



Юрченко В.В.¹, Ахальцева Л.В.¹, Юрцева Н.А.¹, Коняшкина М.А.¹, Лебедев А.С.²

Оценка мутагенной активности пищевого красителя Понсо 4R в микроядерном тесте на мышах

¹ФГБУ «Центр стратегического планирования и управления медико-биологическими рисками здоровью» Федерального медико-биологического агентства, 119121, Москва, Россия;

²ФГБОУ ВО «Ярославский государственный университет имени П.Г. Демидова», 150057, Ярославль, Россия

Введение. Пищевой моноазокраситель E124 Понсо 4R применяется в пищевой, фармацевтической и косметической промышленности. Анализ доступных данных по оценке генетической безопасности E124 на основе учёта основных маркерных событий генотоксичности выявил их противоречивость, возможно, связанную с количественными и (или) качественными различиями изученных образцов по примесям.

Цель работы — оценить мутагенную активность в микроядерном тесте на мышах нескольких коммерческих образцов E124, присутствующих на отечественном рынке.

Материалы и методы. Изучены три образца E124 от разных производителей (Индия). Для оценки подлинности субстанций Понсо 4R применялся метод ИК-спектроскопии среднего диапазона, техника УНПВО. Водные растворы краски вводили в желудок самцам мышей CBA × C57Bl6/j) в дозах от 125 до 2000 мг/кг дважды с интервалом 24 ч и приготовлением препаратов через 24 ч после второго введения. Для оценки частоты полихроматофильных эритроцитов (ПХЭ) с микроядрами (МЯ) анализировали 4000 ПХЭ, доли ПХЭ среди всех эритроцитов — 500 клеток на животное.

Результаты. Понсо 4R был идентифицирован во всех представленных образцах. На всех изученных уровнях воздействия образцы E124 вызывали повышение частоты ПХЭ с МЯ ($p < 0,05–0,001$, критерий Т) в костном мозге мышей в линейной зависимости от дозы ($p < 0,04–0,0001$). Доля ПХЭ от всех эритроцитов не изменялась.

Ограничения исследования. Полученные данные не позволяют определить механизм генотоксического действия исследуемого вещества.

Заключение. Анализ частоты ПХЭ с МЯ в костном мозге мышей после двукратного введения в дозах 125–2000 мг/кг выявил мутагенную активность трёх образцов Понсо 4R.

Ключевые слова: генотоксичность; пищевые азокрасители; E124; Понсо 4R; микроядерный тест *in vivo*; полихроматофильные эритроциты; мыши

Соблюдение этических стандартов. Исследование одобрено локальным этическим комитетом НИИ ЭДнТО ФГБУ «НМИЦ онкологии им. Н.Н. Блохина» Минздрава России, проведено в соответствии с Европейской конвенцией о защите позвоночных животных, используемых для экспериментов или в иных научных целях (ETS N 123), директивой Европейского парламента и Совета Европейского союза 2010/63/ЕС от 22.09.2010 г. о защите животных, использующихся для научных целей.

Для цитирования: Юрченко В.В., Ахальцева Л.В., Юрцева Н.А., Коняшкина М.А., Лебедев А.С. Оценка мутагенной активности пищевого красителя Понсо 4R в микроядерном тесте на мышах. *Гигиена и санитария*. 2023; 102(11): 1210–1214. <https://doi.org/10.47470/0016-9900-2023-102-11-1210-1214> <https://elibrary.ru/rwvbw>

Для корреспонденции: Юрченко Валентина Васильевна, канд. мед. наук, вед. науч. сотр. отд. профилактической токсикологии и медико-биологических исследований ФГБУ «ЦСП» ФМБА России, 119121, Москва. E-mail: VYurchenko@cpspmz.ru

Участие авторов: Юрченко В.В. — концепция и дизайн исследования, работа с животными, приготовление препаратов для микроскопического анализа, статистический анализ, анализ данных литературы, написание текста; Ахальцева Л.В. — микроскопический анализ, поиск источников литературы, анализ данных литературы, написание текста; Юрцева Н.А. — работа с животными, приготовление препаратов для микроскопического анализа, микроскопический анализ; Коняшкина М.А. — работа с животными, приготовление препаратов для микроскопического анализа; Лебедев А.С. — оценка подлинности субстанций Понсо 4R. Все соавторы — утверждение окончательного варианта статьи, ответственность за целостность всех частей статьи.

Конфликт интересов. Авторы декларируют отсутствие явных и потенциальных конфликтов интересов в связи с публикацией данной статьи.

Финансирование. Работа выполнена в рамках государственного задания «Комплексная система оценки генотоксичности пищевых добавок» ФГБУ «ЦСП» ФМБА России.

Поступила: 09.08.2023 / Принята к печати: 15.11.2023 / Опубликована: 08.12.2023

Valentina V. Yurchenko¹, Lyudmila V. Akhaltseva¹, Nadezda A. Yurtseva¹,
 Mariya A. Konyashkina¹, Anton S. Lebedev²

Evaluation of mutagenic activity of the food dye Ponceau 4R in a micronuclear test in mice

¹Centre for Strategic Planning of FMBA of Russia, Moscow, 119121, Russian Federation;

²Yaroslavl State University, Yaroslavl, 150003, Russian Federation

Introduction. Food monoazo dye E124 Ponceau 4R is used in the food, pharmaceutical, and cosmetic industries. An analysis of the available data on the evaluation of the genetic safety of E124 based on the main marker events of genotoxicity revealed their inconsistency, possibly associated with quantitative and/or qualitative differences in the studied samples for impurities.

The aim of the work is to evaluate the mutagenic activity in the micronucleus test in mice of several commercial samples of E124 present on the domestic market.

Materials and methods. Three samples of E124 from different manufacturers (India) were studied. To assess the identity of Ponceau 4R substances, there was used method of MIR-spectroscopy — universal ART technique. Aqueous dye solutions were administered to the stomach of male CBA × C57Bl6/j) mice at doses of 125 to 2000 mg/kg twice with an interval of 24 hours and preparations were prepared 24 hours after the last injection. To assess the frequency of polychromatophilic erythrocytes (PCE) with micronuclei (MN), 4000 PCE were analyzed, the proportion of PCE among all erythrocytes — 500 cells per animal.

Results. Ponceau 4R was determined in all samples. All E124 samples caused an increase in the frequency of PCE with MN ($p < 0.05–0.001$, T test) after exposure at all levels studied in a linear dose-dependent manner. The proportion of PCE from all erythrocytes did not change.

Limitations. The data obtained do not allow determining the mechanism of the genotoxic action of the test substance.

Conclusion. An analysis of the frequency of MN PCEs in the bone marrow in mice after a double injection at doses of 125–2000 mg/kg revealed the genotoxicity of three samples Ponceau 4R.

Keywords: genotoxicity; food azo dyes; E124; Ponceau 4R; micronucleus test *in vivo*; polychromatophilic erythrocytes; mice

Compliance with ethical standards. The study was approved by the local ethical committee of the Research Institute of EDiTO Federal State Budgetary Institution «N.N. Blokhin National Medical Research Center of Oncology» of the Ministry of Health of the Russian Federation, carried out under the European Convention for the Protection of Vertebrate Animals Used for Experiments or Other Scientific Purposes (ETS N 123), Directive of the European Parliament and Council of the European Union 2010/63/EU of 22.09.2010 on the protection of animals used for scientific purposes.

For citation: Yurchenko V.V., Akhaltseva L.V., Konyashkina M.A., Yurtseva N.A., Lebedev A.S. Evaluation of the mutagenic activity of the food dye Ponceau 4R in a micronucleus test in mice. *Gigiena i Sanitariya (Hygiene and Sanitation, Russian journal)*. 2023; 102(11): 1210–1214. <https://doi.org/10.47470/0016-9900-2023-102-11-1210-1214> <https://elibrary.ru/riwbwa> (in Russian)

For correspondence: Valentina V. Yurchenko, MD, PhD, Leading Researcher of the Department of Preventive Toxicology and Biomedical Research in the Centre for Strategic Planning of FMBA of Russia, Moscow, 119121, Russian Federation. E-mail: VYurchenko@cspmrz.ru

Information about the authors:

Yurchenko V.V., <https://orcid.org/0000-0003-4377-245X>
Yurtseva N.A., <https://orcid.org/0000-0001-5031-2916>
Lebedev A.S., <https://orcid.org/0000-0002-0856-3209>

Akhaltseva L.V., <https://orcid.org/0000-0002-3619-3858>
Konyashkina M.A., <https://orcid.org/0000-0002-8319-1329>

Contribution: Yurchenko V.V. – concept and design of the study, work with animals, preparation of preparations for cytogenetic analysis, statistical analysis, analysis of literature, writing a text; Akhaltseva L.V. – cytogenetic analysis, search for literature sources, analysis of literature; Yurtseva N.A. – work with animals, preparation of preparations for cytogenetic analysis, search for literature sources; Konyashkina M.A. – work with animals, preparation of preparations for cytogenetic analysis, cytogenetic analysis, search for literature sources; Lebedev A.S. – verification of Ponceau 4R substances for identity. All authors are responsible for the integrity of all parts of the manuscript and approval of the manuscript final version.

Conflict of interest. The authors declare no conflict of interest.

Acknowledgment. The work was carried out within the framework of the state task «Complex system for assessing the genotoxicity of food additives» Centre for Strategic Planning of FMBA of Russia.

Received: August 9, 2023 / Accepted: November 15, 2023 / Published: December 8, 2023

Введение

Мутации считаются ключевым событием канцерогенеза. Для выявления потенциальных мутагенов в краткосрочных тестах применяют токсичные и субтоксичные уровни воздействия. Экспериментальные свидетельства порога мутагенного действия имеются только для ограниченного числа веществ, поэтому в общем случае принимают линейную модель дозовой зависимости. Практическим следствием этого является то, что ни один уровень экспозиции нельзя признать не несущим риск [1], поэтому важно в процессе изготовления пищевых продуктов избежать применения потенциально мутагенных пищевых добавок.

Синтетический пищевой краситель (ПК) E124 Понсо 4R (пунцовый 4R, пищевой красный 7, кошениловый красный, новый кокцин) разрешён к применению в РФ при изготовлении конфет, десертов, карамелей, мармелада, безалкогольных и алкогольных напитков, йогурта и т. д. [2] – всего более 160 наименований готовой продукции [3].

Адекватная оценка генотоксических свойств включает оценку способности вещества вызывать генные мутации, абберации хромосом и анеуплоидию.

В отношении индукции генных мутаций можно отметить, что E124 в основном не проявил мутагенной активности в тесте Эймса [4]. Только в составе безалкогольных напитков и только после фотодеградации под влиянием солнечного света E124 вызывал мутации на штамме TA 98 (без активации) и TA 100 (с активацией и без) [5]. Однако облучение краски ультрафиолетом продолжительностью до 2 нед не сопровождалось появлением мутагенных свойств [6]. Работ с применением двойной активации E124 в тесте Эймса (восстановление по азосвязи с последующим окислением продуктов распада молекулы красителя) согласно современным рекомендациям [7] нам не удалось найти. На трансгенных грызунах (TGR) в условиях ежедневного введения мышам в желудок в дозах до 1000 мг/кг в течение 28 дней Понсо 4R не вызывал повышения частоты генных мутаций в клетках печени и железистой части желудка [8]. Хотя щелочной метод (тест) ДНК-комет *in vivo* выявляет лишь транзитные мутационные события, но он хорошо прогнозирует способность веществ индуцировать генные мутации *in vivo* [9]. Важно, что в тесте комет для E124 на одном и том же виде

животных (мыши) при применении сходных схем опытов были получены как отрицательные [8], так и положительные результаты [10, 11].

Микроядерный тест (МТ) *in vivo* предназначен для выявления и кластогенного, и анеугенного действия тестируемого вещества. Фрагменты хромосом или целые хромосомы, оставшие во время митоза и не вошедшие в дочерние ядра, формируют в цитоплазме микроядра (МЯ). В острых опытах на мышах V.G. Vaidya и N.M. Godbole получили положительный результат в этом тесте [цит. по 12]. К сожалению, нам не удалось выяснить подробности постановки опыта. В остальных цитогенетических исследованиях применяли внутрибрюшинное введение, которое не считается релевантным для азосоединений, поскольку исключает азоредукцию краски анаэробными бактериями в ЖКТ с образованием ароматических аминов, которые всасываются сравнительно легко и после окисления в печени могут приобретать мутагенные свойства [13]. Тем не менее у мышей наблюдали индукцию аббераций хромосом на фоне угнетения эритропоэза после введения E124 в дозах от 4 до 20 мг/кг с положительным трендом зависимости эффекта от дозы [14]. В то же время частота МЯ не изменялась после четырёхкратного введения в дозе 300 мг/кг или однократного до 1200 мг/кг [8] или до 2400 мг/кг [15]. В последнем случае после введения E124 в высшей дозе наблюдалась частичная гибель мышей, а у выживших доля ПХЭ в костном мозге снижалась на 30%. Отмеченная противоречивость результатов опытов *in vivo* заставила экспертов EFSA усомниться в идентичности/чистоте использованных в этих работах образцов E124 [16].

Данных по оценке генетической безопасности пищевого красителя Понсо 4R, циркулирующего на отечественном рынке, нам не удалось найти. Учитывая, что ранее в стандартной постановке МТ на мышах нами были получены противоположные результаты по коммерческим образцам других пищевых моноазокрасителей [17, 18], представлялось интересным оценить несколько образцов одного красителя, что в случае получения противоположных результатов могло дать возможность выявить причину мутагенности.

Цель работы – оценка мутагенных свойств в МТ на костном мозге мышей трёх образцов E124, приобретённых в открытой продаже.

Материалы и методы

Изучены три образца пищевого красителя Понсо 4R:

1) Понсо 4R(I) производства Роха Дайкем ЛТД (Индия) партия RP19010064, серия 1007221677-1007221708, дата выпуска 22.01.2019 г., годен до 21.01.2024 г., чистота 83,11%, куплен в интернет-магазине. Согласно ксерокопии сертификата завода-производителя, образец краски соответствовал спецификации ЕС [19];

2) Понсо 4R(II) был приобретён в торговой точке, распространяющей в том числе материалы для покраски автомобилей. Вместо сертификата была представлена копия спецификации, в которой было указано содержание красителя $\geq 80\%$ и отсутствовали такие позиции, как «нерастворимые в воде вещества», «вспомогательные красящие вещества», «экстрагируемые эфиром вещества», «несульфированные ароматические амины»;

3) Понсо 4R(III) производства Динамик Продактс ЛТД (Индия), партия P4R-2021/3, дата выпуска 18.04.2020 г., годен до 17.04.2025 г., чистота 81,94%, куплен в интернет-магазине. Согласно ксерокопии сертификата завода-производителя, образец краски соответствовал спецификации ЕС [19].

Для оценки подлинности субстанций Понсо 4R применялся метод ИК-спектроскопии среднего диапазона. ИК-спектры получали на приборе Spectrum 65 (PerkinElmer) на алмазной УНПВО с фокусирующей линзой из ZnSe, детектор – LiTaO₃, диапазон сканирования 4000–600 см⁻¹, спектральное разрешение – 2 см⁻¹. Оценка подлинности проводилась путём программного (Spectrum software v10.6.2 [Spectrum 10.6: <https://www.perkinelmer.com/product/software-kit-spectrum-10-1x108873>]) последовательного расчёта парной корреляции спектральных данных трёх образцов, а также визуальным сравнением ИК-спектров образцов с референтным спектром из online-библиотеки Spectrabase [Spectrabase: <https://spectrabase.com/spectrum/2nA3W3b9AYE>]. Перед расчётом парных корреляций проводилась нормализация полученных спектров к ординате 10%Т.

Биологические эксперименты проводили с использованием самцов конвенциональных мышей F1 (СВАх С57Bl6/j) двухмесячного возраста разведки (НПП «Питомник лабораторных животных» ФИБХ РАН).

Образец Понсо 4R(I) изучали в опыте № 1 на мышах с массой тела от 20,3 до 25,4 г ($M_{\text{ср}} \pm \delta = 22,96 \pm 1,30$). Образцы Понсо 4R(II), Понсо 4R(III) и Понсо 4R(I) (повторно, со сдвигом диапазона доз) оценивали в опыте № 2 на мышах с массой тела от 19 до 24,1 г ($M_{\text{ср}} \pm \delta = 21,23 \pm 1,06$). В состав каждой группы входило по 6 особей. Эксперименты проводили в соответствии с [20].

Учитывая, что применение пищевых красителей предусматривает их поступление в организм потребителя с рационалом, в экспериментах на мышах использовали пероральный путь введения. По данным литературы, при введении в желудок мышам ЛД₅₀ Понсо 4R составляет 8 г/кг (https://www.chemsrc.com/en/cas/2611-82-7_1008290.html), поэтому в качестве максимальной использовали дозу 2000 мг/кг. Приготовленные непосредственно перед применением водные растворы красителя вводили мышам в желудок в объёме 100 мкл/10 г массы тела в дозах от 125 до 2000 мг/кг дважды с интервалом 24 ч и последующей эвтаназией через сутки после второго введения. Животным негативного контроля в том же режиме вводили дистиллированную воду. В качестве позитивного контроля использовали циклофосфамид (Эндоксан производства Вахтер, Германия, серия 9D301A), водный раствор которого вводили внутривенно однократно в дозе 10 мг/кг за сутки до эвтаназии.

Костный мозг вымывали эмбриональной телочьей сывороткой (ООО НПП «ПанЭко», серия S00E31), центрифугировали, мазки готовили стандартным способом, подсушивали на воздухе и окрашивали азуран-эозином с использованием набора красителей Лейкодиф 200 (Erba Lachema, Чехия). Защищенные препараты анализировали методом световой микроскопии (Olympus BX-41, Япония, увеличение 10 × 100).

От каждого животного анализировали 4000 ПХЭ, учитывали ПХЭ с МЯ. Долю ПХЭ от суммы ПХЭ и нормохромных эритроцитов (НХЭ) определяли при подсчёте 500 эритроцитов.

Статистическую обработку экспериментальных данных проводили в программе Statistica 10 for Windows путём сравнения опытных групп с группой отрицательного контроля с использованием Т-критерия для независимых групп данных. Значимыми считали различия при $p \leq 0,05$. Ответ считали положительным при соответствии следующим критериям [20]: а) значение показателя в группах животных параллельных отрицательного и положительного контролей входит в 95%-е доверительные интервалы (95% ДИ) соответствующих исторических (накопленных) контролей; б) хотя бы в одной точке опыта значение показателя значимо превышает параллельный отрицательный контроль и выходит за пределы 95% ДИ накопленного отрицательного контроля; в) наблюдается значимый положительный тренд зависимости эффекта от дозы.

Результаты

Понсо 4R был идентифицирован во всех образцах E124. В ходе программного расчёта парной корреляции спектральных данных его значение составляло не менее 0,981, что свидетельствует об идентичности основного вещества образцов. Структура Понсо 4R также подтверждается присутствием следующих структурных фрагментов: О–Н (3435 см⁻¹), С–Н sp² (3092 см⁻¹), N=N (1422 см⁻¹), С–N (1285 см⁻¹), С–О (1187 см⁻¹), S=O (as; 1146, 1142 см⁻¹), S=O (sy; 1042 см⁻¹), внеплоскостные колебания ароматического кольца (836; 752; 682; 655 см⁻¹). В целом по полученным спектрам можно констатировать, что наименьшее содержание основного вещества наблюдалось в образце Понсо (I) (хотя по паспорту содержание основного вещества самое высокое из всех представленных), так как большая часть характерных сигналов для данного образца имела меньшие амплитуды в сравнении с двумя другими: менее интенсивные полосы С–Н sp² (3092 см⁻¹), N=N (1422 см⁻¹), С–N (1285 см⁻¹), С–О (1187 см⁻¹), S=O (as; 1146, 1142 см⁻¹) и внеплоскостные колебания ароматического кольца (836; 752; 682; 655 см⁻¹). Самое высокое содержание основного вещества в образце Понсо III, если исходить из описанных выше предположений.

После введения мышам красителя в высоких дозах наблюдалось отрывание, особенно после выдачи корма (через 1,5–2 ч после введения). В остальном внешний вид и поведение опытных мышей не отличалось от контрольных. Результаты микроскопического анализа представлены в таблице.

Средняя частота ПХЭ с МЯ у животных групп отрицательного контроля колебалась от 0,71 до 1,88‰, что было ниже или входило в 95% доверительный интервал (ДИ) накопленного в лаборатории отрицательного контроля по 102 мышам (1,42–1,90‰); у мышей групп положительного контроля – от 8,58 до 9,25‰ (по 42 мышам 95% ДИ 8,53–9,62). Доля ПХЭ среди всех эритроцитов в костном мозге в группах отрицательного контроля колебалась между 51,92 и 47,93% (95% ДИ 46,11–51,49%); после введения циклофосфамида – между 45,57 и 56,32% (95% ДИ 50,26–53,46%). Таким образом, в целом постановку опытов можно признать удовлетворительной.

Только в одной группе мышей (после введения Понсо 4R (II) в дозе 250 мг/кг) значимо снижалась доля ПХЭ среди всех эритроцитов в костном мозге ($p = 0,04$). Однако линейный тренд зависимости токсического эффекта от дозы красителя не достигал статистической значимости ($p = 0,77$), что позволило пренебречь этой единичной находкой.

Все образцы красителя во всех испытанных дозах вызывали по сравнению с параллельным отрицательным контролем статистически значимое увеличение частоты ПХЭ с МЯ, которое превышало 95% ДИ накопленного отрицательного контроля. Во всех случаях наблюдался статистически значимый положительный тренд зависимости эффекта от дозы.

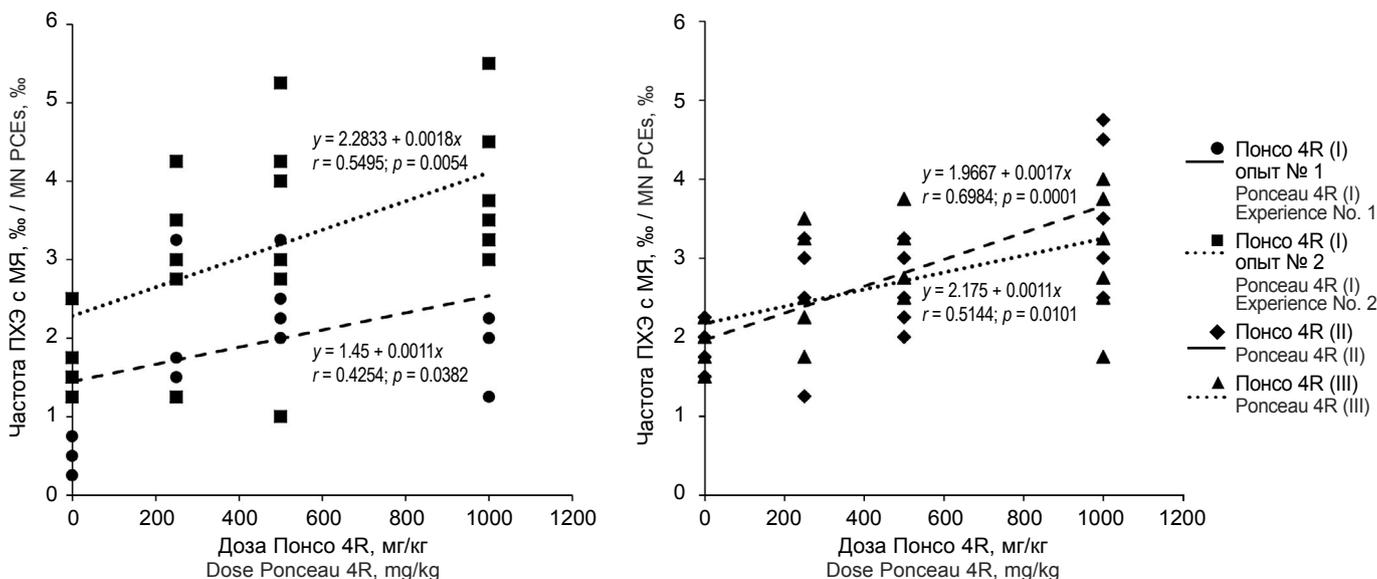
Результаты оценки цитогенетической активности образцов I, II, III пищевого красителя Понсо 4R

The results of the evaluation of the cytogenetic activity of I, II, III samples of the food dye Ponceau 4R

Опыт № Experience No.	Вещество Sample	Доза, мг/кг Dose, mg/kg	ПХЭ с МЯ, ‰ polychromatophilic erythrocytes (PCE) with micronuclei (MN), ‰		ПХЭ / (ПХЭ + НХЭ), % PCE / (PCE + normochromic erythrocytes (NCE)), %	
			<i>M</i> (95% ДИ / CI)	min–max	<i>M</i> (95% ДИ / CI)	min–max
1	Понсо 4R (I) / Ponceau 4R (I)	0 ¹	0.71 (0.15 ÷ 1.27)	0.25–1.75	51.92 (46.48 ÷ 57.35)	44.20–59.60
		250	2.38* (1.45 ÷ 3.30)	1.50–3.25	54.63 (48.59 ÷ 60.68)	44.90–61.70
		500	2.50*** (2.06 ÷ 2.94)	2.00–3.25	51.73 (44.27 ÷ 59.20)	40.20–61.00
		1000	2.13** (1.13 ÷ 2.71)	1.25–3.25	55.08 (50.42 ÷ 59.75)	47.90–60.80
		2000	1.92** (0.75 ÷ 3.09)	1.00–4.00	52.33 (45.98 ÷ 58.69)	42.50–59.50
	Циклофосфамид / Cyclophosphamide	10	8.58*** (6.37 ÷ 10.80)	6.00–11.00	56.32 (53.71 ÷ 58.92)	53.00–60.40
2	Понсо 4R (I) / Ponceau 4R (I)	0 ¹	1.88 (1.33 ÷ 2.42)	1.25–2.50	47.93 (44.37 ÷ 51.49)	44.00–52.60
		125	3.46** (2.35 ÷ 4.56)	2.25–5.00	46.43 (41.08 ÷ 51.79)	41.60–53.20
		250	3.17* (1.99 ÷ 4.35)	1.25–4.25	46.67 (39.90 ÷ 53.44)	40.40–58.00
		500	3.38* (1.83 ÷ 4.92)	1.00–5.25	47.00 (39.15 ÷ 54.85)	34.00–54.60
		1000	3.92*** (2.94 ÷ 4.89)	3.00–5.50	49.63 (41.90 ÷ 57.37)	36.60–57.20
	Циклофосфамид / Cyclophosphamide	10	9.25*** (7.62 ÷ 10.88)	7.75–12.00	45.73 (41.12 ÷ 50.34)	41.80–53.20
2	Понсо 4R (II) / Ponceau 4R (II)	0 ¹	1.75 (1.42 ÷ 2.08)	1.50–2.25	48.80 (46.11 ÷ 51.49)	45.00–51.80
		250	2.75* (1.92 ÷ 3.58)	1.25–3.25	38.20* (26.88 ÷ 49.52)	25.80–52.60
		500	2.71** (2.15 ÷ 3.27)	2.00–3.25	49.73 (43.43 ÷ 55.93)	43.40–58.00
		1000	3.63*** (2.72 ÷ 4.53)	2.50–4.75	50.60 (44.13 ÷ 57.07)	38.20–54.80
		2000	3.00** (2.40 ÷ 3.60)	2.25–3.75	46.70 (37.07 ÷ 56.33)	36.60–57.60
	Циклофосфамид / Cyclophosphamide	10	8.83*** (7.26 ÷ 10.40)	7.25–11.50	45.57 (41.49 ÷ 49.65)	42.20–52.20
2	Понсо 4R (III) / Ponceau 4R (III)	0 ¹	1.75 (1.42 ÷ 2.08)	1.50–2.25	48.80 (46.11 ÷ 51.49)	45.00–51.80
		250	2.79** (2.02 ÷ 3.56)	1.75–3.50	48.37 (40.88 ÷ 55.85)	39.20–61.20
		500	3.04*** (2.56 ÷ 3.52)	2.50–3.75	48.77 (38.43 ÷ 59.10)	33.40–61.20
		1000	3.00** (2.12 ÷ 3.88)	1.75–4.00	48.30 (44.68 ÷ 51.92)	44.80–53.20
		2000	3.08*** (2.57 ÷ 3.60)	2.25–3.75	42.30 (38.29 ÷ 46.31)	38.00–46.00
	Циклофосфамид / Cyclophosphamide	10	8.83*** (7.26 ÷ 10.40)	7.25–11.50	45.57 (41.49 ÷ 49.65)	42.20–52.20

Примечание. ¹ – отрицательный контроль «дистиллированная вода»; * – $p < 0,05$; ** – $p < 0,01$; *** – $p < 0,001$ при сравнении с параллельным отрицательным контролем (Т-критерий).

Note: ¹ – negative control «distilled water»; * – $p < 0.05$; ** – $p < 0.01$; *** – $p < 0.001$ when compared with a parallel negative control (T-test).



Линейные тренды зависимости частоты ПХЭ с МЯ от дозы для разных образцов Понсо 4R.

Linear trends in the dependence of the frequency of PCE with MN on the dose for different Ponceau 4R samples.

Для сравнения мутагенной эффективности разных образцов был выбран общий для всех экспериментов диапазон доз (см. рисунок).

Как видно на рисунке, тренды для Понсо (II) и Понсо (III) по результатам единого эксперимента различаются между собой не больше, чем тренды для Понсо (I) по данным двух независимых экспериментов (левый график). В связи с этим может возникнуть сомнение, не принадлежат ли образцы I, II и III к одной партии красителя. Однако все три образца имели непропорционально различающиеся спектральные отношения характеристических сигналов. Различия в амплитудах основных сигналов указывали на разное количественное содержание Понсо 4R в исследованных образцах, что исключает их принадлежность к одной партии.

Обсуждение

По данным литературы, в острых опытах на костном мозге мышей были испытаны четыре образца Понсо 4R, два из которых индуцировали аберрации хромосом [14] или МЯ [цит. по 12]. Два других были негативны в МТ [8, 15]. В нашей работе три образца E124 проявили мутагенную активность на проэритробластах костного мозга мышей в стандартной постановке МТ. Исследование ограничено рамками методологии применяемого теста и не позволяет определить механизм действия исследуемого пищевого красителя (анеугенный или кластогенный).

Анализ, проведённый методом ИК-спектроскопии среднего диапазона, установил подлинность субстанции Понсо 4R во всех изученных образцах и показал их принадлежность к разным партиям. Таким образом, нельзя думать, что полученные нами результаты в МТ можно отнести к случайной покупке трёх образцов красителя, принадлежащих к одной партии. Следовательно, в страну были завезены, разрешены к применению и поступили в продажу три потенциально опасные партии пищевого красителя E124. Полученные нами данные указывают на целесообразность продолжения работ по систематической оценке генетической безопасности применяемых в нашей стране пищевых добавок, как это ранее было предложено для пестицидов [21, 22]. В частности, адекватная проверка генотоксических свойств каждой партии синтетических красителей должна быть обязательным условием выдачи разрешения на применение.

Заключение

1. Понсо 4R был идентифицирован во всех образцах с помощью ИК-спектроскопии среднего диапазона
2. Для трёх образцов E124 из разных партий показано повышение частоты ПХЭ с МЯ ($p < 0,05-0,001$, критерий Т) после двукратного введения в желудок в дозах 125–2000 мг/кг в линейной зависимости от дозы ($p < 0,04-0,0001$). Доля ПХЭ от всех эритроцитов в костном мозге не изменялась.
3. Целесообразно организовать работу по систематической (в том числе экспериментальной) оценке генетической безопасности пищевых добавок, применяемых в нашей стране.

Литература (п.п. 1, 5–16, 19, 20 см. References)

2. Евразийская экономическая комиссия. *Требования безопасности пищевых добавок, ароматизаторов и технологических вспомогательных средств*. ТР ТС 029/2012; 2012.
3. Бессонов В.В. *Разработка методов и системы гигиенического контроля за использованием красителей в производстве пищевой продукции*: Автореф. дисс. ... д-ра биол. наук. М.; 2011.
4. Юрченко В.В., Ингель Ф.И., Ахальцева Л.В., Коняшкина М.А., Юрцева Н.А., Никитина Т.А. и др. Генетическая безопасность синтетических пищевых красителей. Обзор литературы. *Экологическая генетика*. 2021; 19(4): 323–41. <https://doi.org/10.17816/ecogen79399>
17. 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; 101(7): 798–801. <https://doi.org/10.47470/0016-9900-2022-101-7-798-801> <https://elibrary.ru/ouulgn>
18. Ахальцева Л.В., Юрченко В.В., Юрцева Н.А., Коняшкина М.А. Оценка генотоксичности пищевого красителя Жёлтый «солнечный закат» в микроядерном тесте *in vivo*. *Гигиена и санитария*. 2022; 101(9): 1093–7. <https://doi.org/10.47470/0016-9900-2022-101-9-1093-1097> <https://elibrary.ru/zwhjps>
21. Приказ Федеральной службы по надзору в сфере защиты прав потребителей и благополучия человека № 225 «О санитарно-эпидемиологической экспертизе пестицидов и агрохимикатов». М.; 2006.
22. Илюшина Н.А. Оценка эквивалентности техническим продуктам пестицидов-аналогов оригинальным действующим веществам по критерию «мутагенность». *Экологическая генетика*. 2019; 17(2): 101–12. <https://doi.org/10.17816/ecogen172101-112> <https://elibrary.ru/rdxvof>

References

1. EFSA Scientific Committee. Scientific Opinion on genotoxicity testing strategies applicable to food and feed safety assessment. *EFSA J.* 2011; 9(9): 2379. <https://doi.org/10.2903/j.efsa.2011.2379>
2. Eurasian Economic Commission. Safety requirements for food additives, flavorings and technological aids. TR CU 029/2012; 2012. (in Russian)
3. Bessonov V.V. *Development of methods and systems of hygienic control over the use of dyes in the production of food products*: Diss. Moscow; 2011. (in Russian)
4. Yurchenko V.V., Ingel' F.I., Akhal'tseva L.V., Konyashkina M.A., Yurtseva N.A., Nikitina T.A., et al. Genotoxic safety of synthetic food colours. Review. *Ekologicheskaya genetika*. 2021; 19(4): 323–41. <https://doi.org/10.17816/ecogen79399> <https://elibrary.ru/muulzs>
5. Yamjaia K., Nainar M.S., Varma S.K., Ambore N. Separation, identification and mutagenic assessment of the photodegradation products of Ponceau 4R (E124) in a beverage. *Anal. Methods*. 2016; 8(25): 5017–24. <https://doi.org/10.1039/C6AY00716C>
6. Ozaki A., Kitano M., Itoh N., Kuroda K., Furusawa N., Masuda T., et al. Mutagenicity and DNA-damaging activity of decomposed products of food colours under UV irradiation. *Food Chem. Toxicol.* 1998; 36(9–10): 811–7. [https://doi.org/10.1016/S0278-6915\(98\)00039-8](https://doi.org/10.1016/S0278-6915(98)00039-8)
7. OECD. Test No. 471: Bacterial Reverse Mutation Test, OECD Guidelines for the Testing of Chemicals, Section 4. Paris: OECD Publishing; 2020. <https://doi.org/10.1787/9789264071247-en>
8. Yamada M., Honma M. Summarized data of genotoxicity tests for designated food additives in Japan. *Genes Environ.* 2018; 40: 27. <https://doi.org/10.1186/s41021-018-0115-2>
9. Kirkland D., Levy D.D., LeBaron M.J., Aardema M.J., Beevers C., Bhalli J., et al. A comparison of transgenic rodent mutation and *in vivo* comet assay responses for 91 chemicals. *Mutat. Res. Genet. Toxicol. Environ. Mutagen.* 2019; 8396: 21–35. <https://doi.org/10.1016/j.mrgentox.2019.01.007>
10. Tsuda S., Murakami M., Matsusaka N., Kano K., Taniguchi K., Sasaki Y.F. DNA damage induced by red food dyes orally administered to pregnant and male mice. *Toxicol. Sci.* 2001; 61(1): 92–9. <https://doi.org/10.1093/toxsci/61.1.92>
11. Shimada C., Kano K., Sasaki Y.F., Sato I., Tsuda S. Differential colon DNA damage induced by azo food additives between rats and mice. *J. Toxicol. Sci.* 2010; 35(4): 547–54. <https://doi.org/10.2131/jts.35.547>
12. Sankaranarayanan N., Murthy M.S. Testing of some permitted food colours for the induction of gene conversion in diploid yeast. *Mutat. Res.* 1979; 67(4): 309–14. [https://doi.org/10.1016/0165-1218\(79\)90026-0](https://doi.org/10.1016/0165-1218(79)90026-0)
13. EFSA Panel on Food Additives and 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.
14. Agarwal K., Mukherjee A., Sharma A. In vivo cytogenetic studies on male mice exposed to Ponceau 4R and beta-carotene. *Cytobios.* 1993; 74(296): 23–8.
15. Hayashi M., Kishi M., Sofuni T., Ishidate M. Jr. Micronucleus tests in mice on 39 food additives and eight miscellaneous chemicals. *Food Chem. Toxicol.* 1988; 26(6): 487–500. [https://doi.org/10.1016/0278-6915\(88\)90001-4](https://doi.org/10.1016/0278-6915(88)90001-4)
16. EFSA. Statement on Allura Red AC and other sulphonated mono azo dyes authorised as food and feed additives. *EFSA J.* 2013; 11(6): 3234. <https://doi.org/10.2903/j.efsa.2013.3234>
17. Akhal'tseva L.V., Yurchenko V.V., Yurtseva N.A., Konyashkina M.A. Evaluation of the genotoxicity of the food dye tartrazine in a micronucleus test *in vivo*. *Gigiena i Sanitariya (Hygiene and Sanitation, Russian journal)*. 2022; 101(7): 798–801. <https://doi.org/10.47470/0016-9900-2022-101-7-798-801> <https://elibrary.ru/ouulgn> (in Russian)
18. Akhal'tseva L.V., Yurchenko V.V., Yurtseva N.A., Konyashkina M.A. Evaluation of the food dye sunset yellow FCF in a micronucleus test *in vivo*. *Gigiena i Sanitariya (Hygiene and Sanitation, Russian journal)*. 2022; 101(9): 1093–7. <https://doi.org/10.47470/0016-9900-2022-101-9-1093-1097> <https://elibrary.ru/zwhjps> (in Russian)
19. Commission Regulation (EU) No. 231/2012 laying down specifications for food additives listed in Annexes II and III to Regulation (EC) No. 1333/2008 of the European Parliament and of the Council. Available at: <https://data.europa.eu/eli/reg/2012/231/oj>
20. OECD. Test No. 474: Mammalian Erythrocyte Micronucleus Test. OECD Guidelines for the Testing of Chemicals, Section 4. Paris: OECD Publishing; 2016. <https://doi.org/10.1787/9789264264762-en>
21. Order of the Federal Service for Supervision of Consumer Rights Protection and Human Welfare № 225 «On Sanitary and Epidemiological Expertise of Pesticides and Agrochemicals». Moscow; 2006. (in Russian)
22. Ilyushina N.A. Assessment of the equivalence of technical materials of analogous pesticides to original active substances on the basis of «mutagenicity» criterion. *Ekologicheskaya genetika*. 2019; 17(2): 101–12. <https://doi.org/10.17816/ecogen172101-112> <https://elibrary.ru/rdxvof> (in Russian)