

УДК 612.396.22: 591.175/436: 616.89-008

©Лелевич, Бородинский

ОСОБЕННОСТИ ГЛИКОЛИЗА В ПЕЧЕНИ И СКЕЛЕТНОЙ МУСКУЛАТУРЕ КРЫС ПРИ ОСТРОЙ АЛКОГОЛЬНОЙ ИНТОКСИКАЦИИ

С.В. Лелевич^{1}, А.Н. Бородинский²*

¹Гродненский государственный медицинский университет, 230009 Республика Беларусь, г. Гродно, ул. Горького, 80, тел.: (0152) 50-05-57; факс: (0152) 43-53-41; эл. почта: slelevich@yandex.ru

²Институт фармакологии и биохимии НАН Беларуси

Изучено функциональное состояние гликолиза в печени и мышечной ткани крыс при острой алкогольной интоксикации. Выявлено, что при введении 1 г/кг этанола отмечается ингибирование активности ферментов гликолиза и понижение уровня некоторых субстратов данного метаболического пути в печени. В скелетной мускулатуре в данных экспериментальных условиях наблюдается увеличение активности ЛДГ. Алкогольная интоксикация средней степени тяжести (2,5 г/кг) активизирует процесс распада гликогена и повышает уровень глюкозы в печени. В мышечной ткани экспериментальных животных при этом отмечается ингибирование активности ФФК и снижение уровня Г-6-Ф. При введении 5 г/кг алкоголя отмечается ингибирование лимитирующих ферментов в печени и скелетной мускулатуре.

Ключевые слова: глюкоза, алкоголь, гексокиназа, лактат, инсулин.

ВВЕДЕНИЕ. Эффекты этанола на метаболические процессы организма, в частности, на углеводный обмен активно изучаются с использованием различных экспериментальных моделей, на многих видах животных, при введении различных доз алкоголя. При этом отмечается много противоречий в полученных данных, обусловленных, в первую очередь, различной длительностью периода голодания перед введением алкоголя и его дозой [1]. Острая алкогольная интоксикация приводит к накоплению восстановительных эквивалентов в ткани печени, что проявляется в увеличении стационарной концентрации NADH [2]. Однократное введение этанола (2,5 г/кг) снижает уровень инсулина в сыворотке крови крыс. Предполагают, что это реализуется посредством угнетения функций β -клеток поджелудочной железы [3]. Функция α -клеток стимулируется только введением больших доз (7,5 г/кг) алкоголя. Назначение этанола на фоне голодания также понижает содержание инсулина в крови экспериментальных животных [3], что, как предполагают авторы, является следствием падения уровня гликемии. Однократное введение алкоголя (4-7,5 г/кг) понижает через 2 часа концентрацию гликогена в печени крыс [4]. Гликогенолитический эффект этанола усиливается

* - адресат для переписки

при увеличении длительности его введения и практически не изменяется при возрастании дозы алкоголя более 7,5 г/кг. В отношении влияния этанола на функциональное состояние гликолиза в печени крыс имеются противоречивые данные. Острая алкогольная интоксикация приводит у некормленных особей к снижению активности некоторых ферментов гликолиза [5]. В то же время, на фоне 48-часового голодания этанол повышает активность фосфофруктокиназы и пируваткиназы, не изменяет содержание лактата в печени, но повышает отношение лактат/пируват [5].

Поражения скелетной мускулатуры отмечаются в 40-60% случаев алкогольной интоксикации [6]. При этом может теряться до 20% массы мышечной ткани, причиной которой является нарушение синтеза мышечных белков. Данный процесс сопровождается развитием острой алкогольной миопатии (алкогольного рабдомиолиза). Клинически это проявляется болезненной отечностью мышечной ткани, миоглобинурией, ростом активности сывороточной креатинфосфокиназы, некрозом и острой почечной недостаточностью [7]. Чаще всего поражаются мышцы ног, однако, возможны и более распространенные поражения. В частности, патологический процесс может затрагивать диафрагму, мышцы глотки, грудную мускулатуру. Клинические симптомы острой алкогольной миопатии исчезают при прекращении приема спиртных напитков [8].

Экспериментальных работ по изучению состояния метаболизма глюкозы в мышечной ткани при действии этанола мало. Выявлены метаболические нарушения в скелетной мышце крыс при введении малых доз (1 г/кг) этанола [6]. Это проявлялось снижением уровня гликогена, мелкокапельной жировой инфильтрацией, усилением активности ферментов анаэробного гликолиза, дистрофическими изменениями миоцитов. Острая алкогольная интоксикация на фоне голодания сопровождается более выраженными дистрофическими и некротическими изменениями в миоцитах, уменьшением содержания липидов и гликогена. Нарушения накопления гликогена в скелетной мускулатуре крыс выявлены и в ряде других экспериментов [4]. Авторы считают это одним из патогенетических аспектов развития алкогольной миопатии. Однократное внутривенное введение этанола (2,2 мл/час в течение 30 мин) экспериментальным животным сопровождалось увеличением отношения лактат/ пируват в печени и мышечной ткани, а также увеличением уровня АМР в обеих тканях [2]. Однако для формирования целостного представления об особенностях тканевых нарушений метаболизма глюкозы при острой алкогольной интоксикации вышеперечисленных данных явно недостаточно.

Целью данного исследования явилось изучение функционального состояния гликолиза в печени и скелетной мускулатуре крыс, а также ряда регуляторных показателей в сыворотке крови экспериментальных животных при острой алкогольной интоксикации.

МЕТОДИКА. В эксперименте использовано 29 белых беспородных крыс самцов массой 180-220 г. Анализ литературных данных, отражающих влияние однократного введения алкоголя на обмен углеводов [9, 10], позволил остановиться на дозах 1, 2,5 и 5 г этанола на кг массы тела. Перед декапитацией все животные 12 часов содержались без пищи при свободном доступе к воде. Особям первой экспериментальной группы (контроль, 7 животных) внутрибрюшинно вводили 1 мл физиологического раствора NaCl, второй (7 животных) – 10% раствор этанола в дозе 1 г/кг, третьей (7 животных) – 25% раствор этанола в дозе 2,5 г/кг и четвертой (8 животных) – 25% раствор этанола в количестве 5 г/кг массы тела. Декапитацию проводили через 1 час после инъекций. В гомогенатах печени и мышц (внутренней поверхности бедра) определяли активность ферментов гликолиза – гексокиназы (ГК) и глюкокиназы (ГЛК) [11], фосфофруктокиназы (ФФК) [12], пируваткиназы (ПК) [13] и лактатдегидрогеназы (ЛДГ) [14]. Содержание субстратов – глюкозы [15], глюкозо-6-фосфата (Г-6-Ф) [16], пирувата [14], лактата [17] и гликогена [15] – определяли в гомогенатах, для приготовления

которых использовали ткани, замороженные в жидком азоте. Уровень гликемии определяли с использованием глюкозооксидазного метода стандартными наборами реактивов, а концентрацию инсулина в сыворотке, применяя стандартные наборы реактивов Института биоорганической химии НАН Беларуси для радиоиммунологического определения.

Полученные данные выражали в виде Ме (медиана) и рассеяния (25 и 75 процентилей). Статистическую обработку данных выполняли с применением методов непараметрической статистики, используя критерий Манна-Уитни. При этом использовался пакет статистических программ STATISTICA 7.0.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ. При введении этанола в дозе 1 г/кг массы тела (2-ая группа) наблюдается снижение активности ферментов начальных реакций гликолиза в печени. Активность ГК снижается при этом на 29 ($p < 0,02$), а ГЛК – на 34% ($p < 0,001$) по сравнению с контрольными значениями (табл. 1). Это, возможно, обусловлено снижением выработки инсулина поджелудочной железой, выявленное при введении алкоголя в аналогичной дозе [3]. У животных 2-ой группы снижена активность ПК, тогда как активность ФФК и ЛДГ не отличается от контрольной группы. С пониженной активностью вышеперечисленных ферментов гликолиза согласуется уменьшение уровня субстратов данного метаболического пути (рис.). Во второй экспериментальной группе понижается содержание Г-6-Ф, пирувата и лактата. Содержание глюкозы в печени при этом не изменяется, что согласуется со стабильным уровнем гликогена (рис.). В скелетной мускулатуре, в отличие от печени, не выявлено таких существенных сдвигов в функционировании гликолиза при введении 1 г/кг этанола. У животных 2-ой группы отмечается только увеличение активности ЛДГ по сравнению с контролем. Различия в эффектах малой дозы алкоголя на гликолиз в печени и мышечной ткани объясняется, вероятно, особенностями его метаболизма в организме и как следствие этого – первостепенное поражение ткани печени. С неизменной активностью большинства ферментов гликолиза у особей 2-ой группы согласуется стабильный уровень субстратов углеводного обмена в мышечной ткани (табл. 2). Уровень гликемии у крыс при введении 1 г/кг этанола не отличается от контрольной группы.

Таблица 1. Активность ферментов гликолиза в печени (нмоль/мг/мин), уровень глюкозы и инсулина в крови при острой алкогольной интоксикации.

ПАРАМЕТР	Экспериментальные группы			
	1-ая группа контроль	1-ая группа 1 г/кг	3-ья группа 2,5 г/кг	4-ая группа 5 г/кг
ГК	3,14 (2,58; 3,58)	2,11 (1,99; 2,58)*	2,41 (1,87; 2,69)*	2,18 (1,29; 2,78)*
ГЛК	10,08 (8,54; 10,15)	6,35 (5,36; 7,22)*	8,11 (7,22; 8,96)	6,55 (5,11; 7,06)*
ФФК	8,25 (7,58; 9,21)	8,27 (7,88; 9,88)	5,90 (5,25; 6,23)*	5,84 (5,03; 6,12)*
ПК	65,21 (56,23; 69,61)	51,02 (48,25; 52,25)*	58,14 (52,18; 64,18)	42,13 (38,98; 46,94)*
ЛДГ	158,31 (144,03; 166,14)	187,59 (166,33; 193,14)	222,06 (219,01; 238,16)*	246,91 (230,67; 259,10)*
Гликемия (ммоль/л)	5,42 (4,25; 6,03)	5,14 (4,98; 6,03)	7,44 (6,96; 7,84)*	7,27 (6,93; 7,78)*
Инсулин (пмоль/л)	154,6 (148,6; 174,1)	98,4 (91,6; 102,3)*	109,3 (100,1; 111,6)*	107,9 (104,3; 114,2)*

Примечание. Здесь и в таблицах 2,3 данные выражены в виде Ме и рассеяния (25 и 75 %);

*- статистически значимые различия с контролем ($p < 0,05$).



Рисунок.

Содержание субстратов углеводного обмена в печени крыс при острой алкогольной интоксикации. 100%- контроль *- статистически значимые различия с контролем ($p < 0,05$).

Таблица 2. Содержание субстратов гликолиза в скелетной мускулатуре крыс при острой алкогольной интоксикации (мкмоль/г).

СУБСТРАТ	Экспериментальные группы			
	1-ая группа контроль	2-ая группа 1 г/кг	3-ья группа 2,5 г/кг	4-ая группа 5 г/кг
Глюкоза	5,61 (4,98; 6,44)	5,49 (4,96; 6,04)	5,96 (5,23; 6,49)	7,98 (7,18; 8,23)*
Г-6-Ф	0,83 (0,61; 0,91)	0,87 (0,71; 0,96)	0,48 (0,39; 0,56)*	0,47 (0,38; 0,66)*
Пируват	0,26 (0,11; 0,48)	0,31 (0,18; 0,41)	0,27 (0,18; 0,4)	0,4 (0,28; 0,46)
Лактат	7,63 (6,87; 8,44)	7,92 (7,44; 8,53)	7,84 (7,12; 8,99)	9,61 (8,46; 11,35)*
Гликоген	31,52 (28,07; 36,25)	31,16 (24,02; 38,61)	18,06 (15,22; 24,12)*	17,18 (13,15; 20,57)*

Введение этанола в средней дозе (2,5 г/кг) несколько меняет функциональное состояние гликолиза в печени в сравнении с предыдущей экспериментальной группой. Активность ГК понижена в сравнении со значениями контрольной группы, тогда как активность ГЛК нормализуется (табл. 1). Вероятно, это обусловлено снижением концентрации инсулина в сыворотке крови, которое отмечается при умеренной алкогольной интоксикации и согласуется с имеющимися литературными

данными [3]. Активность лимитирующего фермента гликолиза – ФФК - у особей 3-ей группы снижена, а ПК – не отличается от контрольной группы (табл. 1). Выявленное повышение активности ЛДГ в данных экспериментальных условиях указывает на преобладание анаэробных процессов в ткани печени, которые проявляются при увеличении степени алкогольной интоксикации. Содержание глюкозы в печени при назначении этанола в дозе 2,5 г/кг повышается, что может быть обусловлено понижением здесь уровня гликогена (рис.). Увеличение концентрации глюкозы в печеночной ткани при введении средней дозы этанола возможно связано с развитием у животных гипергликемии (табл. 1). Непосредственное повышение содержания глюкозы в крови после употребления этанола обусловлено увеличением секреции адреналина и усилением гликогенолиза [18], а также гипоинсулинемией у животных 3-ей группы. Хорошо известна высокая проницаемость мембран гепатоцитов для глюкозы, вследствие чего внутриклеточная концентрация глюкозы в печени обычно очень близка к ее концентрации во внеклеточном пространстве [19]. Концентрация других метаболитов гликолиза – Г-6-Ф, пирувата и лактата в печени, при этом не отличается от значений контрольной группы (рис.). Увеличение дозы вводимого алкоголя до 2,5 г/кг приводит к более существенным изменениям функционирования гликолиза в мышечной ткани крыс, чем меньшая доза этанола. Выявлено снижение активности одного из ключевых ферментов гликолиза – ФФК (на 20%), а также потенцирование стимулирующего эффекта алкоголя в отношении ЛДГ. Ингибирование активности ФФК в данных экспериментальных условиях представляется одним из наиболее существенных метаболических эффектов этанола на гликолиз в скелетной мускулатуре крыс. Это объясняется ключевой ролью этого фермента в регуляции данного пути метаболизма глюкозы в мышцах [19]. Одним из возможных объяснений ингибирования активности ФФК может являться снижение уровня Г-6-Ф в мышечной ткани животных 3-ей группы. Вероятно, падение его концентрации приводит к уменьшению уровня фруктозо-6-фосфата – основного субстрата фосфофруктокиназной реакции. Еще одним механизмом ингибирования гликолиза при введении 2,5 г/кг этанола может являться гипоинсулинемия (табл. 1). Предполагается, что действие инсулина на поглощение глюкозы в мышечной ткани обусловлено активацией процесса мембранного транспорта, который ингибируется алкоголем. Со снижением уровня инсулина в сыворотке животных 3-ей группы согласуется увеличение уровня гликемии, а также снижение концентрации гликогена в мышцах (табл. 2). Понижение уровня последнего, вероятно, объясняется ингибированием эффекта инсулина на активность гликогенсинтазы мышечной ткани при введении этанола [20]. Содержание других субстратов гликолиза – глюкозы, пирувата и лактата не менялось в мышечной ткани при введении 2,5 г/кг алкоголя (табл. 2).

Таблица 3. Активность ферментов гликолиза в скелетной мускулатуре крыс при острой алкогольной интоксикации (нмоль/мг/мин).

ФЕРМЕНТ	Экспериментальные группы			
	1-ая группа контроль	2-ая группа 1 г/кг	3-ья группа 2,5 г/кг	4-ая группа 5 г/кг
ГК	28,09 (20,8; 36,7)	30,8 (20,7; 37,2)	18,3 (16,7; 25,6)	15,6 (14,4; 19,4)*
ФФК	96,3 (88,2; 106,3)	97,3 (84,6; 100,1)	78,1 (66,4; 93,2)*	66,4 (60,1; 71,1)*
ПК	699,3 (549,6; 769,1)	700,5 (621,6; 769,1)	681,1 (601,8; 781,4)	493,6 (434,8; 556,0)*
ЛДГ	426,7 (404,6; 463,8)	591,6 (576,0; 648,1)*	650,2 (603,6; 690,2)*	708,2 (681,8; 711,8)*

Введение этанола в высокой токсической дозе (5 г/кг) приводит к ингибированию активности всех определяемых лимитирующих ферментов гликолиза в печени (табл. 1). Причем степень ингибирования выражена в большей степени, чем при назначении более низких доз алкоголя. По сравнению с контрольными животными у особей 4-ой группы активность ГК снижена на 35 ($p<0,001$), ГЛК – на 37 ($p<0,001$), ФФК – на 28 ($p<0,02$) и ПК – на 32% ($p<0,01$), что свидетельствует о снижении поточной скорости гликолиза. В тоже время статистически значимо повышается активность ЛДГ и содержание лактата, что указывает на активизацию анаэробных процессов в печени при нарастании степени алкогольной интоксикации. Подтверждением этому служит резкое повышение отношения лактат/пируват при выраженной алкогольной интоксикации в сравнении с контрольными животными (30,8 и 11,1 соответственно). Со снижением активности ключевых ферментов гликолиза у особей 4-ой группы согласуется понижение у них уровня Г-6-Ф и пирувата (рис.). Снижение содержания пирувата в данных экспериментальных условиях имеет важное значение в опосредовании еще одного эффекта тяжелой алкогольной интоксикации – ингибировании глюконеогенеза. Полагают, что это осуществляется через снижение скорости пируваткарбоксилазной реакции данного метаболического пути [21]. Возрастание же концентрации глюкозы в печени в данных условиях может, в определенной степени, быть обусловлено гликогенолитическим эффектом этанола, на что указывает понижение уровня данного полисахарида (рис.). Активация гликогенолиза в присутствии этанола реализуется через механизм стимуляции эндокринной деятельности надпочечников, выброса адреналина и активации ферментов катаболизма гликогена [22]. Введение этанола в максимальной дозе (5 г/кг) сопровождается наиболее существенными изменениями функционального состояния гликолиза и в мышечной ткани. У животных 4-ой группы выявлено снижение активности большинства изученных ферментов гликолиза: ГК (на 44%), ФФК (на 31%) и ПК (на 30%). Активность ЛДГ в данных экспериментальных условиях увеличена, причем степень повышения наиболее выражена по сравнению с предыдущими группами (табл. 3). С увеличением активности ЛДГ согласуется повышение уровня лактата в скелетной мускулатуре животных 4-ой группы (табл. 2). При введении 5 г/кг алкоголя отмечается увеличение концентрации глюкозы в мышечной ткани, что может быть связано с развитием гипергликемии в данных экспериментальных условиях. Содержание Г-6-Ф и гликогена при этом ниже контрольного уровня (табл. 2). Сходные метаболические нарушения в скелетной мускулатуре крыс при экспериментировании с аналогичными дозами алкоголя выявили и другие авторы [4]. Необходимо отметить схожесть метаболических эффектов токсической дозы алкоголя на большинство ферментов и субстратов углеводного обмена в печени и скелетной мускулатуре крыс. Выявленные нарушения функционального состояния гликолиза в мышечной ткани, вероятно, являются следствием метаболических изменений в печени. По литературным данным, в патогенезе алкогольной миопатии наиболее важную роль играют следующие факторы: алкоголь как таковой, алкогольная нейропатия, гормональные нарушения, а также нарушение функции печени [23]. Употребление этанола изменяет стабильность мРНК сократительных белков, способствуя развитию алкогольной скелетной миопатии. Атрофия скелетной мускулатуры отчасти объясняется сдвигами метаболизма в печени при введении этанола.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ. Таким образом, степень нарушений функционирования гликолиза в печени и мышечной ткани при острой алкогольной интоксикации определяется дозой вводимого этанола. При введении небольшой дозы алкоголя (1 г/кг) отмечается ингибирование отдельных ферментов гликолиза и понижение уровня некоторых субстратов данного метаболического пути в печени. При этом еще не проявляется гликогенолитический эффект и анаэробный сдвиг метаболизма глюкозы. В скелетной мускулатуре в данных экспериментальных условиях наблюдается только увеличение активности ЛДГ. Алкогольная интоксикация

средней степени (2,5 г/кг), не потенцируя дальнейшего ингибирования гликолиза, активизирует процесс распада гликогена и повышает уровень глюкозы в печени. В мышечной ткани экспериментальных животных при этом отмечается ингибирование активности ФФК и снижение уровня Г-6-Ф. При выраженной алкогольной интоксикации (5 г/кг) отмечается ингибирование лимитирующих ферментов гликолиза в печени и скелетной мускулатуре и анаэробная ориентация метаболизма глюкозы по данному метаболическому пути. При этом чётко проявляется гликогенолитический эффект высокой дозы этанола. Нарушение метаболизма глюкозы на фоне потребления больших доз этанола вносит определенный вклад в формирование общей патохимической картины тяжелой формы острой алкогольной интоксикации и должно учитываться при разработке оптимальных схем ее метаболической коррекции.

ЛИТЕРАТУРА

1. Рослый И.М., Абрамов С.В., Азаронов В.Р. (2004) *Вопр. наркологии*, №5, 46-56.
2. Грабовска-Гибнер Е., Стасно И., Шукальски Б. (1979) *Postepy Higieny i Medycyny Doswiadczalnej*, **33** (2), 197-219.
3. Potter D., Chin C., Rowland J. (1980) *J. Stud. Alc.*, **41**(12), 814-815.
4. Бузалков Р.Т., Мумев С. (1973) *Сб. трудов Природно-мат. фак-та Ун-та Скопье*, **25**, 114.
5. Duruibe V., Tejwani G. (1981) *Mol. Pharmacol.*, **20**(3), 621-630.
6. Бритван И.Я. (1988) *Бюлл. экспер. биол. мед.*, **105**, 606-608.
7. Preedy V.R., Richardson E. (1994) *Br. Med. Bull.*, **50**, 152-162.
8. Fernandez-Sola J. (1995) *Alcohol Alcohol.*, **30**, 487.
9. Ai Hua Bo, Cui Shi Tian (2001) *World Chin. J. Dig.*, **9**, 157-160.
10. Duruibe V., Tejwani G. (1982) *Mol. Pharmacol.*, **22**, 620-625.
11. Salas M., Vinuela E., Sols A. (1963) *J. Biol. Chem.*, **238**, 3535-3538.
12. Undervud A., Newsholme E. (1965) *Biochem. J.*, **95**(7), 868-875.
13. Bergmayer H. (1962) *Methoden der Enzymatischen Analyse*, Weinheim.
14. Прохорова Ж.И. (1982) *Методы биохимических исследований*, Л.
15. Мильман Л.С., Юровицкий Ю.Г., Ермолаева Л.П. (1974) *Методы биологии развития*, Наука, М.
16. Hohorst H., Krentz F., Bucher T. (1959) *Biochem. Z.*, **332**(1), 18-46.
17. Колб В.Г., Камышников В.С. (1982) *Справочник по клинической химии*, Беларусь, Мн.
18. Kreisberg R., Owen W., Silgal A. (1971) *J. Clin. Invest.*, **50**(2), 166-174.
19. Ньюсхолм Э., Старп К. (1977) *Регуляция метаболизма*, Мир, М.
20. Xu D., Dhillon A.S. (1996) *Addict. Biol.*, **1**(1), 71-83.
21. Badawy A. (1977) *Br. J. Alcohol Alcohol.*, **12**(1), 30-42.
22. Vierling W., Gorbath H., Ammon H. (1980) *Arzneimittelforschung*, **30**(5), 773-776.
23. Сидоров П.И., Ишеев Н.С., Соловьев А.Г. (2003) *Соматогенез алкоголизма*, МЕДпресс-информ, М.

Поступила: 21. 05. 2007.

**PARTICULARITIES OF GLYCOLYSIS IN LIVER AND SKELETAL MUSCLE AFTER
ACUTE ALCOHOL INTOXICATION IN RATS**

S.V. Lelevich¹, A.N. Borodinsky²

¹Grodno State Medical University, Gorkogo ul., 80, Grodno, 230009 Belarus, tel.: (0152) 50-05-57;
fax (0152) 43-53-41; e-mail: slelevich@yandex.ru

²Institute of Pharmacology and Biochemistry, Belarus

Functional activity of glycolysis was studied in liver and skeletal muscles of rats subjected to acute alcohol intoxication. Alcohol administration in the dose of 1 g/kg led to inhibition of glycolytic enzymes activities and decreased levels of some glycolytic substrates in liver. Activity of LDH increased in skeletal muscle under these experimental conditions. Moderate dose of ethanol (2.5 g/kg) activated glucogenolysis and increased glucose level in liver. In this group inhibition of PFK activity and decrease of glucose-6-phosphate level in muscle was also observed. Alcohol administration in the dose of 5 g/kg caused inhibition of rate-limiting enzymes of glycolysis in liver and muscle.

Key words: glucose, alcohol, hexokinase, lactate, insulin.