

ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНОЕ ОБОСНОВАНИЕ МЕТАБОЛИЧЕСКИХ ПРОЦЕССОВ В ОРГАНИЗМЕ ПРИ АЛКОГОЛЬНОЙ ИНТОКСИКАЦИИ

Лелевич С.В.

УО «Гродненский государственный медицинский университет»,
230009, Республика Беларусь, г. Гродно, ул. Горького, 80
slelevich@yandex.ru

Статья поступила 21.03.2016

Проведено исследование активностей ключевых ферментов гликолиза в печени крыс в условиях однократного введения различных доз этанола. Выявлено снижение поточной скорости данного пути катаболизма глюкозы при острой алкогольной интоксикации. Установлен прямой ингибирующий эффект высокой дозы этанола на активность печеночной фосфофруктокиназы, что подтверждается результатами опытов in vitro.

Ключевые слова: алкоголь, печень, фосфофруктокиназа, пируваткиназа.

Алкогольная интоксикация приводит к накоплению восстановительных эквивалентов в ткани печени, что проявляется в увеличении стационарной концентрации НАДН₂ [3; 7]. Имеются данные о противоположном воздействии этанола на активность ферментов гликолиза и глюконеогенеза в печени, что связано с изменением концентраций гликолитических гормонов [14; 20]. Так, по данным ряда авторов, однократное введение алкоголя голодающим крысам приводило в печени к повышению активности фосфофруктокиназы и пируваткиназы, а также росту соотношения лактат/пируват, на фоне неизменного количества лактата [6]. Прием этанола стимулировал распад гликогена в печени накормленных животных [14] и приводил к угнетению ключевых реакций глюконеогенеза в печени людей [20]. Поражения скелетной мускулатуры достаточно часто встречаются при алкогольной интоксикации [18]. Данный процесс сопровождается развитием острой алкогольной миопатии и проявляется мышечными болями, а также изменениями маркерных показателей в крови [8; 16; 17].

Известно, что основной метаболит этанола – ацетальдегид – нарушает функции печени и других органов [21]. Он тормозит окислительно-восстановительные реакции, в плазме крови при этом накапливаются жирные кислоты, глицерин и пировиноградная кислота. Все это способствует накоплению кислых метаболитов, развитию метаболического ацидоза, а также отеку легких [1]. Часто отмечают гипокальциемию и гипогликемию, что может стать причиной судорог. Ацетальдегид увеличивает высвобождение из адренергических окончаний катехоламинов, которые повышают то-

нус артерий мышечного типа и артериол, вызывают тахикардию, повышают потребность миокарда и других тканей в кислороде [21; 24].

Острая алкогольная интоксикация на фоне голодания сопровождается более выраженными дистрофическими и некротическими изменениями в миоцитах, уменьшением содержания липидов и гликогена [23]. Нарушения накопления гликогена в скелетной мускулатуре крыс были показаны и в ряде других экспериментов [11]. Авторы считают это одним из патогенетических аспектов развития алкогольной миопатии. Однократное внутривенное введение этанола экспериментальным животным сопровождалось увеличением отношения лактат/пируват в печени и мышечной ткани, а также увеличением уровня АМФ в обеих тканях [11].

Несмотря на определенное количество работ, посвященных изучению влияния этанола на метаболические процессы в организме, до конца невыясненными остаются вопросы патогенетических механизмов развития этой патологии, что и предопределило проведение данного исследования.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

В эксперименте по моделированию острой алкогольной интоксикации были использованы белые беспородные крысы-самцы, массой 180–220 г. Перед декапитацией все животные 12 часов содержались без пищи при свободном доступе к воде. Выбор количества вводимого алкоголя был обусловлен имеющимися представлениями о малых, средних и больших дозах, с одной стороны, и задачей выяснения дозозависимых эффектов этанола, с другой. Особям первой экспериментальной группы (контроль, $n = 8$) внутрижелудочно вводили 1 мл физиологического раствора NaCl, второй – 25% раствор этанола в дозе 1 г/кг ($n = 8$), третьей – раствор этанола в дозе 2,5 г/кг ($n = 8$) и четвертой ($n = 8$) – раствор этанола в количестве 5 г/кг массы тела. Декапитацию производили через 1 час после введения этанола и физиологического раствора.

После декапитации экспериментальных животных у них быстро извлекали печень. Активность ферментов определяли в супернатанте. Определение активностей гексокиназы (ГК) и глюкокиназы (ГЛК) основано на спектрофотометрическом измерении нарастания содержания НАДФН в присутствии соответствующей концентрации субстрата и избытка вносимой в инкубационную среду дегидрогеназы Г-6-Ф. Определение активности ГК и ГЛК в системе, сопряженной с глюкозо-6-фосфатдегидрогеназой [19], является универсальным методом измерения активности этих ферментов.

Активность фосфофруктокиназы (ФФК) определялась методом, описанным в работе А. Undervud [22]. Принцип данной аналитической проце-

дуры основан на спектрофотометрической регистрации скорости окисления НАДН в сопряженной реакции с фруктозо-1,6-дифосфатальдолазой, α -глицерофосфатдегидрогеназой и триозофос-фатизомеразой.

Активность пируваткиназы (ПК) определяли по регистрации убыли НАДН при трансформации образующегося пирувата в лактат в присутствии содержащейся в инкубационной среде лактатдегидрогеназы (ЛДГ) [5].

Определение активности ЛДГ основывалось на исследовании скорости окисления НАДН при превращении лактата в пируват. Это регистрировалось спектрофотометрически по убыли величины оптической плотности при длине волны 340 нМ [2].

С целью выяснения характера эффектов этанола на активность некоторых ключевых ферментов гликолиза в печени были выполнены опыты *in vitro* с созданием в инкубационной среде по определению ферментативной активности различных концентраций этанола (5–500 мМ). В экспериментах по изучению механизма влияния алкоголя на активность ФФК и ПК использовано 35 животных, которые были разделены на пять равных групп: контроль (1-я группа), 5 мМ этанола (2-я группа), 50 мМ этанола (3-я группа), 100 мМ этанола (4-я группа) и 500 мМ этанола (5-я группа).

Для моделирования трёхмерных структур ФФК человека и крысы была использована известная трёхмерная структура с идентификатором 3O8L из международной базы данных Protein Data Bank (www.pdb.org). Консенсусные аминокислотные последовательности ферментов взяты из международной базы данных UniProt (www.uniprot.org). В работе использовались известные трёхмерные структуры человеческой мышечной (1ZJH) и человеческой печёночной ПК (2VGB). Гомологичные ферменты крысы смоделированы на основании соответствующих трёхмерных структур ферментов человека. Моделирование трёхмерных структур ферментов проводили с помощью сервера Swiss Model (<http://swissmodel.expasy.org>). Использовался режим моделирования по готовому выравниванию аминокислотной последовательности моделируемого фермента с аминокислотной последовательностью шаблона. Выравнивание аминокислотных последовательностей проводили с помощью программы MEGA 6 (www.megasoftware.net), встроенным в неё алгоритмом Muscle.

Для молекулярного докинга этанола, АДФ и АТФ к моделям печёночной ФФК человека и крысы, а также для докинга этанола и аланина к трёхмерным структурам печёночной ПК человека и моделям трёхмерных структур печёночной ПК крысы был использован Docking Server (www.dockingserver.com).

Нами рассчитаны значения константы связывания по приведенной ниже формуле по средним значениям свободной энергии связывания для 10 попыток докинг-подбора наиболее подходящей области связывания в каждой из пар «белок-лиганд»:

$$K = e^{-\Delta G/RT}, \text{ где}$$

K – константа ингибирования;

ΔG – свободная энергия связывания (ккал/моль);

R – газовая постоянная ($1,99 \cdot 10^{-3}$ ккал/моль·К);

T – температура (310 К).

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

При введении этанола в дозе 1 г/кг массы тела (2-я группа) наблюдалось снижение активности ферментов начальных реакций гликолиза в печени: скорость ГК при этом регистрировалась пониженной на 29% ($p < 0,02$), а ГЛК – на 34% ($p < 0,001$) по сравнению с контрольными значениями (табл. 1). У животных 2-й группы снижалась активность ПК, тогда как активности ФФК и ЛДГ не отличались от таковых в контрольной группе.

Введение этанола в средней экспериментальной дозе (2,5 г/кг) несколько меняло состояние гликолиза в печени в сравнении с предыдущей группой. Активность ГК снижалась в сравнении со значениями контрольной группы, тогда как активность ГЛК нормализовалась (табл. 1). Активность еще одного лимитирующего фермента гликолиза, ФФК – у особей 3-й группы снижалась, а ПК – не отличалась от контроля. Выявленное повышение активности ЛДГ в данных экспериментальных условиях указывает на преобладание анаэробных процессов в ткани печени, которые проявляются при увеличении степени алкогольной интоксикации.

Введение этанола в высокой экспериментальной дозе (5 г/кг) приводило к ингибированию активности всех лимитирующих ферментов гликолиза в печени (табл. 1). Причем степень ингибирования была выражена в большей степени, чем при введении более низких количеств алкоголя. По сравнению с контрольными животными, у особей 4-й группы активность ГК снижалась 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 печени при выраженной алкогольной интоксикации. В то же время в данных условиях статистически значимо повышалась активность ЛДГ, что указывает на активизацию анаэробных процессов при увеличении степени алкогольной интоксикации.

Таблица 1
Активность ферментов гликолиза в печени (нмоль/мг/мин) при острой алкогольной интоксикации

Фермент	Экспериментальные группы			
	1-я (контроль)	2-я (1 г/кг)	3-я (2,5 г/кг)	4-я (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; 259,1)*

Примечание: здесь и в табл. 2 данные выражены в виде Ме (25, 75);

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

Этанол может взаимодействовать с большим количеством белков, будучи составной частью растворителей. Кроме того, алкоголь связывает холинорецепторы в качестве агониста, ГАМК-рецепторы в качестве положительного аллостерического модулятора, рецепторы N-метил-D-аспартата в качестве антагониста, а также глициновые рецепторы как агонист. Более того, этанол активирует калиевые каналы, регулируемые G-белком. Предположительный карман для связывания этанола на этих каналах похож на таковой, описанный для белка LUSH дрозофилы. Белок LUSH – это специфический рецептор для этанола в системе обоняния плодовой мушки [4; 15; 25].

Принимая во внимание способность этанола к образованию водородных связей и формированию гидрофобных контактов с белками, важным представился вопрос о том, является ли его действие на активность одного из лимитирующих ферментов гликолиза в печени ФФК прямым. Прямое воздействие – это следствие физического связывания этанола определенной областью белка. В случае непрямого эффекта этанол может действовать через изменение текучести клеточных мембран, сбой в нервной и гуморальной регуляции, а также через связывание с другими белками и ДНК. Еще один вопрос, который мы хотели решить в данных исследованиях, может ли прямое ингибирование активности ФФК этанолом быть

связано с угнетением её активности при острой алкогольной интоксикации.

Результаты опытов *in vitro* показали, что прямое ингибирование активности печёночной ФФК имеет место при достижении концентрации этанола в инкубационной среде 100 мМ (табл. 2). Таким образом, вполне вероятно, что прямое ингибирование активности ФФК печени наблюдается при острой алкогольной интоксикации в дозе 5 г/кг.

Для моделирования трёхмерных структур печёночной ФФК крысы и человека нами использован сервер Swiss Model [13]. В качестве шаблона применялась известная 3D структура 3O8L – мышечная ФФК кролика. Для молекулярного докинга этанола, АДФ и АТФ к моделям печёночной ФФК человека и крысы был применен Docking Server [9; 12].

Таблица 2
Активность фосфофруктокиназы (нмоль/мг/мин) в печени крыс при различных концентрациях этанола *in vitro*

ФФК	Экспериментальные группы				
	Контроль	Этанол 5 мМ	Этанол 50 мМ	Этанол 100 мМ	Этанол 500 мМ
	8,35 (7,4; 9,0)	7,35 (7,1; 8,8)	7,6 (5,9; 9,9)	5,4 (4,0; 5,7)*	4,65 (4,2; 6,4)*

АДФ является аллостерическим активатором ФФК [10]. Сайт для его связывания включает аминокислотные остатки: Asp173, Met174, Asp179, Tyr214, Phe308, Asn341, Ser377, Asn381, Phe538, Asp543 и Phe671. Docking Server правильно определил сайт для связывания этой молекулы. Этанол может быть связан с той частью АДФ-связывающего сайта, которая способна взаимодействовать с аденином (рис. 1).

Три остатка фенилаланина (Phe308, Phe538 и Phe671) способны образовывать гидрофобные контакты или вступать во взаимодействие с этанолом [10]. Остаток Asp543 принимает участие в полярных взаимодействиях. Константы связывания для этанола, естественно, значительно ниже, чем для АДФ. Это говорит о том, что он способен вытеснять АДФ из соответствующих сайтов только при достижении высокой концентрации. Собственно, это и доказали результаты эксперимента *in vitro* (табл. 2). С другой стороны, для белка дрозофилы LUSH энергия связывания равна 2,03 ккал/моль, что только на 8,5% ниже, чем для печёночной ФФК человека.

Таким образом, активность ФФК печени может быть угнетена высокой дозой этанола (5 г/кг), приводящей к достижению пиковой концентрации (100 мМ) в крови за счёт связывания его аллостерическим сайтом.

Угнетение активности ФФК печени после введения 2,5 г/кг этанола, выявленное нами в опытах *in vivo*, вероятно, обусловлено непрямым механизмом и связано с повышением соотношения НАДН/НАД⁺ при острой алкогольной интоксикации. Возможным путем реализации эффектов умеренной алкогольной интоксикации на активность печеночной ФФК является продуцирование АДГ НАДН, который, в свою очередь, ингибирует изоцитратдегидрогеназу. Результатом данных изменений является рост уровня цитрата, который ингибирует активность ФФК.

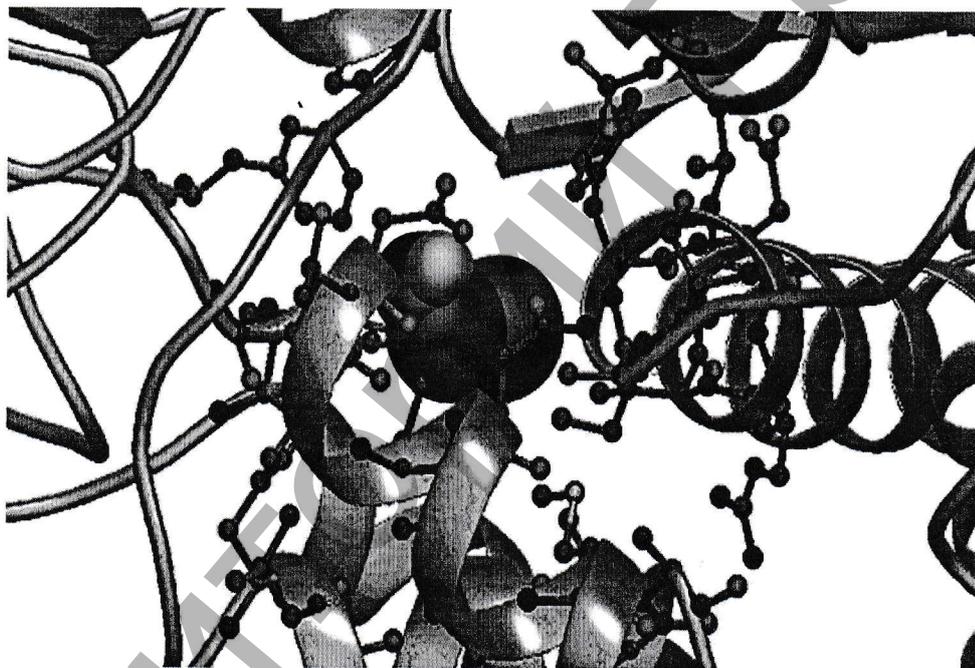


Рис. 1. Расположение молекулы этанола в аллостерическом центре печеночной ФФК человека.

Аналогичные исследования *in vitro* были выполнены с целью выяснения характера эффектов однократно вводимого этанола на активность ПК печени. Снижение активности данного фермента при острой алкогольной интоксикации (5 г/кг), выявленное в опытах *in vivo*, должно быть связано с непрямым механизмом, так как их активность *in vitro* снижалась только в присутствии этанола в концентрации 500 мМ, а такая концентрация алкоголя в тканях живого организма недостижима.

Таким образом, острая алкогольная интоксикация приводит к ингибированию ключевых ферментов гликолиза в печени. Этанол в высокой дозе оказывает прямой ингибирующий эффект на активность одного из

ключевых ферментов гликолиза – ФФК, что подтверждается снижением скорости данной энзиматической реакции в опытах *in vitro*.

ЛИТЕРАТУРА

1. Божко Г., Бойко Т. Ацетальдегид в кардиотоксических механизмах действия алкоголя: действие на кардиальные и адренальные катехоламины // Кардиология. – 1991. – Т. 31. – №9. – С. 73–75.
2. Прохорова Ж.И. Методы биохимических исследований. – Л.: Ленинградский университет, 1982. – С. 223–230.
3. Пархоменко Е.П. и др. Характерные метаболические нарушения в тканях крыс, вызванные длительным приемом алкоголя // Укр. биох. журнал. – 2007. – Т. 79. – №3. – С. 61–69.
4. Aryal P., Dvir H., Choe S. A discrete alcohol pocket involved in GIRK channel activation. // Nature Neuroscience. – 2009. – Vol. 12. – N8. – P. 988–995.
5. Bergmayer H. Methoden der enzymatischen analyse. – Weinheim, 1962. – P. 253–259.
6. Duruibe V., Tejwani G.A. The effect of ethanol on the activities of the key gluconeogenic and glycolytic enzymes of rat liver. // Mol. Pharmacol. – 1981. – Vol. 20. – N3. – P. 621–630.
7. French S.W. The pathogenesis and significance of the urinary alcohol cycle in rats fed ethanol intragastrically. // Alcohol Clin. Exp. Res. – 2005. – Vol. 29. – N11. – P. 158–161.
8. Hamitouche S., Poupon J., Dreano Y., Amet Y., Lucas D. Ethanol oxidation into acetaldehyde by 16 recombinant human cytochrome P450 isoforms: role of CYP2C isoforms in human liver microsomes. // Toxicol. Lett. – 2006. – Vol. 167. – N3. – P. 221–230.
9. Hode A.B., Kruse S.W., Nix J.C. The role of multiple hydrogen-bonding groups in specific alcohol binding sites in proteins: insights from structural studies of LUSH // J. of Mol. Biol. – 2008. – Vol. 376, № 5. – P. 1360–1376.
10. Huey R., Morris G.M., Olson A.J. A semiempirical free energy force field with charge-based desolvation // J. of Comput. Chem. – 2007. – Vol. 28. – N6. – P. 1145–1152.
11. Karinch A.M., Martin J.H., Vary T.C. Acute and chronic ethanol consumption differentially impact pathways limiting hepatic protein synthesis. // Am. J. Physiol. Endocrinol. Metab. – 2008. – Vol. 295. – N1. – P. 3–9.
12. Kiefer F, Arnold K., Kunzli M., Bordoli L., Schwede T. The SWISS-MODEL Repository and associated resources. // Nucleic Acids Res. – 2009. – Vol. 37. – N1. – P. 387–392.

13. *Kruse S.W., Zhao R., Smith D.P.* Structure of a specific alcohol-binding site defined by the odorant binding protein LUSH from *Drosophila melanogaster*. // *Nature Structural Biology*. – 2003. – Vol. 10. – N9. – P. 694–700.
14. *Kubota M., Virkamaki A., Yki-Jarvinen H.* Ethanol stimulates glycogenolysis in livers from fed rats. // *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.* – 1992. – Vol. 201. – N1. – P. 114–118.
15. *Meera P., Olsen R.W., Otis T.S., Wallner M.* Alcohol- and alcohol antagonist-sensitive human GABAA receptors: tracking subunit incorporation into functional receptors. // *Molecular Pharmacology*. – 2010. – Vol. 78. – N5. – P. 918–924.
16. *Preedy V.R., Richardson P.J.* Ethanol induced cardiovascular disease. // *Br. Med. Bull.* – 1994. – Vol. 50. – N1. – P. 152–163.
17. *Preedy V.R.* Ethanol toxicity and cardiac protein synthesis in vivo. // *Am. Heart J.* – 1994. – Vol. 127. – N5. – P. 1432–1439.
18. *Reilly M.E., Paice A., Ansell H., Patel V.B., Marway J.S., Bonner A.B., Preedy V.R.* The acute effects of a single dose of ethanol on biochemical indices of skeletal muscle composition: time course changes and comparison with the effects of endotoxin. // *Biochem. Soc. Trans.* – 1994. – Vol. 22. – N4. – P. 447.
19. *Salas M., Vinuela E., Sols A.* Insulin-dependent synthesis of liver glucokinase in the rats. // *J. Biol. Chem.* – 1963. – Vol. 238. – N11. – P. 3535–3538.
20. *Siler S.Q., Neese R.A., Christiansen M.P., Hellerstein M.K.* The inhibition of gluconeogenesis following alcohol in humans. // *Am. J. Physiol.* – 1998. – Vol. 275. – N5. – P. 897–907.
21. *Skrzydlewski Z., Worowski K., Skrzydlewska E.* Release of acid proteolytic activity from lysosomes and degradation of protein in organs of rats intoxicated with ethanol and acetaldehyde. // *Acta Biochim. Pol.* – 1985. – Vol. 32. – N3. – P. 271–277.
22. *Undervud A., Newsholme E.* Properties of phosphofructokinase from rat liver and their relation to the control of glycolysis and gluconeogenesis. // *Biochem. J.* – 1965. – Vol. 95. – N7. – P. 868–875.
23. *Xu D., Dhillon A.S., Davey C.G., Fournier P.A., Palmer T.N.* Alcohol end glucose metabolism in skeletal muscles in the rat. // *Addict. Biol.* – 1996. – N1. – P. 71–83.
24. *Yazaki K., Haida M., Kurita D., Shinohara Y.* Effect of chronic alcohol intake on energy metabolism in human muscle. // *Alcohol Clin. Exp. Res.* – 1996. – Vol. 20. – N9. – P. 360–362.
25. *Yevenes G.E., Moraga-Cid G., Avila A.* Molecular requirements for ethanol differential allosteric modulation of glycine receptors based on selective G β modulation. // *The Journal of Biological Chemistry*. – 2010. – Vol. 285. – N39. – P. 30203–30213.