

СОСТОЯНИЕ СИСТЕМЫ ПРО-/АНТИОКСИДАНТЫ В КРОВИ КРЫС С МОДЕЛЬЮ АЛКОГОЛЬНОЙ ЗАВИСИМОСТИ

Веревкин А.А.¹, Даниленко К.А.¹, Каде А.Х.¹, Накохов Р.З.¹, Саатчиан Н.П.²,
Губарева Е.А.¹, Кислица Т.С.¹, Занин С.А.¹

¹Государственное бюджетное образовательное учреждение высшего профессионального образования Кубанский государственный медицинский университет Минздрава Российской Федерации, Краснодар, Россия (350063, г. Краснодар, ул. Седина, 4), e-mail: zanin77@mail.ru

²Государственное бюджетное учреждение здравоохранения «Детская краевая клиническая больница» Министерства здравоохранения Краснодарского края (350007, г. Краснодар, пл. Победы, 1)

В работе исследовали баланс системы про/антиоксидантов у 50 нелинейных крыс самцов, получающих энергетические напитки («Ред Булл», «Ягуар») и пиво («Белый Медведь»), являющиеся одними из наиболее продаваемых в Российской Федерации. Все животные были разделены на 4 группы: 1 группа – «Ред Булл», 2 – «Ягуар», 3 – «Белый Медведь», 4 – интактные животные (контроль). Изучали ферментативные и не ферментативные показатели системы про-/антиоксидантов в эритроцитарной массе (каталаза, супероксиддисмутаза, сульфгидрильные (SH) – группы) и плазме крови (общая антиоксидантная активность, максимум вспышки хемилюминисценции, каталаза, супероксиддисмутаза, SH-группы, малоновый диальдегид и диеновые конъюгаты) экспериментальных животных после 20 дней употребления ими указанных напитков. Было выявлено резкое снижение общей антиоксидантной активности плазмы крови и стойкое повышение уровня продуктов свободно-радикального окисления в 1, 2 и 3 группах, что даёт повод говорить о дисбалансе в системе про/антиоксидантов, возникающем под влиянием энергетических напитков.

Ключевые слова: про-/антиоксиданты, энергетические напитки, свободные радикалы.

CONDITION OF SYSTEM OF THE PRO-/ANTIOXIDANTS IN BLOOD OF RATS WITH MODEL OF ALCOHOLIC DEPENDENCE

Verevkin A.A.¹, Danilenko K.A.¹, Kade A.K.¹, Nakohov R.Z.¹, Saatchijan N.P.²,
Gubareva E.A.¹, Kislitsa T.S.¹, Zanin S.A.¹

¹Kuban state medical university of the Ministry of Health Care and Social Development of the Russian Federation, Krasnodar, Russia (350063, Krasnodar, Sedina street, 4), e-mail: zanin77@mail.ru

²Children's regional clinical hospital of Ministry of Health of Krasnodar territory (350007, Krasnodar, Victory square, 1)

In work investigated balance of system about/antioxidants at 50 nonlinear rats of the males receiving power drinks («Red Bull», «Jaguar») and the beer («Polar bear»), being one of the most sold in the Russian Federation. All animals have been divided into 4 groups: 1 group – «Red Bull», 2 – «Jaguar», 3 – «Polar bear», 4 - intact animals (control). Studied enzymatic and not enzymatic system indicators pro-/antioxidants in erythrocyte to weight (catalase, superoxidedismutase, sulfhydryl (SH) - groups) and blood plasma (the general antioxidant activity, a flash maximum chemiluminescence, catalase, superoxidedismutase, SH-groups, malondialdehyde and diene conjugates) experimental animals after 20 days of the use by them of the specified drinks. Sharp decrease in the general antioxidant activity of plasma of blood and proof increase of level of products of is free-radical oxidation in 1, 2 and 3 groups that the occasion speak about a disbalance in system about/antioxidants, arising under the influence of power drinks lets has been revealed.

Keywords: about-/antioxidants, power drinks, free radicals.

Введение. Энергетические напитки (энергетики) – газированные безалкогольные или слабоалкогольные напитки, содержащие специальные вещества, стимулирующие центральную нервную систему человека и/или повышающие работоспособность. Их начали производить в Азии. В 1982 Дитрих Матешич из Австрии попробовав в Гонконге тонизирующие напитки местного производства, решил производить их в Европе. Через 2

года Дитрих Матешниц основал компанию «Red Bull GmbH», немного разнообразив азиатский рецепт новыми компонентами, хотя в основе остались кофеин и таурин. Первые энергетики в Европе были проданы в Австрии, затем они попали в Венгрию. Российский рынок энергетиков начал формироваться в начале 90-х годов. Реклама энергетических напитков гласила, что они помогут избавиться от усталости и сонливости, обрести бодрость, повысить тонус [5]. Благодаря такой рекламе, энергетики завоевали популярность среди наиболее уязвимой группы населения – подростков [8]. Часть потребителей ведут здоровый образ жизни, а часть используют алкогольные энергетики для того, чтобы расслабиться [10]. На главном сайте компании «Red Bull» приведен список исследований, которые доказывают безвредность тауринсодержащих энергетических напитков. Эти исследования проводились на спортсменах, которые являются потенциально наиболее обследованной и здоровой группой населения, но до сих пор окончательно не изучено потенциально отрицательное влияние стимулирующих напитков на обычных потребителей, которые помимо превышения дозировки, указанной на сайте компании Red Bull как «рекомендованная», могут также иметь отягощенный преморбидный фон [6,7,9]. Во многих странах мира стимулирующие напитки запрещены, так в США продажа энергетиков запрещена в штатах Юта, Оклахома, Мичиган, а в штате Вашингтон запрет действует с 18 ноября 2010 года. В декабре 2010 года алкогольные энергетические напитки, содержащие кофеин, были полностью изъяты из продажи на всей территории США на основании заключения властей об их вреде для здоровья. Во Франции, Дании и Норвегии энергетики запрещены к продаже в продовольственных магазинах. Они продаются только в аптеках, так как считаются лекарственным средством. В Германии запрещено их производство. Однако в российских ночных клубах популярным является коктейль в виде смеси алкоголя с энергетиком. Учитывая неоднозначное отношение к стимулирующим напиткам, мы решили исследовать влияние энергетических напитков на про-/антиоксидантную систему крови, эритроцитов, а также установить наличие зависимости от данного типа напитков. Установлено, что постоянное образование прооксидантов в живых организмах уравновешено их дезактивацией антиоксидантами, поэтому для поддержания гомеостаза необходима непрерывная регенерация антиоксидантной способности. Отсутствие или сбой непрерывности этого процесса сопровождается накоплением окислительных повреждений и приводят к возникновению окислительного стресса (ОС), который является составным элементом целого ряда патологических процессов и заболеваний [2].

Цель работы: изучить особенности сдвигов в системе про-/антиоксиданты у крыс при хроническом употреблении следующих напитков: энергетический напиток «Ред Булл», алкогольно-энергетический напиток «Ягуар» и пивной напиток «Белый Медведь».

Материалы и методы исследования. Исследование выполнено в лаборатории кафедры общей и клинической патофизиологии ГБОУ ВПО КубГМУ Минздрава России. Эксперименты проведены на 50 белых нелинейных крысах-самцах средней массой - 175 ± 25 гр. Содержание животных и постановка экспериментов проводилась в соответствии с требованиями приказов № 1179 МЗ СССР от 11.10.1983 года и № 267 МЗ РФ от 19.06.2003 года, а также международными правилами «Guide for the Care and Use of Laboratory Animals». Из 50 животных были сформированы 4 группы: 1 группа (n=15) употребляла энергетический напиток «Ред Булл», 2 группа (n=15) алкогольно-энергетический напиток «Ягуар», 3 группа (n=15) – пиво «Белый Медведь», 4 группа – контрольная (5 животных) получала воду. Перед началом эксперимента животным был предложен свободный выбор между водой и соответствующим напитком. Все животные выбрали воду. Животные 1, 2 и 3 групп получали соответствующие напитки через зонд, введенный в пищевод, в количестве 2 мл на протяжении 10 дней, что составляло 6,5 % от суточного объема потребляемой жидкости. Остальные 93 % суточной потребности, что составляет около 27 мл, компенсировались за счёт воды. Через 10 дней, после начала спаивания, животным опять предлагали на выбор воду и соответствующие напитки. Все животные выбрали соответствующий каждой группе напиток. Далее животные получали те же напитки, которые находились в свободном доступе еще в течение 10 дней. Количество выпитого напитка контролировалось путем замеров количества жидкости, находившегося в индивидуальных поилках ежедневно, и составило у животных разных групп от 20 до 26 мл за сутки, что составляло 86 % от суточного объема жидкости, остальные 14 % приходилось на воду, что составляло около 4 мл. Таким образом, животные принимали напитки в течение 20 дней без перерыва. После завершения первой части эксперимента был произведен забой животных, в соответствии с регламентированными нормами гуманного обращения. Перед забоем животным проводили наркоз: золетилом и ксиланитом. В стадии глубокого наркоза вскрывалась грудная клетка. [4] Затем производился забор крови из левого желудочка в количестве 1 мл. Кровь была исследована на кафедре фундаментальной и клинической биохимии ГБОУ ВПО КубГМУ Минздрава России. Гепаринизированная кровь центрифугировалась, отделялись эритроцитарная масса и плазма крови, в которых изучались ферментные и неферментные показатели системы про-/антиоксиданты. Контролем служили аналогичные показатели группы интактных крыс (n=5). В эритроцитарной массе изучалась активность ферментов первой и второй линии антиоксидантной системы (АОС) – супероксиддисмутазы (СОД), каталазы (КАТ), SH-группы. Активность КАТ исследовали в гемолизате эритроцитов по методу, предложенному R. Beers et al., 1952 в авторской модификации Павлюченко И.И. и соавт. (2006) [1], основанной на оценке скорости убыли

субстрата фермента (перекиси водорода). Активность СОД определяли в гемолизате эритроцитов по методу, предложенному Костюк В.А. и соавт. (1990) в авторской модификации Павлюченко И.И. и соавт. (2006) [1], которая основана на способности СОД ингибировать индуцированную реакцию аутоокисления кверцетина. В плазме крови изучалась активность КАТ, СОД, продукты окислительной модификации белков: малоновый диальдегид (МДА) и диеновые конъюгаты (ДК). Биофизическими методами изучались общая антиоксидантная активность (АОА) и уровень максимальной вспышки хемилюминесценции (МХВЛ). Определение АОА плазмы крови проводилось модифицированным амперометрическим способом на анализаторе «Яуза-01-ААА». Способ основан на измерении электрического тока, возникающего при окислении биологического образца на поверхности рабочего электрода при определенном потенциале. Интенсивность МВХЛ определялась с помощью люминотестера ЛТ-01 в составе системы для диагностики ОС [3], включающей аналогово-цифровой преобразователь и ЭВМ с авторской «Программой регистрации сигналов хемилюминотестера ЛТ-01», позволяющей регистрировать амплитуду и площадь хемилюминесценции. В тканях изучалась активность КАТ, СОД, АОА, уровень МХВЛ. Отдельно на 3 животных, не принимающих напитки, было опробовано влияние данного типа наркоза на изучаемые биохимические показатели клеток крови, плазмы и тканей. Установлено, что указанные наркотические препараты в приведённой дозировке не влияют на вышеперечисленные показатели [4].

Статистическую обработку полученных данных осуществляли методами непараметрической статистики на компьютере с использованием программного обеспечения «Statistika 6.0 for Windows» фирмы «Stat Soft, Inc.» и «Microsoft Office Excel 2003». Полученные результаты исследуемых групп после статистической обработки выражали в виде средних значений (M) и ошибки среднего (m). Сравнение выборок проводилось по непараметрическому критерию Вилкоксона для зависимых групп с установлением уровня значимости $*p \leq 0,05$ и $**p \leq 0,01$.

Результаты исследования и их обсуждение. Начиная с 10 дня употребления напитков и до конца эксперимента было отмечено, что животные 1, 2 и 3 групп стали предпочитать соответствующие их группе напитки воде. Такое поведение животных косвенно свидетельствует о возникновении зависимости к указанным напиткам. Кроме того, также обращало на себя внимание изменение поведения у животных 1 группы, принимавших алкогольный энергетик «Ягуар», и 2 группы, принимавших безалкогольный напиток «Ред Булл». Животные стали возбужденными, проявляли выраженную агрессию по отношению друг к другу. Эти явления возникали примерно на 10 сутки исследования и сохранялись в течение последующих 10 дней употребления напитка, что свидетельствует о влиянии данных

напитков на поведенческие реакции животных. После забоя животных была исследована активность СОДМ, КАТ, SH-группы, и содержание продуктов ОМБ – МДА, ДК, а также АОА и МВХЛ. Данные приведены в таблице № 1.

Таблица 1

Исследуемые показатели эритроцитов и плазмы крови крыс

Напиток/ Показатели	«Ред Булл» (1 группа)	«Ягуар» (2 группа)	«Белый Медведь» (3 группа)	Интактные животные (4 группа)
	M±m	M±m	M±m	M±m
Эритроциты				
КАТ	1,853±0,59	0,873±0,276*	1,916±0,606	2,1032±0,67
СОД	0,114±0,036	0,084±0,027*	0,119±0,038	0,136±0,043
SH-группы	0,64±0,202	0,904±0,285*	0,594±0,187	0,402±0,127
Плазма крови				
АОА	1637±517,5*	932,7±294,9*	1697±536,5*	2015±637,1
МВХЛ	0,169±0,094	0,196±0,164*	0,144±0,082	0,11±0,035
КАТ	0,142±0,045*	0,08±0,026**	0,156±0,05	0,204±0,065
СОД	0,27±0,09*	0,112±0,036**	0,28±0,09*	0,447±0,14
SH-группы	28,16±8,9	30,1±9,5*	27,12±8,57	21,12±6,68
МДА	16,1±5,09*	19,9±6,29*	15,2±4,82*	10,9±3,45
ДК	7,67±2,42*	9,24±2,92*	7,404±2,34*	4,67±1,48

Примечание: * – $p \leq 0,05$ – достоверно по отношению к 4 группе, ** – $p \leq 0,01$ – достоверно по отношению к 4 группе.

При исследовании были выявлены следующие сдвиги в системе про/антиоксиданты в эритроцитах крыс: активность КАТ у животных 3 группы, употреблявших пиво, снизилась на 8,9 % ($p \geq 0,05$), у животных 1 группы на 11,8 % ($p \geq 0,05$), во 2 группе животных – на 58,5 %, что было достоверно ($p \leq 0,05$) по отношению к животным 4 группы. Активность СОД у животных 3 группы снизилась на 12 % ($p \geq 0,05$), у животных 1 группы – на 16 % ($p \geq 0,05$), во 2 группе животных отмечено максимальное достоверное снижение на 38 %, что достоверно ($p \leq 0,05$) по отношению к группе интактных животных. При исследовании SH-групп у животных 3 группы они увеличивались на 4,8 % ($p \leq 0,05$), в 1 группе животных – на 5,9 %

($p \leq 0,05$), а во 2 группе животных, принимавших алкоголь-энергетический напиток «Ягуар», на 12,5 % ($p \leq 0,05$).

При исследовании плазмы крови крыс обнаружено, что АОА у животных 3 группы снизилась на 15,8 % ($p \leq 0,05$), в 1 группе животных снижение на 18,7 % было достоверным ($p \leq 0,05$), а во 2 группе животных – на 53,7 % ($p \leq 0,01$). Уровень МХВЛ у животных 3 группы, употреблявших пиво, увеличился на 30,9 % ($p \geq 0,05$), во группе животных, принимавших «Ред Булл», – 53,6 % ($p \geq 0,05$), в 1 группе животных, употреблявших Ягуар, – 78,2 % ($p \leq 0,05$). Исследование активности КАТ показало ее уменьшение у животных 3 группы на 23,5 % ($p \geq 0,05$), у животных 1 группы – на 30,4 % ($p \leq 0,05$), а во 2 группе животных – на 60,8 % ($p \leq 0,01$). Определение активности СОД у крыс 3 группы показал ее снижение на 37,4 % ($p \leq 0,05$), в 1 группе животных – на 40 % ($p \leq 0,05$), и во 2 группе животных, принимавших Ягуар, – на 74,9 % ($p \leq 0,01$). Исследование SH-группы у животных 3 группы, употреблявших пиво, показало ее увеличение на 28,4 % ($p \geq 0,05$), в 1 группе животных, принимавших напиток «Red Bull», – на 33,3 % ($p \geq 0,05$), и во 2 группе крыс («Ягуар») – на 42,5 % ($p \leq 0,05$). Определение МДА у животных 3 группы выявило его увеличение на 39,5 % ($p \leq 0,05$), в 1 группе крыс – на 47,7 % ($p \leq 0,05$), и во 2 группе животных увеличение составило 82,6 % ($p \leq 0,05$). Увеличение ДК у крыс 3 группы составило 58,5 % ($p \leq 0,05$), в 1 группе животных – 64,2 % ($p \leq 0,05$) и во 2 группе животных – 97,9 % ($p \leq 0,05$).

Выводы

Таким образом, проведенное исследование показало, что:

- принимаемые напитки ингибируют компоненты антиоксидантной системы крови;
- вызывают формирование зависимости у животных к их приему;
- при систематическом их употреблении влияют на поведенческие реакции животных (возбуждение, агрессия).

Список литературы

1. Луговая, И. А. Активность ферментов антирадикальной защиты в эритроцитах и в раневом отделяемом у больных с осложненным течением сахарного диабета / И. А. Луговая, И. И. Павлюченко, С. Р. Федосов // Открытое образование. – 2006. – № 3. – С. 425–427.
2. Лушак, В. И. Окислительный стресс и механизмы защиты от него / В. И. Лушак // Биохимия. – 2001. – Т. 66, вып. 5. – С. 592-609.
3. Павлюченко И. И., Федосов С. Р., Басов А. А. Программа для регистрации сигналов хемиллюминотестера ЛТ-1. Свидетельство об официальной регистрации программы для ЭВМ №2006611562 от 10 мая 2006 года.

4. Трофименко, А. И. Моделирование церебральной ишемии посредством коагуляции средней мозговой артерии у крыс / А. И. Трофименко, А. Х. Каде, В. П. Лебедев [и др.] // *Фундаментал. исслед.* – 2012. – № 2. – С. 215-218.
5. Aranda, M. Simultaneous determination of riboflavin, pyridoxine, nicotinamide, caffeine and taurine in energy drinks by planar chromatography-multiple detection with confirmation by electrospray ionization mass spectrometry / M. Aranda, G. Morlock, // *J. Chromatogr.* – 2006. – A 1131. – PP. 253–260.
6. Brooks, J. Spike shooter makers stand by their energy drink. http://cbs4denver.com/local/local_story_054082902.html. Accessed on February 28, 2008.
7. Dasey, D. Man's heart stops after Red Bull overdose. *The Sydney Morning Herald*, August 19. <http://www.smh.com.au/articles/2007/08/18/1186857834956.html>. Accessed on February 28, 2008.
8. Ferreira, S. E. Effects of energy drink ingestion on alcohol intoxication / S. E. Ferreira, M. T. de Mello, S. Pompeia [et al.] // *Alcohol Clin. Exp. Res.* – 2006. – Vol. 30. – PP. 598–605.
9. Finnegan D. The health effects of stimulant drinks / D. Finnegan // *Nutrition Bulletin.* – 2003. – Vol. 28 (2). – PP. 147-1554.
10. Iyadurai S.J., Chung S.S. New-onset seizures in adults: possible association with consumption of popular energy drinks / S.J. Iyadurai, S.S. Chung // *Epilepsy and Behav.* – 2007. – Vol. 10(3). – PP. 504-508.

Рецензенты:

Колесникова Н.В., д.б.н., заведующая ЦНИЛ Отдела клинической экспериментальной иммунологии и молекулярной биологии, профессор ГБОУ ВПО КубГМУ Минздрава России, г. Краснодар.

Абушкевич В.Г., д.м.н., профессор кафедры нормальной физиологии ГБОУ ВПО КубГМУ Минздрава России, г. Краснодар.