

УДК 637.344 : 57.083

Кочубей-Литвиненко О. В., к.т.н., доцент, **Олішевський В. В.**, к.т.н., доцент
(E-mail: okolit@email.ua)

Національний університет харчових технологій, м. Київ, Україна

Дмитруха Н. М., д.б.н., с.н.с. ©

Інститут медицини праці АМН України, м. Київ, Україна

ДОСЛІДЖЕННЯ ЦИТОТОКСИЧНОЇ ДІЇ МОЛОЧНОЇ СИРОВАТКИ ПІСЛЯ ЕЛЕКТРОІСКРОВОГО ОБРОБЛЕННЯ НА КУЛЬТУРАХ РУХЛИВИХ КЛІТИН

Стаття присвячена вивченню цитотоксичної дії молочної сироватки до і після електроіскрового оброблення та сухої сироватки, збагаченої частинками магнію і мангану внаслідок електроіскрового диспергування гранул металів в її середовищі. Дослідження проводили з використанням альтернативного методу in vitro на біологічних тест-об'єктах – суспензійній культурі сперматозоїдів бика. Оцінку цитотоксичної дії здійснювали за індексом токсичності I_1 на аналізаторі АТ-05 (Росія).

У статті представлено результати фізико-хімічних досліджень і дисперсного аналізу молочної сироватки до та після електроіскрового оброблення. Визначено індекси токсичності зразків сухої демінералізованої сироватки та збагаченої магнієм і манганом внаслідок реалізації електроіскрового оброблення, що становлять 87,9 і 93,9 % відповідно. Зроблено висновок, що досліджувані зразки сухої сироватки належать до 4 класу небезпеки й є нетоксичними.

Ключові слова: *молочна сироватка, електроіскрове оброблення, магній, манган, цитотоксичність, тест-об'єкт, культура сперматозоїдів бика, рухливість, індекс токсичності.*

УДК 637.344 : 57.083

Кочубей-Литвиненко О. В., к.т.н., доцент, **Олішевський В. В.**, к.т.н., доцент,
Національний університет пищевых технологий, г. Киев, Украина

Дмитруха Н. М., д.б.н., с.н.с

Інститут медицини труда АМН Украины, г. Киев, Украина

ИССЛЕДОВАНИЕ ЦИТОТОКСИЧЕСКОГО ДЕЙСТВИЯ МОЛОЧНОЙ СЫВОРОТКИ ПОСЛЕ ЭЛЕКТРОИСКРОВОЙ ОБРАБОТКИ НА КУЛЬТУРАХ ПОДВИЖНЫХ КЛЕТОК

Статья посвящена изучению цитотоксического действия молочной сыворотки до и после электроискровой обработки, а также сухой сыворотки, обогащенной частицами магния и марганца в результате электроискрового диспергирования гранул металлов в ее среде. Исследования проводили с использованием альтернативного метода in vitro на биологических тест-объектах – суспензионной культуре сперматозоидов быка. Оценку цитотоксичности осуществляли по индексу токсичности на анализаторе АТ-05 (Россия).

В статье представлены результаты физико-химических исследований и дисперсного анализа молочной сыворотки до и после электроискровой обработки. Определены индексы токсичности образцов сухой деминерализованной сыворотки и обогащенной магнием и марганцем в результате электроискровой обработки, составляющие 87,9 и 93,9 % соответственно. Сделан вывод, что исследуемые образцы сыворотки относятся к 4 классу опасности и являются нетоксичными.

Ключевые слова: молочная сыворотка, электроискровая обработка, магний, марганец, цитотоксичность, тест-объект, культура сперматозоидов быка, подвижность, индекс токсичности.

UDC 637.344: 57.083

Kochubei-Lytvynenko O., Ph.D., associate professor,
Olishevsky V., Ph.D., associate professor
National University of Food Technologies, Kyiv, Ukraine
Dmytrukha N., Doctor of Biological Science
Institute for occupational health, Kyiv, Ukraine

STUDY OF MILK WHEY CYTOTOXICITY AFTER ELECTRICAL DISCHARGE TREATMENT OF MOVING CELLS CULTURES

The article is dedicated to studying cytotoxicity of milk whey before and after electrical discharge treatment and dry whey enriched with magnesium and manganese particles in result of electrical discharge dispersion of metal granules in its environment. The study was performed with the use of alternative method in vitro on biological test objects: suspension culture of bull spermatozoa. Estimate of the cytotoxic activity was performed according to I_t toxicity index on AT-05 analyzer (Russia).

The article presents results of physicochemical research and dispersion analysis of milk whey before and after electrical discharge treatment. Toxicity indexes of dry demineralized whey and whey enriched with magnesium and manganese as a result of electrical discharge treatment were established to constitute 87,9 and 93,9 % respectively. Conclusion was made that studied samples of dry whey belong to 4 class of threat and therefore are not toxic.

Key words: milk whey, electrical discharge treatment, magnesium, manganese, cytotoxicity, test object, culture of bull spermatozoa, agility, toxicity index.

Вступ. Використання лише традиційних технологій та способів оброблення для вирішення актуальних для молочного виробництва проблем є неперспективним в сучасних умовах. Тому інноваційним підходом є використання електрофізичних методів [1]. Але впровадження нових методів оброблення в технологічну схему виробництва харчових продуктів потребує вирішення ряду питань, зокрема, виявлення ланок виробництва, де економічно ефективно їх використовувати за раціонального поєднання з традиційними методами дослідження впливу на якість і безпечність готових продуктів тощо.

У Проблемній науково-дослідній лабораторії НУХТ тривають дослідження щодо вивчення фізичних та електрохімічних процесів, що відбуваються в молочній сироватці при реалізації методу об'ємного електроіскрового диспергування струмопровідних гранул металів. Доведено можливість збагачення молочної сироватки частинками біогенних елементів Магнію та Мангану. Оскільки ці елементи є каталізаторами багатьох процесів, у тому числі можуть прискорювати трансформацію лактози за певних умов, дані дослідження є перспективними. Але не менш важливим ніж вивчення процесів, що відбуватимуться за електроіскрового оброблення, є проведення токсиколого-гігієнічної оцінки обробленої молочної сироватки та виготовлених з неї продуктів.

Як правило, у вітчизняній та світовій практиці для доведення небезпечності речовин проводять дослідження на теплокровних тваринах. Проте сьогодення вимагає одержання інформації про токсичність та небезпечність речовин і продуктів за менш затратних способів, в експрес-режимі та більш гуманно, ніж

традиційно визначеними методами експериментальних досліджень на лабораторних тваринах. Нині активно розвиваються альтернативні методи *in vitro* на біологічних тест-об'єктах, що мають позитивні результати при оцінці токсичності полімерних матеріалів, парфумерно-косметичної продукції, поверхнево-активних речовин тощо [2-6].

Оцінка цитотоксичності з використанням рухливості статевих клітин бика в якості тест-об'єкту передбачає оцінювання токсичності речовин та визначення класу небезпечності. Перевагою використання суспензії культури сперматозоїдів бика (КСБ) порівняно з іншими клітинними культурами є відносна невибагливість до умов їх зберігання (немає потреби дотримуватись стерильних умов), що значно зменшує працемісткість і вартість випробувань. Метод дозволяє оцінити сумарний ефект від впливу досліджуваних речовин та продуктів за їх біологічною дією на тест-об'єкт КСБ.

Метою роботи було встановити безпечність молочної сироватки, збагаченої частинками магнію і мангану внаслідок об'ємного електроіскрового диспергування гранул металів, та порівняти ступінь її цитотоксичної дії альтернативним *in vitro* методом з використанням клітинного тест-об'єкту – суспензійної культури сперматозоїдів бика.

Матеріали і методи досліджень. Предмет досліджень: сироватка з-під сиру кисломолочного до та після електроіскрового оброблення в розрядній камері зі струмопровідним прошарком гранул магнію та мангану; суха сироватка демінералізована та суха сироватка, збагачена магнієм та манганом.

Електроіскровий процес реалізовували на експериментальному технологічному комплексі, що складається з генератора розрядних імпульсів, блоку управління, розрядної камери, вимірювальних і допоміжних приладів [7].

Суху сироватку, збагачену частинками магнію та мангану виробляли з підсирної сироватки, попередньо демінералізованої на нанофільтраційній установці GEA, а потім обробленій за електроіскровим методом.

Величину рН досліджуваного середовища визначали на іонометрі універсальному И-160 М. При цьому активну кислотність сухої сироватки вимірювали у відновлених зразках з масовою часткою сухих речовин 6,0 %.

Розмір частинок визначали на аналізаторах дисперсності частинок Malvern Instruments Ltd., Великобританія. Вміст металічних елементів у зразках сироватки – методом атомно-абсорбційної спектроскопії на атомно-абсорбційному спектрометрі ААС1N (Carl-Zeiss Jena, Німеччина).

Дослідження цитотоксичності проводили в умовах Лабораторії промислової токсикології і гігієни праці при використанні хімічних речовин Інституту медицини праці АМН України. В роботі використовували метод, що ґрунтується на визначенні безпосереднього впливу продукту на рухливість статевих клітин бика. Оцінку цитотоксичної дії досліджуваних зразків здійснювали за індексом токсичності I_t на аналізаторі АТ-05 (Росія). Індекс токсичності I_t (у %) обчислювали для кожного зразка досліджуваної молочної сироватки як відношення середньозваженого часу рухливості суспензії клітин у досліді до середньозваженої рухливості суспензії клітин у контролі.

Висновок щодо загально токсичної дії робили за значенням I_t . Якщо індекс токсичності досліджуваного об'єкта знаходиться в інтервалі значень 70 – 120 %, тоді його відносять до 4-го класу небезпеки і визнають нетоксичним. Якщо I_t

виходить за встановлені межі, то речовина є токсичною і потребує додаткових токсикологічних досліджень [3, 8].

Результати досліджень. Результати фізико-хімічних досліджень і дисперсного аналізу дослідних зразків молочної сироватки до та після реалізації електроіскрового процесу представлені в табл.1.

Таблиця 1

Характеристика дослідних зразків молочної сироватки

Номер зразка	pH	Середній розмір частинок, мкм	Вміст Mg, мг/кг	Вміст Mn, мг/кг
1	4,18 ± 0,18	0,490 ± 0,24	53±2,7	0,035 ± 0,001
2	4,76 ± 0,15	0,394 ± 0,17	148 ± 7,0	0,035 ± 0,001
3	4,99 ± 0,20	0,492 ± 0,26	53±2,7	0,060 ± 0,003
4	6,3 ± 0,20	60,3 ± 2,8	938	1,1
5	6,5 ± 0,15	63,6 ± 3,0	2900	12,9

Номер зразка: 1 – сироватка з-під сиру кисломолочного освітлена; 2,3 – сироватка, оброблена в розрядній камері з шаром гранул металів між основними електродами магнію та мангану відповідно; 4 – суха підсирна демінералізована сироватка; 5 – суха підсирна сироватка, збагачена магнієм і манганом.

Оцінка цитотоксичної дії досліджуваних зразків наведена у табл. 2.

Таблиця 2

Цитотоксичність досліджуваних зразків молочної сироватки

Номер зразка	Середньозважений час рухливості, ум.од., у:		Інтегральна оцінка рухливості, ум.од., у:		Індекс токсичності, %
	досліді	контролі	досліді	контролі	
1	5,2	34,1	49,0	20912,2	15,2
2	5,6		50,3		16,4
3	6,7		107,5		19,6
4	31,9	36,3	6605,5	28313,4	87,9
5	34,1		8776,5		93,9

Зменшення рухливості КСБ в зразках сироватки з-під сиру кисломолочного до та після оброблення пояснюється низьким pH середовища (табл. 1). Зміна pH розчину чинить цитотоксичну дію на суспензію сперматозоїдів бика, для якого характерний діапазон значень pH 5,9-7,3. Тому для підтвердження безпеки сироватки з низьким pH середовища слід підбирати інші тест-об'єкти, на які pH не буде мати істотного впливу. Хоча попередньо можна стверджувати, що зниження рухливості КСБ не пов'язане з електроіскровим обробленням, оскільки, незважаючи на низький рівень pH, інтегральна оцінка рухливості в оброблених зразках сироватки була навіть дещо вищою, ніж у вихідній сироватці.

Встановлено, що індекс токсичності зразків сухої демінералізованої сироватки становив 87,9 %, а сухої сироватки, збагаченої магнієм та манганом – 93,9 %. Це дає підстави віднести досліджувані зразки сухої сироватки до 4 класу небезпеки малонебезпечних речовин згідно з ГОСТ 12.1.007.

Відомо, що основним джерелом енергії прямолінійно-поступального руху сперматозоїдів є аденозинтрифосфат (АТФ), синтез якого здійснюють мітохондрії. Рухова функція сперматозоїдів зберігається доти, поки в клітині мітохондрії синтезують АТФ [2].

Відмічено, що при контакті сухої підсирної сироватки, збагаченої магнієм та манганом, зі сперматозоїдами бика, їх рухлива активність була навіть жвавішою порівняно зі зразком сухої підсирної сироватки. Тобто, електроіскрове оброблення не викликало в сироватці потенційно шкідливих чинників, які б могли спричинити порушення проникності мембран мітохондрій, припиняючи їх функціонування, та змінити енергетичний обмін клітин.

Висновки. 1. Електроіскрове оброблення не викликає в сироватці потенційно шкідливих чинників.

2. Суха підсирна сироватка, збагачена магнієм та манганом внаслідок електроіскрового оброблення, не виявляє цитотоксичної дії на КСБ. Індекс токсичності дорівнює 93,9 %, що дає підстави віднести її до 4-го класу небезпеки і визнати нетоксичною.

3. Для підтвердження безпеки сироватки з-під сиру кисломолочного з низьким рН середовища слід підбирати інші тест-об'єкти, на які рН не буде мати істотного впливу.

Перспективи подальших досліджень. Відповідно до Європейської законодавчої програми REACH з Реєстрації, експертизи та авторизації хімічних речовин для остаточного встановлення небезпеки обробленої сироватки, і враховуючи її призначення для харчових цілей, необхідно провести додаткові дослідження на культурах клітин епітелію кишкового та гепатоцитах для виявлення потенційних органів-мішеней.

Література

1. Рогов И. А. Электрофизические методы в холодильной технике и технологии / И. А. Рогов, Б. С. Бабакин, В. А. Выгодин. – М.: Колос, 1996. – 336 с.
2. Альмова А.А., Бегиева М.Б. Определение токсического действия полимерных материалов на основе N,N-диаллиламинокислот // Фундаментальные исследования. – 2012. – № 93. – с. 539-541.
3. Гигиена, токсикология, санитария. Экспресс-метод оценки общетоксического и кожно-раздражающего действия парфюмерно-косметической продукции *in vitro* (на культуре подвижных клеток): методические рекомендации № 29 ФЦ/394. – М.: Минздрав РФ, 2002. – 10 с
4. Лаппо В. Г., Перова Н. М. Оценка токсичности чистящих и моющих средств *in vitro* на кратковременной суспензионной культуре подвижных клеток-сперме быка // Токсикологический вестник. – 2004. – №6. – С. 17–60.
5. Наружный Н. П., Завьялов Н. В., Еськов А. П. Экспресс-метод определения цитотоксичности материалов с использованием в качестве тест-объекта спермы крупного рогатого скота. Методические рекомендации. – М.: 2001.
6. Оцінка токсичності поверхнево-активних речовин на культурі рухливих клітин / Яловенко О. І., Раєцька О. В., Голіченков О. М. та ін. // Довкілля та здоров'я. – 2014. - № 3 (70). – с. 15–18.
7. Лопатько, К. Г. Образование наноразмерной фракции металлов при электроискровой обработке гранул / К. Г. Лопатько, В. В. Олишевский, А. И. Маринин, Е. Г. Афтандилянц // Электронная обработка материалов. – 2013. – № 49 (6). – С. 80–85.
8. Межгосударственный стандарт. Продукция парфюмерно-косметическая. Методы оценки токсикологических и клинко-лабораторных показателей безопасности.

Стаття надійшла до редакції 4.09.2015