

ЦИТОСТАТИЧНА ДІЯ ХАРЧОВИХ АРОМАТИЗАТОРІВ НА МЕРИСТЕМИ КОРЕНІВ *ALLIUM CERA* L.

*М. В. Таран, аспірантка**

А. Ф. Ліханов, К. Є. Шаванова, кандидати біологічних наук

М. Ф. Стародуб, доктор біологічних наук

Досліджено вплив харчових ароматизаторів «Фундук», «Кава», «Карамель» на тест-об'єкт Allium sera L. Визначено вплив ароматизаторів на енергію проростання та схожість насіння. Показано особливості токсичного впливу досліджуваних речовин на апікальні меристеми коренів цибулі за затримкою їх росту, показниками мітотичного індексу та порушеннями процесу поділу клітин.

Ана-телофазний аналіз, хромосомні аберації, мітотичний індекс, харчовий ароматизатор.

Ринок продуктів харчової промисловості досить різноманітний. Виробництво харчових добавок у світі має тенденцію до безперервного кількісного та якісного зростання: в країнах Європи – на 2 %, у США – на 4,4 %, в Азії – на 10 – 15 % [6]. Більшість синтетичних харчових ароматизаторів представлена широким комплексом компонентів, які отримують шляхом хімічного синтезу, і хоча за їх складом та чистотою здійснюється постійний контроль, вони можуть бути небезпечними для здоров'я людини [1]. До того ж законодавством України не встановлено обов'язкового тестування нових харчових добавок на мутагенну активність, що створює потенційну небезпеку їх вживання.

Класичним методом дослідження токсичного і мутагенного впливу хімічних речовин на живі об'єкти є тест на клітинах рослин, зокрема кореневої меристеми *A. sera* L. (*Allium*-тест). Важливою перевагою цього методу є тісна кореляція його результатів з даними, що отримано на інших тест-системах [2, 3].

Мета досліджень – вивчення потенціальної небезпечності харчових ароматизаторів «Фундук», «Кава», «Карамель», їх цитостатичної та мутагенної дії.

Матеріали та методика досліджень. У роботі досліджували харчові ароматизатори: «Фундук» (компонентний склад: D-карбон – моноциклічний терпеноїд, ментофуран – 3,6-диметил-4,5,6,7-тетрагідробензофуран); «Кава» (компонентний склад: етилбутират $C_6H_{12}O_2$, β -дамаскон – $C_{13}H_{20}O$, ацетоїн-ацетилметилкарбінол (3-гідрокси-2-бутанон) $CH_3CH(OH)COCH_3$, мальтол); «Карамель» (компонентний склад: масляна кислота $CH_3CH_2CH_2COOH$, диацетил-2,3-бутадіон, диметилгіоксаль, $CH_3COCOCH_3$, дигідрокумарин ($C_9H_8O_2$), гамаокталактон – бутилбутиролактон, лактон 4-гідроксиоктанової кислоти, етилбутират – $C_6H_{12}O_2$, $CH_3CH_2CH_2COOC_2H_5$). Добові дози для ароматизаторів: «Фундук» – 0,5 мг/л, «Кава» – 0,5 мг/л, «Карамель» – 0,5 мг/л.

* Науковий керівник – доктор біологічних наук, професор М. Ф. Стародуб

Для виявлення хромосомних аберацій і цитостатичної дії досліджуваних речовин використовували *Allium*-тест. Насіння цибулі (*A. сера* L.) стерилізували в 1 %-ному розчині KMnO_4 , відмивали у воді та пророщували 72 год на фільтрувальному папері у чашках Петрі за температури 22 °С. Корінці довжиною 0,5 – 1 см фіксували 24 год у суміші Кларка, тричі відмивали дист. H_2O та 70% $\text{C}_2\text{H}_5\text{OH}$ і зберігали у 70 %-ному етиловому спирті. Хромосоми фарбували реактивом Шифа (Merk) методом холодного гідролізу за Фольгеним [5].

Як показник цитостатичної активності ароматизаторів використовували індекс мітотичної активності (MI) клітин кореневих меристем. Частоту аберантних анафаз (ЧАА) розраховували у відсотках, за співвідношенням аберантних ана-телофаз та всіх проаналізованих за формулою:

$$\text{ЧАА} = n_a \cdot 100 \% / n,$$

де n_a – кількість аберантних ана-телофаз; n – загальна кількість проаналізованих ана-телофаз.

Достовірність відмінностей показників MI і ЧАА у клітинах меристем здійснювали методом χ^2 . Первинну обробку отриманих даних виконували в пакеті аналізу програми Microsoft Office Excel 2007.

Результати досліджень. Пророщування насіння *A. сера* виявило лінійну залежність між швидкістю його проростання і концентрацією досліджуваних речовин. Встановлено, що збільшення концентрації ароматизаторів знижує енергію проростання. Найтоксичнішим виявився ароматизатор «Кава»: за концентрації 1,0 мг/л хімічні компоненти, що входять до його складу, повністю блокували проростання насіння (табл. 1).

1. Вплив харчових ароматизаторів на енергію проростання насіння *A. сера* L., %

Харчовий ароматизатор	Концентрація ароматизатора, мг/л					
	Контроль	0,2	0,4	0,6	0,8	1,0
«Фундук»	27,0 ± 1,34	15,0 ± 0,87	7,0 ± 0,57	3,0 ± 0,21	3,0 ± 0,21	1,0 ± 0,05
«Кава»	21,0 ± 1,07	11,0 ± 0,62	4,0 ± 0,38	2,0 ± 0,17	1,0 ± 0,05	0
«Карамель»	23,0 ± 1,13	12,0 ± 0,69	5,0 ± 0,42	2,0 ± 0,17	2,0 ± 0,17	1,0 ± 0,05

Слід зазначити, що насіння *A. сера* у контролі мало невисоку схожість 42 – 54 %, проте зі збільшенням концентрації харчових ароматизаторів, цей показник достовірно істотно знижувався (табл. 2).

2. Схожість насіння *Allium сера* L., %

Харчовий ароматизатор	Концентрація ароматизатора, мг/л					
	Контроль	0,2	0,4	0,6	0,8	1,0
Фундук	54 ± 2,03	30 ± 1,13	14 ± 0,78	6 ± 0,34	6 ± 0,34	2 ± 0,05
Кава	42 ± 1,45	22 ± 1,08	8 ± 0,43	4 ± 0,12	2 ± 0,05	0
Карамель	46 ± 1,76	24 ± 1,10	10 ± 0,65	4 ± 0,12	4 ± 0,12	2 ± 0,05

При пророщуванні коренів цибулин *A. сера* у розчинах ароматизаторів при концентраціях 0,2 – 0,6 мг/л процеси росту коренів уповільнювалися у 3 – 4 рази, а при концентраціях 0,8 – 1,0 мг/мл ріст коренів майже повністю призупинявся. У нормі зона найбільшої мітотичної активності клітин меристеми знаходилася на відстані 1300 – 1800 мкм від групи клітин центра спокою. У коренях, які пророщувалися у розчинах ароматизаторів «Кава» та «Фундук», зона активного поділу клітин зменшувалася в 3 – 6 разів (250 – 600 мкм).

Клітини, що знаходилися за ендодермою, після холодного гідролізу виявляли позитивну реакцію ДНК на фуксин-сірчану кислоту. Під впливом

синтетичного ароматизатора «Кава» в клітинах первинної кори коренів цибулі спостерігалось швидке руйнування нуклеїнових кислот (підтверджено реакцією Шифа на ДНК). Навіть за умов короткочасної (30 – 60 хв) обробки коренів ароматизаторами поділ клітин в апікальних меристемах майже повністю призупинявся (рис. 1).

Після обробки коренів синтетичними ароматизаторами поділ клітин уповільнювався. За показниками цитотоксичної дії швидкість дифузії діючих речовин, а також їх проникнення через апопласт свідчив про те, що процеси розтягнення і поділу клітин є чутливими до хімічних компонентів ароматизаторів. Під їх дією мітотичний індекс знижувався в 10 – 15 разів: з 8 – 12% до 0,5 – 1%.

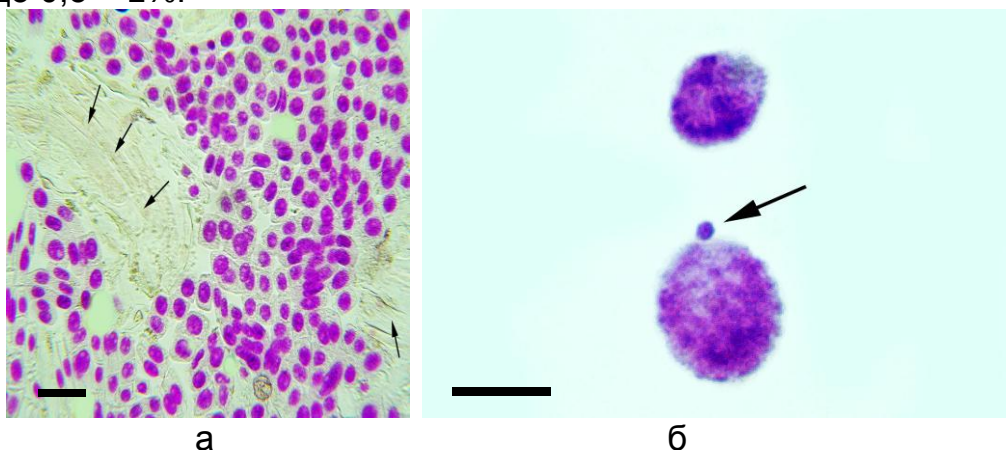


Рис.1. Цитотоксична та мутагенна дія харчового ароматизатору «Кава» на клітини апікальної меристеми *A. сера* (реакція Фьольгена на ДНК): а – деградація нуклеїнових кислот та зони некротизації клітин (лінійка – 30 мкм); б – утворення мікроядра показано стрілкою (лінійка – 10 мкм)

Внаслідок масових порушень поділу клітин, фрагментації і відставання окремих хромосом або їх фрагментів утворювалися чисельні клітини з мікроядрами діаметром від 0,8 до 3 мкм. Мікроядра в протопластах аберантних клітин з часом поступово руйнувалися. Таким чином, ядра в клітинах, що безпосередньо знаходилися під впливом синтетичних ароматизаторів, поступово набували ознак аномалій, втрачали ділянки або навіть цілі хромосоми. Порушення нормального мітозу, нерівноцінний розподіл генетичного матеріалу призводили до формування анеуплоїдних та поліплоїдних клітин, які виникали внаслідок К-мітозу, каріокінезу без цитокінезу та ін. За нашими даними фрагменти мітотичних хромосом іноді об'єднувалися в хромосомні агрегати, які наприкінці телофази утворювали окремі мікроядра (1, іноді 2, 3), або знову самозбиралися в ядрах за період проходження наступної інтерфази.

Цитогенетичні дослідження показали (табл. 3), що показники мітотичного індексу для ароматизаторів «Фундук» і «Карамель» достовірно не відрізнялися від контролю. Під впливом ароматизатора «Кава» мітотичний індекс був достовірно нижчим ($\chi^2 = 10,41$, $p < 0,01$).

3. Показники мітотичного індексу (MI) у клітинах *A. сера* під дією харчових ароматизаторів

Назва зразка	Проаналізовано клітин для обліку MI	MI $\pm$ Sp	Значення χ^2
Фундук	2400	5,08 $\pm$ 0,45	0,39

Кава	3900	3,10 ± 0,28*	10,41
Карамель	3600	4,89 ± 0,36	0,12
Контроль	2700	4,67 ± 0,41	-

* p<0,01

Оскільки достовірне відхилення значення МІ виявлено при використанні ароматизатора «Кава», нами було проведено аналіз тривалості проходження клітинами різних фаз мітозу. Частота абератних анафаз у клітинах коренів *А. сера* достовірно перевищувала контрольне значення лише в зразку «Кава». У зразках «Фундук» і «Карамель» достовірного відхилення не виявлено (табл. 4).

Отримані результати підтвердили вплив харчового ароматизатора «Кава» на співвідношення кількості клітин у різних фазах мітозу, його цитостатичну та мутагенну активність.

4. Частота абератних анафаз (ЧАА) у клітинах кореневої меристеми *А. сера* під впливом досліджуваних ароматизаторів

Назва зразка	Проаналізовано корінців	Проаналізовано анафаз	Виявлено абератних анафаз	ЧАА ± Sp	Значення χ^2
Фундук	13	537	19	3,54 ± 0,80	3,28
Кава	12	597	38	6,37 ± 1,00*	15,35
Карамель	7	643	17	2,64 ± 0,63	1,02
Контроль	9	555	9	1,62 ± 0,54	-

* p<0,001

Висновки

За показниками цитотоксичності досліджені ароматизатори можна розташувати так: «Кава», «Фундук», «Карамель». Встановлена пряма залежність між енергією проростання і схожості насіння *А. сера* та концентрацією харчових ароматизаторів. У концентраціях 0,2 – 0,6 мг/л ароматизатори уповільнювали рост коренів у 3 – 4 рази, при збільшенні їх концентрації до 0,8 – 1,0 мг/мл ріст коренів призупинявся. Харчовий ароматизатор «Кава» у концентрації 0,6 мг/л викликає порушення мітозу (асиметричні мітози, К-мітоз, утворення мікроядер) і викликає частковий некроз тканин в апікальних меристемах та зонах розтягнення клітин коренів *А. сера*.

Список літератури

1. Гончаренко Т. П. Харчові добавки як об'єкт моніторингових досліджень / Т. П. Гончаренко, О. Г. Гончаренко // Екологія довкілля та безпека життєдіяльності. – 2008. – №4. – С. 81–84.
2. Горová А. И. Методические аспекты оценки мутагенного фона и генетического риска для человека и биоты от действия мутагенных экологических факторов / А. И. Горová, Л. Ф. Бобырь, Т. В. Скворцова // Цитология и генетика. – 1996. – Т. 30, № 6. – С. 78–86.
3. Козовий Р. В. Розробка профілактики негативного впливу мутагенних чинників на спадковий апарат людини / Р. В. Козовий // Вісник Укр. товариства генетиків і селекціонерів. – 2005. – Т.3, №1–2. – С.80–85.
4. Лакин Г. Ф. Биометрия: учеб. пособие для вузов / Г. Ф. Лакин. – М: Высш. шк., 1990. – 352 с.

5. Паушева З. П. Практикум по цитологии растений / З.П.Паушева. – М.: Агропромиздат, 1988. – С. 138–170.

6. Смоляр В. І. Токсичні ефекти харчових добавок / В.І.Смоляр // Проблеми харчування. – 2005. – № 1. – С. 5–15.

Изучено влияние пищевых ароматизаторов «Фундук», «Кофе», «Карамель» на тест-объект Allium cepa L. Определено влияние ароматизаторов на энергию прорастания и всхожесть семян. Показано особенности токсического воздействия исследованных веществ на апикальные меристемы корней лука по показателям задержки роста, митотического индекса и нарушениями процесса деления клеток.

Ана-телофазный анализ, хромосомные aberrации, митотический индекс, пищевой ароматизатор.

The effect of food flavors on the Allium cepa L. test object was determined. It was estimated the vigor level, germination, mitotic index, aberrations in cells and the delay root growth of onions.

Ana-telophase analysis, chromosomal aberrations, mitotic index, food flavors.