

**ЭКСПРЕСС-ОЦЕНКА БЕЗВРЕДНОСТИ БАД, ЯВЛЯЮЩИХСЯ ИСТОЧНИКАМИ ВИТАМИНОВ
И МИНЕРАЛЬНЫХ ВЕЩЕСТВ, НА *TETRAHYMENA PYRIFORMIS***

Журихина Л.Н., Бондарук А.М., Свинтилова Т.Н., Цыганков В.Г.

Республиканское унитарное предприятие «Научно-практический центр гигиены», Минск, Республика Беларусь

Реферат. С использованием метода экспресс-оценки безвредности биологически активных добавок к пище (БАД) на инфузориях *Tetrahymena pyriformis* проведено исследование двух образцов БАД, являющихся дополнительным источником витаминов и минеральных веществ.

Разработанный метод позволяет определить класс опасности БАД на основании параметров токсичности; биологическое действие БАД на протяжении одного (хронический эксперимент) и семи жизненных циклов популяции (продолженный эксперимент), что дает возможность оценить безвредность БАД при длительном применении.

Ключевые слова: БАД (биологически активные добавки к пище), безвредность, биологическое действие, *Tetrahymena pyriformis*.

Введение. Среди огромного многообразия биологически активных добавок, как уже присутствующих на рынке, так и впервые предъявляемых на регистрацию, одно из первых мест как по численности, так и по реальной значимости для здоровья человека занимают добавки, действующим началом которых являются витамины: как сами по себе, так и в сочетании с другими биологически активными веществами [1]. По мере накопления научных фактов о биологической роли отдельных микронутриентов и уровнях обеспеченности ими населения число витаминов, макро- и микроэлементов, включаемых в БАД, постоянно возрастает.

Использование витаминно-минеральных БАД позволяет ликвидировать дефицит пищевых веществ и повысить сопротивляемость организма к воздействию неблагоприятных факторов окружающей среды [2]. Таким образом, оптимизация обеспеченности витаминами, а также недостающими макро- и микроэлементами является важнейшим массовым профилактическим мероприятием, которое не только существенно укрепляет здоровье, но и дает большой экономический эффект [3].

Цель работы — провести на инфузориях *Tetrahymena pyriformis* (далее — *T. pyriformis*) сравнительную экспресс-оценку безвредности биологически активных добавок к пище, являющихся дополнительным источником витаминов и минеральных веществ.

Материалы и методы. Объектами исследования являлись образцы биологически активных добавок к пище (БАД-1 и БАД-2) следующего состава (таблица 1).

Таблица 1. — Информация на упаковке исследованных образцов БАД

БАД	Состав	Источник	Форма выпуска	Способ применения
БАД-1	Глюкоза — 1,96 г, витаминный премикс — 50 мг. Формы компонентов, входящих в состав витаминного премикса: ретинола ацетат (витамин А), D ₃ (холекальциферол), D — альфатокоферола ацетат (витамин Е), тиамин мононитрат (витамин В ₁), рибофлавин (витамин В ₂), пиридоксина гидрохлорид (витамин В ₆), L — аскорбат натрия (витамин С), D — пантотенат кальция (витамин В ₅), D — биотин (витамин В ₇), фолиевая кислота, никотинамид (витамин РР), цианокобаламин (витамин В ₁₂). Вспомогательные вещества: сахар молочный (лактоза), тальк (Е 553), кальция стеарат (Е 470), или магния стеарат, или кислота стеариновая, ароматизатор натуральный лимона, кислота лимонная	Витаминов: А, D ₃ , В ₁ , В ₂ , В ₅ , В ₆ , В ₇ , В ₁₂ , РР, Е, С, фолиевой кислоты	Таблетки по 2,9 г	По 1 таблетке 3–4 раза в день
БАД-2	МСМ (метилсульфонилметан) — 250 мг, L-цистеин — 200 мг, витамин В ₅ (кальция D — пантотенат) — 5 мг, витамин В ₆ (пиридоксина гидрохлорид) — 2 мг, цинк (пиколинат цинка) — 10 мг, железо (бисглицинат железа) — 3 мг, биотин (D-биотин) — 100 мкг, витамин В ₁₂ (цианокобаламин) — 4 мкг; карнаубский воск, целлюлоза, гидроксипропилметил-целлюлоза, натрия кроскармеллоза, двуокись титана, пищевой краситель (экстракт куркумы), пищевой краситель (экстракт свеклы обыкновенной)	Витаминов В ₅ , В ₆ , В ₁₂ , цинка, железа, биотина	Таблетки по 1170 мг	По 1 таблетке в день с приемом пищи

Исследования данных БАД проводились по следующим показателям [4]:

- определение класса опасности по показателям токсичности в остром, подостром и хроническом экспериментах;

- оценка биологической активности по коэффициенту адаптогенности первого и седьмого жизненных циклов популяции с расчетом показателя резерва адаптации (Рад). Показатели 7-го жизненного цикла позволяют оценить возможность длительного применения БАД.

При выборе концентраций исследуемых БАД руководствовались результатами токсикологических экспериментов и величиной рекомендуемой производителем суточной дозы (РСП — рекомендуемое суточное потребление).

Полученные экспериментальные данные обрабатывали статистически с определением средней арифметической каждого вариационного ряда, среднеквадратичного отклонения, стандартной ошибки, коэффициента вариации и критерия Стьюдента. При уровне значимости $<0,05$ различия средних арифметических показателей безвредности считали статистически достоверными [5].

Результаты и их обсуждение. По результатам токсикологической оценки в остром, подостром и хроническом экспериментах на *T. pyriformis* БАД-1 по всем показателям токсичности и опасности, кроме зоны хронического действия (Z_{chr}), относится к 4–5 классу, по Z_{chr} — к 3 классу опасности. В соответствии с принципами гигиенической классификации БАД-1 является умеренно опасной (3 класс опасности) (таблица 2).

Таблица 2. — Гигиеническая классификация БАД по результатам токсикологической оценки в остром, подостром и хроническом экспериментах на *T. pyriformis*

Показатель	БАД-1	БАД-2
Острая токсичность		
ЛД ₁₆ , мг/мл	60,0	41,0
ЛД ₅₀ , мг/мл	102,2±0,18	65,80±0,11
ЛД ₈₄ , мг/мл	144,2	90,5
Класс токсичности по ЛД₅₀acuta	5	5
Подострая токсичность		
ЛД ₁₆ , мг/мл	59,00	3,00
ЛД ₅₀ , мг/мл	91,40±0,08	27,80±0,06
ЛД ₈₄ , мг/мл	122,9	52,5
Ккум _{acuta}	0,89	0,42
Класс токсичности по Ккум_{acuta}	4	3
Хроническая токсичность в логарифмической фазе (48 ч)		
ЕД ₁₆ , мг/мл	0,24	22,88
ЕД ₅₀ , мг/мл	4,2±0,014	26,40±0,01
ЕД ₈₄ , мг/мл	8,16	29,90
Хроническая токсичность в стационарной фазе (96 ч)		
ЕД ₁₆ , мг/мл	12,20	32,21
ЕД ₅₀ , мг/мл	22,40±0,017	33,58±0,002
ЕД ₈₄ , мг/мл	32,57	34,95
Ккум _{chr}	5,33	1,27
Класс токсичности по Ккум_{chr}	5	5
Показатели опасности хронического эксперимента		
Z_{chr}	4,56	1,96
Класс опасности	3	4
МНД _{chr} , мг/мл	1,5	0,06
Класс опасности	5	3
ЛД ₅₀ /МНД _{chr}	60,9	1097
Класс опасности	4	3
Класс опасности по лимитирующему показателю	3	3

БАД-2 по результатам изучения токсичности в остром и подостром экспериментах нетоксична (5-й класс), с умеренно выраженной кумулятивностью (3-й класс). По показателям опасности хронического эксперимента: максимальной неэффективной дозе хронического эксперимента (МНД_{chr}), отношению среднесмертельной дозы (ЛД₅₀) к МНД_{chr} БАД-2 относится к 3-му классу опасности (умеренная опасность) (таблица 2).

Таким образом, по результатам токсиколого-гигиенической оценки БАД-1 и БАД-2 — умеренно опасны (3-й класс опасности).

В хроническом (96-часовом эксперименте) с целью уточнения МНД исследовали биологическое действие БАД-1 и БАД-2 в концентрациях, эквивалентных РСР и более высоких. В качестве критерия оценки МНД был рассчитан коэффициент адаптогенности (Кад) (таблица 3).

Таблица 3. — Изменение адаптационного потенциала *T. pyriformis* в среде культивирования, содержащей БАД-1 и БАД-2 возрастающих концентраций

БАД-1		БАД-2	
Концентрация, мг/мл	$K_{ад}$	Концентрация, мг/мл	$K_{ад}$
Контроль	$1,00 \pm 0,005$	Контроль	$1,00 \pm 0,007$
0,6	$1,04 \pm 0,004^*$	0,06	$1,27 \pm 0,020^*$
1,5	$1,01 \pm 0,005$	0,09	$0,83 \pm 0,008^*$
4,0	$0,89 \pm 0,007^*$	0,18	$0,75 \pm 0,003^*$

БАД-1 вносили в среду культивирования № 1 в концентрациях 0,6; 1,5 и 4,0 мг/мл. Концентрация 0,6 мг/мл эквивалентна потреблению человеком 11,6 г, или 4 таблеток БАД, что соответствует РСП. БАД-1 в концентрации 1,5 мг/мл эквивалентна потреблению человеком 29 г, или 10 таблеток БАД. При этом верхний допустимый уровень (ВДУ) потребления внесенных витаминов не превышает. Концентрация 4,0 мг/мл эквивалентна потреблению человеком 80 г БАД-1. При таком применении отмечается превышение ВДУ потребления витаминов А, D₃, В₁, В₂, В₅, В₆, В₁₂, биотина, фолиевой кислоты.

БАД-2 вносили в среду культивирования в концентрациях 0,06; 0,09 и 0,18 мг/мл. Данные концентрации эквивалентны суточному потреблению человеком 1 таблетки (1170 мг — РСП), 1,5 таблеток (1800 мг) и 3 таблетки (3510 мг) соответственно. Применение 1,5 таблеток БАД-2 в сутки не превышает ВДУ потребления внесенных витаминов и минеральных веществ для человека, содержание которых вынесено на этикетку. При приеме 3 таблеток БАД-2 отмечается превышение верхнего допустимого уровня потребления (в сутки) витамина В₁₂, биотина и цинка.

В среде культивирования, обогащенной БАД-1 в концентрации 0,06 мг/мл, наблюдалось слабо выраженное, но статистически значимое увеличение адаптационного потенциала *T. pyriformis*. В среде с концентрацией БАД-1 1,5 мг/мл отмечалось отсутствие видимого эффекта, что свидетельствует о равновесии механизмов адаптации. Дальнейшее повышение концентрации БАД-1 в среде культивирования до 4,0 мг/мл привело к снижению адаптационного потенциала популяции на 11% ($p < 0,05$). МНД БАД-1 по критерию $K_{ад}$ — 1,5 мг/мл.

БАД-2 в концентрации 0,06 мг/мл в среде без витаминов и минералов проявила выраженный адаптогенный эффект ($K_{ад} = 1,27 \pm 0,02$) (таблица 3).

При увеличении концентраций БАД на этой же среде в замедленной и стационарной фазе роста популяции отмечено: наличие крутящихся и пульсирующих инфузорий с измененной формой (ластовидных), наличие мертвых особей до 60%. Адаптационный потенциал популяции в среде, содержащей БАД-2 в концентрациях 0,09 и 0,18 мг/мл, снизился на 17 и 25 % соответственно по отношению контрольному уровню ($p < 0,05$) (таблица 3). Контролем являлись среды без БАД: К-1 — среда с оптимальным содержанием макро- и микронутриентов, К-2 — среда с дефицитом витаминов и минералов (на 50%).

С целью оценки безвредности РСП БАД-1 и БАД-2 исследовали их биологическое действие в пролонгированных экспериментах путем подсчета численности популяции в первом и седьмом жизненном цикле и расчета коэффициентов адаптогенности первого ($K_{ад24-96}$) и седьмого ($K_{ад312-384}$) жизненных циклов, $R_{ад}$ (таблица 4).

Таблица 4. — Изменение численности *T. pyriformis* в пролонгированном эксперименте в средах, содержащих БАД-1 и БАД-2 в концентрациях, эквивалентных РСП

БАД	Время экспозиции, ч			
	24	48	72	96
Первый жизненный цикл				
К-1	18000±1626	200500±3252	479500±6075	585000±3070
БАД-1	19000±735	192000±3098	480000±4381	607000±17379
БАД-2	23500±1702*	302000±4531*	560000±3158*	610000±16831
К-2	17000±1070	47500±2216	101000±2857	255000±2569
БАД-1	11750±496*	49000±6387	276000±3666*	370000±1585*
БАД-2	19500±691	132000±2184*	298000±5096*	374500±10638*
Численность популяции в % к контролю				
К-1	100 ± 9,0	100 ± 1,6	100 ± 1,3	100 ± 0,5
БАД-1	106 ± 4,1	96 ± 1,5	100 ± 0,9	104 ± 3,0
БАД-2	131 ± 9,5*	151 ± 2,3*	116 ± 0,7*	104 ± 2,9

БАД	Время экспозиции, ч			
	24	48	72	96
К-2	100±6,3	100±4,7	100±2,8	100±1,0
БАД-1	69±2,9*	103±13,5	273±3,6*	145±0,6*
БАД-2	115±4,1	278±4,6*	295±5,1*	147±4,2*
Седьмой жизненный цикл				
БАД	312	336	360	384
К-1	21500±559	273000±2352	504000±9466	611500±11960
БАД-1	22500±423	312500±6103*	565000±8854*	645000±9423
без БАД-1	22500±628	299000±7425*	513500±6945	559000±3162*
БАД-2	26000±601*	308000±8595*	554000±8037*	572500±2500*
без БАД-2	26500 ± 423*	295000±7961*	528500±6453	560500±3233*
К-2	20000±559	49500±1208	103500±1743	258000±4484
БАД-1	23000±1420	137000±2765*	402000±5548*	481000±6648*
без БАД-1	15500±856*	57000±2290*	204000±6429*	394500±5064*
БАД-2	30000±834*	293000±7057*	448000±7832*	567500±6815*
без БАД-2	25000±989*	33000±663*	427500±6291*	533000±7576*
Численность популяции в % к контролю				
К-1	100±2,6	100±0,9	100±1,9	100±2,0
БАД-1	105±2,0	115±2,2*	112±1,8*	106±1,5
без БАД-1	105±2,9	110±2,7*	102±1,4	91±0,5*
БАД-2	121±2,8*	113±3,2*	110±1,6*	94±0,4*
без БАД-2	123±2,0*	108±2,9*	105±1,3	91±0,5*
К-2	100±2,8	100±2,4	100±1,7	100±1,7
БАД-1	115±7,1	277±5,6*	388±5,4*	186±2,5*
без БАД-1	78±4,3*	115±4,6*	197±6,2*	153±2,0*
БАД-2	150±4,2*	592±14,3*	433±7,6*	220±2,6*
Без БАД-2	125±5,0*	67±1,3*	413±6,1*	207±2,9*
Примечание — * — статистически достоверные изменения по отношению к контролю при p<0,05.				

БАД вносили в среды культивирования в концентрациях, эквивалентных РСП: 0,6 мг/мл для БАД-1 и 0,06 мг/мл — для БАД-2.

На протяжении первого жизненного цикла популяции, культивируемой в среде № 1, содержащей БАД-1, не отмечалось статистически значимых изменений численности популяции по отношению к ее численности в среде № 1 без БАД-1. БАД-2, внесенная в среду культивирования № 1, стимулировала рост популяции на этапах 24–48–72 ч на 31–51–16% (p<0,05) (таблица 4).

При внесении биологически активных добавок в среду культивирования № 2 с дефицитом витаминов и минералов их биологическая активность была выражена в большей степени, чем в полноценной среде культивирования. Под действием БАД-1 отмечались фазовые колебания численности популяции на этапах первого жизненного цикла: ингибирующий эффект в лаг-фазе, отсутствие видимого эффекта в логарифмической фазе и выраженное ростстимулирующее действие в замедленной и стационарной фазе роста популяции. БАД-2 проявила рост-стимулирующее действие на всех этапах жизненного цикла популяции (таблица 4).

Пролонгированное воздействие БАД на популяцию, культивируемую в среде № 1, проявилось в усилении рост-стимулирующего эффекта у БАД-1 и ослаблении такового у БАД-2 в седьмом жизненном цикле популяции (таблица 4).

Пролонгированное воздействие биологически активных добавок на популяцию, культивируемую в среде № 2, характеризовалось ярко выраженной стимуляцией жизненного потенциала популяции *T. pyriformis* на всех этапах седьмого жизненного цикла (таблица 4).

По окончании культивирования инфузорий на протяжении шести жизненных циклов в средах с БАД-1 и БАД-2 они были пересеяны на среды без БАД. В среде № 1 проявления биологической активности носили тот же характер, что и в среде с БАД. В среде № 2 рост-стимулирующий эффект сменился ингибирующим. Так, при пересеве популяции, культивировавшейся в среде № 2 с БАД-2, в среду без БАД-2 стимулирование роста попу-

ляции в логарифмической фазе в 5,9 раза сменилось ингибирующим эффектом. Численность популяции уменьшилась на 33% по отношению к контролю (таблица 4).

Сравнение коэффициентов адаптогенности первого и седьмого жизненного цикла популяции, культивируемой в среде № 1, содержащей БАД-1 в концентрации, изoeffективной РСЦ, выявило умеренное повышение адаптационного потенциала популяции при пролонгированном воздействии БАД-1. Адаптационный резерв популяции повысился на 9% ($p < 0,05$). При культивировании *T. pyriformis* в среде № 2 с дефицитом витаминов и минералов адаптационный потенциал популяции в первом жизненном цикле повысился на 68%, в седьмом — на 55% по отношению к контролю. Адаптационный резерв в седьмом жизненном цикле снизился на 9% ($p < 0,05$) (таблица 5).

Таблица 5. — Адаптация *T. pyriformis* к пролонгированному воздействию БАД-1 и БАД-2

Образец	БАД-1			БАД-2		
	К _{ад24-96}	К _{ад312-384}	Р _{ад312-384}	К _{ад24-96}	К _{ад312-384}	Р _{ад312-384}
Среда № 1 без БАД	1,00±0,007	1,00±0,019	1,00± 0,019	1,00±0,007	1,00±0,019	1,00±0,019
Среда № 1 с БАД	1,01±0,007	1,10±0,008*	1,09±0,008	1,17±0,013*	1,04±0,011*	0,89±0,09*
Среда № 2 без БАД	1,00±0,025	1,00±0,018	1,00±0,018	1,00±0,025	1,00±0,018	1,00±0,018
Среда № 2 с БАД	1,68±0,019*	1,55±0,013*	0,92±0,013*	1,96±0,034*	2,36±0,032*	1,20±0,033*

Примечание — * — статистически достоверные изменения по отношению к контролю при $p < 0,05$.

БАД-2, внесенная в среду культивирования № 1, проявила более выраженную биологическую активность при пролонгированном воздействии на популяцию *T. pyriformis*, чем БАД-1. Адаптационный потенциал популяции в первом жизненном цикле повысился на 17%, в седьмом — на 4% по отношению к контролю ($p < 0,05$). Адаптационный резерв популяции, культивируемой в среде № 1, при пролонгированном воздействии БАД-2 снизился на 11%. При внесении БАД-2 в среду № 2 с дефицитом микронутриентов адаптационный потенциал культивируемой в этой среде популяции в первом жизненном цикле повысился на 96%, в седьмом — на 136%. Адаптационный резерв увеличился на 20% (таблица 5).

Закключение. С использованием в качестве тест-объекта инфузорий *T. pyriformis* осуществлена оценка безвредности двух образцов БАД, являющихся дополнительным источником витаминов и минеральных веществ в рационе, на этапе их реализации.

По результатам токсикологической оценки БАД-1 и БАД-2 относятся к 3-му классу опасности (умеренно опасны). Биотестирование БАД в концентрациях, эквивалентных рекомендуемому суточному потреблению, показало, что они проявляют более выраженную биологическую активность в среде с дефицитом микронутриентов.

БАД-1 и БАД-2 в концентрациях, эквивалентных рекомендуемому суточному потреблению, не оказали вредного воздействия на популяцию и проявили адаптогенный эффект в среде с дефицитом микронутриентов. Более выраженную биологическую активность проявила БАД-2, в состав которой помимо витаминов входят минералы и L-цистеин.

Таким образом, биотестирование на *T. pyriformis* БАД, являющихся дополнительным источником витаминов и минеральных веществ, позволяет не только оценить безвредность рекомендуемого суточного потребления, но и при необходимости откорректировать дозу и длительность применения, осуществить скрининг БАД одной группы по показателям безвредности.

Литература

1. Василевский, И.В. Клинико-фармакологические аспекты рационального применения витаминно-минеральных комплексов у детей / И.В. Василевский // Мед. новости. — 2010. — № 2. — С. 6–11.
2. Лаухина, Г.Г. Биологически активные добавки к пище. Вопросы и ответы / Г.Г. Лаухина, О.А. Шорникова // Здоровье. Медицинская экология. Наука. — 2010. — № 1–2 (41–42). — С. 82–84.
3. Спиричев, В.Б. БАДы как дополнительный источник витаминов в питании здорового и больного человека / В.Б. Спиричев // Медицина и экономика сегодня. — 2005. — № 2. — С. 2–17.
4. Методы экспресс-оценки безвредности биологически активных добавок к пище, являющихся источниками аминокислот, витаминов и минеральных веществ, на *Tetrahymena pyriformis*: инструкция по применению № 034-1215: утв. 07.04.2016 / Л.Н. Журихина [и др.]. — Минск, 2016. — 25 с.
5. Прозоровский, В.Б. Статистическая обработка результатов фармакологических исследований / В.Б. Прозоровский // Психофармакол. биол. наркология. — 2007. — Т. 7, № 3–4. — С. 2000–2120.

EXPRESS-ASSESSMENT OF HARMLESSNESS OF FOOD SUPPLEMENTS, WHICH ARE THE ADDITIONAL SOURCE OF VITAMINS AND MINERALS, ON TETRAHYMENA PYRIFORMIS

Zhurihina L.N., Bondaruk A.M., Svintilova T.N., Tsygankov V.G.

Republican Unitary Enterprise “The Scientific & Practical Center of Hygiene”, Minsk, Republic of Belarus

Using the method of express-assessment of harmless of food supplements on the infusorians *Tetrahymena pyriformis* two samples of food supplements, which are the additional source of vitamins and minerals, has been studied.

The developed method allows to determine the class of danger of food supplements on the basis of toxicity parameters; biological action of food supplements throughout one (chronic experiment) and seven (prolonged experiment) life cycles of the population, which provides to estimate the harmless of food supplements for prolonged use.

Keywords: food supplements, harmless, biological action, *Tetrahymena pyriformis*.

Поступила 18.05.2016