

Читать
онлайн
Read
online

Ахальцева Л.В., Юрченко В.В., Юрцева Н.А., Коняшкина М.А.

Оценка генотоксичности пищевого красителя тартразина в микроядерном тесте *in vivo*

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

Введение. Пищевой азокраситель тартразин (E102) широко применяется при производстве продуктов питания, фармакологических и косметических средств. Несмотря на разрешение к применению, интерес к всесторонней оценке влияния пищевых красителей, особенно синтетических, на здоровье не ослабевает. Анализ данных литературы по оценке генотоксичности тартразина при исследованиях *in vivo* выявил некоторые противоречия результатов, что показало целесообразность испытания приобретённого в розничной продаже пищевого красителя в одном из рекомендованных тестов.

Материалы и методы. Генотоксичность тартразина (производство Индия, чистота 88,37%) изучена в микроядерном тесте на клетках костного мозга самцов мышей гибридов F1(CBAxС57Bl6/j). Исследуемое вещество двукратно вводили в желудок мышей в интервале доз 250–2000 мг/кг. Частоту полихроматофильных эритроцитов (ПХЭ) с микроядрами (МЯ) оценивали по результатам анализа 4000 ПХЭ. Долю ПХЭ среди всех эритроцитов определяли при анализе 1000 клеток на каждое животное.

Результаты. Не выявлено повышения частоты полихроматофильных эритроцитов с МЯ над параллельным отрицательным контролем при двукратном энтеральном введении тартразина во всех изученных дозах. Доля ПХЭ среди всех эритроцитов не изменялась.

Ограничения исследования обусловлены методологией теста: проанализированы только цитогенетические нарушения в единственной ткани в условиях двукратного введения изученного образца.

Заключение. Образец пищевого красителя тартразина (E102) в диапазоне доз 250–2000 мг/кг не проявил цитогенетической активности в микроядерном тесте *in vivo* на клетках костного мозга мышей при двукратном введении.

Ключевые слова: генотоксичность пищевых синтетических азокрасителей; тартразин; микроядерный тест *in vivo*; полихроматофильные эритроциты; костный мозг; 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), директивной Европейского парламента и Совета Европейского союза 2010/63/ЕС от 22.09.2010 г. о защите животных, использующихся для научных целей.

Для цитирования: 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>

Для корреспонденции: Ахальцева Людмила Вячеславовна, канд. биол. наук, ст. науч. сотр. отд. профилактической токсикологии и медико-биологических исследований ФГБУ «Центр стратегического планирования и управления медико-биологическими рисками здоровью» ФМБА России, 119121, Москва. E-mail: LAhalceva@cspmz.ru

Участие авторов: Ахальцева Л.В. – цитомный анализ, поиск источников литературы, анализ данных литературы, написание текста; Юрченко В.В. – концепция и дизайн исследования, работа с животными, приготовление препаратов для цитомного анализа, статистический анализ, анализ данных литературы, написание текста; Юрцева Н.А. – работа с животными, приготовление препаратов для цитомного анализа, цитомный анализ, поиск источников литературы; Коняшкина М.А. – работа с животными, приготовление препаратов для цитомного анализа, поиск источников литературы, анализ данных литературы. 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: 21.02.2022 / Принята к печати: 08.06.2022 / Опубликовано: 31.07.2022

Lyudmila V. Akhaltseva, Valentina V. Yurchenko, Nadezda A. Yurtseva, Mariya A. Konyashkina

Evaluation of the genotoxicity of the food dye tartrazine in a micronucleus test *in vivo*

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

Introduction. Food azo dye Tartrazine (E102) is widely used in the production of food, pharmacological and cosmetic products. Despite the approval for use, interest in a comprehensive assessment of the impact of food colours, especially synthetic ones, on health continues unabated. The analysis of literature evaluating the genotoxicity of Tartrazine *in vivo* studies revealed some inconsistencies in the results, that showed the possibility to test a retail food colouring in one of recommended tests.

Materials and methods. The Tartrazine genotoxicity (produced in India, purity 88.37%) was studied in the micronucleus test on male mouse bone marrow cells (hybrids F1 CBA x C57Bl6/j). The test substance was double enteral administrated in the dose range 250–2000 mg/kg. The frequency of polychromatophilic erythrocytes (PCEs) with micronuclei (MNs) was estimated by the analysis of 4000 PCEs. The proportion of PCE among all erythrocytes was determined by analyzing 1000 cells per animal.

Results. There was no increase in the frequency of micronucleated polychromatophilic erythrocytes over a concurrent negative control with double enteral administration of Tartrazine in all doses studied. The proportion of PCEs among all erythrocytes did not change.

Limitations of the study are due to the methodology of the test: only cytogenetic disorders in a single tissue were analyzed under conditions of double enteral administration of the studied sample.

Conclusion. The sample of the food dye Tartrazine (E 102) in the dose range of 250–2000 mg/kg did not show cytogenetic activity in the *in vivo* micronucleus test on mouse bone marrow cells after a double enteral administration.

Keywords: genotoxicity of food synthetic azo dyes; Tartrazine; *in vivo* micronucleus test; polychromatophilic erythrocytes; bone marrow; 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: Akhaltseva 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)

For correspondence: Lyudmila V. Akhaltseva, MD, PhD, Senior 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: LAhalceva@cspmz.ru

Information about the authors:

Akhaltseva L.V., <https://orcid.org/0000-0002-3619-3858>
Yurtseva N.A., <https://orcid.org/0000-0001-5031-2916>

Yurchenko V.V., <https://orcid.org/0000-0003-4377-245X>
Konyashkina M.A., <https://orcid.org/0000-0002-8319-1329>

Contribution: Akhaltseva L.V. – cytome analysis, search for literature sources, analysis of literature, writing a text; Yurchenko V.V. – concept and design of the study, work with animals, preparation of preparations for cytome analysis, statistical analysis, analysis of literature, writing a text; Yurtseva N.A. – work with animals, preparation of preparations for cytome analysis, cytome analysis, search for literature sources; Konyashkina M.A. – work with animals, preparation of preparations for cytome analysis, search for literature sources, analysis of literature. 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: February 21, 2022 / Accepted: June 08, 2022 / Published: July 31, 2022

Введение

Пищевые азокрасители (ПаК) интенсивно применяют во всём мире. Так, например, на долю трёх азокрасителей (красный очаровательный, жёлтый «солнечный закат» и тартразин) приходится 90% потребления всех пищевых красителей, используемых в США [1]. Пищевая добавка тартразин (E102) относится к группе синтетических пищевых красителей, содержащих азогруппу, и широко применяется в процессе производства для придания цвета продуктам питания, фармакологическим и косметическим средствам. Несмотря на быстрые темпы внедрения в практику натуральных красителей, объём использования синтетических продолжает расти. Так, за 2017 г. при создании новых продуктов питания применение тартразина увеличилось на 6,7% [2].

Группа экспертов Объединённого комитета ФАО/ВОЗ по безопасности пищевых добавок (JEFSA) на основании исследований, в том числе по изучению мутагенной активности, пришла к выводу, что употребление тартразина с пищей не представляет опасности для здоровья населения, и изменила верхнюю границу допустимой суточной дозы (ADI) с 7,5 до 10 мг/кг массы тела [3, 4].

Для оценки генотоксического потенциала различных факторов окружающей среды, в том числе и пищевых красителей, рекомендованы батареи тестов, включающие методы *in vitro* и *in vivo* [5, 6]. Однако результаты оценки мутагенной активности пищевых синтетических красителей в тестах *in vivo* в литературе, доступной в настоящее время, оказались довольно противоречивыми [7]. Поэтому представлялось целесообразным оценить мутагенный потенциал ПаК, присутствующих на отечественном рынке, в частности тартразина, в микроядерном тесте на клетках костного мозга мышей.

Микроядерный тест на млекопитающих *in vivo* используется для выявления повреждений хромосом или митотического аппарата в эритроцитах, вызванных тестируемым веществом, что приводит к появлению в цитоплазме микроядер (МЯ), содержащих отставшие в митозе фрагменты хромосом или целые хромосомы. Анализируют созревающие полихроматофильные эритроциты (ПХЭ) в костном мозге на наличие МЯ, оставшихся в цитоплазме после вытеснения основного ядра. Достоверное увеличение частоты ПХЭ с микроядрами у обработанных испытуемым веществом животных в сравнении с контрольными является признаком индуцированного повреждения хромосом.

Материалы и методы

В работе использовали приобретённый в розничной продаже пищевой краситель тартразин (E102, CAS 1934–21–0), произведённый на заводе Roha Dyechem PVT. LTD (Индия, партия № RP19020586, серия 1007284496–1007284554), согласно стандартам Директивы Комиссии Европейского союза 2012/231/ЕС [8]. Приобретённый образец имеет Декларацию о соответствии красок техническому регламенту Евразийского экономического союза. Содержание в продукте красящих веществ составляет 88,37%.

В качестве экспериментальных животных использовали конвенциональных самцов мышей гибридов F1 (СВАхС57В16/ж) двухмесячного возраста (НПП «Питомник лабораторных животных» ФИБХ РАН). В состав каждой группы входило 6 особей. Животных содержали при 12-часовом световом режиме в условиях свободного доступа к воде и пище.

Эксперимент проводили в соответствии с официальными документами [9, 10]. Учитывая, что применение красителей в пищевой промышленности предусматривает их поступление в организм человека с пищей, в экспериментах на мышах использовали пероральный путь введения. По данным литературы, ЛД₅₀ тартразина для мышей при введении в желудок составляет 12 750 мг/кг [3], поэтому в качестве максимальной использовали дозу 2000 мг/кг, принятую для оценки генотоксических эффектов малотоксичных соединений [10].

Для проведения эксперимента готовили 20%-й раствор тартразина в дистиллированной воде *ex tempore*. Растворы для введения красителя в более низких концентрациях получали путём последовательных разведений. Всего изучали эффекты четырёх доз: 250; 500; 1000 и 2000 мг/кг массы тела животного. Растворы вводили мышам в желудок зондом в объёме 100 мкл/10 г массы тела двукратно с интервалом 24 ч. Цитогенетические препараты готовили через 24 ч после второго введения.

Мышам группы отрицательного контроля в том же режиме вводили дистиллированную воду (100 мкл/10 г массы тела), животным группы положительного контроля вводили циклофосфамид (Эндоксан, Вахтер, Германия, серия 9D301A) в дозе 10 мг/кг внутривентриально однократно за 24 ч до эвтаназии цервикальной дислокацией.

Костный мозг вымывали эмбриональной телячьей сывороткой (ООО НПП «ПанЭко», серия S00E31), центрифугировали, мазки готовили стандартным способом, подсушивали на воздухе и окрашивали азураном с использованием набора красителей Лейкокодиф 200 (Erba Lachema, Чехия).

Частота ПХЭ с МЯ в костном мозге мышей при двукратном введении тартразина

The prevalence of micronuclei polychromatophiles (MN PCE) in the bone marrow of mice after a double administration of Tartrazine

| Доза, мг/кг Dose, mg/kg | ПХЭ с МЯ, %* MN PCE, %* | ПХЭ/(ПХЭ + НХЭ), %* PCE/(PCE + Normochromic erythrocyte (NCE)), %* |
|---------------------------------------|----------------------------------|---|
| 0 (контроль) (control) | 2.21 (1.73 ÷ 2.69) 1.50–2.75 | 53.48 (49.53 ÷ 57.43) 48.40–58.70 |
| 250 | 1.96 (1.70 ÷ 2.22) 1.75–2.25 | 52.18 (47.38 ÷ 56.99) 48.30–61.10 |
| 500 | 1.67 (1.05 ÷ 2.28) 0.75–2.50 | 50.25 (47.64 ÷ 52.86) 43.50–62.60 |
| 1000 | 1.83 (1.22 ÷ 2.45) 1.25–2.75 | 51.38 (43.94 ÷ 58.83) 39.60–61.20 |
| 2000 | 1.71 (0.52 ÷ 2.90) 0.75–3.50 | 53.33 (49.37 ÷ 57.30) 47.10–57.40 |
| 10 (циклофосфамид / cyclophosphamide) | 8.83** (7.56 ÷ 10.10) 6.75–10.25 | 50.63 (44.90 ÷ 56.37) 41.20–57.10 |

Примечание. * – приведены средние значения (95%-й ДИ), min-max; ** – $p < 0,001$ при сравнении с параллельным отрицательным контролем (t -критерий Стьюдента).

Note: * – average values are given (95% CI), min-max; ** – $p < 0.001$ when compared with a parallel negative control (t -test).

Перед началом цитогенетического анализа препараты шифровали с помощью генератора случайных чисел.

Анализ полученных препаратов проводили методом световой микроскопии (микроскоп Olympus BX-41, Япония, увеличение 10×100 с масляной иммерсией).

От каждого животного анализировали 4000 ПХЭ [10]. Учитывали ПХЭ с микроядрами. Долю ПХЭ от суммы полихроматофильных и нормохромных эритроцитов ПХЭ/(ПХЭ+НХЭ) определяли при подсчёте 1000 эритроцитов.

Статистическую обработку экспериментальных данных проводили в программе Statistica 10 for Windows путём сравнения опытных групп с группой отрицательного контроля с использованием t -критерия Стьюдента для независимых групп данных. Значимыми считали различия при $p \leq 0,05$.

Результаты

Результаты оценки мутагенных свойств тартразина приведены в таблице.

В группе отрицательного контроля среднее значение частоты ПХЭ с МЯ составило 2,21 (1,73–2,69)‰, что близко к накопленному лабораторному отрицательному контролю ($X_{cp.} = 1,64$; ДИ 1,31 ÷ 1,97‰).

Воздействие тартразина во всех испытанных дозах не вызывало изменения фоновых уровней частоты ПХЭ с МЯ. Кроме того, тартразин не влиял на процессы продукции и созревания эритроцитов в костном мозге мышей. Так, доля ПХЭ среди всех эритроцитов во всех опытных группах не отличалась от параллельного отрицательного контроля ($X_{cp.} = 53,48$; ДИ 49,53 ÷ 57,43‰) и была близка к накопленному контролю ($X_{cp.} = 49,87$ %; ДИ 47,94 ÷ 51,79%). Таким образом, в эксперименте пищевой краситель Е102 не проявил цитогенетической активности на проэритроцитах костного мозга мышей в испытанных режимах применения.

Обсуждение

Анализ данных литературы показал, что в различных тестах *in vivo* по испытанию тартразина на генотоксичность получены противоречивые результаты. В работе [11] тартразин (Allied Chemical Co. Morristown, NJ, чистота 94%) не индуцировал внепланового синтеза ДНК в первичной культуре гепатоцитов от крыс, которым вводили через желудочный зонд пищевой краситель в дозе 500 мг/кг, в постановке *in vivo* и *in vitro*. В тесте ДНК-комет отрицательный результат был получен на клетках печени, кишечника и желудка мышей при трёхкратном введении тартразина (Sensient Colors, LLC, USA, чистота > 85%) в дозах от 25 до 2000 мг/кг [12]. Положительные ответы были получены в остром опыте на клетках желудка и толстой кишки мышей в дозах от 10 мг/кг и выше (Tokyo Kasei Kogyo Industry Ltd., Japan) [13], а также в хронических экспериментах на крысах в дозах от 3 мг/кг

(Courtex International, France) [14] до 15 мг/кг [15] с использованием клеток печени, почек, в дозе 7,5 мг/кг – на клетках костного мозга [16] и лейкоцитах крови крыс (Sigma-Aldrich, Germany, чистота 86,7%) [17].

Тартразин не проявил мутагенной активности в микроядерном тесте на полихроматофильных эритроцитах костного мозга мышей при трёхкратном введении в дозах от 25 до 2000 мг/кг (Sensient Colors, LLC, USA, чистота > 85%) [12] и на энтероцитах мышей [18] при двукратном введении от 20 до 1000 мг/кг (Sigma-Aldrich, Saint Quentin Fallavier, France, чистота 90%), но с достоверным повышением митотической активности клеток эпителия кишечника в дозах 20 и 200 мг/кг. В тесте на индукцию aberrаций хромосом в клетках костного мозга мышей отрицательные результаты были получены в острых опытах при использовании максимальных доз тартразина в пределах 5 мг/кг (пятикратное введение) [19] и 200 мг/кг [20]. Однако частота aberrаций хромосом у крыс повышалась при хроническом (7 нед) поступлении тартразина с кормом и/или водой в дозе 7,5–15 мг/кг массы тела в день [15], а также у мышей и крыс при поступлении в течение 3–9 мес в дозах от 200 до 1000 мг/кг массы тела в день [21]. В последней работе [21] тартразин также индуцировал сестринские хроматидные обмены в клетках костного мозга млекопитающих. Пероральное введение беременным мышам тартразина в дозе 68 мг/кг массы тела в день в течение первых семи дней беременности вызывало увеличение частоты aberrаций хромосом и снижение митотического индекса в клетках костного мозга самок и в эмбриональных клетках [22].

Следует отметить, что публикаций по изучению генотоксичности тартразина в тестах *in vivo* не так много, и в некоторых из них проведение эксперимента не полностью соответствует требованиям руководств OECD [10, 23, 24]. Так, в работе [20] выполнялось внутрибрюшинное введение тартразина животным, а не характерный для испытания ПаК энтеральный путь поступления вещества в организм, который благодаря контакту краски с кишечной микрофлорой способствует восстановлению азосвязей, расщеплению крупных молекул и образованию легко всасывающихся сульфаниловой кислоты и ароматических аминов, что повышает резорбцию краски [25, 26]. В некоторых публикациях число животных на группу отличалось от рекомендованного в руководствах OECD (не менее 5 животных) и составляло 4 [13, 20] или менее [15]. В некоторых работах испытывали менее трёх рекомендуемых доз тартразина [14, 15, 17], что не позволяет определить наличие или отсутствие статистически значимой линейной зависимости эффекта от дозы. В отдельных случаях допустимо применение одной, но предельной рекомендованной дозы – 1000 или 2000 мг/кг массы тела в день [10, 23]. В ряде работ [14–20, 22] выбор максимальных доз не всегда был на уровне 2000 или 1000 мг/кг массы тела животного в зависимости от продолжительности

эксперимента (менее 14 дней и более 14 дней соответственно). Противоречивость литературных данных может быть связана с изучением образцов пищевого красителя от разных производителей (зачастую без указания производителя, степени чистоты, номера партии), разнообразием в выборе доз, продолжительности экспозиции, разным объёмом выборок и другими причинами.

Настоящее исследование ограничено рамками методологии применяемого теста: проанализированы только цитогенетические нарушения в единственной ткани (костный мозг) в условиях двукратного введения изученного образца без учёта генных мутаций. Говорить о полном отсутствии генотоксической активности испытуемого образца можно

только в совокупности с другими рекомендованными исследованиями *in vitro* и *in vivo*.

Заключение

В настоящей работе образец пищевого красителя тартазина (E102) производства Roha Dychem PVT. LTD (Индия) чистотой 88,37%, изученный согласно рекомендациям [9, 10] в микроядерном тесте *in vivo*, показал отсутствие цитогенетической активности на клетках костного мозга самцов мышей гибридов F1 (СВАхС57В16/ж) в условиях двукратного введения в дозах 250; 500; 1000 и 2000 мг/кг массы тела животного.

Литература

(п.п. 1, 3–6, 8, 10–18, 20–26 см. References)

2. ГИОРД. Мировой рынок пищевых красителей: интенсивный рост натурального сегмента. Доступно: https://www.giord.ru/news/novosti_otrasli/mirovoy_rynok_pishchevykh_krasiteley_intensivnyy_rost_naturalnogo_segmenta/
7. 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>
9. Руководство Р 1.2.3156-13. Оценка токсичности и опасности химических веществ и их смесей для здоровья человека. М.; 2014.
19. Дурнев А.Д., Орешенко А.В., Кулакова А.В., Берестень Н.Ф. Анализ цитологической активности пищевых красителей. *Вопросы медицинской химии*. 1995; (5): 50–3.
1. Kobylewski S., Jacobson M.F. Toxicology of food dyes. *Int. J. Occup. Environ. Health*. 2012; 18(3): 220–46. <https://doi.org/10.1179/1077352512z.00000000034>
2. GIORД. The world market of food dyes: intensive growth of the natural segment. Available at: https://www.giord.ru/news/novosti_otrasli/mirovoy_rynok_pishchevykh_krasiteley_intensivnyy_rost_naturalnogo_segmenta/ (in Russian)
3. European Food Safety Authority. Scientific opinion on the re-evaluation of tartrazine (E 102) as a food additive. *EFSA J*. 2009; 7(11): 1331–82. <https://doi.org/10.2903/j.efsa.2009.1331>
4. WHO. Food Additives Series, No. 73. Safety evaluation of certain food additives: prepared by the Eighty-second meeting of the Joint FAO/WHO Expert Committee on Food Additives (JECFA). Geneva; 2017.
5. EMA/CHMP/ICH/126642/2008. ICH guideline S2 (R1) on genotoxicity testing and data interpretation for pharmaceuticals intended for human use. European Medicines Agency; 2013. Available at: https://www.ema.europa.eu/en/documents/scientific-guideline/ich-guideline-s2-r1-genotoxicity-testing-data-interpretation-pharmaceuticals-intended-human-use-step_en.pdf
6. Committee on Mutagenicity of Chemicals in Food, Consumer Products, and the Environment. Interim guidance on a strategy for genotoxicity testing and mutagenic hazard assessment of impurities in chemical substances; 2012. Available at: https://assets.publishing.service.gov.uk/government/uploads/system/uploads/attachment_data/file/1043249/strategy-for-genotoxicity-testing-of-chemicals-guidance.pdf
7. 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> (in Russian)
8. 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.
9. Guide P 1.2.3156-13. Assessment of toxicity and hazards of chemicals and their mixtures for human health. Moscow; 2014. (in Russian)
10. 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>
11. Kornbrust D., Barfknecht T. Testing of 24 food, drug, cosmetic, and fabric dyes in the *in vitro* and the *in vivo/in vitro* rat hepatocyte primary culture/DNA repair assay. *Environ. Mutagen*. 1985; 7(1): 101–20. <https://doi.org/10.1002/em.2860070106>
12. Bastaki M., Farrell T., Bhusari S., Pant K., Kulkarni R. Lack of genotoxicity in vivo for food color additive Tartrazine. *Food Chem. Toxicol*. 2017; 105: 278–84. <https://doi.org/10.1016/j.fct.2017.04.034>
13. Sasaki Y.F., Kawaguchi S., Kamaya A., Ohshita M., Kabasawa K., Iwama K., et al. The comet assay with 8 mouse organs: results with 39 currently used food additives. *Mutat. Res*. 2002; 519(1–2): 103–19. [https://doi.org/10.1016/S1383-5718\(02\)00128-6](https://doi.org/10.1016/S1383-5718(02)00128-6)
14. Abo-El-Sooud K., Hashem M.M., Badr Y.A., Eleiwa M.M.E., Gab-Allaha A.Q., Abd-Elhakim Y.M., et al. Assessment of hepato-renal damage and genotoxicity induced by long-term exposure to five permitted food additives in rats. *Environ. Sci. Pollut. Res. Int*. 2018; 25(26): 26341–50. <https://doi.org/10.1007/s11356-018-2665-z>
15. Hassan G.M. Effects of some synthetic coloring additives on DNA damage and chromosomal aberrations of rats. *Arab. J. Biotech*. 2010; 13(1): 13–24.
16. El-Desoky G.E., Wabaidur S.M., AlOthman Z.A., Habila M.A. Regulatory role of nano-curcumin against tartrazine-induced oxidative stress, apoptosis-related genes expression, and genotoxicity in rats. *Molecules*. 2020; 25(24): 5801. <https://doi.org/10.3390/molecules25245801>
17. Khayyat L., Essawy A., Sorour J., Soffar A. Tartrazine induced structural and functional aberrations and genotoxic effects *in vivo*. *Peer J*. 2017; 5: e3041. <https://doi.org/10.7717/peerj.3041>
18. Poul M., Jarry G., Elhkim M.O., Poul J.M. Lack of genotoxic effect of food dyes amaranth, sunset yellow and tartrazine and their metabolites in the gut micro assay in mice. *Food Chem. Toxicol*. 2009; 47(2): 443–8. <https://doi.org/10.1016/j.fct.2008.11.034>
19. Durnev A.D., Oreshchenko A.V., Kulakova A.V., Beresten N.F. Analysis of cytogenetic activity of food dyes. *Voprosy meditsinskoy khimii*. 1995; (5): 50–3. (in Russian)
20. Das A., Mukherjee A. Genotoxicity testing of the food colours amaranth and tartrazine. *Int. J. Hum. Genet*. 2004; 4(4): 277–80. <https://doi.org/10.1080/09723757.2004.11885906>
21. Giri A.K., Das S.K., Talukder G., Sharma A. Sister chromatid exchange and chromosome aberrations induced by curcumin and tartrazine on mammalian cells in vivo. *Cytobios*. 1990; 62(249): 111–7.
22. Farag I.M., Abdel Aziz K.B., El-Nahass E., Zaher M., Hegazy M.A., Roshdy H.M. Cytogenetic studies on the effects of Tartrazine, beta-carotene and a mixture of both dyes on pregnant mice and their embryos. *Bull. Natl Res. Cent. (Egypt)*. 2001; 26(1): 93–109.
23. OECD. Test No. 475: Mammalian Bone Marrow Chromosomal Aberration Test. OECD Guidelines for the Testing of Chemicals; Section 4. Paris: OECD Publishing; 2016. <https://doi.org/10.1787/9789264264786-en>
24. OECD. Test No. 489: In Vivo Mammalian Alkaline Comet Assay. OECD Guidelines for the Testing of Chemicals; Section 4. Paris: OECD Publishing; 2016. <https://doi.org/10.1787/9789264264885-en>
25. Brown J.P. Role of gut bacterial flora in nutrition and health: a review of recent advances in bacteriological techniques, metabolism and factors affecting flora composition. *Crit. Rev. Food Sci. Nutr*. 1977; 8(3): 229. <https://doi.org/10.1080/10408397709527224>
26. Brown J.P. Reduction of polymeric azo and nitro dyes by intestinal bacteria. *Appl. Environ. Microbiol*. 1981; 41(5): 1283–6. <https://doi.org/10.1128/aem.41.5.1283-1286.1981>