УДК 664

ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНОЕ ДОКАЗАТЕЛЬСТВО БЕЗОПАСНОСТИ ТОНИЗИРУЮЩИХ НАПИТКОВ НА РАСТИТЕЛЬНОМ СЫРЬЕ

Experimental Safety Proof of the Tonic Beverages Based
on the Herbal Raw Materials

Поляков В.А., Позняковский В.М., Котова Т.В.
Polyakov V.A., Poznyakovskiy V.M., Kotova T.V.

Ключевые слова:

тонирующие
напитки;
экстракт
родиолы розовой;
биомаркеры;
цитоллиз

Реферат

Статья посвящена проведению экспериментальной оценки доказательства безопасности потребления тонирующего напитка с экстрактом родиолы розовой посредством определения активности ферментов биомаркеров цитолиза – аланин-аминотрансферазы (АЛТ), аспартатаминотрансферазы (АСТ), креатинкиназы (КК) и лактатдегидрогеназы (ЛДГ). Исследование выполнено на половозрелых крысах самцах линии Wistar ($n = 15$, масса тела – 461 ± 23 г), которым с использованием глоточного зонда ежедневно трехкратно на протяжении 21 суток вводили тонирующий напиток, содержащий 20 мкг экстракта родиолы розовой в 100 см³ воды, из расчета 4 мкг экстракта на 100 г массы тела. Через три недели потребления напитка в плазме крови определяли активность ферментов биомаркеров цитолиза. Методом регрессионного анализа построены модели прогнозирования изменений активности лактатдегидрогеназы при потреблении тонирующего напитка с экстрактом родиолы розовой. Модели характеризуются тесными связями результативного и факторных признаков с уровнем надежности 95 %, адекватны по критерию Фишера, а коэффициенты значимы по критерию Стьюдента. По результатам эксперимента ежедневное потребление тонирующих напитков с экстрактом родиолы розовой не приводит к достоверному изменению активности ферментов биомаркеров цитолиза, что свидетельствует о его безопасности. Это совпадает с оценкой прогноза изменения активности ЛДГ. Разработанные математические модели прогнозирования позволили установить, что при изменении режима дозирования и концентрации напитка с экстрактом родиолы розовой происходит изменение активности ЛДГ в референтных пределах.

Keywords:

soft drinks;
Rhodiola rosea extract;
biomarkers;
cytolysis

Abstract

The scientific paper is devoted to the safety evidence experimental evaluation of the consumption of soft drinks based on the Rhodiola rosea extract by determining the activity of cytolysis biomarkers enzymes – alanine aminotransferase, aspartate aminotransferase, creatinekinase and lactate dehydrogenase. The study was performed on the reproductive male rats of Wistar line ($n = 15$, body weight – 461 ± 23 g). They were watered daily using a pharyngeal pathfinder with drink containing 20 mg of the Rhodiola rosea extract in 100 cm³ of water in an amount of 4 µg of extract per 100 g of body weight. The infiltration was carried out three times a day for 21 days. 3 weeks after the beverage consumption the cytolysis biomarkers enzymes activity in plasma was determined. By the regression analysis the model for predicting changes in lactate dehydrogenase activity while consuming soft drinks with Rhodiola rosea extract is constructed. Models are characterized by close ties of effective and factor evidence with 95 % reliability level, the Fisher criteria adequate, and its significant coefficient in Student's t-criterion.

The daily consumption of soft drinks with ginseng extract was determined not to cause significant changes in cytolysis bio-markers enzymes activity indicating its safety. This coincides with the assessment of forecast changes in the LDH activity. Developed mathematical forecasting modes has allowed to establish that changing the dosing regimen and concentration of the beverage with the Rhodiola rosea extract led to a change in LDH activity in the reference range.

Актуальность

Расширение ассортимента отечественных продуктов, в том числе специализированного назначения, – одна из приоритетных задач пищевой и перерабатывающей промышленности, определяемых указами Президента РФ и постановлениями Правительства РФ, в которых основное внимание направлено на обеспечение качества и безопасности разрабатываемой продукции, формирующей здоровье нации [4; 5].

Одной из востребованных групп функциональных продуктов являются тонизирующие напитки, объем производства которых неуклонно растет как в нашей стране, так и за рубежом. Особенностью безалкогольных тонизирующих напитков является способность оказывать стимулирующее воздействие на организм человека в целом и на функциональную активность отдельных органов и тканей.

Среди сырьевых компонентов тонизирующих напитков особую актуальность приобрело изучение свойств родиолы розовой, которая оказывает модулирующее действие на фагоцитарную активность лейкоцитов, пролиферацию лимфоцитов и выработку антител [7; 8]. Являясь адаптогенным средством растительного происхождения, препараты родиолы розовой оказывают стимулирующее воздействие на ЦНС и метаболические процессы в организме человека, поэтому они широко используются для повышения умственной и физической работоспособности, лечения амнезии [9], улучшения мнестических процессов при старении и ишемических повреждениях головного мозга [1].

Вместе с тем, несмотря на широкое применение тонизирующих компонентов родиолы розовой и многочисленные их исследования, остается открытым вопрос о биологической безопасности длительного, в том числе неконтролируемого, потребления тонизирующих напитков, содержащих растительные адаптогены. В связи с этим необходима не только текущая оценка патогенного влияния определенных доз и концентраций тонизирующих напитков на организм или отдельные органы и ткани, но и прогнозирование безопасности различных уровней их употребления.

Цель исследования – проведение экспериментальных испытаний безопасности тонизирующего напитка с родиолой розовой на основе оценки цитолитических эффектов в сердце, печени, головном мозге и скелетных мышцах при длительном его потреблении.

Материалы и методы исследования

Исследование выполнено на половозрелых крысах самцах линии Wistar с исходной массой тела 461 ± 23 г ($n = 30$) в соответствии с Европейской конвенцией о гуманном обращении с животными, используемыми для экспериментов или в иных научных целях (Страсбург, 1986).

Изготовление тонизирующих напитков осуществляли согласно ГОСТ Р 52844-2007 с использованием сухого экстракта родиолы розовой (ЗАО «Лекарственные травы», РФ). Приготовленный напиток, содержащий 20 мкг экстракта родиолы розовой в 100 см³ воды, вводили животным рогом глоточным зондом трехкратно (9:00, 13:00 и 17:00) из расчета 4 мкг экстракта на 100 г массы тела ежедневно на протяжении 21 суток.

По окончании эксперимента животных декапитировали после предварительной ингаляции диэтиловым эфиром. Смешанную кровь отбирали в стерильные пробирки с ЭДТА-КЗ и центрифугировали в течение 10 мин со скоростью 4000 об./мин на центрифуге СМ-12 с угловым ротором (крутящий момент – 2100 г). До проведения анализа плазму крови хранили 3–5 суток в морозильной камере при температуре -18 °С. Плазма подвергалась однократному замораживанию-размораживанию.

Активность ферментов биомаркеров цитолиза определяли на СФ-2000 (ОКБ «Спектр», РФ) спектрофотометрически при температуре 37 °С с использованием наборов реактивов: аланинаминотрансферазы (АЛТ) и аспартатаминотрансферазы (АСТ) (ООО «Ольвекс Диагностикум», РФ); лактатдегидрогеназы (ЛДГ) (АО «ДИАКОН-ДС», РФ); креатинкиназы (КК) («HUMAN», Германия) [10]. С учетом высокой динамичности и вариабельности активности ферментов биомаркеров цитолиза, а также с целью исключения фоновых влияний на результаты анализа была выполнена контрольная серия ($n = 15$), живот-

ные которой по всем характеристикам аналогичны опытной группе, кроме изучаемого фактора – вместо тонизирующего напитка им вводили аналогичным образом соответствующий объем дистиллированной воды.

Оценку безопасности тонизирующих напитков с экстрактом родиолы розовой проводили методом трехфакторного регрессионного анализа с построением математической модели и использованием пакета анализа в Microsoft Office Excel 2010 [6], который позволяет производить расчеты различных регрессионных моделей, проверить гипотезу адекватности модели имеющимся наблюдениям, а также применить модель для прогнозирования зависимой переменной при новых значениях независимой переменной.

Результаты и их обсуждение

Установлено, что введение крысам тонизирующего напитка с экстрактом родиолы розовой ежедневно трехкратно в течение 21 суток не вызывает изменений активности АЛТ, ЛДГ и КК, отражающих цитолиз (табл. 1), что свидетельствует о безопасности его длительного потребления.

В определенной степени этот вывод подтверждается отсутствием различий активности ферментов биомаркеров цитолиза в сравнении с таковой у животных контрольной серии, которые вместо тонизирующего напитка получали воду. Наблюдается незначительный рост активности АСТ – на 2,9 Ед/л выше верхней границы референтного предела. Поэтому нельзя исключить возможность развития цитолиза при других вариантах потребления тонизирующего напитка, так как вследствие стимулирующего действия возрастает функциональная активность гепатоцитов, кардиомиоцитов, клеток крови, головного мозга, скелетных мышц. Всё вышеизложенное послужило основанием для разработки математических моделей прогнозирования цитолиза при длительном потреблении тонизирующего напитка. Для оценки прогноза развития цитолиза с использованием математических моделей в качестве функции отклика выбрана общая активность ЛДГ [2; 3].

ЛДГ – внутриклеточный фермент, локализованный практически во всех клетках организма. Однако пять изоферментов ЛДГ имеют достаточно выраженную тканевую и органную специфичность.

Повышение в крови активности изоферментов ЛДГ₁ и ЛДГ₂ отражает преимущественно цитолиз кардиомиоцитов, ЛДГ₃ – клеток легочной ткани, ЛДГ₄ и ЛДГ₅ – гепатоцитов и скелетных мышц. Эти свойства отличают ЛДГ как фермент биомаркер цитолиза от других ферментов биомаркеров. Представлялось целесообразным выявить корреляционную зависимость между общей активностью ЛДГ и активностью других маркеров цитолиза – АЛТ, АСТ и КК – при пролонгированном потреблении тонизирующего напитка.

Построение трехфакторной модели сводится к выводу нелинейного уравнения регрессии, которое определяет эмпирическую зависимость функции отклика общей активности ЛДГ (Y) от независимых факторов активности ферментов АЛТ (X₁), АСТ (X₂), КК (X₃) и их взаимодействий. Вид и численные значения параметров уравнения регрессии устанавливались с помощью метода наименьших квадратов отклонений эмпирических данных от восстановленных модельных данных.

Факторный эксперимент характеризуется количественными показателями, выраженными в Ед/л: X₁ – АЛТ; X₂ – АСТ; X₃ – КК; функция отклика ЛДГ – Y (табл. 2). Целью регрессионного анализа является определение такого сочетания факторов X₁, X₂, X₃, при котором значение функции отклика Y принимает значение в референтных пределах. В результате моделирования уравнение изменения активности ЛДГ у мышей самцов, потреблявших тонизирующий напиток с родиолой розовой, имеет вид:

$$Y = -664,944X_1 + 14,613X_3 + 0,187X_1^3 - 0,018X_2^3 - 0,034X_3^3 + 16707,610; \quad (1)$$

$$34 \leq X_1 \leq 37; 43 \leq X_2 \leq 44; 10 \leq X_3 \leq 14; 197 < Y \leq 228.$$

Регрессионная статистика дала высокую оценку качества модели.

Значение множественного коэффициента детерминации $R^2 = 0,87$ показывает, что 87 % общей вариации активности ЛДГ у мышей самцов объясняется вариацией факторных признаков. Выбранные факторы оказывают существенное влияние на изменение ЛДГ у самцов. Уровень значимости 0,00017 подтверждает значимость коэффициента детерминации и уравнения изменения активности ЛДГ.

Таблица 1

Активность ферментов биомаркеров цитолиза в плазме крови подопытных крыс

Группа	Активность фермента, Ед/л			
	АЛТ	АСТ	ЛДГ	КК
I. Контрольная (n = 15)	32,7±0,1	30,8±0,1	253,4±19,8	10,3±0,4
II. Опытная (n = 15)	33,9±0,3	42,9±0,3	211,0±2,3	11,2±0,4

Таблица 1

Сравнение экспериментальной и предсказанной величин активности ЛДГ у мышей самцов, потребляющих тонизирующий напиток с экстрактом родиолы розовой

№ опыта	Активность фермента, Ед/л			Активность ЛДГ, Ед/л		Остатки регрессии
	АЛТ	АСТ	КК	экспериментальная	предсказанная	
I. Опытная группа						
1	34	43	11	211	209	0,88
2	35	43	11	200	203	1,10
3	36	43	14	228	227	0,30
4	34	43	10	205	206	0,27
5	37	44	14	213	214	0,42
6	33	43	10	221	218	1,53
7	34	43	14	199	199	0,11
8	36	43	10	226	228	0,66
9	34	43	10	204	206	1,04
10	37	44	11	212	218	2,97
11	34	43	11	211	209	0,88
12	34	43	10	197	201	1,72
13	35	43	10	216	212	2,04
14	34	43	11	207	209	1,13
15	37	44	11	215	207	3,56
II. Контрольная группа						
1	34,1	31,5	15	288,5	287,2	1,3
2	34,3	30,1	11	320,6	306,4	14,2
3	33,7	31,2	12	285,3	279,9	5,4
4	34,1	31,4	11	286,9	281,5	5,4
5	34,3	30,0	11	319,0	306,8	12,2
6	33,7	31,2	12	283,7	279,9	3,8
7	34,1	31,4	11	288,5	281,5	7,0
8	33,9	29,9	12	303,0	300,5	2,5
9	33,7	31,2	11	282,1	277,8	4,3
10	34,1	31,4	11	270,9	281,5	−10,6
11	34,3	30,1	15	314,2	314,9	−0,7
12	33,7	31,1	11	266,1	280,0	−13,9
13	34,1	31,5	15	283,7	287,2	−3,5
14	34,3	30,0	11	280,5	290,8	−10,3
15	33,7	31,1	11	278,9	280,0	−1,1

Показатель средней ошибки аппроксимации 1,24 % также подтверждает достаточно высокую адекватность уравнения. Кроме того, отметим статистическую значимость всех параметров: стандартные ошибки параметров уравнения меньше соответствующих коэффициентов.

Таким образом, полученная модель позволяет оценить изменение активности ЛДГ у мышей самцов, потребляющих тонизирующий напиток, при изменении факторов в референтных диапазонах (рис. 1).

Поверхность отклика позволяет сделать вывод: у мышей самцов, потреблявших тонизирующий напиток с экстрактом родиолы розовой, значения ЛДГ изменяются в пределах референтных значений (170–480 Ед/л). Наибольшее значение ЛДГ по оценке полученной модели составляет 228,72 Ед/л при количестве ферментов, Ед/л: АЛТ – 35,6; АСТ – 42,6; КК – 14. Высокое значение ЛДГ находится на уровне 197,70 Ед/л при следующих показателях, Ед/л: АЛТ – 34,1; АСТ – 42,6; КК – 10.

Наибольшее влияние на изменение уровня ЛДГ оказывает изменение содержания АСТ; увеличение уровня АЛТ приводит к увеличению концентрации ЛДГ, тогда как КК оказывает противоположное действие: увеличение КК приводит к снижению уровня ЛДГ.

Рис. 1. Поверхность отклика изменения активности ЛДГ у мышей самцов, потребляющих напиток с родиолой розовой

После анализа результатов факторного эксперимента был сделан следующий вывод: изменение активности ферментов биомаркеров цитолиза АЛТ, КК и ЛДГ находится в референтных пределах. Рост значения активности АСТ выше верхнего допустимого уровня референтного предела не вызывает патогенетических изменений. С учетом полученных результатов рекомендуется контролировать дозировку экстракта родиолы розовой в напитках и продолжительность употребления напитка во избежание негативных последствий.

Аналогичным образом проводилось построение математических моделей для животных контрольной группы (рис. 2).

Выводы

Доказано, что длительное потребление тонизирующего напитка с экстрактом родиолы розовой не сопровождается патогенетически значимым увеличением цитолиза, оцениваемого по изменению активности в крови ферментов биомаркеров АЛТ, АСТ, КК и ЛДГ в сердце, печени, мозге и скелетных мышцах. Полученные данные согласуются с оценкой прогнозирования математической модели.

Рис. 2. Поверхность отклика изменения активности ЛДГ у мышей самцов (контрольная группа)

Библиографический список

1. Котова Т.В., Разумов А.С., Сухих А.С., Позняковский В.М. Влияние употребления компонентов тонизирующих напитков на биохимические показатели повреждения клеточных мембран // Пища. Экология. Качество. Тематика: «Продовольственная безопасность России: Пути. Проблемы. Решения»: сб. ст. XII Междунар. науч.-практ. конференции (Москва, 19–21 марта 2015 г.) / Московский государственный университет пищевых производств. М., 2015. Т. I. С. 46–47.

Bibliography

1. Kotova T.V., Razumov A.S., Suhikh A.S., Poznjakovskij V.M. Vlijanie upotreblenija komponentov tonizirujushhih napitkov na biohimicheskie pokazateli povrezhdenija kletochnyh membran // Pishha. Jekologija. Kachestvo. Tematika: «Prodovol'stvennaja bezopasnost' Rossii: Puti. Problemy. Reshenija»: sb. st. XII Mezhdunar. nauch.-prakt. konferencii (Moskva, 19–21 marta 2015 g.) / Moskovskij gosudarstvennyj universitet pishhevyh proizvodstv. M., 2015. T. I. S. 46–47.

2. Котова Т.В., Солопова А.Н., Позняковский В.М. Информационная модель безопасности тонизирующего (энергетического) напитка с кофеином и таурином // Технология и товароведение инновационных пищевых продуктов. 2015. № 3(32). С. 70–76.
3. Котова Т.В., Солопова А.Н., Позняковский В.М. Информационная модель безопасности тонизирующего (энергетического) напитка с лимонником китайским // Техника и технология пищевых производств. 2015. № 2(37). С. 110–115.
4. Позняковский В.М. Безопасность продовольственных товаров (с основами нутрициологии). М.: ИНФРА-М, 2014. 271 с.
5. Политика здорового питания. Федеральный и региональный уровни: [монография] / В.И. Покровский, Г.А. Романенко, В.А. Княжев, Н.Ф. Герасименко, Г. Г. Онищенко, В.А. Тутельян, В.М. Позняковский. Новосибирск: Сибирск. универс. изд-во, 2002. 344 с.
6. Тутельян В.А., Смирнова Е.А. Роль пищевых ингредиентов в создании современных продуктов питания // Пищевые ингредиенты в создании современных продуктов питания: [монография] (сб. ст.) / под ред. В.А. Тутельяна, А.П. Нечаева. М.: Дели плюс, 2014. С. 10–24.
7. Уткин В. А. Статистические технологии в медицинских исследованиях: [монография]. Пятигорск, 2002. 214 с.
8. Effects of Co-Administration of Tea Epigallocatechin-3-gallate (EGCG) and Caffeine on Absorption and Metabolism of EGCG in Humans / K. Nakagawa, K. Nakayama, M. Nakamura et al. // Biosci. Biotechnol. Biochem. 2009. № 73(9). P. 2014–2017.
9. Graham T.E., Spriet L.L. Metabolic, catecholamine, and exercise performance responses to various doses of caffeine // J. Appl. Physiol. 1995. № 78(3). P. 867–874.
10. Search for natural products related to regeneration of the neuronal network / C. Tohda, T. Kuboyama, K. Komatsua et al. // Neurosignals. 2005. Vol. 14. P. 34–45.
2. Kotova T.V., Solopova A.N., Poznjakovskij V.M. Informacionnaja model' bezopasnosti tonizirujushhego (jenergeticheskogo) napitka s kofeinom i taurinom // Tehnologija i tovarovedenie innovacionnyh pishhevyh produktov. 2015. № 3(32). S. 70–76.
3. Kotova T.V., Solopova A.N., Poznjakovskij V.M. Informacionnaja model' bezopasnosti tonizirujushhego (jenergeticheskogo) napitka s limonnikom kitajskim // Tehnika i tehnologija pishhevyh proizvodstv. 2015. № 2(37). S. 110–115.
4. Poznjakovskij V.M. Bezopasnost' prodovol'stvennyh tovarov (s osnovami nutriciologii). M.: INFRA-M, 2014. 271 s.
5. Politika zdorovogo pitaniya. Federal'nyj i regional'nyj urovnj: [monografija] / V.I. Pokrovskij, G.A. Romanenko, V.A. Knjazhev, N.F. Gerasimenko, G. G. Onishhenko, V.A. Tutel'jan, V.M. Poznjakovskij. Novosibirsk: Sibirsk. univers. izd-vo, 2002. 344 s.
6. Tutel'jan V.A., Smirnova E.A. Rol' pishhevyh ingredientov v sozdanii sovremennyh produktov pitaniya // Pishhevye ingredienty v sozdanii sovremennyh produktov pitaniya: [monografija] (sb. st.) / pod red. V.A. Tutel'jana, A.P. Nechaeva. M.: DeLi plus, 2014. S. 10–24.
7. Utkin V. A. Statisticheskie tehnologii v medicinskih issledovanijah: [monografija]. Pjatigorsk, 2002. 214 s.
8. Effects of Co-Administration of Tea Epigallocatechin-3-gallate (EGCG) and Caffeine on Absorption and Metabolism of EGCG in Humans / K. Nakagawa, K. Nakayama, M. Nakamura et al. // Biosci. Biotechnol. Biochem. 2009. № 73(9). P. 2014–2017.
9. Graham T.E., Spriet L.L. Metabolic, catecholamine, and exercise performance responses to various doses of caffeine // J. Appl. Physiol. 1995. № 78(3). P. 867–874.
10. Search for natural products related to regeneration of the neuronal network / C. Tohda, T. Kuboyama, K. Komatsua et al. // Neurosignals. 2005. Vol. 14. P. 34–45.

**Поляков
Виктор Антонович**
Polyakov
Victor Antonovich

Тел./Phone: (495) 362-44-95
E-mail: 4953624495@mail.ru

Академик РАН, доктор технических наук, профессор, директор
Всероссийский научно-исследовательский институт пищевой биотехнологии –
филиал ФГБУН «ФИЦ питания и биотехнологии»
111033, РФ, г. Москва, ул. Самокатная, 4Б

Academician of the Russian Academy of Sciences, Doctor of Technical Science, Professor, Director
Russian Science Institute of Food Biotechnology – subdivision of the Federal Research Centre
for Nutrition, Biotechnology and Food Safety
111033, Russia, Moscow, Samokatnaya St., 4B

**Позняковский
Валерий Михайлович**
Poznyakovskiy
Valeriy Mikhailovich

Тел./Phone: (905) 960-96-40
E-mail: pvm1947@bk.ru

Заслуженный деятель науки РФ, доктор биологических наук, профессор,
профессор кафедры технологии питания
Уральский государственный экономический университет
620144, РФ, г. Екатеринбург, ул. 8 Марта/Народной Воли, 62/45

Honored Scientist of the Russia, Doctor of Biological Science, Professor,
Professor of the Food Technology Department
Ural State University of Economics
620144, Russia, Ekaterinburg, 8 March St. / Narodnoy Voli St., 62/45

**Котова
Татьяна Вячеславовна**
Kotova
Tatyana Vyacheslavovna

Тел./Phone: (923) 518-13-31
E-mail: it_kotova@inbox.ru

Кандидат технических наук, доцент, доцент кафедры торгового дела
Российский экономический университет им. Г.В. Плеханова –
Кемеровский институт (филиал)
650992, РФ, г. Кемерово, Кузнецкий пр., 39

Candidate of Technical Sciences, Associate Professor of the Business Department
Kemerovo University (Division) of the Plekhanov University of Economics
650992, Russia, Kemerovo, Kuznetskiy Ave., 39