

УДК 612.122.1: 616.36- 092.9: 616.89.- 008.441.13

©Лелевич

## **ФУНКЦИОНАЛЬНОЕ СОСТОЯНИЕ НЕКОТОРЫХ ПУТЕЙ МЕТАБОЛИЗМА ГЛЮКОЗЫ В ПЕЧЕНИ КРЫС ПРИ ХРОНИЧЕСКОЙ АЛКОГОЛЬНОЙ ИНТОКСИКАЦИИ**

*С.В. Лелевич*

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

Исследовано состояние гликолиза и пентозофосфатного пути в печени крыс при хронической алкогольной интоксикации. Выявлено ингибирование активности некоторых ферментов гликолиза на 29 сутки алкогольной интоксикации. Длительное введение этанола приводит к увеличению в печени уровня глюкозы и лактата, а также к понижению уровня гликогена. На 29 сутки алкогольной интоксикации выявляется ингибирование транскетолазной реакции, снижение уровня пентоз в печени, а также концентрации инсулина в крови.

**Ключевые слова:** алкоголь, печень, глюкоза, инсулин, транскетолаза.

**ВВЕДЕНИЕ.** Хроническая алкогольная интоксикация представляет собой пример одного из наиболее распространенных длительных экзогенных химических воздействий на организм. Комплекс изменений, возникающий при длительном введении этанола, необходимо рассматривать как генерализованную интоксикацию, затрагивающую подавляющее число клеток. Висцеральные нарушения под влиянием хронической алкогольной интоксикации имеют при этом не меньшее значение, чем классические симптомы поражения ЦНС.

Среди многочисленных висцеральных поражений, которые оказывают влияние на общую продолжительность жизни при алкоголизме, патологии печени отводится ведущее место [1, 2]. Данный орган несет основную нагрузку в метаболическом цикле этанола, поступающего в организм. Длительное введение алкоголя максимально загружает пути его метаболизма, превращая печень в основной орган – “мишень”. Функциональное состояние данного органа играет важную роль в патогенезе алкогольной болезни. Выявлено, что у больных с патологией печени имеются клинические особенности алкоголизма, заключающегося в более высокой наследственной отягощенности заболевания, раннем начале и большей скорости формирования основных клинических симптомов [3]. Помимо того, что печень является главной мишенью для алкоголя, это еще и основной орган ответственный за гомеостаз глюкозы и энергетический обмен в организме. Изучение нарушений данного обмена при действии этанола позволит приблизиться к пониманию событий на молекулярном, клеточном и тканевом уровнях.

Хроническое потребление алкоголя приводит к развитию адаптации всех внутриклеточных систем к постоянно повышенной концентрации этанола в крови, а, следовательно, и в клетке. Выявлены изменения активностей ряда ферментов

углеводного обмена в печени крыс при длительном (3,5 мес.) потреблении алкоголя в качестве единственного источника жидкости [4]. Одним из симптомов хронической алкогольной интоксикации (4 мес.) является гипогликемия [5]. Это связано с развитием дисбаланса между образованием и утилизацией глюкозы при длительном употреблении этанола. Данные изменения могут явиться следствием влияния алкоголя на отношение свободных  $\text{NAD}^+/\text{NAD}\cdot\text{H}$  в клетках печени, что в итоге приводит к угнетению глюконеогенеза и гипогликемии [6]. Выявлены также изменения функционального состояния пентозофосфатного пути (ПФП) при хронической алкогольной интоксикации [7, 8].

Большинство данных о нарушениях углеводного обмена в печени получены при длительных сроках алкоголизации (3–8 мес.). Однако практически отсутствуют сведения о нарушениях метаболизма глюкозы при более коротких сроках введения этанола (до 1 мес.), которые можно рассматривать как субхронические. Очевидно, что именно в этот период происходит трансформация острых эффектов этанола в патохимические отклонения, характерные для хронической алкогольной интоксикации.

Целью данной работы являлось исследование активности ферментов гликолиза и ПФП, содержания субстратов углеводного обмена в печени, а также уровня глюкозы и инсулина в сыворотке крови крыс при хронической алкогольной интоксикации.

**МЕТОДИКА.** В эксперименте было использовано 25 белых, беспородных крыс-самцов массой 180-220г, находившихся на стандартном рационе вивария при свободном доступе к воде. Животных были разделены на 3 группы. Особям первой группы (контроль) внутрижелудочно вводили 0,9% раствор хлорида натрия 2 раза в сутки, вторая группа животных получала 25% раствор этанола в течение 14 суток, а третья – 29 суток. Декапитацию проводили через 1 час после последнего введения этанола.

После декапитации животных у них быстро извлекали печень. Одну часть ткани фиксировали в жидком азоте для определения содержания субстратов, а другую использовали для определения активности ферментов. Активность ферментов определяли в супернатанте, который готовили следующим образом: ткани разводили в девятикратном по отношению к массе объеме инкубационной среды, которая состояла из 0,15 М  $\text{KCl}$ ; 0,05 М трис- $\text{HCl}$  буфер (pH 7,8) и 0,001 М ЭДТА в отношении 1:1:1. Ткань гомогенизировали в стеклянных гомогенизаторах при  $t^\circ 0 - +2^\circ\text{C}$ . Затем гомогенат центрифугировали на холоде при 10000 g в течение 20 мин. Супернатант сразу же использовали для работы. Величина разведения центрифугатов устанавливалась опытным путем из расчета, что при внесении их в пробу в объеме 0,1 мл, определяемая экстинция находилась на линейном участке графика концентрационной зависимости. В центрифугатах определяли активность основных ферментов гликолиза и ПФП.

Принцип определения активности гексокиназы (ГК) и глюкокиназы (ГЛК) основывается на спектрофотометрическом измерении нарастания содержания  $\text{NADPH}$  в присутствии соответствующей концентрации субстрата и избытка вносимой в инкубационную среду глюкозо-6-фосфатдегидрогеназы. ГК и ГЛК катализируют одну и ту же реакцию в печени, но отличаются друг от друга по  $K_m$ . Данный факт позволяет раздельно определять их активность в ткани печени [9].

Активность фосфофруктокиназы (ФФК) определяли по методу Ундервуда [10]. Принцип данного метода основан на спектрофотометрической регистрации скорости окисления  $\text{NADH}$  в сопряжённой системе с фруктозо-1,6-дифосфатальдолозой,  $\alpha$ -глицерофосфатдегидрогеназой, триозофосфатизомеразой.

Принцип метода определения активности пируваткиназы (ПК) заключался в регистрации убыли  $\text{NADH}$  при трансформации образующегося пирувата в лактат в присутствии содержащейся в инкубационной среде лактатдегидрогеназы [11].

Активность лактатдегидрогеназы (ЛДГ) определяли по скорости окисления  $\text{NADH}$  при превращении лактата в пируват, которую регистрировали

спектрофотометрически по убыли величины оптической плотности при длине волны 340 нм [12].

Определение активности глюкозо-6-фосфатдегидрогеназы (Г-6-ФДГ) и 6-фосфоглюконатдегидрогеназы (6-ФГДГ) основано на специфическом ферментативном окислении субстрата (глюкозо-6-фосфата или 6-фосфоглюконата), сопровождающемся восстановлением  $\text{NADP}^+$ , количество которого определяли спектрофотометрически [13]. Реакцию начинали добавлением центрифугата ткани. В пробе, содержащей оба субстрата, определяли суммарную активность обеих дегидрогеназ, а в пробе, содержащей только 6-фосфоглюконат, – 6-ФГДГ. Активность Г-6-ФДГ определяли по разнице между первой и второй пробами.

Активность транскетолазы (ТК) определяли по количеству образующейся седогептулозы, которая при кипячении в кислой среде образует оксиэтилфурфурол; последний в присутствии орцина и ионов трехвалентного железа даёт специфическую сине-зеленую окраску с максимумом поглощения при длине волны 625 нм [14].

Принцип метода определения пентоз заключается в том, что при нагревании в присутствии минеральных кислот от них отщепляется вода и образуется фурфурол. В присутствии орцина и хлорного железа развивается зеленое окрашивание, интенсивность которого пропорциональна количеству содержащихся пентоз [15].

Содержание субстратов гликолиза и гликогена в печени определяли в безбелковых центрифугатах, для приготовления которых использовали ткани, замороженные в жидком азоте. Из них готовили гомогенаты, добавляя 6%  $\text{HClO}_4$  в соотношении 1:5 к массе тканей. Гомогенаты выдерживали 10 ч на холоде, после чего центрифугировали 30 мин при 1000 g. Отделяли супернатанты, нейтрализовали их до pH 7,2 и выдерживали на холоде один час. Осадок перхлората калия, образующийся при нейтрализации, осаждали центрифугированием при 1000 g в течение 30 мин. В полученных супернатантах определяли количество субстратов углеводного обмена.

Для определения уровня глюкозы в печени использовался ферментативный метод, включающий в себя сопряженное действие ГК и Г-6-ФДГ [16]. Глюкоза под действием ГК в присутствии АТФ переходит в Г-6-Ф, который при помощи Г-6-ФДГ окисляется в 6-фосфоглюконат, что приводит к восстановлению  $\text{NADP}$ .

Содержание глюкозо-6-фосфата (Г-6-Ф) определяли, используя Г-6-ФДГ и фосфогексоизомеразу [17]. В присутствии Г-6-ФДГ Г-6-Ф окисляется в 6-фосфоглюконовую кислоту, что сопровождается восстановлением  $\text{NADP}^+$ . Имеющийся Ф-6-Ф под действием фосфогексоизомеразы превращается в эквивалентное количество Г-6-Ф, который далее утилизируется в глюкозо-6-фосфатдегидрогеназной реакции.

В основе метода по определению пирувата лежит его восстановление до лактата в присутствии ЛДГ [12].

Принцип энзиматического определения лактата основан на его дегидрировании ЛДГ в присутствии  $\text{NAD}^+$  [18]. По количеству образовавшегося  $\text{NADH}$ , определяемого спектрофотометрически, судили о содержании молочной кислоты.

Определению гликогена проводили ферментативным методом по количеству глюкозы, образующейся при гидролизе гликогена [16]. К 0,1 мл безбелкового центрифугата добавляли 3 мл этанола, выдерживали при 37°C один час и центрифугировали (1000 g × 30 мин). Промывку осадка этанолом проводили дважды. Осадок гликогена подвергали двухчасовому кислотному гидролизу с 4M  $\text{H}_2\text{SO}_4$  в кипящей водяной бане. Гидролизат охлаждали, нейтрализовали 2M KOH, стабилизировали реакцию среды 0,1 M трис-HCl буфером (pH 7,6). В гидролизате с помощью энзиматического метода [16] определяли содержание глюкозы.

Уровень гликемии определяли с использованием глюкозооксидазного метода стандартными наборами реактивов, а концентрацию инсулина определяли в сыворотке, применяя радиоиммунологический метод.

## ОБМЕН ГЛЮКОЗЫ ПРИ ХРОНИЧЕСКОЙ АЛКОГОЛИЗАЦИИ

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

**РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ.** Введение алкоголя в течение 14-ти суток (2-я группа) сопровождается ингибированием в печени активности одного из ключевых ферментов гликолиза – ГЛК (табл. 1). Со сниженной скоростью глюкокиназной реакции сопоставим повышенный уровень глюкозы в печеночной ткани, а также увеличение содержания данного субстрата в сыворотке крови животных 2-ой экспериментальной группы (табл. 1). Одним из факторов, способствующих развитию гипергликемии в данных условиях, может выступать снижение концентрации гликогена в печени, уровень которого составляет 81% от контроля (табл. 2). Изменений активностей других исследованных ферментов гликолиза и ПФП при введении алкоголя в течение 14-ти суток выявлено не было. Несмотря на развивающуюся в данных экспериментальных условиях гипергликемию, концентрация инсулина в сыворотке не отличается от контрольного уровня (табл. 1), что указывает на превалирование других, не связанных с нарушением функций  $\beta$ -клеток, механизмов регуляции метаболизма глюкозы в печени при 14-суточной алкогольной интоксикации.

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

ПАРАМЕТР	Экспериментальные группы		
	1 группа контроль	2 группа 14 суток	3 группа 29 суток
ГК	4,06 (3,80; 4,50)	4,01 (3,56; 4,19)	2,91 (2,46; 3,16)
ГЛК	7,55 (6,94; 8,09)	5,99 (5,14; 6,52)*	5,34 (5,12; 5,86)*
ФФК	7,74 (7,17; 8,29)	7,43 (7,11; 7,62)	7,01 (5,26; 8,06)
ПК	77,0 (70,4; 81,4)	82,3 (78,1; 86,7)	71,2 (64,3; 78,1)
ЛДГ	107,3 (101,7; 112,0)	114,4 (106,7; 128,7)	158,1 (152,8; 164,3)*
Гликемия (ммоль/л)	4,48 (3,97; 5,02)	5,78 (5,27; 6,14)*	5,09 (4,87; 5,18)
Инсулин (пмоль/л)	81,9 (72,8; 92,4)	78,8 (71,6; 84,4)	69,3 (60,7; 78,6)*

Примечание: Здесь и в табл. 2-3 данные выражены в виде Ме и рассеяния (25 и 75 %);

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

Таблица 2. Содержание субстратов углеводного обмена в печени крыс при хронической алкогольной интоксикации (мкмоль/г).

<b>СУБСТРАТ</b>	<b>Экспериментальные группы</b>		
	<b>1 группа контроль</b>	<b>2 группа 14 суток</b>	<b>3 группа 29 суток</b>
<b>Глюкоза</b>	7,16 (6,65; 7,82)	9,09 (8,91; 10,84)*	11,13 (10,01; 13,26)*
<b>Г-6-Ф</b>	0,40 (0,30; 0,53)	0,37 (0,33; 0,56)	0,26 (0,19; 0,36)*
<b>Пируват</b>	0,13 (0,09; 0,19)	0,15 (0,14; 0,24)	0,16 (0,14; 0,26)
<b>Лактат</b>	2,64 (2,40; 2,81)	2,68 (2,50; 2,88)	3,41 (3,26; 3,64)*
<b>Гликоген</b>	151,8 (142,1; 166,4)	127,4 (126,1; 131,6)*	123,9 (116,7; 130,6)*

Увеличение алкоголизации экспериментальных животных до 29-ти суток сопровождается более существенными сдвигами в функционировании изученных путей метаболизма глюкозы в печени, чем при предыдущем сроке. У животных 3-й группы выявлено снижение активностей ферментов начальных стадий гликолиза – ГК и ГЛК (табл. 1). Ингибирование скоростей данных реакций является, вероятно, одной из основных причин увеличения содержания глюкозы в печени при 29-суточной алкогольной интоксикации (табл. 2). Концентрация данного субстрата при этом превышает и контрольный уровень (на 55%) и таковой у особей 2-ой экспериментальной группы. Определенный вклад в вышеуказанные изменения вносит снижение содержания гликогена в печени крыс при 29-суточной алкогольной интоксикации (табл. 2).

Ещё одним, важным на наш взгляд, эффектом 29-суточной алкогольной интоксикации является увеличение активности ЛДГ в печени крыс и как следствие этого рост концентрации лактата (табл. 2). Эти данные указывают на анаэробную переориентацию гликолиза в печени при длительном поступлении алкоголя в организм. У животных 3-й группы снижен уровень Г-6-Ф (табл. 2), что является еще одним, наряду с ростом содержания глюкозы в печени, следствием ингибирования активности ферментов начальных стадий гликолиза. Введение алкоголя в течение 29-ти суток приводит к снижению скорости транскетолазной реакции (на 33%) и падению уровня пентоз в печени (табл. 3). О снижении активности одного из основных ферментов ПФП – транскетолазы при длительном введении алкоголя сообщалось и ранее [19, 20]. Эти результаты были получены при длительных (4–6 мес.) сроках алкоголизации. Данный эффект этанола является одним из следствий его влияния на обмен тиамина. Снижение активности ТК при хронической алкогольной интоксикации, вероятно, обусловлено



## ОБМЕН ГЛЮКОЗЫ ПРИ ХРОНИЧЕСКОЙ АЛКОГОЛИЗАЦИИ

формированием у крыс В<sub>1</sub> гиповитаминозного состояния, что является следствием снижения потребления пищи на фоне длительного введения этанола и нарушения процессов всасывания в ЖКТ [21]. Полученные нами результаты указывают на то, что “перестройка” одного из основных путей метаболизма глюкозы в печени – ПФП, происходит уже спустя несколько недель после начала введения алкоголя и должно учитываться в качестве одного из идентификационных признаков трансформации острой интоксикации этанолом в хроническую.

Таблица 3. Активность ферментов ПФП (нмоль/мг/мин), содержание пентоз (мкмоль/г) в печени крыс при хронической алкогольной интоксикации.

ПАРАМЕТР	Экспериментальные группы		
	1 группа контроль	2 группа 14 суток	3 группа 29 суток
Г-6-ФДГ	3,98 (3,71; 4,16)	3,58 (3,46; 3,71)	4,16 (3,88; 4,28)
6-ФГДГ	4,16 (4,01; 4,48)	4,26 (3,86; 4,61)	3,86 (3,41; 3,95)
ТК	17,4 (16,2; 18,1)	16,2 (14,3; 18,3)	11,7 (9,6; 13,9)*
Пентозы	5,81 (5,66; 6,02)	5,51 (25,42; 5,73)	3,54 (3,29; 4,08)*

Введение алкоголя в течение 29-ти суток сопровождается изменением уровня инсулина в сыворотке экспериментальных животных (табл. 1), который у особей 3-ей группы составляет 84% от контроля. Существуют предположения, что сдвиг редокс-состояния и изменения энергетического обмена играют ведущую роль в многочисленных опосредованных эффектах этанола при его длительном поступлении в организм [22]. Это проявляется в виде изменения уровня гликемии путем перестройки функционирования гликолиза, глюконеогенеза и гликогенолиза. Следствием данных эффектов являются компенсаторные изменения эндокринной деятельности желез внутренней секреции. Алкоголь оказывает влияние на секрецию инсулина путем влияния на ЦНС, релизинг-факторы и cAMP.

**ЗАКЛЮЧЕНИЕ.** Алкогольная интоксикация в относительно непродолжительные сроки (до 1 мес.) сопровождается нарушениями метаболизма глюкозы по пути гликолиза и ПФП, отклонениями в обмене гликогена в печени и функционировании инсулярного аппарата поджелудочной железы. Эти нарушения следует рассматривать в качестве одного из модулей начальной стадии патохимической картины хронической алкогольной интоксикации. Их следует учитывать при разработке дифференцированных схем метаболической коррекции продолжительной алкогольной интоксикации.

## ЛИТЕРАТУРА

1. Бацкоков С.С., Ткаченко Е.И., Успенский Ю.И. (1996) Российский журнал гастроэнтер., гепатол., копролог., **4**, 207.
2. Соринсон С.Н. (1995) Нижегородский мед. журнал, **1**, 97-102.
3. Альтишлер В.Б., Абдуллаев Т.Ю. (2001) Вопросы наркологии, **1**, 33-41.
4. Prasanka C.V., Romakrishnan S. (1984) Ind. J. Biochem. Biophys., **21**(1), 62-65.
5. Косенко Е.А., Каминский Ю.Г. (1988) Углеводный обмен, печень алкоголь, Пушино.
6. Christensen E.L., Higgins J.J. (1979) in: Biochemistry and Pharmacology of Ethanol (E. Majchrowicz, E.P. Noble eds.) N.Y.: Plenum Press, **vol. 1**, pp. 191-247.
7. Лелевич В.В. (1991) Вопросы мед. химии, **37**(1), 21-23.
8. Mukheijee A., Svoronos S., Ghazanfani A. (1987) J. Clin. Invest., **79**(4), 1039-1043.
9. Salas M., Vinuela E., Sols A. (1963) J. Biol. Chem., **238**(11), 3535-3538.
10. Undervud A., Newsholme E. (1965) Biochem. J., **95**(7), 868-875.
11. Bergmayer H. (1962) Methoden der enzymatischen Analyse, Weinheim.
12. Прохорова Ж.И. (1982) Методы биохимических исследований, Л.
13. Glock G., Mc Lean P. (1953) Biochem. J., **53**(3), 400-401.
14. Bruns F., Dunwald H., Noltmann E. (1958) Biochem. Z., **330**(6), 497-508.
15. Кочетов Г.А. (1980) Практическое руководство по энзимологии, Москва: Высшая школа, 210-211.
16. Мильман Л.С., Юровицкий Ю.Г., Ермолаева Л.П. (1974) Методы биологии развития, Наука, М.
17. Hohorst H., Krentz F., Bucher T. (1959) Biochem. Z., **332**(1), 18-46.
18. Колб В.Г., Камышников В.С. (1982) Справочник по клинической химии, Беларусь, Мн.
19. Jung E.H., Itokawa Y., Nishino K. (1991) Am. J. Clin. Nutr., **53**(1), 100-105.
20. Shaw S., Gorkin B., Lieber C. (1981) Am. J. Clin. Nutr., **34**(5), 856-860.
21. Фридман Л., Флеминг Н., Робертс Д., Хайман С. (1998) Наркология, М.: Бином.
22. Axelrod D. (1974) Biol. Alcohol., **3**, 291-302.

Поступила: 22. 10. 2007.

## FUNCTIONAL STATE OF GLUCOSE METABOLISM IN RAT LIVER UNDER CHRONIC ALCOHOL INTOXICATION

*S.V. Lelevich*

Grodno State Medical University, Gorkogo Str., Grodno, 80230009 Belarus;  
tel.: (0152) 50-05-57; fax: (0152) 43-53-41; e-mail: slelevich@yandex.ru

Chronic alcohol intoxication caused inhibition of some glycolytic enzymes observed after the 29 days alcohol intoxication. Ethanol administration increased liver glucose and lactate contents, and decreased the glycogen level. The 29 day alcohol intoxication also caused to the inhibition of the transketolase activity and decreased liver pentoses and serum insulin.

**Key words:** alcohol, liver, glucose, insulin, transketolase.