

УДК 547.458.6+637.144.5

СРАВНИТЕЛЬНАЯ ТОКСИКОЛОГИЧЕСКАЯ ОЦЕНКА КОМПЛЕКСОВ В- И Г-ЦИКЛОДЕКСТРИНА С ГИДРОЛИЗАТОМ СЫВОРОТОЧНЫХ БЕЛКОВ МОЛОКА НА ТЕСТ-ОБЪЕКТЕ *TETRAHYMENA PYRIFORMIS***Т.Н. Головач¹, В.Г. Цыганков², А.М. Бондарук², Л.Н. Журихина², В.П. Курченко¹**¹ Белорусский государственный университет, Минск, Республика Беларусь² Научно-практический центр гигиены, г. Минск, Республика Беларусь

Введение. Циклодекстрины (ЦД) обладают конусообразной пространственной структурой с гидрофобной полостью, в которую могут быть включены соединения различной природы. β- и γ-ЦД состоят из 8 и 9 мономеров глюкозы соответственно, формирующих циклическую структуру. В полости β-ЦД могут быть размещены гетероциклические или ароматические группы, тогда как γ-ЦД способны связываться макроциклические и стероидные вещества [1, 2].

Гидролизаты белков с глубокой степенью гидролиза, которые вносят в специализированные продукты питания, характеризуются специфическим горьким вкусом. Формирование наноконплексов с циклическими олигосахаридами приводит к снижению горечи включенных пептидов и увеличению их биологически активных свойств [3, 4]. Целесообразным представляется проведение токсикологической оценки опытных образцов клатратов β- и γ-ЦД с пептидами сывороточных белков молока.

В настоящее время инфузории *Tetrahymena pyriformis* являются универсальным тест-объектом для оценки биологической ценности и безопасности продуктов питания и кормов, а также широкого спектра соединений различной природы [5, 6, 7].

Цель работы – определение токсического действия наноконплексов β- и γ-циклодекстрина, включающих пептиды сывороточных белков молока, в тест-системе с инфузориями *T. pyriformis*.

Материалы и методы. В работе применяли клатраты β- и γ-ЦД с гидролизатом белков молочной сыворотки, полученные в НИЛ прикладных проблем биологии (Белорусский государственный университет).

На базе РУП «Научно-практический центр гигиены» проведена первичная токсикологическая оценка наноконплексов с применением тест-объекта *T. pyriformis*. Уровень токсического воздействия определяли по времени 50 % гибели инфузорий в культуральной среде с заданной концентрацией токсического вещества (ЛД₅₀). Готовили суспензии, содержащие 50–400 мг/мл клатратов, устанавливали активную кислотность суспензий на уровне 7,1–7,2 ед. рН. По 1 мл образца с различной концентрацией клатратов вносили во флакон объемом 10 мл (в двух повторностях), затем добавляли культуру инфузорий в стационарной фазе роста, содержащую 100 000±1000 организмов.

Продолжительность инкубирования образцов при 25 °С в остром эксперименте составляла 2–3 ч, в случае подострого эксперимента – 24 ч. Впоследствии в нативном препарате наблюдали картину интоксикации. В счетной камере Фукса-Розенталя определяли количество лизированных инфузорий до и после фиксации 5 % раствором йода. Пробит-анализ прямой летальности осуществляли с применением метода В.Б. Прозоровского [7].

Согласно результатам расчета % летальности *T. pyriformis* в остром (acuta) и подостром (subacuta) экспериментах устанавливали основные параметры токсичности (ЛД₁₆, ЛД₅₀, ЛД₈₄). Коэффициент кумуляции в остром эксперименте ($K_{КУМsubacuta}$) определяли как соотношение ЛД_{50subacuta}/ЛД_{50acuta}.

Результаты и обсуждение. В сравнительных условиях оценены параметры токсичности образцов наноконплексов β- и γ-ЦД с гидролизатом сывороточных белков молока на тест-объекте *T. pyriformis*.

При исследовании показателей токсичности (острый эксперимент) в 1 мл питательной среды, содержащей культуру инфузорий в стационарной фазе роста, вносили 50–300 мг образца наноконплекса β-ЦД с пептидами сыворотки молока. Время экспозиции проб с простейшими при определении острой токсичности составляло 5 ч.

Спустя 5 ч инкубации при содержании клатрата 50 мг/мл численность инфузорий не отличалась от контрольного уровня, при концентрации 100–300 мг/мл – численность культуры снизилась на 8–54 % (летальность 8–54 %).

При исследовании подострой токсичности (время экспозиции 24 ч) наноконплекса β-ЦД с пептидами наблюдалось усиление токсического эффекта согласно показателям ЛД₁₆, ЛД₅₀ и ЛД₈₄. В пробах, содержащих 100 мг/мл тестируемого образца, летальность простейших составила 12 %, а при внесении 150–300 мг/мл – летальность достигала 31–95 %.

Методом пробит-анализа [7] летальности инфузорий в остром и подостром экспериментах рассчитаны основные параметры токсичности клатрата β -ЦД с пептидами, что отражено в таблице 1.

Первичная токсиколого-гигиеническая оценка комплекса включения β -ЦД с пептидами в остром и подостром экспериментах на *T. pyriformis* показала, что в среднесмертельной дозе тестируемый объект относится к 5 классу токсичности (является нетоксичным), а по коэффициенту кумуляции – 4 классу токсичности (является малотоксичным).

Таблица 1 – Параметры токсичности наноконплекса β -ЦД с пептидами сыворотки молока по результатам оценки на *T. pyriformis*

Показатель токсичности	Величина токсичности	Класс токсичности
Острая токсичность		
ЛД ₁₆ , мг/мл	151,91±0,38	–
ЛД ₅₀ , мг/мл	277,25±1,30	5
ЛД ₈₄ , мг/мл	402,58±1,13	–
Подострая токсичность		
ЛД ₁₆ , мг/мл	111,20±4,19	–
ЛД ₅₀ , мг/мл	173,23±9,94	–
ЛД ₈₄ , мг/мл	235,26±0,61	–
КкуМ _{acuta}	0,62	4

В эксперименте по определению острой токсичности в 1 мл питательной среды с культурой инфузорий в стационарной фазе роста вносили комплекс γ -ЦД с пептидами в количестве 50–400 мг. Продолжительность экспозиции проб с тест-объектом *T. pyriformis* составила 5 ч.

Через 5 ч инкубации инфузорий с клатратом γ -ЦД при концентрации 100 мг/мл численность инфузорий снизилась на 10–12 % (летальность составила 10–12 %), при 200–400 мг/мл – на 17–36 % по сравнению с контрольным уровнем.

В случае экспозиции наноконплекса γ -ЦД с пептидами в течение 24 ч (подострый эксперимент) наблюдалось усиление токсического эффекта по показателям ЛД₁₆, ЛД₅₀ и ЛД₈₄. При содержании комплекса 100 мг/мл летальность достигала 17–18 %, при увеличении концентрации клатрата до 200–400 мг/мл – 26–48 %. Параметры острой и подострой токсичности γ -ЦД с пептидами сывороточных белков представлены с таблице 2.

В целом, согласно среднесмертельной дозе образец наноконплекса γ -ЦД с пептидами относится к 5 классу токсичности, а по коэффициенту кумуляции – к 4 классу токсичности.

Таблица 2 – Параметры токсичности наноконплекса γ -ЦД с пептидами сыворотки молока по результатам оценки на *T. pyriformis*

Показатель токсичности	Величина токсичности	Класс токсичности
Острая токсичность		
ЛД ₁₆ , мг/мл	200,87±5,91	–
ЛД ₅₀ , мг/мл	493,06±4,01	5
ЛД ₈₄ , мг/мл	785,25±13,94	–
Подострая токсичность		
ЛД ₁₆ , мг/мл	127,40±3,93	–
ЛД ₅₀ , мг/мл	403,26±4,91	–
ЛД ₈₄ , мг/мл	679,10±13,76	–
КкуМ _{acuta}	0,82	4

Принадлежность изучаемого объекта к классу токсичности (опасности) устанавливается по параметру, соответствующему наиболее высокому классу опасности (токсичности). Согласно классификации, представленной в таблице 3, клатраты β - и γ -ЦД с пептидами сыворотки молока отнесены к 4 классу токсичности (малоопасные соединения).

Таблица 3 – Токсикологическая классификация объектов по результатам их тестирования на *T. pyriformis*

Показатель	Классы по убывающей степени токсичности				
	1 (чрезвычайно опасные соединения)	2 (высоко опасные соединения)	3 (умеренно опасные соединения)	4 (малоопасные соединения)	5 (нетоксичные соединения)
ЛД ₅₀ , мг/мл	менее 0,1	0,1–1,0	1,1–20	21–50	более 50
Кку _{Macuta}	менее 0,1	0,10–0,30	0,31–0,49	0,50–1,0	более 1,0

Заключение. Представлено сравнительное исследование показателей токсичности наноконплексов β - и γ -ЦД с гидролизатом сывороточных белков молока по результатам оценки на *T. pyriformis*. Согласно экспериментальным данным опытные образцы клатратов соответствуют 4 классу опасности (малоопасные соединения). Практическая значимость работы связана с внесением клатратов циклических олигосахаридов с пептидами в продукты специализированного питания на основе гидролизованных белков молока.

Литература

- Amphiphilic cyclodextrin nanoparticles / G. Varan, C. Varan, N. Erdoğar [et al.] // Int. J. Pharm. – 2017. – Vol. 531, № 2. – P. 457–469.
- γ -Cyclodextrin: a review on enzymatic production and applications / Z. Li, M. Wang, F. Wang [et al.] // Appl. Microbiol. Biotechnol. – 2007. – Vol. 77, N2. – P. 245–255.
- Antimutagenic and antibacterial activity of β -cyclodextrin clathrates with extensive hydrolysates of colostrum and whey / T.M. Halavach [et al.] // Biointerface Res. Appl. Chem. – 2021. – Vol. 11, № 2. – P. 8626–8638.
- The use of 2D NMR to study β -cyclodextrin complexation and debittering of amino acids and peptides / G.A. Linde [et al.] // Food Res. Int. – 2010. – Vol. 4, № 1. – P. 187–192.
- Combinatorial QSAR modeling of chemical toxicants tested against *Tetrahymena pyriformis* / H. Zhu [et al.] // J. Chem. Inf. Model. – 2008. – Vol. 48, № 4. – P. 766–784.
- Альтернативные методы исследования (экспресс-методы) для токсиколого-гигиенической оценки материалов, изделий и объектов окружающей среды: метод. пособ. / Л.Г. Подунова, Т.А. Меньшикова, Я.Г. Двоскин. – Москва, 1999. – 108 с.
- Прозоровский, В.Б. Использование метода наименьших квадратов для пробит-анализа кривых летальности / В.Б. Прозоровский // Фармакология и токсикология. – 1962. – № 1. – С. 41–63.