

# ВОЗМОЖНЫЕ ПОДХОДЫ К ПОДДЕРЖАНИЮ pH ПРИ АТФ-азных НАГРУЗКАХ С ПОМОЩЬЮ ЭКЗОГЕННЫХ СУБСТРАТОВ ЭНЕРГЕТИЧЕСКОГО ОБМЕНА

*А.С. Розенфельд, РГППУ, г. Екатеринбург*

Представлены новые подходы к оценке метаболического состояния и его повышение с помощью экзогенных субстратов энергетического обмена.

До настоящего времени в физиологии, спортивной и клинической практики об изменении кислотно-основного состояния (КОС) организма судили, главным образом, по регистрации pH,  $pCO_2$  крови и содержанию недоокисленных продуктов обмена таких как, лактат, пирувата, кетоновые тела. Возможно, именно поэтому первые попытки борьбы за увеличение работоспособности путем воздействия на pH были направлены на коррекцию pH крови.

Модельные эксперименты показали, что при введении в перфузат  $NaHCO_3$  в 2,5 раза ускоряется выход лактата из изолированной работающей мышцы собаки. При этом сохранялись работоспособность и высокая скорость поглощения кислорода [5]. В последующих исследованиях не было отмечено сколько-нибудь заметного повышения работоспособности после введения бикарбоната [7].

На базе представлений о роли бикарбоната в поддержании pH крови А.А. Poulus, Н.А. Doctor, Н.С. Westra [8] сделали попытку коррекции ацидоза с помощью внутривенного введения  $NaHCO_3$ , спортсменам, выполняющим максимальную и субмаксимальную нагрузку. После внутривенного введения  $NaHCO_3$  повышались как  $pCO_2$  в крови так и выход  $CO_2$  с выдыхаемым воздухом, но субъективная переносимость работы и собственно работоспособность не улучшались. Не было также отмечено изменений со стороны частоты пульса, артериального давления, легочной вентиляции и потребления кислорода.

Использование глюкозы и различных источников углеводов весьма благотворно сказывается при коротких – пиковых нагрузках, когда сдвиг pH не успевает оказать какое либо влияние на физическую работоспособность, а также на длинных дистанциях при относительно низкой мощности работы, когда вклад гликолиза равен 1/13 доли суммарной энергопродукции и основным ограничителем является не кислотный сдвиг pH, а истощение углеводных депо мышц [3].

В настоящее время накоплен большой материал по использованию глюкозы и других сахаров при мышечных нагрузках [12]. Известно, что прием глюкозы способствует поддержанию гликогенного депо в мышцах [3], препятствует снижению сахара в крови [2] и повышает работоспо-

собность на длинных дистанциях [16, 4]. С другой стороны показано, что введение сахаров может вызвать ацидоз вследствие усиленного образования лактата [10], и в таких случаях у спортсменов можно было наблюдать снижение работоспособности.

В 1966 году К.А. Чазовой было обнаружено, что применение глутаминовой кислоты при спортивной деятельности может повышать работоспособность и улучшать ряда биохимических показателей. Кроме того, она полагала, что глутамат в глутаминсинтетазной реакции будет связывать избыток аммиака [19] в результате чего будет пополняться пул гликогена.

Высокая эффективность янтарной кислоты определялась тем, что в условиях рабочей гипоксии ФАД-зависимый субстрат окисляется лучше чем НАД-зависимые, поскольку окисление последних может быть заторможено вследствие высокой восстановленности НАДН [18].

Работы М.Н. Кондрашовой, Н.Р. Чаговец [17], Э.В. Маркарян [20]; L. Orié [6], давали основание полагать, что увеличение вклада окислительного фосфорилирования в энергообеспечение АТФ-азной нагрузки за счет дополнительной поставки митохондриальных субстратов и в частности сукцината, может оказаться эффективным «патогенетическим» способом стабилизации pH и поддержания работоспособности.

В период начала наших исследований имелись достаточные основания для сомнений участия митохондрий в поддержании внутриклеточного pH [6, 14, 9], поскольку экспериментально вклад окислительного фосфорилирования в поддержание pH не был определен из-за отсутствия адекватного способа исследования.

Традиционное определение титруемой буферной емкости [11] и другие обычные способы исследования величины кислотного сдвига pH не могли дать представления о динамическом процессе поддержания pH в ходе работы. Регистрация изменений pH в изолированных клетках при выключении митохондриального энергообеспечения ингибиторами не позволила определить величину вклада окислительного фосфорилирования в поддержании pH, так как одновременно снижалась активность АТФ-аз, очевидно вследствие повышения концентраций АДФ и фосфата

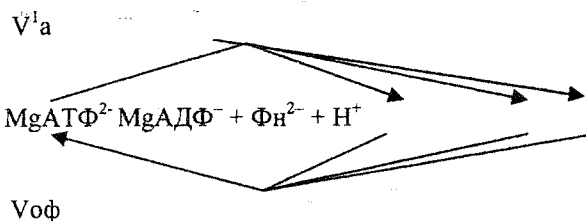
[15]. Кроме того вклад митохондрий легко маскировался на коротких временах активацией  $\text{Na}^+/\text{H}^+$  обменника, который может играть весьма существенную роль в регуляции внутриклеточного рН [1].

Необходимо было использовать принципиально иной кинетический подход, который позволил бы промоделировать генерацию  $\text{H}^+$  в АТФ-потребляющих реакциях и определить при этом возможную долю митохондриального энергообеспечения в предотвращении развития ацидоза.

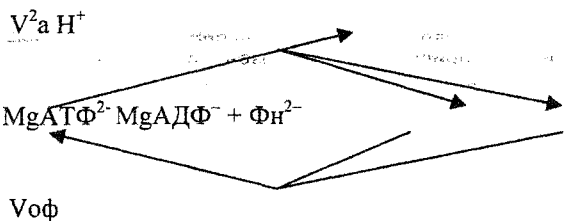
Из теоретического анализа, следовало, что *in vitro* также, как и в математической модели, необходимо было создать стационарные или близкие к стационарному условия, в которых хотя бы на начальных временах суммарные скорости гидролиза ( $V_a$ ) и синтеза ( $V_\phi$ ) АТФ были бы равны:

$$V_a = V_\phi \equiv V_{\phi}^g + V_{\phi}^o.$$

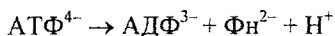
Тогда часть АТФ-азной активности ( $V_a^1$ ), обеспечиваемая ресинтезом АТФ в дыхательной цепи ( $V_{\phi}^o$ ), не генерирующая протоны ( $\text{H}^+$ )



могла бы быть отделена от части АТФ-азной нагрузки  $V^2_a$ , обеспечиваемой гликолитическим фосфорилированием ( $V_{\phi}^g$ ) и являющейся источником протонов



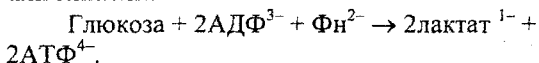
с помощью ингибиторного анализа. В случае фиксирования на заданном уровне АТФ-азной нагрузки можно было попытаться экспериментально выявить вклад митохондрий в поддержание рН, путем определения разности между скоростями образования  $\text{H}^+$  ( $\Delta V\text{H}^+$ ) в присутствии и отсутствии ингибиторов дыхания или разобщителей окислительного фосфорилирования. Итак, следовало задать фиксированный по скорости, хотя бы на начальном промежутке времени, уровень работы



и изменять активность окислительного фосфорилирования



или гликолиза



Для изменения вклада окислительного фосфорилирования в поддержании рН на фоне заданной АТФ-азной нагрузки использовали разные экзогенные субстраты, окисляющиеся в митохондриях, а для увеличения вклада гликолиза добавляли избыток глюкозы или разобщитель окислительного фосфорилирования.

*In vitro* на гомогенате или митохондриях сердца или печени крысы задавали АТФ-азную нагрузку путем активации эндогенных АТФ-аз с помощью градуального увеличения концентрации  $\text{Mg}^{2+}$  в инкубационной среде, либо добавлением 0,1–0,4 ед. внешних, экзогенных потребителей АТФ: гексокиназы с глюкозой, креатинкиназы с креатином или фактора  $F^1$ .

Как показано на рис. 1, повышение содержания  $\text{Mg}^{2+}$  от 0,5 до 3,5 мМ при инкубации гомогената сердца вызывает почти линейное увеличение скорости освобождения  $\text{H}^+$  в среду в присутствии 2,5 мМ АТФ как при окислении глюкозы, так и при окислении сукцината. Однако различия в регистрируемых скоростях закисления среды и потребления кислорода существенны.

В присутствии глюкозы скорость потребления кислорода в 4–6 раз ниже, тогда как скорость освобождения протона в среду в 2–10 раз выше чем при окислении сукцината, при равных по величине АТФ-азных нагрузках.

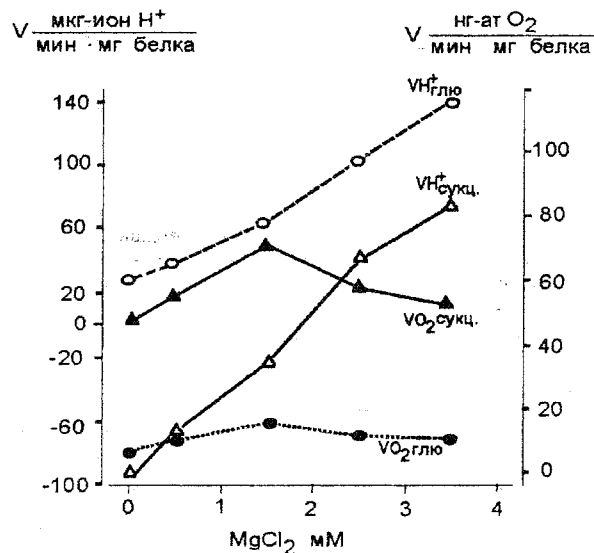


Рис. 1. Зависимость начальных скоростей генерации  $\text{H}^+$  и потребления кислорода гомогенатом сердца крысы от концентрации магния при окислении глюкозы (O) и сукцината (Δ)

Светлые символы –  $V\text{H}^+$ , заштрихованные символы –  $V\text{O}_2$ . Среда инкубации: 125 мМ КСl, 1 мМ  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ , 1 мМ ЭГТА, концентрация глюкозы 5 мМ, начальная концентрация АТФ 3 мМ. Содержание белка 20 мг на мл. Объем ячейки 1,2 мл, температура 29 °С.

Очевидно, это связано с тем, что при окислении глюкозы первая – верхняя часть гликолиза выполняет роль дополнительной АТФ-азы (по-

мимо  $Mg^{++}$ -активируемых, негликолитических АТФ-аз): глюкоза + АТФ<sup>-4</sup> → Г-6-Ф<sup>-2</sup> + АДФ<sup>-3</sup> +  $H^+$  + фруктозо-6-фосфат<sup>-2</sup> + АТФ<sup>-4</sup> → фруктозо-1-6-дифосфат<sup>-4</sup> + АДФ<sup>-3</sup> +  $H^+$ . Именно поэтому, при фиксированной по магнию АТФ-азной нагрузке избыток глюкозы даже на фоне высокой скорости сопряженного с фосфорилированием дыхания, например при окислении сукцината, приводит почти к двукратному увеличению скорости образования  $H^+$ : с 20–25 до 40–50 нг-ат.  $H^+$  в мин на мг белка. Добавление АТФ с  $Mg^{++}$  приводит к стимуляции дыхания похожей на стимуляцию дыхания АДФ.

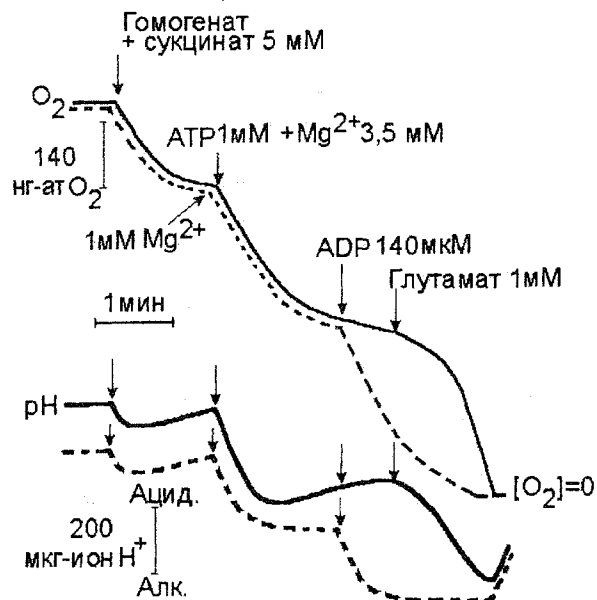


Рис. 2. Синхронная регистрация дыхания и рН при окислении сукцината гомогенатом сердца крысы в присутствии разных концентраций ионов магния. Среда инкубации и основные условия, как на рис. 1

На рис. 2 видно, что в гомогенате сердца легко развивается щавелевоуксусное торможение СДГ при активации АТФ-аз высокими концентрациями ионов магния и АТФ. Подобным образом действует избыток АДФ, поэтому сниженная скорость дыхания и не активируется дополнительным внесением АДФ. Как следствие снижения фосфорилирующего дыхания (АТФ-синтетазной активности) увеличивается скорость освобождения  $H^+$ . Глутамат, вовлекающий щавелевоуксусную кислоту (ЩУК) в трансаминирование, активирует дыхание и сразу же «забуферивает» образуемый АТФ-азами  $H^+$ . При достижении кислородного нуля прекращение дыхания сопровождается закислением среды. При добавлении меньших концентраций ионов магния вместе с АТФ нагрузка невелика, и щавелевоуксусное торможение отсутствует. При этом картина дыхания и освобождения-связывания ионов водорода в точности соответствует ответу дыхания и рН на малую добавку АДФ.

Свежевыделенный гомогенат сердца крысы имел удовлетворительные показатели сопряжения: дыхательный контроль (ДК) по Ларди и Вельман 3,3–3,5; ДК по Чансу и Вильямсу 2,2–2,8. Эндogenous АТФ-азы в отсутствии  $Mg^{++}$  и субстратов дыхания, при окислении глюкозы генерировали в среднем до 40 нг-ион,  $H^+$  в мин на мг белка при низкой скорости дыхания.

При втором способе моделирования АТФ-азных нагрузок *in vitro* в среду с гомогенатом вносили экзогенные АТФ-азы. На коротких интервалах времени, до 2–3 минут существенных различий в действии трех использованных акцепторных систем: гексокиназной, креатинкиназной, фактора  $F^1$  и  $H^+$ -АТФ-азы, мы не обнаружили.

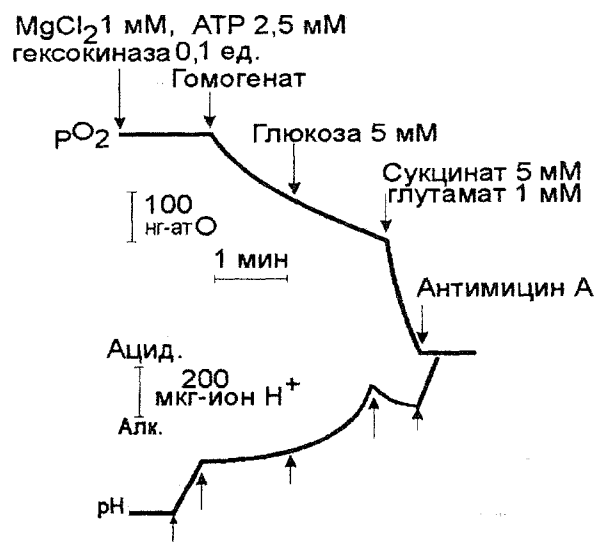


Рис. 3. Изменение скорости дыхания гомогената сердца и рН в присутствии глюкозо-гексокиназной системы при окислении глюкозы и сукцината с глутаматом

Условия, инкубации аналогичны предыдущим.

На рис. 3 показано, что при генерации  $H^+$  экзогенной АТФ-азой гомогенат «нейтрализует» тем больше  $H^+$ , чем выше скорость дыхания. При выключении дыхательной цепи антимицином А резко ускоряется закисление. Торможение уборки  $H^+$  при внесении глюкозы на фоне окисления эндогенных субстратов отражает, очевидно, увеличение вклада гликолиза в энергообеспечение АТФ-азной нагрузки.

В последующих экспериментах реакции дыхательной цепи митохондрий, сопряженные с синтезом АТФ, активировали путем внесения экзогенных субстратов, что позволило определить какие субстраты в большей мере способны обеспечить поддержание рН при нагрузках.

Как показано в таблице 4 при фиксированной АТФ-азной нагрузке, (задаваемой внесением  $Mg^{++}$ ) большей скорости дыхания гомогената соответствует меньшее накопление  $H^+$  при прочном сопряжении окислительного фосфорилирования.

Окисление добавленных глутамата,  $\alpha$ -кетоглутарата ( $\alpha$ -КГ) и  $\beta$ -оксибутирата ( $\beta$ -ОМ) примерно в равной мере повышает потребление  $O_2$  гомогенатом сердца (проба 3, 4, 5; табл. 1).

Однако при этом в разной степени уменьшает  $VH^+$  и только при окислении глутамата шестикратно уменьшается скорость генерации  $H^+$ .

Наблюдаемые различия можно объяснить раз-

ными путями утилизации данных экзогенных субстратов. Окисление  $\beta$ -ОМ в сердце происходит не до ацетоацетата, как в печени, а полностью до  $CO_2$  и  $H_2O$ . Вовлечение образующегося из  $\beta$ -ОМ ацетоацетата в цикл окислительного распада сопряжено с затратой энергии на ацилирование.

Приведенные в таблице 2 величины  $\Delta VH^+$  отражают вклад окислительного фосфорили-

Таблица 1  
Сравнение скоростей генерации  $H^+$  при окислении различных субстратов гомогенатом сердца крысы и активации эндогенных АТФ-аз ионами магния (n = 4)

Условия инкубации (рН = 6,9; АТФ = 2,5; субстраты по 5 мМ)	Добавки Mg <sup>++</sup> мМ	Изменение [H <sup>+</sup> ] в среде - VH <sup>+</sup> (мкг-ион.H <sup>+</sup> в мин на мг белка)	Потребление O <sub>2</sub> (нГ. O <sub>2</sub> в мин на мг белка)
1. Глюкоза	-	+40 ± 3	10 ± 1
2. Глюкоза	2,5	+100 ± 6	9 ± 1
3. Глюкоза + $\beta$ -ОМ	2,5	+125 ± 8	38 ± 2
4. Глюкоза + $\alpha$ -КГ	2,5	+108 ± 5	36 ± 2
5. Глюкоза + глутамат	2,5	+18 ± 1	43 ± 2
6. Глюкоза + малат + пируват	2,5	+55 ± 3	50 ± 3
7. Глюкоза + сукцинат	2,5	+42 ± 2	60 ± 3
8. Глюкоза + сукцинат + глутамат	2,5	+1 ± 1	83 ± 4
9. Глюкоза + сукцинат	-	-125 ± 4	65 ± 2
10. Глюкоза + ДНФ 20мкМ	2,5	+194 ± 9	11 ± 1
11. Сукцинат + ДНФ 20мкМ	3,5	+75 ± 4	78 ± 2

( $\rho = 0,73$ ;  $p < 0,05$ )

Таблица 2  
Зависимость эффективности уборки  $H^+$  от условий инкубации гомогената сердца

Условия инкубации			Измеряемые параметры		
Субстраты	АТФ мМ	Mg <sup>++</sup> мМ	* $\Delta VH^+$ мкг-ион в мин на мг белка	$\Delta VO_2$ нГ-ат в мин на мг белка	$\Delta VH^+/\Delta VO_2$
1. Сукцинат К	2,5	2,5	67	60	1,11
2. Сукцинат К	2,5	3,5	48	50	0,96
3. Сукцинат К + глутамат К	2,5	2,5	136	100	1,36
4. Сукцинат К + глутамат К + глюкоза	2,5	2,5	95	83	1,15
5. Сукцинат К + глутамат К	5,0	2,5	169	98	1,72
6. Сукцинат К + ДНФ (20 мкМ)	2,5	3,5	5	78	0,06
7. Сукцинат К + глутамат К	2,5	-	180	75	2,40

\* $\Delta VH^+ = VH^+_{инг} - VH^+_{о.ф.}$   $\Delta VH^+$  рассчитано по разности скорости генерации протонов ( $VH^+_{инг}$ ) АТФ-азой в присутствии ингибиторов дыхательной цепи и скорости «уборки» протонов при работе дыхательной цепи при прочном сопряжении окислительного фосфорилирования ( $VH^+_{о.ф.}$ ).

рования в динамическую «буферную ёмкость» ткани. Если считать, что содержание белка составляет в сердце 15 % от массы ткани, то при величине  $\Delta V\text{H}^+$  порядка 100 мкг-ион в мин на мг белка получается, что окислительное фосфорилирование может «забуферивать» порядка 15 мМ  $\text{H}^+$  в мин. на 1 г ткани. Таким образом за 5 мин, вклад окислительного фосфорилирования в динамическую буферную ёмкость равен всей суммарной буферной ёмкости ткани, обусловленных химическими буферными системами.

Описанные закономерности прослеживаются также на гомогенате печени крысы и легко могут быть воспроизведены на изолированных митохондриях при задании стандартной АТФ-азной нагрузки гексокиназо-глюкозной фосфатакцепторной системой [21].

Полученные *in vitro* данные о величине вклада окислительного фосфорилирования в поддержание рН при АТФ-азных нагрузках свидетельствуют о том, что из всех использованных экзогенных митохондриальных субстратов в вышеописанных экспериментах, наиболее эффективными оказались сукцинат К, и смесь сукцината К с глутаматом К.

Таким образом, ожидаемый и обнаруженный на уровне митохондрий и гомогената против-ацидотический эффект позволяют полагать, что выявленные механизмы купирования метаболического ацидоза могут быть реализованы на уровне целостного организма и являются весомым аргументом в пользу использования экзогенного сукцината при интенсивных физических нагрузках, когда работоспособность может ограничиваться чрезмерным развитием ацидоза.

### Литература

1. Aronson, P.S. *Na<sup>+</sup>-H<sup>+</sup> exchange, intracellular pH and cell function* / P.S. Aronson, W.F. Boron // *Current Topics in Membranes and Transport*. – Academic Press Inc, Orlando, San Diego, New York, Austin, Boston, London, Sydney, Tokyo, Toronto, 1986. Vol. 26, 315 p.
2. Benade, A.J.S. *The significance of an increased R.Q. after sucrose ingestion during prolonged aerobic exercise* / A.J.S. Benade, C.R. Jansen, G.G. Rogers, C.H. Wyndham, N.B. Strydom // *Pfluegers Arch.* – 1973. – 342, 3. – P. 199–206.
3. Brouns, F. *Utilization of lipids during exercise in human subjects: metabolic and dietary constraints* / F. Brouns, van der Vusse G.J. // *Br. J. Nutr.* – 1998. – 79 (2). – P. 117–28.
4. El-Sayed, M.S. *Exogenous carbohydrate utilization: effects on metabolism and exercise performance* / M.S. El-Sayed, D. MacLaren, A.J. Rattu // *Comp. Biochem. Physiol.* – 1997. – 118 (3). – P. 789–803.
5. Hirche, H.J. *Lactic acid permeation rate in working gastrochemii of dogs during metabolic alkalosis and acidosis* / H.J. Hirche, V. Hombach, H.D. Langohr, U. Wacker, J. Busse // *Pfluegers Arch.* – 1975. 376, 3. – P. 209–222.
6. Opie, L.H. *Lactate Metabolism and Cardiac Muscle* / L.H. Opie // *Lactate: Physiologic, Methodologic and Pathologic Approach*. – Springer-Verlag; Berlin; Heidelberg; N. Y., 1980. – P. 4–10.
7. Portington, K.J. *Effect of induced alkalosis on exhaustive leg press performance* / K.J. Portington, D.D. Pascoe, M.J. Webster, L.H. Anderson, R.R. Rutland, L.B. Gladden // *Med. Sci. Sports Exerc.* – 1998. 30 (4). – P. 523–528.
8. Poulus, A.J. *Acid-base, balance and subjective feelings of fatigue during physical exercise* / A.J. Poulus, H.J. Docto, H.G. Westra // *Eur. J. Appl. Physiol. and Occup. Physiol.* 1974. – 33, 3. – P. 207–213.
9. Ross, A. *Intracellular pH* / A. Ross, W. Boron // *Physiol. Rev.* – 1981. – 61. – P. 297–434.
10. Rujner, J. [Leigh disease in a 17-year-old boy] [Article in Polish] / J. Rujner, W.T. Chrusciel, H. Kulczycka, A. Bednarczyk // *Wiad. Lek.* – 1990. – 1, 43 (17–18). – P. 902–904.
11. Sahlin, K. *Intracellular pH and Energy Metabolism in skeletal Muscle in Man* / K. Sahlin // *Acta Physiolog. – Scandinav.* – 1978. – Suppl. – 455 p.
12. Spriet, L.L. *Influence of diet on the metabolic responses to exercise* / L.L. Spriet, S.J. Peters // *Proc. Nutr. Soc.* – 1998. – 57 (1). – P. 25–33.
13. Thompson, C.H. *Abnormal ATP turnover in rat leg muscle during exercise and recovery following myocardial infarction* / C.H. Thompson, G.J. Kemp, B. Rajagopalan, G.K. Radda // *Cardiovasc. Res.* – 1995. – 29 (3). – P. 344–349.
14. Wilkie, D.K. *Discussion* / D.K. Wilkie // *Lactate Physiologic, Methodologic and Pathologic Approach*. Springer-Verlag; Berlin; Heidelberg; N. Y., 1980. – P. 7–9.
15. Децерековский, В.И. *Математические модели мышечного сокращения* / В.И. Децерековский. – М.: Наука, 1977. – 160 с.
16. Квартовкина, Л.К. *О качественной ориентации в питании спортсменов* / Л.К. Квартовкина, А.А. Минх // *Актуальные вопросы гигиены физических упражнений и спорта*. – М., 1968. – С. 56–59.
17. Кондрашова, М.Н. *Янтарная кислота в скелетных мышцах при интенсивной деятельности и в период отдыха* / М.Н. Кондрашова, Н.Р. Чаговец // *Журн. докл. АН СССР* – 1971. – Т. 198, №. 1 – С. 243–246.
18. Лукьянова, Л.Д. *Кислородзависимые процессы в клетке и ее функциональное состояние* / Л.Д. Лукьянова, Б.С. Балмуханов, А.Т. Уголев. – М.: Наука, 1982. – 301 с.
19. Майстер, А. *Биохимия аминокислот* / А. Майстер. – М.: Изд-во иностр. лит. – 1961. – 439 с.
20. Маркарян Э.В. *Фосфорилирование АДФ при окислении разных субстратов митохондриями и тканями* / Э.В. Маркарян // *Митохондрии: Струк-*

тура и функции в норме и патологии. – М., 1971 – С. 173–176.

21. Розенфельд, А.С. Регуляция сукцинатом вклада митохондрий в поддержание рН при АТФ-азных нагрузках: дис. ... канд. биол. наук / А.С. Розенфельд. – Пушкино, 1983. – 145 с.

22. Чазова, К.А. О влиянии глутаминовой кислоты на процесс утомления людей разного характера труда / К.А. Чазова // Биологическое действие глутаминовой кислоты на организм в эксперименте и клинике. – Свердловск, 1966. – С. 123–129.