержание красящих веществ, % Content of colorant substances, %	83,110
Вещества нерастворимые в воде, % Water-insoluble substances, %	0,042
Вспомогательные красящие вещества, % Auxiliary colorant substances, %	<1,00
Экстрагируемые эфиром вещества, % Ether-extractable substances, %	<0,200
Органические компоненты за исключением красящих веществ, % Organic components excluding colorant substances, %	<0,500
Несульфированные основные аромати- ческие амины (в расчётах анилин), % Non-sulfonated primary aromatic amines (calculated as aniline), %	<0,010
Свинец (Pb), мг/кг Lead (Pb), mg/kg	<2,00
Мышьяк (As), мг/кг Arsenic (As), mg/kg	<1,00
Ртуть (Hg), мг/кг Mercury (Hg), mg/kg	<1,00
Кадмий (Cd), мг/кг Cadmium (Cd), mg/kg	<1,00

вводили в культуру на 44 часу. При использовании системы метаболической активации на 48 часу в культуральную среду вводили 200 мкл фракции S9 из печени крыс Wistar с коферментами по прописи, используемой при постановке теста Эймса [29]. По завершению 3-часовой инкубации при 37 °С клетки во всех культурах отмывали стерильной средой F-10[®] («ПанЭко», РФ), которую затем заменяли на свежую, содержащую фитогемагглютинин, L-глутамин и цитохалазин В. Культивирование продолжали при 37 °С в течение последующих 21 часа.

Основной исход исследования

Оценка генетической безопасности красителя в экспериментальной модели на клетках цельной венозной крови человека, культивированных в условиях цитогенетического блока.

Методы регистрации исходов

Предварительно гипотонизированные клетки фиксировали [25], наносили на замороженные предметные стёкла и окрашивали азур-эозином по Романовскому. Цитомный анализ шифрованных препаратов выполняли по расширенному протоколу микроядерного теста в соответствии с методическими рекомендациями [25, 26], подсчитывая по 1000 2-ядерных клеток для оценки частоты микроядер и по 500 клеток — для определения спектра клеточных популяций.

Этическая экспертиза

Исследование проводили на донорской крови некурящих, молодых и здоровых участников эксперимента, которые подписали информированное согласие на участие в этой работе.

Проведение исследования одобрено этической комиссией по серии экспериментов по оценке генотоксических эффектов пищевых красителей № 04П-14.05.2021 от 14.05.2021.

Статистический анализ

Статистический анализ данных проводили в программе Statistica[®] 10.2 (Statsoft, Dell Inc., США). Для сравнения эффектов с контролем и между отдельными культурами, подвергавшимися воздействию одинаковых концентраций красителя, использовали критерий χ^2 . Сравнение дозовых зависимостей, полученных в условиях метаболической активации и без неё, проводили с использованием непараметрического U-критерия Манна–Уитни. Различия считали значимыми при $p \leq 0,05$.

РЕЗУЛЬТАТЫ

Уровни эффектов нестабильности генома в культуре лимфоцитов человека показаны в табл. 2.

Возможно чётко проследить, что генотоксические эффекты пищевого красителя в культурах

без и в присутствии системы метаболической активации S9 проявлялись качественно по-разному. Так, в условиях её отсутствия действие самых низких концентраций (0,000 025 6–0,000 64 мг/мл) сопровождалось дозозависимым снижением частоты 2-ядерных клеток с нуклеоплазменными мостиками (НПМ) и в одном случае — снижением частоты 4-ядерных клеток с микроядрами, что может свидетельствовать о гибели клеток с такими повреждениями. Повышение генотоксических эффектов красителя по сравнению с контролем обнаружено, начиная с концентрации пищевого красителя 0,0032 мг/мл, что выражалось в увеличении частоты 2- и 4-ядерных клеток с НПМ, а также 2-ядерных клеток с микроядрами и НПМ. При дальнейшем повышении концентрации красителя наблюдали признаки геномной нестабильности преимущественно в полиядерных клетках.

В условиях метаболической активации и при высоких концентрациях красителя (начиная с 0,08 мг/мл), фиксировали значительную гибель клеток, поэтому такие препараты не анализировали.

В культурах с дополнительной метаболической активацией (содержащих S9) по сравнению с соответствующим контролем наблюдали статистически значимое увеличение частоты 2-ядерных клеток с микроядрами при воздействии двух минимальных и одной максимальной из исследованных концентраций красителя (см. табл. 2). При этом частота 2-ядерных клеток с НПМ в условиях метаболической активации при всех использованных концентрациях статистически значимо не отличалась от контроля (см. табл. 2). Кроме того, частота 4-ядерных клеток с НПМ в культурах с метаболической активацией была статистически значимо ниже, чем без неё ($p < 0,001$). Статистически значимо более высокая частота клеток с генетическими повреждениями (микроядра + НПМ) отмечена в культурах без добавления фракции S9 по сравнению с экспозицией в условиях дополнительной метаболической активации во всех делящихся и ускоренно делящихся клетках ($p < 0,001$), начиная с концентрации красителя 0,000 64 мг/мл.

Процессы пролиферации при культивировании в условиях блока цитокинеза характеризуются распределением клеток с различным количеством ядер в спектре клеточных популяций (рис. 1). Влияние метаболической активации на продолжительность клеточного цикла проявляется в значительном увеличении доли 1- и 2-ядерных клеток, а также в снижении численности клеток, прошедших более одного цикла деления в присутствии цитохалазина В (см. рис. 1). Все полученные результаты свидетельствуют о том, что в условиях метаболической активации по сравнению с культурами без неё наблюдали торможение пролиферации клеток. Анализ спектра клеточных популяций в культурах без добавления фракции S9 (рис. 2, а) показал, что воздействие минимальных концентраций понсо 4R сопровождалось торможением пролиферации клеток, что подтверждено

Таблица 2. Эффекты нестабильности генома в первичных культурах клеток цельной крови человека при воздействии пищевого красителя с и без метаболической активации**Table 2.** Genomic instability effects in primary cultures of human whole blood cells exposed to the food colorant with and without metabolic activation

Концентрация пищевого красителя, мг/мл культуры Concentration of food colorant, mg/mL	Частота клеток с генетическими повреждениями, % Frequency of cells with genetic damage, %									
	Клетки, не прошедшие ни одного митотического цикла (неделяющиеся) Cells that did not undergo mitosis (non-dividing)		Прошли один митотический цикл Completed one mitotic cycle		Прошли два митотических цикла Completed two mitotic cycles				Прошли более двух митотических циклов Completed more than two mitotic cycles	
	1-ядерные клетки Mononucleated cells		2-ядерные клетки Binucleated cells		3-ядерные клетки Trinucleated cells		4-ядерные клетки Tetranucleated cells		Полиядерные клетки Multinucleated cells	
	МЯ MN	Кольцевое ядро Nuclear ring	МЯ MN	НПМ NPB	МЯ MN	НПМ NPB	МЯ MN	НПМ NPB	МЯ MN	НПМ NPB
<i>Без метаболической активации Without metabolic activation</i>										
Митомицин Mitomycin 0,000 01	0,4	—	1,8	0,8	18,5	3,7	3,6*	3,6*	33,3*	33,3
0	0,6	—	1,30	1,10	7,69	15,38	18,02	20,72	6,41	19,23
0,000 025 6	—	—	1,50	0,40*	26,67	13,33	10,00	28,89	6,67	13,33
0,000 128	—	—	0,90	0,30*	16,67	0,00	13,79	29,31	7,02	14,04
0,000 64	0,20	—	0,70	0,10*	3,13	6,25	5,74*	18,03	10,98	21,95
0,0032	—	—	1,70	3,40*	9,09	0,00	10,26	37,61*	13,73	23,53
0,016	—	—	1,40	0,4	0,00	3,45	22,76	20,00	16,13	46,77*
0,08	0,40	—	0,70	0,8	6,25	9,38	11,11	10,56	16,67	33,33
0,4	0,20	—	1,50	1,5	20,00	20,00	12,77	23,40	21,28*	51,06*
2,0	—	—	1,50	1,7	7,41	18,52	19,30	21,93	18,18	4,55
<i>В условиях метаболической активации With metabolic activation</i>										
0	0,40	—	0,90	0,8	0	5	—	—	—	—
0,000 025 6	—	0,4	2,10*	0,2	7,69	3,08	11,11	5,13	15,79	0,00
0,000 128	—	0,2	2,10*	0,5	6,90	8,62	7,44	14,88	9,38	9,38
0,000 64	0,4	—	1,8	0,4	6,76	5,41	3,25	5,69	7,50	5,00
0,0032	—	—	0,4*	—	10,87	2,17	0,69	5,52	7,32	2,44
0,016	—	0,2	2,5*	0,3	12,00	4,00	7,69	3,85	5,77	9,62
0,08 и выше	Токсический эффект Toxic effect									

Примечание. * — статистически значимые отличия от контроля, $p \leq 0,05$; МЯ — микроядра; НПМ — нуклеоплазменные мостики.

Note: *, statistically significant differences from control, $p \leq 0.05$; MN, micronuclei; NPB, nucleoplasmic bridges.

статистически значимым увеличением доли неделящихся 1-ядерных клеток ($p < 0,001$) и клеток, прошедших один митотический цикл (2-ядерных, $p < 0,001$) по сравнению с контролем. Одновременно отмечено уменьшение доли клеток, завершивших два и более цикла в присутствии цитохалазина В (многоядерные клетки с числом ядер ≥ 3). При повышении концентрации красителя до 0,08 мг/мл наблюдали ускорение пролиферации, сопровождающееся снижением доли неделящихся клеток и увеличением клеток, завершивших один и более циклов деления ($p < 0,001$) после введения цитохалазина В. Особого внимания заслуживает увеличение численности 3-ядерных

клеток, которое может свидетельствовать о возникновении анеуплоидии ($p < 0,001$). В условиях метаболической активации краситель в концентрациях выше 0,08 мг/мл тормозил процессы пролиферации, что можно трактовать как токсический эффект. Выявленное на высоких концентрациях красителя увеличение частоты полиядерных клеток с микроядрами и НПМ в сочетании с признаками торможения пролиферации позволяет предположить подавление репаративных процессов. Анализ спектра клеточных популяций в культурах, содержащих фракцию S9 и различные концентрации красителя (см. рис. 2, b), показал статистически значимое снижение доли

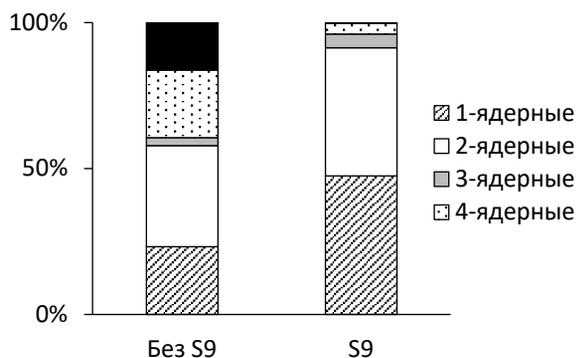


Рис. 1. Контрольные культуры: спектр клеток, прошедших разное количество циклов делений в присутствии цитохалазина В. S9 — система метаболической активации.

Fig. 1. Control cultures: spectrum of cells that completed varying numbers of division cycles in the presence of cytochalasin B. S9, metabolic activation system.

1- и 2-ядерных клеток по сравнению с контролем с фракцией S9 ($p < 0,02$). При этом для фракции 1-ядерных клеток выявлена чёткая U-образная зависимость от дозы: при низких концентрациях 0,000 025–0,000 64 мг/мл наблюдали ускорение пролиферации, а при более высоких — её угнетение. Кроме того, при воздействии концентраций красителя, не подавляющих пролиферацию, наблюдали статистически значимое увеличение доли ускоренно делящихся клеток (3-, 4- и полиядерных) по сравнению с контролем с добавлением фракции S9 ($p < 0,001$). Особое интерес представляет увеличение численности фракции анеуплоидных 3-ядерных клеток — феномена, возникающего не только *in vitro* и *ex vivo*, но и также при обследовании людей, подвергшихся воздействию генотоксикантов [26, 27].

В культурах без дополнительной метаболической активации при воздействии красителя в концентрациях 0,000 025 6 и 0,016 мг/мл частота апоптоза была статистически значимо выше по сравнению с контролем, тогда

как при обработке наиболее высокими концентрациями статистически значимых отличий не наблюдали (табл. 3). При отсутствии метаболической активации снижение митотической активности отмечено при концентрациях пищевого красителя 0,000 128, 0,0032, 0,4 и 2 мг/мл.

Введение фракции S9 в контрольную культуру приводило к значительному увеличению частоты апоптоза по сравнению со спонтанными эффектами, однако во всех культурах, содержащих пищевой краситель, её добавление вызывало снижение апоптоза. При этом митотическая активность в условиях метаболической активации была выше, чем в соответствующих культурах без фракции S9, за исключением контрольной.

Таким образом, в присутствии фракции S9 наблюдали одновременное усиление митотической активности и снижение частоты апоптоза на фоне индукции повреждений ДНК (см. табл. 2). Это создаёт условия для фиксации генетических нарушений в поколениях делящихся клеток и повышает риск их опухолевой трансформации.

ОБСУЖДЕНИЕ

В исследовании проведён цитомный анализ проявлений геномной нестабильности в лимфоцитах человека при *ex vivo* воздействии пищевого красителя в широком диапазоне концентраций. В задачи работы входило не только культивирование цельной венозной крови человека с воздействием красителя в широком диапазоне концентраций в условиях цитокинетического блока, но и оценка влияния дополнительной метаболической активации на индукцию генотоксических эффектов.

Получены три группы данных, демонстрирующих влияние пищевого красителя с учётом способа культивирования на:

- индукцию повреждений ДНК в разных популяциях делящихся клеток;

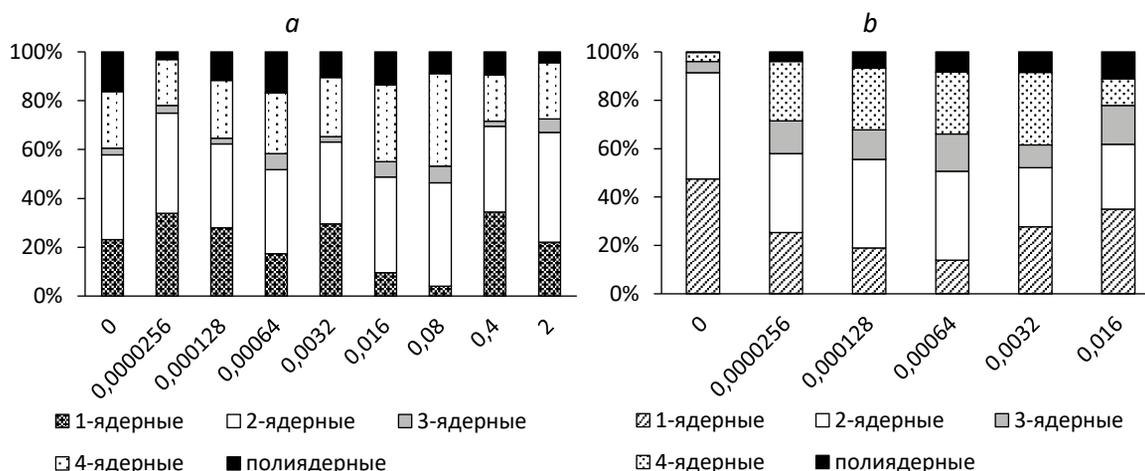


Рис. 2. Влияние пищевого красителя на пролиферацию клеток: а — воздействие только понсо 4R; б — воздействие понсо 4R в условиях метаболической активации.

Fig. 2. Effects of the food colorant on cell proliferation: a, exposure to Ponceau 4R only; b, exposure to Ponceau 4R under metabolic activation conditions.

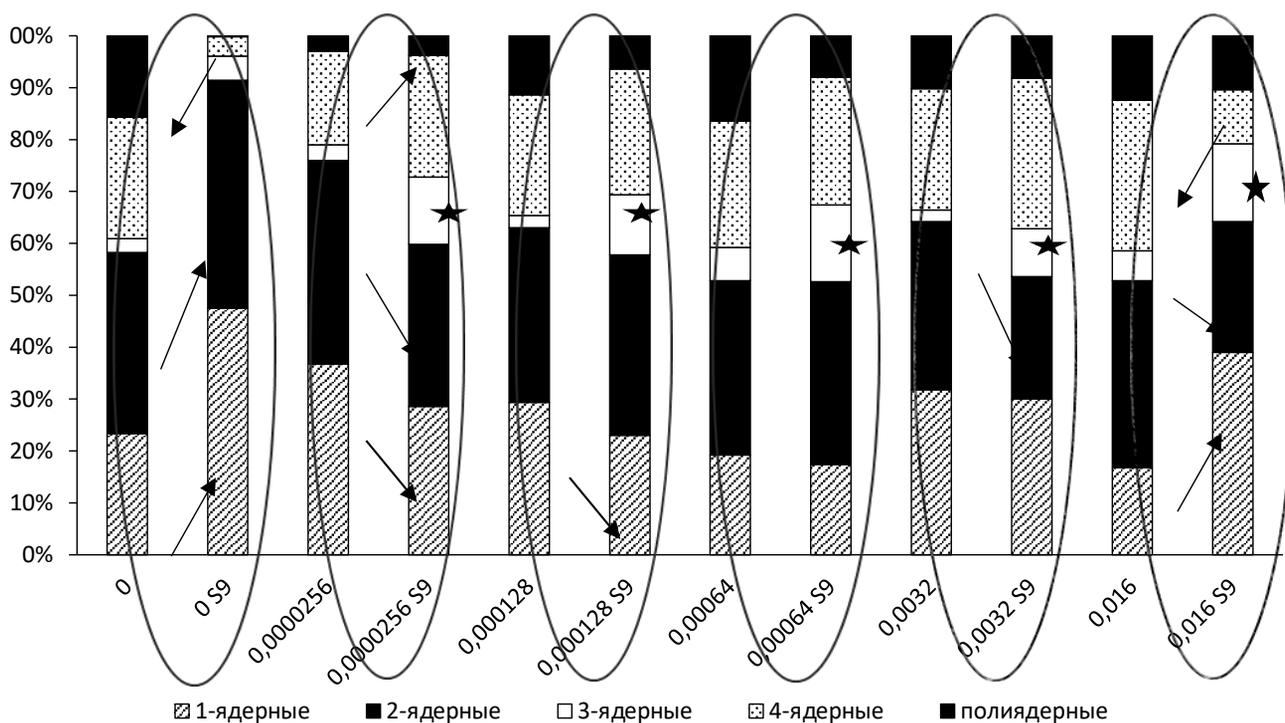


Рис. 3. Парное сравнение спектров клеточных популяций в культурах крови человека после воздействия пищевого красителя в условиях метаболической активации и без: красная звезда — статистически значимые различия в частоте 3-ядерных клеток в спектре клеточных популяций при различных способах культивирования; стрелки — статистически значимые различия в частоте клеток, прошедших одинаковое число циклов деления при различных способах культивирования (направление указывает вектор изменения, а её цвет соответствует той клеточной фракции, для которой это изменение статистически значимое). S9 — система метаболической активации.

Fig. 3. Pairwise comparison of cell population spectra in human blood cultures after exposure to the food colorant with and without metabolic activation: red star, statistically significant differences in the frequency of trinucleated cells within the spectrum of cell populations under different cultivation conditions; arrows, statistically significant differences in the frequency of cells that completed the same number of division cycles under different cultivation conditions (the direction indicates the vector of change, and the color corresponds to the cell fraction for which the difference is statistically significant). S9, metabolic activation system.

Таблица 3. Митотическая активность и апоптоз в культурах клеток при воздействии пищевого красителя в условиях метаболической активации и без

Table 3. Mitotic activity and apoptosis in cell cultures exposed to the food colorant with and without metabolic activation

Концентрация пищевого красителя, мг/мл Food colorant concentration, mg/mL	Частота апоптоза, % Apoptosis rate, %		Частота митоза, % Mitosis rate, %	
	без S9 without S9	с S9 with S9	без S9 without S9	с S9 with S9
0	0,80	13,20	3,40	0,40
0,000 025 6	2,60*	0,40*	1,80	4,00*
0,000 128	1,20	0,60*	0,80*	4,40*
0,000 64	0,20	1,20*	2,00	2,80*
0,0032	1,80	1,00*	1,40*	2,20*
0,016	3,80*	1,40*	4,20	4,80*
0,08	—	Токсический эффект Toxic effect	5,20	Токсический эффект Toxic effect
0,4	0,20		0,60*	
2	—		1,00*	
Митомицин Mitomycin 0,000 01	12,00		1,40	

Примечание. * — статистически значимые отличия от контроля, $p < 0,05$.

Note: *, statistically evident differences from control, $p < 0.05$.

- пролиферативную активность и спектр клеточных популяций;
- митотическую активность и апоптоз.

Анализ генетических повреждений в клетках по всему диапазону исследованных концентраций пищевого красителя показал, что статистически значимое увеличение по сравнению с контролем наблюдали преимущественно в популяции клеток с НПМ, тогда как при воздействии в условиях метаболической активации — в клетках с микроядрами (см. табл. 2). Кроме того, клетки, несущие одновременно два типа повреждений (микроядра + НПМ), в культурах с фракцией S9 встречали значительно реже, чем без неё. Статистически значимые различия в эффектах обнаружены для 4- и полиядерных клеток ($p=0,003$ и $p=0,001$ соответственно), а также по суммарной частоте всех делящихся и ускоренно делящихся клеток, прошедших два и более митотических циклов в присутствии цитохалазина В ($p < 0,001$), начиная с концентрации 0,000 64 мг/мл.

Совокупность клеточных популяций в каждой культуре при цитокинетическом блоке определяли после введения цитохалазина В следующим образом:

- неделящиеся клетки — 1-ядерные;
- клетки, прошедшие один митотический цикл — 2-ядерные;
- клетки, прошедшие два цикла деления — 3- или 4-ядерные;
- клетки, прошедшие более двух циклов — полиядерные, содержащие более четырёх ядер.

Следует понимать, что с уменьшением доли неделящихся 1-ядерных клеток в культуре увеличивается число клеток, вступивших в митоз и прошедших за время культивирования более 1 цикла деления (содержат более 2 ядер). При каждом последующем делении в клетках выявляется всё больше скрытых генетических повреждений, проявляющиеся в виде микроядер и НПМ. Чем больше циклов деления прошли клетки в присутствии цитохалазина В, тем выше вероятность появления таких повреждений. На основании учёта всех клеточных популяций в культурах без фракции S9 мы подсчитали общее количество клеток с микроядрами и НПМ и сравнили с соответствующими значениями в культурах с метаболической активацией. Статистический анализ, выполненный с помощью критерия Манна–Уитни, показал статистически значимые различия между дозовыми кривыми ($p=0,008$).

Влияние метаболической активации на пролиферацию клеток проявилось по-разному. Так, в контрольных культурах (рис. 3, попарное сравнение) присутствие S9 тормозило пролиферацию клеток. Торможение пролиферации отметили также при воздействии минимальной из исследованных концентраций красителя, что сопровождалось увеличением частоты неделящихся клеток и снижением численности клеток, делящихся ускоренно. Однако при совместном введении в культуру фракции S9 и минимальной концентрации пищевого красителя, напротив,

наблюдали ускорение пролиферации, о чём свидетельствует статистически значимое уменьшение доли неделящихся клеток и увеличение суммарной численности клеток, прошедших два и более митотических цикла ($p < 0,001$). В условиях отсутствия метаболической активации аналогичный эффект регистрировали только при воздействии пищевого красителя на культуру в концентрации 0,000 64 мг/мл ($p=0,025$). При дальнейшем её повышении спектр клеточных популяций изменился. Смену характера тенденции в культурах без фракции S9 наблюдали при концентрации пищевого красителя 0,08 мг/мл, тогда как в её присутствии — уже при 0,000 64 мг/мл. При этом различия между клеточными культурами с метаболической активацией и без неё заключались преимущественно в статистически значимом увеличении доли 3-ядерных клеток ($p=0,002$), что может свидетельствовать об индукции анеуплоидии.

Воздействие пищевого красителя в концентрации 0,0032 мг/мл приводило к снижению пролиферативной активности по сравнению с контролем, а добавление фракции S9, напротив, способствовало её активации ($p < 0,001$), что подтверждено увеличением доли ускоренно делящихся клеток, в том числе прошедших два митотических цикла: 3-ядерных ($p=0,03$) и 4-ядерных ($p < 0,05$) (см. рис. 3). Минимальная концентрация пищевого красителя ингибировала пролиферацию клеток, в то время как совместное введение фракции S9 с красителем способствовало её активации. Однако при увеличении концентраций пищевого красителя от 0,000 64 мг/мл подобный эффект в большинстве пролиферирующих фракций уже не наблюдали, а дальнейшее повышение его концентрации в условиях метаболической активации сопровождалось выраженным торможением клеточного деления. Таким образом, анализ спектра клеточных популяций выявил U-образную зависимость пролиферативной активности от концентрации красителя, что важно для оценки его токсикологического профиля и обоснования предельно допустимых уровней.

Ускорение пролиферации клеток, несущих генетические повреждения, ассоциировано с блоком апоптоза и сокращением продолжительности клеточного цикла, что связано с закреплением имеющихся ранее или вновь образовавшихся повреждений в ряду поколений делящихся клеток и, в свою очередь, с повышением риска развития новообразований и ускорением старения.

Особое внимание следует уделить статистически значимому увеличению частоты анеуплоидных 3-ядерных клеток во всех культурах с добавлением фракции S9 по сравнению с количеством, зафиксированном без дополнительной метаболической активации ($p=0,03$). В культурах крови здоровых детей и взрослых 3-ядерные клетки всегда присутствуют в популяции клеток второго митоза, однако их доля, как правило, не превышает 10% этого пула. При этом их частота не коррелирует с возрастом доноров, но — что особенно важно — снижается по мере

повышения уровня апоптоза [30, 31]. Следует также отметить, что в данном эксперименте увеличение частоты 3-ядерных клеток по сравнению с соответствующим контролем отмечено только в условиях метаболической активации. Это позволяет предположить, что их индукция обусловлена метаболитами пищевого красителя либо соединениями и их метаболитами, содержащимися в примесях.

В настоящей работе, аналогично данным, полученным при оценке генотоксичности пищевого красителя тартразина [32], мы обнаружили снижение уровня апоптоза при всех использованных концентрациях красителя в присутствии фракции S9. При этом контрольный уровень был сопоставим с таковым при воздействии понсо 4R. Известно, что изменения нормального уровня апоптоза, также как нарушения отдельных его механизмов, могут лежать в основе канцерогенеза, нейродегенеративных процессов, воспалений, а также некоторых аутоиммунных заболеваний. Эти состояния тесно связаны с генетической нестабильностью и, следовательно, с повышением канцерогенных и других ассоциированных рисков [33–35].

Согласно спецификации (см. табл. 1), исследуемый образец содержал 83,110% основного красителя и не более 6,752% идентифицированных примесей, что составляет 89,862% смеси на основе понсо 4R. Таким образом, оставшиеся 10,138% приходятся на неидентифицированные компоненты этой смеси. Полагают, что как основной краситель, так и идентифицированные и неидентифицированные примеси, а также их метаболиты могут в совокупности участвовать в индукции выявленных эффектов генетической нестабильности.

В.В. Юрченко и соавт. [18] изучили генотоксическую активность трёх разных образцов красителя E124, приобретённых в розничной торговой сети. Все они проявили мутагенную активность на проэритробластах костного мозга мышей в стандартной постановке микроядерного теста. Активность одного из этих образцов мы исследовали в настоящей работе и выявили эффекты нестабильности генома. Таким образом, результаты, которые мы получили, не только качественно воспроизводят данные, ранее полученные в параллельных экспериментах с использованием другого теста, но расширяют доказательную базу, позволяя более глубоко понять возможные механизмы индукции генотоксических эффектов. Тем не менее вопрос о непосредственном индукторе наблюдаемых эффектов геномной нестабильности в изученном красителе на основе понсо 4R остаётся открытым. Именно поэтому нельзя исключить, что метаболизирующая активность фракции S9 в условиях нашего эксперимента направлена не только на трансформацию молекул красителя, но и также (и/или преимущественно) на изменение состава содержащихся в нём примесей. Мы полагаем, что при принятии решений о допустимости использования пищевых красителей, содержащих примеси (учитывая, что получение высокоочищенных веществ для массового

использования в пищевой промышленности экономически затруднительно), необходимо разработать и внедрить специальный регламент оценки их генотоксического потенциала. В качестве экспериментальной основы для такого подхода (из-за простоты постановки, чёткости протокола цитомного анализа, скорости, надёжности получения результатов) возможно использовать протокол, представленный в настоящем исследовании, а также в нашей ранее опубликованной работе, выполненной по аналогичной схеме [32].

Генетическую безопасность в РФ оценивают только для пищевых продуктов и добавок, полученных с использованием генетически модифицированных микроорганизмов [36]. Мы рассматриваем такое ограничение как существенный недостаток действующей системы оценки генетической безопасности продуктов питания. Именно поэтому в дизайн данного исследования мы внесли несколько изменений. В частности, минимальную концентрацию красителя, использованную в эксперименте, мы снизили более чем в 150 и 30 раз по сравнению с допустимой суточной дозой, использовали систему метаболической активации гепатоцитов крыс. Кроме того, наряду с анализом частоты микроядер и НПМ в 2-ядерных клетках, исследовали спектр клеточных популяций, характер повреждений в различных типах клеток, митотическую активность, а также частоту апоптоза.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Таким образом, выявлены генотоксические эффекты образца пищевого красителя на основе понсо 4R, приобретённого в розничной торговой сети и содержащего, согласно спецификации, 83,1% основного красящего вещества. На основании полученных данных невозможно однозначно определить, с каким компонентом смеси связаны выявленные эффекты — с самим понсо 4R, содержащимися в нём примесями и/или с их метаболитами. Тем не менее очевидно, что данная смесь, используемая в пищевой промышленности, с высокой вероятностью поступает в рацион конечного потребителя.

Именно поэтому представляет особую важность тот факт, что для исследуемого пищевого красителя на основе понсо 4R уже на уровне допустимой суточной дозы (в нашем случае 0,000 64 мг/кг) вне зависимости от наличия системы дополнительной метаболической активации выявлено статистически значимое повышение уровня анеуплоидии (по частоте 3-ядерных клеток). Кроме того, только в условиях метаболической активации наблюдали снижение уровня апоптоза на фоне усиления митотической активности. Существенно и то, что в присутствии фракции S9 превышение контрольных значений по частоте 2-ядерных клеток с микроядрами («золотой стандарт» оценки генотоксичности в микроядерном тесте на культуре клеток крови млекопитающих) обнаружено уже при минимальных использованных концентрациях

красителя, более чем в 150 и 30 раз соответственно ниже нормы для человека.

Использованный экспериментальный подход не только позволил выявить высокую вероятность возникновения генотоксических эффектов, которые, как правило, не учитывают при стандартной оценке, но также может служить основой для разработки системы оценки генетической безопасности пищевых красителей и добавок.

ДОПОЛНИТЕЛЬНАЯ ИНФОРМАЦИЯ

Вклад авторов. Т.А. Никитина — постановка эксперимента, цитомный анализ, статистический анализ полученных данных, написании текста рукописи; М.А. Коняшкина — постановка эксперимента, статистическая обработка данных, написание текста рукописи; Ф.И. Ингель — руководство исследованием, концепция и дизайн исследования, написание и редактирование текста рукописи; Л.В. Ахальцева — создание системы метаболической активации S9 и руководство её использованием в эксперименте. Все авторы одобрили рукопись (версию для публикации), а также согласились нести ответственность за все аспекты работы, гарантируя надлежащее рассмотрение и решение вопросов, связанных с точностью и добросовестностью любой её части.

Этическая экспертиза. Выписка из протокола этической комиссии по серии экспериментов по оценке генотоксических эффектов пищевых красителей № 04П-14.05.2021 от 14.05.2021.

Источники финансирования. Работа выполнена в рамках государственного задания «Создание комплексной системы оценки генотоксичности пищевых добавок» Регистрационный № НИОКТР АААА-А20-120111090100-6.

Раскрытие интересов. Авторы заявляют об отсутствии отношений, деятельности и интересов за последние три года, связанных с третьими лицами (коммерческими и некоммерческими), интересы которых могут быть затронуты содержанием статьи.

Оригинальность. При создании настоящей работы авторы не использовали ранее опубликованные сведения (текст, иллюстрации, данные).

Доступ к данным. Все данные, полученные в настоящем исследовании, доступны в статье.

Генеративный искусственный интеллект. При создании настоящей статьи технологии генеративного искусственного интеллекта не использовались.

Рассмотрение и рецензирование. Настоящая работа подана в журнал в инициативном порядке и рассмотрена по обычной процедуре. В рецензировании участвовали два внешних рецензента, член редакционной коллегии и научный редактор издания.

ADDITIONAL INFORMATION

Author contributions: T.A. Nikitina: experimental design, cytome analysis, statistical analysis of the data, writing—original draft; M.A. Konyashkina: experimental design, statistical data processing, writing—original draft; F.I. Ingel: supervision, conceptualization and study design, writing—original draft, writing—review & editing; L.V. Akhaltseva: development of the S9 metabolic activation system and supervision of its application in the experiment. All authors approved the version of the manuscript to be published and agree to be accountable for all aspects of the work, ensuring that questions related to the accuracy or integrity of any part of the work are appropriately investigated and resolved.

Ethics approval: Excerpt from the Ethics Committee protocol on the series of experiments evaluating the genotoxic effects of food colorants No. 04P-14.05.2021 dated May 14, 2021.

Funding sources: This study was carried out as part of the state assignment *Development of a Comprehensive System for the Assessment of the Genotoxicity of Food Additives*, Registration No. НИОКТР АААА-А20-120111090100-6.

Disclosure of interests: The authors have no relationships, activities, or interests for the last three years related to for-profit or not-for-profit third parties whose interests may be affected by the content of the article.

Statement of originality: No previously published material (text, images, or data) was used in this study or article.

Data availability statement: All data generated during this study are available in this article.

Generative AI: No generative artificial intelligence technologies were used to prepare this article.

Provenance and peer review: This paper was submitted unsolicited and reviewed following the standard procedure. The peer review process involved two external reviewers, a member of the editorial board, and the in-house scientific editor.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ | REFERENCES

1. FDA. Food and drug administration compliance program guidance manual. Chapter 03 —Foodborne biological hazards. USA: FDA; 2008. Available from: <https://www.fda.gov/media/71245/download>
2. Agarwai K, Mukherjee A, Sharma A. *In vivo* cytogenetic studies on male mice exposed to Ponceau 4R and beta-carotene. *Cytobios*. 1993;74(296):23–28.
3. Bateman B. The effects of a double blind, placebo controlled, artificial food colourings and benzoate preservative challenge on hyperactivity in a general population sample of preschool children. *Archives of Disease in Childhood*. 2004;89(6):506–511. doi: 10.1136/adc.2003.031435
4. McCann D, Barrett A, Cooper A, et al. Food additives and hyperactive behaviour in 3-year-old and 8/9-year-old children in the community: a randomised, double-blinded, placebo-controlled trial. *The Lancet*. 2007;370(9598):1560–1567. doi: 10.1016/S0140-6736(07)61306-3
5. EFSA Panel on Food Additives or Nutrient Sources Added to Food. Scientific Opinion on the re-evaluation of Ponceau 4R (E 124) as a food additive. *EFSA Journal*. 2009;7(11):1328. doi: 10.2903/j.efsa.2009.1328
6. Kirkland D, Reeve L, Gatehouse D, Vanparrys P. A core in vitro genotoxicity battery comprising the Ames test plus the in vitro micronucleus test is sufficient to detect rodent carcinogens and in vivo genotoxins. *Mutation Research/Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis*. 2011;721(1):27–73. doi: 10.1016/j.mrgentox.2010.12.015 EDN: OKOVFF
7. Yurchenko VV, Ingel FI, Akhaltseva LV, et al. Genotoxic safety of synthetic food colours. Review. *Ecological genetics*. 2021;19(4):323–341. doi: 10.17816/ecogen79399 EDN: MUULZS
8. Ishidate M, Sofuni T, Yoshikawa K, et al. Primary mutagenicity screening of food additives currently used in Japan. *Food and Chemical Toxicology*. 1984;22(8):623–636. doi: 10.1016/0278-6915(84)90271-0
9. Izbirak A, Sumer S, Diril N. Mutagenicity testing of some azo dyes used as food additives. *Microbiol Bul*. 1990;24(1):48–56.
10. Hayashi M, Matsui M, Ishii K, Kawasaki M. Data sheet for mutagenicity evaluation of food additives by Ministry of Health Labour and Welfare (FY1979-FY1998). *Environ Mutagen Res*. 2000;22:27–44.
11. Haveiand-Smith RB. *An evaluation on the genetic effects of some food colours using microbia test systems*. Ph D. Thesis. London: CNA; 1980.
12. Yamjala K, Subramania Nainar M, Varma SK, Ambore N. Separation, identification and mutagenic assessment of the photodegradation products of Ponceau 4R (E124) in a beverage. *Analytical Methods*. 2016;8(25):5017–5024. doi: 10.1039/C6AY00716C
13. Cameron TP, Hughes TJ, Kirby PE, et al. Mutagenic activity of 27 dyes and related chemicals in the Salmonella/microsome and mouse lymphoma TK+/- assays. *Mutation Research/Genetic Toxicology*. 1987;189(3):223–261. doi: 10.1016/0165-1218(87)90056-5
14. Luck H, Rickerl E. Lebensmittelzusatzstoffe und mutagene Wirkung. VI. Pruefung der in Westdeutschland zugelassenen und urapruenglich

- vorgeachlagenen Lebensmittelfarbatoffe auf mutagene Wirkung an *Escherichia coli*. *Z Lebens- mittel-Untersuch-Forsch.* 1960;112:157–174. (In German)
15. Sankaranarayanan N, Murthy MSS. Testing of some permitted food colours for the induction of gene conversion in diploid yeast. *Mutation Research/Genetic Toxicology.* 1979;67(4):309–314. doi: 10.1016/0165-1218(79)90026-0
 16. Gubbini L, Cardamone J, Voiterra-Veca L, et al. Controio dei effetti mutageno di alcuni coloranti chimici ambientali. *Atti Ass. Genet Ital.* 1975;20:43–44.
 17. Vaidya VG, Godbole NM. Mutagenicity study of four colours using human leucocyte and mouse micronucleus test systems. *Indian Journal of Experimental Biology.* 1978;16(7):820–821.
 18. Yurchenko VV, Akhaltseva LV, Yurtseva NA, et al. Evaluation of mutagenic activity of the food dye Ponceau 4R in a micronuclear test in mice. *Hygiene and sanitation.* 2023;102(11):1210–1214. doi: 10.47470/0016-9900-2023-102-11-1210-1214 EDN: RIWBWA
 19. Durnev AD, Oreshchenko AV, Kulakova AV, Beresten NF. Analysis of cytogenetic activity of food dyes. *Voprosy medicinskoj himii.* 1995;41(5):50–53. EDN: UZFCRZ
 20. Bastaki M, Farrell T, Bhusari S, et al. Lack of genotoxicity in vivo for food color additive Tartrazine. *Food and Chemical Toxicology.* 2017;105:278–284. doi: 10.1016/j.fct.2017.04.034
 21. Sasaki YF, Kawaguchi S, Kamaya A, et al. The comet assay with 8 mouse organs: results with 39 currently used food additives. *Mutation Research/Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis.* 2002;519(1-2):103–119. doi: 10.1016/s1383-5718(02)00128-6 EDN: AYFGGD
 22. Tsuda S. DNA Damage induced by red food dyes orally administered to pregnant and male mice. *Toxicological Sciences.* 2001;61(1):92–99. doi: 10.1093/toxsci/61.1.92 EDN: IWNCVD
 23. Yamada M, Honma M. Summarized data of genotoxicity tests for designated food additives in Japan. *Genes and Environment.* 2018;40(1):1–25. doi: 10.1186/s41021-018-0115-2 EDN: NMRVHY
 24. Shimada C, Kano K, Sasaki YF, et al. Differential colon DNA damage induced by azo food additives between rats and mice. *The Journal of Toxicological Sciences.* 2010;35(4):547–554. doi: 10.2131/jts.35.547
 25. Ingel FI. Part 2. Environmental factors and individual features in system of evaluation of human genome instability. additional capability of the test the technique for cytogenetic analysis. *Ecological genetics.* 2006;4(4):38–54. doi: 10.17816/ecogen4438-54 EDN: HZNVET
 26. Ingel FI, Yurchenko VV, Guskov AS, et al proliferative activity parameters and their correlation with genetic damage of blood lymphocytes duringcultivation under the conditions of cytokinetic block. *Annals of The Russian Academy of Medical Sciences.* 2006(4):41–45. EDN: HSYNGB
 27. Swaroop VR, Roy DD, Vijayakumar T. Genotoxicity of synthetic food colorants. *Journal of Food Science and Engineering.* 2011;1:53–59.
 28. OECD. *Test No. 487: In Vitro mammalian cell micronucleus test. OECD Guidelines for the Testing of Chemicals, Section 4.* Paris: OECD; 2023. doi: 10.1787/9789264264861-en
 29. Yeropkin MYh, Yeropkina EM. Model of biotransformation of xenobiotics *In vitro*: effect of liver fraction S9 on toxicity of some animal preparations. *Toxicological Review.* 2008;(5):35–39. EDN: JVOOMT
 30. Ingel FI, Erdinger L, Eckl P, et al. Genomic instability, radiosensitivity and adaptive response of blood lymphocytes from children living in the aral sea region: correlation with emotional stress and blood contamination. *Central European Journal of Occupational and Environmental Medicine.* 2010;16(1-2):31–45. EDN: WTJSLP
 31. Ingel F, Krivtsova E, Urtseva N, et al. Volatility and sensitivity of the genome of healthy children in Magnitogorsk. *Hygiene and Sanitation, Russian Journal.* 2013;92(3):20–27. EDN: QIQPXV
 32. 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: 10.17816/ecogen117502 EDN: VADCQS
 33. Rastogi RP, Richa, Sinha RP. Apoptosis: molecular mechanisms and pathogenicity. *EXCLI Journal.* 2010;8:155–181. doi: 10.17877/DE290R-8930
 34. Veres IA. Apoptosis-dependent mechanisms of inflammation. *Medical Journal.* 2017;(3):147–152. EDN: ZEGMCP
 35. Lugovaya AV, Kalinina NM, Mitreikin VP, et al. Apoptosis and proliferation of peripheral blood T-cells as alternative processes in pathogenesis of diabetes mellitus type 1. *Medical alphabet.* 2019;1(4):16–20. doi: 10.33667/2078-5631-2019-1-4(379)-16-20 EDN: PVXRKE
 36. *Microbiological and molecular genetic assessment of food products obtained using genetically modified microorganisms: guidelines.* Moscow: Federal Center for State Sanitary and Epidemiological Surveillance of the Ministry of Health of Russia; 2004. (In Russ.) Available from: <https://meganorm.ru/Data2/1/4293855/4293855349.pdf>

ОБ АВТОРАХ

* Никитина Татьяна Александровна;

адрес: Россия, 119121, Москва, ул. Погодинская д. 10с1;
ORCID: 0000-0003-0866-5990;
eLibrary SPIN: 9106-5076;
e-mail: TNikitina@cspfmba.ru

Коняшкина Мария Александровна, канд. биол. наук;

ORCID: 0000-0002-8319-1329;
eLibrary SPIN: 7559-9045;
e-mail: MKonyashkina@cspfmba.ru

Ингель Фаина Исааковна, д-р биол. наук;

ORCID: 0000-0002-2262-6800;
eLibrary SPIN: 1013-7006;
e-mail: FIngel@cspfmba.ru

Ахальцева Людмила Вячеславовна, канд. биол. наук;

ORCID: 0000-0002-3619-3858;
eLibrary SPIN: 7049-0003;
e-mail: LAhalceva@cspfmz.ru

AUTHORS' INFO

* Tatyana A. Nikitina;

address: 10s1 Pogodinskaya st, Moscow, Russia, 119121;
ORCID: 0000-0003-0866-5990;
eLibrary SPIN: 9106-5076;
e-mail: TNikitina@cspfmba.ru

Maria A. Konyashkina, Cand. Sci. (Biology);

ORCID: 0000-0002-8319-1329;
eLibrary SPIN: 7559-9045;
e-mail: MKonyashkina@cspfmba.ru

Faina I. Ingel, Dr. Sci. (Biology);

ORCID: 0000-0002-2262-6800;
eLibrary SPIN: 1013-7006;
e-mail: FIngel@cspfmba.ru

Lyudmila V. Akhaltseva, Cand. Sci. (Biology);

ORCID: 0000-0002-3619-3858;
eLibrary SPIN: 7049-0003;
e-mail: LAhalceva@cspfmz.ru

* Автор, ответственный за переписку / Corresponding author