

ESTIMATION OF TOXIC OF SURFACTANTS ON THE CULTURE OF MOBILE CELLS

Yalovenko O.I., Raietska O.V., Holichenkov O.M., Babii V.F., Kondratenko O.E., Pimushyna M.V.

ОЦІНКА ТОКСИЧНОСТІ ПОВЕРХНЕВО-АКТИВНИХ РЕЧОВИН НА КУЛЬТУРІ РУХЛИВИХ КЛІТИН

**ЯЛОВЕНКО О.І.,
РАЄЦЬКА О.В.,
ГОЛІЧЕНКОВ О.М.,
БАБІЙ В.Ф.,
КОНДРАТЕНКО О.Є.,
ПІМУШИНА М.В.**
ДУ "Інститут гігієни та
медичної екології
ім. О.М. Марзеєва НАМН
України",
м. Київ

УДК: 612.014.46: 543.395

Ключові слова: ПАВ, *in vitro*
метод, культура
сперматозоїдів бика,
цитотоксичність,
безпечність.

Пріоритетним напрямком розвитку сучасної токсикології є розробка методів біотестування, які можуть бути використані як альтернатива випробуванням на тваринах та як методи оцінки специфічних властивостей окремих груп хімічних речовин, наприклад поверхнево-активних речовин (ПАР) [1-3]. ПАР — одна з найбільш токсичних груп інгредієнтів, які входять до складу рецептур косметичних засобів. Необхідність зниження токсичних ефектів речовин цієї групи, виявлених протягом тривалої історії їх використання у косметичці, зумовила тенденцію заміни широковідомих, подразнюючих шкіру ПАР (наприклад, лаурилсульфат натрію) у готових виробках, на нові, синтезовані з природної сировини, більш безпечні за своїм впливом на організм [4]. Враховуючи вимоги біоетики щодо застосування ссавців в експерименті та для виявлення і підтвердження переваг нових тензидів при їх гігієнічній оцінці, намага-

ються використовувати, крім традиційних стандартизованих методів досліджень, біотести, які є більш чутливими для виявлення окремих ефектів і їхніх механізмів дії, а також специфічні для обраної групи хімічних речовин. Одним з таких методів оцінки негативної дії на організм є *in vitro* метод оцінки токсичності з використанням короткотривалої суспензійної культури рухливих клітин (сперматозоїдів бика).

Метою нашої роботи було визначити безпечні ПАР та порівняти ступінь їхньої цитотоксичної дії альтернативним *in vitro* методом з використанням клітинного тест-об'єкту суспензійної культури сперматозоїдів бика.

Матеріали та методи досліджень. У роботі досліджено 11 ПАР: аніонні (АПАВ) — лаурилсульфат натрію, лауретсульфат натрію, натрієва сіль поліетоксисульфосукцинату; амфотерні (Амф. ПАР) — кокамідпропілбетаїн, динатрій кокоамфодіацетат, алкілдиметилбетаїн,

ОЦЕНКА ТОКСИЧНОСТИ ПОВЕРХНОСТНО-АКТИВНЫХ ВЕЩЕСТВ НА КУЛЬТУРЕ ПОДВИЖНЫХ КЛЕТОК

**Яловенко Е.И., Раецкая Е.В.,
Голыченков А.М., Бабий В.Ф.,
Кондратенко Е.Е., Пимушина М.В.**
ГУ "Институт гигиены и медицинской
экологии им. А.Н. Марзеева Национальной
академии медицинских наук Украины", г. Киев

Целью нашей работы было определить безопасные ПАВ и сравнить степень их цитотоксического действия альтернативным *in vitro* методом с использованием клеточного тест-объекта суспензионной культуры сперматозоидов быка.

Материалы и методы исследований. В работе исследовано 11 ПАВ разных групп: анионные, амфотерные, неионогенные, катионные. Оценку безопасности (цитотоксичности) проводили *in vitro*

тестированием на культуре сперматозоидов быка при использовании анализатора токсичности АТ-05.

Результаты исследований.

В исследованиях *in vitro* установлено, что из 11 ПАВ только одно (поликватерниум 7) является безопасным (относится к 4 классу опасности и не оказывает кожнораздражающего действия), по степени выраженности цитотоксического действия наиболее опасными ПАВ являются алкилдиметилбетаин, лаурилсульфат натрия, лауретсульфат натрия, кокамидпропилбетаин. Определено нормативное разведение ПАВ для проведения сравнительных исследований их цитотоксического действия.

Ключевые слова: ПАВ, *in vitro* метод, культура сперматозоидов быка, цитотоксичность, безопасность.

© Яловенко О.І., Раєцька О.В., Голіченков О.М., Бабій В.Ф., Кондратенко О.Є., Пимушина М.В. СТАТТЯ, 2014.

натрієва сіль n-пальметилглутамінової кислоти; неіоногенні ПАР (НПАР) — кокоглюкозид, діетаноламід жирних кислот кокосового масла; комплекс ПАР — водний розчин поліетиленгліколю-150, полігліцерил-2-тристеарату, лаурилполіоксиетиленсульфату, дипропіленгліколю; катіонна ПАР — полікватерніум-7. Усі ці тензиди, крім лаурилсульфату натрію та діетаноламідів жирних кислот, випускаються у вигляді 30-50% стабілізованих водних розчинів. Концентрація кожного ПАР в інгредієнті враховувалася у процесі приготування водних витяжок.

Оцінку токсичності (цитотоксичності) проводили *in vitro* на культурі сперматозоїдів бика при використанні аналізатора токсичності АТ-05, який дозволяє визначати сумарний індекс токсичності водної витяжки

$$I_t^s = S_{\text{ср. дослід}} / S_{\text{ср. контр}} \cdot 100\%,$$

де $S_{\text{ср. дослід}}$ — середнє арифметичне значення сумарної рухової активності сперматозоїдів у досліді, $S_{\text{ср. контр}}$ — середнє арифметичне значення сумарної рухової активності сперматозоїдів у контролі.

За методичними рекомендаціями [5] при скринінговій оцінці безпечності цим альтернативним методом досліджені витяжки вважаються безпечними, тобто відсутні загальнотоксична та шкірно-подразнююча дія, якщо значення індексу токсичності I_t^s перебуває у діапазоні від 70% до 120%.

Порівняльні дослідження рівня цитотоксичної дії ПАР вико-

нували відповідно до вимог методичних рекомендацій [5], за виключенням етапу пробопідготовки, для якого експериментально визначили нормативне розведення водних витяжок, зручне для виявлення ефекту. В якості позитивного контролю використовували лаурилсульфат натрію, який є еталонним подразником у токсикологічних дослідженнях продукції косметичної промисловості [6, 7].

Результати досліджень. ПАР у концентраціях, безпечних для цілісного організму ссавців, можуть проявляти високу цитотоксичність *in vitro* на будь-якій короткотривалій культурі еукаріотичних клітин. Під час проведення порівняльних випробувань *in vitro* на культурі рухливих клітин необхідно підібрати таку нормативну концентрацію водних витяжок ПАР, яка б дозволила порівняти в експерименті ступінь проявлення їхньої цитотоксичної дії. Для вирішення цього завдання були оцінені водні витяжки концентрацій (0,004%, 0,008%, 0,02%, 0,04%) трьох ПАР: лаурилсульфату натрію (як позитивного контролю), лауретсульфату натрію та кокамідопропілбетаїну, які виявилися найтоксичнішими, за даними літературних джерел та за результатами власних досліджень *in vitro* на короткотривалій культурі еритроцитів [8, 9]. На аналізаторі токсичності АТ-05 визначали сумарний індекс токсичності водних витяжок кожної концентрації (I_t^s).

Результати досліджень токсичності ПАР *in vitro* на культурі сперматозоїдів бика, представлені у таблиці 1, показують, що усі водні витяжки ПАР, у тому числі і лаурилсульфату натрію, у концентраціях 0,004%, 0,008% нетоксичні для сперматозоїдів бика у короткотривалій суспензійній культурі. Водні витяжки усіх трьох ПАР 0,04% концентрації показують дуже

високий рівень токсичності, у тому числі і "найм'якший" з них, кокамідопропілбетаїн, а значення I_t^s лаурилсульфату натрію (1,7%) та лауретсульфату натрію (0%) практично однаково (на рівні нижнього граничного значення діапазону вимірювань (0%), тобто токсичнішої речовини, ніж лаурилсульфат натрію виявити буде неможливо. Оцінка впливу водних витяжок ПАР 0,02% концентрації на сперматозоїди у культурі дозволила більш показово розділити ПАР за рівнем цитотоксичної дії. Значення I_t^s 0,02% водної витяжки лаурилсульфату натрію значно вище (28%) від нижнього граничного значення діапазону вимірювань за пристроєм, тому дослідження витяжок ПАР 0,02% концентрації дозволить виявити і більш небезпечні ПАР. Враховуючи викладене вище, при порівняльних дослідженнях цитотоксичної дії ПАР було обрано нормативну концентрацію їхніх водних витяжок — 0,02%.

Визначення загальнотоксичної дії та шкіро-подразнюючої дії проводили за рекомендованим та стандартизованим у Російській Федерації для оцінки експрес-методом безпечності очищувальних косметичних засобів, в якому як тест-об'єкт використовується культура сперматозоїдів бика, а нормативна концентрація водних витяжок речовин для досліджень — 0,04% [5].

Результати досліджень токсичної дії водних витяжок ПАР 0,04% та 0,02% концентрацій наведено у таблиці 2.

Аналіз отриманих результатів досліджень 0,04% водних витяжок ПАР (табл. 2) показав, що у перших 10 ПАР $I_t^s < 70\%$. Згідно з методичними рекомендаціями [5] це означає, що речовини слід піддавати розширеним санітарно-хімічним та токсикологічним дослідженням, і лише один (полікватерніум 7) можна характеризувати як компонент, який належить до 4 класу не-

Таблиця 1

***In vitro* токсичність водних витяжок ПАР різної концентрації**

Найменування ПАР	Сумарний індекс токсичності (I_t^s) витяжок ПАР різних концентрацій			
	(I_t^s) витяжки 0,004% концентрації	(I_t^s) витяжки 0,008% концентрації	(I_t^s) витяжки 0,02% концентрації	(I_t^s) витяжки 0,04% концентрації
Лаурилсульфат натрію	75,7	79,6	28	1,7
Лауретсульфат натрію	97,5	98,1	29,7	0,0
Кокамідопропілбетаїн	122,9	99,4	36,7	16,8

ESTIMATION OF TOXIC OF SURFACTANTS ON THE CULTURE OF MOBILE CELLS

Yalovenko O.I., Raietska O.V., Holichenkov O.M., Babii V.F., Kondratenko O.E., Pimushyna M.V.
State Institution "O.M. Marzeiev Institute for Hygiene and Medical Ecology, National Academy of Medical Sciences of Ukraine", Kyiv

Objective. To define safe surfactants and to compare a degree of their cytotoxic effect by the alternative *in vitro* method with the use of cellular test-object of suspension culture of bull spermatozoa.

Materials and methods of research. 11 surfactants of different groups were studied in work: anionic, amphoteric, nonionogenic and cationic. Estimation of safety (cytotoxicity) was conducted

by *in vitro* assay on the culture of bull spermatozoa at the use of analyzer of toxicity AT-05.

Results of researches. In research *in vitro* we determined that only one (polyquaternium 7) from 10 surfactants was safe (belongs to the 4-th risk class and does not causes a skin-irritating effect); alkyl-dimethylbetaine, sodium lauryl sulfate, sodium lauryl sulfate, cocamidopropylbetaine were the most dangerous surfactants by a degree of the expressiveness of cytotoxic effect; we determined a standard dilution of the surfactants for the performance of the comparative research of their cytotoxic effect.

Keywords: surfactants, *in vitro* method, culture of spermatozoa of bull, cytotoxicity, safety.

безпеки та не має шкіро-подразнюючих властивостей.

У ході порівняння результатів досліджень I_t^s 0,02% витяжок ПАР (табл. 2) виявлено, що за рівнем зменшення цитотоксичної дії ці речовини можна розмістити у такому порядку (рис.): алкілдиметилбетаїн, лаурилсульфат натрію, лауретсульфат натрію, кокамідопропілбетаїн, кокоглюкозид, натрієва сіль поліетоксисульфосукцинату, діетаноламід жирних кислот кокосового масла, динатрій кокоамфодіацетат, комплексний інгредієнт (водний розчин поліетиленгліколю-150, полігліцерил-2-тристеарату, лаурилполіоксиетиленсульфату, дипропіленгліколю), натрієва сіль n-пальметилглутамінової кислоти, полікватерніум 7.

Необхідно відзначити, що алкілдиметилбетаїн виявився найбільш небезпечною ПАР, цитото-

ксічна дія на сперматозоїди якої перевищує навіть рівень негативного впливу лаурилсульфату натрію, який ми обрали як позитивний контроль у досліді, а лауретсульфат натрію за значенням I_t^s практично не відрізняється від лаурилсульфату натрію. За проведеними дослідженнями натрієву сіль n-пальметилглутамінової кислоти, динатрій кокоамфодіацетату, діетаноламід жирних кислот кокосового масла, полікватерніуму -7 можна характеризувати як більш "м'які", ніж інші тензиди, тому перші три з них можуть бути прекрасною заміною токсичних ПАР (лаурилсульфату натрію, лауретсульфату натрію) у рецептурах косметичних засобів.

Висновки

Аналіз та узагальнення отриманих результатів досліджень, проведених *in vitro* біотестуванням на культурі спермато-

зоїдів бика при використанні аналізатора токсичності АТ-05, дозволяє зробити висновок, що лише один з 11 досліджених ПАР (полікватерніум 7) не спричиняє шкіро-подразнюючої дії, і його можна віднести до 4 класу небезпеки за класифікацією ДСТУ 12.1.007. Для виявлення класу токсичності та оцінки подразнюючого ефекту інших ПАР необхідно проводити додаткові розширені токсикологічні дослідження.

Порівняльна оцінка цитотоксичної дії на культурі сперматозоїдів бика показала, що найбільш небезпечними ПАР є алкілдиметилбетаїн, лаурилсульфат натрію, лауретсульфат натрію. Причому перший виявився навіть більш токсичним, ніж еталонний подразник лаурилсульфат натрію, а рівень цитотоксичної дії лауретсульфату натрію практично не від-

Таблиця 2

Сумарний індекс токсичності водних витяжок ПАР 0,02% та 0,04% концентрацій

Найменування ПАР	Назва групи ПАР	Сумарний індекс токсичності I_t^s водних витяжок ПАР	
		I_t^s 0,04% витяжки ПАР	I_t^s 0,02% витяжки ПАР
Алкілдиметилбетаїн	Амф.ПАР	0,0	18
Лаурилсульфат натрію	АПАР	1,7	28,0
Лауретсульфат натрію	АПАР	0,0	29,7
Кокоамідопропілбетаїн	Амф.ПАР	16,8	36,7
Діетаноламід жирних кислот кокосового масла	НПАР	25,5	55,1
Натрієва сіль поліетоксисульфосукцинату	АПАР	31,8	43,7
Кокоглюкозид	НПАР	33,6	41,7
Динатрій кокоамфодіацетат	Амф.ПАР	37,1	59,3
Водний розчин поліетиленгліколю-150, полігліцерил-2-тристеарату, лаурилполіоксиетиленсульфату, дипропіленгліколю	Комплекс ПАР	41,9	70,2
Натрієва сіль n-пальметилглутамінової кислоти	Амф.ПАР	64,4	86,9
Полікватерніум 7	КПАР	87,7	124,6

різняється від рівня позитивного контролю. Ці результати зовсім не узгоджуються з рекламними рекомендаціями виробників, наданими в інформаційних описах, щодо більш "м'якої" дії на клітини ссавців алкілдиметилбетаїну та лауретсульфату натрію. Водночас щодо натрієвої солі п-пальметилглутамінової кислоти прогнози виробників про "м'які" токсикологічні властивості підтвердилися. Вважаємо, що при введенні нових інгредієнтів до косметичних засобів необхідно проводити повноцінні токсикологічні дослідження, а не давати оцінку негативного впливу на організм за даними відомих аналогів.

ЛИТЕРАТУРА

1. Федосеева Т.А. Гигиеническое обоснование прогнозирующей способности альтернативного метода при оценке опасности моющих и чистящих средств: автореф. дис. канд. мед. наук: 14.00.07 — гигиена / Т.А. Федосеева. — Мытищи, 2007.
2. Тимофеев Г. Безопасность и эффективность на пути косметического средства к потребителю // SORF-Journal (Russian version). — 2007. — № 5. — С. 34-40.
3. Каркищенко Н.Н. От моделей животных к альтернатив-

ным моделям в токсикологии / Н.Н. Каркищенко // Токсикологический вестник. — 2010. — № 3. — С. 18-21.

4. Новая косметология: в 2-х т. — Т. 1 / под ред. Е.И. Эрнандес. — М.: ООО Фирма КЛАВЕЛЬ, 2005. — 424 с.

5. Гигиена, токсикология, санитария. Экспресс-метод оценки общетоксического и кожно-раздражающего действия парфюмерно-косметической продукции *in vitro* (на культуре подвижных клеток): метод. рек. № 29 ФЦ/394. — М.: Минздрав РФ, 2002. — 10 с.

6. Loffler H. Profile of irritant patch testing with detergents: sodium lauryl sulfate, sodium laureth sulfate and alkyl polyglucoside / H. Loffler, R. Happle // Contact Dermatitis. — 2003. — Vol. 48, № 1. — P. 26-32.

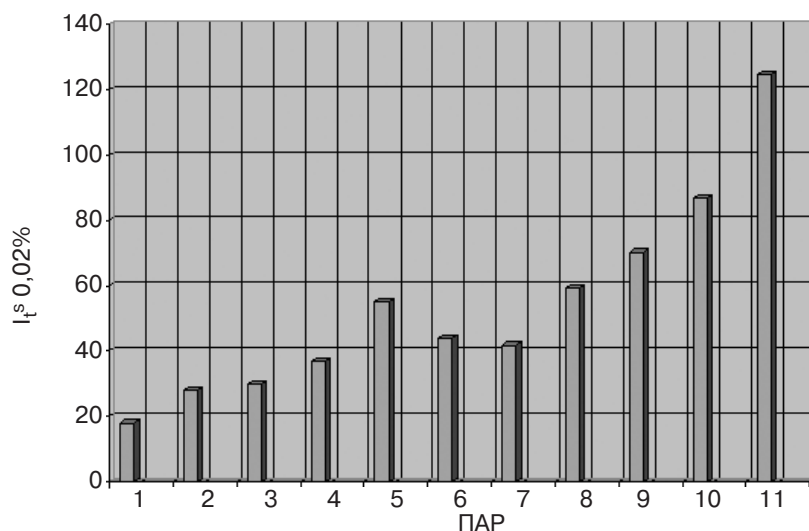
7. Vozmediano J.M. Evaluation of the irritant capacity of decyl polyglucoside / J.M. Vozmediano, J.M. Carbajo, R. Franco, V.J. Milan, M. Padilla, C. Sarmiento // International Journal of Cosmetic Science. — 2000. — Vol. 22, № 1. — P. 73-81.

8. Surfactants, skin cleansing protagonists / M. Corazza, M.M. Laurila, M. Zappaterra, A. Bianchi, A. Virgili // J. Eur. Acad. Dermatol. Venerol. — 2010. — № 24 (1). — P. 1-6.

9. Цитотоксична дія як крите-

Рисунок

Ранжування ПАР за рівнем цитотоксичної дії



Примітка: 1 — алкілдиметилбетаїн, 2 — лаурилсульфат натрію, 3 — лауретсульфат натрію, 4 — кокамідопропілбетаїн, 5 — діетаноламід жирних кислот кокосового масла, 6 — натрієва сіль поліетоксисульфосукцинату, 7 — кокоглюкозид, 8 — динатрій кокоамфодіацетат, 9 — водний розчин поліетиленгліколю-150, полігліцерил-2-тристеарату, лаурилполіоксиетилен-сульфату, дипропіленгліколю, 10 — натрієва сіль п-пальметилглутамінової кислоти, 11 — полікватерніум 7.

рій оцінки ступеня токсичності поверхнево-активних речовин / О.І. Волощенко, О.І. Яловенко, О.В. Раєцька, З.Ю. Майстренко, Кузьміна А.І., Т.В. Навоєва // Гігієна населених місць. — К., 2012. — Вип. 60. — С. 174-178.

REFERENCES

1. Fedoseeva T.A. Gigenicheskoe obosnovanie prognoziruiushchei sposobnosti alternativnogo metoda pri otsenke opasnosti moiushchikh i chistiashchikh sredstv [Hygienic Substantiation of the Predictive Ability of the Alternative Method at the Assessment of the Danger of Cleansing Agents]: avtoref. diss. kand. med. nauk. Mytishchi; 2007. (in Russian)
2. Тимофеев Г. SORF-Journal (Russian version). 2007; 5 : 34-40. (in Russian)
3. Karkishchenko N.N. Toksikologicheskii vestnik. 2010; 3: 18-21. (in Russian)
4. Ernandes E.I. (ed.) Novaia kosmetologiya [New Cosmetology]. Moscow: firma KLAVEL; 2005; 1 : 424 p. (in Russian)
5. Ekspress-metod otsenki obshchetoksicheskogo i kozhno-razdrazhaiushchego deistviia parfiumerno-kosmeticheskoi produktsii *in vitro* (na kulture podvizhnykh kletok): metod. rekomendatsii [Express Method for the Assessment of Generally Toxic and Dermairritating Effect of Perfumery-Cosmetic Production *In Vitro* (on the Culture of Mobile Cells)]: № 29 FC/394. Moscow; 2002 : 10 p. (in Russian)
6. Loffler H., Happle R. Contact Dermatitis. 2003; 48(1): 26-32 (7).
7. Vozmediano J.M., Carbajo J.M., Franco R., Milan V.J., Padilla M., Sarmiento C. International Journal of Cosmetic Science. 2000; 22 (1) : 73-81.
8. Corazza M., Laurila M.M., Zappaterra M., Bianchi A., Virgili A.J. Eur. Acad. Dermatol. Venerol. — 2010. — № 24 (1). — P. 1-6.
9. Voloshchenko O.I., Yalovenko O.I., Raietska O.V., Maistrenko Z.Yu., Kuzmina A.I., Navoieva T.V. Tsytotoksichna diia yak kryterii otsinky stupeniya toksichnosti poverkhnevo-aktyvnykh rechovyn [Cytotoxic Effect as a Criterion for the Assessment of the Surfactant Toxicity Levels]. In: Hihiena naselennykh mist [Hygiene of the Settlements]. Kyiv; 2012; 60 : 174-178. (in Ukrainian)

Надійшла до редакції 20.02.2014.