

УДК 612.351.11: 612.396.2: 615.212.7]- 092.9
©Лелевич

МЕХАНИЗМЫ РЕГУЛЯЦИИ АКТИВНОСТИ ФЕРМЕНТОВ ГЛИКОЛИЗА В ПЕЧЕНИ КРЫС ПРИ МОРФИНОВОЙ ИНТОКСИКАЦИИ

С.В. Лелевич

УО “Гродненский государственный медицинский университет”, 230015
Республика Беларусь, Гродно, ул. Горького, 80; тел.: (8-0152)-50-05-34;
факс: (0152) –33-53-41; эл. почта: slelevich@yandex.ru

Изучено влияние острой морфиновой интоксикации на активность ферментов гликолиза в печени. Наиболее существенные изменения выявлены при дозе наркотика 10 мг/кг. Также исследовано действие морфина гидрохлорида *in vitro* в концентрациях 1, 10 и 50 мкг/мл на активность ключевых ферментов гликолиза в печени крыс. Выявлен прямой дозозависимый ингибирующий эффект на активность глюкокиназы. Данные изменения функционального состояния углеводного обмена протекают на фоне гормонального дисбаланса в организме экспериментальных животных.

Ключевые слова: морфин, гликолиз, гексокиназа, глюкокиназа, инсулин, тироксин.

ВВЕДЕНИЕ. Наркотические препараты являются для организма соединениями, не имеющими трофической и энергетической ценности. Все наркотики, в большей или меньшей степени, взаимодействуя с мембранами клеток и клеточных органелл, изменяют их морфофункциональные свойства [1]. Важным элементом в механизме действия наркотиков и патогенезе наркоманий играют опиоидные рецепторы [2]. Взаимодействие опиоидных агонистов с рецепторами изменяет функцию эфферентных клеток за счет влияния на уровень сАМР, функции кальциевых и калиевых каналов. Попадая в организм, наркотическое вещество оказывает влияние на большинство тканей, так как в одних клетках оно связывается со специфическими рецепторами, в других - превращается в более активные метаболиты, в третьих - подвергается действию гормонального фона [3]. Важным типом эффектов наркотических препаратов является их влияние на ключевые звенья метаболизма. В первую очередь, здесь следует отметить изменение под влиянием наркотиков углеводно-энергетического обмена. Причем характер данных эффектов зависит не только от типа наркотического препарата, но и от длительности его воздействия [4]. Опиаты ингибируют окислительное фосфорилирование в митохондриях, что приводит к снижению энергетического потенциала клетки [5]. Кроме установления самого феномена ингибирования опиатами окислительного фосфорилирования, показано также, что этот процесс обусловлен блокированием активности одного из ферментов данной системы – адениннуклеотидтранслоказы [1]. В нескольких работах уже отмечались некоторые эффекты морфина на углеводный обмен. Так, при введении крысам

* - адресат для переписки

гидрохлорида морфина (внутрибрюшинно, 30 мг/кг массы в течение 6 дней) в печени подопытных животных по сравнению с контрольными содержание лактата снижается на 45%, пирувата - на 53%, малата - на 59% и α -кетоглутарата - на 32% [6], что указывает на значительное угнетение гликолиза и окислительных процессов. Этими же авторами выявлено, что после 5-недельного введения морфина в печеночной ткани происходит снижение активности ЛДГ, что приводило к накоплению лактата. Инъекции морфина крысам (1-15 мг/кг массы тела, внутрибрюшинно) сопровождались повышением утилизации глюкозы в базальных ганглиях [7]. В то же время введение морфина животным вызывает через один час в ткани мозга увеличение содержания глюкозы и некоторых интермедиатов начальных стадий гликолиза [1].

Для выяснения механизмов этих отклонений, их регуляторных особенностей, оценки их значимости в суммарной картине патохимических изменений, индуцируемых морфином, необходима дальнейшая конкретизация исследований, изучение ряда сопряженных показателей. Эту задачу мы попытались решить в своих исследованиях.

МЕТОДИКА. Анализ литературных данных, отражающих влияние однократного введения морфина на метаболические процессы у экспериментальных животных [8-10], а также задача выяснения дозозависимых эффектов, позволили остановиться на его дозах 10, 20 и 40 мг/кг массы тела. В исследовании использованы 32 животных, которые были разделены на 4 равные группы. Особи 2-ой группы получали 1% раствор морфина гидрохлорида внутрибрюшинно в дозе 10 мг/кг массы тела, 3-ей группы – 20 мг/кг и 4-ой – 40 мг/кг массы тела. Контрольные животные (1-ая группа) получали эквивалентные количества физиологического раствора хлорида натрия. Декапитацию производили через 1 час после инъекции наркотика, что соответствует периоду его выраженных метаболических эффектов.

По данным литературы, при внутрибрюшинном введении морфина крысам в дозах 10-20 мг/кг его содержание в плазме крови составляет 1-2 мкг/мл [1, 11]. Исходя из этого, в серии опытов *in vitro*, в среде определения активности ферментов были созданы концентрации наркотика 1, 10 и 50 мкг/мл. В этой серии исследований было использовано 7 животных. В гомогенатах печени определяли активность ключевых ферментов гликолиза - гексокиназы (ГК; КФ 2.7.1.1) и глюкокиназы (ГЛК; КФ 2.7.1.2) [12], фосфофруктокиназы (ФФК; КФ 2.7.1.11) [13], пируваткиназы (ПК; КФ 2.7.1.40) [14] и лактатдегидрогеназы (ЛДГ; КФ 1.1.1.27) [15]. В сыворотке крови при помощи радиоиммунологического метода определяли уровень инсулина, тироксина, трийодтиронина и тироксинсвязывающего глобулина (ТСГ) с использованием стандартных наборов Института биоорганической химии НАН Беларуси.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ. Назначение морфина гидрохлорида в дозе 10 мг/кг массы тела приводит к активации ключевых ферментов гликолиза в печени – ГК, ГЛК и ФФК (табл. 1). При этом отмечено изменение уровня исследуемых гормонов в сыворотке крови. Содержание тироксина резко возрастает, увеличиваясь в 2,6 раза в сравнении с контролем (табл. 2). Это согласуется с данными других авторов о стимуляции секреции гормонов щитовидной железы при однократном введении морфина, о чем свидетельствовало наличие зон резорбции во многих фолликулах, обилие секреторных гранул в апикальной части тироцитов, увеличение цистерн гранулярного эндоплазматического ретикулума [16]. Характерно, что гипертироксинемия у животных 2-ой группы наблюдается на фоне пониженного содержания ТСГ в сыворотке крови (табл. 2). Уменьшение уровня ТСГ может являться следствием ингибирующего влияния морфина на биосинтез белка [4], что подтверждается потенцированием данного эффекта при увеличении дозы вводимого наркотика. Морфин в дозе 10 мг/кг не изменяет активность ПК, повышая скорость лактатдегидрогеназной реакции (табл. 1).

Таблица 1. Активность ферментов гликолиза (нмоль/мг белка/мин) в печени крыс *in vivo* при однократном введении различных доз морфина гидрохлорида.

ФЕРМЕНТ	Экспериментальные группы			
	1 группа контроль	2 группа 10мг/кг	3 группа 20 мг/кг	4 группа 40 мг/кг
ГК	2,77±0,19	4,30±0,45*	3,13±0,35	3,06±0,30°
ГЛК	6,63±0,71	9,01±0,82*	5,31±0,61°	7,98±0,80 ^Δ
ФФК	9,14±0,59	12,02±0,80*	9,77±0,90	9,65±1,40
ПК	71,75±7,54	84,62±7,81	96,75±6,08*	92,80±8,77
ЛДГ	164,5±6,25	234,2±10,4*	228,8±8,84*	231,6±23,7*

Примечание: * - статистически значимые различия с 1-ой группой, $p < 0,05$;
 ° - статистически значимые различия со 2-ой группой, $p < 0,05$;
^Δ - статистически значимые различия с 3-ей группой, $p < 0,05$.

Таблица 2. Содержание гормонов и ТСГ в сыворотке крови крыс при однократном введении различных доз морфина гидрохлорида.

ПОКАЗАТЕЛЬ	Экспериментальные группы			
	1 группа контроль	2 группа 10мг/кг	3 группа 20 мг/кг	4 группа 40 мг/кг
Инсулин (пмоль/л)	44,7±7,32	43,5±6,90	32,0±6,28	21,3±3,72*°
Тироксин (ммоль/л)	134,1±13,0	353,2±40,6*	392,4±50,7*	273,5±40,5*
Трийодтиронин (нмоль/л)	1,12±0,26	1,20±0,16	1,54±0,20	2,06±0,17*
ТСГ (мкг/мл)	19,0±2,30	10,1±1,45*	6,8±0,65*	6,2±0,84*°

Примечание: * - статистически значимые различия с 1-ой группой, $p < 0,05$;
 ° - статистически значимые различия со 2-ой группой, $p < 0,05$.

При введении морфина в дозе 20 мг/кг активность ферментов начальных реакций гликолиза – ГК, ГЛК и ФФК не отличается от уровня контрольных животных (табл. 1). Активность ферментов конечных стадий гликолиза – ПК и ЛДГ при этом увеличивается. В то же время введение морфина в дозе 20 мг/кг, как и в случае меньшей дозы, сопровождается существенными изменениями функционального статуса щитовидной железы (табл. 2). Содержание тироксина в сыворотке крови повышается в 2,93 раза, а уровень ТСГ снижается на 64% ($p < 0,001$).

Введение морфина в дозе 40 мг/кг не изменяет активность большинства изученных ферментов гликолиза (табл. 1). Повышенной при этом остается только активность ЛДГ, что говорит об интенсификации анаэробных процессов при острой морфиновой интоксикации. Активность ГК при введении морфина в дозе 40 мг/кг понижена по сравнению с животными 2-ой группы, а скорость ГЛК статистически значимо повышена в сравнении с 3-ей экспериментальной группой. Данные изменения регистрируются на фоне значительного (на 52%) понижения содержания инсулина в сравнении с контрольной группой. Уровень тироксина и трийодтиронина при назначении большой дозы морфина превышают контрольный уровень, а содержание ТСГ наоборот понижено (табл. 2).

Таким образом, морфин при однократном назначении оказывает влияние на состояние гликолиза в печени. Наибольший эффект проявляется при дозе 10 мг/кг и заключается в активации большинства изученных ферментов данного метаболического пути. Схожие изменения наблюдаются при введении аналогичной дозы морфина в отношении метаболизма нейроактивных аминокислот в коре больших полушарий головного мозга [8]. Это может быть связано с превалированием при острой морфиновой интоксикации процессов возбуждения и формированием эйфорического состояния. Увеличение дозы морфина до 20 и 40 мг/кг не изменяет активность ключевых ферментов гликолиза. Одним из механизмов, возможно, участвующих в активации ферментов гликолиза (ФФК и ПК) при назначении морфина в дозе 10 мг/кг, является торможение наркотиком окислительного фосфорилирования и уменьшение уровня АТФ [5]. Однако, исходя из данных об активности ферментов гликолиза, данный эффект не проявляется при увеличении дозы вводимого морфина. Кроме того, важным регулятором активности ключевых ферментов гликолиза является фруктозо-2,6-бисфосфат [17]. Вместе с тем, сведений об изменении уровня этого метаболита при острой морфиновой интоксикации в доступной литературе не обнаружено.

Определенный вклад в формирование вышеперечисленных метаболических изменений вносит гормональный дисбаланс, индуцируемый морфином. Гормональный фон щитовидной и поджелудочной железы, несомненно, оказывает влияние на функционирование гликолиза в печени. Так, при инсулиновой недостаточности, вызванной голоданием или аллоксановым диабетом, наблюдается снижение активности ГК и ГЛК в печени [18, 19]. Имеются данные об участии инсулина в активации ФФК в печени [20]. Показано, что введение гормона приводит через 5-10 минут к резкому подавлению продукции глюкозы в печени. Увеличение содержания в печени фруктозо-2,6-бисфосфата в этих условиях связано с активацией ФФК. На функциональную активность ГК оказывают регулирующее действие гормоны щитовидной железы, в частности, тироксин. Рядом исследователей показано, что у крыс при гипертрофии миокарда, индуцированной тироксином, повышается интенсивность гликолиза, о чём свидетельствует значительное повышение активности ГК [1]. Влияние голодания на активность ГЛК зависит от функционального состояния щитовидной железы [21]. Нагрузка глюкозой индуцирует фермент у интактных и гипертиреоидных крыс, не изменяя его активности у гипотиреоидных животных. Снижение активности ФФК в печени крыс наблюдается при гипотиреозе, индуцируемом недостатком йода в корме, и частично восстанавливается после 3-дневного курса введения трийодтиронина. Изменения активности фермента сопровождаются такими же изменениями его количества в ткани [22].

Эти данные свидетельствуют о значительном влиянии гормонов щитовидной и поджелудочной железы на состояние гликолиза в печени в норме и при различных патологических состояниях организма. В тоже время, информации о состоянии гормонального фона щитовидной и поджелудочной железы при введении экспериментальным животным морфина ранее не было.

Нами выявлено, что минимальная доза наркотика (10 мг/кг) повышает в крови уровень тироксина, тогда как содержание инсулина не изменяется (табл. 2). Это нарушает нативные межгормональные взаимоотношения, что интегрально проявляется в конкретных регуляторных эффектах на определенные метаболические пути или отдельные ферменты. При увеличении дозы вводимого наркотика до 20 мг/кг и 40 мг/кг, выраженность гормональных нарушений в поджелудочной и щитовидной железе возрастает. Однако это не ассоциируется с нормализацией активности ключевых ферментов гликолиза в печени в данных условиях. Следовательно, при действии высоких доз морфина в печени функционируют другие механизмы регуляции ферментов гликолиза, которые превалируют над гормональными. Отмечают [23], что при многих экспериментальных условиях сАМР, а не инсулин является основным регулятором активности ГЛК в печени крыс. Важную роль при этом играют и глюкокортикоиды.

Для расшифровки этих механизмов нами были выполнены эксперименты *in vitro* с созданием в гомогенатах различных концентраций морфина гидрохлорида. Из всех определяемых ферментов гликолиза прямой эффект морфина проявлялся только в отношении ГЛК. Ее активность при концентрации наркотика 1 мкг/мл составляла 112% от исходной ($p < 0,5$), при концентрации 10 мг/мл – 89% ($p < 0,1$), а при концентрации 50 мг/мл – 64% ($p < 0,05$). То есть для ГЛК проявляется прямой дозозависимый ингибирующий эффект морфина. Однако эти результаты не согласуются с данными, полученными *in vivo* (табл. 1). Активности ГК, ФФК, ПК и ЛДГ не изменялись при моделировании с различными концентрациями морфина в условиях *in vitro*.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ И ВЫВОДЫ. Исходя из вышеизложенного, можно сделать, по крайней мере, два вывода. Во-первых, изменение функционирования гликолиза в печени при острой морфиновой интоксикации не является следствием прямых эффектов наркотика на ферменты данного метаболического пути. Во-вторых, учитывая изменения гормонального фона щитовидной и поджелудочной железы при однократном введении морфина, механизмы регуляции гликолиза в данных условиях в меньшей степени включают эндокринную компоненту и возможно связаны с продуктами биотрансформации наркотика в организме.

ЛИТЕРАТУРА

1. Майский А.И., Ведерникова Н.Н., Чистяков В.В. (1982) Биологические аспекты наркоманий, Медицина, М.
2. Панченко Л.Ф., Теребилина Н.Н., Гуревич К.Г. (2002) Нейрохимия, **19**(1), 26-32.
3. Пирожков С.В., Панченко Л.Ф. (1991) Вопр. мед. химии, **37**, 2-10.
4. Лелевич В.В., Селевич М.И., Панченко Л.Ф., Виницкая А.Г. (1999) Вопр. мед. химии, **45**, 357-367.
5. Гегенава Г.П., Чистаков В.В. (1975) Бюлл. exper. биол. мед., №10, 77-79.
6. Гулый М.Ф., Синицкий Н.А., Стогний В.В. (1992) Вопр. мед. химии, **38**, 48-50.
7. Beck T., Wenzel J., Kuschinsky K. (1989) Brain Res., **497**, 205-213.
8. Курбат М.Н., Лелевич В.В. (2002) Экспер. клин. фармакол., **65**(5), 27-28.
9. Devane C., Simpkins J., Boulton D. (1999) J. Pharm. Pharmac., **51**, 1283-1287.
10. Koide H., Oda T. (1959) Clin. Chim. Acta., **4**, 554-561.
11. Чобанов Н.Г., Воронина Т.А., Бойко С.С. (1995) Бюлл. exper. биол. мед., **119**, 273-275.
12. Salas M., Vinuela E., Sols A. (1963) J. Biol. Chem., **238**, 3535-3538.

ФЕРМЕНТЫ ГЛИКОЛИЗА ПРИ МОРФИНОВОЙ ИНТОКСИКАЦИИ

13. *Undervud A., Newsholme E.* (1965) *Biochem. J.*, **95**, 868-875.
14. *Bergmeyer H.* (1962) *Methoden der enzymatischen analyse*, Weinheim, pp. 253-259.
15. *Прохорова Ж.И.* (1982) Методы биохимических исследований, Медицина, Л.
16. *Bakalska M., Denkova R., Nikitov B.* (1994) *Tes. Bulg. Sci.*, **47**, 109-112.
17. *Niemeyer H., Rabajille E.* (1988) *Arch. Biochem. Biophys.*, **265**, 91-93.
18. *Кульдема Л.А.* (1979) *Вопр. мед. химии*, **24**, 36-41.
19. *Pilkis S.* (1970) *Biochim. Biophys. Acta*, **215**, 461-476.
20. *Assimacopoulos-Jeannet F., Jeanrenaud B.* (1990) *J. Biol. Chem.*, **265**, 7202-7206.
21. *Sibrowski W., Muler M., Seitz H.* (1991) *Biochem. Soc. Trans.*, **9**, 202.
22. *Wall S., Hove M., Crepin K., Hue L.* (1989) *FEBS Lett.*, **257**, 211-214.
23. *Seitz H. J., Luth W., Tarnowski W.* (1979) *Arch. Biochem. Biophys.*, **195**, 385-391.

Поступила: 03. 04. 2006.

MECHANISMS OF REGULATION OF GLYCOLYTIC ENZYMES IN RAT LIVER UNDER MORPHINE INTOXICATION

S.V. Lelevich

Grodno State Medical University, Gorkogo ul., 80, Grodno, 230015 Belarus; tel.: (8-0152)-50-05-34;
fax: (0152)-33-53-41; e-mail: slelevich@yandex.ru

The influence of acute morphine intoxication on glycolytic enzymes in liver has been investigated. The most significant changes were found under the action of the drug in the dose of 10 mg/kg. We also studied *in vitro* action of morphine in the concentrations 1, 10 and 50 µg/ml on the key glycolytic enzymes activities in rat liver. The direct dose-dependent inhibition of the glycokinase activity was shown. The changes in functional state of carbohydrate metabolism accompany hormonal imbalance in the animal bodies.

Key words: morphine, glycolysis, hexokinase, glycokinase, insuline, thyroxine.