

Список литературы

Поддубная-Арнольди В.А. Цитозембриология покрытосеменных растений. М.: Наука, 1976. 507 с.

Семенов В.И., Семенова Е.В., Капицына Л.Ф. Изучение характера конъюгации хромосом и анеуплоидии в связи с плодовитостью автотетраплоидной кукурузы // Генетика. 1969. Т. 5, № 10. С. 67–83.

Хаджинов М.И., Щербак В.С. Полиплоидия у кукурузы // Теоретические и практические проблемы полиплоидии. М.: Наука, 1974. С. 27–41.

Чеботарь А.А. Эмбриология кукурузы. Кишинев: Штиинца, 1972. 384 с.

УДК 633.15-035.67:615.918

ТОКСИКОЛОГИЧЕСКАЯ, КАНЦЕРОГЕННАЯ И МУТАГЕННАЯ
БЕЗОПАСНОСТЬ АНТОЦИАНОВОЙ ФОРМЫ КУКУРУЗЫ
КАК ИСТОЧНИКА КРАСНОГО КРАСИТЕЛЯ

Н.В. Полуконова, И.А. Фёдорова, А.В. Гопиенко*, В.С. Тырнов*

Саратовский государственный медицинский университет

им. В.И. Разумовского

410012, Саратов, ул. Б. Казачья, 112; e-mail: ecoton@rambler.ru

** Саратовский государственный университет им. Н.Г. Чернышевского
410012, Саратов, ул. Астраханская, 83*

Проведена оценка токсикологической, канцеро- и мутагенной безопасности фармакологической композиции сырья антоциановой формы кукурузы *Zea mays* L. для ее дальнейшего внедрения в пищевую и фармацевтическую промышленность. Токсическая оценка проведена на личинках двукрылых насекомых – хирономидах (*Chironomus plumosus*), оценка канцерогенности – на рыбах *Danio rerio*, оценка мутагенности – на мушках *Drosophila melanogaster*. Установлено, что вытяжка сырья кукурузы, приготовленная с целью ее использования как антоцианового красителя, не обладает токсичностью, канцеро- и мутагенной активностью.

Ключевые слова: антоциановая кукуруза, оценка токсической, канцеро- и мутагенной безопасности, *Chironomus plumosus*, *Danio rerio*, *Drosophila melanogaster*.

Антоциановые формы кукурузы *Zea mays* L. представляют большой интерес в плане поиска принципиально нового источника красного красителя для фармацевтической и пищевой промышленности. В результате проведенного ранее фитохимического анализа водно-спиртового экстракта антоциановой формы кукурузы установлено (Купчак, 1998; Полуконова и др., 2010), что сырье исследуемого растения содержит девять фенольных

соединений, из которых три антоциана: цианидин, 3-О-β-D-гликопиранозид цианидина (хризантемин), 3-О-β-D-галактопиранозид цианидина (идеин), пять флавоноидов: 5,7,4'-тригидрокси-3',5'-диметоксифлавонол (трицин), 3,5,7,4'-тетрагидроксифлавонол (кемпферол), 3,5,7,3',4'-пентагидроксифлавонол (кверцетин), 3-О-β-D-гликопиранозид кемпферола (астрагалин), 3-О-β-D-гликопиранозид кверцетина (изокверцетин) и одно производное оксикоричной кислоты: 3-О-п-кумароилхинная кислота, а также: этиловый эфир гексадекановой кислоты; 5-гидроксиметил-2-фураальдегид; 1-(4-метоксифенил) – метоксипропан; 2,3-дигидро-3,5-дигидрокси-6-метил-4Н-пиран-4-он; гексадекановая кислота (пальмитиновая кислота); этиловый эфир линоленовой кислоты; 9,12-октадекановая кислота; 2-(5-хлор-2-метоксифенил) пиррол. Выявлено отсутствие антрагликозидов, дубильных веществ, кумаринов, кардиотонических гликозидов и алкалоидов (Купчак, 1998).

Преимуществами сырья антоциановой формы кукурузы служат не только устойчивость получаемого красителя, но и содержание целого комплекса биологически активных веществ с положительным фармакологическим действием (Купчак и др., 1995). Так, была выявлена антимикробная активность водно-спиртового экстракта антоциановой формы кукурузы в отношении тест-штаммов синегнойной палочки и стафилококка (Полуконова и др., 2010). Химический состав данной фармакологической композиции свидетельствует о ее потенциальной противоопухолевой, антиоксидантной и другой фармакологической активности.

Согласно принятым Фармкомитетом стандартам (материалы <<http://www.medline.ru/public/fund/pharmcom/>>фармкомитета РФ, 2005) для любого вида сырья при внедрении в пищевую и фармацевтическую промышленность необходимо его тестирование на токсичность, канцеро- и мутагенность на установленных биологических объектах.

Цель настоящей работы – оценить токсикологическую, канцеро- и мутагенную безопасность фармакологической композиции сырья антоциановой формы кукурузы *Zea mays* L., соответственно, на хирономидах *Chironomus plumosus*, рыбах *Danio rerio* и *Drosophila melanogaster*, для ее дальнейшего внедрения в пищевую и фармацевтическую промышленность.

Материал и методы

Материалом служила специально созданная гомозиготная линия кукурузы на кафедре генетики Саратовского государственного университета.

Высушенное сырье гибридной формы кукурузы *Zea mays* L. (сбора 2009 г.) характеризуется темно-фиолетовой окраской стеблей, листьев, со-

цветий и кроющих листьев початков. Приготовление водного и водно-спиртового экстракта проводили по стандартным методикам (ГФ, 1990).

В качестве биологических объектов использованы личинки комаров-звонцов *Ch. plumosus* IV возраста, аквариумные рыбы *D. rerio* (размер 2,5–3,5 см, масса тела 150–250 мг), а также *D. melanogaster* тестерных линий «Canton-S» и «M-5 W^a bar».

Токсикологический краткосрочный скрининговый тест на *Ch. plumosus* проводили при комнатной температуре в непроточных условиях. Использовали разведения исходного раствора в 2, 5 и 10 раз и исходный раствор без разведения в 2 повторностях. В опытные и контрольные емкости помещали по 10 особей. Длительность острого эксперимента составила 48 ч, в течение которых личинок не кормили. Токсическое действие раствора оценивали по критерию выживаемости и изменению морфофункционального состояния личинок. Состояние морфофункциональных изменений личинок оценивалось по десятибалльной шкале (Фёдорова, 2009). Устанавливали диапазон концентраций исследуемого препарата, вызывающих гибель 50% (LC₅₀) особей.

Тест на аквариумных рыбах *D. rerio* (Н) проводили в прямоугольных аквариумах емкостью 10 л, в помещении без вредных испарений и газов при комнатной температуре в непроточных, аэрируемых условиях (компрессор марки «AQUAEL APR-200 п/ч 3В», распылитель марки «AS-25 двухканальный»). Использовали дехлорированную, фильтрованную с помощью фильтра (марка «ФВ Гейзер 1 УЖ-евро») воду, которую отстаивали 3 сут. Рыб кормили основным кормом для всех видов аквариумных рыб «Tetra Min». В опытные и контрольные емкости помещали по 12 особей. Применялся метод растворения препарата в воде аквариумов (иммерсия).

Учитывали выживаемость, активность, окраску подопытных животных. Устанавливали диапазон концентраций исследуемого препарата, вызывающих гибель 50% (LC₅₀) особей. Параметры острой токсичности – LC₅₀, LC₁₀₀ – определяли с помощью пробит-анализа (Коросов, Калинкина, 2003) и аналитического экспресс-метода (Фрумин, 1991). Класс опасности устанавливали на основе Приказа МПР России от 15.06.2001 № 511 (позитивные результаты указывали на отсутствие необходимости дополнительной оценки на токсичность).

В тесте на канцерогенность у рыб *D. rerio* использована стандартная концентрация – 1/5 от LC₅₀, что на данном виде сырья составило 0,3 г/л. В течение острого эксперимента смена воды не производилась. Продолжительность острого опыта составила 96 ч, подострого – 14 сут., хронического – 60 сут. В течение подострого и хронического для поддержания концентрации в воде производилась регулярная смена воды 1 раз в двое суток.

D. melanogaster линий дикого типа с хорошо изученным спонтанным фоном мутабельности для опытов по учету рецессивных, сцепленных с полом летальных мутаций (РСПЛМ) – «Canton-S» и тестерной линии «M-5 W^a bar». Рекомендательный метод «Меллер-5» основан на индукции рецессивных летальных мутаций в X-хромосоме самцов дикого типа линии «Canton-S», передающихся через самок F₁ самцам второго поколения, не доживающим до стадии имаго. В X-хромосоме мух этой линии имеются 2 инверсии, которые полностью исключают возможность кроссинговера между половыми хромосомами, не нарушая жизнеспособности дрозофилы. Фенотипическими маркерами служат мутации Apricot – абрикосовые глаза и Bar – полосковидные глаза.

Концентрации исследуемой водной вытяжки – 8 мг/мл и 16 мг/мл. Использован пероральный (с пищей) способ введения исследуемого экстракта путем внесения в равных объемах в стандартную питательную среду в пробирках диаметром 1,5 см. Длительность экспозиций составила до 5 суток.

Результаты и их обсуждение

В первой экспериментальной серии влияния водного экстракта на личинок *Ch. plumosus* анализировали характер токсического воздействия при разведении исходного раствора в 2, 5 и 10 раз ($30 \cdot 10^{-3}$, $12 \cdot 10^{-3}$, $6 \cdot 10^{-3}$ мг/мл) в сравнении с контрольной группой. Во второй экспериментальной серии оценивалось токсическое действие упаренной спиртовой вытяжки сырья в концентрациях 22.8 мг/мл, 11.4 мг/мл, 4.6 мг/мл и 2.3 мг/мл, соответственно составляющих разведения в 1, 2, 5 и 10 раз от исходного раствора вытяжки.

Определены следующие параметры острой токсичности на личинках: LC₁₀₀₋₂₄ = 22.8 мг/мл, LC₁₀₀₋₄₈ = 11.4 мг/мл, LC₅₀₋₄₈ = 4.6 мг/мл.

Все установленные концентрации, вызывающие токсический эффект, были получены при разведении меньше чем в 100 раз, что позволило отнести тестируемый раствор к IV–V классу токсичности согласно принятой в экотоксикологии пятибалльной шкале (Приказ МПР России от 15.06.2001 № 511).

Содержание *D. rerio* в выделенной фармакологической композиции в условиях хронического эксперимента с последующим наблюдением за ними не привело к образованию опухолей у рыб, что свидетельствует об отсутствии тенденции у данной композиции к канцерогенной активности.

Дозу, вызывающую 50%-ную стерильность самцов *D. melanogaster*, установить не удалось. Все самцы сохраняли фертильность, что отражало отсутствие цитотоксичности. Исследуемые концентрации водной вытяжки

(8 мг/мл и 16 мг/мл) не выявили стерилизующего эффекта, что согласно принятой методике тестирования на мутагенность (Методические рекомендации..., 1982; Материалы фармкомитета, 2005) свидетельствует об отсутствии мутагенной активности анализируемой фармакологической композиции.

Таким образом, водный и водно-спиртовой экстракты антоциановой формы кукурузы можно считать нетоксичными и не обладающими канцерогенной и мутагенной активностью, а фармакологическую композицию данного вида сырья – перспективной в плане дальнейшей разработки по выявлению эффективных фармакологических свойств.

Список литературы

Государственная Фармакопея СССР. XI изд. Вып. 1, 2. М.: Медицина, 1990. 510 с.

Коросов А.В., Калинин Н.М. Количественные методы экологической токсикологии. Петрозаводск: ПетрГУ, КНЦ. 2003. 56 с.

Купчак Т.В., Николаева Л.О., Шимолина Л.Л. Выделение и идентификация антоцианов из гибридной кукурузы // Фармацевт. журн. 1995. № 6. С. 62–64.

Купчак Т.В. Фитохимическая характеристика гибридной формы кукурузы *Zea mays* L. и технология антоцианового красящего препарата: автореф. дис. ... канд. фарм. наук. СПб., 1998. 23 с.

Материалы фармкомитета РФ. 2005. URL: <http://www.medline.ru/public/fund/pharmcom/>

Методические рекомендации по применению соматического мутагенеза у *Drosophila melanogaster* в качестве тест-системы для ускоренного определения канцерогенов. М., 1982. 24 с.

Полуконова Н.В., Дурнова Н.А., Райкова С.В., Федорова И.А., Разуваева К.А., Щербаченко А.В., Альмяшев Р.Ш. Анализ химического состава и биологических свойств спиртового экстракта растительного сырья гибридной формы кукурузы *Zea mays* L. // Фармобразование 2010: материалы IV Всерос. с междунар. участием науч.-метод. конф. Воронеж, 2010. С. 306–311.

Приказ МПР России от 15.06.2001 № 511 «Об утверждении Критериев отнесения опасных отходов к классу опасности для окружающей природной среды». 2001.

Фёдорова И.А. Характер изменения функционально активных участков и компактности политенных хромосом *Chironomus* (Diptera) под влиянием холинотропных препаратов: автореф. дис. ... канд. биол. наук. Астрахань, 2009. 23 с.

Фрумин Г.Т. Экспресс-метод определения эффективных и смертельных доз (концентраций) // Хим.-фармацевт. журн. 1991. № 6. С. 15–18.