

Читать  
онлайн  
Read  
online

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

## Оценка цитогенетической активности пищевого красителя азорубина в микроядерном тесте на мышах

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

**Введение.** Моноазокраситель азорубин E122 (кармуазин, пищевой красный 3) используют при изготовлении десертов, карамелей, конфет, мармеладов, мороженого, алкогольных и безалкогольных напитков и т. д. Оценка безопасности пищевых добавок включает изучение генотоксического потенциала. При этом для веществ с высокой экспозицией или небольшой, но длительной (в том числе для пищевых добавок) обязательны тесты *in vivo*.

**Материалы и методы.** Микроядерным методом на клетках костного мозга мышей (самцы, гибриды F1 CBA × C57Bl6/j) изучена генотоксическая активность водного раствора синтетического пищевого азокрасителя азорубина E122. Исследуемые вещества вводили в желудок мышей в диапазоне доз 250–2000 мг/кг двукратно с интервалом 24 ч, приготовление препаратов осуществляли через 24 ч после последнего введения. Частоту полихроматофильных эритроцитов (ПХЭ) с микроядрами (МЯ) оценивали по результатам анализа 4000 ПХЭ, долю ПХЭ — по результатам анализа 500 эритроцитов на каждое животное.

**Результаты.** Не выявлено статистически значимого повышения частоты ПХЭ с МЯ по отношению к параллельному контролю при двукратном введении азорубина во всех изученных дозах. После воздействия в дозах 1000 и 2000 мг/кг частота ПХЭ с МЯ несколько превышала верхний предел 95%-го ДИ накопленного отрицательного контроля. Эффект статистически значимо зависел от дозы, что не позволяет признать ответ чётко отрицательным.

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

**Заключение.** Анализ частоты ПХЭ с МЯ в костном мозге мышей после двукратного введения азорубина в дозах 250–2000 мг/кг позволил квалифицировать результат эксперимента как неопределённый.

**Ключевые слова:** генетическая безопасность; азорубин; кармуазин; синтетические пищевые красители; азокрасители; микроядра; полихроматофильные эритроциты

**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., Коняшкина М.А., Юрцева Н.А. Оценка цитогенетической активности пищевого красителя азорубина в микроядерном тесте на мышах. *Гигиена и санитария*. 2023; 102(6): 580–583. <https://doi.org/10.47470/0016-9900-2023-102-6-580-583> <https://elibrary.ru/qhujuw>

**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@cspmz.ru

**Участие авторов:** Юрченко В.В. — концепция и дизайн исследования, работа с животными, приготовление препаратов для цитогенетического анализа, статистический анализ, анализ данных литературы, написание текста; Ахальцева Л.В. — цитогенетический анализ, поиск источников литературы, анализ данных литературы; Коняшкина М.А. — работа с животными, приготовление препаратов для цитогенетического анализа; цитогенетический анализ, поиск источников литературы; Юрцева Н.А. — работа с животными, приготовление препаратов для цитогенетического анализа, поиск источников 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: 06.02.2023 / Принята к печати: 07.06.2023 / Опубликована: 30.07.2023

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

## Evaluation of the cytogenetic activity of the food dye Azorubine in a micronucleus test in mice

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

**Introduction.** Azorubine E122 (Carmoisine, Food Red 3) monoazo dye is used in the manufacture of desserts, caramels, sweets, marmalades, ice cream, alcoholic and non-alcoholic drinks, etc. The safety assessment of food additives includes the study of genotoxic potential. At the same time, for substances with a high or a small but long-term exposure (including food additives), *in vivo* tests are required.

**Materials and methods.** The genotoxic activity of aqueous solutions of synthetic food azo dyes E122 Azorubin was studied by the micronuclear method on bone marrow cells in mice (males, hybrids F1 CBA × C57Bl6/j). The studied substances were injected into the stomach of mice at doses of 250–2000 mg/kg twice with an interval of 24 hours, with the preparation of bone marrow preparations 24 hours after the last administration. The frequency of micronucleated (MN) polychromatophilic erythrocytes (PCEs) was estimated on the base of the results of the analysis of 4000 PCE. The proportion of PCE among all red blood cells was determined by analyzing 500 cells per animal.

**Results.** There was no statistically significant increase in the frequency of PCE with MN over the current control with a double administration of Azorubine in all studied doses. After exposure at doses of 1000 and 2000 mg/kg, the incidence of MN PCEs slightly exceeded the upper limit of the 95% CI of the accumulated negative control and the effect was dose-dependent and statistically significant, which does not allow recognizing the answer as clearly negative.

**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.** An analysis of the frequency of MN PCEs in the bone marrow of mice after a double injection of Azorubine at doses of 250–2000 mg/kg made it possible to qualify the result of the experiment as uncertain.

**Keywords:** genetic safety; azorubin; carmoisine; synthetic food dyes; azo dyes; micronuclei; polychromatophilic erythrocytes

**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. Evaluation of the cytogenetic activity of the food dye azorubin in the in vivo micronuclear test. *Gigiena i Sanitariya (Hygiene and Sanitation, Russian journal)*. 2023; 102(6): 580–583. <https://doi.org/10.47470/0016-9900-2023-102-6-580-583> <https://elibrary.ru/qhujiwv> (In Russ.)

**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@cspmz.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>

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; Konyashkina M.A. – work with animals, preparation of preparations for cytogenetic analysis, cytogenetic analysis, search for literature sources; Yurtseva N.A. – work with animals, preparation of preparations for cytogenetic analysis, search for literature sources. 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.

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

**Acknowledgment.** The study had no sponsorship.

Received: February 6, 2023 / Accepted: June 7, 2023 / Published: July 30, 2023

## Введение

Одним из важнейших биотехнологических приёмов изготовления продуктов питания, лекарств и косметики является использование синтетических пищевых красителей (ПК) из разных групп химических соединений, среди которых азокрасители составляют 2/3 от всего рынка синтетических ПК [1]. В России не разрешено вводить азокрасители только в продукты питания, предназначенные для детей до трёх лет. В частности, моноазокраситель азорубин E122 (кармуазин, пищевой красный 3) используют при изготовлении десертов, карамелей, конфет, мармеладов, мороженого, алкогольных и безалкогольных напитков и т. д. — всего более 90 наименований конечных продуктов [2]. Оценка безопасности химических веществ обязательно включает изучение генотоксического потенциала. Генетические повреждения в соматических и половых клетках связаны с серьёзным влиянием на здоровье и в принципе могут проявляться даже при низких уровнях экспозиции. Мутации в соматических клетках способны вызвать рак, если они происходят в протоонкогенах, в генах — супрессорах опухолей и (или) в генах, отвечающих на повреждение ДНК, а также могут стать причиной различных генетических заболеваний [3, 4]. Накопление повреждений ДНК в соматических клетках предположительно играет роль в таких дегенеративных состояниях, как ускоренное старение, иммунная дисфункция, кардиоваскулярные и нейродегенеративные болезни [5–8]. Мутации в половых клетках способны привести к спонтанным абортam, бесплодию, повреждению наследственного аппарата потомков и, возможно, последующих поколений. Оценку генотоксичности химических веществ проводят поэтапно с применением на первом этапе батареи тестов *in vitro*. В случае положительного ответа на первом этапе переходят ко второму этапу с применением тестов на млекопитающих *in vivo*. При этом для веществ с высокой экспозицией или небольшой, но длительной (а экспозиция потребителей к пищевым добавкам практически пожизненная) тесты *in vivo* обязательны при любых результатах первого этапа [9, 10].

В открытом доступе нам удалось найти всего три работы по исследованию генотоксичности азорубина *in vivo*. Не наблюдалось усиления внепланового синтеза ДНК в гепатоцитах, выделенных из печени крыс через 2 и 14 ч после однократного введения в желудок азорубина (ICI, Great Britain, чистота 85%) в дозе 400 мг/кг [11]. Частота метафаз с аберра-

циями хромосом не изменялась у мышей после четырёхкратного введения азорубина в желудок в дозах до 10 мг/кг [12], но повышалась у крыс после поступления в организм с кормом или питьевой водой в дозах до 0,22 мг/кг/день в течение 30; 60 и 90 дней [13]. Следует отметить, что указанные работы не удовлетворяют современным требованиям к выбору высшей дозы на уровне максимальной переносимой. Кроме того, в работе [13] в качестве цитогенетических нарушений учитывали не только делеции хромосом, но и такие события, как слипания хромосом, аттенуация центромер, ассоциации (центрические и конец-в-конец) и гиперплоидию.

**Цель исследования** — оценка потенциальной цитогенетической активности азорубина *in vivo* в соответствии с современным протоколом.

## Материалы и методы

В розничной продаже был приобретён пищевой краситель азорубин (E122) производства завода Roha Dychem PVT. LTD (Махараштра, Индия) (партия RP19040185, дата выпуска 25.04.2019 г., чистота 91,41%). По данным завода, химический состав партии соответствовал стандартам Директивы Комиссии Европейского союза 2012/231/ЕС [231/2012]. Дистрибьютор предоставил также копию декларации (от 21.09.2018 г.) о соответствии данной партии красителя Техническому регламенту Евразийского экономического союза.

Работу проводили согласно рекомендациям [14] на группах мышей-самцов СВА/С57В16 (по 6 в группе) массой тела от 18,4 до 24,1 г (21,03 ± 1,29). Животных содержали при 12-часовом световом режиме в условиях свободного доступа к воде и пище. Проведение исследования было одобрено этическим комитетом Комиссии по биотехнике НИИ ЭДиТО ФГБУ «НИИЦ онкологии им. Н.Н. Блохина» Минздрава России. Средняя летальная доза азорубина для мышей при введении в желудок составляет выше 10 000 мг/кг [15], поэтому в качестве максимальной использовали дозу 2000 мг/кг. Краску непосредственно перед применением разводили в дистиллированной воде и вводили в желудок мышей в объёме 0,1 мл/10 г в дозах 250; 500; 1000 и 2000 мг/кг дважды с интервалом 24 ч с последующей этаназией через 1 сут после второго введения. В качестве негативного контроля использовали дистиллированную воду, которую вводили животным перорально в том же режиме.

### Частота ПХЭ с МЯ и доля ПХЭ в костном мозге мышей после двукратного введения азорубина

The frequency of polychromatophilic erythrocytes (PCE) with micronuclei (MNs) and the proportion of PCE in the bone marrow in mice after a double administration of Azorubine

Доза, мг/кг Dose, mg/kg	ПХЭ с МЯ, ‰ MN PCEs, ‰		ПХЭ / (ПХЭ + НХЭ), % PCE (PCE + normochromic erythrocytes (NCE)), %	
	<i>M</i> (95%-й ДИ / 95% CI)	min–max	<i>M</i> (95%-й ДИ / 95% CI)	min–max
0 (контроль / control)	1.83 (1.22 ÷ 2.45)	1.50–3.00	54.67 (49.69 ÷ 57.65)	49.60–58.70
250	1.29 (0.71 ÷ 1.88)	0.50–2.00	58.32 (52.76 ÷ 63.88)	54.80–68.60
500	1.71 (1.08 ÷ 2.34)	0.75–2.25	54.58 (51.40 ÷ 57.77)	49.90–58.40
1000	2.04 (1.46 ÷ 2.63)	1.00–2.50	52.67 (50.08 ÷ 55.25)	49.10–55.80
2000	2.25 (1.57 ÷ 2.93)	1.25–3.25	53.13 (46.36 ÷ 59.91)	42.90–62.40
10 (циклофосфамид / cyclophosphamide)	8.83* (8.03 ÷ 9.64)	7.75–9.50	51.97 (47.49 ÷ 56.44)	45.00–56.30

Примечание. \* –  $p < 0,001$  при сравнении с параллельным отрицательным контролем ( $T$ -критерий).

Note: \* –  $p < 0.001$  when compared with a parallel negative control ( $T$ -test).

В качестве позитивного контроля использовали циклофосфамид (эндоксан) (Baxter, Германия), который вводили в дистиллированной воде для инъекций внутривенно однократно в дозе 10 мг/кг за 1 сут до эвтаназии.

Костный мозг вымывали из бедренной кости эмбриональной телячьей сывороткой (ООО НПП «ПанЭко», серия S00E31), мазки окрашивали по Гимзе с использованием набора «Лейкодиф 200» (Erba Lachema, Чехия) и микроскопировали при увеличении  $\times 1000$  (Olympus BX-41, Япония). Перед просмотром препараты шифровали, расшифровывали только по завершении анализа всех препаратов. На каждое животное анализировали по 4000 полихроматофильных эритроцитов (ПХЭ), учитывали ПХЭ с микроядрами (МЯ). Соотношение между ПХЭ и нормохромными эритроцитами (НХЭ) оценивали при анализе 500 эритроцитов. Статистическую обработку полученных данных проводили в программе Statistica 10 for Windows путём сравнения опытных групп с группой отрицательного контроля. Значимыми считали различия при  $p \leq 0,05$ .

## Результаты

Внешний вид и поведение мышей после введения ПК не отличались от контрольных. Результаты микроскопического анализа представлены в таблице.

Спонтанная частота ПХЭ с МЯ у контрольных животных составила 1,83‰ (1,22–2,45‰) и была близка к уровням, отмеченным в литературе [14, 16–18]. Результат не выходил за пределы 95%-го доверительного интервала (ДИ), накопленного в лаборатории контроля (1,39–1,90‰), включающего

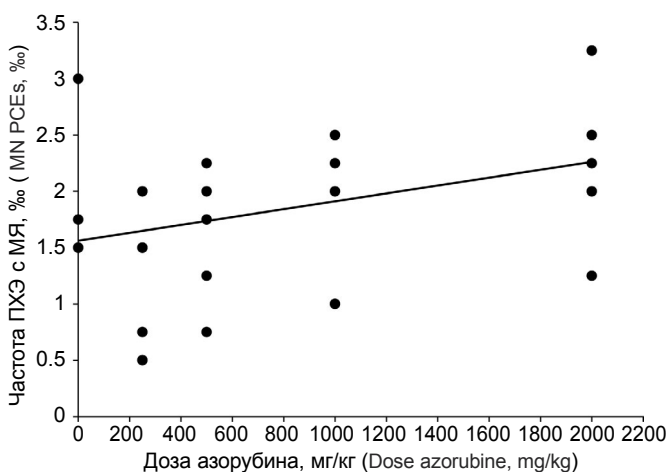
данные по 96 самцам мышей СВА/С57В16, интактным или после введения в желудок дистиллированной воды, физиологического раствора либо подсолнечного масла. У мышей группы позитивного контроля после однократного введения циклофосфамида в дозе 10 мг/кг частота ПХЭ с микроядрами составила 8,83‰ (8,03–9,64‰), что находилось в пределах 95%-го ДИ накопленного лабораторного положительного контроля при внутривенном введении в этой дозе циклофосфамида от разных производителей (6,88–15,28‰) 42 самцам мышей СВА/С57В16.

Доля ПХЭ в группе параллельного отрицательного контроля составила 54,67 (49,69 ÷ 57,65)%, что близко к 95%-му ДИ накопленных контрольных данных (49,28–57,09%), в группе положительного контроля – 51,97 (47,49 ÷ 56,44)%, что было близко к 95%-му ДИ накопленного положительного контроля (40,48–49,78%).

Частота ПХЭ в группах мышей, экспонированных к азорубину, статистически значимо не отличалась от уровня параллельного негативного контроля во всём диапазоне изученных доз. Так, для максимальной дозы 2000 мг/кг в соответствии с критерием  $T$  для независимых выборок  $p = 0,271$ ; по критерию Манна – Уитни  $p = 0,225$  и критерий  $\chi^2$  был равен 2,788. Следовательно, полученный в тесте ответ нельзя признать положительным. Однако после воздействия в дозах 1000 и 2000 мг/кг частота ПХЭ с МЯ несколько превышала верхний предел 95%-го ДИ накопленного отрицательного контроля (2,04 и 2,25‰ против 1,90‰), и эффект зависел от дозы статистически значимо (см. рисунок), что не позволяет признать ответ ясно отрицательным. Следовательно, полученный нами результат следует квалифицировать как неопределённый [14]. Азорубин при пероральном применении не приводил к снижению доли ПХЭ среди всех эритроцитов в костном мозге мышей, что свидетельствует об отсутствии влияния изученного образца на процессы продукции и созревания эритроцитов.

## Обсуждение

Адекватная оценка генотоксичности должна включать три конечных события: генные мутации, структурные и численные нарушения хромосом. Способность азорубина вызывать генные мутации была изучена в многочисленных исследованиях на микроорганизмах [19] с отрицательным результатом, в том числе в тесте Эймса с применением предварительной редукции краски с помощью дитионита [20]. Современный протокол теста Эймса советует моделировать процесс восстановления азо-связи под влиянием анаэробной микрофлоры кишечника [21], но не делает выбора между обработкой краски в анаэробных условиях (дитионит или цельные микробы либо бесклеточные экстракты кала) и в аэробных условиях (рибофлавин или флавиномононуклеотид) [20, 22, 23]. В условиях отсутствия



Распределение частоты ПХЭ с МЯ в зависимости от дозы азорубина.  
Distribution of the frequency of MN PCEs depending on the dose of Azorubine.

стандартизированной процедуры двойной экзогенной активации *in vitro* и отсутствия исследований с использованием таких методов *in vivo*, как тест на индукцию генных мутаций у трансгенных животных или тест комет, высоко с ним конкордантный [24], представляется преждевременным делать заключение об отсутствии способности азорубина вызывать генные мутации.

Такие параметры цитогенетической активности, как структурные и численные нарушения хромосом, позволяет выявить микроядерный тест. Было показано, что в лимфоцитах человека *in vitro* азорубин индуцировал значимое превышение над контролем частоты клеток с микроядрами в концентрациях от 100 ppm (1 мг/л) [25]. В нашем опыте азорубин не показал ясно положительного ответа после двукратного орального применения краски в дозах от 250 до 2000 мг/кг. Это расхождение может быть связано с различиями в метаболизме и (или) биодоступности веществ к органам-мишеням, что способно стать критическим фактором [9]. В документах EFSA по пересмотру допустимой суточной дозы приводились данные, свидетельствующие о наличии системной экспозиции при оральном поступлении <sup>14</sup>C-азорубина в организм мышей с пиковыми уровнями ра-

диоактивности в плазме крови, печени, лёгких, семенниках и селезёнке через 8 ч после введения [15]. При этом уровень абсорбции был менее 10% от введённой дозы. В настоящей работе подтверждением экспозиции костного мозга к азорубину и (или) его метаболитам является линейная положительная зависимость частоты ПХЭ с МЯ от введённой дозы.

Настоящее исследование ограничено рамками методологии использованного теста, позволяющего проанализировать только цитогенетические нарушения без возможности учёта генных мутаций. Оценён единственный образец краски в единственной ткани (костный мозг).

## Заключение

Результаты проведённого эксперимента по оценке цитогенетической активности пищевого красителя азорубина E122 в микроядерном тесте на костном мозге мышей в условиях двукратного введения в желудок в дозах 250; 500; 1000 и 2000 мг/кг не позволяют определённо классифицировать выбранный образец данного красителя как мутаген *in vivo*, но в то же время оставляют сомнения в его генетической безопасности.

## Литература

(п.п. 1, 3–11, 13–18, 20–25 см. References)

- Бессонов В.В. *Разработка методов и системы гигиенического контроля за использованием красителей в производстве пищевой продукции*: Автореф. дисс. ... д-ра биол. наук. М.; 2011.
- Дурнев А.Д., Орешенко А.В., Кулакова А.В., Берестень Н.Ф. Анализ цитологической активности пищевых красителей. *Вопросы медицинской химии*. 1995; 41(5): 50–3. <https://elibrary.ru/uzfcrz>
- 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> <https://elibrary.ru/muulzs>
- Gičević A., Hindija L., Karačić A. Toxicity of azo dyes in pharmaceutical industry. In: Badnjević A., Škrbić R., Gurbeta Pokvić L., eds. *CMBEBIIH 2019. IFMBE Proceedings*. Cham: Springer; 2019. [https://doi.org/10.1007/978-3-030-17971-7\\_88](https://doi.org/10.1007/978-3-030-17971-7_88)
- 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)
- Erickson RP. Somatic gene mutation and human disease other than cancer: an update. *Mutat. Res.* 2010; 705(2): 96–106. <https://doi.org/10.1016/j.mrrev.2010.04.002>
- Choudhuri S., Kaur T., Jain S., Sharma C., Asthana S. A review on genotoxicity in connection to infertility and cancer. *Chem. Biol. Interact.* 2021; 345: 109531. <https://doi.org/10.1016/j.cbi.2021.109531>
- Hoeijmakers J.H. DNA damage, aging, and cancer. *N. Engl. J. Med.* 2009; 361(15): 1475–85. <https://doi.org/10.1056/nejmra0804615>
- Slatter M.A., Gennery A.R. Primary immunodeficiencies associated with DNA-repair disorders. *Expert. Rev. Mol. Med.* 2010; 12: e9. <https://doi.org/10.1017/s1462399410001419>
- De Flora S., Izzotti A. Mutagenesis and cardiovascular diseases Molecular mechanisms, risk factors, and protective factors. *Mutat. Res.* 2007; 621(1–2): 5–17. <https://doi.org/10.1016/j.mrfmmm.2006.12.008>
- Frank S.A. Evolution in health and medicine Sackler colloquium: Somatic evolutionary genomics: mutations during development cause highly variable genetic mosaicism with risk of cancer and neurodegeneration. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 2010; 107(Suppl. 1): 1725–30. <https://doi.org/10.1073/pnas.0909343106>
- Hardy A., Benford D., Halldorsson T., Jeger M., Knutsen H.K., More S., et al. Clarification of some aspects related to genotoxicity assessment. *EFSA J.* 2017; 15(12): e05113. <https://doi.org/10.2903/j.efsa.2017.5113>
- Committee on mutagenicity of chemicals in food, consumer products and the environment (COM). Guidance on a strategy for genotoxicity testing of chemicals. Available at: [https://assets.publishing.service.gov.uk/government/uploads/system/uploads/attachment\\_data/file/1043249/strategy-for-genotoxicity-testing-of-chemicals-guidance.pdf](https://assets.publishing.service.gov.uk/government/uploads/system/uploads/attachment_data/file/1043249/strategy-for-genotoxicity-testing-of-chemicals-guidance.pdf)
- Kornbrust D., Barfknecht T. Testing of 24 food, drug, cosmetic, and fabric dyes in the *in vitro* and the *in vivo* rat hepatocyte primary culture/DNA repair assays. *Environ. Mutagen.* 1985; 7(1): 101–20. <https://doi.org/10.1002/em.2860070106>
- Durnev A.D., Oreshchenko A.V., Kulakova A.V., Beresten' N.F. Analysis of the cytogenetic activity of food dyes. *Voprosy meditsinskoy khimii*. 1995; 41(5): 50–3. <https://elibrary.ru/uzfcrz> (in Russian)
- Ali M.O., Al-Ghor A., Sharaf A.K., Mekawy H., Montaser M.M. Genotoxic effects of the food color (Carmoisine) on the chromosome of bone marrow cells of rat. *Toxicol. Letters*. 1998; 95(1): 44. [https://doi.org/10.1016/S0378-4274\(98\)80172-0](https://doi.org/10.1016/S0378-4274(98)80172-0)
- OECD. Test No. 474: Mammalian Erythrocyte Micronucleus Test. OECD Guidelines for the Testing of Chemicals, Section 4. OECD Publishing. Paris; 2016. <https://doi.org/10.1787/9789264264762-en>
- EFSA Panel on Food Additives and Nutrient Sources added to Food (ANS). Scientific Opinion on the re-evaluation of Azorubine/Carmoisine (E 122) as a food additive on request the European Commission. *EFSA J.* 2009; 7(11): 1332. <https://doi.org/10.2903/j.efsa.2009.1332>
- Salamone M.F., Mavournin K.H. Bone marrow micronucleus assay: a review of the mouse stocks used and their published mean spontaneous micronucleus frequencies. *Environ. Mol. Mutagen.* 1994; 23(4): 239–73. <https://doi.org/10.1002/em.2850230402>
- Krishna G., Urda G., Paulissen J. Historical vehicle and positive control micronucleus data in mice and rats. *Mutat. Res.* 2000; 453(1): 45–50. [https://doi.org/10.1016/s0027-5107\(00\)00074-9](https://doi.org/10.1016/s0027-5107(00)00074-9)
- Hayashi M., Dearfield K., Kasper P., Lovell D., Martus H.J., Thybaud V. Compilation and use of genetic toxicity historical control data. *Mutat. Res.* 2011; 723(2): 87–90. <https://doi.org/10.1016/j.mrgentox.2010.09.007>
- 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> (in Russian)
- Brown P.J., Roehm W.G., Brown J.R. Mutagenicity testing of certified food colors and related azo, xanthene and triphenylmethane dyes with the Salmonella/microsome system. *Mutat. Res.* 1978; 56(3): 249–71. [https://doi.org/10.1016/0027-5107\(78\)90192-6](https://doi.org/10.1016/0027-5107(78)90192-6)
- OECD. Test No. 471: Bacterial Reverse Mutation Test. OECD Guidelines for the Testing of Chemicals, Section 4. OECD Publishing. Paris; 2020. <https://doi.org/10.1787/9789264071247-en>
- Brown J.P., Dietrich P.S. Mutagenicity of selected sulfonated azo dyes in the Salmonella/microsome assay: use of aerobic and anaerobic activation procedures. *Mutat. Res.* 1983; 116(3–4): 305–15. [https://doi.org/10.1016/0165-1218\(83\)90068-x](https://doi.org/10.1016/0165-1218(83)90068-x)
- Prival M.J., Davis V.M., Peiperl M.D., Bell S.J. Evaluation of azo food dyes for mutagenicity by method using Salmonella Typhimurium. *Mutat. Res.* 1988; 206(2): 247–59. [https://doi.org/10.1016/0165-1218\(88\)90168-1](https://doi.org/10.1016/0165-1218(88)90168-1)
- 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.* 2019; 839: 21–35. <https://doi.org/10.1016/j.mrgentox.2019.01.007>
- Swaroop V.R., Roy D.D., Vijayakumar T. Genotoxicity of synthetic food colorants. *J. Food Sci. Eng.* 2011; (1): 128–34.