

УДК 541.15:541.515:543.422.27

ВЛИЯНИЕ ДОЗЫ ГАММА-ОБЛУЧЕНИЯ НА ТОКСИЧНОСТЬ ПАПАИНА

© 2024 г. У. Ю. Аллаярова¹, С. В. Демидов¹, С. В. Блохина¹, Т. А. Раевская¹,
Д. В. Мищенко¹, Ю. А. Омельчук², С. Р. Аллаяров^{1*}

¹Федеральный исследовательский центр проблем химической физики и медицинской химии РАН,
Черноголовка, Россия

²Институт ядерной энергии и промышленности Севастопольского
государственного университета, Севастополь, Россия

*E-mail: sadush@icp.ac.ru

Поступила в редакцию 28.04.2024 г.

После доработки 01.06.2024 г.

Принята к публикации 02.06.2024 г.

Исследование влияния широкого диапазона доз γ -облучения от 250 до 3000 кГр на острую токсичность папаина при введении лабораторным животным. Впервые обнаружено, что предварительное γ -облучение папаина до 1000 кГр более чем в пять раз снижает токсичность его водных дисперсий при внутрибрюшинном введении. Дальнейшее повышение дозы облучения до 3000 кГр не приводит к заметному изменению токсического воздействия. Результаты исследования указывают на то, что γ -облучение папаина может быть использовано для снижения его токсичности.

Ключевые слова: папаин, γ -облучение, водная дисперсия, острая токсичность

DOI: 10.31857/S0023119324050097 **EDN** TXKSIN

ВВЕДЕНИЕ

Папаин – растительный фермент, получаемый из дерева *Carica papaya*, имеет молекулярную массу 23350. Полипептидная цепь папаина содержит 212 аминокислотных остатков, а его активный центр состоит из остатков аминокислот цистеина-25 и гистидина-159. Стабилизируется папаин тремя дисульфидными мостиками, образованными из шести остатков цистеина [1, 2]. Дешевизна исходного сырья, наличие больших сырьевых ресурсов и неограниченные области применения делают папаин одним из наиболее перспективных материалов для использования в пищевой промышленности и медицине. Являясь растительным ферментом, папаин активно используется во всех доминирующих отраслях пищевой промышленности, в частности при консервировании пищевых продуктов [3], а также для улучшения пластичности и растяжимости сыров [4, 5], расщепления некоторых нерастворимых белковых компонентов,

образующихся во время и после брожения в пивоварении и виноделии [6]. Использование гидролиза белков до пептидов различного размера с помощью папаина нашло применение в пищевых добавках, усилителях вкуса [7, 8] и в производстве биоактивных пептидов [6].

Исследование [9] показало, что папаин может быть использован при лечении кариеса и при биохимических процедурах удаления дентина. Механизм биохимического удаления кариеса включает расщепление полипептидных цепей и/или гидролиз поперечных связей коллагена. Эти поперечные связи придают стабильность коллагеновым фибриллам, которые становятся слабее и, следовательно, легче могут быть удалены при воздействии папаинового геля. Кроме того, папаин используется для лечения ожоговых ран, непроходимости пищевода, а также заживления венозных язв [3].

Папаин, обладая сильным антиангиогенным действием, способствует уменьшению побочных

эффектов, вызванных противоопухолевой терапией, что улучшает качество жизни пациентов [10]. Установлено [11], что папаин проявляет противоопухолевую активность в отношении клеточной линии рака печени HEPG2 [11], может расщеплять фибриновую оболочку раковых клеток до аминокислотной формы [12]. К сожалению, в литературе отсутствует информация о противоопухолевых экспериментах на животных с использованием папаина, кроме исследований *in vitro* на культурах клеток [13]. Тем не менее решающее значение для получения более точных знаний о болезнях человека и животных имеют исследования на животных, позволяющие оценить эффективность и безопасность будущего лекарственного препарата и являющиеся обязательным условием его использования в клинических испытаниях [14]. Кроме того, применение папаина и композитов на его основе в медицине, фармацевтической и пищевой промышленности требует обеспечения стерильности и биологической безопасности используемых материалов. В последнее время для решения этих задач широко применяется радиационная стерилизация, позволяющая эффективно удалять микроорганизмы всех видов, находящиеся на разных стадиях развития. При использовании радиационной стерилизации крайне необходимо сохранение низкой токсичности папаина.

В связи с вышеизложенным предметом настоящего исследования было изучение влияния различных доз γ -облучения на токсичность папаина при внутрибрюшинном и пероральном введении животным – самцам мышей линии BDF₁.

ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ

Материалы

В работе использовали порошок папаина (Ferak).

Гамма-облучение

Облучение образцов γ -лучами ⁶⁰Co проводили на установке УНУ “Гамма-100” ФИЦ ПХФ и МХ РАН при 23°C на воздухе при мощности дозы облучения 1.8 Гр/с.

Исследование острой токсичности

Эксперименты на животных проводили на базе УНУ “Питомник и виварий ФИЦ ПХФ и МХ РАН” в соответствии с руководством по проведению доклинических исследований лекарственных средств [15] и с соблюдением принципов гуманного обращения с животными в соответствии с национальными и международными

стандартами. Исследования одобрены этическим комитетом ФИЦ ПХФ и МХ РАН, протокол № 78 от 23.06.2023 В работе использовали самцов мышей линии BDF₁. Диспергированный в дистиллированной воде порошок исходного или γ -облученного папаина вводили животным внутрибрюшинно однократно. Контрольным животным внутрибрюшинно вводили дистиллированную воду без папаина в тех же объемах. Для введения использовали одноразовые шприцы (1.0 мл).

Животных содержали на стандартной сбалансированной диете с использованием экструдированного комбикорма для мелких лабораторных грызунов “ЧАРА” (ЗАО “Ассортимент-Агро”) со свободным доступом к воде.

Токсикологическая оценка облученного папаина также включала однократное внутрижелудочное введение водных растворов папаина мышам с помощью атравматического металлического зонда. После введения исследуемого соединения у животных регистрировали наличие клинических признаков интоксикации: изменение массы тела мышей, сохранение двигательных функций, состояние шерстяного покрова, изменение дыхания, реакцию на внешние раздражители, а также фиксировали дату гибели животных. Визуальный осмотр всех экспериментальных животных проводили ежедневно, признаки отклонения в состоянии здоровья и случаи гибели мышей регистрировали в журнале. Для оценки повреждающего действия папаина на внутренние органы и ткани проводили патологоанатомическое вскрытие после цервикальной дислокации шейных позвонков животного.

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ И ОБСУЖДЕНИЕ

Острая токсичность γ -облученного папаина

Как известно [1], папаин является чувствительным ферментом, который может подвергаться деградации, окислению и гидролизу при воздействии жестких условий или водной среды с течением времени, что может привести к изменению его ферментативной активности. Результаты исследования радиационной функционализации макромолекул папаина, облученного γ -лучами ⁶⁰Co, свидетельствуют о заметных изменениях в химическом составе папаина в зависимости от дозы облучения порошка папаина при комнатной температуре на воздухе [16]. В облученном папаине образуются и накапливаются продукты деструкции основной цепи и радиационного окисления.

Таблица 1. Параметры острой токсичности исходного и γ -облученного папаина при внутрибрюшинном введении мышам BDF1

Доза облучения, кГр	МПД мг/кг	ЛД ₁₆ мг/кг		ЛД ₅₀ мг/кг		ЛД ₈₄ мг/кг		ЛД ₁₀₀ мг/кг	
		А*	Б*	А*	Б*	А*	Б*	А*	Б*
0	400	538	535	668±50	700	921	900	1047	1000
250	2000	2335	2313	2887±148	2659	3569	2915	3911	3000
1000	2000	3208	3100	3987±203	4130	4956	5053	5440	6000
2000	2000	3135	2967	3915±213	3958	4889	4692	5377	5000
3000	1000	2255	2545	3221±262	3909	4602	4818	5292	5000

А* – расчеты велись по методу пробит-анализа Лигчфилда и Уилкоксона;

Б* – расчеты велись по методу Беренса.

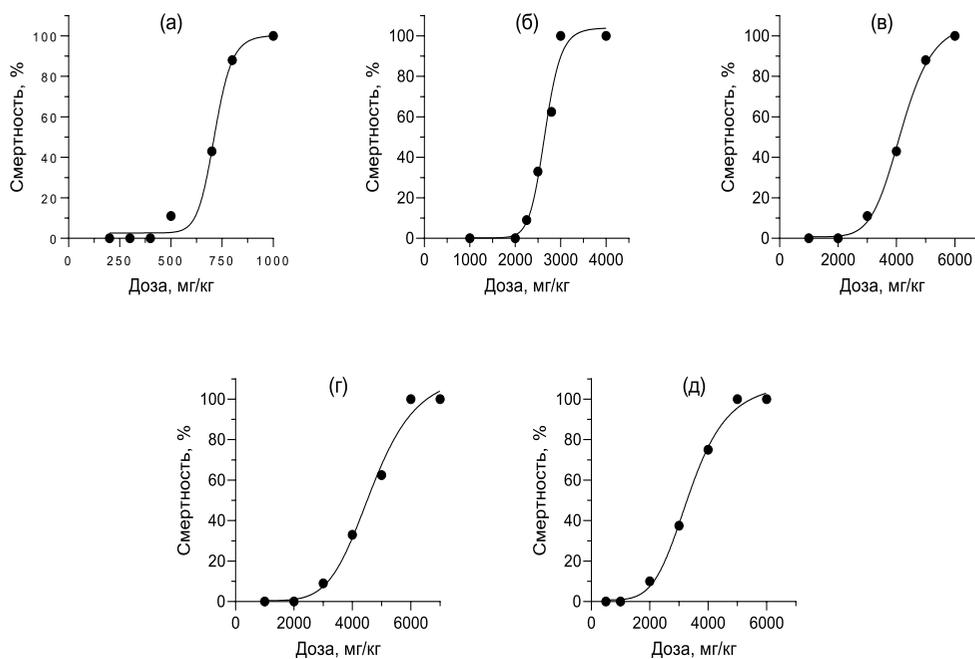


Рис. 1. Кривая зависимости “доза–эффект” после однократного внутрибрюшинного введения мышам BDF1 папаина, облученного разными дозами γ -радиации (кГр): 0 (а), 250 (б), 1000 (в), 2000 (г), 3000 (д).

В табл. 1 приведены параметры острой токсичности исходного и γ -облученного папаина при внутрибрюшинном введении животным. Видно, что водные дисперсии папаина, предварительно облученного разными дозами радиации 250, 1000, 2000 и 3000 кГр, оказывают менее токсичное действие, чем дисперсия в воде исходного папаина, не подвергавшегося γ -облучению. В случае использования раствора необлученного папаина полулетальная доза, вызывающая гибель половины подопытных животных (ЛД₅₀), составляет 668 ± 50 мг/кг, тогда как при применении водных дисперсий образцов папаина, облученных дозами 1000, 2000 и 3000 кГр, ЛД₅₀ составляет 3987 ± 203 , 3915 ± 213 и 3221 ± 262 соответственно (табл. 1). Таким образом, предварительное γ -облучение папаина снижает токсичность его водных дисперсий в 4.8–5.9 раз.

В качестве параметров токсичности водных дисперсий исходного и облученных разными дозами образцов папаина служили значения МПД (максимальная переносимая доза, при которой гибели животных не наблюдается), ЛД₅₀ (доза, при которой погибает 50% животных), а также дозы ЛД₁₆, ЛД₈₄ и ЛД₁₀₀, вызывающие гибель 16, 84 и 100% животных соответственно (табл. 1). Для определения параметров токсичности использовали метод графического анализа зависимости по кривой “доза–эффект”. Для этого использовали графики, представляющие соотношение погибших и выживших особей в группах животных, получавших папаин, облученный разными дозами радиации, при последовательном увеличении вводимых дозировок (по методу Беренса). Кривые “доза–эффект” представлены на рис. 1.

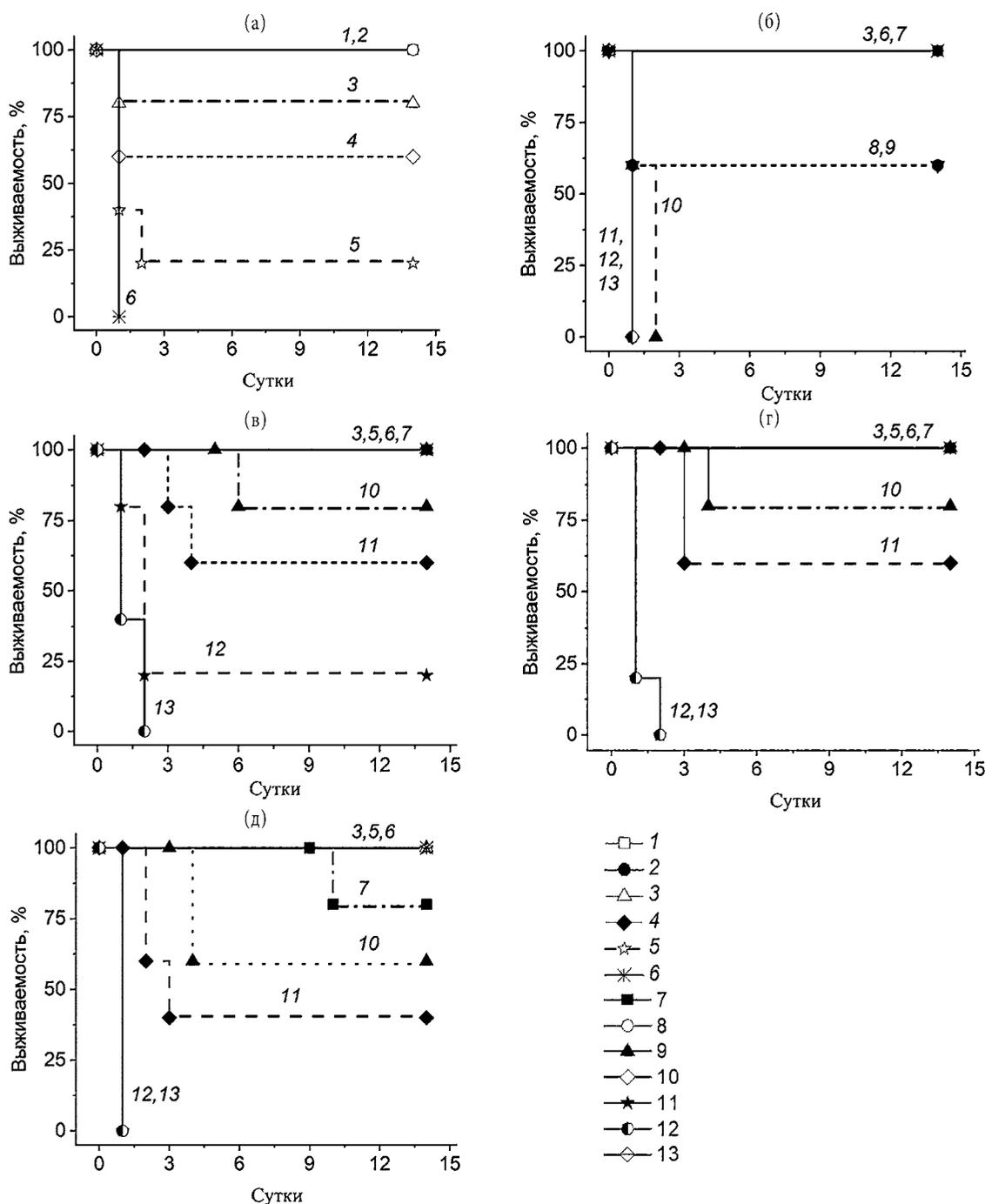


Рис. 2. Выживаемость животных после внутрибрюшинного введения водного раствора необлученного (а) и γ -облученного папаина (250 кГр (б), 1000 кГр (в), 2000 кГр (г), 3000 кГр (д)) в разных дозировках (мг/кг): 400 (2), 500 (3), 700 (4), 800 (5), 1000 (6), 2000 (7), 2500 (8), 2800 (9), 3000 (10), 4000 (11), 5000 (12), 6000 (13). Контрольным группам животных (1) внутрибрюшинно вводили дистиллированную воду без папаина в таком же объеме.

Кроме того, данные по смертности животных при однократном внутрибрюшинном введении исследуемых соединений до и после облучения были подвергнуты пробит-анализу по Finney [17] для определения LD_{50} , LD_{84} и LD_{16} . Стандартную ошибку для полуметальной дозы LD_{50} рассчитывали по формуле:

$$S_{LD_{50}} = (LD_{84} - LD_{16}) / \sqrt{2N}.$$

Летальную дозу LD_{100} рассчитывали согласно формуле:

$$LD_{100} = LD_{84} + (LD_{84} - LD_{50}) / 2.$$

На рис. 2. приведены кривые выживаемости животных после введения водного раствора

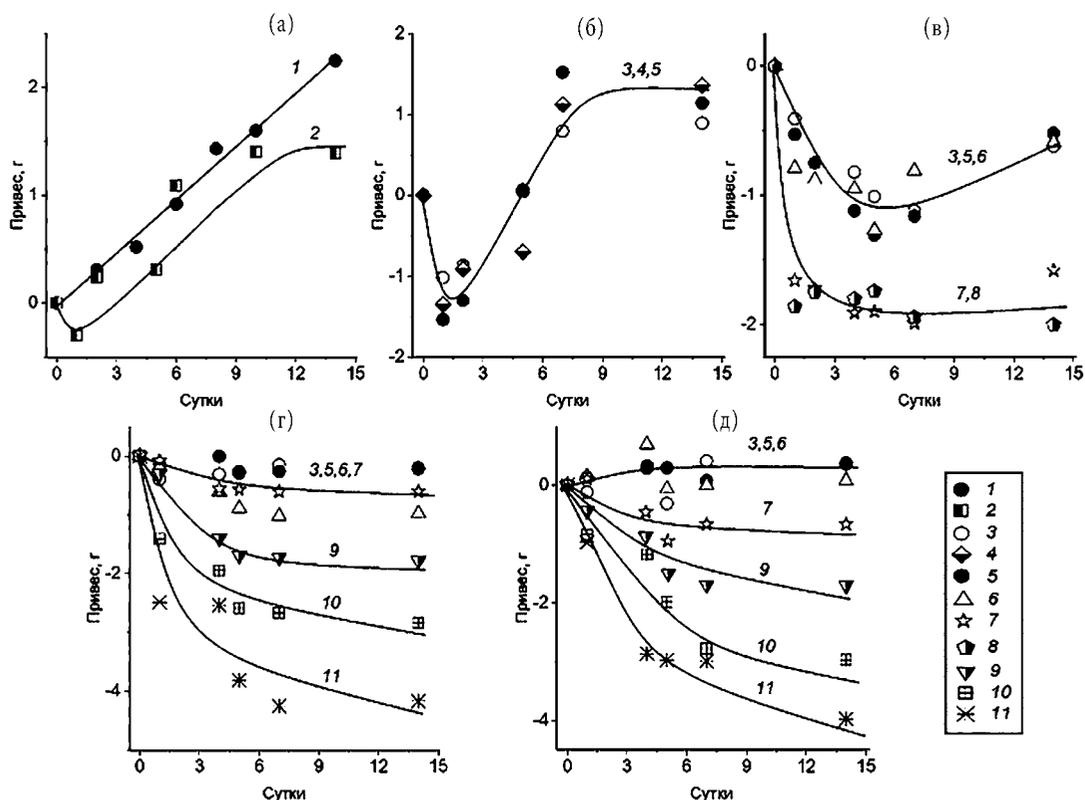


Рис. 3. Изменение средней массы тела экспериментальных животных в ходе контрольного эксперимента (а, кривая 1) и после внутрибрюшинного введения необлученного (а, (кривая 2), б (кривые 3, 4, 5)) и γ -облученного папаина (250 кГр (в), 1000 кГр (г), 3000 кГр (д)) в дозировках 300 мг/кг (2), 500 мг/кг (3), 700 мг/кг (4), 800 мг/кг (5), 1000 мг/кг (6), 2000 мг/кг (7), 2500 мг/кг (8), 3000 мг/кг (9), 4000 мг/кг (10), 5000 мг/кг (11). Контрольным группам животных (1) внутрибрюшинно вводили дистиллированную воду без папаина в таком же объеме.

необлученного и облученного разными дозами папаина при внутрибрюшинном введении мышам различных дозировок папаина. Как видно, несмотря на снижение токсичности папаина после γ -облучения его водной дисперсии, в ходе эксперимента наблюдалась гибель животных, как и в случае введения дисперсии необлученного папаина. После однократного внутрибрюшинного введения раствора нерадиолизованного папаина в дозировке 1000 мг/кг летальный исход регистрировался на первые сутки эксперимента (рис. 2а).

У экспериментальных животных, получивших летальные дозы, после введения водной дисперсии папаина наблюдались признаки интоксикации, а именно диарея, снижение мышечного тонуса и двигательной активности. В условиях эксперимента у животных, получавших внутрибрюшинно дистиллированную воду без папаина, наблюдается линейное со временем прибавление в весе с первого дня наблюдения (рис. 3а, кривая 1). Однако внутрибрюшинное введение как облученного, так и необлученного папаина, негативно сказывается на прибавлении веса подопытными животными. Анализ динамики изменения массы

тела экспериментальных животных, получавших внутрибрюшинно водные дисперсии облученного и необлученного папаина, приведен на рис. 3.

Видно достоверное снижение средней массы тела на 2–3 сутки после введения необлученного папаина с тенденцией к восстановлению массы тела к 9–14 суткам (рис. 3б, кривые 3, 4, 5).

Введение 500 мг/кг необлученного папаина приводит к максимальному снижению среднего веса подопытных животных на 1.5 г через 2 суток. В то же время введение мышам в два раза большего количества папаина, облученного 250 кГр, приводит к снижению их веса всего лишь на 1 г (рис. 3в, кривая б).

В случае введения того же количества папаина, облученного дозами 1000–3000 кГр, не наблюдается снижения веса в ходе всего эксперимента (рис. 3г, д, кривая б).

Это еще раз свидетельствует о снижении токсичности папаина после воздействия γ -радиации для подопытных животных при внутрибрюшинном введении, т. е. предварительное γ -облучение папаина снижает неблагоприятное действие на набор веса животными.

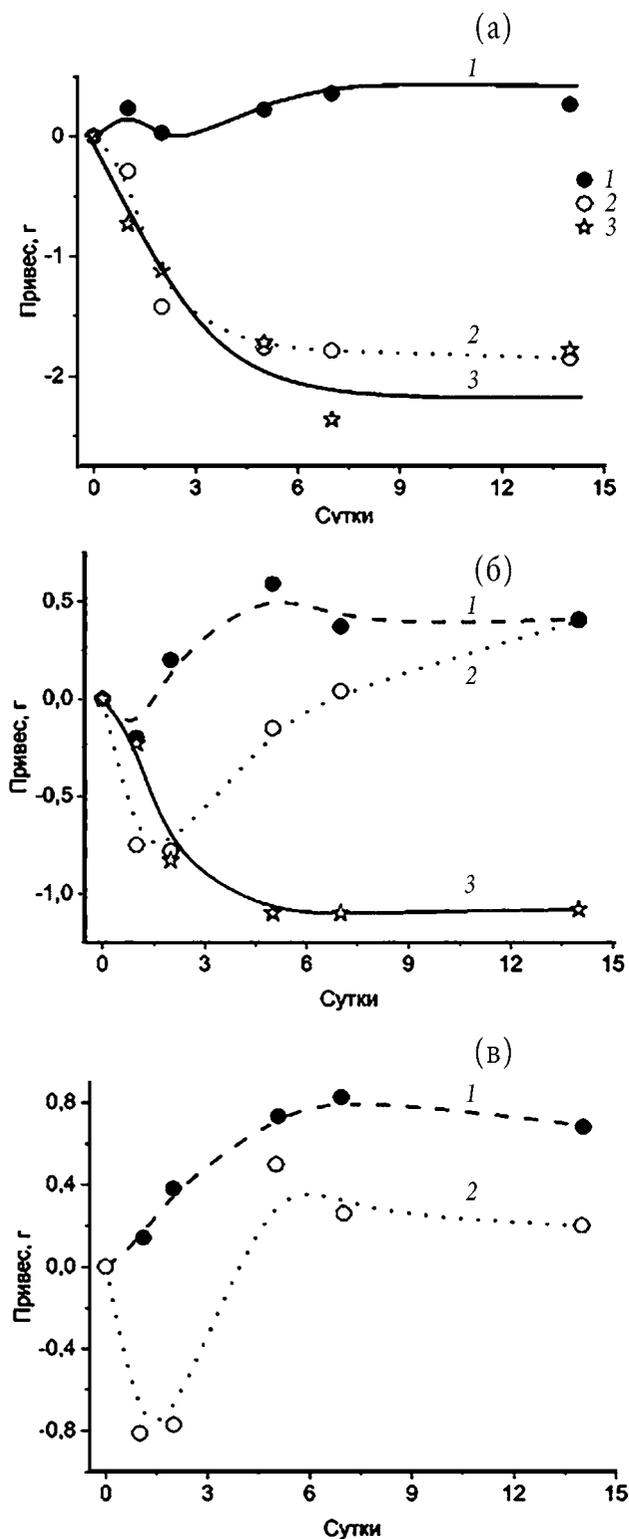


Рис. 4. Изменение массы тела экспериментальных животных, получавших внутрижелудочно водный раствор необлученного (а) и γ -облученного папаина (б, в). Доза предварительного γ -облучения папаина (кГр): 250 (б), 2000 кГр (в). Внутрижелудочное введение водных растворов папаина посредством металлического зонда производилось однократно в дозах (мг/кг): 5000 (1), 10000 (2), 20000 (3).

Результаты исследования позволяют отнести папаин и его аналоги, γ -облученные дозой до 3000 кГр, к четвертому классу малотоксичных соединений в соответствии с ГОСТ 12.1.007-76 при внутрибрюшинном введении мышам BDF1.

Острая токсичность папаина при внутрижелудочном применении

Изменение массы тела экспериментальных животных, получавших внутрижелудочно водные растворы необлученного и облученного разными дозами γ -излучения папаина, представлено на рис. 4. Следует отметить, что после перорального введения как необлученного, так и облученного папаина не наблюдалось серьезных клинических проявлений интоксикации, ни одно из подопытных животных не погибло. Поведение экспериментальных мышей в период наблюдения не отличалось от поведения животных контрольной группы, мыши были подвижны, активны и проявляли любопытство. За весь период наблюдения у мышей не было выявлено снижения двигательной активности, нарушения ритма дыхания, расстройств пищеварения.

Тем не менее в ходе данного эксперимента наблюдалось уменьшение средней массы тела мышей после перорального введения папаина в дозе 10000 мг/кг и более. У экспериментальных животных, получавших перорально 5000 мг/кг как необлученного (рис. 4а, кривая 1), так и облученного папаина (рис. 4б, в, кривая 1), было установлено прибавление в весе, причем, чем больше была доза предварительного γ -облучения папаина, тем больше было прибавление веса. В целом эксперименты показали, что наибольший привес наблюдается у животных, перорально получавших папаин, облученный дозой 2000 кГр при дозировке введения 5000 мг/кг. Видимо, внутрижелудочное введение папаина в максимально допустимой дозе, в отличие от внутрибрюшинного введения водного раствора папаина, не оказывает значимого токсического действия на организм лабораторных животных и не вызывает их гибели. К наибольшей токсичности с летальным исходом приводит только внутрибрюшинное введение экспериментальным животным водной дисперсии папаина. Таким образом, снижение острой токсичности исходного папаина может быть достигнуто при помощи предварительного γ -облучения порошка папаина.

В заключение можно выделить следующие изменения в токсических свойствах γ -облученного папаина:

- водные растворы облученных и необлученных γ -радиацией образцов папаина не оказывают значимого токсического действия на организм лабораторных животных и не вызывают их гибели при внутрижелудочном введении (в данном опыте наибольший привес наблюдался у подопытных животных, получавших водный раствор облученного папаина, поскольку облучение папаина уменьшает динамику потери веса подопытными животными);
- морфологическая картина внутренних органов, наблюдаемая при патологоанатомическом вскрытии экспериментальных животных, получавших папаин внутрижелудочно, не отличалась от таковой, наблюдаемой у контрольных животных. Следовательно, облученный папаин, наряду с необлученным, может использоваться в медицинских целях;
- при внутрибрюшинном способе введения водная дисперсия порошка папаина, облученного дозами радиации 250–3000 кГр, оказывает меньшее токсическое действие, чем дисперсия необлученного папаина.

Анализ полученных данных позволяет отнести необлученный папаин к 3 классу умеренно-токсичных веществ, а папаин, облученный дозами 250–3000 кГр, к 4 классу малотоксичных веществ в соответствии с ГОСТ 12.1.007-76 [18] при внутрибрюшинном способе введения его водных дисперсий.

ИСТОЧНИК ФИНАНСИРОВАНИЯ

Работа была выполнена в рамках госзаданий № 124013000722–8 и 124020500019–2 с использованием УНУ «Гамма-100 ФИЦ ПХФ и МХ РАН» и УНУ «Питомник и виварий ФИЦ ПХФ и МХ РАН».

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. *Kamphuis I.G., Kalk K.H., Swarte M.B., Drenth J.* // J.Mol. Biol. 1984. V. 179. P. 233.
2. *Wong D.W. S.* Food enzymes: structure and mechanism. NY: Springer Science + Business Media, 1995. P. 139.
3. *Shouket H.A., Ameen I.A., Tursunov O., Kholikova Kh., Pirimov O., Kurbonov N. et al.* // IOP Conf. Ser.: Earth Environ. Sci. 2020. V. 614. Article 012171.
4. *Mahajan R.T., Chaudhari G.* // Int.J. Adv. Res. 2014. V. 2. P. 1173.
5. *Abu-Alruz K., Mazahreh A.S., Quasem J.M., Hejazin R.K., El-Qudah J.M.* // Am.J. Agricult. Biol. Sci. 2009. V. 4. P. 173.
6. *Polaina J., MacCabe A.P.* Industrial enzymes: structure, function, and applications. Dordrecht: Springer, 2007. 641 p.
7. *Pietrasik Z., Shand P.J.* // Meat Sci. 2011. V. 88. P. 8.
8. *Bekhit A.A., Hopkins D.L., Geesink G., Franks P.* // Crit. Rev. Food Sci. Nutr. 2014. V. 54. P. 1012.
9. *Beeley J.A., Yip H.K., Stevenson A.G.* // Brit. Dental J.: BDJ online. 2000. V. 188. P. 427.
10. *Mohr H., Desser L.* // BMC Compl. Altern. Med. 2013. V. 13. P. 231.
11. *Akila M., Sushama A., Ramanathan K.* // Int.J. Pharm. Pharm. Sci. 2014. V. 6. P. 160.
12. *Fauziya S., Krishnamurthy R.* // CIB Tech J. Pharm. Sci. 2013. V. 2. P. 25.
13. *Nguyen T.T., Shaw P.N., Parat M.O., Hewavitharana A.K.* // J.Mol. Nutr. Food. Res. 2013. V. 57. P. 153.
14. *Manal E.E.* // EC Clin. Exp. Anatomy. 2018. V. 1. P. 40.
15. *Миронов А.Н., Сакаева И.В., Саканян Е.И., Бунятян Н.Д., Ковалева Е.Л., Л.И. Митькина, Т.Б. Шемерянкина, В.А. Яшкур.* // Ведомости Научного центра экспертизы средств медицинского применения. 2012. № 3. С. 56.
16. *Аллаяров С.Р., Руднева Т.Н., Демидов С.В., Аллаярова У.Ю., Чекалина С.Д.* // Химия высоких энергий. 2024. Т. 58. №5 (в печати).
17. *Meckroge A.R.* // J. Inst. Actuar. 1952. V. 78. P. 388.
18. *Березовская И.В.* // Химико-фармацевтический журнал. 2003. Т. 37. С. 32.

EFFECT OF GAMMA IRRADIATION DOSE ON PAPAIN TOXICITY

U. Yu. Allayarova^a, S. V. Demidov^a, S. V. Blokhina^a, T. A. Rayevskaya^a,
D. V. Mishchenko^a, Yu. A. Omelchuk^b, S. R. Allayarov^a *

^a Federal Research Center for Problems of Chemical Physics and Medicinal Chemistry,
Russian Academy of Sciences, Chernogolovka, Russia

^b Sevastopol Institute for Nuclear Energy and Industry,
Sevastopol National University, Sevastopol, Russia

*E-mail: sadush@icp.ac.ru

Study of the effect of a wide range of γ -irradiation doses from 250 to 3000 kGy on acute toxicity of papain when administered to laboratory animals. It was found for the first time that preliminary γ -irradiation of papain up to 1000 kGy reduces toxicity of its aqueous dispersions at intraperitoneal administration by more than five times. Further increase of irradiation dose up to 3000 kGy does not lead to a noticeable change in the toxic effect. The results of the study indicate that γ -irradiation of papain can be used to reduce its toxicity.

Keywords: papain, γ -irradiation, aqueous dispersion, acute toxicity

REFERENCES

1. Kamphuis I.G., Kalk K.H., Swarte M.B., Drenth J. // J.Mol. Biol. 1984. V. 179. P. 233.
2. Wong D.W.S. Food enzymes: structure and mechanism. NY: Springer Science + Business Media, 1995. P. 139.
3. Shouket H.A., Ameen I.A., Tursunov O., Kholikova Kh., Pirimov O., Kurbonov N. et al. // IOP Conf. Ser.: Earth Environ. Sci. 2020. V. 614. Article 012171.
4. Mahajan R.T., Chaudhari G. // Int.J. Adv. Res. 2014. V. 2. P. 1173.
5. Abu-Alruz K., Mazahreh A.S., Quasem J.M., Hejazin R.K., El-Qudah J.M. // Am.J. Agricult. Biol. Sci. 2009. V. 4. P. 173.
6. Polaina J., MacCabe A.P. Industrial enzymes: structure, function, and applications. Dordrecht: Springer, 2007. 641 P.
7. Pietrasik Z., Shand P.J. // Meat Sci. 2011. V. 88. P. 8.
8. Bekhit A.A., Hopkins D.L., Geesink G., Franks P. // Crit. Rev. Food Sci. Nutr. 2014. V. 54. P. 1012.
9. Beeley J.A., Yip H.K., Stevenson A.G. // Brit. Dental J.: BDJ online. 2000. V. 188. P. 427.
10. Mohr H., Desser L. // BMC Compl. Altern. Med. 2013. V. 13. P. 231.
11. Akila M., Sushama A., Ramanathan K. // Int.J. Pharm. Pharm. Sci. 2014. V. 6. P. 160.
12. Fauziya S., Krishnamurthy R. // CIB Tech J. Pharm. Sci. 2013. V. 2. P. 25.
13. Nguyen T.T., Shaw P.N., Parat M.O., Hewavitharana A.K. // J.Mol. Nutr. Food. Res. 2013. V. 57. P. 153.
14. Manal E.E. // EC Clin.Exp. Anatomy. 2018. V. 1. P. 40.
15. Mironov A.N., Sakaeva I.V., Sakanyan E.I., Bunyatyay N.D., Kovaleva E.L., Mitkina L.I. et al. // Vedomosti Scientific Centre of expertise of means of medical use. 2012. № 3. P. 56.
16. Allayarov S.R., Rudneva T.N., Demidov S.V., Allayarova U. Yu., Chekalina S.D. // High Energy Chemistry. 2024. V. 58. № 5 (in publication).
17. Mekaroglu A.R. // J. Inst. Actuar. 1952. V. 78. P. 388.
18. Berezovskaya I.V. // Chem._Pharm. J. 2003. V. 37. P. 32.