

ИССЛЕДОВАНИЕ ТОКСИЧНОСТИ БИОМАССЫ *DUNALIELLA SALINA* AR-1 О.А. Верушкина¹, Э.Н. Баймурзаев², Б.О. Сагдуллаева³, Л.Г. Тетюхина⁴, А.К. Тонких⁵

^{1,2,5}Институт микробиологии АН РУз,

^{3,4}Институт санитарии, гигиены и профзаболеваний МЗ РУз

<https://doi.org/10.5281/zenodo.8371939>

Аннотация. Изучены острая токсичность, кожно-резорбтивное, кожно-раздражающее действие, исследованы кумулятивные свойства, действие на слизистую оболочку глаз, лиофильно высушенной биомассы *Dunaliella salina*, рекомендованную в качестве БАДа.

Острая токсичность традиционно изучалась на белых мышах (обоих полов). Эффект кожно-резорбтивного и кожно-раздражающего действия изучали общепринятым методом исследования интактных мышей. Эффект, вызывающий аллерген, и действие на слизистую оболочку глаз, изучали путем тестирования конъюнктивы на сенсibilизированных мышках.

В результате лиофильно высушенная биомасса *Dunaliella salina* оказалась нетоксичной в любой дозе мг/кг, поэтому была принята $LD_{50} > \infty$ мг / кг. Результаты показали, что препарат не оказывает местного зудящего и аллергического действия.

На основании полученных данных можно сделать вывод, что биомасса *Dunaliella salina* обладает высокой безвредностью и относится к 4-му классу малотоксичных препаратов.

Ключевые слова: биомасса *Dunaliella salina*, острая токсичность, кумулятивные свойства, кожно-резорбтивное действие, чувствительность, кожно-раздражающее действие.

Annotatsiya. O'tkir toksikligi, terini rezorptiv qiluvchi, terini tirnash xususiyati beruvchi ta'sirini o'rgangan, parhez qo'shimchasi sifatida tavsiya etilgan Dunaliella salinasining liyofillangan biomassasi, ko'zning shilliq qavatiga ta'sirini, kumulyativ xususiyatlarini o'rgangan.

O'tkir toksiklik an'anaviy ravishda oq sichqonlarda (ikkala jinsda) o'rganilgan. Terini rezorptiv qiluvchi va terini bezovta qiluvchi ta'sirning ta'siri buzilmagan sichqonlarni o'rganish uchun umumiy qabul qilingan usul yordamida o'rganildi. Allergenni keltirib chiqaradigan ta'sir va ko'zning shilliq qavatiga ta'siri sezgir sichqonlarda kon'yunktivani sinash orqali o'rganildi.

Natijada, Dunaliella salinasining liyofilizatsiya qilingan biomassasi har qanday mg / kg dozada toksik bo'lmagan bo'lib chiqdi, shuning uchun $LD_{50} > \infty$ mg / kg qabul qilindi. Natijalar shuni ko'rsatdiki, preparat mahalliy qichishish yoki allergik ta'sirga ega emas.

Olingan ma'lumotlarga asoslanib, Dunaliella salinasining biomassasi juda zararsiz va past toksik dorilarning 4-sinfiga tegishli degan xulosaga kelish mumkin.

Kalit so'zlar: Dunaliella salina biomassasi, o'tkir toksikligi, kumulyativ xususiyatlari, terining rezorptiv ta'siri, sezgirligi, terining tirnash xususiyati ta'siri.

Abstract. Studied acute toxicity, skin-resorptive, skin-irritating effect, investigated the cumulative properties, the effect on the mucous membrane of the eyes, lyophilized biomass *Dunaliella salina*, recommended as a dietary supplement.

Acute toxicity has traditionally been studied in white mice (both sexes). The effect of skin-resorptive and skin-irritating action was studied using a generally accepted method for studying

intact mice. The allergen-inducing effect and the effect on the mucous membrane of the eyes were studied by testing the conjunctiva in sensitized mice.

As a result, the lyophilized biomass of *Dunaliella salina* turned out to be non-toxic at any dose of mg / kg; therefore, $LD_{50} > \infty$ mg / kg was adopted. The results showed that the drug had no local itching or allergic effects.

Based on the data obtained, it can be concluded that the biomass of *Dunaliella salina* is highly harmless and belongs to the 4th class of low-toxic drugs.

Keywords: biomass of *Dunaliella salina*, acute toxicity, cumulative properties, skin resorptive effect, sensitivity, skin irritant effect.

Аральское море высыхает и мелеет, из-за чего концентрация солей в оставшемся Западном Арале и многочисленных озёрах Приаралья, в 2000 - 2005 гг. поднялась выше 110 г/л [1]. В настоящее время концентрация солей в воде Западного остаточного водоема Арала достигает 150–167 г/л. Это говорит о том, что в водоеме наступила стадия галогенеза. И в этих оставшихся водах обнаружилась солеустойчивая микроводоросль *Dunaliella salina* [10]. Ни в фундаментальной работе А.М. Музафарова [7], посвящённой флоре водоёмов Средней Азии, ни в последующих работах по Аралу и водоёмам Приаралья, упоминания об Аральской *Dunaliella salina* не было найдено. В литературе, впервые о дуналиелле аральской было упомянуто в 2009 г в статье Тонких с соавторами.

Эту микроводоросль в промышленных масштабах производят во многих странах мира, из-за каротиноидов (до 10% от сухой бмомассы), липидов (до 10% биомассы) и глицерина (до 30% биомассы) [17].

Кроме того, были различные сообщения об использовании водорослей или ее экстрактов и метаболитов в качестве антиоксидантов, противоаллергических, противомикробных, цитотоксических, кардиоактивных, противокашлевых, противодиабетических, противовоспалительных, гепатопротекторных. Обсуждалось текущее состояние и потенциальное применение *Dunaliella* в области фармацевтики, нутрицевтиков и различных промышленных продуктов. [15]. Поэтому, дальнейшее изучение терапевтических свойств *D. salina* и её промышленное культивирование может привести к расширению её практического применения в медицине.

По данным, проведенных исследований, FAO UN ООН дефицит витамина А или его предшественника β-каротина в Узбекистане испытывает 53% детского и 38,4% взрослого населения.[Report 2017]. Эту проблему дефицита у населения и сельскохозяйственных животных поможет решить производство витаминизированных пищевых и кормовых добавок на основе промышленного культивирования в Узбекистане микроводоросли *D. salina*.

Так как *D. salina* по естественным причинам появилась в гиперсолёных водоёмах Приаралья, этот регион может стать местом её промышленного культивирования. Выделенный из гиперсолёных озёр Приаралья штамм *Dunaliella salina* AR-1, содержит около 2% β-каротина и обладает высокой антиоксидантной активностью [2].

Прежде, чем начать исследовать терапевтические свойства данной микроводоросли, нам необходимо было проверить ее на токсичность. В связи с этим и были проведены данные исследования.

Исследование токсичности биомассы *Dunaliella salina* AR-1 было проведено совместно с сотрудниками Института санитарии, гигиены и профзаболеваний МЗ РУз.

Целью исследования явилось изучение острой токсичности, кожно-раздражающего, кожно-резорбтивного действия, исследование кумулятивных свойств, а также действие биомассы на слизистую оболочку глаз.

Материалы и методы исследования. Все исследования были проведены на здоровых животных, прошедших карантин не менее 10-14 дней [3, 9, 11].

Объектом исследования была лиофильно высушенная биомасса микроводоросли *Dunaliella salina*.

Изучение острой токсичности. Изучение острой токсичности проводили по общепринятой методике на 12 белых мышах (обоих полов), массой тела 100-120 г, с последующим разделением на группы по 6 животных в каждой.

Препарат вводили однократно перорально при помощи металлического зонда в концентрации 5 г/мл, растворяя в дистиллированной воде. Контрольной группе животных (n=6) в аналогических условиях опыта вводили стерильную воду для инъекций [8, 9, 11].

Кожно-раздражающее действие. Исследование кожно-раздражающего действия микроводорослей *Dunaliella salina* AR-1 проводили в опытах на 6 белых крысах массой 90-120 г. Перед опытом удалили шерсть лабораторного животного на боку туловища с помощью вогнутых ножниц и подготовили место для аппликации размером 2 x 2 см². Исследуемый продукт наносили в количестве 1 мл в исходной концентрации (5 г/мл). Контрольной группе животных (n=6) в аналогических условиях нанесли дистиллированную воду.

Во избежание слизывания, стирания яда о стенки клетки, животных перед аппликацией фиксировали в специальных станках и оставили фиксированными в течении 4 часов.

После эксперимента наблюдение за подопытными животными вели в течение 3 суток. В процессе эксперимента все подопытные животные находились под ежедневным наблюдением: отмечали общее состояние, поведение, употребление корма и воды, состояние кожи, слизистых оболочек и волосяных покровов. Исследования проводились по общепринятой методике, описанной в ГОСТ Р ИСО 10993.10-99 [5].

Кожно-резорбтивное действие. Исследование кожно-резорбтивного действия биомассы *Dunaliella salina* AR-1 проводили в опытах на 6 белых крысах массой 90-115 г. Лабораторных животных, поместили в индивидуальные домики и фиксировали. В пробирку внесли препарат в исходной концентрации и погрузили хвост крысы в пробирку с препаратом. Пробирки поместили в водяную баню с температурой 28-30 °С. После 4 часов экспозиции, кожу хвоста обмывали теплой водой. Хвосты контрольной группы животных (n=6) в аналогических условиях опыта погрузили в пробирки с дистиллированной водой.

Во время экспериментов по изучению острой токсичности, кожно-раздражающего и кожно-резорбтивного действия все животные содержались в стандартных условиях вивария и находились на полноценном пищевом рационе. При проведении экспериментов были соблюдены следующие климатические условия: температура помещения находилась в интервале 18-25°C, относительная влажность в интервале 40-70% [9, 11, 12].

Исследование кумулятивных свойств. Для токсикологической характеристики изучаемого вещества важно выяснить, обладает ли данное соединение кумулятивными свойствами. При многократном поступлении через малые интервалы времени вещество может само накапливаться в организме (материальная кумуляция: кумуляция пестицида или его метаболитов) либо вызывать суммирование эффекта, т.е. суммирование функциональных изменений, связанных с длительным воздействием яда (функциональная кумуляция). Возможен и смешанный тип кумуляции. [8, 11]. Выяснение степени кумулятивного действия вещества позволяет в относительно короткие сроки прогнозировать потенциальную способность пестицида вызывать хроническое отравление. [6, 11,14].

Исследование кумулятивных свойств биомассы *Dunaliella salina* AR-1 проводили в опытах на 6 белых беспородных крысах массой 100-120 г. Препарат вводили в течение 28 дней перорально при помощи металлического зонда в возрастающих концентрациях. Начальной концентрацией препарата был раствор в концентрации 0,01 г/мл, затем через каждые 4 дня увеличивали концентрацию препарата. Контрольной группе животных (n=6) в аналогических условиях опыта вводили стерильную воду для инъекций.

Все подопытные животные не отличались по общему состоянию и поведению от контрольных животных, реакция на внешние раздражители (болевые, звуковые) сохранены.

Действие биомассы на слизистую оболочку глаз. Исследование действия биомассы *Dunaliella salina* AR-1 на слизистую оболочку глаз проводили в опытах на 6 белых крысах массой 100-120 г. Препарат в исходной концентрации вводили в конъюнктивальный мешок с помощью пипетки в количестве 1-2 капли. Контрольной группе животных (n=6) в аналогичных условиях ввели в конъюнктивальный мешок дистиллированную воду.

Во время эксперимента все животные содержались в стандартных условиях вивария и находились на полноценном пищевом и водном рационе. При проведении экспериментов температура помещения находилась в интервале 18-25 °C, относительная влажность в интервале 40-70%.

Результаты исследования острой токсичности. Результаты проведенных исследований установлено, что препарат при однократном пероральном применении в выше указанной концентрации не вызывает гибели подопытных белых беспородных крыс в течение 14 суток наблюдения. После введения препарата в дозах 5 г/мл не наблюдались изменения общего состояния, поведения, а также гибели животных. Вычисление ЛД₅₀ из-за отсутствия погибших животных после перорального введения препарата оказалось невозможным, так как пороговой дозы не удалось достичь, что свидетельствует об отсутствии токсичности [9, 12].

Результаты кожно-раздражающего действия. Результаты проведенных исследований установлено, что микроводоросли *Dunaliella salina* AR-1 при применении в выше указанных концентрациях не обладают выраженным кожно-раздражающим действием и не вызывали гибели подопытных крыс в течение 3 суток наблюдения.

Результаты исследования кожно-резорбтивного действия. Результаты проведенных исследований установлено, что микроводоросли *Dunaliella salina* при применении в выше указанных концентрациях не обладают выраженным кожно-

резорбтивным действием и не вызывает гибели подопытных животных в течение 3 суток наблюдения. (таблица 1.)

Результаты обработаны методом вариационной статистики по критерию Стьюдента при $p=0,05$ [9, 12].

Таблица 1.

Результаты исследования острой токсичности, кожно-раздражающего и кожно-резорбтивного действия.

Исследования	Название испытуемого продукта	Доза, 5 гр/мл	Количество крыс	Курс введения	Наблюдение 1-14 день		
					Заболеело	Пало	Выжило
Острой токсичности	Биомасса микроводоросли <i>Dunaliella salina</i>	5	6	1	0	0	6
Кожно-раздражающего действия		5	6	1	0	0	6
Кожно-резорбтивного действия		5	6	1	0	0	6

Результаты исследования кумулятивных свойств. Все подопытные животные не отличались по общему состоянию и поведению от контрольных животных, реакция на внешние раздражители (болевые, звуковые) сохранены. Корм и воду употребляли хорошо, выделение кала и мочи были обычными. Состояния кожи, слизистых оболочек и волосяных покровов без изменений, динамика массы тела не отличалась от контрольных мышей. После забоя животных при макроскопическом осмотре внутренних органов видимых патологических изменений не выявлено.

Таким образом, макроскопические исследования внутренних органов у белых беспородных крыс, вовлеченных в эксперимент, показали, что все показатели практически не отличались между собой. По макроскопическому исследованию внутренних органов и по абсолютному весу печени, селезенки и почек между опытной и контрольной группами не обнаружены видимые отличия. Из-за отсутствия гибели животных не было возможности вычислить коэффициент кумуляции.

Таблица 2.

Результаты исследования кумулятивных свойств микроводорослей *Dunaliella salina* на белых беспородных крысах

Название продукта	Доза, гр/мл	Количество крыс	Курс введения	Наблюдение 1-28 день		
				Заболело	Падо	Выжило
Микроводоросли <i>Dunaliella salina</i>	0,01-40,96	6	1	0	0	6

Результаты исследования действия биомассы на слизистую оболочку глаз. Все подопытные животные не отличались по общему состоянию и поведению от контрольных животных, реакция на внешние раздражители (болевые, звуковые) сохранены. Корм и

воду употребляли хорошо, выделение кала и мочи были обычными. Состояния кожи, слизистых оболочек и волосяных покровов без изменений. Состояние зрительного анализатора было без изменений, конъюнктивы не гиперемирована, обычной окраски. Первые минуты после введения отмечали покраснение глаз, беспокойное поведение животного, но через 20-30 минут покраснение глаз исчезли, животные успокоились и поведение стало обычным. Выявлено гиперемия и изменение поведения животного было временным и было связано с попаданием в слизистую глаз чужеродного вещества.

В результате однократного воздействия не было обнаружено никаких изменений роговицы и конъюнктивы глаза опытного глаза животных, по сравнению с контрольным глазом. (таблица 3.)

Таблица 3.

Результаты исследования действия микроводорослей *Dunaliella salina* на слизистую оболочку глаз белых крыс

Название продукта	Доза, гр/мл	Количество крыс	Курс введения	Наблюдение 1-14 день		
				Заболело	Падо	Выжило
Микроводоросли <i>Dunaliella salina</i>	5	6	1	0	0	6

Обсуждения полученных результатов. На основании полученных данных мы можем сделать вывод, что биомасса микроводоросли *Dunaliella salina* имеет хорошую переносимость, так как при пероральном введении высоких доз, не наблюдается клинической картины интоксикации, а также гибели животных. Также полученные данные свидетельствуют об отсутствии в лиофильно высушенной биомассе кожно-раздражающего и кожно-резорбтивного действия.

Обобщая вышесказанное по токсикологическим показателям (острая токсичность, кожно-резорбтивное и кожно-раздражающее действия, исследование кумулятивных свойств, а также действие биомассы на слизистую оболочку глаз), можно сделать заключение о том, что порошок микроводоросли *Dunaliella salina*, безвреден в своём применении.

Заключение. Изучена острая токсичность, кожно-резорбтивное и кожно-раздражающее действия, в результате было установлено, что препарат обладает хорошей переносимостью, и высокой безвредностью. Биомасса микроводоросли *Dunaliella salina* AR-1 относится к четвертому классу токсичности, не оказывает раздражающего действия на слизистую оболочку глаз лабораторных животных. Кроме того, в период наблюдения не отмечены признаки отрицательного влияния на организм лабораторных животных. Кумулятивные свойства в изученном препарате также отсутствовали.

REFERENCES

1. Аральское море и Приаралье Обобщение работ НИЦ МКВК по мониторингу состояния и анализу ситуации. Ташкент, Baktria Press, 2017 (рус), Paris, UNESCO, 2017 (eng).
2. Абдуллаев А. А., Семененко В. Е. Интенсивная культура *Dunaliella salina* Teod. и некоторые ее физиологические характеристики // Физиология растений. - 1974. - 21, вып. 6. - С. 1145 -1153.

3. Амикишиева А. В. Поведенческое фенотипирование: современные методы и оборудование / А. В. Амикишиева // Информац. Вестн. ВОГиС. – 2009. – № 3. – С. 529-542.
4. Бидарова Ф.Н., Хубаева Т.О., Кисиева М.Т., Хубаева И.В., Тавасиева Дз.В. Экспресс-методы оценки антиокислительной и антирадикальной активности органических субстратов: методические рекомендации по фармацевтической химии для студентов фармацевтического факультета.-Владикавказ: СОГМА, 2014.- 32 с.
5. ГОСТ Р ИСО 10993.10-99. Оценка биологических действий медицинских изделий. Исследование раздражающего и сенсибилизирующего действия. - Москва: Издательство стандартов, 1999. - 38 с.
6. «Методология комплексного и ускоренного нормирования пестицидов в объектах окружающей среды». Методические указания разработаны под руководством дейст. чл. АМН СССР, проф. Л.И.Медведя.
7. Музафаров А.М., Таубаев Т.Т. Культивирование и применение микроводорослей. Ташкент. Фан. УзССР. 1984. 136 с.
8. Насонов Е. Л. Применение нестероидных противовоспалительных препаратов: терапевтические перспективы // Русский медицинский журнал.- 2002.- Т 10, - № 4.
9. «Порядок и методология предрегистрационной токсиколого-гигиенической экспертизы пищевых добавок», 012-3/0244 МУ № 9н/138. Утверждено зам.министра здравоохранения П.Н.Бургасов. 30.09.1980г. №2255-80
10. Разаков Р.М., Исмаилходжаев Б.Ш., Тонких А.К., Махмурова Д.М., Раджабова Г.Г. Разработка основ технологии культивирования микроводоросли Дуналиелла в условиях Узбекистана// ЎзМУ Хабарлари. Махсус сон. 2011. С.19-21.
11. Руководство по экспериментальному (доклиническому) изучению новых фармакологических веществ / [под общ. ред. Р.У. Хабриева]. - 2-е изд., перераб. и доп. - М.: ОАО «Изд-во «Медицина», - 2005. - 832 с.
12. Руководство по проведению доклинических исследований лекарственных средств. Часть первая / [под ред. А.Н. Миронова]. - М.: Гриф и К, 2012. - 944 с.
13. Руководство. Унифицированные методы исследования качества вод. Часть 3. Методы биологического анализа вод (СЭВ). М., 1977.
14. Саноцкий И.В. Методы определения токсичности и опасности химических веществ. Москва, - 1970, - С.161-163; 175-177.
15. Arun N., Singh D.P. A review on pharmacological applications of halophilic alga Dunaliella.// Indian Journal of Geo-Marine Science. 2016. V.45 (3), P. 440-447
16. Ascoli C, Barbi M, Frediani C, Petracchi D. Effects of electromagnetic fields on the motion of Euglena gracilis// Biophysical Journal, 1978. V. 24. P. 601-612
17. Ben-Amotz A. Bio-Fuel and CO2 Capture by Micro-Algae. Booklet of Conference “Wind, Sea, Algae” April 20-22, 2009. Maribo, Denmark