

УДК 57.024

DOI 10.29039/2413-1725-2024-10-2-23-31

ВЛИЯНИЕ ХРОНИЧЕСКОГО СТРЕССА НА СТЕПЕНЬ ТОКСИЧНОСТИ БЕНЗОЙНОЙ И СОРБИНОВОЙ КИСЛОТЫ

*Гизатуллина А. А., Валова Я. В., Курилов М. В., Хуснутдинова Н. Ю.,
Каримов Д. Д., Смолянкин Д. А., Каримов Д. О., Мухаммадиева Г. Ф.*

*ФБУН «Уфимский научно-исследовательский институт медицины труда и экологии
человека», Уфа, Россия
E-mail: alinagisa@yandex.ru*

Нами было проведено исследование, в котором оценивалось влияние хронического стресса и консервантов на организм крыс. Оценка исследовательского поведения, вертикальной и горизонтальной активности не выявили статистически значимых различий между экспериментальными группами. Показатель набора веса у особей, получавших совместно консерванты и регулярные стрессоры, был более приближен к значению в группе контроля, тогда как в двух оставшихся группах наблюдалось снижение темпа роста массы тела. Это может означать, что консерванты действительно могут в некоторой степени нивелировать последствия стрессового воздействия. Результаты проведенного нами исследования дополняют имеющиеся литературные данные по изучению воздействия стресса и консервантов на организм.

Ключевые слова: хронический стресс, экспериментальные животные, вертикальная активность, горизонтальная активность, консерванты, бензойная кислота, сорбиновая кислота.

ВВЕДЕНИЕ

Использование консервантов в пищевой промышленности стало неотъемлемой частью современной жизни, они играют важную роль в поддержании природных свойств продуктов питания, увеличении их срока годности, а также сокращении потерь пищевых продуктов при длительной транспортировке. Наравне с натуральными консервантами активно процветает и группа химических, в числе которых можно выделить сорбаты и бензоаты [1]. Сорбиновая кислота (E200) представляет собой антимикробный агент, который активно используется в производстве пищевой и алкогольной продукции, часто встречается в винах [2]. Бензойная кислота (E210), а также её соли являются одними из самых популярных химических консервантов.

Несмотря на губительное воздействие данных консервантов на дрожжи и плесень, бензойная и сорбиновая кислоты считаются относительно безвредными для организма человека [3]. Однако имеются данные о косвенном влиянии сорбиновой кислоты на функционирование нервной системы за счет разрушения витаминов группы В под её воздействием [4]. Кроме того отмечается, что при избыточном поступлении бензойной кислоты в живой организм она может

накапливаться в печени. До конца не определено влияние избытка данного консерванта на нервную систему, поскольку существуют данные как о терапевтическом действии бензоатов при лечении нейродегенеративных состояний, так и напротив о том, что существует риск расстройства нейроэндокринной системы [5, 6]. Целью эксперимента стала оценка влияния сочетанного воздействия хронического стресса и консервантов на организм крыс.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Эксперимент проводился в стандартных условиях вивария, если не указано иное. Помещение вивария имеет постоянный необходимый уровень влажности примерно 50 %, температуру 20–25 °С и двенадцатичасовое искусственное освещение в дневное время. Для исследования были отобраны 40 белых аутбредных крыс самок и самцов в равном соотношении и распределены на 4 экспериментальные группы (таблица 1).

Таблица 1

Дизайн эксперимента

Группа, количество особей	Тип воздействия
1 10 (5 самцов, 5 самок)	Отрицательный контроль
2 10 (5 самцов, 5 самок)	Хронический стресс
3 10 (5 самцов, 5 самок)	Консерванты
4 10 (5 самцов, 5 самок)	Консерванты + хронический стресс

Эксперимент продолжался 28 календарных дней. Под воздействием консервантов понимается раствор сорбиновой (500 мг/кг массы тела) и бензойной кислоты (100 мг/кг массы тела). Дозы веществ выбраны из расчета десятикратной дозы данных консервантов, которая ежедневно поступает в организм взрослого человека в соответствии с перечнем пищевых продуктов, утвержденным Р2.1.10.3968-23 (Москва, 2023) и ТР ТС 029/2012 (принят решением Совета Евразийской экономической комиссии № 58 от 20.07.2012 г). Раствор вводился перорально один раз в сутки животным из соответствующих групп, особи двух других групп по аналогичной схеме получали чистую дистиллированную воду эквивалентно.

Под воздействием непредсказуемого хронического стресса понимается ряд легких стрессоров, влиянию которых животные были подвержены один или два раза в сутки со сменным графиком. Среди стрессоров использовали;

- социальный стресс – помещение животных в одиночные клетки с прозрачными стенками, свободным доступом к воде и пище на сутки;

- шум – размещение клеток с животными в непосредственной близости с источником непрерывающегося шума громкостью 80 дБ в течение двух часов;

- иммобилизация – нахождение животных в специализированных иммобилизационных камерах из оргстекла в горизонтальном положении в течение 30-60 минут;

- пищевая депривация – изъятие корма на сутки;

- питьевая депривация – изъятие поилки с водой на сутки;

- свет – клетки с животными помещали в комнату со включенным искусственным освещением на всю ночь.

Еженедельно снимались поведенческие показатели на доске с отверстиями 4*4 («UgoBasil», Италия) и с помощью многофункциональной клетки для оценки общей активности («UgoBasil», Италия). Все манипуляции с крысами проводили строго в соответствии с правилами по гуманному и бережному обращению с животными, которые зафиксированы в «Европейской конвенции по защите позвоночных животных, используемых для экспериментальных и других научных целей» (Strasbourg, 1986) и Хельсинской декларации о гуманном отношении к животным.

Для статистического анализа полученных результатов использовали программное обеспечение IBM SPSS Statistics 21 (IBM, США). Данные проходили проверку на нормальность с применением критерия Колмогорова-Смирнова, после чего были оценены с помощью однофакторного дисперсионного анализа (ANOVA) с применением апостериорных критериев Тьюки и Тамхейна. Данные представлены как среднее арифметическое и среднеквадратичная ошибка. Критический уровень значимости (p) принят равным 0.05.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

В течение месяца каждую неделю были зафиксированы значения трех показателей: количество опусканий головы в отверстия, общая вертикальная двигательная активность (ОВДА) и общая горизонтальная двигательная активность (ОГДА) в многофункциональной клетке общей активности (таблица 2).

Таблица 2

Результаты поведенческих показателей

Показатель	Группа	1 неделя	2 неделя	3 неделя	4 неделя
Количество опусканий головы в отверстия	1	22,8±2,1	22,6±3,7	24,4±3,5	19,7±2,4
	2	19,7±2,2	21,9±2,4	21,0±2,2	14,9±2,6
	3	19,4±2,4	24,7±3,7	16,2±1,4	18,4±2,9
	4	19,4±2,9	19,7±1,8	16,1±2,6	13,7±2,2
ОВДА	1	518,7±60,5	428,9±70,9	425,6±47,3	381,4±58,1
	2	502,0±46,6	341,4±72,5	405,7±82,7	365,7±82,9
	3	436,2±71,1	519,2±62,2	419,0±54,1	472,8±47,9
	4	463,9±57,4	329,1±52,5	336,5±60,8	334,8±69,8
ОГДА	1	936,1±98,6	916,8±78,5	841,9±71,6	836,1±81,6
	2	960,6±71,9	837,2±99,0	995,7±119,3	872,2±113,6
	3	872,2±91,5	905,4±75,6	904,2±84,1	903,7±65,2
	4	916,3±80,8	865,8±67,8	905,0±106,5	820,5±121,5

Анализ результатов теста с использованием доски с отверстиями не показал статистически значимых различий между группами ($p > 0,05$) (рис. 1). Однако наблюдается тенденция к снижению исследовательского интереса у крыс из групп, получавших консерванты, по сравнению с группой контроля на третьей неделе эксперимента ($F=2,5$; $p=0,07$). Кроме того, отмечается сокращение среднего числа заглядываний в норки животными из всех групп к четвертой неделе, что не получило статистического подтверждения. Количество опусканий головы в отверстия может быть трактовано для грызунов не только как проявление исследовательского интереса, но и как возможная попытка к бегству в следствие повышения уровня тревожности [7, 8]. Поэтому, в силу многозначности рассматриваемого показателя, данный тест чаще используется в сочетании с другими поведенческими исследованиями [9].

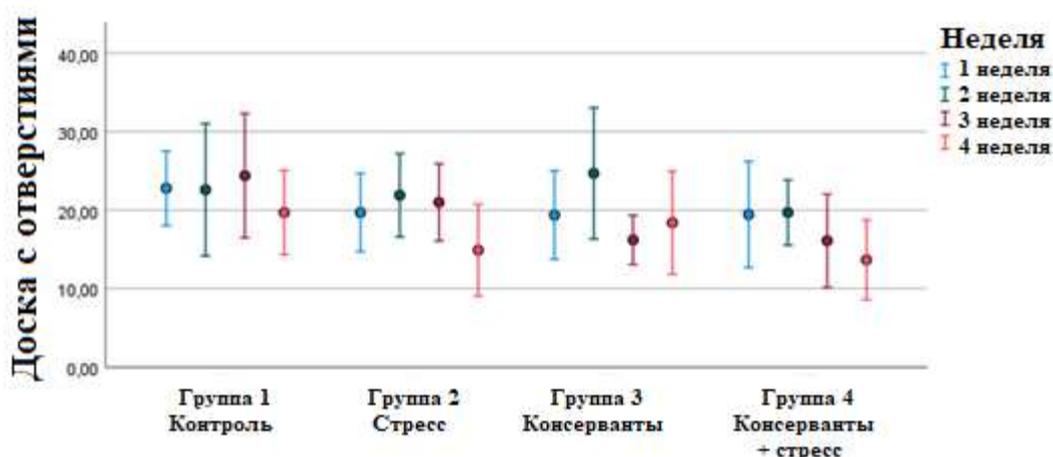


Рис. 1. Динамика результатов теста «Доска с отверстиями» в исследуемых группах в течение четырех недель

К горизонтальной активности относят любые перемещения животного в горизонтальной плоскости, включая бег и ходьбу на четырех лапах. Среднее значение данного показателя было примерно одинаковым на протяжении всего времени эксперимента во всех группах, что подтверждает отсутствие статистически значимых различий как между группами в каждую из недель, так и внутри одной группы в динамике месяца исследования ($p > 0,05$). Однако на графике в группах, подверженных стрессу, можно отметить более выраженный размах значений показателя (рис. 2).

Вертикальной активностью у крыс считается подъем на задние лапы, тогда как передние могут либо оставаться на весу, либо упираться в стенки клетки. Графическое изображение данного показателя в четырех исследуемых группах за четыре недели представлено на рисунке (рис. 3).

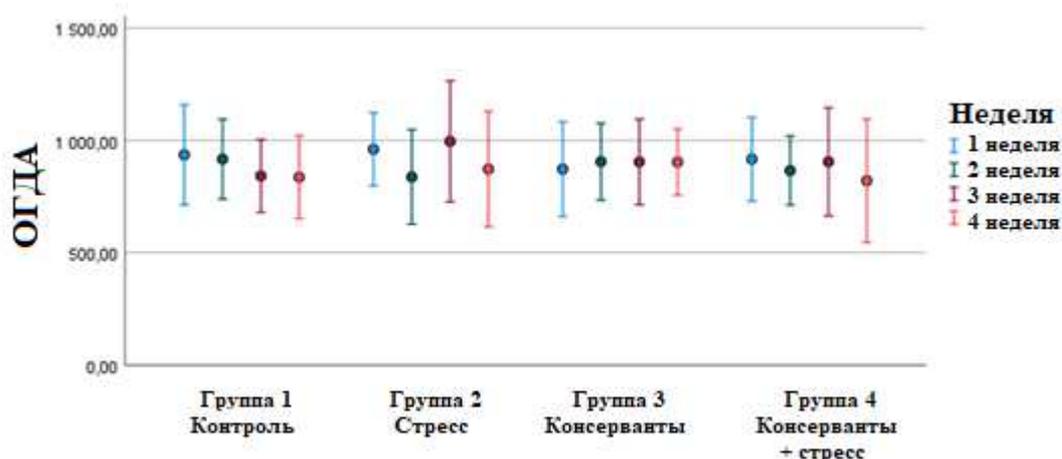


Рис. 2. Динамика изменения показателя ОГДА в исследуемых группах в течение четырех недель

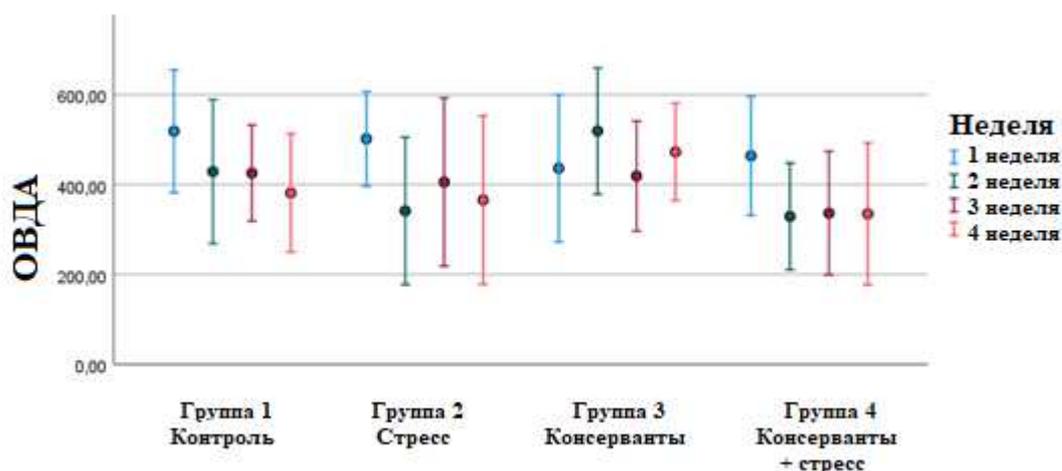


Рис. 3. Динамика изменения показателя ОВДА в исследуемых группах в течение четырех недель

Статистический анализ результатов не подтвердил значимость видимых различий между группами ($p > 0,05$). Однако можно отметить некоторые тенденции. Так, например, в группе контроля отмечается небольшое и постепенное сокращение двигательной активности в течение всего времени, что может объясняться потерей ощущения новизны. В то же время в группе со стрессом и консервантами, напротив, отмечается разброс значения показателя по неделям, что может свидетельствовать о

нарастании беспокойства и, как следствие, нарушении стабильности психического состояния. В группе, получавшей и стрессовое воздействие, и консерванты, отмечается спад активности со второй недели эксперимента, что, однако, также не является статистически значимым различием.

Кроме того, крыс подвергали процедуре взвешивания до начала эксперимента и перед его завершением. На графике представлено изменение массы тела крыс из всех групп за все время исследования ([итоговое значение массы тела]-[исходная масса тела], граммы) (рис. 4).

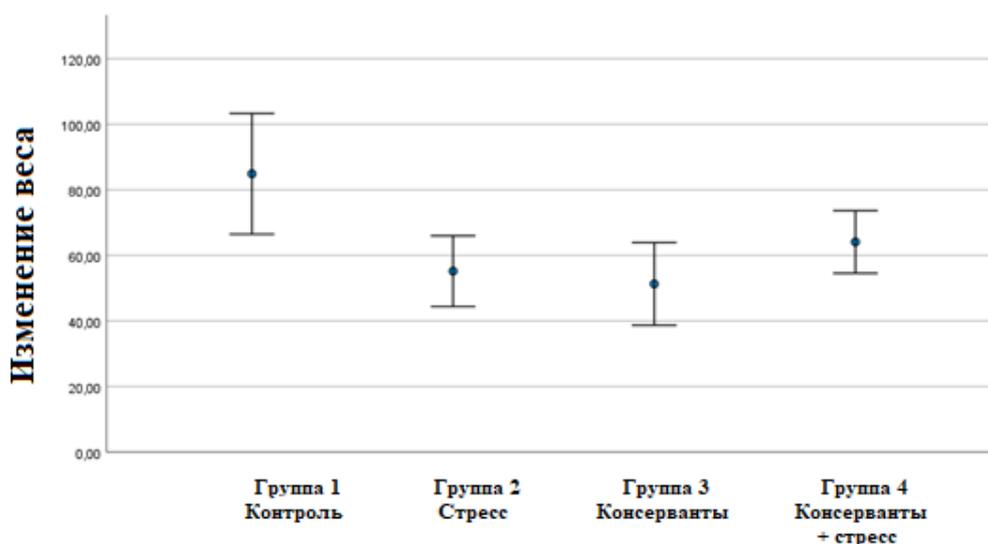


Рис. 4. Изменение массы тела крыс за время эксперимента

Животные из контрольной группы за календарный месяц в среднем набрали $84,4 \pm 8,1$ г, тогда как у животных в группах, получавших консерванты или подверженных стрессу набор веса был статистически значимо ниже ($F=6,5$; $51,3 \pm 5,6$; $p=0,01$ и $55,2 \pm 4,8$; $p=0,01$, соответственно). В группе, в которой животные были подвержены сочетанному воздействию консервантов и стресса, также отмечается более низкое среднее значение набора массы ($64,1 \pm 4,2$), чем в группе контроля, однако данные различия не достигли уровня статистической значимости, указывая скорее на тенденцию ($p=0,08$).

Спонтанные вертикальные и горизонтальные исследовательские движения являются неотъемлемыми компонентами поведения грызунов. Хронический стресс угнетает организм, что подтверждается результатами многих исследований. Так, в эксперименте Kuang W. в группе крыс с моделью хронического легкого непредсказуемого стресса по сравнению с контрольной группой наблюдалась более низкая масса тела и уменьшенное количество горизонтальных переходов [10].

Входящий в состав смеси консервантов бензоат натрия может в некоторой степени нивелировать негативные эффекты стресса. В исследовании Guo F. с коллегами было показано, что прием бензоата натрия в дозе 400 и 800 мг/кг

внутривенно в течение месяца при легком непредсказуемом стрессе способствовал ослаблению симптомов депрессии у крыс [11]. Тогда как в эксперименте Asejeje F., который тоже длился 1 месяц, поступление бензоата в дозах 150, 300 и 600 мг/кг показало значительное анксиогенное поведение, нарушения двигательных функций и исследовательской деятельности [12]. Доза и длительность приема консервантов имеет важное значение, поскольку при дозе бензоата натрия 70 мг/кг веса животного в течение 30 дней не наблюдалось никаких нарушений в системах организма, тогда как при 200 и более мг/кг веса увеличивалось количество маркеров воспаления и появлялись гистопатологические разрушения в печени [13]. При более длительном поступлении в организм сорбата и бензоата Abd-Elhakim Y. с соавторами наблюдали заметное повреждающее действие на печень и почки экспериментальных животных [14].

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Как отдельное, так и сочетанное воздействие консервантов с факторами стресса не оказало влияния на поведение крыс в тестах на доске с отверстиями и в клетке общей активности. Однако показатель набора веса у особей, получавших совместно консерванты и регулярные стрессоры, был более приближен к значению в группе контроля, тогда как в двух оставшихся группах наблюдалось снижение темпа роста массы тела. Это может означать, что консерванты действительно могут в некоторой степени нивелировать последствия стрессового воздействия. Результаты проведенного нами исследования дополняют имеющиеся литературные данные по изучению воздействия стресса и консервантов на организм.

Список литературы

1. Баласаян С. Ю. Сравнительный анализ натуральных и синтетических консервантов в пищевой промышленности / С. Ю. Баласаян // Вестник науки. – 2023. – №12 (69).
2. Колесняк А. А. Некоторые итоги продовольственной стратегии России, Китая и Японии / А. А. Колесняк, Н. М. Полянская // Проблемы дальнего Востока – Москва, 2022. – №5. – С. 62–79
3. Машанов А. И. Основы консервирования пищевых продуктов [Электронный ресурс]: учеб. пособие / А. И. Машанов, В. В. Матюшев, Н. А. Величко [и др.]; Краснояр. гос. аграр. ун-т. – Красноярск, 2019 – 270 с.
4. Stipanuk M. H. Biochemical, physiological, and molecular aspects of human nutrition. / Stipanuk M. H., Caudill M. A. // Elsevier/Saunders. – 2012. – P. 626.
5. Курилов М. В. Консерванты. Бензойная кислота. Накопление в печени экспериментальных животных / М. В. Курилов, Г. Р. Аллаярова, А. С. Фазлыева // Международный научно-практический журнал «Эпоха науки». – 2023. – С. 190.
6. Walczak-Nowicka Ł. J. Sodium Benzoate-Harmfulness and Potential Use in Therapies for Disorders Related to the Nervous System: A Review / Ł. J. Walczak-Nowicka, M. Herbert // Nutrients. – 2022. – Apr 2;14(7). – 1497. doi: 10.3390/nu14071497. PMID: 35406109; PMCID: PMC9003278.
7. Hughes R. N. Neotic Preferences in Laboratory Rodents: Issues, Assessment and Substrates / R. N. Hughes // Neurosci.Biobehav.Rev. – 2007. – 31 – P. 441–464 doi:10.1016/j.neubiorev.2006.11.004.
8. Brown G. R. The Exploratory Behaviour of Rats in the Hole-Board Apparatus: Is Head-Dipping a Valid Measure of Neophilia? / G. R. Brown, C. Nemes // Behav. Process. – 2008 – 78 – P. 442–448. doi: 10.1016/j.beproc.2008.02.019

9. Vobrubová B. Relationship between exploratory activity and adrenocortical activity in the black rat (*Rattus rattus*) / B. Vobrubová, M. Fraňková, I. Štolhoferová [et al.] // *J Exp Zool A Ecol Integr Physiol*. – 2021. – Feb; 335(2). – P. 286–295. doi: 10.1002/jez.2440. Epub 2021 Jan 7. PMID: 33411407.
10. Kuang W. H. IGF-1 defends against chronic-stress induced depression in rat models of chronic unpredictable mild stress through the PI3K/Akt/FoxO3a pathway / W. H. Kuang, Z. Q. Dong, L. T. Tian [et al.] // *Kaohsiung J Med Sci*. – 2018. – Jul;34(7). – P. 370–376. doi: 10.1016/j.kjms.2018.02.004. Epub 2018 Mar 6. PMID: 30063009.
11. Guo F. Exploring the role and mechanism of sodium benzoate in CUMS-induced depression model of rats / F. Guo, Z. Zhang, Y. Liang [et al.] // *Neuro Endocrinol Lett*. – 2020. – Oct;41(4). – P. 205–212. PMID: 33307655.
12. Asejeje F. O. Sodium benzoate induces neurobehavioral deficits and brain oxido-inflammatory stress in male Wistar rats: Ameliorative role of ascorbic acid / F. O. Asejeje, B. O. Ajayi, M. A. Abiola [et al.] // *J Biochem Mol Toxicol*. – 2022. – May;36(5). – e23010. doi: 10.1002/jbt.23010. Epub 2022 Feb 21. PMID: 35187746.
13. Khan I. S. Toxicological impact of sodium benzoate on inflammatory cytokines, oxidative stress and biochemical markers in male Wistar rats / I. S. Khan, K. B. Dar, S. A. Ganie [et al.] // *Drug Chem Toxicol*. – 2022. – May;45(3) – P. 1345–1354. doi: 10.1080/01480545.2020.1825472. Epub 2020 Oct 1. PMID: 33003957.
14. Abd-Elhakim Y. M. Toll-like receptors and nuclear factor kappa B signaling pathway involvement in hepatorenal oxidative damage induced by some food preservatives in rats / Y. M. Abd-Elhakim, A. Behairy, M. M. Hashem [et al.] // *Sci Rep*. – 2023. – Apr 12;13(1) – 5938. doi: 10.1038/s41598-023-32887-9. PMID: 37045926; PMCID: PMC10097866.

INFLUENCE OF CHRONIC STRESS ON THE DEGREE OF TOXICITY OF BENZOIC AND SORBIC ACID

***Gizatullina A. A., Valova Y. V., Kurilov M. V., Khusnutdinova N. Yu., Karimov D. D.,
Smolyankin D. A., Karimov D. O., Muhammadieva G. F.***

*Ufa Research Institute of Occupational Medicine and Human Ecology, Ufa, Russia
E-mail: alinagisa@yandex.ru*

The active use of preservatives, such as sorbates and benzoates, helps preserve the health and taste of food products and increase their shelf life. The question of the effect of these preservatives on the nervous system of the body is especially relevant in high stress environments. Chronic stress depresses the body, which is confirmed by the results of many studies. The purpose of the experiment was to assess the effect of the combined effects of chronic stress and preservatives on the body of rats.

We conducted a study that assessed the effects of chronic stress and preservatives on the body of rats. 40 rats were evenly divided into 4 experimental groups: control group, chronic stress group, preservative group, stress and preservative group. The experiment lasted 1 month. Chronic unpredictable stress was provided by regular exposure to mild stressors, including: social stress, immobilization, exposure to noise, exposure to light at night, food and water deprivation. Behavioral tests were carried out every week: a board with holes, measurement of general motor activity. We also analyzed the animals' body weight.

Spontaneous vertical and horizontal exploratory movements are integral components of rodent behavior. Assessment of exploratory behavior, vertical and horizontal activity did not reveal statistically significant differences between the experimental groups. Both individual and combined exposure to preservatives with stress factors had no effect on the behavior of rats in tests on a board with holes and in a general activity cage. However, the rate of weight gain in individuals who received preservatives and regular stressors together was closer to the value in the control group, while in the two remaining groups a decrease in the rate of body weight growth was observed. This may mean that preservatives may actually offset the effects of stress to some extent. The results of our study complement the existing literature data on the effects of stress and preservatives on the body.

Keywords: chronic stress, experimental animals, board with holes, vertical activity, horizontal activity, preservatives, benzoic acid, sorbic acid.

References

1. Balasanyan S. Yu. [Comparative analysis of natural and synthetic preservatives in the food industry], *Vestnik nauki*. No. 12 (69) (2020) (in Russ.)
2. Kolesnyak A. A., Polyanskaya N. M. [Some results of the food strategy of Russia, China and Japan], *Problemy dal'nego Vostoka*, Moscow, No. 5. (2022) (in Russ.)
3. Mashanov A. I., Matyushev V. V., Velichko N. A. [and others] [Fundamentals of food preservation [Electronic resource]: textbook. Allowance], 270, (*Krasnoyar. gos. agrar. un-t.* Krasnoyarsk, 2019) (in Russ.)
4. Stipanuk M. H., Caudill M. A. Biochemical, physiological, and molecular aspects of human nutrition Elsevie, *Saunders*. (2012)
5. Kurilov M. V., Allayarova G. R., Fazlyeva A. S. [Preservatives. Benzoic acid. Accumulation in the liver of experimental animals], *Mezhdunarodnyj nauchno-prakticheskij zhurnal «Epoha nauki»*, 190 (2023) (in Russ.)
6. Walczak-Nowicka Ł. J, Herbet M. Sodium Benzoate-Harmfulness and Potential Use in Therapies for Disorders Related to the Nervous System: A Review, *Nutrients.*, 2 (7), 14 (2022).
7. Hughes R. N. Neotic Preferences in Laboratory Rodents: Issues, Assessment and Substrates, *Neurosci.Biobehav.Rev.* 31 (2007)
8. Brown G. R., Nemes C. The Exploratory Behavior of Rats in the Hole-Board Apparatus: Is Head-Dipping a Valid Measure of Neophilia? *Behav. Process.* 78 (2008)
9. Vobrubová B., Fraňková M., Štolhoferová I., Kaftanová B., Rudolfová V., Chomik A., Chumová P., Stejskal V., Palme R., Frynta D. Relationship between exploratory activity and adrenocortical activity in the black rat (*Rattus rattus*), *J Exp Zool A Ecol Integr Physiol.* 335 (2), (2019)
10. Kuang W. H., Dong Z. Q., Tian L. T., Li J. IGF-1 defends against chronic-stress induced depression in rat models of chronic unpredictable mild stress through the PI3K/Akt/FoxO3a pathway, *Kaohsiung J Med Sci.* 34 (7), (2018)
11. Guo F., Zhang Z., Liang Y., Yang R., Tan Y. Exploring the role and mechanism of sodium benzoate in CUMS-induced depression model of rats, *Neuro Endocrinol Lett.* 41(4), (2020)
12. Asejeje F. O., Ajayi B. O., Abiola M. A., Samuel O., Asejeje G. I., Ajiboye E. O., Ajayi A. M. Sodium benzoate induces neurobehavioral deficits and brain oxido-inflammatory stress in male Wistar rats: Ameliorative role of ascorbic acid, *J Biochem Mol Toxicol.* 36(5), (2022)
13. Khan I. S., Dar K. B., Ganie S. A., Ali M. N. Toxicological impact of sodium benzoate on inflammatory cytokines, oxidative stress and biochemical markers in male Wistar rats, *Drug Chem Toxicol.* 45(3), (2022)
14. Abd-Elhakim Y. M., Behairy A., Hashem M. MM., Abo-El-Souud K., El-Metwally A. E., Hassan B. A., Ali H. A. Toll-like receptors and nuclear factor kappa B signaling pathway involvement in hepatorenal oxidative damage induced by some food preservatives in rats, *Sci Rep.* 12 (1), 13 (2023)