

ПОКАЗАТЕЛИ АЗОТИСТОГО ОБМЕНА В КРОВИ АЛКОГОЛИЗИРОВАННЫХ КРЫС ПОСЛЕ ВВЕДЕНИЯ ПИНЕАЛОНА И ПОСЛЕДУЮЩЕГО УТОМЛЕНИЯ

Шейхова Р.Г.¹, Саидов М.Б.¹, Лысенко А.В.², Эмирбеков Э.З.¹

¹Дагестанский государственный университет, г. Махачкала, Sharg2006@mail.ru

²Южный федеральный университет, г. Ростов-на-Дону alysenko@sfnu.ru

Исследовано влияние пинеалона на азотистый обмен в крови алкоголизованных крыс на фоне утомления. Все анализы крови сделаны на биохимическом, автоматическом анализаторе «Хитахи - 901», с использованием соответствующих тест наборов. В работе представлены данные показателей азотистого обмена крови при хронической интоксикации организма в эксперименте с использованием алкоголизованных крыс в течение 3-х месяцев, а так же результаты по влиянию ноотропного трипептида пинеалон при различных вариантах исследования. Для выявления стресспротекторных свойств пептида пинеалона, в качестве модели стресса было использовано плавание крыс до предельного утомления. Авторы работы полагают, что пинеалон проявляет своё стресспротекторное действие опосредованно, как ноотропное средство, оказывающее лечебное действие от алкогольной энцефалопатии, что в свою очередь, в определённой степени, сказывается на восстановлении метаболических функций, в частности на синтез белка, и потому на его уровень в крови.

Ключевые слова: алкоголизованные крысы, утомление, стресспротекторные свойства, трипептид пинеалон, азотистый обмен, стресс.

THE INDICATORS NITROGEN METABOLISM IN A BLOOD OF THE ALCOHOLIZED RATS AFTER INJECTION PINEALONA AND SUBSEQUENT FATIGUE

Sheyhova R.G.¹, Saidov M.B.¹, Lysenko A.V.², Emirbekov E.Z.¹

¹Dagestan State University, Makhachkala, Sharg2006@mail.ru

²South Federal University, Rostov-on-Don alysenko@sfnu.ru

The scientific research influence of pinealon on nitrogen metabolism in the blood of alcoholic rats during fatigue. All blood tests done on biochemical, automatic analyzer "Hitachi - 901", with using of appropriate test kits. The paper presents data of indicators of nitrogen metabolism blood in chronic intoxication of organism in the experiment with using alcoholic rats within 3 months, and the results on the nootropic effect of the Tripeptide pinealon in different variants of research. For revealing of stressprotectiv properties of the peptide pinealon, as a model of stress was used swimming rats till limit of fatigue. The authors believe that pinealon shows its stressprotectiv action indirectly, as nootropic product, having a therapeutic effect against alcoholic encephalopathy that in its turn, in a certain extent, affect the recovery metabolic functions, particularly on protein synthesis, and on it level in a blood.

Keywords: alcoholic rats, fatigue, stressprotectiv properties, tripeptide pinealon, nitrogen metabolism, stress.

Сегодня одним из значимых социальных факторов, влияющих на процессы ускоренного старения, является злоупотребление спиртных напитков. Алкоголь является психотропным веществом, оказывающим угнетающее действие на центральную нервную систему и повышающим порог болевой чувствительности [1, 3]. Поэтому, алкоголь использовался и в виде допинга во время олимпийских игр с самого дня основания соревнований в 776 г. до н.э., а в некоторых видах спорта и по сегодняшний день. При алкоголизации тормозится синтез белков [1, 6]. Это происходит вследствие изменений в структуре и функциях рибосом, а также в некоторых процессах биосинтеза белка:

- нарушения активности ферментов аминоксил-тРНК-синтетаз, участвующих в реакциях активирования аминокислот – первичного звена синтеза белков;

- дефицита ионов магния, необходимых для этерификации аминокислот. Уменьшается также синтез РНК и ДНК.

Снижение синтеза белков как ферментных, так и структурных, ведет к угнетению процессов регенерации, самообновления и развитию атрофических процессов в органах, в том числе, в головном мозге [1, 3]. Содержание азотистых соединений в организме при норме находится на относительно постоянном уровне, поэтому значимая роль для диагностики общего гомеостаза при токсическом влиянии алкоголя принадлежит азотистому обмену.

Регуляция азотистого обмена в целом организме направлена на приспособление интенсивности азотистого обмена к изменяющимся условиям окружающей и внутренней среды и осуществляется нервной системой [2, 5, 6].

Сегодня в мире уделяется большое значение поиску ноотропных препаратов, обладающих стресс-протекторным действием. Наибольшее внимание привлекают различные аминокислоты и пептидные биорегуляторы, так как сравнительный анализ проведенных экспериментов позволяет сделать вывод о потенциальной перспективности их в качестве стресс-лимитирующих факторов.

Для изучения их эффективности в зависимости от возраста и генетически детерминированного уровня тревожности конкретного индивида, особенно актуален поиск путей управления поведением организма в экстремальных условиях [2, 7]. И так как в настоящее время серьезная проблема общества и метаболические нарушения, возникающие при этом, способствуют дегенеративным изменениям тканей мозга вследствие нарушения памяти, что указывает на ускоренное старение [4], мы взяли это патологическое состояние в модели для исследования ноотропного геропротектора – пинеалон.

Целью нашей работы явилось исследование влияния трипептида пинеалон на азотистый обмен в крови алкоголизованных крыс при утомлении. Все животные (самцы белых крыс) были разделены на 8 групп по следующей схеме:

1-я – контрольная (интактная); 2-я – не алкоголизованные с плаванием до утомления; 3-я – не алкоголизованные, получившие пинеалон; 4-я – не алкоголизованные, получившие пинеалон до начала плавания; 5-я – контрольная (алкоголизованные); 6-я – алкоголизованные с плаванием до утомления; 7-я – алкоголизованные, получившие пинеалон; 8-я – алкоголизованные, получившие пинеалон до начала плавания. Животные получали пинеалон внутримышечно в дозе 2,5 мкг/кг массы тела в течение 5 дней. Через сутки после последней инъекции крыс принуждали к плаванию до утомления (до отказа) с грузом 8 % от массы тела в воде с температурой 26 °С (такая физическая нагрузка является моделью стрессорного воздействия). Животные алкоголизовались 10 %-ным этиловым

спиртом, в течение 3 месяцев. Через сутки после инъекций и плавания проводилась декапитация.

Все анализы крови получены на биохимическом анализаторе «Хитачи - 901», с использованием соответствующих тест наборов.

Результаты исследования и их обсуждение

Мы исследовали стресс-протекторное влияние пинеалона в течение 5 дней (в дозе 2,5 мкг/кг) на азотистый обмен в крови алкоголизованных крыс. Для животных проведённые инъекции и длительное плавание, приводящие к утомлению, являются стрессом. Оценка этих показателей позволяет составить некоторое представление о метаболическом статусе при хронической алкогольной интоксикации и может служить ориентиром при выборе патогенетической терапии острых состояний в клинике алкоголизма, а также прогностическим критерием.

Из таблицы 1 видно, что относительно 1-ой контрольной группы интактных животных во 2-й группе через сутки после плавания до утомления активность АЛТ и АСТ падает на 18,6 и 15,5 % соответственно, но данная разница в значениях не достоверна. В 3-й группе животных после 5-ти дневных инъекций пинеалоном, активность аминотрансфераз так же варьирует в пределах нормы. Комбинация с применением пинеалона и последующим плаванием в 4-й группе, выражается ещё в большем снижении активности аминотрансфераз; АЛТ на 22,5%, а АСТ на 29%, но при этом Р снова $>0,05$.

Таким образом, можно судить о том, что нагрузка физиологическая до утомления, когда крысы плавают с грузом 8%-м от массы тела и стойко до 2-х минут тонут, никак не отражается через сутки на активности аминотрансфераз крови. Применение пинеалона, на активность АСТ и АЛТ, тоже не влияет, разве, что в 4 группе на эмоциональную сферу, которая проявлялась на поведении животных и в увеличении периода плавания на 9 мин до утомления.

Таблица 1

Показатели азотистого обмена в крови алкоголизованных крыс после введения пинеалона и последующего утомления
($M \pm m$; $n=6$)

	Конт- рольные (интак- ные) крысы	Не алкоголизованные крысы			Алкоголизованные крысы			
		Плава- ние	Пинеа- лон	Пинеалон. + плавание	Контроль	Плава- ние	Пинеа- лон	Пинеалон. + плавание
№ группы	1	2	3	4	5	6	7	8
Общий белок (65-85 г/л)	77±1,33	80,5±1,30 P ₍₁₋₂₎ P>0,05	80,1±2,27 P _{(1-3); (3-7)} P>0,05	76,5±1,74 P ₍₄₋₈₎ P>0,05	69,8±2,36 P ₍₁₋₅₎ P<0,05	64,4±2,73 P _{(1-6);(2-6)} P<0,001	70,31±2,56 P ₍₁₋₇₎ P<0,05	71,92±1,31 P ₍₁₋₈₎ P<0,05
Креатинин в норме у людей (45-100 мкМ/л)	38, 3±1,63	41,4±1,10 P ₍₁₋₂₎ P>0,05	37,9±1,20 P ₍₃₋₇₎ P>0,05	36,6±1,12 P ₍₄₋₈₎ P>0,05	39,2±1,16 P ₍₁₋₅₎ P>0,05	38,1±1,70 P _{(1-6);(2-6)} P>0,05	39,4±2,0 P ₍₁₋₇₎ P>0,05	37,3±1,42 P ₍₁₋₈₎ P>0,05
Мочевина в норме у людей (1,7– 8,3 мМ/л)	6,0±1,8	6,2±0,9 P ₍₁₋₂₎ P>0,05	5,6±1,6 P ₍₁₋₃₎ P>0,05	5,9±1,2 P ₍₁₋₄₎ P>0,05	5,6±1,3 P ₍₁₋₅₎ P>0,05	6,24±1,8 P ₍₁₋₆₎ P>0,05	6,3±0,9 P ₍₁₋₇₎ P>0,05	6,0±0,8 P ₍₁₋₈₎ P>0,05
АЛТ (до 40 Ед./л)	10,55±1,6	8,59±1,9 P ₍₁₋₂₎ P>0,05	9,08±1,3 P ₍₁₋₃₎ P>0,05	8,17±0,4 P ₍₁₋₄₎ P>0,05	10,32±1,9 P ₍₁₋₅₎ P>0,05	10,19±0,6 P ₍₁₋₆₎ P>0,05	10,79±1,3 P ₍₁₋₇₎ P>0,05	9,96±1,4 P ₍₁₋₈₎ P>0,05
АСТ (до 40 Ед./л)	6,53±1,4	5,52±1,0 P ₍₁₋₂₎ P>0,05	6,91±1,2 P ₍₁₋₃₎ P>0,05	4,61±1,2 P ₍₁₋₄₎ P>0,05	7,13±1,8 P ₍₁₋₅₎ P>0,05	6,46±1,2 P ₍₁₋₆₎ P>0,05	7,4±1,5 P ₍₁₋₇₎ P>0,05	5,57±1,0 P ₍₁₋₈₎ P>0,05

Примечание: P-достоверность

Дальнейшие исследования проводились по той же схеме, уже на крысах, которых алкоголизовали в течение 3 месяцев и отразили значения 5, 6, 7 и 8-й групп в таблице 1.

В 5-й группе с алкоголизованными крысами видно, что активность аминотрансфераз соответствует значениям контрольной 1-й группы интактных крыс. Значения других 6, 7-й и 8-й групп животных, также не имеют достоверных отличий, как в самой группе алкоголизованных, так и среди не алкоголизованных животных. Все значения варьируют в пределах нормы. Следует отметить, что в группах с хронической алкогольной интоксикацией коэффициент Де Ритиса снижается, и ориентировочно во всех группах держится на уровне 0,69.

В начальном этапе развития хронической алкогольной интоксикации, по литературным данным [5] преимущественно отмечается сердечный тип отношения АСТ/АЛТ (больше 1); в последующем он сменяется его печеночным вариантом (меньше 1). На языке метаболических сдвигов это означает: в первом случае – усиление катаболизма за счет активации митохондрий, а во втором – усиление анаболизма при активации глюкозо-аланинового шунта. Однако, в состоянии хронической алкогольной интоксикации при анализе характера изменения метаболически взаимосвязанных показателей (общий белок, АСТ, АЛТ,) должны выявляться стойкие и характерные его варианты, которые не просматриваются в случае аминотрансфераз крови крыс в нашем варианте исследований [5,8].

Что касается показателей общего белка, то по результатам, представленным в таблице 1 наглядно видно, что во 2-й, 3-й и 4-й группах крыс, не употреблявших 10% этанол, наблюдается стойкое соответствие показателям 1-й контрольной группы интактных животных. Мы наблюдаем, что через сутки, после однократного утомительного плавания и применения пинеалона в этих группах, содержание общего белка в крови не изменяется, варьируя в пределах $\pm 0,6-4\%$ относительно контроля. В 5-й, 6-й, 7-й и 8-й группах крыс влияние интенсивной, стрессовой нагрузки и пептидного биорегулятора пинеалона на содержание общего белка в крови изучалось на фоне алкоголизованных крыс.

Как видно по результатам таблицы 1, у алкоголизованных крыс отмечаются видимые изменения уровня общего белка, относительно данных контрольной 1-й группы крыс. При этом во всех исследуемых вариантах алкоголизованных крыс наблюдается устойчиво низкий уровень белка относительно соответствующих вариантов неалкоголизованных животных. В 5-й контрольной группе алкоголизованных крыс содержание общего белка достоверно ниже значений интактных животных 1-й группы на 10%, где $P_{(1-5)} < 0,05$. Ещё более выраженное, достоверное снижение белка на 20% ($P < 0,05$) наблюдается в 6 группе животных относительно 2 группы, испытавших стресс при плавании

до утомления. Возможно, для восполнения затраченного резерва энергетического субстрата при плавательной нагрузке использовался процесс глюконеогенеза, который способствовал более интенсивному использованию свободных аминокислот в качестве субстрата. Следовательно, заведомо сниженный уровень пула свободных аминокислот, необходимых для синтеза белка и токсическое, длительное действие этанола на печень, способствуют снижению уровня синтеза белка. Показатели общего белка алкоголизованных животных в 7-й группе после применения пинеалона повысились на 12% относительно 3-й группы не алкоголизованных крыс, но не достоверно ($P_{(3-7)} > 0,05$). При сравнении 1-й и 7-й групп прослеживается достоверное снижение белка на 9%, как и в случае 8-й группы на 10%, ($P_{(1-7), (1-8)} < 0,05$). При сравнении всех полученных результатов алкоголизованных крыс, видно, что на фоне общего снижения белка при применении пинеалона в 7-й группе, и даже при утомительном плавании в 8-й группе, наблюдается тенденция к повышению общего белка, но ещё не достоверное, в среднем на 6%, ($P > 0,05$). О таком влиянии пинеалона на содержание общего белка в 3-й и 4-й группах не алкоголизованных крыс, говорить не приходится, так как его показатели сохраняются в пределах нормы. Поэтому, можно полагать, что применение пинеалона в течение 5 дней (в дозе 2,5 мкг/кг), не оказывает выраженного действия на метаболические процессы белка и аминотрансфераз, вследствие, его недостаточного срока применения, для более эффективного проявления протекторных свойств.

По данным литературы, диагностическую ценность при исследовании азотистого обмена представляют так же содержание мочевины и креатинина в плазме крови. Содержание мочевины в крови позволяет сделать заключение о степени утомления (или хронического утомления), что надо рассматривать как симптом недостаточного восстановления и несбалансированного питания [1]. Содержание же креатинина в крови снижается при заболеваниях мышечной системы, повышается при почечной недостаточности.

Экспериментально полученные результаты креатинина и мочевины в группах, как алкоголизованных, так и не алкоголизованных крыс от контроля достоверно не отличаются. Все значения в вариантах с пинеалоном и утомлением при плавании, так же, варьируют в пределах нормы, где $P > 0,05$. Учитывая то, что и в контрольной, интактной группе животных и в группах с плаванием до утомления содержание мочевины, как и в случае с креатинином, в плазме крови не отличается достоверно от контрольных и нормальных значений, можно полагать, о компенсаторных функциях организма на этих этапах нагрузки.

Соответственно, следует полагать, что данное достоверное изменение, касающееся только показателей белка из метаболитов АО, есть токсическое действие этанола, то есть, прямое угнетающее влияние накопившегося его метаболита ацетальдегида на процессы белкового синтеза в печени. По литературным данным известно, что ацетальдегид, накапливающийся в тканях и являющийся токсическим продуктом, при взаимодействии с белками тканей вызывает изменение их синтеза, конформации, структуры, метаболизма и функций [1].

Судя по литературным данным, применение пинеалона способствует улучшению не только отдельных показателей клеточного и тканевого гомеостаза в клетках головного мозга, но и нормализации функций ЦНС в целом, нарушенных в результате стресса, негативных воздействий неблагоприятных факторов окружающей среды, развития возрастной патологии [3, 6].

Следовательно, профилактическое применение пинеалона целесообразно для спортсменов подвергающихся большим эмоциональным и физическим нагрузкам.

Выводы:

- 1) Вследствие 3-х месячного алкоголирования крыс 10% этанолом отмечается достоверное снижение общего белка плазмы крови относительно контрольных (интактных) животных.
- 2) При внутримышечном введении трипептида пинеалон в течение 5 дней (в дозе 2,5 мкг/кг) наблюдается повышение уровня белка в плазме крови крыс до значений животных принимавших пептид без алкоголизации.
- 3) При внутримышечном введении трипептида пинеалон в течение 5 дней (в дозе 2,5 мкг/кг) во всех исследованных группах крыс не наблюдается изменений в активности аминотрансфераз, в содержании креатинина и мочевины в плазме крови крыс.

Список литературы

1. Афанасьев, В.В. Острая интоксикация этиловым алкоголем. Оперативное руководство / В.В. Афанасьев, Т.Л. Рубитель, А.В. Афанасьев. – СПб: Интермедика, 2002.
2. Ашмарин И.П. Нейропептиды / И.П. Ашмарин, Е.П. Каразеева // Нейрохимия, под ред Ашмарина И.П. – М., 1996. – С. 298-334.
3. Болдырев А.А. Окислительный стресс и мозг // Сорос. образ. журн. – 2001. – Т. 7, № 4. – С. 21-28.
4. Лысенко А.В., Шейхова Р.Г., Назимко В.А., Финоченко Т.А. Теория и практика использования пептидов для улучшения адаптации к неблагоприятным профессиональным

воздействиям. (Монография) Ростов н/Д: Изд-во РГУПС, 2011. - 151 с.

5. Рослый, И.М., Рослый, С.В. Абрамов, М.Г. Водолажская, Ю.А. Шуляк // Вопросы Наркологии. Изд-во: Медицина, Наука, 2005. – №1. – С. 59-67.

6. Рослый, И.М. Биохимия и алкоголизм (III): длительная алкоголизация как механизм развития белковой дистрофии/ И.М. Рослый, С.В. Абрамов, М.Г. Агаронов, В.Р. // Вопросы Наркологии. Изд-во: Медицина, Наука, 2004. – №4. – С. 70-80.

7. Хавинсон В.Х. Пептидные биорегуляторы и старение / В.Х. Хавинсон, В.Н. Анисимов. – СПб.: Наука, 2003. – 223.

8. Шейхова Р.Г., Лысенко Д.С., Митусов В.В. Влияние пинеалона на резервные возможности организма алкоголизированных крыс при плавании // Актуальные проблемы биологии, нанотехнологий и медицины: Материалы VI Международного научно – практической конференции; Южный федеральный университет. – Ростов-на-Дону: Издательство Южного федерального университета, 2015. – С. 295 – 296.

Рецензенты:

Омаров К.З., д.б.н., проф., зав. лаб. экологии животных Прикаспийского института биологических ресурсов ДНЦ РАН, г. Владикавказ;

Габибов М.М., д.б.н., проф. кафедрой зоологии и физиологии Дагестанского университета, г. Владикавказ.