Федеральное агентство по образованию
ГОУ ВПО «Российский государственный профессионально-педагогический университет»
Уральское отделение Российской академии образования
Академия профессионального образования

А. С. Розенфельд
Е. И. Маевский

ТЕОРЕТИКО-МЕТОДОЛОГИЧЕСКИЕ АСПЕКТЫ ДЕЙСТВИЯ СУКЦИНАТА ПРИ СПОРТИВНЫХ НАГРУЗКАХ И ГИПОКСИИ

Екатеринбург
2007

УДК 612.015: 613.73
ББК Ч510.2
Р 64

Розенфельд А. С., Маевский Е. И. Теоретико-методологические аспекты действия сукцината при спортивных нагрузках и гипоксии. Екатеринбург: Изд-во ГОУ ВПО «Рос. гос. проф.-пед. ун-т», 2007. 174 с.
ISBN 978-5-8050-0242-8

Монография посвящена анализу гипотезы о возможности регуляции функционального состояния организма при интенсивных нагрузках за счет увеличения активности митохондриального энергообеспечения. Представлены экспериментальные доказательства эффективности коррекции метаболического ацидоза на разных уровнях организации биологических объектов. Обосновано практическое использование сукцината аммония для повышения работоспособности спортсменов.

Работа представляет интерес для физиологов, биохимиков, врачей, специалистов в области спортивной медицины и биологии.

Рецензенты: действительный член Российской академии естественных наук, заслуженный деятель науки, доктор биологических наук, профессор Н. А. Фомин (ГОУ ВПО «Южноуральский государственный педагогический университет»); доктор педагогических наук, профессор Л. А. Семенов (ГОУ ВПО «Российский государственный профессионально-педагогический университет»)

ISBN 978-5-8050-0242-8 © ГОУ ВПО «Российский государственный профессионально-педагогический университет», 2007
© А. С. Розенфельд, Е. И. Маевский, 2007

Введение

Метаболический ацидоз является атрибутом многих экстремальных физиологических и патологических состояний, в частности, связанных со значительной активацией процессов, при которых происходит потребление энергии, с нарушением функций митохондрий, недостаточным снабжением тканей кислородом, избыточным окислением липидов при голодании или сахарном диабете (L. Opie, 1978; P. Yan, J. S. Cheah, A. C. Thai et al., 1983; A. Katz, A. Edlund, K. Sahlin, 1987; W. Kamiike, S. Shimizu, N. Hatanaka et al., 1995; K. Sato, Y. Kashiwaya, C. A. Keon et al., 1995; C. H. Thompson, G. J. Kemp, B. Rajagopalan et al., 1995; B. K. Siesjo, K. I. Katsura, T. Kristian et al., 1996; C. Aalkjaer, H. L. Peng, 1997; P. Jouannet, C. Serres, 1998). Особое значение метаболический ацидоз приобретает в условиях интенсивной мышечной работы. Ряд исследователей считают, что он является основным фактором, ответственным за утомление и ограничение работоспособности при физических нагрузках (L. Kaijser, 1970; J. Karlsson, C. F. Funderburk, B. Essen et al., 1975; J. R. Williamson, S. W. Schaffer, C. Ford et al., 1976; G. W. Mainwood, J. M. Renaud, 1985; K. Iwanaga, M. Sakurai, T. Minami et al., 1992; G. J. Kemp, D. J.Taylor, C. H. Thompson et al., 1993; Y. Wang, G. J. Heigenhauser, C. M. Wood, 1994; K. Iwanaga, M. Sakurai, T. Minami et al., 1996; H. Green, 1997; R. J. Maughan, P. L. Greenhaff, J. B. Leiper et al., 1997). Соответственно при разработке методов и приемов, повышающих работоспособность, устойчивость организма в экстремальных состояниях, ключевым становится анализ механизмов развития и купирования метаболического ацидоза.

В различных условиях метаболический ацидоз проявляется в виде сдвига pH в кислую сторону накопления различных недоокисленных продуктов энергетического обмена: лактата, пирувата или ацетоновых тел, кислот цикла Кребса и жирных кислот (Н. Н. Яковлев, 1978; J. V. Bonventre, J. Y. Cheung, 1985; S. Matsuoka, J. M. Jarmakani, H. H. Young et al., 1986; K. Sato, Y. Kashiwaya, C. A. Keon et al., 1995; R. Ferrari, A. Cargnoni, P. Bernocchi et al., 1996; J. O. Holloszy, W. M. Kohrt, P. A. Hansen, 1998; R. F. Ranallo, E. C. Rhodes, 1998). При физической работе основными кислотными эквивалентами являются

лактат и пируват (Н. Н. Яковлев, 1976; А. С. Розенфельд, 1983; G. J. Kemp, C. H. Thompson, A. L. Sanderson et al., 1994; P. E. Bollaert, B. Robin-Lherbier, J. P. Mallie et al., 1994). Одновременно существенно снижается концентрация бикарбоната и содержание щелочных компонентов других буферных систем, в крови и тканях может развиваться гипокапния, обусловленная компенсаторным ускорением выведения углекислого газа (Н. И. Волков, 1969; Р. Г. Науменко, 1976; Ф. Д. Голлник, Л. Германсен, 1982; S. J. Chirtel, R. W. Barbee, W. N. Stainsby, 1984; M. Sherman, A. Matityahu, D. Campbell, 1996).

Согласно сложившимся представлениям, причина метаболического ацидоза при интенсивной мышечной нагрузке сводится к активации гликолиза, продуцирующего лактат и пируват, в силу недостаточной активности кислородзависимых систем энергообеспечения, т. е. в результате развития рабочей гипоксии. Развитие гипоксии при интенсивной работе и сопровождающее ее повышение степени восстановленности NADH как в цитозоле вследствие активации гликолиза, так и в митохондриях могут приводить, по крайней мере в кардиомиоцитах и скелетных мышцах, к активации апоптоза и некроза. Это обусловлено тем, что избыток цитозольного NADH способствует активации образования супероксидного аниона при гипоксии почти на порядок (K. M. Mohazzab-H, P. M. Kaminski, M. S. Wolin, 1997). А в митохондриях при торможении дыхательной цепи возникают одноэлектронные утечки, обеспечивающие образование активных форм кислорода (J. F. Turrens, A. Alexandre, A. L. Lehninger, 1985; A. P. Halestrap, K. Y. Woodfield, C. P. Connern, 1997; L. B. Becker, T. L. Van den Hoek, Z. H. Shao et al., 1999). Наряду с генерацией активных форм кислорода (АФК) гипоксические условия благоприятствуют повышению внутриклеточной концентрации ионов кальция (D. Stone, V. Darley-Usmar, D. R. Smith et al., 1989; M. S. Paller, E. L. Green, 1994; F. Di Lisa, R. Menabo, M. Canton et al., 1998) и торможению окисления NADH-зависимых субстратов (Л. Д. Лукьянова, 1997; L. Schild, T. Reinheckel, I. Wiswedel et al., 1997). Особенно усиливается образование АФК при переходе от гипоксических условий к нормоксическим (Y. Fujii, M. E. Johnson, G. J. Gores, 1994; A. P. Halestrap, K. Y. Woodfield, C. P. Connern, 1997; L. B. Becker, T. L. Van den Hoek, Z. H. Shao et al., 1999).

Указанные факторы, как известно, ответственны за запуск разными путями либо регуляторного каскада апоптоза – программируемой гибели клеток, либо некроза в зависимости от степени воздействия этих факторов на митохондрии (P. Bernardi, L. Scorrano, R. Colonna et al., 1999; M. Crompton, 1999, 2000; A. Halestrap, A. M. Davidson, 2000). При этом внутриклеточный ацидоз, обусловленный прежде всего избыточным гидролизом АТФ и накоплением лактата, может играть роль важного дополнительного фактора, запускающего апоптоз и некроз (N. H. Bishopric, D. J. Discher, S. Kaiser et al., 1999). Не исключено, что развитие апопотоза и митоптоза (программируемое разрушение митохондрий) играет важную роль в процессе создания новой популяции клеток, митохондрий, обладающих новыми, более пригодными для выполнения нагрузки свойствами. По крайней мере, как считает В. П. Скулачев (1982), V. P. Skulachev (1998), апоптоз и митоптоз выполняют функционально и эволюционно важную роль в освобождении и защите ткани от не справляющихся со своими функциями поврежденных клеток и митохондрий. С другой стороны, излишне активированный апоптоз и тем более некроз, запускаемый при открытии неспецифической проницаемой митохондриальной поры, могут существенно подорвать структурно-функциональную основу восстановления ткани после гипоксических реперфузионных нагрузок.

Мы считаем, что в конечном счете апоптоз и митоптоз необходимы как начальные этапы генерации новых популяций клеток и митохондрий, обеспечивающих становление адаптивных процессов. Но в случае грубого массирования повреждения клеток и митохондрий требуется весьма длительное время, измеряемое сутками, для их замены и восстановления функции тканей на новом, возможно, более высоком уровне. В исследованиях Н. Н. Яковлева (1959, 1974, 1976, 1978, 1983) было показано, что при жесткой перегрузке в результате предельных тренировочных нагрузок для восстановления функций спортсмена и активности ферментов его митохондрий требуется как минимум 4–5 суток отдыха. Для обеспечения текущего восстановления, необходимого для оперативной компенсаторной перестройки, следует избегать условий, сопровождающихся развитием массированного апоптоза и митоптоза. Соответственно при разработке методов и приемов, повышающих устойчивость и адаптивность организ-

ма, в частности, при интенсивных физических нагрузках, ключевым становится анализ механизмов развития и коррекция метаболического ацидоза в условиях рабочей гипоксии.

Согласно существующим представлениям, для купирования метаболического ацидоза необходимо: а) активировать доставку кислорода и окисление лактата и пирувата; б) увеличить тем или иным образом активность пируватдегидрогеназы; в) ускорить использование лактата и пирувата в глюконеогенезе; г) снизить интенсивность гликолиза или уменьшить интенсивность выполняемой работы, приведя ее в соответствие с возможностями кислородтранспортных и кислородзависимых систем энергообеспечения; д) повысить буферную емкость химических буферных систем организма путем введения бикарбоната или иных щелочных компонентов, например трис-буфера.

Перечисленные меры легко осуществить in vitro, но на уровне целостного организма в большинстве случаев они оказываются либо труднореализуемыми, либо в принципе невозможными и малоэффективными. Например, активация кислородной доставки ограничена индивидуальным развитием и физиологическими возможностями внешнего дыхания, сердечно-сосудистой системы, гемодинамики и массообмена. Легко достигаемая in vitro и в экспериментах на животных активация пируватдегидрогеназного комплекса после введения дихлорацетата для человека может быть чревата побочными последствиями. А введение избытка бикарбоната, действительно способного значительно защелачивать плазму крови, не облегчает выполнение интенсивной мышечной нагрузки (A. J. Poulus, H. J. Doctor, H. G. Westra, 1974; P. Bollaertet, B. Robin-Lherbier, J. P. Mallie et al., 1994; K. J. Portington, D. D. Pascoe, M. J. Webster et al., 1998; R. H. Mak, 1999; R. C. Morris, O. Schmidlin, M. Tanaka et a1., 1999). Искусственные сдвиги направления и интенсивности метаболических путей посредством гормонального воздействия и использования экстремальных диет, способствующих гиперактивации анаболических процессов, глюконеогенеза, подавлению или стимуляции гликолиза или липолиза, оказались губительными для здоровья спортсменов и не обеспечили стабильно воспроизводимого повышения работоспособности. В конечном счете многие из гормональных и других средств метаболического воздействия были запрещены для употребления в спортивной практике. Возник вопрос: можно ли в принципе уменьшить глу-

бину или повысить переносимость метаболического ацидоза без снижения, а лучше даже при повышении работоспособности?

Выполненный нами теоретический анализ и полученные ранее результаты позволили выдвинуть гипотезу о том, что такая возможность существует (А. С. Розенфельд, 1983; Е. И. Маевский, А. С. Розенфельд, М. В. Вазагашвилли и др., 1996; Е. И. Маевский, Е. В. Гришина, А. С. Розенфельд и др., 1999; Е. И. Маевский, А. С. Розенфельд, Е. В. Гришина, 1999; Е. И. Маевский, Е. В. Гришина, А. С. Розенфельд и др., 2000). В основе развиваемых подходов лежит анализ механизмов образования и утилизации ионов водорода при АТФ-азных нагрузках и роли митохондрий в обеспечении АТФ-азных нагрузок в клетках (М. Н. Кондрашова, 1996).

Суть гипотезы состоит в предположении, что *для поддержания pH без уменьшения интенсивности АТФ-азных нагрузок следует активировать митохондриальную систему энергообеспечения.* Такая возможность другими исследователями практически не изучалась. Очевидно, это связано с тем, что при изучении регуляции кислотно-основного состояния клеток, тканей и целостного организма основное внимание уделялось анализу состояния различных буферных систем и величине их буферной емкости, а не процессам метаболизма (K. Sahlin, R. C. Harris, E. Hultman, 1975; K. Sahlin, R. S. Harris, R. Nylind et al., 1976; K. Sahlin, G. Palmskog, E. Hultman, 1978; A. Ross, W. Boron, 1981).

В последние годы внимание многих исследователей было направлено на выявление вклада ионообменных систем, активного и пассивного транспорта ионов через клеточную мембрану, прежде всего с участием Na^+/H^+-обменника и различных ион-транспортирующих АТФ-аз (G. J. Kemp, C. H. Thompson, A. L. Sanderson et al., 1994; U. Russ, C. Balser, W. Scholz et al., 1996). Возможности участия этих систем в регуляции кислотно-основного состояния, казалось бы, не ограничены, так как концентрация ионов Na^+ вне клетки на шесть, а внутри клетки на четыре порядка больше концентрации ионов водорода. Однако ингибирование Na^+/H^+-обмена существенно не влияет на сдвиг pH при сколько-нибудь длительных нагрузках (G. J. Kemp, C. H. Thompson, A. L. Sanderson et al., 1994; M. Hendrikx, K. Mubagwa, F. Verdonck et al., 1994). С точки зрения анализа состояния химических буферных систем главным ограничителем в поддержании pH

является конечность их буферной емкости, особенно в зонах локально ограниченного кровотока и ограничения производства бикарбоната при гипоксии. Следует отметить, что даже увеличение потока во всех этих системах не обеспечивает одновременного повышения работоспособности, напротив, активация Na^+/H^+-обменника при развитии кислородного голодания сопровождается одновременным увеличением потоков ионов Ca^{2+}, что приводит к перегрузке митохондрий ионами Ca^{2+}, и нарушением энергопродукции (W. Rouslin, 1991; M. Hendrikx, K. Mubagwa, F. Verdonck et al., 1994; U. Russ, C. Balser, W. Scholz et al., 1996). Такие изменения могут сопровождаться гибелью клеток вследствие открытия неспецифической поры и запуском апоптоза или некроза (P. Bernardi, 1999; P. Bernardi, L. Scorrano, R. Colonna et al., 1999; M. Crompton, 1999; A. P. Halestrap, E. Doran, J. P. Gillespie et al., 2000).

Участие митохондрий в поддержании pH до последнего времени рассматривалось с позиций их вклада в Ca^{2+}/H^+-обмен, в окисление недоокисленных лактата, пирувата и кетоновых тел, в активацию глюконеогенеза и аммониогенеза или в образование CO_2 (Y. Wang, G. J. Heigenhauser, C. M. Wood, 1994). Известное по экспериментам in vitro ощелачивание внемитохондриального пространства при окислительном фосфорилировании, неизбежно активируемом при энергообеспечении любой работы – АТФ-азной нагрузки, не только не рассматривалось как средство стабилизации pH и уменьшения метаболического ацидоза, но и ставилось под сомнение (M. Brand, A. Lehninger, 1977; L. Opie, 1980; D. Wilkie, 1980; A. Ross, W. Boron, 1981) или полностью отрицалось (K. Sahlin, R. C. Harris, E. Hultman, 1975; K. Sahlin, 1978).

Теоретически вклад митохондрий в поддержание pH при АТФ-азных нагрузках обусловлен, во-первых, реакциями окислительного фосфорилирования, во-вторых, в меньшей мере, – утилизацией недоокисленных продуктов гликолиза (W. Gevers, 1977). Возможность уменьшения метаболического ацидоза за счет увеличения вклада окислительного фосфорилирования обусловлена тем, что источником H^+ при любой нагрузке являются собственно АТФ-азные реакции, обеспечиваемые ресинтезом АТФ в гликолизе (W. Gevers, 1979; J. Lowenstein, 1993).

Теоретически очевидно, что накопление ионов водорода, возникших в процессе АТФ-азной реакции, прямо пропорционально образованию лактата и пирувата. Следовательно, в случае увеличения вклада гликолиза в энергообеспечение ацидоз должен нарастать. И напротив, при увеличении вклада митохондрий и реакций окислительного фосфорилирования ацидоз должен уменьшаться. Внешне это полностью соответствует сложившимся ранее представлениям о том, что активация гликолиза ответственна за развитие метаболического ацидоза. По сути, уменьшается доля окислительного фосфорилирования в обеспечении АТФ-азных нагрузок при сохранении последних на достаточно высоком уровне.

Недооценка роли митохондрий в уборке ионов водорода, образующихся в АТФ-азных реакциях (при нагрузке), связана в первую очередь с трудностями экспериментального обнаружения этого вклада. Необходимо было использовать принципиально иные экспериментальные подходы, которые позволили бы промоделировать генерацию H^+ в АТФ-потребляющих реакциях и определить при этом возможную долю митохондриального энергообеспечения в предотвращении развития ацидоза. До настоящего времени такой эксперимент никем не был выполнен.

В случае решения задачи выявления вклада митохондрий в поддержание pH при АТФ-азных нагрузках возникла бы следующая проблема: каким образом увеличить вклад митохондрий в условиях интенсивной нагрузки? Причем необходимо было принимать во внимание, что любая достаточно значительная по мощности физическая работа сопровождается развитием рабочей гипоксии, обусловленной существенным повышением потребления кислорода при относительно недостаточной активации систем доставки кислорода. В такой ситуации следовало учитывать особенности превращений субстратов в митохондриях и возможность их окисления при повышении восстановленности переносчиков в дыхательной цепи. На основании развиваемых М. Н. Кондрашовой представлений о возможности преимущественного окисления сукцината в условиях гипоксии (М. Н. Кондрашова, Е. И. Маевский, Г. В. Бабаян, 1973; М. Н. Кондрашова, Е. И. Маевский, 1978) при планировании настоящей работы мы полагали необходимым исследовать механизмы субстратной поддержки энергодающих реакций митохондрий для повышения их вклада в обеспече-

ние АТФ-азных нагрузок и, следовательно, в обеспечение коррекции метаболического ацидоза. При этом предполагалось изучение указанных процессов как на уровне изолированных тканевых препаратов, в первую очередь на уровне митохондрий, так и в условиях целостного организма. Здесь следует отметить, что ионы водорода, образующиеся в АТФ-азных реакциях, появляются вне клетки в симпорте с лактатом, пируватом или в результате Na^+/H^+-обмена (G. J. Kemp, C. H. Thompson, A. L. Sanderson et al., 1994; A. Mobasheri, R. Mobasheri, M. J. Francis et al., 1998; M. Karmazyn, 1998). Поэтому на уровне целостного организма развитие метаболического ацидоза проявляется в виде повышения концентрации лактата и пирувата и падения концентрации натриевых солей буферных систем. Таким образом, для разработки средств купирования метаболического ацидоза, вызываемого АТФ-азными нагрузками, мы полагали необходимым провести систематическое изучение формирования адаптивных реакций целостного организма при экстремально высоких физических нагрузках, сопровождающихся развитием ацидоза и мобилизацией систем регуляции кислотно-основного состояния на различных уровнях организации.

Один из наиболее сложных вопросов, стоявших перед нами в начале исследования, заключался в том, как и почему можно на уровне целостного организма подходить к проблеме коррекции нагрузочного ацидоза, исходя из сугубо «митохондриальных» представлений. Кратко ответ выглядит следующим образом. В условиях организма химические буферные системы обеспечивают стабильное поддержание pH, несмотря на малую буферную емкость. Концентрация бикарбоната – основного щелочного эквивалента буферов плазмы крови – порядка 25 мМ. Общая буферная емкость бикарбонатной системы при объеме циркулирующей крови 5 л не достигает 125 мМ. Для обеспечения субмаксимальной по мощности работы, например на уровне 300 Вт в минуту, если вся работа носит аэробный характер, требуется дополнительно 3 л кислорода, что при величине отношения АДФ/О, равном в среднем 2,5, эквивалентно расходу и воспроизводству 670 мМ АТФ. Поскольку при работе такой мощности возникает кислородный долг, превышающий 50% энергетической потребности, постольку 335 мМ АТФ воспроизводится «анаэробно» в субстратном фосфорилировании в реакциях гликолиза. Соответст-

венно 335 м-эквивалентов ионов водорода может поступить в кровоток, и, если бы буферная система крови была замкнута, ее буферная емкость полностью была бы исчерпана за 20 с. Благодаря работе химических буферов в открытой проточной системе во взаимодействии с гемоглобиновым буфером, физиологическими системами выведения кислотных эквивалентов и метаболическими процессами, утилизирующими ионы водорода в реакциях окислительного фосфорилирования, окисляющими лактат до CO_2 (необходимого для воспроизводства бикарбоната) и вовлекающими лактат в глюконеогенез, химическая буферная емкость крови и величина pH поддерживаются весьма стабильно. Так, после нагрузки 300 Вт в течение 3 мин буферная емкость плазмы падает кратковременно всего на 3–7 мМ в зависимости от уровня тренированности спортсмена.

Анализируя отдельные элементы открытой буферной системы крови, мы предположили, что одним из узких мест, обладающим резервной (не используемой в полной мере) активностью, является митохондриальная система энергообеспечения. У высокотренированных спортсменов системы выведения кислотных эквивалентов и доставки кислорода работают на близком к физиологическому пределу уровне. При достижении индивидуального предела внешнего дыхания и сердечно-сосудистой системы по доставке кислорода к работающим скелетным мышцам развивается нагрузочная гипоксия и метаболический ацидоз. И тогда вопрос поддержания энергетики митохондрий сводится к обеспечению их субстратом, способным окисляться в условиях гипоксии.

Представленная работа отражает результаты экспериментального исследования, подтвердившего гипотезу о преимущественном окислении сукцината в условиях кислородного дефицита. Именно поэтому в качестве средства метаболической коррекции ацидоза был использован сукцинат, окисляющийся, в отличие от NAD-зависимых субстратов, при высоком уровне NADH и поддерживающий тем самым воспроизведение АТФ в реакциях окислительного фосфорилирования в гипоксических условиях. Увеличение вклада митохондрий в энергообеспечение сказывается на функционировании не только скелетных мышц, но и всех других тканей, в частности миокарда, печени и почек. При этом может увеличиваться ударный объем сердца за счет возрастания полноты расслабления миокарда во время диасто-

лы (очень чувствительного к энергетическому дефициту) и повышаться минутный объем без возрастания частоты сердечных сокращений. На уровне печени и почек может существенно возрастать интенсивность вовлечения лактата в глюконеогенез.

В процессе работы выяснилось, что даже несубстратные (малые) концентрации сукцината достаточны для того, чтобы вызвать сдвиг кривой диссоциации оксигемоглобина вправо, что способствует облегчению доставки кислорода и поддержанию бикарбонатной буферной системы. Одновременно происходит улучшение венозного оттока, поскольку сукцинат, по-видимому, обладает вазодиляторным действием.

Таким образом, выбор сукцината в качестве средства метаболической коррекции ацидоза обеспечил более эффективное функционирование нескольких сопряженно работающих механизмов в открытой системе естественной коррекции метаболического ацидоза: увеличение вклада митохондрий в ресинтез АТФ – уменьшение количества ионов водорода, остающихся в цитозоле при работе АТФ-аз актомиозина и саркоплазматического ретикулума; улучшение работы сердечно-сосудистой системы как на центральном, так и на периферическом участках и дополнительное усиление участия «гемоглобинового буфера» в доставке кислорода и в поддержании буферных систем при явно лучших условиях для окисления и вовлечения недоокисленного лактата и других метаболитов в глюконеогенез.

Успех коррекции метаболического ацидоза с помощью сукцината свидетельствует о том, что «митохондриальный подход» оказался продуктивным в условиях организма. Очевидно, это связано с одной из фундаментальных закономерностей функционирования иерархическим образом организованных систем, на которую обратил наше внимание еще в 1978 г. Е. Е. Сельков: физиологические и биохимические регуляторные системы высшего уровня организации поддерживают, многократно усиливают и упреждают регуляторные связи, возникшие на низшем стехиометрическом уровне организации метаболизма.

Глава 1. Метаболический ацидоз – следствие интенсивной нагрузки

1.1. Основные элементы регуляции энергетического обмена в мышцах при нагрузке

Мышцы являются одним из наиболее важных потребителей энергии в организме человека. При переходе от покоя к физической активности энергетические потребности скелетных мышц и систем, обеспечивающих их функционирование, возрастают многократно (Н. Н. Яковлев, 1983; К. Бэгшоу, 1985). Непосредственно в мышечной клетке потребителями энергии являются следующие процессы: а) поддержание трансмембранного потенциала (градиента ионов и воды) на наружной клеточной мембране и в Т-системе; б) АТФ-азы саркоплазматического ретикулума; в) АТФ-азы актомиозина; г) энергозависимые реакции биосинтеза углеводов, липидов, белков и других соединений, входящих в состав внутриклеточных структур.

В общем виде, независимо от типа мышц, соотношение потребления энергии в процессе мышечного сокращения и расслабления можно представить следующим образом. При развитии потенциала действия происходит деполяризация клеточной мембраны, внутрь клетки входят ионы натрия (в кардиомиоцитах также ионы Ca^{++}) (А. А. Болдырев, 1977). Под влиянием входящего Na^{+} тока происходит выброс ионов Ca^{++} из саркоплазматического ретикулума и (или) вход Ca^{++} в клетку через внешнюю мембрану. В результате локально увеличивается внутриклеточная концентрация ионов Ca^{++} с 10^{-8} М до 10^{-6} М. Ионы кальция связываются с тропонином, и АТФ-аза актомиозина освобождается от блокирующего действия тропонина. Происходит сокращение мышечных фибрилл. При этом Na^{+}/K^{+}-АТФ-аза клеточной мембраны гидролизует АТФ и за счет его энергии откачивает вошедшие ионы Na^{+} в обмен на K^{+}, т. е. восстанавливает электрохимический потенциал и градиент катионов на наружной клеточной мембране. АТФ-азы саркоплазматического ретикулума и наружной клеточной мембраны за счет гидролиза АТФ обеспечивают восстановление низкой концентрации ионов Ca^{++} в цитозоле. В результате снижения внутриклеточной концентрации ионов Ca^{++} распадается

комплекс Ca^{++}-тропонин. Освобождающийся тропонин блокирует взаимодействие актомиозина с АТФ, и происходит процесс расслабления. Причем, судя по всему (in vitro и in vivo), наиболее чувствительным к изменению энергетического состояния является процесс расслабления, в котором ведущую роль играют кальциевые АТФ-азы саркоплазматического ретикулума и наружной клеточной мембраны, откачивающие избыток Ca^{++} против огромного кальциевого градиента. Поэтому одним из самых ранних симптомов энергетического дефицита является развитие контрактуры, т. е. нарушение процесса расслабления (А. Ленинджер, 1974; G. W. Mainwood, J. M. Renaud, 1985; D. G. Behm, D. M. St-Pierre, 1998).

Несмотря на то что соотношение энерготрат в мышце таково, что более 70% энергии используется АТФ-азой актомиозина, а саркоплазматическим ретикулумом – не более 25% (G. Langer, 1974), последний благодаря высокому сродству к АТФ может весьма успешно конкурировать за АТФ с АТФ-азой актомиозина (N. Voollestad, E. Verburg, 1996). Некоторые исследователи полагают, что именно в силу того, что АТФ-аза актомиозина проигрывает конкуренцию, при гипоксии может наблюдаться отрицательный инотропный эффект – падение амплитуды и силы сокращения (M. Hendrikx, K. Mubagwa, F. M. Verdonck et al., 1994).

Поскольку внутриклеточная концентрация АТФ невелика, энергетическим источником для мышечного сокращения являются процессы воспроизводства АТФ из АДФ и фосфата. Имеющейся концентрации АТФ недостаточно для того, чтобы обеспечить энерготраты при пиковых нагрузках более чем в течение 1–2 с. Продолжение мышечной деятельности требует подключения других энергетических источников для ресинтеза АТФ, что связано с соответствующим уменьшением мощности мышечной работы. Первым источником ресинтеза АТФ является креатинфосфатный буфер. Концентрация креатинфосфата (КрФ) в мышцах может достигать 20–40 мМ, т. е. в 5–10 раз превышать концентрацию АТФ. Однако через 12–15 с работы максимальной интенсивности пул КрФ тоже истощается. Это то время, которое необходимо для активации метаболических процессов, поставляющих АТФ за счет окислительно-восстановительных превращений: гликолитической оксидоредукции и окислительного фосфорилирования. При этом гликолиз может поддерживать продукцию АТФ на

субмаксимальном уровне интенсивности в течение 40–60 с. Более длительная нагрузка возможна только при сниженной интенсивности и обеспечивается преимущественно за счет аэробных окислительных процессов. Схематически чередование и изменение доли участия различных источников энергии в энергообеспечении показано на рис. 1 (Я. Мусил, О. Новакова, К. Кунц, 1984).

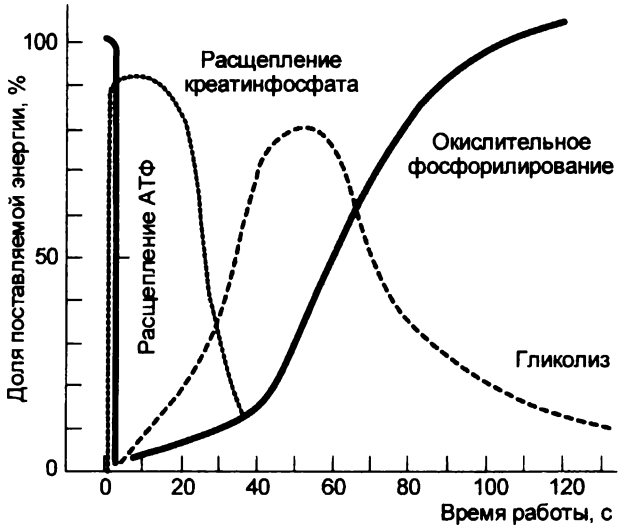


Рис. 1. Смена источников энергии в процессе работы мышц

Отметим, что в мышцах при аэробном энергообеспечении, когда ведущим источником АТФ являются митохондрии с протекающим в них циклом трикарбоновых кислот и β-окислением жирных кислот, весьма важную роль продолжает играть КрФ. При этом он выступает не столько в роли энергетического буфера при пиковых нагрузках, сколько в качестве переносчика богатого энергией фосфата от митохондрий к миофибриллам (В. Я. Изаков, Г. П. Иткин, В. С. Мархасин и др., 1981). Дело в том, что малая скорость диффузии АТФ и АДФ (весьма крупных заряженных молекул) значительно ограничивает доставку АДФ от миофибрилл к митохондриям и прохождение АТФ от митохондрий к миофибриллам. В мышечных клетках это ограничение снимается за счет использования быстро диффундируемых маленьких молекул креатина и креатинфосфата. При этом креатинкина-

за митохондрий находится, очевидно, в тесной связи с аденилаттранслоказой (В. А. Сакс, В. Н. Люлина, Г. Б. Черноусова, 1975), так что выходящая из митохондрий молекула АТФ сразу вступает в креатинкиназную реакцию

$$Кр + АТФ \rightarrow КрФ + АДФ.$$

Образовавшаяся молекула АДФ возвращается аденилаттранслоказой во внутримитохондриальный компартмент и вступает в АТФ-синтетазную реакцию. КрФ диффундирует до миофибрилл, где ассоциированная с миофибриллами креатинкиназа ведет реакцию в обратном направлении – образуются креатин и АТФ. Последний используется АТФ-гидролазой актомиозина или саркоплазматического ретикулума. Креатин и неорганический фосфат, образующийся в АТФ-гидролазной реакции, диффундируют затем к митохондриям.

Важным фактором в энергообеспечении является доступность углеводов и липидов, определяемая величиной и локализацией соответствующих депо. По мере роста тренированности депо субстратов увеличивается по массе и приближается к непосредственным пользователям: возрастает величина гликогенных депо вблизи миофибрилл и появляются липидные вакуоли непосредственно в мышечных клетках около митохондрий (Н. Н. Яковлев, 1974; R. F. Ranallo, E. C. Rhodes, 1998).

Увеличение физической нагрузки, частоты и силы сокращения миофибрилл сопровождается повышением скорости гидролиза АТФ. АТФ-азами актомиозина потребляется порядка 70% АТФ, саркоплазматическим ретикулумом – 20–25% АТФ и K^+/Na^+-АТФ-азой – 5–7% АТФ (G. A. Langer, 1974). Суммарная скорость гидролиза АТФ и представляет собой обобщенную АТФ-азную нагрузку в энергетике мышечных клеток (В. В. Дынник, 1984). Для каждого вида физической работы характерна своя стационарная скорость гидролиза АТФ (Ф. Голлник, Л. Германсен, 1982), обеспечиваемого окислением соответствующих субстратов.

В покое мышцы в зависимости от их типа и уровней различных субстратов и гормонов в крови, характера питания могут использовать как углеводы, так и липиды, а при голодании и кетоновые тела. При переходе от покоя к нагрузке и особенно при выполнении работы максимальной и субмаксимальной интенсивности основными окис-

ляемыми субстратами становятся углеводы (E. Hultman, J. Berstrom, N. McLennan et al., 1967; J. Bergstroem, P. Fuerst, F. Gellyas et al., 1972; J. O. Holloszy, W. M. Kohrt, P. A. Hansen, 1998; A. Wagenmakers, 1998). Происходит активация реакций гликогенолиза и гликолиза, идущих в цитоплазме, цикла Кребса и окислительного фосфорилирования, протекающих в митохондриях. Важными факторами, обеспечивающими их синхронную регуляцию, являются креатинкиназная (КК) и аденилаттранслоказная (АДТ) реакции, как ясно из вышеизложенного, а также аденилаткиназа (АДК) и Н-транспортные цитозоль-митохондриальные челноки.

В тканях животных основными цитозоль-митохондриальными переносчиками водорода являются малат-аспартатный и α-глицерофосфатный Н-челноки (J. R. Williamson, S. W. Schaffer, C. Ford et al., 1976). Малат-аспартатный Н-челнок осуществляет перенос водорода с цитоплазматического NADH на митохондриальный NAD^+, а α-глицерофосфатный – с цитоплазматического NADH на флавопротеид митохондрий. Поскольку пируват и NADH образуются в гликолизе в стехиометрических количествах, то при недостаточной активации Н-челноков пируват может быть использован в качестве акцептора восстановительных эквивалентов в лактатдегидрогеназной реакции (ЛДГ). В противном случае накапливается NADH и скорость гликолиза резко падает вследствие угнетения дегидрогеназы 3-фосфоглицеринового альдегида. В аэробных условиях значительная часть образующегося в гликолизе пирувата транспортируется в митохондрии, где используется в пируватдегидрогеназной (ПДГ) реакции.

В стационарных условиях скорость работы всех Н-транспортных челноков соизмерима со скоростью окисления пирувата:

$$V_{ПДГ} = V_{челноков} \equiv V_{МДГ} + V_{α\text{-}ГФДГ},$$

т. е. скорости окисления пирувата (протока через цикл Кребса) и Н-транспортных челноков должны быть почти одинаковы при окислении глюкозы или лактата. В условиях изменяющейся АТФ-азной нагрузки, как показывают результаты математического моделирования, скорости гликогенолиза, цикла Кребса и Н-транспортных челноков, как правило, меняются синхронно (В. В. Дынник, 1978; В. В. Дынник, Е. И. Маевский, 1979). Важным для понимания механизмов регуляции этих систем является диапазон стабилизации

АТФ – величина диапазона скоростей АТФ-азных нагрузок, в котором энергетический метаболизм способен стабилизировать высокий уровень АТФ (E. Selkoy, 1975; Р. Бонензак, Е. Е. Сельков, 1977). В стационарном режиме суммарная скорость синтеза АТФ в клетке ($V_ф$) всегда равна суммарной скорости АТФ-азной нагрузки (V_a):

$$АТФ \underset{V_ф}{\overset{V_a}{\rightleftharpoons}} АДФ + P_i; \quad V_ф = V_a.$$

До тех пор, пока $V_ф$ увеличивается с ростом V_a, в системе поддерживается стационарный уровень АТФ. Критической является точка, в которой $V_ф = V_ф^{max}$, поскольку при последующем увеличении V_a уровень АТФ резко падает. Именно величина $V_a^{max} = V_ф^{max}$ определяет величину диапазона стабилизации АТФ в клетке. Выход за пределы этого диапазона сопровождается переключением энергетики в низкоэнергетическое состояние (В. В. Дынник, Е. Е. Сельков, 1978), дезаминированием адениновых нуклеотидов (E. G. Krebs, C. Gonzaler, J. B. Posner et al., 1964; Р. Н. Маепраа, K. O. Raivio, M. P. Kekomaeki, 1968; Э. Ф. Деркачев, В. А. Алексеев, М. Р. Константинов и др., 1976) и зачастую гибелью клеток.

Даже небольшое уменьшение стационарного уровня АТФ с увеличением нагрузки приводит к изменению уровня АДФ почти на порядок. Например, если сумма аденилатов в клетке $A_q \approx 10$ мМ и концентрация АТФ уменьшается от 9,8 до 8,5 ÷ 9 мМ, то концентрация АДФ растет от 0,1 до 1–1,25 мМ (K. Sahlin, A. Alvestrand, R. Brandt et al., 1978).

Благодаря высокой активности аденилаткиназы и креатинкиназы в цитоплазме такие изменения АДФ приводят к аналогичным изменениям АМФ и $Ф_н$ в цитоплазме (рис. 2, *а*) – ключевых регуляторов гликолиза. Увеличение концентраций активаторов АМФ и $Ф_н$ и снижение уровня ингибитора КрФ может приводить к росту скорости гликогенолиза ($V_г$) с увеличением нагрузки (рис. 2, *в*).

Одновременно накапливаются лактат по мере роста $V_г$ и NADH ($NADH_c$) в цитоплазме (см. рис. 2, *в*). Аналогичным образом при участии транслоказы адениловых нуклеотидов увеличение уровня АДФ в цитозоле ($АДФ_c$) приводит к росту концентрации АДФ в митохондриях ($АДФ_м$), что вызывает активацию дыхания и снижение сте-

пени восстановленности митохондриального NADH ($NADH_м$) (рис. 2, *б*) – ключевых регуляторов цикла Кребса (В. В. Дынник, 1977; В. В. Дынник, А. В. Темнов, 1977). Скорость протока через цикл Кребса (V_c) увеличивается (рис. 2, *г*) (R. G. Weiss, R. Kalil-Filho, A. Herskowitz et al., 1993; G. F. Mason, R. Gruetter, D. L. Rothman et al., 1995). При насыщающих значениях концентрации соответствующих регуляторов скорости гликогенолиза ($V_г$) и окисления пирувата в цикле Кребса достигают максимальных значений (см. рис. 2, *в*, *г*).

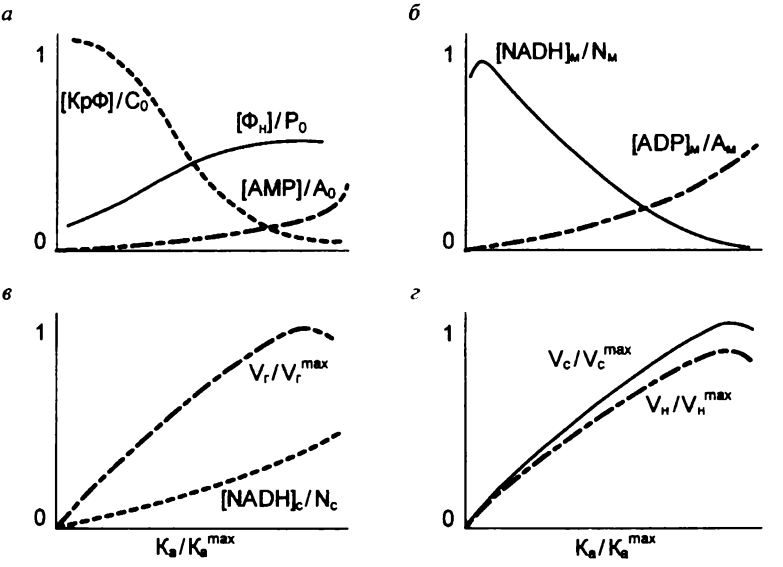


Рис. 2. Зависимости стационарных концентраций различных метаболитов мышечных клеток и скоростей гликогенолиза ($V_г$), цикла Кребса (V_c) и малат-аспартатного челнока ($V_н$) от константы скорости АТФ-азной нагрузки (K_a), рассчитанные на основе математической модели В. В. Дынника (В. В. Дынник, Е. И. Маевский, 1979):

A_0 – суммарная концентрация адениловых нуклеотидов в клетке; C_0 – суммарная концентрация креатинфосфата и креатина в клетке; P_0 – суммарная концентрация органических и неорганических фосфатов в клетке; N_c – суммарная концентрация NAD и NADH в цитозоле; $A_м$ – суммарная концентрация адениловых нуклеотидов в митохондриях; $N_м$ – суммарная концентрация NAD и NADH в митохондриях

Одновременное снижение степени восстановленности NADH и других переносчиков дыхательной цепи и увеличение $NADH_c$ приводят к активации цитозоль-митохондриальных челноков ($V_н$), т. е. скорость окисления $NADH_c$ челноками также растет с нагрузкой (см. рис. 2, *г*).

Таким образом, повышение уровня АДФ в цитоплазме при возрастании нагрузки является первичным сигналом, приводящим к изменению концентраций вторичных регуляторов гликогенолиза (АМФ, $Ф_н$, КрФ), цикла Кребса, окислительного фосфорилирования ($АДФ_м$, $NADH_м$) и малат-аспартатного челнока ($NADH_c$ и $NADH_м$).

Анализ представленных в литературе данных с помощью математического моделирования (В. В. Дынник, Е. И. Маевский, 1979; В. В. Дынник, 1984) показал, что неорганический фосфат ($Ф_н$) можно рассматривать как один из ключевых метаболитов в синхронной регуляции всех подсистем углеводного энергетического обмена. Повышение уровня $Ф_н$ в физиологическом диапазоне концентраций приводит к возрастанию скоростей гликогенолиза (Э. Рэкер, 1967), цикла Кребса (B. Sacktor, 1970), окислительного фосфорилирования (G. Boehme, K. J. Hartung, W. Kunz, 1978) и малат-аспартатного Н-транспортного челнока (K. T. La Noue, J. Bryta, D. J. Bassett, 1974). Донором $Ф_н$ в мышечной клетке является КрФ, поэтому КК-система играет важную роль в мышечных клетках, обеспечивая повышение уровня $Ф_н$ при возрастании АТФ-азных нагрузок в стационарных условиях. Увеличение внутриклеточной концентрации неорганического фосфата вследствие активации гидролиза АТФ и использования креатинфосфата также может влиять на кислотно-основные системы клеток. Если значительная часть фосфата появляется в результате распада АТФ, то это приводит к сдвигу pH в кислую сторону. Если основным источником фосфата является креатинфосфат, у которого константа диссоциации кислотных остатков близка к таковой для неорганического фосфата, то это приводит к увеличению буферной емкости клетки без сдвига pH. В любом случае прирост концентрации фосфата обеспечивает помимо аллостерического воздействия на ряд ферментов стехиометрическую активацию фосфат-акцепторных систем гликолиза и окислительного фосфорилирования, транспорта субстратов в митохондрии, скорости протока в субстратном фосфорилировании на уровне α-кетоглутарата, а также набухание митохондрий, что,

в свою очередь, сопровождается ускорением работы дыхательной цепи и облегчением транспорта субстратов, катионов и адениловых нуклеотидов через митохондриальную мембрану.

Сокращенная блок-схема взаимодействия различных систем углеводного энергетического обмена мышечных клеток при увеличении АТФ-азной нагрузки (уровня АДФ) представлена на рис. 3 (В. В. Дынник, Е. И. Маевский, 1979). Пунктирными стрелками на рисунке показаны аллостерические положительные (+) и отрицательные (–) воздействия различных эффекторов. Поскольку скорости гликолиза ($V_г$) и цикла Кребса ($V_с$) увеличиваются, то и суммарная скорость фосфорилирования АДФ ($V_н$) также растет с нагрузкой.

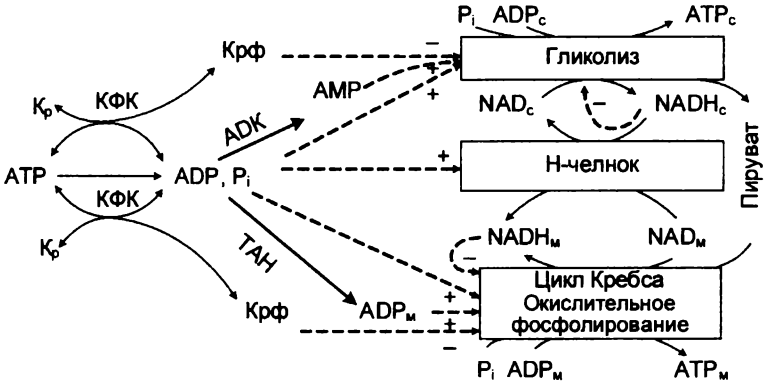


Рис. 3. Блок-схема регуляции углеводного обмена:
КФК – креатинфосфокиназа; ADK – аденилаткиназа; ТАН – транслоказа адениловых нуклеотидов

В сердечной мышце при окислении углеводов максимальные скорости гликолиза, цикла Кребса и Н-челноков могут быть одного порядка (D. Pette, 1966, 2000; R. G. Weiss, R. Kalil-Filho, A. Herskowitz et al., 1993); в этих условиях ресинтез АТФ за счет гликолиза составляет примерно 1/13 часть общей энергопродукции. На наш взгляд, это возможно лишь в том диапазоне АТФ-азных нагрузок, где системы доставки кислорода обеспечивают увеличение степени окисленности пиридиннуклеотидов в митохондриях с ростом K_a, как это показано на рис. 2, *б*. Хорошо известно, что при субмаксимальных и тем более максимальных по мощности нагрузках системы доставки и потребле-

ния кислорода не обеспечивают поддержание высокой степени окисленности NAD. Иными словами, при интенсивной физической работе развивается рабочая гипоксия (Ф. Голлник, Л. Германсен, 1982; Н. А. Фомин, 1995).

В такой ситуации может изменяться как доля гликолиза в энергообеспечении, так и обычная последовательность превращений субстратов в цикле трикарбоновых кислот. Если относительно активации гликолиза при рабочей гипоксии существует достаточно полное понимание, то в отношении возможности перестройки в реакциях цикла Кребса при гипоксии представления весьма фрагментарны. Имеющиеся в литературе данные свидетельствуют о том, что активность разных ферментов цикла и ассоциированных с ними реакций входа и оттока субстратов меняется при гипоксии неоднозначно и в разной степени (Л. Д. Лукьянова, 1997; И. П. Ашмарин, П. В. Стукалов, Н. Д. Ещенко, 1999). Согласно исследованиям выполненным в лаборатории М. Н. Кондрашовой, теоретически можно было представить активацию окисления сукцината, монополизацию им дыхательной цепи и компенсаторное усиление воспроизводства сукцината в необычной последовательности реакций, например в виде «цикла Брауншейна» (М. Н. Кондрашова, 1991). Однако экспериментальные свидетельства наличия таких превращений до последнего времени носили в основном косвенный характер. Поэтому одной из задач нашего исследования был поиск прямых свидетельств переключения энергетического обмена при гипоксии на преимущественное окисление сукцината.

1.2. Основные метаболические факторы, ограничивающие мышечную активность

Наряду с механизмами, ограничивающими мышечную активность на физиологическом уровне, такими как психоэмоциональное утомление (Ю. Г. Бобков, В. М. Виноградов, В. Ф. Катков и др., 1984), возможный блок нервно-мышечной передачи или нарушение электромеханического сопряжения из-за дисбаланса катионов (А. А. Болдырев, 1977), развитие рабочей гипоксии, на внутриклеточном уровне также можно выделить факторы, ответственные за утомление.

В процессе мышечной работы утилизация АТФ существенно ускоряется и требуется мобилизация всех звеньев энергетического обмена для восстановления Na^+/K^+-баланса, аккумуляции Ca^{2+} саркоплазматическим ретикулумом и обеспечения АТФ-азы актомиозинового комплекса. При высокоинтенсивных нагрузках скорость утилизации АТФ превышает скорость ее образования в гликолизе и окислительном фосфорилировании, вместе взятых, в результате этого падает концентрация АТФ, что сопровождается аккумуляцией ряда продуктов метаболизма, таких как ионы H^+, $Ф_н$, АМФ, АДФ, ИМФ. Соответственно нарушается Na^+/K^+-баланс, Ca^{2+}-цикл, актомиозиновое взаимодействие, падает пул аденилатов, нарастает ацидоз и развивается утомление. Такое утомление назвали метаболическим (A. N. Belcastro, T. A. Albisser, B. Littlejohn, 1996; H. Green, 1997), потому что все изменения касаются итермедиатов и кофакторов и в случае прекращения мышечной активности происходит достаточно быстрое восстановление почти всех метаболических характеристик, энергетики клеток, амплитуды и силы сокращений. Неоднократное повторение высокоинтенсивных нагрузок при увеличении их длительности без достаточного восстановительного периода в промежутках отдыха приводит к истощению внутриклеточных депо субстратов, в первую очередь гликогена. Утомление, обусловленное истощением субстратного депо, также относят к метаболическим видам утомления, но оно требует более длительных периодов восстановления.

К неметаболическому виду утомления относятся нарушения целостности внутриклеточных структур и такие ультраструктурные изменения, как дезориентация миофибрилл и повреждение цитоскелета клеток (A. N. Belcastro, T. A. Albisser, B. Littlejohn, 1996; H. Green, 1997).

При рассмотрении лимитирующих звеньев энергетического обмена во время метаболического утомления прежде всего следует учитывать соотношение величины развиваемой АТФ-азной нагрузки (V_a) и времени (T), в течение которого система способна функционировать в стационарном режиме при заданной работе (В. В. Дынник, 1977, 1984). В зависимости от этого соотношения можно выделить несколько факторов, ответственных за снижение развиваемой системой АТФ-азной нагрузки. Следует отметить, что это снижение является важным предохранительным механизмом, защищающим мышцы от перегрузки.

При действии нагрузок сверхмаксимальной интенсивности одним из предохранительных механизмов может быть угнетение АТФ-аз актомиозина и саркоплазматического ретикулума, определяющих величину АТФ-азной нагрузки (V_a) (N. Nanninga, 1962; B. Lee, 1965; B. Chaplain, 1966).

Лимитирующей стадией при гидролизе АТФ этими АТФ-азами является высвобождение АДФ из активных центров (В. И. Дещеревский, 1977).

В стационарном режиме работа при таких нагрузках невозможна, так как выход за пределы диапазона стабилизации АТФ сопряжен, как отмечалось выше, с переходом в низкоэнергетическое состояние и гибелью клеток.

В нестационарном режиме функционирование при таком уровне нагрузки возможно только в течение очень короткого периода времени Т, в котором креатинкиназная реакция является основной реакцией в синтезе АТФ (КрФ используется как буфер АТФ). Скорость синтеза АТФ в энергетике клетки может увеличиться только до своего максимального значения V_{max}, характерного для креатинкиназной реакции (В. В. Дынник, 1984).

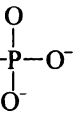
Отсюда очевидно, что, чем больше запасы КрФ в клетке, тем больше время Т, в течение которого достигается критическая концентрация АДФ, приводящая к снижению скорости АТФ-азной нагрузки.

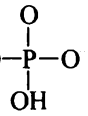
Ясно также, что время Т стационарного режима работы будет тем больше, чем больше вклад энергетики клетки в продукцию АТФ. Благодаря увеличению мощностей различных систем энергетического обмена (рост $V_{\phi\,max}$) в результате адаптации система оказывается способной выдерживать в стационарном режиме такие нагрузки, которые ранее для нее были стрессовыми или вообще недоступными (Н. Н. Яковлев, 1974, 1983).

При действии АТФ-азных нагрузок, не выводящих энергетику за пределы диапазона стабилизации АТФ ($V_a < V_{a\,max} \cdot V_{a\,max} = V_{\phi\,max}$), в системе устанавливается стационарный режим работы, наиболее характерный для большинства видов циклических по характеру физических упражнений и спортивных нагрузок. Длительность работы (Т) в этом режиме ограничивается другим механизмом, связанным с угнетением АТФ-аз актомиозина и саркоплазматического ретикулума избытком протонов, накапливающихся в процессе работы в клетке

(A. M. Katz, 1970; A. Schwartz, 1974; J. Lowenstein, 1993). Именно в связи с этим многие исследователи считают, что основным ограничителем работоспособности при субмаксимальных мышечных нагрузках является ацидоз, когда внутриклеточное pH снижается до 6,5–6,3 (L. Kaijser, 1970; J. Karlsson, C. F. Funderburk, B. Essen et al., 1975; K. Sahlin, 1978; K. Sahlin, G. Palmskog, E. Hultman, 1978; C. Aalkjaer, H. L. Peng, 1997; G. L. Smith, C. Austin, C. Crichton et al., 1998).

1.3. Причины развития ацидоза при АТФ-азных нагрузках

Рассмотрим реакции, ответственные за генерацию H^+, и условия развития ацидоза в работающей мышечной клетке. В зависимости от pH источником ацидоза при окислении углеводов могут быть: при pH = 7,5 – преимущественно различные АТФ-азные реакции, при pH =6,5 – гликолиз или обе эти системы реакций вместе при pH = 7,0 (W. Gevers, 1977). Это определяется тем, что величина pK_2 для второй гидроксильной группы фосфорной кислоты равна 6,78 (R. Alberty, 1969). Следовательно, при pH = 7,5 фосфат существует преимущественно в форме $Ф_н^{-2}$. При pH = 6,8 обе формы $Ф_н^{-1}$ и $Ф^{-2}$ представлены в равных концентрациях: 

а при pH = 6,5 – в виде аниона $Ф_н^{-1}$: 

Известно, что физиологический диапазон внутриклеточного pH колеблется от 7,54 (W. E. Jacobus, G. J. Taylor, D. P. Hollis et al., 1977; R. Ferrari, A. Cargnoni, P. Bernocchi et al., 1996) до 6,3 (K. Sahlin, 1978). При pH = 7,5 источником протона является АТФ-аза. Гликолиз в целом в этих условиях протонов не потребляет и не продуцирует. Синтез АТФ в митохондриях в реакциях окислительного фосфорилирования идет с поглощением протонов. Фактически это обращение реакции

$$MgАТФ^{2-} \underset{V_{о.ф}}{\overset{V_a^1}{\rightleftharpoons}} MgАДФ^{-} + Ф_н^{2-} + H^+.$$

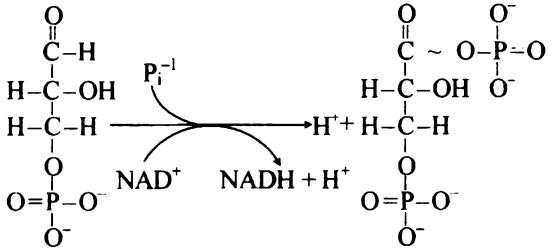
В стационарных условиях суммарные скорости гидролиза (V_a) и синтеза ($V_ф$) АТФ в клетке равны: $V_a = V_ф \equiv V_{г.ф} + V_{о.ф}$.

Часть АТФ-азной активности (V_a^1), обеспечиваемая ресинтезом АТФ в дыхательной цепи ($V_{о.ф}$), не генерирует H^+.

Другая часть АТФ-азной нагрузки V_a^2, связанная с гликолитическим фосфорилированием ($V_{г.ф}$), оказывается источником протонов:

$$MgАТФ^{2-} \xrightarrow[V_{г.ф}]{V_a^2,\ H^+} MgАДФ^- + Ф_н^{2-}.$$

При pH = 6,5 АТФ-азы перестают генерировать протон, который «остается» на $Ф_н$, так как $Ф_н$ существует в форме $Ф_н^{1-}$. Изменение заряда $Ф_н$ приводит к тому, что протон освобождается в гликолизе на стадии ГАФДГ-ФГК-реакции, так как pK для гидроксилов 1–3-дифосфоглицериновой кислоты существенно ниже 6,5.



В итоге происходит генерация протона не в АТФ-азных реакциях, а собственно в реакциях гликолиза.

Но здесь следует обратить внимание на то, что при таком низком pH интенсивность гликолиза минимальна из-за торможения его ключевых ферментов (K. Sahlin, R. C. Harris, E. Hultman, 1975; K. Sahlin, A. Alvestrand, J. Bergstroem et al., 1977; K. Sahlin, G. Palmskog, E. Hultman, 1978). Итак, поскольку гликолиз работает «в паре» с АТФ-азами, то скорость продукции H^+ всей системой независимо от pH определяется величиной скорости гликолиза (гликогенолиза). Подчеркнем, что при нормальных величинах pH (pH >> 6,5) в процессе гликолиза лактат и пируват образуются в форме анионов и источниками H^+ не являются, в чем можно убедиться при подробном рассмотрении схемы гликолиза, включающей диссоциацию кислотных групп (рис. 4).

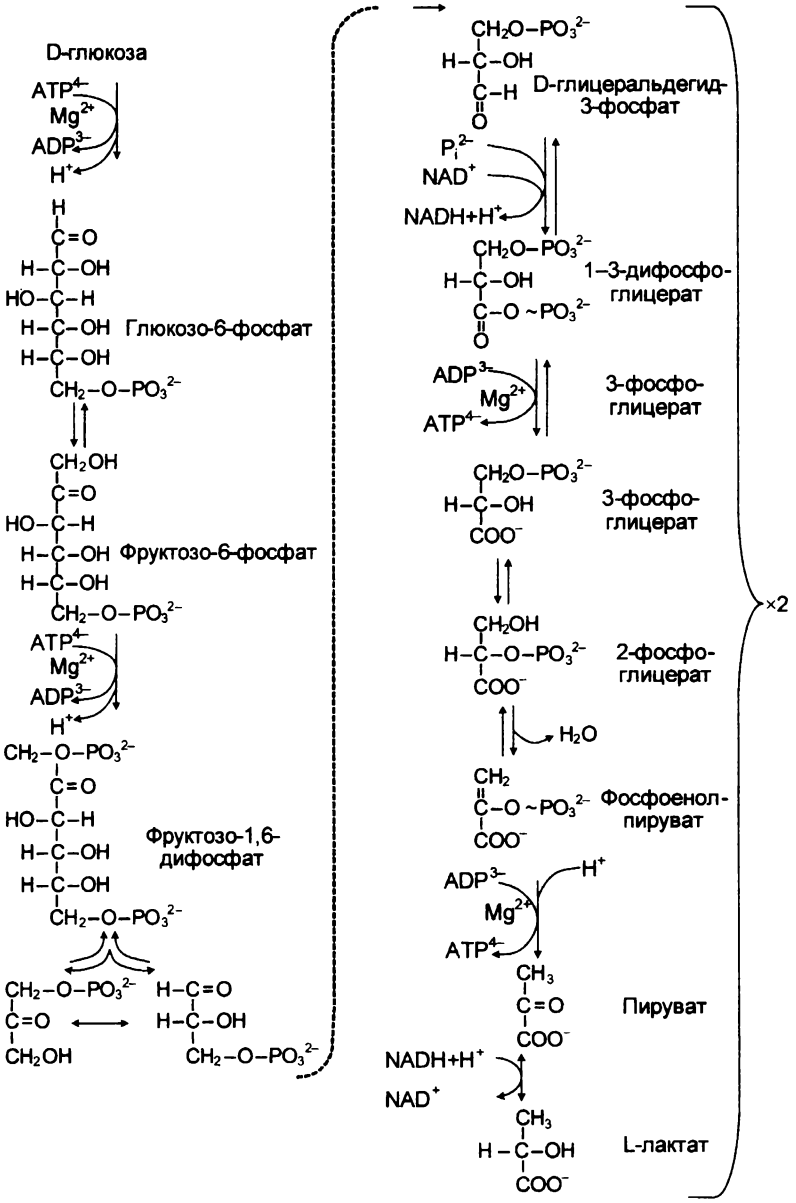


Рис. 4. Схема реакций гликолиза

Из представленной схемы видно, что в первой части гликолиза, в процессе активации – подготовки молекулы глюкозы к окислению – идет фосфорилирование с затратой АТФ и образованием двух фосфорилированных триоз. Суммарное уравнение выглядит следующим образом:

$$C_6H_{12}O_6 + 2АТФ^{4-} \rightarrow 2C_3H_5O_6P^{2-} + 2АДФ^{3-} + 2H^+$$

$$[-8] \quad \rightarrow \quad [-4] \quad + \quad [-6] \quad + [+2]$$

Ясно, что первая часть гликолиза является генератором ионов водорода, подобно обычной АТФ-азной реакции. Во второй части гликолиза происходит образование лактата и АТФ и связывание $2H^+$ (в пируваткиназной реакции). В итоге собственно гликолиз избытка H^+ не генерирует.

$$2C_3H_5O_6P^{2-} + 4АДФ^{3-} + 2P^{2-} + 2H^+ \rightarrow 2C_3H_5O_3^{1-} + 4АТФ^{4-}$$

$$[-4] \quad + \quad [-12] \quad + [-4] + [+2] \rightarrow \quad [-2] \quad + \quad [-16]$$

Итого $\quad [-18] = [-18]$

Поэтому снижение уровня лактата в клетке за счет функционирования Н-транспортных челноков, когда вместо лактата конечным продуктом является пируват, едва ли может приводить к уменьшению ацидоза в клетке.

Однако в обычных условиях при эффективной (не лимитированной недостатком кислорода) работе дыхательной цепи имеет место синхронизация деятельности Н-транспортного челнока и транспорта пирувата в матрикс митохондрий. Причем движущей силой для переноса аниона пирувата является трансмембранный электрохимический потенциал ионов водорода $\Delta\psi H^+$, точнее его pH-составляющая (рис. 5).

Поскольку пируват заряжен отрицательно и переносится через внутреннюю мембрану митохондрий от плюса к минусу по градиенту ионов водорода, постольку транспортной формой пирувата является либо нейтральная недиссоциированная молекула, либо симпорт катиона H^+ и аниона пирувата, либо антипорт аниона пирувата и гидроксила. Конкретный механизм идентифицировать невозможно (К. Ф. Шольц, 1994). Но результатом в любом случае является одновременное потребление двух протонов и двух анионов пирувата. Сле-

довательно, в тех аэробных ситуациях, когда пируват входит в митохондрии для включения в последующие превращения, гликолиз выполняет функцию поставщика пирувата и водорода (восстановительных эквивалентов) для митохондрий и не влияет на внемитохондриальный цитозольный pH, хотя как минимум две молекулы АТФ по-прежнему воспроизводятся в гликолитической оксидоредукции, не захватывающей непосредственно ионы водорода.

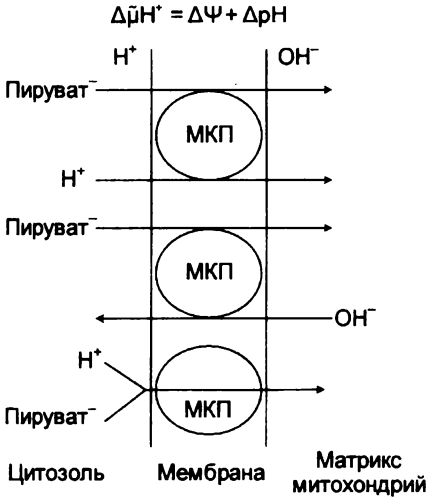


Рис. 5. Схема эквивалентных механизмов переноса пирувата монокарбоксилатным переносчиком из цитозольного пространства в матрикс митохондрий

Н-челноки позволяют поддерживать высокие скорости гликолиза и утилизации пирувата в митохондриях за счет реокисления гликолитического NADH и тем самым уменьшают уровень лактата и пирувата в клетке.

Продукция H^+ будет тем меньше, чем больше вклад аэробного окисления субстратов, точнее вклад окислительного фосфорилирования по сравнению с гликолизом в продукцию АТФ (рис. 6). Из приведенной схемы ясно, что причиной ацидоза является не просто накопление недоокисленных продуктов, таких как лактат (или пируват), а гидролиз той части аденозинтрифосфата (АТР), ресинтез которой не компенсируется окислительным фосфорилированием.

Идеальным при окислении глюкозы является случай, когда активности Н-челноков и окислительного фосфорилирования достаточны для того, чтобы окислить весь образующийся в гликолизе пируват, как, например, в летательных мышцах насекомых (B. Sacktor, 1970). В этом случае вклад гликолиза (гликогенолиза) в суммарную продукцию АТФ составляет только 1/13.

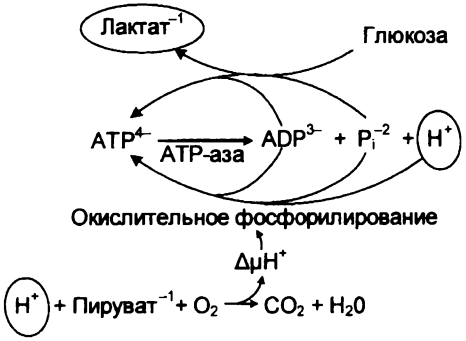


Рис. 6. Схема образования и уборки H^+ при обеспечении АТФ-азных нагрузок за счет субстратного фосфорилирования в реакциях гликолиза или за счет окислительного фосфорилирования в дыхательной цепи митохондрий

В различных мышцах животных и сердце суммарная активность дегидрогеназ малатдегидрогеназного (МДГ) и α-глицерофосфатдегидрогеназного (α-ГФДГ) челноков одного порядка с активностью ЛДГ (D. Pette, 1966, 2000), с которой они конкурируют за гликолитический NADH. При таких условиях весь пируват не может быть окислен в митохондриях и вклад гликогенолиза в энергопродукцию, а следовательно, и генерация протона выше, чем в летательных мышцах насекомых.

В анаэробных условиях работа всех клеточных АТФ-аз сопряжена с функционированием одного гликолиза, поэтому ацидоз развивается быстро. Независимо от pH среды скорость продукции протона в цитоплазме пропорциональна скорости гликолиза (гликогенолиза). Поскольку для удаления лактата и протона из клетки используются различные механизмы, уровень лактата в клетке не всегда может соответствовать pH цитоплазмы (J. Piiper, 1980).

При разных по интенсивности стационарных мышечных нагрузках устанавливается разное соотношение между внутриклеточным pH и содержанием лактата. В покое и в период отдыха после нагрузки значение pH, измеренное разными методами у человека в скелетной покоящейся мышце, составляет 7,00±0,06 – 7,08±0,034. У большинства животных величина внутриклеточного pH колеблется между 6,8–7,1 (K. Sahlin, A. Alvestrand, J. Bergstroem et al., 1978). После изометрической нагрузки на уровне 68% от максимально возможной pH снижается до 6,60±0,13 и резко возрастает содержание лактата. При этом соотношение между pH и содержанием лактата и пирувата в мышце выражается следующим равенством (K. Sahlin, R. S. Harris, E. Hultman, 1975):

$$pH = -0{,}00532\ (\text{лактат} + \text{пируват}) + 7{,}06.$$

При такой же динамической (циклической) нагрузке падение pH связано менее крутой зависимостью с изменением содержания лактата и пирувата в мышцах (K. Sahlin, R. S. Harris, R. Nylind et al., 1976):

$$pH = -0{,}00413\ (\text{лактат} + \text{пируват}) + 7{,}06.$$

Это обусловлено тем, что при динамических упражнениях увеличивается объем циркулирующей крови и улучшается доставка кислорода, соответственно уменьшается количество образующегося лактата и увеличивается доля окисляющегося в митохондриях пирувата.

При восстановлении во время отдыха после истощающей циклической нагрузки содержание лактата в мышце падает экспоненциально (K. Sahlin, R. S. Harris, R. Nylind et al., 1976) и снижается до 50% от максимального через 9,5 мин отдыха. Начальная скорость падения концентрации лактата составляет 7,7 мМ в минуту на 1 кг сухого веса мышцы. Соотношение между суммарным содержанием лактата и пирувата в начальный период восстановления и величиной pH линейно:

$$pH = -0{,}00521\ (\text{лактат} + \text{пируват}) + 7{,}22.$$

Важным фактором в регуляции внутриклеточного pH является концентрация CO_2, которая генерируется в цикле Кребса и образуется при нейтрализации кислых продуктов бикарбонатами. При мышечной работе, особенно во время циклических нагрузок и в период восста-

новления, резко активируется выведение CO_2 из мышц. Общее содержание CO_2 в скелетной мышце падает с 9,84 ±1,39 мМ на 1 кг веса в покое до 4,64 ± 0,76 через минуту после окончания упражнений (K. Sahlin, A. Alvestrand, J. Bergstroem et al., 1978). Суммарное содержание CO_2 возрастает за время отдыха, но даже через 20 мин после окончания упражнений остается ниже наблюдаемого в покое. Изменения внутриклеточного pH таковы: 7,1 в покое; 6,3 сразу после истощающей циклической нагрузки; 6,6 через 1 мин; 6,85 через 8 мин и 7,05 через 20 мин отдыха (K. Sahlin, A. Alvestrand, J. Bergstroem et al., 1978).

Рассматривая вклад аэробных процессов в продукцию внутриклеточного CO_2, следует отметить возможность широкого варьирования концентрации CO_2 в зависимости от вклада гликолиза и аэробных окислительных процессов в энергообеспечение, а также от глубины развивающейся при физической работе гипоксии. Теоретический анализ свидетельствует о том, что в случае ограничения доставки кислорода и активации гликолиза на фоне активации цитозоль-митохондриальных Н-челноков может значительно уменьшаться продукция CO_2 (рис. 7).

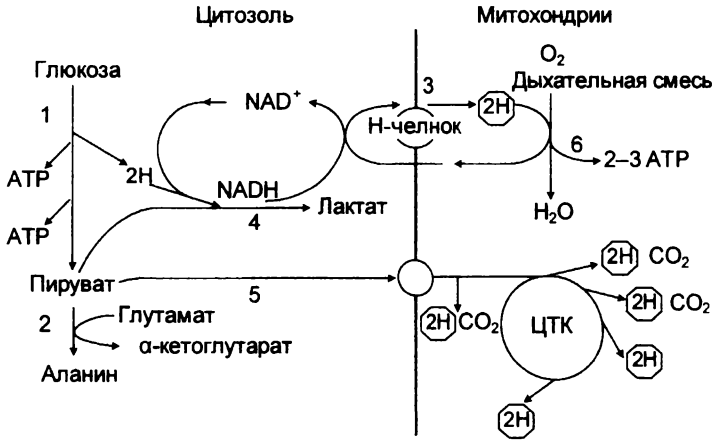


Рис. 7. Схема взаимосвязи гликолиза и внутримитохондриальных процессов при посредстве Н-челноков:

1 – гликолитическая оксидоредукция; *2* – аланинаминотрансфераза; *3* – Н-транспортные цитозольмитохондриальные шунты; *4* – лактатдегидрогеназная реакция; *5* – пируватдегидрогеназная реакция; *6* – окислительное фосфорилирование

Для этого достаточно, чтобы скорости гликолитической оксидоредукции *1*, Н-челноков *3* и уборки пирувата в трансаминазной реакции *2* были равны или хотя бы соизмеримы. В такой ситуации поток пирувата в лактат *4* и в цикл трикарбоновых кислот *5* минимизирован и дополнительным конечным продуктом окисления глюкозы является аланин. В митохондриях окислительное фосфорилирование в дыхательной цепи (см. рис. 7) обеспечивается за счет потока восстановительных эквивалентов, поступающих из цитозоля через Н-челноки, а цикл трикарбоновых кислот практически приостановлен, и соответственно нет источника CO_2. Таким образом, в описанных условиях не происходит образования лактата и CO_2. Источником АТФ при этом являются гликолиз и окислительное фосфорилирование в соотношении не 1/13 как обычно, а в лучшем случае 1/3, если работает малат-аспартатный шунт, поставляющий восстановительные эквиваленты в дыхательную цепь на уровне NAD^+, что обеспечивает ресинтез трех молекул АТФ при окислительном фосфорилировании. Если велик вклад α-глицерофосфатного шунта, поставляющего восстановительные эквиваленты на флавопротеиды, то в дыхательной цепи прохождение каждой пары водорода обеспечивает ресинтез лишь двух молекул АТФ. При этом соотношение энергопродукции в гликолизе и митохондриях будет составлять 1/2. Следовательно, вклад гликолиза (без продукции лактата) теоретически может достигать 30% и ацидоз будет обусловлен образованием протона в АТФ-азных реакциях, не компенсированных продукцией АТФ в окислительном фосфорилировании.

Нельзя не отметить, что эти условия, по-видимому, далеки от стационарных, хотя бы потому, что источник глутамата для аланинаминотрансферазной реакции не бесконечен. Выход из такого «полуанаэробного» (гипоксического) состояния связан с окислением в цикле трикарбоновых кислот недоокисленных аланина, лактата, пирувата, в результате чего может произойти резкое увеличение продукции CO_2 сверх ожидаемого при окислении молекулы глюкозы в этот момент. Не исключено, что именно этим обусловлено резкое увеличение концентрации CO_2 в ткани сразу по окончании интенсивной физической нагрузки (K. Sahlin, A. Alvestrand, J. Bergstroem et al., 1978).

Обилие экспериментальных данных о гиперпродукции аланина при интенсивной мышечной работе дает основание с достаточным

вниманием отнестись к приведенным аргументам по поводу того, что продукция пирувата, лактата и CO_2 далеко не полно отражает процесс развития ацидоза. Более того, значительный ацидоз может развиваться при минимальном образовании пирувата, лактата и CO_2. Возможно, именно в связи с этим в ряде исследований наблюдается существенный дисбаланс между относительно небольшим увеличением концентрации лактата в ткани и значительной глубиной ацидоза – кислотного сдвига pH (K. Iwanaga, M. Sakurai, T. Minami et al., 1992). Подобные различия в соотношении pH, содержании лактата и пирувата в ткани могут быть индикатором степени использования анаэробных энергетических процессов и соотношения между анаэробными и аэробными энергетическими источниками.

Однако бывают такие режимы работы, при которых выявляются довольно простые взаимоотношения между изменением концентрации лактата, креатинфосфата и отношением АТФ/АДФ. Так, при интенсивных истощающих нагрузках в мышце существует линейная связь между отношением АТФ/АДФ и содержанием лактата: АТФ/АДФ = 7,54 – 0,0196 (лактат) (R. C. Harris, K. Sahlin, E. Hultman, 1977). При этом уровень креатинфосфата связан следующей зависимостью с содержанием лактата:

$$КрФ = 34\, e^{-0.06\ [лактат]} + 51{,}6\, e^{-0{,}015\ [лактат]}.$$

Ряд исследователей (K. Sahlin, R. S. Harris, E. Hultman, 1975; R. C. Harris, R. H. Edwards, E. Hultman et al., 1976) полагают, что это отношение существует независимо от типа, интенсивности и длительности предыдущих нагрузок. Содержание креатинфосфата может поддерживаться на стационарном уровне, величина которого соответствует интенсивности гликолиза, его вкладу в энергопродукцию, и потому может иметь достаточно жесткую связь с содержанием лактата и величиной pH. При отдыхе и восстановлении кровотока в мышце идет быстрый ресинтез креатинфосфата. Его содержание в мышце после истощающих (динамических) упражнений восстанавливалось с 16 до 90% от исходной величины в покое в течение первых минут отдыха. Это означает, что 55 мМ креатинфосфата на 1 кг сухого веса образуется из креатина и фосфата. Так как pK для креатинфосфата и $Ф_н$ составляет 4,5 и 6,8 соответственно, то можно рассчитать, что при внутриклеточном pH = 6,4 около 22 мМ H^+ на 1 кг веса образует-

ся в первые минуты вследствие ресинтеза КрФ. Наличие прямой взаимосвязи между величиной pH и состоянием креатинфосфатной и аденилатной системы легко понять, исходя из уравнения кажущейся константы равновесия креатинкиназной реакции

$$K_{kk} = \frac{[Kp] \cdot [MgATФ^{-2}]}{[KpФ] \cdot [MgATФ^{-}] \cdot [H^{+}]}.$$

Таким образом, величина внутриклеточного pH является интегральным показателем состояния энергетического обмена в мышце как при нагрузке, так и в период восстановления. В свою очередь, снижение pH и накопление лактата существенно влияют на энергетический обмен мышечной ткани.

1.4. Влияние ацидоза на энергообеспечение при АТФ-азных нагрузках

Лимитирующим фактором при мышечной нагрузке высокой интенсивности (более 60% максимальной) является прежде всего падение pH и накопление лактата (Ф. Голлник, Л. Германсен, 1982; R. J. Maughan, P. L. Greenhaff, J. B. Leiper et al., 1997).

В 1955 г. A. Hill сделал заключение, что образование лактата при электростимуляции мышц прекращалось, если pH достигало 6,3. Позднее W. Danforth (1965) и M. Ui (1966) установили, что это обусловлено тем, что низкое pH ингибирует фосфофруктокиназу (ФФК). При концентрации АТФ, равной 7 мМ, если pH падает до 6,4, ФФК практически полностью инактивирована. Это как раз та величина pH, которая была определена K. Sahlln (1978) в клетках скелетных мышц после истощающих упражнений. Имеется доказательство, что как минимум одной из основных частей механизма торможения ФФК является появление аниона $АТФ^{3-}$ (недиссоциированный по одному кислотному остатку молекулы АТФ), который может быть ингибитором ФФК (O. Lowry, J. Passonneau, 1966).

Во время мышечного сокращения происходит активация гликогенфосфорилазы, которая образует гексозофосфаты. Последние накапливаются в мышце, если ингибирована ФФК. Величина pK_2 для гексозофосфата – 6,1, т. е. более низкая, чем pK_2 для H_2PO_4 (pK_2 = 6,8). В результате происходит дальнейшее снижение pH. Избыточное на-

копление фруктозо-6-фосфата частично снимает торможение ФФК низким pH (B. Trividi, W. Danforth, 1966), что способствует дальнейшей продукции лактата. W. Danforth (1965) установил, что переход гликогенфосфорилазы B в гликогенфосфорилазу A при стимуляции мышцы также тормозится низким pH, что может быть обусловлено торможением киназы фосфорилазы B и аденилатциклазы (G. Krebs, C. Gonzaler, J. B. Posner et al., 1964; S. Mawarati, A. Tagaki, L. P. Rowland, 1974). Торможение ФФК низким pH может в некоторой степени сниматься увеличением концентрации фосфата и АМФ (B. Trividi, W. Danforth, 1966). В этой ситуации, когда содержание АТФ относительно высоко и снижено pH, увеличивается дезаминирование АМФ до ИМФ, так как оптимум pH у АМФ-дезаминазы составляет 6,1–6,5 (B. Setlow, J. Lowenstein, 1967). Дезаминирование АМФ предотвращает избыточное накопление АМФ, благодаря чему уменьшается стимуляция гликолиза и тормозится дальнейшее развитие ацидоза, одновременно освобождается ион аммония, который принимает на себя часть избытка H^+. Равновесие ЛДГ-реакции также может зависеть от уровня H^+ согласно уравнению

$$\frac{[\text{лактат}]}{[\text{пируват}]} = K'_{\text{равнов}} \frac{[NADH]\cdot[H^+]}{[NAD^+]}.$$

Увеличение отношения лактат/пируват, наблюдаемое после нагрузки, объясняется ростом отношения $NADH/NAD^+$ и концентрации H^+. На примере ЛДГ ясно, почему pH-зависимость существует для всех реакций, идущих с участием NADH и NAD^+. О влиянии pH на креатинкиназную реакцию уже упоминалось.

Влияние pH на функцию митохондрий исследовали K. Mitchelson (1973) и R. B. Tobin, C. R. Macherer, M. A. Mehlman (1972). Они показали, что окислительное фосфорилирование мало чувствительно к внемитохондриальному pH в диапазоне 6,5–7,5. Ингибирование окислительного фосфорилирования возникало лишь при pH = 6,0. Несоблюдение в этих экспериментах физиологического уровня pCO_2 затрудняет перенос полученных in vitro данных на ситуацию in vivo. Изменение pCO_2 и концентрации HCO_3^- может влиять на цикл трикарбоновых кислот (S. Adler, 1970). В частности, рост pCO_2 может тормозить изоцитрагдегидрогеназную реакцию и снижать концентрацию α-кетоглутарата и величину pH внутри митохондрий.

При снижении pH мобилизуется Ca^{++}, увеличение концентрации свободного Ca^{++} в матриксе приводит к активации α-кетоглутаратдегидрогеназы: повышается V_{max} и снижается величина $K_м$. Сопровождающий падение pH рост концентрации лактата может приводить к набуханию митохондрий и разобщению окислительного фосфорилирования (H. Senger, 1975). В свою очередь, набухание митохондрий способствует ускорению переноса восстановительных эквивалентов на цитохромном участке дыхательной цепи митохондрий (И. П. Красинская, И. С. Литвинов, С. Д. Захаров и др., 1989; Н. Н. Брустовецкий, Е. В. Гришина, З. Г. Амерханов и др., 1989). И в сердце, и в скелетных мышцах рост концентрации протона приводит к нарушению актомиозинового взаимодействия (G. I. Drummond, J. P. Harwood, C. A. Powell, 1969; F. Fuchs, Y. Reddy, F. N. Briggs, 1970). При снижении pH с 7,0 до 6,5 на 25% падает максимальная АТФ-азная активность актомиозиновой системы (M. Sahadler, 1966; H. Portzehl, P. Zaoralek, J. Gaudin, 1969). При уменьшении pH увеличивается количество Ca^{++}, требуемого для получения максимальной активности (M. Sahadler, 1966; H. Portzehl, P. Zaoralek, J. Gaudin, 1969). Y. Nakamura, A. Schwartz (1972) показали, что при pH = 6,5 связывание Ca^{++} белками саркоплазматичееког ретикулума возрастает. При этом уменьшается скорость обмена Ca^{++} (А. А. Болдырев, 1977).

Энергетический выход при гидролизе соединений богатых энергией фосфатов во многом определяется значением pH среды. Количество энергии, освобождающейся при гидролизе одной молекулы АТФ до АДФ и $Ф_н$, зависит от концентрации АТФ, АДФ, $Ф_н$, свободного магния и H^+. При снижении pH изменение свободной энергии реакции гидролиза пирофосфатов, АТФ в том числе, уменьшается. Напротив, в кислой среде изменение свободной энергии гидролиза креатинфосфата возрастает (С. Э. Шноль, 1979). Несмотря на то что запас креатинфосфата падает до того, как снижается pH, изменение свободной энергии гидролиза креатинфосфата при ацидозе может играть важную роль, поскольку креатинфосфат выполняет в клетке функцию переносчика богатого энергией фосфата между митохондриями и миофибриллами (В. А. Сакс, В. Н. Люлина, Г. Б. Черноусова, 1975). В связи с ключевой ролью креатинкиназы митохондрий в этом процессе следует отметить, что происходящее при деэнергизации накопление фосфата и протона по-разному влияет на этот фермент: прирост

концентрации фосфата вызывает диссоциацию комплекса креатинкиназы митохондрий (Е. П. Четверикова, 1975) и ингибирует его, а увеличение концентрации протона активирует митохондриальную креатинкиназу (V. Veksler, R. Ventura-Clapier, 1994) и препятствует ингибирующему действию фосфата.

Величина свободной энергии при гидролизе одной молекулы АТФ падает в покое с 54 до 50 кДж после истощающих нагрузок (K. Sahlin, G. Palmskog, E. Hultman, 1978). Это значение было рассчитано по образцам, полученным через 4–6 с после окончания упражнений (время, требующееся для замораживания образцов). Истинные значения могут быть еще ниже. Возможно, что в этой ситуации энергии, полученной при гидролизе одной молекулы АТФ, недостаточно для разрыва и образования новой связи между миозином и актином. В таких условиях мышечное сокращение может быть затруднено не в результате дефицита АТФ, а вследствие низкого энергетического выхода в реакции гидролиза АТФ. Возможно, именно этим объясняется хорошо известное неполное использование АТФ, присутствующего в мышечной клетке, при ишемии и гипоксии (S. Gudbjarnason, P. Mathes, K. G. Ravens, 1970; G. Gercken, U. Schlette, 1978).

Приведенный материал свидетельствует о том, что падение pH в клетке может тормозить энергопродукцию и утилизацию АТФ, нарушать процесс электромеханического сопряжения и собственно работу контрактильного аппарата. Кроме того, нельзя не отметить, что одним из механизмов патологического воздействия ацидоза является активация перекисного окисления липидов, которое сопровождается образованием или освобождением из белковых компонентов ионов Fe^{++} (B. K. Siesjo, K. I. Katsura, T. Kristian, 1996; P. Clarson, 1997; P. Ponka, C. Beaumont, D. R. Richardson, 1998), приводящих к запуску цепной реакции образования свободных радикалов. В целом это может обусловливать повреждение мембранных структур и нарушать работу многих полиферментных систем.

Из изложенного ясно, что значительную роль в поддержании мышечного сокращения и целостности ультраструктуры мышечных клеток играет стабилизация pH, обеспечиваемая различными буферными системами, в первую очередь величиной буферной емкости.

1.5. Буферная емкость мышц

Способность биологических жидкостей противостоять сдвигам pH в значительной степени зависит от величины их буферной емкости. Буферная емкость (β) растворов определяется, по Д. Ван Слайку, как количество свободных H^+ или OH^-, которые надо добавить для изменения pH на единицу:

$$\beta = -\frac{\Delta H^+}{\Delta pH^+} = SL\left(\frac{mM}{1pH^+}\right),$$

где SL – единица буферной емкости.

Наряду с физико-химическими буферными системами, буферная емкость которых определяется количеством слабых кислот и оснований и их константами диссоциаций, клетка обладает рядом биологических буферных механизмов. Внутриклеточная буферная емкость, согласно B. Sjesjo, K. Messetei (1971), формируется из следующих элементов: 1) физико-химических буферных систем; 2) потребителей и продуцентов органических кислот; 3) трансмембранного переноса H^+ и HCO_3^-. Внутриклеточная буферная емкость скелетной мышцы определяется in vitro титрованием гомогената скелетной мышцы кислотами или основаниями и составляет 40–65 SL (K. Furusawa, P. Kerridge, 1927), 62–82 Sl (E. Bate-Smith, 1938), 48–59 SL (R. E. Eckel, A. W. Botschner, D. H. Wood, 1959), 53 SL (N. Heisler, J. Piiper, 1972). Эти величины меньше буферной способности интактного мышечного препарата примерно на 15 SL, которая рассчитывается по изменению pCO_2, что связано с наличием трансмембранного потока H^+ и HCO_3^- (N. Heisler, J. Piiper, 1972; N. Heisler, 1973).

Интересно, что во время острого дыхательного ацидоза скелетные мышцы выполняют роль буфера. Появляется транспорт H^+ внутрь клеток скелетных мышц и, напротив, наружу из клеток сердца и мозга (R. Clancy, E. Brown, 1966; B. Sjejo, K. Messeter, 1971; Y. L. Lai, B. A. Attebery, E. B. Brown, 1973; G. J. Kemp, C. H. Thompson, D. J. Taylor et al., 1997). Возможно, благодаря этому на уровне целостного организма буферная емкость крови и скелетных мышц снижается, но при этом уменьшается глубина ацидоза в тканях сердца и мозга. Имеется свидетельство того, что in vivo буферная емкость зависит от типа ацидоза (метаболического или дыхательного) и степени наруше-

ния кислотно-основного состояния (КОС) (J. Burnell, 1968; S. Adler 1970; J. A. Bettice, B. C. Wang, E. B. Brown, 1976).

При изометрическом сокращении на уровне 50% максимальной нагрузки была определена in vivo величина буферной емкости скелетных мышц (K. Sahlin, R. C. Harris, E. Hultman, 1975). Она достигала примерно 57 SL, что соответствует величине, определяемой in vitro (40–82 SL). Во время циклических упражнений мышца представляет собой открытую систему, обменивающуюся веществами с кровью, и величина буферной емкости достигает 73 SL (R. C. Harris, R. H. Edwards, E. Hultman et al., 1976). Внутриклеточное содержание HCO_3^- падает с 10,2 мМ в покое до 3 мМ после истощающих циклических упражнений и соответствует выходу из мышцы H^+ в виде угольной кислоты в количестве 12 мМ. Это количество почти соответствует тем различиям в отношении (лактат + пируват)/pH, которые наблюдаются между динамическими и изометрическими нагрузками. При динамических нагрузках часть образованного в мышцах лактата транспортируется в кровь (J. Piiper, 1980; J. Bangsbo, L. Johansen, T. Graham, et al., 1993; G. J. Kemp, C. H. Thompson, A. L. Sanderson et al., 1994; K. Iwanaga, M. Sakurai, T. Minami et al., 1996). Синтез лактата сопровождается накоплением H^+ в эквимолярных количествах. Точный механизм переноса лактата через клеточную мембрану полностью не выяснен. Как минимум часть лактата переносится в недиссоциированной форме (G. Mainwood, P. Worseley-Brown, 1975; A. Roos, 1975; K. Iwanaga, M. Sakurai, T. Minami et al., 1992). Отсюда следует, что изменение внутриклеточного и внеклеточного pH может быть важно для транспорта лактата. Движущей силой для пассивного движения ионов через мембрану является разница в электрохимическом потенциале для ионов в разных компартментах. Величина клеточного мембранного потенциала на клеточной мембране достигает 88 мВ, следовательно, при наружном pH = 7,4 в мышце величина pH должна быть порядка 6,0, однако в покое в мышце pH = 7,0, следовательно, имеется активный перенос H^+, который компенсирует пассивный ток.

При истощающих упражнениях артериальное pH снижается до 7,2–7,0 и pH капиллярной крови может достигать 6,8 (L. Hermansen, J. Osnes, 1972), а внутриклеточное pH – 6,4–6,3. Если величина потенциала на клеточной мембране при таких упражнениях снизится до

50 мВ, то можно считать, что на мембране устанавливается электрическое равновесие для ионов H^+. В случае, если идет ресинтез креатинфосфата после истощающих упражнений без транспорта H^+ через клеточную мембрану, создаются условия даже для пассивного выхода H^+ из клетки. Подобные условия, по-видимому, могут иметь место in vivo, так как E. Enger (1978) определил, что мембранный потенциал в клетках скелетных мышц через 3 ч оклюзии падает линейно с ростом концентрации лактата и достигает 50 мВ.

Вклад различных внутриклеточных буферных процессов и физико-химических буферных систем при образовании лактата и снижении pH в клетке от 7,0 до 6,4 был суммирован K. Sahlin (1978) (табл. 1). Вклад физико-химических буферных систем не зависит от природы изменения pH при постоянном pCO_2, тогда как буферные процессы обусловлены метаболической регуляцией.

Таблица 1

Вклад различных внутриклеточных процессов в буферную емкость при образовании лактата после истощающих динамических нагрузок

Вид буферных систем	H^+ммоль/л	SL
Физико-химические (статические)		
$HCO_3^- + H^+ \rightarrow H_2CO_3 \rightarrow CO_2$	12,0	–7,20
$HPO_4^{2-} + H^+ \rightarrow H_2PO_4^-$	7,2	–4,30
$АТФ^{4-} \rightarrow НАТФ^{3-}$	1,0	–0,58
$АДФ^{3-} \rightarrow НАДФ^{2-}$	0,4	–0,20
Гистидин → Н-гистидин	0,1	–0,07
Карнозин → Н-карнозин	2,0	–1,19
Белок → Н-белок	–	Около 15,00
Процессы образования или потребления кислот и оснований (динамические)		
КрФ → Кр + $Ф_н$	25,7	–15,40
АТФ → ИМФ + $Ф_н$ + NH_3	0,6	0,32
Глутамат + NH_3 → глутамин	7,8	–4,70
Глюкоза + $Ф_н$ → глюкозо-6-фосфат	–2,3	1,40
Глицерин + $Ф_н$ → α-глицерофосфат	–0,3	0,18
Итого		≈ 68

В этих же условиях, как показал B. Essen (1978), накапливается цитрат и малат, однако их вклад очень мал во время истощающих физических упражнений. Суммарная буферная емкость мышечной ткани была определена в 68 SL. Эта величина близка к той, что получена при расчете β для мышечных образцов по отношению Δ (лактат + пируват) /Δ pH = 73 SL.

Существенным дополнением к данным K. Sahlin (1978) могут служить представления о вкладе различных метаболических процессов в продукцию протона в клетках миокарда при поддержании pH, рассмотренные в теоретической работе W. Gevers (1977) (табл. 2).

Таблица 2

Продукция H^+ в миокарде

Процесс	Число H^+, образующихся на моль исходного субстрата	Изменение потока при переходе к ишемии
Гликолиз (до образования пирувата)*	2	Увеличение
Гликолиз (до образования лактата)*	0	Увеличение
Гликогенолиз (до образования лактата)*	От –1 до 0	Увеличение
Синтез и расщепление гликогена (цикл)	1	Увеличение (?)
Липолиз	3	Увеличение (?)
Синтез триглицеридов и цикл расщепления	6–7	Увеличение (?)
Распад креатинфосфата	–1	Увеличение в начале
Окислительное фосфорилирование в митохондриях	–1 или 0 (?)**	Падение
Гидролиз АТФ	1	Падение

* Указаны без АТФ-азных реакций, обеспечивасмых гликолизом.

** Этот вопрос также обусловлен тем, что не учитываются реакции гидролиза АТФ, поставляющие H^+, $Ф_н^{-2}$ и $АДФ^{-3}$ для окислительного фосфорилирования.

К перечню приведенных в табл. 2 буферных механизмов следует добавить Cl-зависимый и Cl-независимый Na/бикарбонатный симпорт, Na^+/H^+ – обмен и Cl/бикарбонатный обмен. Эти три ионтранспортирующие системы дают различный вклад в поддержание

внутриклеточного pH кардиомиоцитов и поперечно-полосатых мышц (C. Aalkjaer, H. L. Peng, 1997).

Для сердца и скелетных мышц наиболее важным является Na^+/H^+-обменник, который осуществляет электронейтральный обмен ионов Na^+ на протон. В настоящее время из ткани человека выделено пять изомеров Na^+/H^+-обменника. В поперечно-полосатых мышцах животных преобладает первый изомер с молекулярной массой 110 КД (M. Karmazyn, 1998). В исследованиях на изолированном сердце и кардиомиоцитах показано, что при адаптации к гипоксии и ишемии происходит экспрессия синтеза Na^+/H^+-обменника, что позволяет уменьшить величину гипоксического и ишемического ацидоза. Однако повышение внутриклеточной концентрации Na^+ вследствие активации Na^+/H^+-обменника неизбежно сопровождается освобождением из саркоплазматического ретикулума и митохондрий значительных количеств ионов Ca^{++} (N. Khandoudi, F. James, D. Feuvray, 1989; M. Hendrikx, K. Mubagwa, F. Verdonck et al., 1994; U. Russ, C. Balser, W. Scholz et al., 1996). Высокие концентрации ионов Ca^{++} увеличивают тонус сердечной мышцы во время диастолы, вызывая значительные изменения в электромеханическом сопряжении, стимулируют футильный кальциевый цикл на внутренней мембране митохондрий. Все это приводит к деэнергизации и развитию сердечной недостаточности. Напротив, вопреки ожиданиям ингибиторы Na^+/H^+-обмена незначительно влияют на глубину ацидоза и приращение концентрации ионов Ca^{++} при гипоксии и ишемии, но существенно уменьшают постгипоксические и постишемические реперфузионные повреждения, т. е. обладают мощным кардиопротекторным действием (M. Hendrikx, K. Mubagwa, F. Verdonck et al., 1994; U. Russ, C. Balser, W. Scholz et al., 1996).

Таким образом, по крайней мере на уровне миокарда активация Na^+/H^+-обмена, направленная, казалось бы, на стабилизацию внутриклеточного pH, не может рассматриваться как защитный процесс, тогда как торможение Na^+/H^+-обмена, препятствующее быстрому ощелачиванию внутриклеточного пространства в постгипоксический период, уменьшает риск повреждения клеток сердца, тормозит активацию перекисного окисления и уменьшает вероятность активации апоптоза в кардиомиоцитах (M. Hendrikx, K. Mubagwa, F. Verdonck et al., 1994; U. Russ, C. Balser, W. Scholz et al., 1996; M. Karmazyn,

1998). Относительно роли Na^+/H^+-обменника в поддержание pH при интенсивной физической работе и адаптации к физической нагрузке в настоящее время не имеется четко сформулированных представлений, подтвержденных надежными экспериментальными данными. Хотя на основании сугубо теоретического анализа некоторые исследователи полагают, что Na^+/H^+-обмену может принадлежать значительная роль в стабилизации внутриклеточного pH (J. Lowenstein, 1993).

Как ясно из вышеприведенного материала, до сих пор не представлены экспериментальные данные относительно вклада окислительного фосфорилирования в поддержание pH. Митохондриям, как правило, отводится роль потребителей пирувата и источника углекислоты за счет реакций декарбоксилирования в цикле трикарбоновых кислот. В период отдыха после нагрузки, а в печени и во время нагрузки митохондрии участвуют не только в окислении пирувата, но и в вовлечении пирувата, аланина и лактата в реакции глюконеогенеза (цикл Кори) (J. Piiper, 1980). Вклад окислительного фосфорилирования в поддержание pH долгое время оставался под вопросом. M. Brand, A. Lehninger (1977) считали, что in vivo окислительное фосфорилирование, согласно хемиосмотической теории, не образует и не утилизирует H^+. М. Н. Кондрашова (1970, 1975) обратила внимание на возможность поддержания pH в клетке при обеспечении энерготрат за счет стимуляции окислительного фосфорилирования. По ее инициативе еще в 1971 г. Э. В. Маркарян было предпринято исследование, в котором показано, что экзогенные субстраты, окисляющиеся в митохондриях, уменьшают развитие ацидоза при хранении кусочков ткани. Позже вопрос о поддержании pH при АТФ-азных нагрузках был рассмотрен теоретически W. Gevers (1977, 1979) и вслед за ним R. Seelye (1980), которые считают, что именно окислительное фосфорилирование при энергообеспечении АТФ-азных нагрузок ответственно за стабилизацию внутриклеточного pH в сердце.

Известное по экспериментам in vitro ощелачивание внемитохондриального пространства при окислительном фосфорилировании (неизбежно активируемом при любой работе – АТФ-азной нагрузке) не только не рассматривалось как средство стабилизации pH и уменьшения метаболического ацидоза, но даже ставилось под сомнение (M. Brand, A. Lehninger, 1977; L. Opie, 1980; D. Wilkie, 1980; A. Roos,

W. Boron, 1981) или отрицалось полностью (K. Sahlin, A. Alvestrand, J. Bergstroem et al., 1977; K. Sahlin, A. Alvestrand, R. Brandt et al., 1978).

Теоретически вклад митохондрий в поддержание pH при АТФ-азных нагрузках обусловлен, во-первых, реакциями окислительного фосфорилирования и, во-вторых, в меньшей мере, – утилизацией недоокисленных продуктов гликолиза (W. Gevers, 1977). Возможность уменьшения метаболического ацидоза за счет увеличения вклада окислительного фосфорилирования обусловлена тем, что источником H^+ при любой нагрузке являются собственно АТФ-азные реакции (W. Gevers, 1977; J. Lowenstein, 1993):

$$АТФ^{-4} \rightarrow АДФ^{-3} + Ф_i^{-2} + H^+.$$

Приписываемое обычно активированному при интенсивной нагрузке гликолизу избыточное накопление ионов водорода далеко не столь очевидно, хотя и общепризнанно. Корректная запись уравнения гликолиза, жестко стихеометрически сопряженного с обеспечением АТФ-азных реакций, показывает, что гликолиз не является источником ионов водорода:

$$глюкоза + 2АДФ^{-3} + 2Ф_н^{-2} \rightarrow 2лактат^{-1} + 2АТФ^{-4}.$$

Избыток H^+ образуется в АТФ-азных реакциях:

$$2АТФ^{-4} \xrightarrow[АТФ\text{-}аза]{} 2АДФ^{-3} + 2Ф_н^{-2} + 2H^+.$$

И лишь суммирование этих двух процессов позволяет получить уравнение, которое создает иллюзию образования избытка ионов водорода в ходе гликолиза:

$$глюкоза \rightarrow 2лактат^{-1} + 2H^+.$$

Получается, что при гликолитическом энергообеспечении в цитозоле может оставаться до двух г-ионов H^+ на 1 моль глюкозы, если затем пируват, образующийся не из лактата, окисляется до CO_2 и H_2O (W. Gevers, 1977, 1979). Напротив, митохондрии в процессе ресинтеза АТФ потребляют в стехиометрических количествах все продукты АТФ-азной реакции ($АДФ^{-3}$, $Ф_н^{-2}$, H^+). Суммарное уравнение окислительного фосфорилирования – это просто обращение АТФ-азной реакции с полным использованием ее продуктов в качестве субстратов. Существенно, что анион пирувата и катион водорода транспортируются, как указывалось выше, в митохондрии одновременно.

Из вышеприведенной схемы (см. рис. 5) ясно, что причиной ацидоза является гидролиз той части АТФ, ресинтез которой не компенсируется окислительным фосфорилированием, но не накопление недоокисленных продуктов, таких как лактат или пируват. Вне клетки эти ионы водорода появляются в симпорте с лактатом или пируватом либо в результате Na^+/H^+-обмена (G. J. Kemp, C. H. Thompson, A. L. Sanderson et al., 1994; G. L. Smith, C. Austin, C. Crichton et al., 1998). В связи с этим вне клетки развитие ацидоза, как правило, проявляется в виде повышения концентрации лактата и пирувата. Кроме того, происходит снижение концентрации натриевых солей буферных систем (Р. И. Воркель, 1974; Н. Н. Яковлев, 1974). Итак, теоретически очевидно, что накопление ионов водорода, образовавшихся в АТФ-азной реакции, прямо пропорционально образованию лактата и пирувата при гликолитическом энергообеспечении. Поэтому в случае активации гликолиза при увеличении его вклада в энергообеспечение ацидоз должен нарастать. И напротив, при увеличении вклада митохондрий и реакций окислительного фосфорилирования ацидоз должен уменьшаться.

Недооценка роли митохондрий в уборке ионов водорода, образующихся в АТФ-азных реакциях (при нагрузке), связана в первую очередь с трудностями экспериментального обнаружения этого вклада. Необходимо было использовать принципиально иные экспериментальные подходы, которые позволили бы промоделировать генерацию H^+ в АТФ-потребляющих реакциях и определить при этом возможную долю митохондриального энергообеспечения в предотвращении развития ацидоза. До настоящего времени такой эксперимент никем не был выполнен. Это связано с тем, что простое ингибирование воспроизводства АТФ в митохондриях в условиях ткани, клетки, гомогената или в реконструированной системе, содержащей наряду с митохондриями полный набор ферментов гликолиза и потребителей АТФ, не позволяет выявить роль митохондрий в поддержании pH независимо от того, каким ингибитором или активатором дыхательной цепи либо разобщителем окислительного фосфорилирования пользовались исследователи. Дело в том, что при торможении воспроизводства АТФ одновременно срабатывают регуляторные механизмы, обеспечивающие, во-первых, активацию гликолиза, а во-вторых, и это главное, торможение АТФ-потребляющих

процессов продуктами АТФ-азной реакции: АДФ, $Ф_н$ и ионами водорода. Система прямых и обратных связей не позволяет саморегулирующейся системе сохранять один и тот же уровень активности нагрузки (в данном случае АТФ-азной) при уменьшении активности процессов ресинтеза АТФ из АДФ и $Ф_н$. Для выяснения роли митохондрий в поддержании pH при АТФ-азных нагрузках необходимо как минимум задать достаточно высокую по мощности стационарную (в идеале) внешнюю АТФ-азную нагрузку, активность которой, по крайней мере в короткие промежутки времени, не менялась бы существенным образом при значительных изменениях вклада митохондрий в энергопродукцию.

Эксперимент такого рода ранее никем не был выполнен. Не была даже поставлена задача проведения подобного экспериментального исследования. Попытки выявить вклад митохондрий в поддержание внутриклеточного pH на изолированных клетках без сохранения заданного уровня АТФ-азной нагрузки, просто путем выключения митохондрий различными ингибиторами, окончились неудачей (J. A. Thomas, R. N. Buchsbaum, A. Zimniak et al., 1979).

До настоящего времени величину вклада окислительного фосфорилирования в поддержание pH при АТФ-азных нагрузках ни in vitro, ни in vivo экспериментально никто не смог изучить. Собственно же теоретические построения встретили жестокую критику (D. Wilkie, 1980; A. J. Wagenmakers, 1998). Поэтому одной из задач нашей работы был поиск путей экспериментальной оценки вклада окислительного фосфорилирования в поддержание pH при АТФ-азных нагрузках.

Не менее сложной проблемой при проведении исследований на уровне митохондрий, гомогенатов, клеток и даже изолированных тканей является оценка возможности перенесения результатов и выводов, полученных на изолированных внутриклеточных и клеточных системах, на уровень целостного организма.

Анализ этой проблемы в аспекте регуляции кислотно-основного состояния крови требует рассмотрения механизмов регуляции КОС на уровне целостного организма и соотношения системы регуляции КОС крови с процессами, протекающими в тканях. Рассмотрим в связи с этим основные буферные системы организма.

1.6. Буферные системы организма

Благодаря наличию переноса между мышечной тканью и кровью H^+, лактата, CO_2, HCO_3^-, а также Na^+/H^+-обмену, падение pH в мышце сопровождается снижением pH и увеличением концентрации лактата в крови, т. е. лактатным ацидозом. Кровь обладает своими химическими буферными системами и осуществляет взаимодействие между всеми органами и тканями, в том числе и участвующими в поддержании pH. Поэтому даже при падении pH в мышце до 6,3–6,4 в крови pH сохраняется на уровне 7,0–7,2. Это очень значительное падение pH. У здорового, не адаптированного к мышечным нагрузкам животного и человека такое снижение pH просто невозможно, ибо уже при pH, равном 7,2–7,25, следует отказ от нагрузки вплоть до потери сознания. В покое же величина pH крови у здоровых млекопитающих равна 7,40 ± 0,005 (Ю. Я. Агапов, 1968; J. Lowenstein, 1993).

Вклад химических буферных систем крови в поддержание pH неодинаков. Так, еще J. Peters и D. Van Slyke (1931) установили, что при снижении pH наибольшее число ионов H^+ нейтрализуется бикарбонатом и гемоглобином, вклад других систем существенно меньше. Количество ионов водорода, поглощаемых разными буферными системами крови при снижении pH с 7,4 до 7,0, в одном литре крови составляет:

для	бикарбоната	– 18 мМ
	фосфата	– 0,3 мМ
	белков плазмы	– 1,7 мМ
	гемоглобина	– 8 мМ
	Всего	28 мМ

Рассмотрим работу бикарбонатной буферной системы. При поступлении в кровь нелетучей сильной кислоты HA (где A – анион) бикарбонат натрия ($NaHCO_3$) вступает с ней в реакцию нейтрализации

$$HA + NaHCO_3 \rightarrow H_2CO_3 + NaA,$$

и вместо сильной кислоты образуется слабая угольная кислота, степень диссоциации которой уменьшается с увеличением ее концентрации (закон разведения Освальда). Если не поддерживать эту буферную систему, то изменяется соотношение компонентов системы и ее

щелочная емкость может быть быстро исчерпана. Постоянство концентрации и соотношение компонентов этой буферной системы поддерживаются благодаря ее взаимосвязи с другими буферными системами крови и наличию протока: ускоренному выведению CO_2 легкими и усиленному воспроизводству бикарбоната в тканевом обмене и реабсорбции его почками. Интенсификация выведения CO_2 обеспечивается прежде всего сдвигом равновесия и ускорением по закону действующих масс карбоангидразной реакции, протекающей в эритроцитах, находящихся в легочных капиллярах, в сторону образования CO_2 и H_2O:

$$H_2CO_3 \xrightarrow[\text{карбоангидраза}]{} CO_2+H_2O.$$

Выделение углекислого газа легкими происходит со скоростью, пропорциональной концентрационному градиенту газа между альвеолярной кровью и альвеолярным воздухом, а также объему альвеолярной вентиляции, которая резко возрастает за счет стимуляции хеморецепторов дыхательного центра увеличивающейся концентрацией CO_2 (М. Е. Маршак, 1969; B. Sacktor, 1970; Дж. Уэст, 1988). Хеморецепторы дыхательного центра обладают высокой чувствительностью к CO_2: так, при повышении pCO_2 артериальной крови на 10 мм рт. ст. наблюдается увеличение вентиляции в 4–5 раз (B. Sacktor, 1970). Напротив, если pCO_2 падает, объем легочной вентиляции существенно снижается. Благодаря такой регуляции обеспечивается соответствие между образованием и выделением углекислоты. В настоящее время трудно утверждать, влияет ли на дыхательный центр только прирост pCO_2 или эта стимуляция обусловливается сочетанием воздействия CO_2 и избытка ионов H^+, хотя точно установлено, что повышение кислотности ведет к увеличению объема легочной вентиляции, а прирост щелочности снижает объем вентиляции. Чувствительность дыхательного центра к изменению pH такова, что объем вентиляции удваивается, если pH падает на 0,1 единицы, и снижается вдвое, если pH возрастает на 0,1 единицы (Л. Л. Шик, 1970). Таким образом, физиологические механизмы регуляции дыхания способствуют стабилизации соотношения компонентов бикарбонатной буферной системы и pH крови.

Важнейшей буферной системой, с которой взаимодействует бикарбонатная, является гемоглобин. Будучи амфолитом, он, как и дру-

гие белки крови, содержит большое количество кислотных (COOH) и щелочных (NH_2) групп. Кислотные группы COOH в щелочных растворах диссоциируют с высвобождением ионов H^+, а в кислых растворах щелочные группы NH_2 связывают H^+ с образованием NH_3. Поскольку pK оксигенированного гемоглобина составляет 6,17, т. е. ниже, чем pH крови, гемоглобин, принимая кислород, отдает в среду H^+:

$$HHb^+ + O_2 \rightarrow HbO_2 + H^+.$$

Стехиометрия процесса такова, что присоединение одной молекулы O_2 сопровождается освобождением 0,7 молей H^+ (А. Уайт, Ф. Хендлер, Э. Смит и др., 1981). Оксигенированный гемоглобин образует внутри эритроцита соль с K^+. В тканевых капиллярах оксигемоглобин, отдавая кислород, теряет свои кислотные свойства. Образующийся «восстановленный» гемоглобин является более слабой кислотой, и поэтому ион K^+ освобождается в раствор и связывается ионом бикарбоната, а молекула гемоглобина связывает свободные ионы водорода. Этим обеспечивается течение реакции диссоциации угольной кислоты и образование бикарбоната, что благоприятствует смещению равновесия карбоангидразной реакции в сторону связывания CO_2 в тканевых капиллярах и освобождения O_2:

$$\begin{array}{cccc} H_2O & CO_2\text{ (из ткани)} & & \text{(в ткань)} \\ \downarrow & \downarrow & & \uparrow \\ KHbO_2 + H_2CO_3 & \rightarrow & KHCO_3 + HHb + O_2. & \end{array}$$

Напротив, в легочном капилляре образование оксигемоглобина способствует превращению бикарбонатов в углекислоту и течению карбоангидразной реакции в сторону выделения газообразного CO_2.

Следовательно, направление описанной реакции и ее скорость тесно связаны и поддерживаются благодаря дыхательной функции крови – переносу и обмену газов: CO_2 и O_2 (А. Уайт, Ф. Хендлер, Э. Смит и др., 1981). Облегчение доставки кислорода при ацидозе и гиперкапнии за счет сдвига кривой диссоциации оксигемоглобина вправо (эффект Бора) способствует активации аэробных окислительных процессов, которые, в свою очередь, в ходе реакций декарбоксилирования, протекающих главным образом в митохондриях, являются источником CO_2. В результате увеличения выхода CO_2 в тканевый ка-

пилляр повышается концентрация бикарбоната, т. е. возрастает емкость бикарбонатной буферной системы.

Аналогично бикарбонатному буферу в защитной реакции крови участвует фосфатный буфер плазмы, составляющими которого являются двухзамещенный фосфорно-кислый натрий Na_2HPO_4 и однозамещенный NaH_2PO_4. При взаимодействии кислоты, поступившей в кровь с двухзамещенным фосфорно-кислым натрием:

$$Na_2HPO_4 + HA \rightarrow NaA + NaH_2PO_4,$$

образуется негидролизующаяся натриевая соль сильной кислоты и однозамещенный фосфорно-кислый натрий, избыток которого выводится почками в мочу. Благодаря этому соотношение компонентов фосфатного буфера устанавливается на уровне 1/4, характерном для нормы:

$$\frac{NaH_2PO_4}{Na_2HPO_4} = \frac{1}{4},$$

и pH крови приближается к исходному – нормальному уровню 7,40.

Ввиду того что изменение скорости выведения NaH_2PO_4 почками происходит относительно медленно, часть однозамещенного фосфорно-кислого натрия вступает в реакцию с бикарбонатом

$$NaH_2PO_4 + NaHCO_3 \rightarrow Na_2HPO_4 + H_2CO_3,$$

в результате чего образуется двухзамещенный фосфорно-кислый натрий и углекислота. Последняя в легочных альвеолах расщепляется карбоангидразой до CO_2 и воды.

По данным J. Peters, D. Van Slyke (1931), суммарная буферная емкость крови человека равна примерно 150–180 м-Экв, а выделяемое количество нелетучих кислот в сутки достигает 100 м-Экв (Дж. Робинсон, 1969). Поэтому все химические буферные системы крови быстро истощились бы при отсутствии выведения ионов H^+, а также воспроизводства компонентов буферных систем и выведения продуктов нейтрализации и кислотных эквивалентов.

Одной из важнейших систем выведения кислых продуктов, как упоминалось выше, является система удаления H_2CO_3 через легкие в виде CO_2 выдыхаемого воздуха. Другой системой, которая выводит избыточное количество ионов H^+, являются почки (рис. 8).

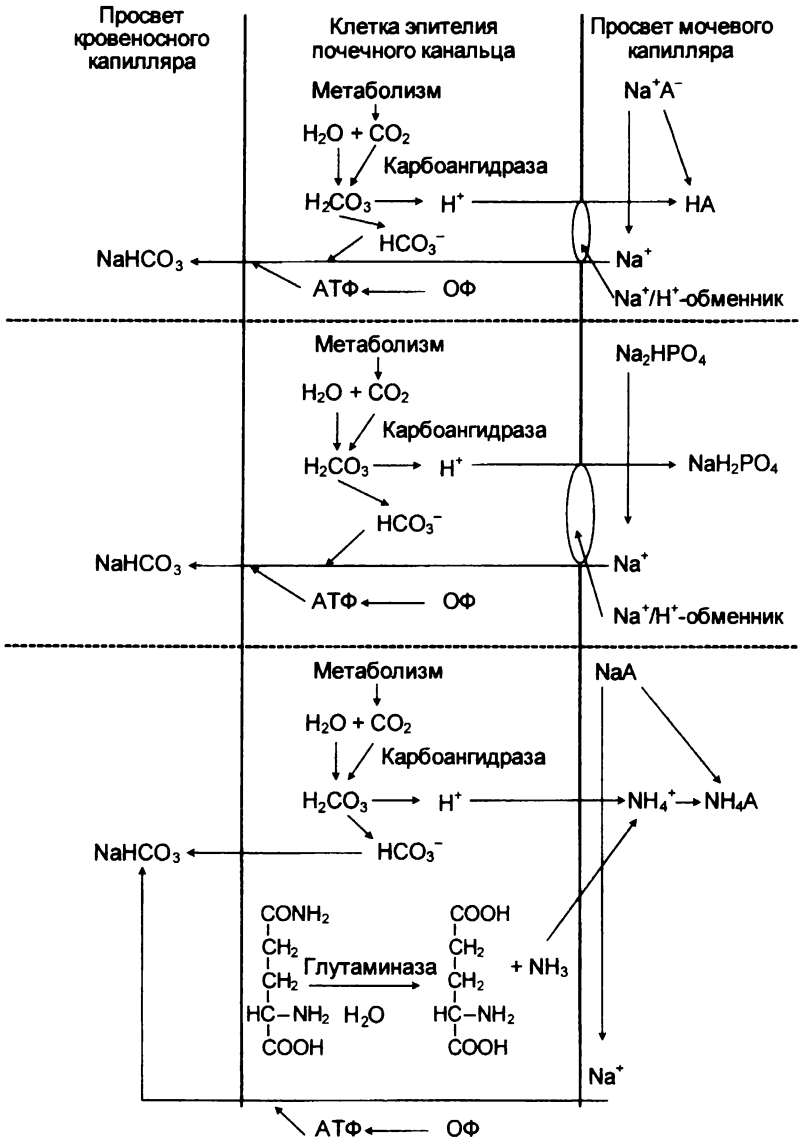


Рис. 8. Схема участия почек в поддержании КОС крови (по Х. Пандову)

При смещении pH крови в кислую сторону в почках усиливается секреция в просвет канальцев H^+. Выделяемые ионы H^+ обмениваются на равное количество ионов Na^+, которые реабсорбируются из клубочкового фильтрата в плазму (Х. И. Пандов, 1969). В клетках почечных канальцев происходит также замена иона Na^+ на ион аммония. При ацидозе активируется аммониогенез, сопряженный с образованием глутамата из глутамина и вовлечением его в цикл Кребса или глюконеогенез (А. Уайт, Ф. Хендлер, Э. Смит и др., 1981).

В течение значительных промежутков времени существенным фактором в поддержании КОС крови является обмен H^+ на катионы минеральных компонентов костей скелета (J. Bettice, J. Gamble, 1975; D. Jackson, 1997), особенно в тех случаях, когда метаболический ацидоз имеет хронический характер (R. J. Alpern, K. Sakhaee, 1997). В результате у таких больных может развиваться остеопороз.

Таким образом, ткани организма осуществляют поддержание КОС крови не только благодаря нейтрализации избытка H^+ и обмену H^+ на щелочные катионы, но также за счет усиления легочной вентиляции и ускорения диссоциации оксигемоглобина, способствующих улучшению аэрации тканей и более полному окислению промежуточных продуктов энергетического обмена до CO_2 и H_2O. Увеличение потока CO_2 из ткани в кровь способствует образованию в тканевом капилляре бикарбоната, и таким образом увеличивается щелочной резерв крови.

Из изложенного следует, что система регуляции КОС крови как всякая биологическая система является проточной и открытой (А. Г. Пасынский, 1968). Стационарный уровень ее компонентов поддерживается благодаря согласованию входящих и выходящих потоков. Точное взаимодействие этих потоков обеспечивается за счет взаимодействия физико-химических механизмов саморегуляции со специализированными рецепторами дыхательного центра, легких, почек, сосудов и изменения ферментативной активности в тканях.

1.7. Возможные подходы к поддержанию pH при АТФ-азных нагрузках с помощью экзогенных субстратов энергетического обмена

До настоящего времени в физиологии, спортивной и клинической практике об изменении КОС организма судили главным образом

по регистрации pH, pCO_2 крови и содержанию недоокисленных продуктов обмена, таких как лактат, пируват, 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 (H. J. Hirche, V. Hombach, H. D. Langohr et al., 1975). В последующих исследованиях не было отмечено сколько-нибудь заметного повышения работоспособности после введения бикарбоната (K. J. Portington, D. D. Pascoe, M. J. Webster et al., 1998).

На базе представлений о роли бикарбоната в поддержании pH крови была сделана попытка коррекции ацидоза с помощью внутривенного введения $NaHCO_3$ спортсменам, выполняющим максимальную и субмаксимальную нагрузку (A. J. Poulus, H. J. Doctor, H. G. Westra, 1974). После внутривенного введения $NaHCO_3$ повышалось как pCO_2 в крови, так и выход CO_2 с выдыхаемым воздухом, но субъективная переносимость работы и работоспособность не улучшались. Возможно, это обусловлено тем, что прирост pCO_2 приводит к снижению внутриклеточного pH (см. п. 1.3). Не было также отмечено изменений со стороны частоты пульса, артериального давления, легочной вентиляции и потребления кислорода. Таким образом, коррекция кислотного сдвига на уровне крови посредством внутривенного введения $NaHCO_3$ при интенсивной физической деятельности оказалась неэффективной. Естественно, что эта неудача заставила обратиться к регуляции pH «на входе» – на уровне энергетического обмена тканей.

На основании вышеизложенных представлений о роли АТФ-азы в развитии метаболического ацидоза и возможном участии митохондрий в поддержании pH естественно возникло предположение о том, что изменение pH можно попытаться регулировать путем активации окислительно-восстановительных процессов в митохондриях. Известно, что для активации гликолитической энергопродукции можно использовать глюкозу или фруктозу. Отсюда можно было предположить, что для активации аэробных окислительных процессов следует

использовать экзогенные митохондриальные субстраты. Действительно, в литературе постоянно появляются свидетельства того, что 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 суммарной энергопродукции и основным ограничителем является не кислотный сдвиг pH, а истощение углеводных депо мышц (F. Brouns, G. J. Van der Vusse, 1998).

В настоящее время накоплен большой материал относительно использования глюкозы и других сахаров при мышечных нагрузках (А. Ф. Краснова, Н. Р. Чаговец, 1962; Л. К. Квартовкина, А. А. Минх, 1968; В. П. Правосудов, 1968; L. L. Spriet, S. J. Peters, 1998). Известно, что прием глюкозы способствует поддержанию гликогенного депо в мышцах (J. Bergstroem, P. Fuerst, F. Gellyas et al., 1972; F. Brouns, G. J Van der Vusse, 1998), препятствует снижению уровня сахара в крови (A. J. Benade, C. R. Jansen, G. G. Rogers et al., 1973) и повышает работоспособность на длинных дистанциях (Л. К. Квартовкина, 1968; M. S. el-Sayed, D. Mac Laren, A. J. Rattu, 1997). С другой стороны, введение сахаров может вызвать ацидоз вследствие усиленного образования лактата (J. P. Van Biervliet, R. C. Senders, J. M. Lamers et al., 1976; J. Rujner, W. T. Chrusciel, H. Kulczycka et al., 1990), и в таких случаях у спортсменов наблюдается снижение работоспособности (Н. Н. Яковлев, 1959). Учитывая закономерности смены субстратов при физической нагрузке, глюкозу следует принимать на длинных дистанциях при относительно малой интенсивности мышечной работы, когда преобладает полное аэробное окисление субстратов, но в силу истощения депо гликогена снижается содержание сахара в крови, усиливается окисление липидов и кетогенез. Введенная в таких условиях глюкоза окисляется примерно в 7,5 раз быстрее, чем в покое (D. Costill, A. Bennett, G. Branam et al., 1973; A. Viru, 1996), и способствует окислению ацетил-КоА, производных жирных кислот, тем самым уменьшая кетогенез и ацидоз.

В 1973 г. на втором симпозиуме по биохимии Н. Р. Чаговец рассказала об использовании экзогенной янтарной кислоты для ускорения восстановительных процессов у спортсменов. Обращение к ян-

тарной кислоте не было случайным и базировалось на высокой энергетической эффективности этого субстрата (М. Н. Кондрашова, 1968, 1969). После теоретического обоснования применения янтарной кислоты (М. Н. Кондрашова, 1970) и разрешения в 1972 г. Фармкомитетом Минздрава СССР ее клинической апробации появились работы, большинство из которых представлено в сборниках «Терапевтическое действие янтарной кислоты» (1975) и «Янтарная кислота» (1996), изданных под редакцией М. Н. Кондрашовой.

Высокая эффективность янтарной кислоты при самых разнообразных физиологических и патологических состояниях связывалась прежде всего с ликвидацией энергетического дефицита, возникающего при активном функционировании и в условиях гипоксии. Методология использования янтарной кислоты основывалась на следующем. Во-первых, окисление янтарной кислоты обеспечивает высокую скорость доставки восстановительных эквивалентов в дыхательную цепь и наибольший выход богатых энергией соединений в единицу времени, что для биологической системы важнее, чем высокий коэффициент полезного действия (Ц. А. Эльвейм, 1952). Во-вторых, можно было предположить, что окисление янтарной кислоты как флавосубстрата происходит легче в условиях кислородного голодания, чем NAD-зависимых субстратов, поскольку окисление последних может быть заторможено вследствие высокой восстановленности NADH (М. Н. Кондрашова, Е. И. Маевский, Г. В. Бабаян, 1973; Л. Д. Лукьянова, Б. С. Балмуханов, А. Т. Уголев, 1982). В-третьих, проведенные исследования (М. Н. Кондрашова, 1968; М. Н. Кондрашова, Н. Р. Чаговец, 1971; Э. В. Маркарян, 1971; W. Gevers, 1977; L. Opie, 1980) давали основание полагать, что увеличение вклада окислительного фосфорилирования в энергообеспечение АТФ-азной нагрузки за счет дополнительной поставки митохондриальных субстратов может оказаться эффективным «патогенетическим» способом стабилизации pH и поддержания работоспособности.

Действительно, при исследовании действия экзогенного сукцината всегда возникали вопросы, а проникает ли он в клетки и может ли включаться в окислительно-восстановительные превращения? Однако изложенные аргументы разбивались о стену сложившихся представлений о невозможности проникновения сукцината в неповрежденные клетки. Несмотря на множественность эффектов действия эк-

зогенного сукцината на уровне клеток, тканей и целостного организма, эти вопросы не были решены. Можно было предположить, что экзогенная янтарная кислота проникает в активно работающие клетки, проницаемость мембран которых, как правило, повышена. В таком случае введенный в организм сукцинат мог бы попадать точно по назначению, прежде всего в активно работающие ткани. Однако в литературе этот вопрос не освещен.

Наряду с сукцинатом представлялось целесообразным использовать глутамат в качестве эффективного поставщика эндогенной янтарной кислоты (А. М. Генкин, Н. А. Удинцев, 1959; М. С. Волков, А. М. Генкин, Е. И. Маевский и др., 1975) и активатора ее окисления в митохондриях не только in vitro, но и in vivo (А. Лабори, 1970; Н. А. Глотов, 1973). Активация глутаматом окисления сукцината осуществляется посредством снятия щавелево-уксусного торможения с сукцинатдегидрогеназы (М. Н. Кондрашова, 1968; М. С. Волков, А. М. Генкин, Е. И. Маевский и др., 1975). Кроме того, можно было рассчитывать на связывание глутаматом избытка аммиака в глутаминсинтетазной реакции (А. Майстер, 1961) и превращение глутамата в гликоген.

Применение глутаминовой кислоты в спорте ранее имело место. Было обнаружено повышение работоспособности и улучшение ряда биохимических показателей при интенсивной мышечной работе и утомлении под влиянием введенного в организм глутамата (К. А. Чазова, 1966). Вышеизложенное послужило основанием для совместного использования сукцината и глутамата с целью поддержания pH при АТФ-азных нагрузках in vitro и in vivo.

Исходно мы не исключали возможность использования пирувата, малата, α-кетоглутарата, изоцитрата и других субстратов, окисляющихся в митохондриях. Для проверки вышеизложенного предположения о возможном преимуществе окисления сукцината при гипоксии по сравнению с указанными NAD-зависимыми субстратами и об энергетическом приоритете сукцината, который можно было бы использовать для компенсации ацидоза, вызванного АТФ-азными нагрузками, мы считали необходимым провести модельные исследования in vitro по сравнению перечисленных субстратов и выяснению целесообразности и эффективности использования тех или иных субстратных композиций или отдельных экзогенных субстратов.

Глава 2. Моделирование in vitro кислотного сдвига pH в тканевых препаратах при АТФ-азных нагрузках

2.1. Подходы к экспериментальной оценке вклада митохондрий в поддержание pH при АТФ-азных нагрузках

Как уже говорилось, теоретические представления W. Gevers (1977) о том, что вклад митохондрий в поддержание pH при АТФ-азных нагрузках обусловлен главным образом реакциями окислительного фосфорилирования и в меньшей мере утилизацией недоокисленных продуктов гликолиза, в начале наших исследований не встретили понимания (L. H. Opie, 1980; D. R. Wilkie, 1980; A. Ross, W. Boron, 1981). Имелись достаточные основания для сомнений относительно участия митохондрий в поддержании внутриклеточного pH, поскольку экспериментально вклад окислительного фосфорилирования в поддержание pH не был определен из-за отсутствия адекватного способа исследования.

Традиционное определение титруемой буферной емкости (K. Sahlin, 1978) 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 (J. A. Thomas, R. N. Buchsbaum, A. Zimniak et al., 1979) не позволила определить величину вклада окислительного фосфорилирования в поддержание pH, так как одновременно снижалась активность АТФ-аз, очевидно вследствие повышения концентраций АДФ и фосфата (В. И. Дещеревский, 1977). Кроме того, вклад митохондрий легко «маскировался» в короткие промежутки времени активацией Na^+/H^+-обменника, который может играть весьма существенную роль в регуляции внутриклеточного pH (H. S. Aronson, W. F. Boron, 1986).

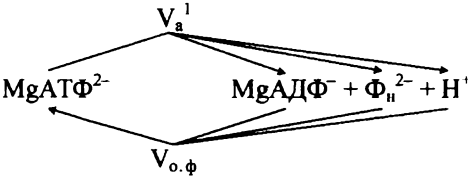
Необходимо было использовать принципиально иной кинетический подход, который позволил бы промоделировать генерацию H^+ в АТФ-потребляющих реакциях и определить при этом возможную

долю митохондриального энергообеспечения в предотвращении развития ацидоза.

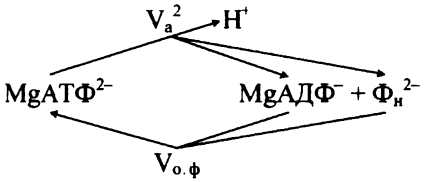
Из теоретического анализа, представленного в гл. 1, следовало, что in vitro, как и в математической модели, необходимо было создать стационарные или близкие к стационарным условия, в которых хотя бы в начальные периоды времени суммарные скорости гидролиза (V_a) и синтеза ($V_ф$) АТФ были бы равны:

$$V_a = V_ф \equiv V_{i.ф} + V_{o.ф}.$$

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



могла бы быть отделена от части АТФ-азной нагрузки V_a^2, обеспечиваемой гликолитическим фосфорилированием ($V_{г.ф}$) 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 pH путем определения разности между скоростями образования H^+ (ΔVH^+) в присутствии и отсутствие ингибиторов дыхания или разобщителей окислительного фосфорилирования.

Итак, следовало задать фиксированный по скорости, хотя бы на начальном промежутке времени, уровень работы

$$АТФ^{4-} \rightarrow АДФ^{3-} + Ф_н^{2-} + H^+$$

и изменять активность окислительного фосфорилирования

$$H^+ + Ф_н^{2-} + АДФ^3 \rightarrow АТФ^{4-}$$

или гликолиза

$$глюкоза + 2АДФ^{3-} + Ф_н^{2-} \rightarrow 2лактат^{1-} + 2АТФ^{4-}.$$

Для изменения вклада окислительного фосфорилирования в поддержание pH 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 Mg^{++} в инкубационной среде либо добавления 0,1–0,4 ед. внешних, экзогенных потребителей АТФ: гексокиназы с глюкозой, креатинкиназы с креатином или фактора F^1. (Креатинкиназу нам любезно предоставила Н. А. Розанова, фактор F^1 H^+-АТФ-азы – Г. Е. Бронников.)

Как показано на рис. 9, повышение содержания Mg^{2+} от 0,5 до 3,5 мМ при инкубации гомогената сердца вызывает почти линейное увеличение скорости освобождения 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. Очевидно, это связано с тем, что при окислении глюкозы первая (верхняя) часть гликолиза выполняет роль дополнительной АТФ-азы (помимо Mg^{++}-активируемых, негликолитических АТФ-аз): $глюкоза + АТФ^{-4} \rightarrow Г\text{-}6\text{-}Ф^{-2} + АДФ^{-3} + H^+ + фруктозо\text{-}6\text{-}фосфат^{-2} + АТФ^{-4} \rightarrow фруктозо\text{-}1\text{-}6\text{-}дифосфат^{-4} + АДФ^{-3} + H^+$. 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^+ / (мин · мг белка). Добавление АТФ с Mg^{++} приводит к стимуляции дыхания, похожей на стимуляцию дыхания АДФ.

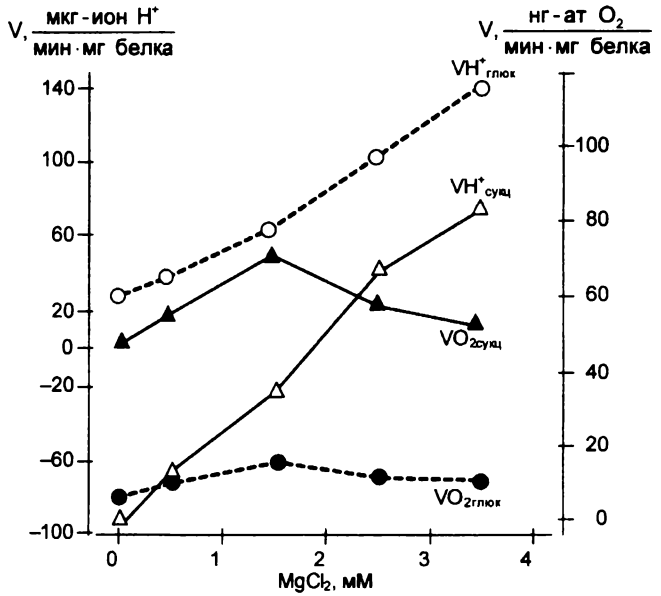


Рис. 9. Зависимость начальных скоростей генерации H^+ и потребления кислорода гомогенатом сердца крысы от концентрации магния при окислении глюкозы и сукцината

Среда инкубации: 125 мМ KCl, 1 мМ KH_2PO_4, 1 мМ ЭГТА, концентрация глюкозы – 5 мМ, начальная концентрация АТФ – 3 мМ. Содержание белка – 20 мг на 1 мл. Объем ячейки – 1,2 мл, температура – 29 °С

На рис. 10 видно, что в гомогенате сердца легко развивается щавелево-уксусное 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 щавелево-уксусную кислоту (ЩУК) в трансаминирование, активирует дыхание и сразу же «защелачивает» 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 щавелево-уксусное торможение

отсутствует. При этом картина дыхания и освобождения-связывания ионов водорода в точности соответствует ответу дыхания и pH на малую добавку АДФ.

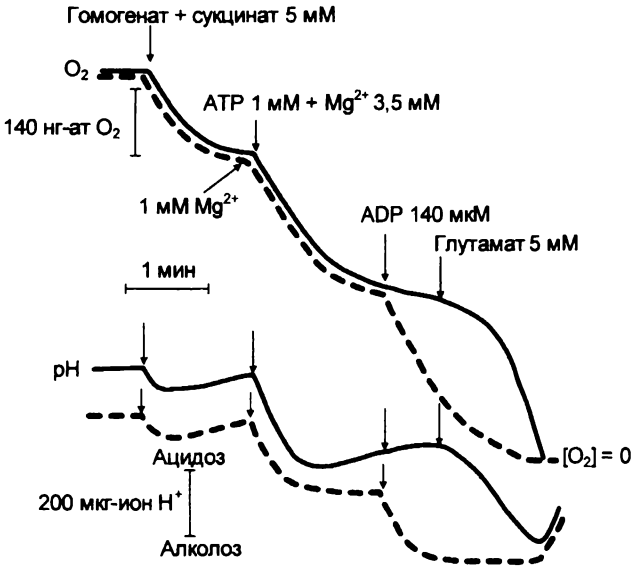


Рис. 10. Синхронная регистрация дыхания и pH при окислении сукцината гомогенатом сердца крысы в присутствии разных концентраций ионов магния

Среда инкубации и основные условия, как на рис. 9

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

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

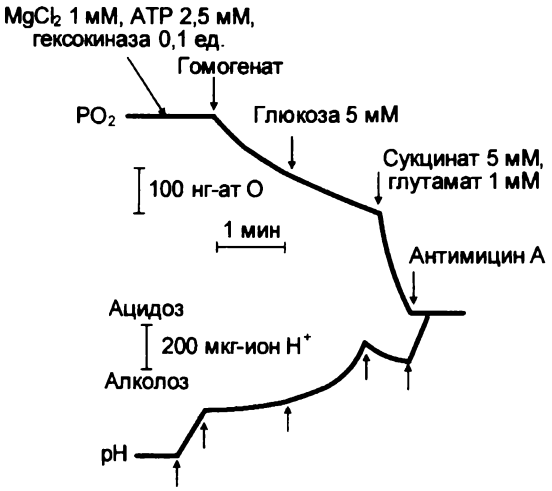


Рис. 11. Изменение скорости дыхания гомогената сердца и pH в присутствии глюкозо-гексокиназной системы при окислении глюкозы и сукцината с глутаматом

Условия и среда инкубации, как на рис. 10

На рис. 11 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.

2.2. Компенсация ацидоза посредством увеличения вклада окислительного фосфорилирования и роль сукцината в компенсации ацидоза при АТФ-азных нагрузках

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

Как показано в табл. 3, при фиксированной АТФ-азной нагрузке, задаваемой внесением Mg^{++}, большей скорости дыхания гомогената соответствует меньшее накопление H^+ при прочном сопряжении окислительного фосфорилирования.

Таблица 3

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

Условия инкубации (pH = 6,9; АТФ = 2,5; субстраты по 5 мМ)	Добавки Mg^{++}, мМ	Изменение $[H^+]$ в среде – VH^+, мкг-ион H^+ / (мин · мг белка)	Потребление O_2, нг-ат O / (мин · мг белка)
1. Глюкоза	–	+40 ± 3	10 ± 1
2. Глюкоза	2,5	+100 ± 6	9 ± 1
3. Глюкоза + β-ОМ	2,5	+125 ± 8	38 ± 2
4. Глюкоза + α-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 20 мкМ	2,5	+194 ± 9	11 ± 1
11. Сукцинат + ДНФ 20 мкМ	3,5	+75 ± 4	78 ± 2

Примечание. $\rho = 0{,}73$; $p < 0{,}05$.

Окисление добавленных глутамата, α-кетоглутарата (α-КГ) и β-оксибутирата (β-ОМ) примерно в равной мере повышает потребление O_2 гомогенатом сердца (см. табл. 3, пробы 3, 4, 5), однако при этом в разной степени снижает VH^+, и только при окислении глутамата шестикратно уменьшается скорость генерации H^+.

Наблюдаемые различия можно объяснить разными путями утилизации данных экзогенных субстратов. Окисление β-ОМ в сердце происходит не до ацетоацетата, как в печени, а полностью до CO_2 и H_2O. Вовлечение образующегося из β-ОМ ацетоацетата в цикл окислительного распада сопряжено с затратой энергии на ацилирование:

$$АТФ^{-4} + ацетоацетат^{-1} + HS\sim KoA \rightarrow АМФ^{2} + \\ + ацетоацетил\sim KoA + P\text{-}P^{-4} + H^+$$

или происходит путем переацилирования (А. Ленинджер, 1974):

ацетоацетат + сукцинил~КоА → ацетоацетил~КоА + сукцинат.

Получается, что еще до вступления β-ОМ в цикл Кребса в митохондриях сердца может происходить включение дополнительной АТФ-азы, дающей H^+ в среду. Кроме того, β-ОМ может существенно изменять транспорт в митохондрии вырабатываемого в гликолизе пирувата (F. Palmieri, E. Quagliariello, 1978). При этом транспорт пирувата частично может осуществляться в обмен на выход β-ОМ без потребления H^+. К тому же активность β-оксибутиратдегидрогеназы недостаточно велика по сравнению с другими дегидрогеназами. В результате небольшой вклад окислительного фосфорилирования нивелируется увеличением энерготрат и активацией гликолиза. Сочетание указанных обстоятельств может быть ответственно за увеличение скорости образования H^+ при окислении β-ОМ.

Очень малое потребление H^+ в присутствии α-кетоглутарата (см. табл. 3, проба 4) может быть связано с рядом обстоятельств. Во-первых, при окислении α-КГ наряду с подачей восстановительных эквивалентов в дыхательную цепь и запуском тем самым окислительного фосфорилирования идет субстратное фосфорилирование на уровне сукцинил-КоА. В результате из четырех молекул богатых энергией соединений, образующихся при каждом акте окисления α-КГ, одна молекула фосфорилируется без использования энергии трансмембранного потенциала, следовательно, без уборки – потребления иона водорода. Во-вторых, α-КГ подвергается окислительному декарбоксилированию в отличие от β-ОМ, малата или сукцината. Образовавшийся CO_2 в карбоангидразной реакции превращается в угольную кислоту. В-третьих, окисление α-КГ протекает параллельно с восстановительным аминированием, сопряженным с затратой энергии на трансгидрогеназную (ТГ) реакцию, поддерживающую высокую степень восстановленности NADP:

$$\text{α-КГ} + \text{NAD(P)H} + NH_3 \xrightarrow{\text{ГДГ}} \text{глутаматмат} + \text{NAD(P)}^+,$$

$$\text{NADP}^+ + \text{NADH} + \text{АТФ}^{-4} \xrightarrow{\text{ТГ}} \text{NADPH} + \text{NAD}^+ + \text{АДФ}^{-3} + \Phi^{-2} + H^+.$$

Хотя активность глутамагдегидрогеназы (ГДГ) в сердце мала (P. Bergmeyer, 1987), она достаточна для регулирования потока субстратов и энергии в цикле Кребса и дыхательной цепи (А. Д. Виногра-

дов, М. Н. Кондрашова, 1967; E. Davis, 1968). В результате, несмотря на увеличение вклада дыхания в энергопродукцию, интегральный показатель соотношения АТФ-синтетазной и АТФ-потребляющих реакций VH^+ остается таким же, как и без α-КГ, когда окисляется только глюкоза.

Возможно, именно благодаря отключению потребляющих энергию ТГ и ГДГ, вовлечению оксалоацетата в трансаминирование и как следствие активации СДГ и цикла Кребса в целом окисление добавленного глутамата (см. табл. 3, проба 5) значительно снижает концентрацию H^+. Не исключено, что какую-то роль играет уборка пирувата в трансаминазной реакции, когда вместо нарабатываемой в ходе гликолиза кетокислоты появляется амфотерное соединение – аминокислота аланин. Совместное окисление экзогенных пирувата и малата (см. табл. 3, проба 5) обеспечивает пятикратную активацию дыхания и в два раза уменьшает скорость генерации H^+ (сравнение с пробой 2). Можно было бы ожидать большего ощелачивающего эффекта от добавленного сукцината. Однако в гомогенате сердца в присутствии 2,5 мМ Mg^{++} при окислении сукцината развивается, как уже упоминалось выше, щавелево-уксусное торможение СДГ. Добавление глутамата в такой ситуации (проба 8) способствует уборке щавелево-уксусной кислоты и резко стимулирует скорость дыхания и уборку H^+. В отсутствие Mg^{++}, стимулирующего эндогенные АТФ-азы, потребление кислорода при окислении сукцината идет с несколько большей скоростью, чем с Mg^{++}, и наблюдается значительное защелачивание среды, подобное тому, которое обычно имеет место при фосфорилировании добавленного АДФ без внешней АТФ-азной нагрузки.

Разобщение окислительного фосфорилирования под влиянием динитрофенола (ДНФ), напротив, сопряжено с приростом образования ионов водорода, особенно резким в отсутствии субстратов, окисляющихся непосредственно в митохондриях (проба 10).

Итак, наименьшее закисление развивается при окислении сукцината с глутаматом. Подобная закономерность была прослежена и в присутствии экзогенных АТФ-аз, как это показано на рис. 12.

Учитывая возможность стимуляции аммонием синтеза глутамата, снимающего щавелево-уксусное торможение СДГ, в ряде экспе-

риментов мы вместо смеси сукцината калия с глутаматом калия использовали в качестве субстрата сукцинат аммония (табл. 4).

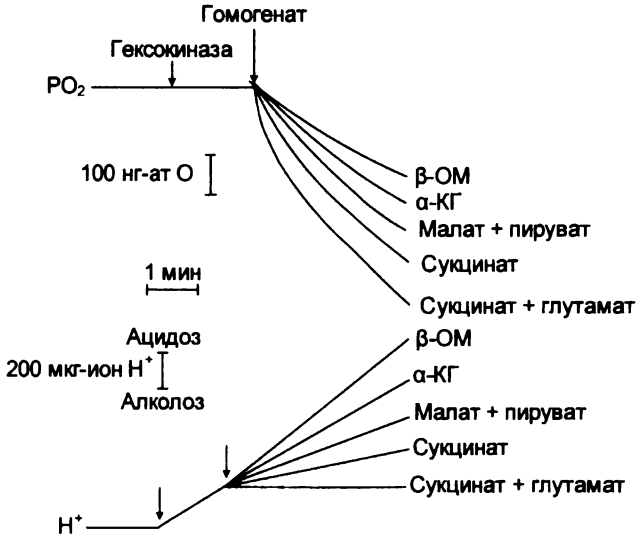


Рис. 12. Зависимость скорости освобождения ионов водорода в среду инкубации субстрата, окисляющегося в гомогенате сердца крысы

Условия инкубации, как на рис. 10, без магния, концентрация АТФ – 2,5 мМ. Добавки: глюкоза и другие субстраты – по 5 мМ, гексокиназа – 0,1 ед. Все кислоты в виде солей калия, за исключением пирувата Na

Оказалось, что при этом скорость потребления кислорода такая же, как и при окислении сукцината калия, однако VH^+ уменьшается так же, как в случае окисления сукцината в присутствии глутамата. Из этого следовало, что помимо окислительного фосфорилирования уборку H^+ может обеспечивать собственно восстановительное аминирование, потребляющее $NAD(P)H \cdot H^+$:

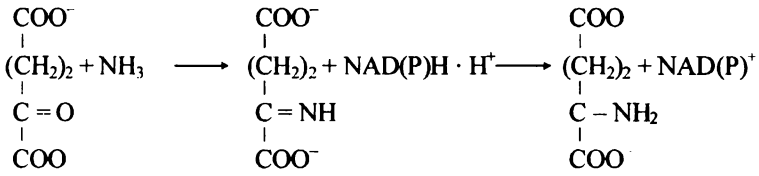


Таблица 4

Сравнение скоростей генерации H^+ (VH^+) и потребления O_2 (VO_2) при окислении гомогенатом сердца сукцината аммония, сукцината калия и смеси сукцината калия с глутаматом калия

Условия инкубации гомогената* (n=4)	VH^+, мкг-ион H^+ / (мин · мг белка)	VO_2, нг-ат O / (мин · мг белка)
1. Гексокиназы 0,1 ед. + глюкозы 1 мМ	+195 ± 9	5 ± 1
2. Сукцината калия 5 мМ + гексокиназы 0,1 ед. + глюкозы 1 мМ	+152 ± 7	45 ± 2
3. Сукцината калия 5 мМ + глутамата калия 5 мМ + гексокиназы 0,1 ед. + глюкозы 1 мМ	+120 ± 5	74 ± 3
4. Сукцината $(NH_4)_2$ 5 мМ + гексокиназы 0,1 ед. + глюкозы 1 мМ	+121 ± 6	49 ± 3
5. Глюкозы 5 мМ + антимицина А 6 мкг + сукцината $(NH_4)_2$ 5 мМ	+81 ± 5 +95 ± 4 +56 ± 4	11 ± 2 0 0

*Состав инкубационной среды: 150 мМ KCl; 3 мМ KH_2PO_4; 2,5 мМ АТФ; 1,2 мМ $MgCl_2$.

Поскольку эта реакция не зависит непосредственно от наличия потока электонов на кислород, то можно ожидать, что сукцинат аммония, стимулируя вхождение эндогенного α-КГ в реакцию восстановительного аминирования, способен снижать VH^+ и при закрытой дыхательной цепи. Возможность почти полного окисления пиридиннуклеотидов в отсутствии O_2 в реакциях восстановительного аминирования хорошо известна (J. Tager, E. Slater, 1963; Ю. Г. Каминский, 1973; Е. Б. Окон, 1977). Окисление NADPH при заторможенной дыхательной цепи сукцинатом аммония было показано Д. Б. Борзовым и Е. И. Маевским (1978). Действительно, как видно из табл. 4 (проба 5), сукцинат аммония вызывает существенное снижение VH^+ при торможении дыхания антимицином А. Важным фактором в уборке H^+ может быть в этом случае перенос аммония в митохондрии (F. Palmiert, E. Quagliariello, 1978).

Таким образом, в экспериментах по моделированию АТФ-азных нагрузок активация окислительного фосфорилирования обеспечивает уменьшение ацидоза. Увеличение вклада окислительного фосфори-

лирования в энергообеспечение АТФ-азных нагрузок достигается in vitro внесением экзогенных субстратов, окисление которых обеспечивает поступление восстановительных эквивалентов в дыхательную цепь митохондрий. При использовании энергетически наиболее эффективного субстрата – сукцината – ацидоз уменьшается ощутимее. В сочетании с экзогенным глутаматом или с аммонием, способствующим образованию глутамата, сукцинат окисляется без развития щавелево-уксусного торможения, с высоким энергетическим выходом, судя по уборке H^+ в ходе окислительного фосфорилирования.

Далее для определения вклада окислительного фосфорилирования в поддержание pH при АТФ-азных нагрузках измеряли скорость генерации H^+, отключая реакции окислительного фосфорилирования на фоне фиксированной скорости генерации H^+:

$$VH^+_{набл} = VH^+_{нагр} - VH^+_{о.ф.}$$

В таких условиях, как указывалось, любой способ уменьшения вклада окислительного фосфорилирования в энергообеспечение АТФ-азных нагрузок должен приводить к увеличению скорости образования H^+. На рис. 13 показано, что остановка дыхательной цепи антимицином А или KCN, торможение аденилаттранслоказы карбоксиатрактилазидом, H^+-АТФ-азы олигомицином, переносчика фосфата N-этилмалеимидом (NEM) или разобщение окислительного фосфорилирования 2,4-динитрофенолом (ДНФ) почти одинаково тормозят уборку протонов (H^+), генерируемых экзогенной АТФ-азой, несмотря на то что скорость потребления кислорода изменяется при этом по-разному.

На основании этих данных можно полагать, что в описанных условиях основной вклад в «связывание» H^+ вносит собственно окислительное фосфорилирование. Полученный результат теоретически был легко предсказуем, однако он не давал ответа на вопрос, какая парциальная реакция в ресинтезе АТФ ответственна за уборку H^+. Нам кажется, что эксперимент с низкой концентрацией NEM в какой-то степени отвечает на этот вопрос. Добавка 50 мкМ NEM полностью ликвидирует изменение pH, наблюдаемое при фосфорилировании, при сохранении ответа на АДФ по дыханию (рис. 14). Поскольку в малой концентрации NEM преимущественно ингибирует перенос фосфата, можно полагать, что наиболее вероятной реакцией, ответст-

венной за уборку H^+ при окислительном фосфорилировании, является перенос фосфата. Подобные результаты были получены G. Boehme, K. J. Hartung, W. Kunz (1978).

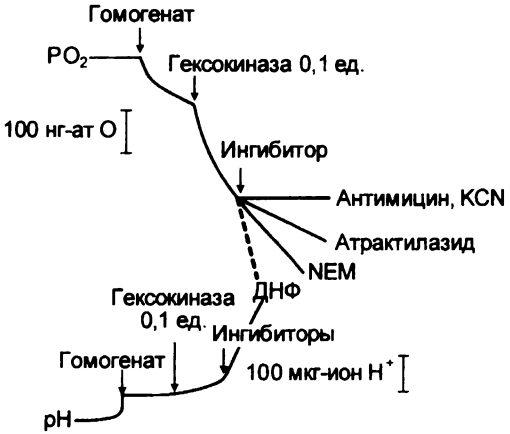


Рис. 13. Влияние различных ингибиторов на скорость дыхания и pH при моделировании АТФ-азных нагрузок на гомогенате сердца крысы
В среде инкубации: АТФ – 1 мМ; глюкозы – 5 мМ; сукцината – 5 мМ; глутамата – 5 мМ. Добавки: антимицин А – 5 мкМ, KCN – 3 мМ, атрактилазид – 5 мкМ, ДНФ – 30 мкМ, NEM – 1 мМ

Для выявления вклада в поддержание pH окисления немитохондриального NADH · H^+ и пирувата, образующихся в гликолизе, был использован ингибитор малат-аспартатного шунта – аминооксиацетат (AOA).

При этом мы исходили из известного факта, что скорость окисления пирувата в митохондриях равна скорости окисления внемитохондриального NADH · H^+ посредством H^+-челнока (J. R. Williamson, S. W. Schaffer, C. Ford et al., 1976). Однако влияние AOA на pH сказалось чрезвычайно мало: на фоне атрактилазида или NEM дополнительное увеличение генерации H^+ после добавления AOA не превышало 1/30–1/40 величины эффекта первых двух ингибиторов. Даже в отсутствие добавленных субстратов цикла трикарбоновых кислот, когда окисляются лишь эндогенные субстраты и продукты гликолиза (в присутствии 5 мМ глюкозы), судя по результатам ингибиторного

анализа, ведущая роль в поддержании pH при АТФ-азных нагрузках принадлежит окислительному фосфорилированию, а не окислению продуктов гликолиза. Полученные данные могут быть описаны схематически (рис. 15).

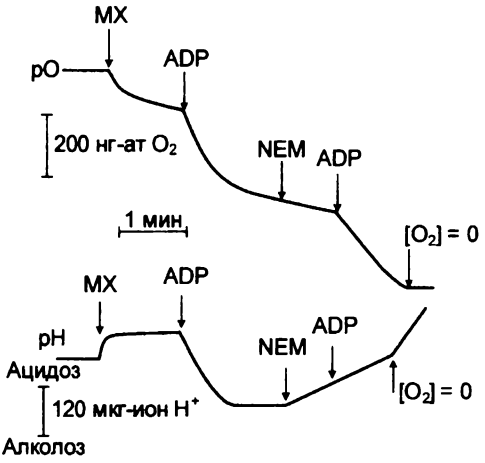


Рис. 14. Ликвидация ощелачивающего эффекта при внесении в инкубационную среду с митохондриями сердца крысы 50 мкм N-этилмалеимида

Условия инкубации: 100 мМ KCl, 3 мМ KH_2PO_4 (pH = 7,4), 1 мМ $MgSO_4$, 0,5 мМ ЭГТА (t = 29 °C)

Из приведенной схемы ясно, что оборот АТФ, АДФ, $Ф_н$ и H^+ происходит в существенно большем объеме, чем утилизация пирувата. Стехиометрия потребления H^+ и пирувата из цитозоля при отсутствии разобщения окислительного фосфорилирования как минимум равна величине АДФ/О, но если брать в расчет полное окисление пирувата до CO_2 и H_2O, сопровождающееся пятью актами дегидрирования, то соотношение $\Delta H^+/\Delta$-пируват может достигать 15. Поскольку малат-аспартатный шунт окисляет в цитозоле столько же молекул $NADH^+$, сколько молекул пирувата окисляется в митохондриях, то добавляется еще один акт дегидрирования с последующим ресинтезом АДФ в дыхательной цепи (итого 6 дегидрирований при полном окислении одной молекулы пирувата). Следовательно, соотношение

уборки H^+ при окислении пирувата к уборке H^+ при окислительном фосфорилировании может достигать 1:18. При учете образования трех молекул угольной кислоты в результате декарбоксилирования при полном окислении пирувата это отношение достигает 1:15. Отсюда становится понятным, почему аминооксиацетат почти не влияет на уборку H^+ при АТФ-азных нагрузках.

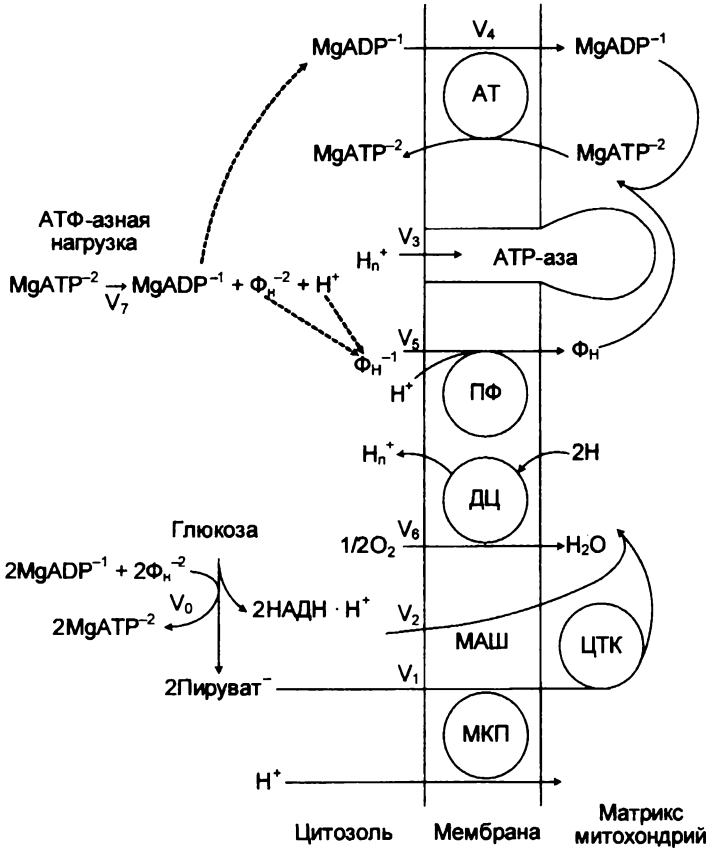


Рис. 15. Схема потоков ионов водорода при обеспечении АТФ-азных нагрузок реакциями окислительного фосфорилирования:

АТ – аденилаттранслоказа; ПФ – переносчик фосфата; ДЦ – дыхательная цепь; ЦТК – цикл трикарбоновых кислот; МАШ – малат-аспартатный шунт; МКП – монокарбоксилатный переносчик

Итак, вклад фосфорилирующего дыхания в поддержание pH можно определять по разности скоростей генерации H^+ в присутствии ингибиторов (атрактилазида, олигомицина или антимицина А) и без них.

Эффективность уборки H^+ митохондриями оценивали по отношению ΔVH^+ к соответствующему значению ΔVO_2 (табл. 5).

Таблица 5

Зависимость эффективности уборки H^+ от условий инкубации гомогената сердца

Условия инкубации			Измеряемые параметры		
Субстраты	АТФ, мМ	Mg^{++}, мМ	ΔVH^+, мкг-ион / (мин · мг белка)	ΔVO_2, нг-ат / (мин · 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

Примечание. Величина $\Delta VH^+ = VH^+_{инг} - VH^+_{о.ф}$ ΔVH^+ рассчитана 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 ($VH^+_{о.ф}$).

Повышение концентрации Mg^{++} от 1 до 3,5 мМ, глюкозы до 5 мМ или внесение в среду 20 мкМ ДНФ снижает эффективность уборки H^+. Напротив, увеличение концентрации АТФ с 2,5 до 5 мМ, внесение 5 мМ глутамата приводят к росту отношения $\Delta VH^+/\Delta VO_2$. В митохондриальных препаратах с более высокой степенью сопряжения окислительного фосфорилирования величина отношения $\Delta VH^+/\Delta VO_2$ всегда выше.

Приведенные в табл. 5 величины ΔVH^+ отражают вклад окислительного фосфорилирования в динамическую «буферную емкость» ткани. Если считать, что содержание белка составляет в сердце 15% от массы ткани, то при величине ΔVH^+ порядка 100 мкг-ион / (мин · мг белка) окислительное фосфорилирование может «защелачивать» около 15 мМ H^+ / (мин · г ткани). Таким образом, за 5 мин вклад окислительного фосфорилирования в динамическую буферную емкость равен всей суммарной буферной емкости ткани (гл. 1, 4), обусловленной 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 (рис. 16).

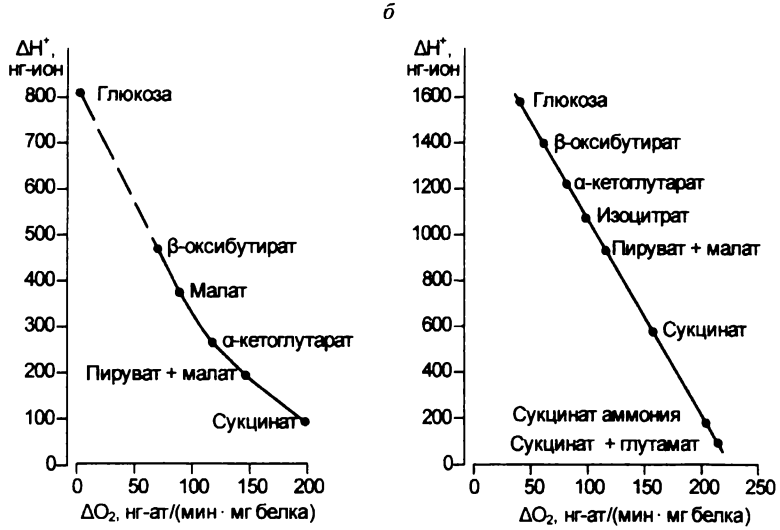


Рис. 16. Уменьшение кислотного сдвига при активации дыхания различными субстратами концентрацией 5 мМ на препаратах митохондрий печени крысы (*а*) гомогената сердца (б) при стационарной АТФ-азной нагрузке, задаваемой глюкозо-гексокиназной фосфатакцепторной системой:

а – 0,03 ед. гексокиназы + 5 мМ глюкозы; *б* – 0,1 ед. гексокиназы + 5 мМ глюкозы

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

В ткани и тем более в целостном организме практически никогда не происходит окисление моносубстратов. По крайней мере, при развитии метаболического ацидоза, связанного с активацией АТФ-аз, имеет место избыток лактата. В модельных экспериментах, выполненных совместно с Н. П. Ким (N. P. Kim, I. V. Ovchinnikov, D. S. Guliamov et al., 1989; Н. П. Ким, Е. И. Маевский, Е. В. Гришина, М. С. Окон и др., 1996), нами было исследовано взаимное влияние совместного окисления экзогенных глюкозы, лактата и сукцината в гомогенате сердца крыс. Эти условия ближе к тем, которые встречаются в ткани. Даже при наличии естественного или искусственно созданного избытка какого-либо субстрата последний окисляется во взаимодействии с превращениями других субстратов. Во время и после гипоксии, как правило, происходит мобилизация глюкозы из гликогенных депо и всегда имеется избыток лактата, что существенным образом определяет энергетическое и кислотно-основное состояние ткани.

«Косубстратные» взаимодействия на гомогенате сердца крысы исследовались с использованием меченой 1,6 ^{14}C-глюкозы (Н. П. Ким, 1987). Работа выполнялась на 20%-м гомогенате сердца белых крыс-самцов породы вистар весом 150–220 г. После 10 мин преинкубации при 25°C в ячейку с 1 мл гомогената и 1 мл инкубационной среды, содержащей 150 мМ KCl, 1 мМ $MgCl_2$, 16 мМ никотинамида, 2 мМ АМФ, 1 мМ NAD, добавляли субстраты окисления. Оказалось, что без добавления других субстратов 60% глюкозы превращается по гликолитическому пути в лактат и пируват, а 40% окисляется до CO_2. Добавление лактата сильно тормозило окисление глюкозы. При добавлении сукцината с лактатом или сукцината с глюкозой наблюдалось интенсивное окисление лактата и снижалось использование глюкозы. При этом уменьшалось закисление среды и возрастал уровень АТФ (табл. 6).

Таблица 6

Изменение концентрации лактата, АТФ и величины pH при инкубации гомогената сердца крысы с глюкозой, лактатом и сукцинатом

Субстраты окисления	Концентрация лактата		[АТФ] в конце инкубации	pH после инкубации (исходно pH = 6,9)*
	до инкубации	после инкубации		
1. 5 мМ глюкозы (n = 5)	2,80 ± 0,14	5,00 ± 0,17	1,27 ± 0,49	6,39 ± 0,05
2. 5 мМ глюкозы + + 10 мМ лактата (n = 7)	12,80 ± 0,14	9,35 ± 0,15 $P_1 < 0,001$	0,39 ± 0,13	6,39 ± 0,08
3. 5 мМ глюкозы + + 5 мМ сукцината (n = 5)	2,80 ± 0,14	Не определяется	1,38 ± 0,29 $P_2 < 0,02$	6,64 ± 0,06 $P_1 < 0,02$ $P_2 < 0,05$
4. 5 мМ сукцината + + 10 мМ лактата (n = 10)	12,80 ± 0,14	6,20 ± 0,16 $P_2 < 0,001$	1,66 ± 0,12 $P_2 < 0,001$	7,33 ± 0,08 $P_{1,2,3} < 0,001$

* Во время преинкубации без субстрата значение pH инкубационной среды снижалось с 7,4 до 6,90±0,04. Время инкубации – 10 мин.

Полученные данные, на наш взгляд, следует учитывать в случае введения значительного количества глюкозы, когда может резко увеличиваться вклад гликолиза в энергообеспечение, что способствует развитию ацидоза и неблагоприятно влияет на систему регуляции сахара в крови. Еще более опасным представляется использование лактатного буфера (препарат лактосол) для устранения метаболического ацидоза (В. Д. Машковский, 1998). Избыток лактата опасен не только тем, что способствует гипоксическому сдвигу редокс-состояния в системе $NADH/NAD^+$ в цитозоле клеток, уменьшению окисления эндогенной глюкозы и падению в связи с этим уровня АТФ. Он может также серьезно нарушать окислительное фосфорилирование в митохондриях (H. Senger, 1975). Напротив, введение янтарной кислоты (сукцината) при избытке эндогенного лактата в присутствии глюкозы способно нормализовать тканевое дыхание и восстановить его доминирование над гликолизом (своеобразный пастеровский эффект). Не последнюю роль в уборке пирувата и лактата, образующихся в гликолизе, при этом выполняет цитратсинтетазная реакция, в которой используется продукт окисления пирувата – ацетил-КоА – благодаря выработке оксалоацетата из окисляющегося сукцината.

Механизм восстановления доминирования дыхания над гликолизом может быть обусловлен включением окислительного фосфорилирования и мощного окисления янтарной кислоты, выигрывающей в конкуренции с гликолизом за фосфат. Учитывая хорошо известную способность янтарной кислоты поддерживать высокую степень восстановленности пиридиннуклеотидов в митохондриях за счет энергозависимого обратного переноса электронов в дыхательной цепи (B. Chance, G. Hollunger, 1961; А. Д. Виноградов, М. Н. Кондрашова, 1967; А. Д. Виноградов, 1979), можно предположить, что присутствие сукцината препятствует уборке восстановительных эквивалентов из цитозоля и поэтому тормозится гликолитическая оксидоредукция. Но лактат при этом не накапливается, так как митохондрии, поддерживающие высокий $\Delta\mu H^+$, потребляют образующийся из глюкозы пируват. В целом окисление сукцината, приводящее к энергизации митохондрий и клеток, должно и через аллостерические механизмы регуляции сопровождаться торможением гликолиза (А. Л. Ленинжер, 1974).

Далее мы промоделировали АТФ-азную нагрузку на изолированной почке, перфузируемой в рециркуляторном режиме. На перфузируемой почке собаки АТФ-азную нагрузку задавали дозированным повышением проницаемости клеточных мембран путем изменения состава перфузата – газопереносящей эмульсии перфторорганических соединений (ПФОС). Вместо неионогенного сурфактанта проксанола 168, не повреждающего клеточные мембраны (а. с. 1325732) эмульсию готовили с поверхностно более активным детергентом проксанолом 268 или плюроником F68. Эксперимент по нормотермической рециркуляторной перфузии почки был выполнен совместно с С. Чилая и М. Вазагашвили в Институте клинической и экспериментальной хирургии Грузинской ССР (рис. 17). Видно, что добавление глюкозы в перфузионную среду в случае использования эмульсии с плюроником F68 вызывало существенный сдвиг pH в кислую сторону. И напротив, внесение в перфузат 1 мМ сукцината натрия способствовало защелачиванию среды, как это наблюдалось на гомогенате сердца и гомогенате печени.

Представленный материал свидетельствует о том, что и в гомогенате, и на перфузируемом органе активация глюкозой субстратного фосфорилирования в реакциях гликолитической оксидоредукции приводит к увеличению вклада гликолиза в энергообеспечение и к развитию ацидоза. Напротив, с помощью экзогенного сукцината можно уве-

личить вклад окислительного фосфорилирования в обеспечение АТФ-азной нагрузки и достаточно эффективно уменьшить ацидоз.

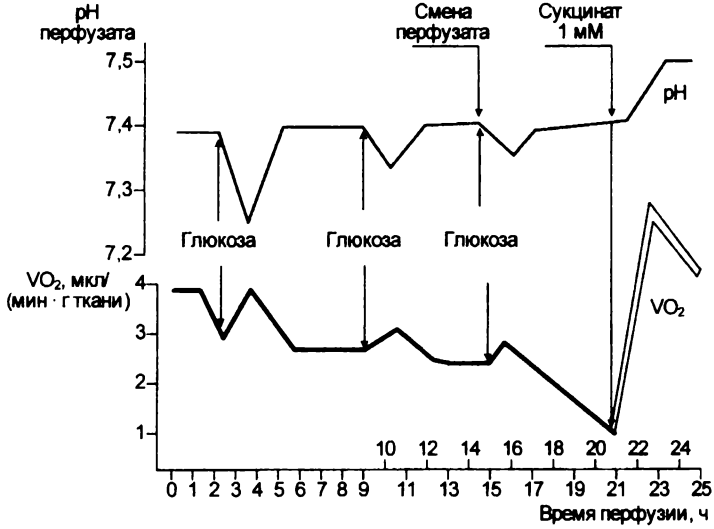


Рис. 17. Влияние глюкозы и сукцината на pH перфузата и скорость дыхания изолированной почки собаки

Состав эмульсии: 10 объемных% ПФОС, 4% плюроника F68, 120 мМ NaCl, 4 мМ KCl, 2 мМ $CaCl_2$, 10 мМ $NaHCO_3$, 1,5 мМ KH_2PO_4. Добавки глюкозы – по 6 мМ, объем перфузата – 1 л, t = 26 °С, масса почки – 40 г

Таким образом, ожидаемый и обнаруженный на уровне митохондрий, гомогената и перфузируемого органа противоацидотический эффект отдельно взятого экзогенного сукцината проявляется также и в условиях кометаболизма сукцината с лактатом и глюкозой и сопровождается улучшением энергетического состояния тканевого препарата. Полученные данные 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 (Н. Н. Яковлев, 1974, 1976, 1983; K. Sahlin, 1978; K. Sahlin, G. Palmskog, E. Hultman et al., 1978; Ф. Д. Голлник, Л. Германсен, 1982; Дж. О. Холлоши, 1982).

Глава 3. Изменение дыхательного коэффициента и кинетических параметров митохондрий при окислении экзогенных субстратов в различных функциональных состояниях и при уменьшении оксигенации

3.1. Изменение дыхательного коэффициента и сопряженных с дыханием энергозависимых процессов как способ определения вида окисляющегося субстрата

В предыдущем разделе в экспериментах in vitro мы обнаружили, что с помощью экзогенных субстратов, окисляющихся в митохондриях, можно существенно уменьшить степень метаболического ацидоза, обусловленного активацией АТФ-аз, которая, в свою очередь, является обязательным атрибутом любой интенсивной нагрузки. Однако в условиях целостного организма интенсивная нагрузка, как правило, сопряжена с развитием рабочей гипоксии. Причина рабочей гипоксии заключена в высокой активности окислительно-восстановительных процессов, протекающих в митохондриях. Кислородный дефицит обусловлен тем, что при интенсивной работе потребление кислорода превышает скорость его доставки. Поэтому вопрос об увеличении вклада митохондрий в энергопродукцию не может быть решен просто путем увеличения подачи субстратов окисления непосредственно в цикл трикарбоновых кислот, минуя гликолиз, без учета возможности окисления этих субстратов в гипоксических условиях.

В модельных экспериментах на изолированных митохондриях, гомогенате, перфузируемом органе нами было показано, что наиболее высокой противоацидотической активностью обладает сукцинат. Несмотря на то что при его окислении термодинамическая эффективность окислительного фосфорилирования меньше, чем при окислении NAD-зависимых субстратов (коэффициент АДФ/О при окислении сукцината равен 2, а при окислении NAD-зависимых субстратов равен 3), за счет того что скорость окисления сукцината существенно выше, чем у других субстратов цикла, мощность процесса генерации

трансмембранного потенциала столь велика, что обеспечивает более высокую скорость как фосфорилирования, так и других энергозависимых реакций, например обратного переноса электронов, поддерживающего более высокую степень восстановленности NADH и NADPH, чем при окислении NAD(P)-зависимых субстратов.

Однако меньшая термодинамическая эффективность и высокая скорость потребления кислорода при окислении сукцината, казалось бы, несовместимы с условиями кислородного дефицита. При гипоксии кислород должен расходоваться более экономично, а добавка экзогенного сукцината должна увеличивать кислородный дефицит и снижать энергетический выход фосфорилирующего дыхания. В связи со сказанным энергетические преимущества окисления сукцината, выявленные при нормоксии (а реально in vitro при гипероксии), становятся совсем не очевидными при гипоксии. Хотя имеющиеся в литературе данные дают основание полагать, что при гипоксии может складывается ситуация, более благоприятная для окисления сукцината, чем для окисления NAD-зависимых субстратов. Суть этой ситуации заключается в следующем.

Даже в гипероксических условиях эксперимента in vitro, когда парциальное давление кислорода в инкубационной среде достигает 150 мм рт. ст., в изолированных митохондриях степень восстановленности NAD(P)H существенно выше, чем степень восстановленности флавинов и тем более цитохромов (табл. 7) (B. Chance, G. R. Williams, 1955; А. Ленинджер, 1974).

Это, возможно, обусловлено не только тем, что NAD и NADP более удалены от кислорода, чем флавины и цитохромы, но и кинетическими особенностями организации дыхательной цепи, в частности тем, что на пути восстановительных эквивалентов от первого комплекса расположен наиболее медленный переносчик – коэнзим Q, пул которого существенно больше, чем пул других коферментов. На его уровне возможно перераспределение и торможение потока восстановительных эквивалентов. При уменьшении парциального давления кислорода наблюдается еще более значительное увеличение степени восстановленности пиридиннуклеотидов по сравнению с другими переносчиками в дыхательной цепи. Это было показано на перфузируемой печени в лаборатории Б. Чанса (R. Scholz, R. G. Thurman, J. R. Willamson et al., 1969) и на срезах головного мозга в лаборатории

Л. Д. Лукьяновой (Л. Д. Лукьянова, А. Т. Уголев, С. В. Харадуров и др., 1978). Фактически пиридиннуклеотиды целиком восстановлены, а флавины еще частично окислены.

Таблица 7

Метаболические состояния митохондрий

№ п/п	Характеристика состояния					Степень восстановленности дыхательных переносчиков в стационарном состоянии, %				
						Цитохромы			Флавопротеиды	Пиридиннуклеотиды
	$[O_2]$, %	[АДФ]	[Субстрат]	VO_2	Ограничитель дыхания	*a*	*c*	*b*		
1	100	Низкая	Низкая	Малая	АДФ	0	7	17	21	90
2	100	Высокая	0	Малая	Субстрат	0	0	0	0	0
3	100	Высокая	Высокая	Большая	Дыхательная цепь	4	6	16	20	53
4	100	Низкая	Высокая	Малая	АДФ	0	14	35	40	99
5	0	Высокая	Высокая	0	O_2	100	100	100	150	100

Примечания:

1. Квадратными скобками обозначены концентрации веществ.
2. VO_2 – скорость дыхания.

Исходя из анализа такого рода редокс-сдвигов в дыхательной цепи, мы предположили, что в гипоксических условиях высокая степень восстановленности NAD(P)H должна препятствовать окислению любого NAD-зависимого субстрата, при том что окисление сукцината, дегидрогеназа которого является флавин-зависимым ферментом, может оставаться на высоком уровне благодаря сохранению большей окисленности флавинов в дыхательной цепи (М. Н. Кондрашова, Е. И. Маевский, Г. В. Бабаян, 1973). Были получены косвенные свидетельства того, что сукцинат легче окисляется при гипоксии, по крайней мере окисляется быстрее, чем воспроизводится из NAD-зависимых субстратов, поскольку его концентрация в условиях острой гипоксической гипоксии в ткани печени может снижаться в 2 раза (Е. И. Маевский, 1971). В подобных же экспериментах при

гипоксической гипоксии наблюдалось увеличение концентрации всех остальных интермедиатов цикла трикарбоновых кислот (М. С. Волков, А. М. Генкин, Е. И. Маевский и др., 1975), что свидетельствует скорее всего о торможении их окисления.

R. W. Von Korff (1967) измерил изменение концентраций субстратов цикла Кребса на изолированных митохондриях сердца кролика в разных метаболических состояниях, в частности в 3-м и 4-м состояниях по Чансу – Вильямсу, отличающихся прежде всего степенью восстановленности дыхательных переносчиков (см. табл. 7). В 3-м состоянии они практически полностью окислены, тогда как в 4-м состоянии восстановлены, причем степень восстановленности NADH в 4-м состоянии достигает 99% (B. Chance, G. R. Williams, 1955).

Итак, R. W. Von Korff показал, что в 3-м состоянии происходит уменьшение стационарных концентраций всех NAD-зависимых субстратов и прирост концентрации сукцината, а в 4-м состоянии при более высокой восстановленности NAD(P)H прирастает концентрация всех NAD-зависимых субстратов, но уменьшается концентрация сукцината. Если считать, что 3-е и 4-е состояния с точки зрения изменения редокс-состояния переносчиков дыхательной цепи моделируют соответственно нормоксическое и гипоксическое состояния, то можно полагать, что при нормоксии лучше окисляются NAD-зависимые субстраты, а при гипоксии – сукцинат. Следует также иметь в виду, что сукцинатдегидрогеназа чрезвычайно чувствительна к редокс-состоянию пиридиннуклеотидов, железо-серного комплекса и коэнзима Q (СДГ активируется при росте степени восстановленности этих переносчиков и ингибируется при их окислении) (T. P. Singer, 1965; M. Gutman, 1978; А. Д. Виноградов, 1979). Более того, конкурентный ингибитор СДГ – щавелево-уксусная кислота – может накапливаться только при высокой степени окисленности NAD, поскольку является высокоэлектронофильным соединением и легко восстанавливается до малата при малейшем росте восстановленности NADH. Очевидно, именно уменьшением величины щавелево-уксусного торможения СДГ при росте восстановленности NADH обусловлено повышение скорости дыхания, в частности окисления сукцината митохондриями, выделенными после гипоксии (З. П. Барбашова, 1960; Е. И. Маевский, 1971; М. Н. Кондрашова, Е. И. Маевский, Г. В. Бабаян, 1973; L. Mela, 1979). По крайней мере, величина щавелево-уксусного торможения

сукцинат-зависимого дыхания митохондрий печени, сердца и коркового слоя почек после перенесения животными острой гипоксической гипоксии резко уменьшалась (Е. И. Маевский, 1971; М. Н. Кондрашова, Е. И. Маевский, Г. В. Бабаян, 1973). In vitro гипоксиеподобную ситуацию восстановления NADH при сохранении окисленности флавопротеидов фактически промоделировала в экспериментах с активацией окисления сукцината ротеноном (U. Rasmussen, 1969).

Таким образом наш собственный опыт и анализ представленных в литературе данных свидетельствуют о том, что в условиях гипоксии можно было бы ожидать преобладания окисления сукцината как в связи с торможением окисления NAD-зависимых субстратов, так и в связи с повышением активности СДГ при восстановлении удаленных от кислорода участков дыхательной цепи. Однако прямые экспериментальные доказательства такого сдвига в соотношении скоростей окисления NAD-зависимых субстратов и сукцината до настоящего времени не были получены.

Мы подошли к исследованию этого вопроса, используя различия в окислении таких NAD-зависимых субстратов, как пируват и α-кетоглутарат, с одной стороны, и сукцинат – с другой. Пируват и α-кетоглутарат в процессе окисления подвергаются окислительному декарбоксилированию, т. е. одновременно идут дегидрирование (поставка водорода в дыхательную цепь) и образование CO_2, тогда как окисление сукцината – это только дегидрирование. Можно было полагать, что измерение отношения освобождающегося CO_2 к количеству потребляемого кислорода, т. е. величины дыхательного коэффициента $RQ = \Delta CO_2/\Delta O_2$, позволит определить, какой субстрат окисляется: подвергающийся окислительному декарбоксилированию (пируват или α-кетоглутарат) или только дегидрирующийся сукцинат. В первом случае теоретически величина дыхательного коэффициента должна приближаться к единице ($\Delta CO_2 = \Delta O_2$), а во втором случае она должна быть равной нулю ($\Delta CO_2 = 0$).

В физиологических условиях на уровне целостного организма величина дыхательного коэффициента RQ не падает, по крайней мере в покое, ниже 0,7–0,8. При этом считается, что величина RQ зависит от того, какой из основных видов субстратов: углеводы, жиры или белки – преимущественно окисляется в момент измерения.

Очевидно, что окисление глюкозы

$$C_6H_{12}O_6 + 6O_2 \rightarrow 6CO_2 + 6H_2O$$

дает величину дыхательного коэффициента, равную 1: $RQ = 6CO_2/6O_2$.

При окислении жирных кислот, например пальмитиновой:

$$C_{18}H_{34}O_2 + 25{,}5O_2 \rightarrow 18CO_2 + 17H_2O,$$

величина $RQ = 18\ CO_2 / 25{,}5O_2$ составит около 0,71.

При окислении аминокислот величина дыхательного коэффициента может существенно варьировать в зависимости от вида окисляющейся аминокислоты, но если учитывать, что количественно в энергетическом обмене преобладает окисление глутаминой, аспарагиновой, дикарбоновых аминокислот, а также аланина и глутамина, то ясно, что величина RQ для аминокислот в среднем составит не менее 1,0.

При гипоксии обычно наблюдают повышение величины дыхательного коэффициента, обусловленное тем, что в кровоток поступают недоокисленные продукты обмена веществ, которые нейтрализуются бикарбонатной буферной системой

$$HA\ (\text{кислота-метаболит}) + NaHCO_3 \rightarrow NaA + H_2CO_3.$$

В результате образуется угольная кислота, которая в легочных капиллярах под влиянием карбоангидразы превращается в CO_2 и H_2O. Вследствие этого падает бикарбонатная буферная емкость плазмы крови и выход CO_2 может существенно превышать потребление кислорода. Таким образом, величина дыхательного коэффициента в зависимости от вклада бикарбонатной буферной системы в нейтрализацию органических кислот может возрастать до 2–2,5.

Для того чтобы по возможности исключить вклад бикарбонатной буферной системы в изменение величины RQ, мы провели совместно с А. М. Зякуном (Институт биохимии и физиологии микроорганизмов РАН) исследование кратковременной гипоксии, когда выход недоокисленных продуктов из ткани в кровоток не успевает повлиять на pH плазмы крови. Кратковременную гипоксию вызывали внезапной 45–60-секундной задержкой дыхания на уровне спокойного вдоха. Во время короткого нефорсированного выдоха собирали 250 мл воздуха и в нем определяли масс-спектрометрически изменение содержания CO_2 и O_2 относительно вдыхаемого воздуха. Исследование было выполнено на здоровых добровольцах, больных диабетом

и ожирением, в покое и после аэробной физической нагрузки, натощак и на фоне глюкозной нагрузки. Во всех перечисленных случаях кратковременная задержка дыхания сопровождалась падением величины RQ от 0,9–1,1, до 0,5–0,45. Столь резкое падение RQ нельзя объяснить связыванием CO_2 гемоглобином в виде карбаминогемоглобина, поскольку гемоглобин может связывать не более 10% углекислоты.

Такое падение RQ позволяет предположить, что в условиях организма может происходить очень быстрая смена субстратов или, по крайней мере, уменьшение доли субстратов, подвергающихся декарбоксилированию при уменьшении доставки кислорода. Едва ли это может быть объяснено активацией гликолиза.

Как показано на рис. 18, для падения RQ необходимо, чтобы поступление восстановительных эквивалентов в дыхательную цепь шло через малат-аспартатный или α-глицерофосфатный шунт *3* из гликолитической оксидоредукции или через флавин-зависимую сукцинатдегидрогеназу и не сопровождалось одновременным декарбоксилированием. В этом случае надо исключить из рассмотрения анаэробную дисмутацию α-кетоглутарата *5*, являющуюся одновременно источником CO_2 и сукцината. Без учета дисмутации величина RQ может приближаться к нулю. Поставка водорода в дыхательную цепь из гликолиза в случае высокой степени восстановленности NADH может идти только через α-глицерофосфатный шунт, дегидрогеназа которого в митохондриях является флавин-зависимым ферментом. В последнем случае на уровне организма может иметь место кратковременное резкое падение RQ.

Показано, что в дыхательную цепь восстановительные эквиваленты H могут поступать без вовлечения в превращения реакций декарбоксилирования. Окисление сукцината может играть большую роль при гипоксии благодаря сохранению более высокой степени окисленности флавопротеидов дыхательной цепи.

Таким образом, наиболее приемлемым, на наш взгляд, может быть предположение о том, что при задержке дыхания происходит быстрое, обусловленное изменением степени восстановленности дыхательных переносчиков увеличение доли окисления флавин-зависимых субстратов, которые не подвергаются декарбоксилированию (сукцинат, эфиры КоА-жирных кислот и α-глицерофосфат). В любом

случае следовало проверить экспериментально, как меняется величина RQ и соотношение окисления пирувата и сукцината на изолированных тканевых препаратах, гомогенате и митохондриях при изменении степени оксигенации и степени восстановленности переносчиков дыхательной цепи in vitro.

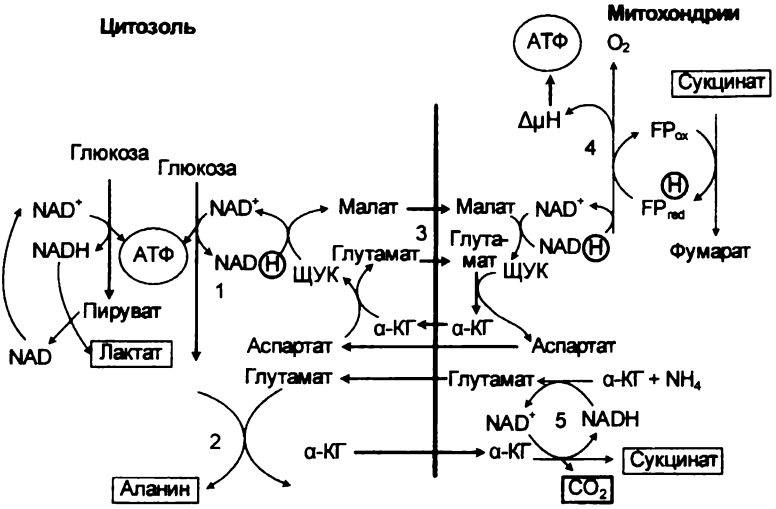


Рис. 18. Схема возможного вклада гликолитической оксидоредукции в падение дыхательного коэффициента за счет поставки цитозоль-митохондриальными шунтами части восстановительных эквивалентов в дыхательную цепь при гипоксической активации гликолиза без участия субстратов цикла трикарбоновых кислот в энергопродукции: *1* – гликолиз; *2* – переаминирование пирувата; *3* – малат-аспартатный шунт; *4* – дыхательная цепь митохондрий; *5* – дисмутация α-кетоглутарата (единственный на схеме источник углекислого газа)

Эксперименты были выполнены в многоэлектродной ячейке, скорость потребления кислорода измеряли полярографическим закрытым кларковским электродом, а скорость образования CO_2 – CO_2-чувствительным электродом. Состояние окислительного фосфорилирования оценивали по параметрам дыхательного контроля, величине отношения АДФ/О, определяемым полярографически, а также по скорости и величине изменений концентрации ионов водорода при

фосфорилировании добавленного АДФ (регистрация pH-чувствительным электродом) и по изменению распределения липофильного катиона тетрафенилфосфония ($ТФФ^+$) между митохондриями и внемитохондриальной средой. Распределение $ТФФ^+$ регистрировали $ТФФ^+$-чувствительным электродом, что позволяло оценивать энергозависимую генерацию электрохимического трансмембранного потенциала на внутренней мембране митохондрий.

Первые же исследования, выполненные на гомогенате и на непромытых митохондриях печени крысы, показали, что величины RQ существенно зависят от вида экзогенного субстрата, метаболического состояния (см. табл. 7) и используемого тканевого препарата (табл. 8).

Анализ приведенных в табл. 8 данных свидетельствует о том, что регистрируемые в эксперименте величины RQ значительно отличаются от теоретически ожидаемых. В частности, сукцинат, малат, α-глицерофосфат и β-оксибутират в процессе окисления не подвергаются декарбоксилированию и поэтому величина RQ должна быть при окислении избытка этих субстратов бесконечно малой. Напротив, при окислении α-кетоглутарата и пирувата величина RQ должна быть на уровне 2,0, так как эти субстраты подвергаются окислительному декарбоксилированию. Однако окисление интермедиатов цикла Кребса, образующихся из экзогенных субстратов, может давать вклад в потребление O_2 и образование CO_2, что и обеспечивает отличие экспериментальных параметров от теоретически ожидаемых. Кроме того, сказываются вклад эндогенных субстратов и множественность путей включения экзогенных субстратов в различные метаболические превращения наряду с непосредственным участием в окислительно-восстановительных реакциях. Зафиксировано наличие четкой разницы для многих субстратов в величинах RQ в 3-м и 4-м состояниях по Чансу – Вильямсу. Ранее подобные сдвиги RQ в зависимости от метаболического состояния никем не описывались.

Для более определенного анализа сдвигов RQ мы использовали относительно простую систему, каковой являются промытые изолированные митохондрии печени крысы.

Как показано на рис. 19, при окислении пирувата и сукцината промытыми изолированными митохондриями печени крысы наблюдаются весьма характерные кинетические кривые потребления кислорода, образования CO_2, изменения pH и распределения $ТФФ^+$, кото-

рые позволяют уверенно отличать окисление пирувата от окисления сукцината и дают довольно близкие к теоретически ожидаемым величины RQ.

Таблица 8

Изменение величины дыхательного коэффициента (RQ) при окислении различных субстратов гомогенатом и митохондриями печени крысы

Окисляющиеся субстраты (4 мМ)	Гомогенат	
	RQ_3	RQ_4
Декарбоксилирующиеся:		
Глюкоза	0,97	1,21
Пируват	1,80	1,20
α-кетоглутарат	1,42	2,80
Недекарбоксилирующиеся:		
Сукцинат	0,18	0,60
Малат	0,30	0,62
β-оксибутират	0,43	0,84
α-глицерофосфат	0,34	0,39
Эндогенные	0,81	0,92

Примечания:

1. $RQ = VCO_2/VO_2$; RQ_3 и RQ_4 – соответственно величины RQ в 3-м и 4-м метаболических состояниях по Чансу – Вильямсу.

2. Концентрация митохондрий – 3 мг белка на 1 мл, концентрации добавленных субстратов – 4 мМ. Среда инкубации: 125 мМ KCl, 1 мМ $MgSO_4$, 3 мМ KH_2PO_4, 0,5 мМ ЭГТА, pH = 7,2. Добавка АДФ – 170 мкМ. Температура – 28 °С. Объем инкубационной ячейки – 2 мл. Исходное pO_2 =150 мм рт. ст.

Скорости дыхания и окислительного фосфорилирования намного выше при окислении сукцината, чем пирувата. При этом окисление пирувата сопряжено со значительным выделением в среду углекислоты. Удержание градиента pH и ТФФ более эффективно происходит при окислении сукцината, чем пирувата. Величина RQ при окислении избытка сукцината едва достигает 0,01 в 3-м состоянии, тогда как при окислении пирувата она может достигать 2,0 (см. рис.19), что легко понять из суммарного уравнения пируватдегидрогеназной реакции:

$$\text{пируват} + 1/2\ O_2 + \text{HS-КоА} \rightarrow H_2O + CO_2 + \text{ацетил-КоА};\ \Delta CO_2/\Delta O_2 = 2.$$

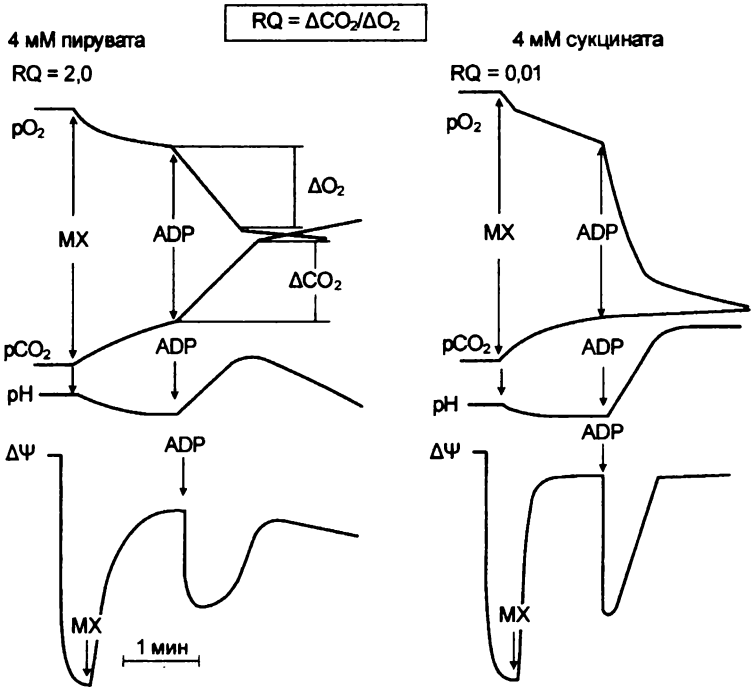


Рис. 19. Регистрация потребления кислорода, образования CO_2, изменения pH и распределения $ТФФ^+$ при окислении митохондриями печени крысы пирувата и сукцината

Концентрация митохондрий – 3 мг белка на моль. Среда инкубации: 125 мМ KCl, 1 мМ $MgSO_4$, 3 мМ KH_2PO_4, 0,5 мМ ЭГТА, pH = 7,2; температура – 28 °С; объем инкубационной ячейки – 2 мл; исходное pO_2 = 150 мм рт. ст.

Результаты измерения АДФ/О и скорости уборки ионов водорода в процессе окислительного фосфорилирования при окислении разных субстратов изолированными митохондриями печени в сочетании с измерением RQ позволяют намного надежнее отличить окисление сукцината от окисления пирувата и других субстратов (табл. 9).

На изолированных митохондриях отличия величин RQ в 3-м и 4-м состояниях еще более значимы, чем в гомогенате. Нет полного соответствия между экспериментальными значениями RQ и теоретически ожидаемыми, хотя величины RQ для недекарбоксилирующихся

субстратов сукцината, малата, β-оксибутирата и α-глицерофосфата явно ниже. Обращает на себя внимание падение RQ в 4-м состоянии при окислении α-кетоглутарата и пирувата.

Таблица 9

Отношение АДФ/О, величина RQ и скорости уборки H^+ при окислении различных субстратов промытыми митохондриями печени крысы

Окисляющиеся субстраты (4 мМ)	Измеряемые параметры			
	АДФ/О	RQ_3	RQ_4	VH^+
Сукцинат	1,60	0,14	0,01	–336
α-кетоглутарат	2,24	1,60	0,40	–302
Малат	2,60	0,25	0,08	–163
β-оксибутират	2,56	0,10	0,08	–294
α-глицерофосфат	1,56	0,20	0,15	–142
Пируват	2,77	1,92	0,66	–184
Сукцинат + α-КГ	1,88	0,60	0,02	–312
Пируват + малат	2,90	1,91	1,10	–216

Примечания:

1. VH^+ – скорость уборки ионов водорода, нг-ион / мин, во время фосфорилирования добавленного АДФ.

2. RQ рассчитывали по отношению скоростей выделения CO_2 и потребления O_2 ($RQ = VCO_2/VO_2$); RQ_3 и RQ_4 – соответственно величины RQ в 3-м и 4-м метаболических состояниях по Чансу –Вильямсу.

3. Концентрация митохондрий – 3 мг белка на 1 мл.

В свете анализа гипоксической ситуации рассмотрим более подробно особенности окисления субстратов в 3-м и 4-м состояниях, которые существенно отличаются друг от друга по степени восстановленности пиридиннуклеотидов.

Последовательное изменение величин RQ в трех циклах фосфорилирования АДФ при окислении пирувата митохондриями печени крысы (по данным, представленным на рис. 4) показано ниже:

I цикл (pO_2 = 127 мм рт. ст.)			II цикл (pO_2 = 99 мм рт. ст.)		III цикл (pO_2 = 73 мм рт. ст.)	
RQ_4	RQ_3	RQ_4	RQ_3	RQ_4	RQ_3	RQ_4
1,80	1,80	0,62	1,20	0,30	0,80	0,10

Кривые потребления кислорода и образования CO_2 по ходу последовательно запускаемых циклов фосфорилирования АДФ видоизменяются так, что при окислении пирувата в промытых митохондриях всегда величина RQ в 4-м состоянии после фосфорилирования АДФ ниже, чем в предшествующем ему 3-м состоянии (рис. 20). Причем в каждом последующем цикле фосфорилирования величины RQ ниже, чем в предыдущем.

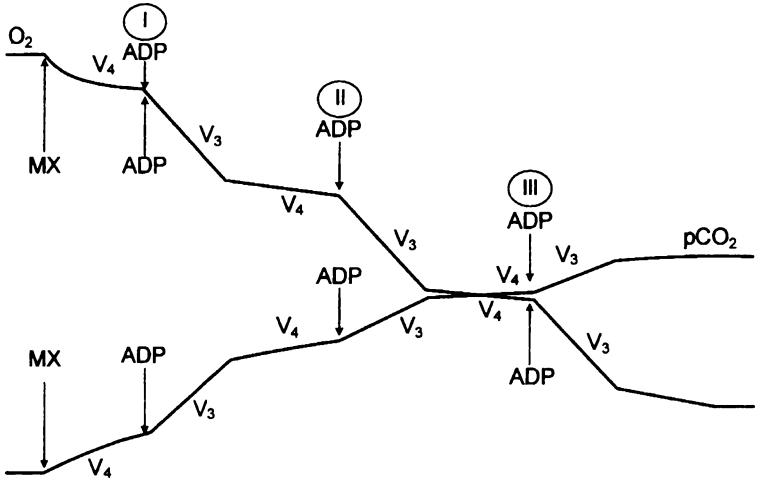


Рис. 20. Изменение величины дыхательного коэффициента при окислении пирувата в трех последовательных циклах фосфорилирования добавленного АДФ

Исходя из этого было сделано два предположения. Либо при окислительном декарбоксилировании пирувата сказывается увеличение фонда АТФ и адениловых нуклеотидов в целом, либо влияет падение парциального давления кислорода в процессе инкубации митохондрий в закрытой ячейке. Мы предположили, что в том и в другом случае часть пирувата отвлекается в пируваткарбоксилазную реакцию, которая связывает CO_2. Вследствие этого в зависимости от доли пирувата, подвергающегося карбоксилированию, снижается величина RQ. Теоретически можно представить, что если в пируватдегидрогеназной и пируваткарбоксилазной реакциях используется равное количество пирувата, то RQ может приблизиться к нулю. На рис. 21 вид-

но, что альтернативой пируваткарбоксилазной реакции относительно образования ЩУК может быть малатдегидрогеназная реакция.

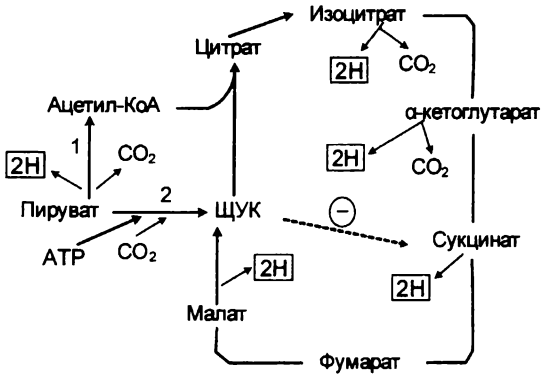


Рис. 21. Схема входа пирувата в цикл трикарбоновых кислот: *1* – пируватдегидрогеназная реакция; *2* – пируваткарбоксилазная реакция; ⟶ торможение СДГ

В таком случае добавление малата, который окисляется до ЩУК без выделения CO_2, может способствовать приросту RQ при совместном окислении пирувата и малата. С другой стороны, образовавшаяся из малата ЩУК не только выступает в качестве партнера в цитратсинтетазной реакции, но и может вызывать инактивацию сукцинатдегидрогеназы. Действительно, оказалось, что даже 0,4 мМ малата при окислении 3,6 мМ пирувата достаточно для того, чтобы значимо повысить RQ по сравнению с окислением одного пирувата (табл. 10).

Поскольку пируваткарбоксилазная реакция требует АТФ, а пируватдегидрогеназная реакция тормозится при росте отношения АТФ/АДФ, постольку можно полагать, что падение RQ в 4-м состоянии связано именно с ростом пула АТФ. Кроме того, нельзя не учитывать постепенное наполнение цикла трикарбоновых кислот интермедиатами, образующимися из окисляющегося пирувата (см. рис. 21). До стадии сукцината (пируватдегидрогеназная, изоцитратдегидрогеназная, α-кетоглутаратде-гидрогеназная реакции) величина RQ держится на уровне 2 единиц. Затем начинается окисление без декарбоксилирования (сукцинатдегидрогеназная и малатдегидрогеназная реакции). Чем больше вклад в процесс окисления последних дегидрогеназ, тем ниже RQ. Не исклю-

чено, что уменьшение RQ в 4-м состоянии может отражать увеличение их вклада, в частности сукцината, так как в 4-м состоянии складываются условия для активации СДГ, а в 3-м состоянии при повышении окисленности NAD проявляется щавелево-уксусное торможение СДГ. Признаки торможения цикла трикарбоновых кислот на уровне СДГ в виде избирательного накопления сукцината в 3-м состоянии в митохондриях сердца кролика при окислении пирувата наблюдал R. W. Von Korff (1967).

Таблица 10

Изменение величины дыхательного коэффициента (RQ) по ходу смены метаболических состояний при окислении пирувата и малата в митохондриях печени крысы (n = 4)

Добавленный субстрат	RQ_4^1	RQ_3^1	RQ_4^2	RQ_3^2
Пируват 4 мМ	1,60 ± 0,14	1,92 ± 0,10	0,64 ± 0,08	1,26 ± 0,12
Малат 4 мМ	0,44 ± 0,06	0,64 ± 0,08	0,16 ± 0,02	0,60 ± 0,06
Пируват 3,6 мМ + + малат 0,4 мМ	1,90 ± 0,20	1,90 ± 0,18	1,12 ± 0,14 $p_{пир} < 0,02$	1,92 ± 0,20 $p_{пир} < 0,05$

Примечания:

1. Величины RQ рассчитаны по отношениям скоростей выделения CO_2 и потребления O_2 в 3-м и 4-м состояниях по Чансу – Вильямсу.

2. Индексы 1, 2 указывают соответственно первый и второй цикл фосфорилирования при последовательных добавках АДФ.

Таким образом, эксперимент с увеличением RQ при совместном окислении малата и пирувата по сравнению с отдельным окислением пирувата не позволяет принять безоговорочно версию изменения только соотношения пируватдегидрогеназной и пируваткарбоксилазной реакции. Возможно, изменяется и вклад эндогенного сукцината. Вторым фактором, оказывающим влияние на соотношение пируватдегидрогеназной и пируваткарбоксилазной реакции и активность СДГ, может быть прирост NADH в 4-м состоянии (см. табл. 10) или при снижении pO_2 в ячейке, например по ходу инкубации при последовательных циклах фосфорилирования АДФ.

Для проверки влияния снижения pO_2 на величину RQ при окислении пирувата был поставлен эксперимент с исходно сниженным содержанием кислорода в инкубационной среде. Для снижения pO_2 инкубационную среду продували предварительно азотом или аргоном. Ока-

залось, что падение pO_2 до 25 мм рт. ст. не только не вызывает снижения RQ, а, напротив, способствует его повышению (табл. 11).

Таблица 11

Изменение дыхательного коэффициента, активности АТФ-азной реакции, не компенсируемой окислительным фосфорилированием, и степени восстановления трансмембранного потенциала в митохондриях печени крысы при окислении пирувата в условиях «нормоксии» и «гипоксии»

Условия оксигенации	Измеряемые параметры				
	RQ_4^*	RQ_3	RQ_4^{**}	VH^+ в S4	% ψ
Нормоксия (начальное pO_2 = 150 мм рт. ст.)	1,38 ± 0,18	1,90 ± 0,06	0,38 ± 0,08	+43 ± 5,0	106 ± 5,0
Гипоксия (начальное pO2 = 25 мм рт. ст.)	1,54 ± 0,16	2,00 ± 0,10	1,08 ± 0,16 p < 0,002	+61 ± 5,0 p < 0,05	88 ± 3,0 p < 0,02

Примечание. RQ_4^* и RQ_4^{**} – величины дыхательного коэффициента в 4-м состоянии до и после фосфорилирования добавленного АДФ соответственно; начальное pO_2 – величина pO_2 в инкубационной ячейке в момент внесения митохондрий; p указано в сравнении с соответствующей величиной при «нормоксии»; VH^+ в S4 – количество ионов водорода, освобождающихся во внемитохондриальное пространство в результате гидролиза АТФ в 4-м состоянии после фосфорилирования АДФ; % ψ – степень восстановления трансмембранного потенциала после фосфорилирования АДФ.

Едва ли прирост RQ в гипоксических условиях можно объяснить увеличением вклада эндогенного сукцината. Если исходить из того, что гипоксический прирост NADH активирует СДГ, то следовало ожидать падения RQ. Наблюдаемый прирост RQ скорее всего свидетельствует об увеличении доли пируватдегидрогеназной реакции при падении доли пируваткарбоксилазной реакции, возможно, в связи с некоторой деэнергизацией митохондрий. Несмотря на то что pO_2 было снижено всего до 25 мм рт ст., что соответствует нормальному физиологическому значению pO_2 в ткани печени, in vitro такое снижение pO_2 сопровождается некоторой деэнергизацией митохондрий: уменьшается способность митохондрий удерживать градиент pH в 4-м состоянии, т. е. увеличивается скорость закисления среды и снижается степень восстановления трансмембранного потенциала после фосфорилирования добавленного АДФ (см. табл. 11). По-видимому, такого уровня деэнергизации доста-

точно для того, чтобы не происходила активация пируваткарбоксилазной реакции, потребляющей АТФ при связывании CO_2.

Если исходить из развиваемых М. Н. Кондрашовой представлений о том, что сукцинат может монополизировать дыхательную цепь, то следует признать, что в условиях пониженного pO_2 или просто в 4-м состоянии, когда повышена степень восстановленности NADH, преимущество сукцината над NAD-зависимыми субстратами может быть более выражено, чем в условиях «нормоксии». Однако данных о том, что сукцинат может «выигрывать конкуренцию» за дыхательную цепь у NAD-зависимых субстратов, мы не обнаружили. Поэтому были поставлены эксперименты, позволяющие по величине RQ, отношению АДФ/О, скорости уборки ионов водорода при фосфорилировании АДФ и степени восстановления трансмембранного потенциала после фосфорилирования АДФ оценить, действительно ли такое явление имеет место. При последовательном увеличении количества экзогенного сукцината на фоне 4 мМ пирувата происходило очень быстрое падение RQ и АДФ/О с одновременным увеличением скорости дыхания и степени восстановления трансмембранного потенциала после фосфорилирования АДФ, что характерно для сукцината (табл. 12). Эти данные дают основание полагать, что даже при существенно меньшей концентрации сукцината по сравнению с пируватом митохондрии предпочтительно окисляют сукцинат.

Подобные эксперименты с другим NAD-зависимым субстратом – α-кетоглутаратом – также свидетельствуют о том, что появления небольшого количества сукцината достаточно для захвата значительной части дыхательной цепи. При последовательных циклах фосфорилирования в процессе инкубации митохондрий происходит падение величины RQ, опять-таки более выраженное в 4-м состоянии, когда активируется СДГ.

Изменение величины дыхательного коэффициента (RQ) по ходу смены метаболических состояний при окислении α-кетоглутарата (4 мМ) в митохондриях печени крысы (n = 4) показано ниже:

RQ_4	RQ_3^1	RQ_4^1	RQ_3^2	RQ_4^2	ADP/O^1	ADP/O^2
1,26±0,22	1,52±0,14	0,58±0,06	1,18±0,18	0,18±0,06	2,58±0,19	2,20±0,16

Примечание. RQ_4 – дыхательный коэффициент в S4 до добавления АДФ; RQ_3^1, RQ_4^1, RQ_3^2, RQ_4^2 – дыхательные коэффициенты в S3 и в S4 при первой и второй добавках АДФ соответственно.

Таблица 12

Изменение скоростей дыхания митохондрий печени в 3-м и 4-м состояниях, отношения АДФ/О, RQ и степени восстановления трансмембранного потенциала после фосфорилирования добавленного АДФ в зависимости от соотношения экзогенных сукцината и пирувата

Окисляющийся субстрат	Измеряемые параметры				
	V_3	V_4	АДФ/О	$\Delta CO_2/\Delta O_2$	$\Delta\psi$ в S4, %
Пируват	101	30	2,65	2,00	89
Сукцинат/пируват = 2/8	118	33	2,37	0,58	93
Сукцинат/пируват = 4/6	157	46	1,62	0,30	94
Сукцинат/пируват = 6/4	180	55	1,35	0,14	96
Сукцинат	200	65	1,33	0,02	100

Примечание. V_3, V_4 – скорости потребления кислорода, нмоль O_2 / (мин · мг белка), соответственно в 3-м и 4-м метаболических состояниях по Чансу – Вильямсу; $\Delta CO_2/\Delta O_2$ – в 3-м состоянии при фосфорилировании 270 мкМ АДФ; $\Delta\psi$ – величина восстановления трансмембранного потенциала в процентах от исходного уровня (до добавки АДФ) после завершения цикла фосфорилирования АДФ в 4-м состоянии.

Трудно чем-либо другим объяснить такое падение RQ, кроме как вовлечением в окисление сукцината, образующегося из α-кетоглутарата. Однако рассмотрение только такой возможности не позволяет понять, почему в условиях «гипоксии» происходит увеличение величины RQ при окислении α-кетоглутарата (табл. 13).

Таблица 13

Величины RQ при окислении α-кетоглутарата митохондриями печени крысы в 3-м и 4-м метаболических состояниях в зависимости от степени оксигенации инкубационной среды (n = 4)

Условия оксигенации	Величина RQ	
	S4	S3
«Нормоксия» (начальное pO_2 = 150 мм рт. ст.)	1,30 ± 0,14	1,56 ± 0,08
«Гипоксия» (начальное pO_2 = 25 мм рт. ст.)	2,09 ± 0,20 $p < 0,05$	1,99 ± 0,18

В связи с этими данными мы хотели бы вернуться к результатам, представленным в табл. 8, где показано, что на гомогенате в 4-м состоянии величина RQ при окислении добавленного α-кетоглутарата возрастала даже до 2,8. Одной из причин такого аномально высокого роста RQ могла быть активация анаэробной дисмутации α-кетоглутарата в присутствии аммония (рис. 22) (Г. А. Кребс, Г. Л. Корнберг, 1959).

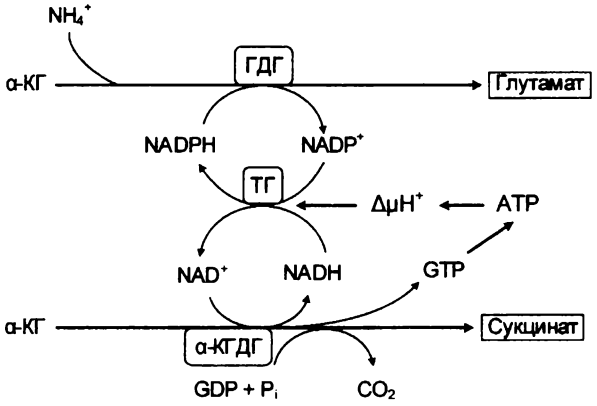


Рис. 22. Схема анаэробной дисмутации α-кетоглутарата в митохондриях: ГДГ – глутаматдегидрогеназа; α-КГДГ – α-кетоглутаратдегидрогеназа; ТГ – трансгидрогеназа

В этом случае одна молекула α-кетоглутарата вовлекается в восстановительное аминирование с образованием глутамата и одновременным окислением NAD(P)H до NAD(P) $^{+}$, что обеспечивает окисление другой молекулы α-кетоглутарата до сукцината. Эта дисмутация может быть зарегистрирована косвенным методом полярографически по появлению ротенон-нечувствительного дыхания при окислении α-кетоглутарата (М. Н. Кондрашова, Е. И. Маевский, 1978) и прямым измерением превращения субстратов с помощью Н-ЯМР-спектроскопии при анаэробиозе (Е. И. Маевский, Е. В. Гришина, А. С. Розенфельд и др., 1999). В 4-м состоянии указанными методами зарегистрировать дисмутацию α-кетоглутарата невозможно. Используя ранее полученный опыт, мы решили оценить появление

дисмутации α-кетоглутарата по образованию CO_2 в присутствии ротенона и аммония (табл. 14).

Таблица 14

Влияние смены метаболических состояний, ионов аммония и ротенона на скорости дыхания, образования CO_2 и величину RQ при окислении α-кетоглутарата. митохондриями печени крысы

Условия инкубации	Измеряемый параметр	Метаболическое состояние	
		S3	S4
α-кетоглутарат	VO_2, мкМ O_2	97	34
	VCO_2, мкМ CO_2	155	12
	$RQ = VCO_2/VO_2$	1,60	0,32
NH_4 + α-кетоглутарат	VO_2	106	35
	VCO_2	162	70
	$RQ = VCO_2/VO_2$	1,52	1,94
Ротенон + NH_4 + + α-кетоглутарат	VO_2	9	–
	VCO_2	26	–
	$RQ = VCO_2/VO_2$	2,89	–

Оказалось, что в присутствии 1 мМ NH_4Cl величина RQ возрастает. Добавление ротенона резко тормозит потребление кислорода и в меньшей степени образование CO_2, что приводит к еще большему приросту RQ. Таким образом, судя по изменению величины RQ, можно считать, что в 4-м состоянии и при падении pO_2 благодаря увеличению степени восстановленности NADH может идти дисмутация α-кетоглутарата, которая обеспечивает образование сукцината.

Приведенные данные свидетельствуют о возможности оценки вида окисляемого митохондриями субстрата по величине дыхательного коэффициента RQ. В частности, четко различаются субстраты, подвергающиеся декарбоксилированию, и окисляющиеся без декарбоксилирования. Именно по этому признаку удалось четко дифференцировать вклад сукцината от вклада пирувата и α-кетоглутарата и показать, что экзогенный сукцинат может «выигрывать конкуренцию» за дыхательную цепь у пирувата, а эндогенно образующийся сукцинат постепенно монополизирует дыхательную цепь даже при

окислении избытка экзогенного α-кетоглутарата. Причем, судя по величине RQ, преимущество в окислении сукцината может быть особенно заметным при снижении pO_2.

3.2. Влияние метаболического состояния и уменьшения оксигенации митохондрий на кинетические параметры окисления экзогенных пирувата и сукцината

Влияние смены метаболических состояний митохондрий на кинетические параметры K_m и V_{max} для окисления различных субстратов исследуется лишь в единичных работах. И практически нет работ, в которых изучалось бы влияние на эти параметры уменьшения парциального давления кислорода. Мы исследовали, каким образом меняется кажущаяся константа Михаэлиса (K_m) и V_{max} для пирувата и сукцината в изолированных интактных митохондриях печени в 3-м и 4-м метаболических состояниях и при снижении pO_2 инкубационной среде. Выбор пирувата обусловлен тем, что он является основным субстратом, поступающим в митохондрии из реакций гликолитического распада гликогена и глюкозы, а сукцината – тем, что имеется множество работ, свидетельствующих об особой роли окисления сукцината при различных функциональных состояниях тканей и при гипоксии. Изменение метаболического состояния митохондрий регистрировали по ходу потребления кислорода в обычном цикле фосфорилирования с относительно большой добавкой АДФ (270 мкМ). Уменьшение оксигенации митохондрий вызывали снижением начального pO_2 инкубационной среды в 6 раз – до 25 мм рт. ст.

Известно, что K_m и критическая концентрация O_2 для терминального фермента дыхательной цепи – цитохромоксидазы – находятся на уровне $pO_2 = 0{,}1$ мм рт. ст. (К. П. Иванов, 1990, 1993). Однако в экспериментах на перфузируемой ткани, выполненных в лаборатории Б. Чанса (E. M. Chance, B. Chance, 1988) на культуре клеток почки, нейробластонн, асцитных клетках, на тонких срезах мозга и печени (Л. Д. Лукьянова, Б. С. Балмуханов, А. Т. Уголев, 1982), показано, что значительное восстановление цитохрома С (от 22 до 40%), уменьшение отношения [АДФ] / [АДФ] · [$Ф_н$] (примерно в три раза) происходит при падении pO_2 до 75 мм рт. ст., а значительный прирост степени восстановленности пиридиннуклеотидов – при падении pO_2

до 25–15 мм рт. ст. Эти данные демонстрируют зависимость митохондриальной функции от pO_2 в диапазоне значительно более высоких значений (Л. Д. Лукьянова Б. С. Балмуханов, А. Т. Уголев, 1982), чем можно было ожидать, исходя из критических значений pO_2 для цитохромоксидазы. В связи с изложенным можно было предположить, что при росте степени восстановленности NADH в случае снижения pO_2 может тормозиться окислительное декарбоксилирование пирувата в пируватдегидрогеназной реакции, поскольку это наиболее известный механизм торможения NAD-зависимых дегидрогеназ продуктом реакции (Б. И. Курганов, 1973). С другой стороны, наоборот, должно ускоряться окисление сукцината, так как увеличение степени восстановленности NADH и коэнзима Q, как правило, приводит к активации сукцинтадегидрогеназы.

Анализируя кинетические характеристики окисления в митохондриях экзогенного субстрата, нельзя не учитывать, что измеряемые параметры K_m и V_{max} отражают в интегральном виде состояние нескольких систем: 1) активность и сродство к субстрату транслоказ, а также соответствующих дегидрогеназ и комплексов дыхательной цепи; 2) тесное сопряжение окислительного фосфорилирования с дыханием. Сопоставление величин K_m и V_{max} для перечисленных систем свидетельствует о том, что узким местом в указанной последовательности реакций является вход субстратов в митохондрии. Так, K_m для пирувата у монокарбоксилатного переносчика на два порядка выше, чем у пируватдегидрогеназы, и составляет 115–640 мкМ в зависимости от условий преинкубации митохондрий (F. Palmiery, E. Quagliariello, 1978). Такого же порядка отличия пируватдегидрогеназы и монокарбоксилатного переносчика по V_{max}, величина которого для переноса пирувата достигает 20 нмоль / (мин · мг белка) (G. Boehme, K. J. Hartung, W. Kunz, 1978). Отметим, что приведенные данные из работ F. Palmiery, E. Quagliariello (1978) и G. Boehme, K. J. Hartung, W. Kunz (1978) были получены на митохондриях с сохраненным мембранным потенциалом и высокой дыхательной активностью без использования ингибиторов дыхательной цепи и дегидрогеназ. Очевидно, поэтому значения параметров существенно отличаются от тех, которые получают с помощью обычной техники набухания митохондрий с использованием аммониевых солей субстратов: в митохондриях при неизменном потенциале величины K_m заметно ниже, а V_{max} существенно выше (ср. с данными, приводимыми

в обзоре К. Ф. Шольца (1994)). Однако исследование зависимости этих параметров от метаболического состояния и уровня оксигенации митохондрий мы в литературе не обнаружили.

Величины кажущихся констант Михаэлиса для пирувата и максимальные скорости дыхания и декарбоксилирования в наших экспериментах определялись путем измерения скоростей потребления кислорода и образования CO_2 при использовании разных концентраций пирувата в диапазоне 0,2–3,2 мМ. Этот диапазон выбран в связи с тем, что дальнейшее увеличение концентрации пирувата может приводить к торможению потока в цикле Кребса и дыхания, очевидно, вследствие ограниченности фонда внутримитохондриального КоА (В. В. Дынник, 1978). Величины K_m и V_{max}, приведенные в табл. 15, рассчитаны по графикам Лайнуивера – Бэрка в обратных координатах 1/S и 1/V.

Таблица 15

Величины K_m и V_{max} для пирувата, рассчитанные по графикам Лайнуивера – Бэрка по скоростям потребления O_2 и выделения CO_2 митохондриями печени крысы в 3-м и 4-м метаболических состояниях (S3 и S4) по Чансу – Вильямсу при двух уровнях оксигенации

Уровень оксигинации	K_m, мкМ		V_{max}, нмоль O_2 или CO_2 / (мин · мг белка)				RQ*	
	S3	S4**	S3		S4**		S3	S4**
	O_2	O_2	O_2	CO_2	O_2	CO_2	VCO_2/VO_2	VCO_2/VO_2
«Нормоксия» (начальное pO_2 = 150 мм рт. ст.)	329 ± ± 25	163 ± ± 12 $p_3 < 0,01$	40,2 ± ± 4,1	64,7 ± ± 5,0	11 ± ± 1,0 $p_3 < 0,01$	7,8 ± ± 1,2 $p_3 < 0,01$	1,61 ± ± 0,10	0,71 ± ± 0,05 $p_3 < 0,01$
«Гипоксия» (начальное pO_2 = 25 мм рт. ст.)	523 ± ± 41 $p_{норм} < 0,05$	256 ± ± 21 $p_{норм} < 0,05$	44,1 ± ± 4,2	78,9 ± ± 6,8	15,4 ± ± 1,3 $p_{норм} < 0,05$	21,5 ± ± 2,2 $p_{норм} < 0,01$	1,79 ± ± 0,11	1,40 ± ± 0,10 $p_{норм} < 0,01$

Примечания:

1. Условия инкубации: объем ячейки – 2 мл, t = 28 °С, концентрация митохондрий – 2,8–3,2 мг белка в 1 мл, концентрации пирувата – от 0,4 до 3,2 мМ, в 3-м состоянии добавка АДФ – 270 мкМ.

2. RQ* рассчитан по величинам V_{max}; S4** – 4-е метаболическое состояние после фосфорилирования добавленного АДФ; p_3 – в сравнении с соответствующими величинами в 3-м состоянии; $p_{норм}$ – в сравнении с условиями «нормоксии».

Из представленных данных видно, что в 4-м состоянии сродство митохондрий к пирувату значительно выше, чем в 3-м состоянии, что хорошо согласуется с результатами F. Palmiery, E. Quagliariello (1978), обнаруживших снижение K_m монокарбоксилатного переносчика для пирувата после преинкубации с субстратом окисления по сравнению с митохондриями, преинкубированными в бессубстратной среде, т. е. в низкоэнергетических условиях. В наших экспериментах митохондрии печени имели высокий дыхательный контроль по Чансу – Вильямсу (не ниже 4), высокие величины отношения АДФ/О и трансмембранного потенциала при окислении пирувата, что свидетельствует о высокой степени сопряжения окислительного фосфорилирования и хорошей энергизации митохондрий (см. табл. 15, рис. 19).

При снижении pO_2 сродство митохондрий к пирувату падало более чем в 1,5 раза. Понижение сродства митохондрий к пирувату при низком pO_2 происходит без снижения V_{max} в 3-м состоянии и даже с некоторым приростом V_{max} в 4-м. В общем виде такая ситуация обычно расценивается как проявление конкурентного торможения (Л. Уэбб, 1966). Мы полагаем, что такое уменьшение сродства объясняется двумя причинами. Во-первых, как ясно из разницы величин K_m для 3-го и 4-го состояний (см. табл. 15), это может быть обусловлено ухудшением сродства к пирувату монокарбоксилатного переносчика при деэнергизации митохондрий. Во-вторых, можно предположить, что при низком pO_2 увеличение степени восстановленности NADH вызывает такое торможение пируватдегидрогеназной реакции, когда она становится узким местом в системе окисления пирувата. Однако величина RQ в условиях «гипоксии» была повышена, что может отражать увеличение вклада окислительного декарбоксилирования по сравнению с пируваткарбоксилазной реакцией. Превышение активности окислительного декарбоксилирования пирувата над активностью пируваткарбоксилазной реакции является признаком умеренного прироста NADH, а главным образом – перехода митохондрий в менее энергизованное состояние (М. А. Родионова, А. Б. Войцтчак, Л. К. Войцтчак, 1973).

В такой ситуации интересно было проверить, как меняются параметры K_m и V_{max} при окислении сукцината. Как показано в табл. 16,

смена метаболических состояний вызывает изменения кажущихся констант сродства митохондрий к сукцинату: в 3-м состоянии величина K_m выше, чем в 4-м состоянии.

Однако снижение pO_2 в инкубационной среде оказывало противоположное действие на определяемые параметры при окислении сукцината: величина K_m снижалась, особенно в 3-м состоянии. Определенные нами величины K_m близки к тем, которые показал ранее в исследованиях сукцинатоксидазной активности А. Д. Виноградов (1967).

Таблица 16

Величины K_m и V_{max} для сукцинатоксидазы митохондрий печени, рассчитанные в координатах Лайнуивера – Бэрка по скоростям потребления O_2 при окислении сукцината в 3-м и 4-м метаболических состояниях по Чансу – Вильямсу при двух уровнях оксигенации

Определяемый параметр	Состояние митохондрий	
	S3	S4
«Нормоксия» (pO_2 = 150 мм рт. ст.)		
K_m для сукцината, мкМ	468 ± 23	210 ± 20 $p_3 < 0{,}001$
V_{max}, нмоль O_2 / (мин · мг белка)	84 ± 7	28 ± 3 $p_3 < 0{,}001$
«Гипоксия» (pO_2 = 25 мм рт. ст.)		
K_m для сукцината, мкМ	247 ± 19 $p_{норм} < 0{,}01$	168 ± 15 $p_3 < 0{,}001$
V_{max}, нмоль O_2 / (мин · мг белка)	113 ± 11 $p_{норм} < 0{,}05$	40,5 ± 4 $p_3 < 0{,}001$ $p_{норм} < 0{,}05$

Примечания:

1. Термин «сукцинатоксидаза» использован для обозначения активности дыхания митохондрий при окислении добавленного сукцината.

2. Условия инкубации: объем ячейки – 2 мл, t = 28 °С, концентрация митохондрий – 2,8–3,2 мг белка в 1 мл, концентрация сукцината – от 0,1 до 4 мМ, в 3-м состоянии добавка АДФ – 270 мкМ; p_3 – в сравнении с соответствующими величинами в 3-м состоянии; $p_{норм}$ – в сравнении с условиями нормоксии, n = 4.

Сопоставляя результаты наших экспериментов и данные А. Д. Виноградова, можно с полной определенностью сказать, что величина K_m для сукцината у сукцинатоксидазной системы в еще большей мере зависит от уровня энергизации митохондрий. В низкоэнергетическом состоянии (в присутствии разобщителя) лимитирующим фактором является не активность дикарбоксилатного переносчика, а щавелево-уксусное торможение СДГ. Именно поэтому данные о переносе сукцината, полученные в условиях выраженной деэнергизации (в присутствии ротенона и ДНФ), показывают, что величина K_m для янтарной кислоты равна 1,3–1,6 мкМ (А. Д. Виноградов, 1979; К. Ф. Шольц, 1994).

Снижение K_m для сукцината при уменьшении pO_2 нельзя объяснить гипоксической деэнергизацией митохондрий. Скорее всего, здесь на первый план выходит увеличение восстановленности дыхательных переносчиков (NADH и коэнзима Q), которое способствует активации СДГ. Но тогда приходится признать, что узким местом является СДГ, а не дикарбоксилатный переносчик. В таком случае снижение K_m для сукцината может быть в равной мере обусловлено переходом от 3-го состояния к 4-му, а при снижении парциального давления кислорода в инкубационной среде – активацией СДГ.

Независимо от принятой гипотезы нельзя не признать, что in vitro всего лишь при 6-кратном снижении pO_2 (до 25 мм рт ст.) сродство митохондрий к сукцинату возрастает, а к пирувату снижается. Возможно, и в условиях целостного организма при гипоксии складываются благоприятные условия для преимущественного окисления сукцината. Отсюда следует, что использование экзогенного сукцината или субстратов, которые в условиях гипоксии легко превращаются в сукцинат, может быть целесообразно для поддержания функций митохондрий при рабочей гипоксии с целью увеличения вклада окислительного фосфорилирования в энергообеспечение и для уменьшения метаболического ацидоза, обусловленного повышенной АТФ-азной нагрузкой.

Но прежде чем перейти к использованию экзогенного сукцината на уровне организма, следовало ответить на вопрос, может ли экзогенный сукцинат проникать в неповрежденные живые клетки и включаться в метаболические превращения, или множество описанных эффектов сукцината не имеют никакого отношения к его участию в энергетическом обмене, как об этом писал А. В. Благовещенский (1968).

Глава 4. Окисление экзогенного сукцината в тканях животных и человека

4.1. Активация дыхания сукцинатом – признак повреждения наружной клеточной мембраны

Повышение содержания сукцината в тканях и появление его в крови в случае функционирования митохондрий в анаэробных условиях (П. Хочачка, Дж. Сомеро, 1977, 1988; H. Taegtmeyer, 1978, 1984; О. И. Писаренко, В. Н. Хлопков, Э. К. Рууге, 1986; О. И. Писаренко, Е. С. Соломатина, И. М. Студнева, 1987; Е. И. Маевский, Е. В. Гришина, М. С. Окон и др., 1996) позволяют предположить, что сукцинат может окисляться тканями не только тогда, когда он образуется и находится в матриксе митохондрий, но и тогда, когда он попадает в кровь из участков аноксии и ишемии или поступает извне в составе пищи и лекарственных препаратов.

Среди физиологов и биохимиков бытует представление о том, что экзогенный сукцинат не проникает через неповрежденные клеточные мембраны (O. Walte, 1979) и поэтому не может подвергаться метаболическим превращениям в тканях. Действительно, если судить по способности экзогенного сукцината стимулировать дыхание тканевых препаратов, то следует признать, что ускорение дыхания в ответ на добавку сукцината наблюдается только при заметном повышении проницаемости клеточной мембраны для сукцината. В наших экспериментах неповрежденные клетки тимуса и свежевыделенные интактные кардиомиоциты крысы или культивируемые клетки почки свиньи при полярографической регистрации потребления кислорода не ускоряли дыхания после добавления 5 мМ сукцината. И напротив, дыхание поврежденных при выделении кардиомиоцитов сукцинат стимулировал более чем в 10 раз. Подобная же картина наблюдалась нами при рециркуляторной нормотермической перфузии изолированной почки собаки: внесение в перфузат 1 мМ сукцината повышало скорость дыхания в несколько раз только в том случае, если для перфузии использовались эмульсии перфторорганических соединений, стабилизированные высокоактивными, способными повышать проницаемость биологических мембран поверхностно-активными веще-

ствами – плюроником F-68 или проксанолом 268 (Е. И. Маевский, А. С. Розенфельд, М. В. Вазагашвили и др., 1996).

Поскольку K_m сукцинатоксидазной системы интактных митохондрий для сукцината составляет порядка 0,2 мМ, то для стимуляции дыхания экзогенным сукцинатом необходимо, чтобы концентрация сукцината внутри клетки достигала хотя бы 0,1 мМ. Если поступающий в клетки сукцинат сразу утилизируется митохондриями, то для того чтобы концентрация сукцината внутри клетки достигла такого уровня, требуется наличие повреждения клеточной мембраны. На основании изложенного ясно, что тест стимуляции дыхания сукцинатом пригоден для оценки степени проницаемости и повреждения клеточной мембраны, но едва ли может быть критерием доступности экзогенного сукцината для интактных клеток в условиях целостного организма.

4.2. Изотопный анализ превращений экзогенного сукцината в условиях целостного организма

В наших исследованиях проникающая способность сукцината оценивалась по появлению изотопной метки в условиях целостного организма после введения животным через рот радиоактивного 2, 3-^{14}С-сукцината (метка в положениях 2 и 3) или после приема человеком сукцината, обогащенного стабильным изотопом ^{13}С (в положениях 1 и 4).

О включении экзогенного сукцината в метаболические превращения судили по распределению радиоактивной метки в виде ^{14}С в тканях крысы и по появлению $^{14}CO_2$ в выдыхаемом воздухе после введения животным меченого 2, 3-^{14}С-сукцината аммония, содержащего 10% меченого сукцината. Для того чтобы выявить распределение радиоактивных изотопов в тканях и в выдыхаемом воздухе, меченый сукцинат вводили в желудок в дозе 15 мг на 1 кг массы тела. Выдыхаемый воздух собирали через 10, 20 и 30 мин. Семь животных находились в покое. Десять крыс через 20 мин после введения ^{14}С-сукцината плавали с грузом весом 6% от массы тела. Груз в виде гирьки привязывали к хвосту. Плавание продолжалось 10 мин. Во время плавания также собирали выдыхаемый воздух для определения метки в составе выдыхаемого CO_2, который связывали путем пропускания

выдыхаемого воздуха через 10% КОН. Через 30 мин после введения сукцината животных декапитировали и перфузировали через аорту 2 л охлажденного раствора Рингера, чтобы удалить кровь из тканевых сосудов. Содержание метки определяли в тканях печени, почек, сердца, бедренной мышцы и цельной крови.

Как показано в табл. 17, у крыс даже в покое уже через 10 мин. в выдыхаемой углекислоте обнаруживается до 3,5% метки от введенной дозы, а через 30 мин – до 16%. При плавании животных с грузом изотоп ^{14}C в выдыхаемом воздухе появлялся в значительно большем объеме (в 5–6 раз), чем в покое. Интересно, что у животных, у которых к хвосту была привязана гирька (без плавания), выделение радиоактивной метки наблюдалось в 3 раза интенсивнее. По-видимому, сказывалось волнение от самой процедуры прикрепления груза и нахождения в эксикаторе с гирькой на хвосте. Отсюда можно сделать вывод, что не только физическая нагрузка, но и волнение сопровождается ускорением утилизации экзогенного сукцината.

Таблица 17

Содержание ^{14}C в выдыхаемом воздухе у крыс в покое и после плавания при введении 2, 3-^{14}C-сукцината в желудок

Группа	Количество радиоактивного углерода, поглощенного щелочью из выдыхаемого воздуха				
	с 1-ю по 10-ю мин, тыс. имп.	с 11-ю по 20-ю мин, тыс. имп.	с 21-ю по 30-ю мин, тыс. имп.	всего за 30 мин	
				тыс. имп.	% от дозы
1-я (покой; n = 7)	110 ± 7,4	100 ± 5,3	301 ± 9,6	508 ± 52,3	15,6
2-я (покой и плавание; n = 10)	Покой 324 ± 31,5 $p_1 < 0,01$	Покой 340 ± 33,2 $p_1 < 0,01$	Плавание 1806 ± 171 $p_1 < 0,01$	2470 ± 234 $p_1 < 0,01$	70,6 $p_1 < 0,01$

Примечание. p_1 – в сравнении с первой группой.

Радиоактивная метка в тканях животных распределялась неравномерно: самая высокая концентрация метки обнаружена в печени. Существенно, что после плавания с грузом содержание ^{14}C в тканях в 1,5–2 раза меньше, чем в покое (табл. 18). В обобщенном виде результаты исследования с изотопной меткой приведены на рис. 23.

Таблица 18

Содержание ^{14}C в тканях после введения крысам в желудок меченого 2, 3-^{14}C-сукцината

Ткани	Содержание ^{14}C					
	1-я группа (покой; n = 7)			2-я группа (плавание; n = 10)		
	имп. на 1 мг ткани	тыс. имп. на орган	% от введенной дозы	имп. на 1 мг ткани	тыс. имп. на орган	% от введенной дозы
Печень	128 ± 4,6	462,1 ± 13,9	15,0	60,0 ± 3,1	216,5 ± 11,0	6,9
Почки	66 ± 2,7	80,0 ± 3,2	2,5	41,9 ± 2,2	50,3 ± 2,6	1,6
Скелетные мышцы	15,3 ± 2,0	614,0 ± 79,8	19,7	7,9 ± 0,9	317,0 ± 11,4	10,0
Сердце	17,5 ± 0,9	10,5 ± 0,5	0,3	9,8 ± 0,5	5,9 ± 0,3	0,2
Плазма крови	78,4 ± 9,1	352,0 ± 42,2	12,0	34,1 ± 4,8	150,0 ± 7,1	5,0
Всего		1522 ± 92,0	49,0		741,0 ± 97,1	23,7

Примечание. Во всех случаях при сравнении данных 1-й и 2-й групп различия статистически значимы при $p < 0,01$.

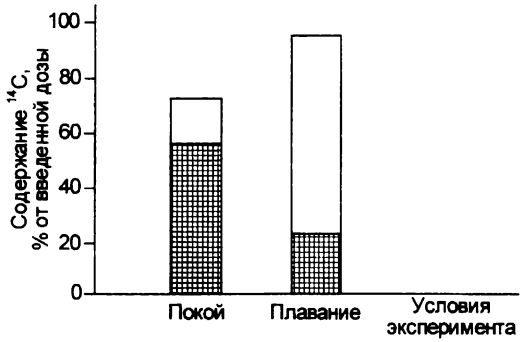


Рис. 23. Распределение ^{14}C в тканях и в выдыхаемом воздухе через 30 мин после введения крысам через рот 2, 3-^{14}C-сукцината аммония в покое и при нагрузке:

▭ – содержание ^{14}C в выдыхаемом воздухе; ▦ – содержание ^{14}C в тканях

Из приведенных данных можно сделать вывод, что экзогенный сукцинат после введения его в желудок достаточно быстро проникает в кровь и в ткани, где включается в энергетический обмен. Интенсив-

ность всасывания и окисления введенного сукцината многократно возрастает при эмоциональной и тем более при физической нагрузке подобно тому, как это происходит с экзогенной глюкозой (Н. Н. Яковлев, 1974).

Кинетику выведения стабильного изотопа ^{13}C с выдыхаемой углекислотой определяли масс-спектрометрически после приема добровольцем глюкозы и сукцината, обогащенных стабильным изотопом ^{13}C. Выдыхаемый воздух в объеме 150 мл собирали каждые 15 мин в течение 120 мин, а затем каждые 30 мин в течение 120 мин. Исследование было выполнено в лаборатории масс-спектрометрического мониторинга Института биохимии и физиологии микроорганизмов РАН А. М. Зякуном.

С помощью масс-спектрометрического анализа было установлено, что у человека после приема натощак через рот 20 мг сукцината аммония, обогащенного стабильным изотопом ^{13}C, метка в составе выдыхаемой углекислоты появляется намного быстрее, чем после приема такого же количества обогащенной стабильным изотопом ^{13}C глюкозы (рис. 24).

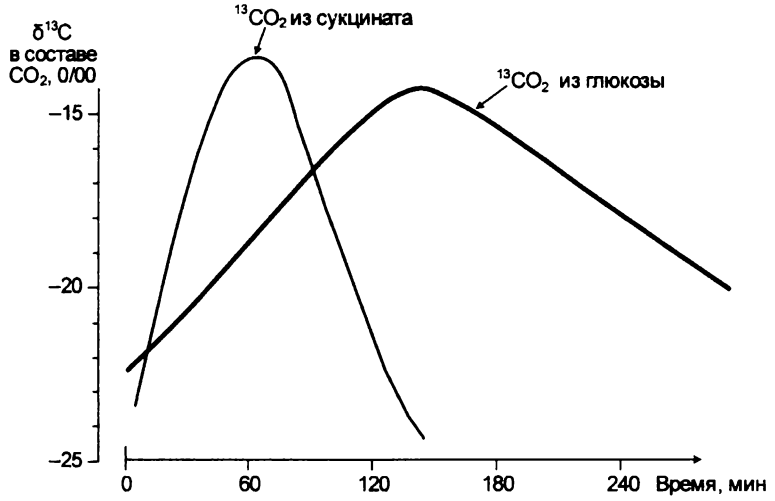


Рис. 24. Выведение ^{13}C с выдыхаемым CO_2 после приема 20 мг сукцината аммония или 20 мг глюкозы, обогащенных изотопом ^{13}C

Заметим, что S. Rous в 1978 г. обнаружила очень быстрое включение в липиды изотопа ^3H из введенного внутрибрюшинно меченного по тритию сукцината. Однако при использовании в качестве изотопной метки ^3H появляется опасение, что включение изотопа в анализируемые метаболиты происходит не только через метаболические превращения, осуществляемые ферментами, но и через воду, с которой, как известно, многие субстраты могут обмениваться атомами водорода при определенных условиях. Поэтому мы предпочли использовать в качестве метки изотоп углерода.

Поскольку в наших экспериментах экзогенный сукцинат вводился через желудочно-кишечный тракт, можно было предположить, что некоторая часть сукцината утилизируется микроорганизмами, населяющими кишечник. Однако обитающие в кишечнике у людей и животных микроорганизмы и паразиты относятся к факультативным и облигатным анаэробам. Именно поэтому, находясь в анаэробных условиях, они скорее образуют и выделяет сукцинат в качестве конечного продукта метаболизма, чем утилизируют экзогенный сукцинат. Иными словами, экзогенный сукцинат в анаэробных условиях не подвергается превращениям, так как является одним из конечных продуктов окислительно-восстановительных реакций (П. Хочачка, Дж. Сомеро, 1977, 1988).

Таким образом, сопоставление полученных экспериментальных результатов с данными, представленными в литературе, свидетельствует о том, что у животных и человека экзогенный сукцинат проникает из желудочно-кишечного тракта в кровь и в ткани, где окисляется до CO_2, который выводится с выдыхаемым воздухом. Изложенное дает основание использовать экзогенный сукцинат в качестве средства метаболической поддержки, например в составе пищевых добавок, и вводить его в комплекс средств метаболитной терапии.

Глава 5. Особенности реакций дыхательной цепи митохондрий при гипоксии и метаболическом ацидозе

5.1. Активация фосфорилирующего дыхания митохондрий после острой гипоксии

Разработка и оценка эффективности средств, способствующих поддержанию и сохранению фосфорилирующего дыхания митохондрий в условиях рабочей гипоксии и развития метаболического ацидоза, требуют выявления различий в состоянии митохондрий в нормоксических и гипоксических условиях и понимания основных механизмов, ответственных за наблюдаемые отклонения в реакциях. В условиях гипоксии митохондрии, клетки, ткани не теряют связи с регуляторными системами организма и функционируют как открытая система с интенсивным массообменом, ограниченным притоком кислорода, в окружении цитозоля с более кислым pH и повышенной концентрацией лактата, фосфата и ионов кальция (A. C. Schoolwerth, T. Strzelecki, F. A. Gesek, 1989; K. Drewnowska, A. C. Schoolwerth, 1994).

В настоящее время установлено, что гипоксические состояния сопровождаются обратимыми нарушениями структуры и функций митохондрий. Причем после острой гипоксии независимо от ее генеза, как правило, наблюдается активация фосфорилирующего дыхания изолированных митохондрий (Е. И. Маевский, 1971; А. М. Генкин, Н. А. Глотов, Е. И. Маевский, 1973; М. Н. Кондрашова, Е. И. Маевский, Г. В. Бабаян, 1973; L. Mela, 1979). Постгипоксическую активацию митохондрий печени, сердца и коркового слоя почек мы отмечали после острой гипоксической гипкосии (нахождение животных в течение 15–60 мин в барокамере на «высоте» 8000 м), после массивной кровопотери, возмещенной аутокровью или эмульсией перфторорганических соединений, после острой этаноловой интоксикации. Для примера приведем данные по изменению дыхания митохондрий печени крыс, перенесших 30-минутную гипоксическую гипоксию. Как показано на рис. 25, скорость дыхания митохондрий печени в 3-м состоянии увеличивалась более чем на 45% ($p < 0,05$), в 4-м состоянии – в меньшей степени, соответственно возрастала величина

дыхательного контроля. При этом отношение АДФ/О оставалось не измененным. В более поздние сроки – через 2 ч пребывания животных на «высоте» 8000 м, так же как и при адаптации животных к хронической гипоксической гипоксии, активации дыхания митохондрий не наблюдалось (Е. И. Маевский, 1971).

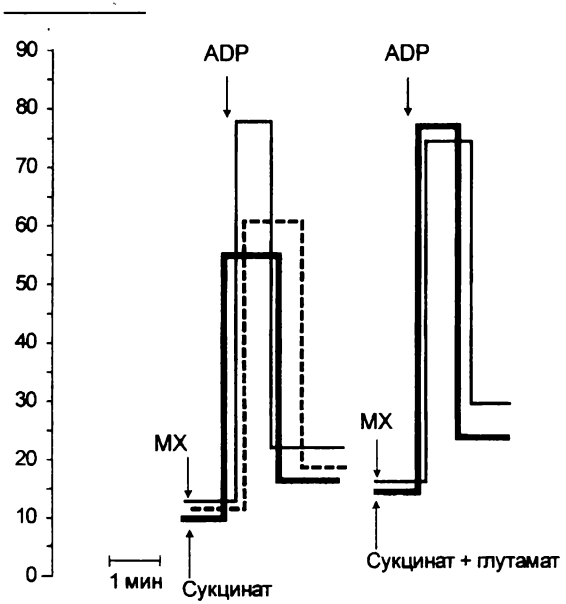


Рис. 25. Скорости дыхания митохондрий печени крыс при окислении сукцината после 60 мин гипоксической гипоксии (добавки: 200 мкМ АДФ, 5 мМ сукцината; «модификаторы среды»: ЭГТА 1мМ или обезжиренный бычий альбумин 1 мг / мл):

━━ нормоксия; ── острая гипоксия; ┅┅ острая гипоксия + модификатор среды

На основании анализа, выполненного in vivo и in vitro, мы выявили следующие факторы, вызывающие активацию дыхания митохондрий после острой гипоксии:

1. *Гормональное воздействие на уровне ткани*, возможно, связанное с гипоксическим стрессом. Подобная гипоксии активация дыхания наблюдалась после подкожного введения малых доз адренали-

на (0,1 мг на 1 кг веса) (M. N. Kondrashova, I. B. Gusar, E. I. Maevsky et al., 1981) и в случае спонтанно увеличенной продукции глюкокортикоидов в коре надпочечников (А. М. Генкин, Н. А. Глотов, Е. И. Маевский, 1973; Г. Г. Вольский, Л. М. Осадчая, 1976; В. И. Кулинский, В. М. Воробьева, Л. В. Труфанова, 1977).

2. *Уменьшение цавелево-уксусного торможения сукцинат-дегидрогеназы*, очевидно, обусловленное повышением степени восстановленности пиридиннуклеотидов после гипоксии. Обычно в условиях нормоксии внесение в инкубационную среду 3 мМ глутамата или изоцитрата стимулирует окисление сукцината даже в митохондриях интактных животных и тем более в случае деэнергизации, вызванной какими-либо нагрузками in vivo или in vitro (А. Д. Виноградов, 1967; М. Н. Кондрашова, 1971). Оказалось, что после острой гипоксии ни глутамат, ни изоцитрат не вызывали дополнительной активации дыхания выделенных митохондрий (см. рис. 25) (М. Н. Кондрашова, Е. И. Маевский, Г. В. Бабаян, 1973; E. I. Maevsky, N. N. Brustovetsky, 1981).

3. *Мобилизация ионов кальция и свободных жирных кислот*. Добавление в среду выделения и инкубации комплексообразователей 1 мМ ЭГТА или ЭДТА либо обезжиренного бычьего альбумина (1 мг на 1 мл среды) существенно уменьшало постгипоксическую активацию дыхания, так же как у животных, перенесших холодовой стресс (Н. Н. Брустовецкий, Е. И. Маевский, Л. С. Данилова и др., 1984; Н. Н. Брустовецкий, Е. И. Маевский, 1986; N. N. Brustovetsky, E. I. Maevsky, S. G. Kolaeva et al., 1985; N. N. Brustovetsky, E. I. Maevsky, 1986). Как ясно из работ последних лет, постгипоксическое повышение содержания в цитозоле клетки и матриксе митохондрий ионов кальция может существенно увеличивать проток через цикл Кребса даже на фоне повышенного уровня восстановленности NADH за счет активирующего воздействия ионов кальция на α-кетоглутаратдегидрогеназу (A. C. Schoolwerth, T. Strzelecki, F. A. Gesek, 1989; K. Drewnowska, A. C. Schoolwerth, 1994).

4. *Активация фосфолипазы А2*. Ингибитор фосфолипазы А2 бромфенацилбромид, добавленный в инкубационную среду в концентрации 1 мМ, также уменьшал постгипоксическую активацию дыхания митохондрий (Н. Н. Брустовецкий, Е. В. Гришина, Е. И. Маевский, 1989; Н. Н. Брустовецкий, З. Г. Амерханов, Е. В. Гришина и др., 1990).

5. *Набухание митохондрий* после острой гипоксии. Данное явление отмечалось во множестве морфологических исследований (К. С. Митин, 1967). В лаборатории В. П. Скулачева было установлено, что набухание митохондрий сопровождается ускорением переноса восстановительных эквивалентов на уровне цитохромов b-c (И. П. Красинская, И. С. Литвинов, С. Д. Захаров и др., 1989). Повышение тоничности среды в таких условиях приводит к сжатию митохондрий и подавлению дыхания (Н. Н. Брустовецкий, З. Г. Амерханов, Е. В. Гришина и др., 1990; N. N. Brustovetsky, M. Klingenberg, 1996). Причем ответ на повышение тоничности среды зависит от исходной степени набухания митохондрий. Оказалось, что для полного подавления ответа митохондрий печени на АДФ у интактных животных достаточно повысить тоничность среды добавкой сахарозы до 500 мОсм, тогда как после острой гипоксии для подавления V_3 необходимо повысить тоничность до 700 мОсм.

Активация фосфолипазы А2 и набухание митохондрий после гипоксии могут быть следствием воздействия повышенных концентраций свободных жирных кислот и ионов кальция (Ю. В. Евтодиенко, 1979), увеличения внутримитохондриальной концентрации кальцийфосфата и недоокисленных субстратов.

Относительно влияния сдвига pH и повышения концетрации лактата в ткани как факторов, вносящих свой вклад в постгипоксическую активацию фосфорилирующего дыхания, далеко не все ясно. С одной стороны, известно, что значительное, в несколько раз по сравнению с физиологическим уровнем, увеличение концентрации лактата независимо от величины pH может вызывать набухание митохондрий, сопровождающееся активацией дыхания и разобщением окислительного фосфорилирования (H. Senger, 1975). С другой стороны, при вышеперечисленных состояниях, в частности при гипоксической гипоксии, содержание лактата возрастает всего в 1,5–2 раза и величина сдвига pH не превышает 0,1–0,15 ед.

В экспериментах in vitro мы обнаружили, что для активирования дыхания необходимо снизить pH инкубационной среды по крайней мере с 7,4 до 6,9. Особенно заметна такая активация на уровне гомогената (табл. 19).

Таблица 19

Влияние снижения pH инкубационной среды на скорости дыхания при окислении сукцината (5 мМ) гомогенатом сердца крысы (t = 30 °С, n = 4) в 4-м состоянии и при активации эндогенных АТФ-аз (3-е состояние)

pH инкубационной среды	Скорость дыхания в 4-м состоянии, нг-атом О / (мин · мг белка)	Скорость дыхания в 3-м состоянии, нг-атом О / (мин · мг белка), в присутствии 2,5 мМ Mg^{++}, 2,5 мМ АТР
7,4	16,2 ± 1,2	67,0 ± 2,7
6,9	25,4 ± 2,1 p < 0,001	81,1 ± 3,2 p < 0,05

Далее мы промоделировали подобный сдвиг pH в условиях целостного организма. По данным K. Sahlin (1978), сдвиг внутриклеточного pH на 0,5–0,6 ед. при мышечной работе сопровождается снижением pH в смешанной крови на 0,2 ед. Оказалось, что такой сдвиг pH крови с 7,41±0,01 до 7,17±0,02 происходит у крыс во время плавания с грузом в течение 15 мин. Одновременно при этом возрастает концентрация лактата в крови и увеличивается отношение лактат/пируват с 13,1±0,7 до 54,4±2,2. В митохондриях скелетных мышц, выделенных из бедренных мышц крыс, после такой нагрузки наблюдалась гипоксиподобная активация фосфорилирующего дыхания (табл. 20).

Таблица 20

Дыхание митохондрий скелетных мышц крыс после плавания с предварительным приемом сукцината аммония

№ п/п	Условия исследований	V_4	V_3	ДК	АДФ/О	$V_ф$
1	2	3	4	5	6	7
Субстрат окисления: сукцината 5 мМ + глутамата 8 мМ						
1	Покой (n = 6)	73±7,1	324±30,0	4,54±0,39	1,00±0,09	331±31,3
2	Нагрузка (n = 8)	123±17,4 p < 0,05	440±34,6 p < 0,05	3,73±0,37	1,07 ± 0,09	457±45,5 p < 0,05

Окончание табл. 20

1	2	3	4	5	6	7
3	Нагрузка с предварительным приемом сукцината (n = 8)	75±7,2	318±48	4,14±0,43	1,24 ± 0,08	413±69,5
	Субстрат окисления: пирувата 10 мМ + малата 5 мМ					
4	Покой (n = 6)	34 ± 4,7	206 ± 20,8	5,56±0,27	1,26±0,12	220±22,8
5	Нагрузка (n = 8)	62 ± 9,0 $p < 0,05$	290 ± 18,0 $p < 0,05$	5,11±0,61	1,24±0,16	278±25,1
6	Нагрузка с предварительным приемом сукцината (n = 8)	42 ± 5,5	156 ± 16,7	3,86±0,35 $p < 0,02$	1,12±0,09	151±17,3

Примечания:

1. V_4 и V_3 – скорости дыхания митохондрий в 4-м и 3-м состояниях по Чансу – Вилямсу, нг-ат О / (мин · мг белка митохондрий); $V_ф$ – скорость фосфорилирования добавленного АДФ, нмоль / (мин · мг белка); p – при сравнении с показателями покоя.

2. Среда выделения для митохондрий скелетных мышц: 0,25 М маннит, 10 мМ трис-HCl буфер (pH = 7,4), 1 мМ ЭГТА, 1 мМ АТФ. Инкубационная среда: 0,25 М маннит, 10 мМ трис-HCl буфер (pH = 7,4), 1 мМ ЭГТА, 3 мМ KH_2PO_4, 1 мМ $MgSO_4$; добавки субстратов по 5 мМ, АДФ – 150 мкМ.

Естественно, в условиях целостного организма активирующее действие рабочей гипоксии на дыхание митохондрий скелетных мышц является результатом влияния всех указанных выше факторов, а не только сдвига pH и накопления лактата. Тем более было интересно проверить, в какой мере теоретические предпосылки использования сукцината, основанные на митохондриальных подходах, могут работать на уровне целостного организма.

5.2. Купирование сукцинатом ацидоза при рабочей гипоксии (физической нагрузке)

Суммируем кратко аргументы, которые послужили обоснованием для использования экзогенного сукцината в качестве средства купирования метаболического ацидоза при рабочей гипоксии.

Из всех митохондриальных субстратов при фиксированной АТФ-азной нагрузке in vitro наиболее эффективно предотвращали развитие ацидоза сукцинат калия, смесь сукцината калия с глутаматом калия или сукцинат аммония. На уровне изолированных митохондрий в обычных нормоксических условиях, судя по изменению дыхательного коэффициента RQ, сукцинат выигрывает конкуренцию за дыхательную цепь у NAD-зависимых субстратов, а при снижении pO_2 в инкубационной среде изменение сродства митохондрий к субстратам таково, что преимущество сукцината становится еще более выраженным. В условиях гипоксии на уровне клеток, срезов тканей и перфузируемого органа в дыхательной цепи митохондрий полностью восстанавливаются пиридиннуклеотиды и сохраняется достаточно высокая окисленность флавопротеидов. Возможно, поэтому в первую очередь нарушается окисление NAD-зависимых субстратов, а флавин-зависимые субстраты, в частности сукцинат, могут еще окисляться. По-видимому, с таким избирательным окислением связано почти двукратное снижение содержания сукцината в печени крыс после 15-минутной гипоксической гипоксии (Е. И. Маевский, 1971). Наконец, наличие у экзогенного сукцината способности проникать в ткани целостного организма и окисляться в них позволяет вводить его в эксперименте на животных через желудочно-кишечный тракт.

На уровне целостного организма противоацидотическое действие сукцината проверяли в условиях рабочей гипоксии, создаваемой физической нагрузкой (плавание крыс в течение 15 мин при температуре воды 30 °С с грузом весом 6% от массы тела). За 20 мин до плавания животным вводили в желудок исследуемый препарат: сукцинат натрия, глутамат натрия или смесь сукцината натрия и глутамата натрия из расчета 25 мг каждого препарата на 1 кг массы тела животного.

Как показано на рис. 26, наиболее эффективное купирование метаболического ацидоза наблюдалось после введения смеси сукцината с глутаматом, подобно тому как это было отмечено на изолированных тканевых препаратах в экспериментах in vitro.

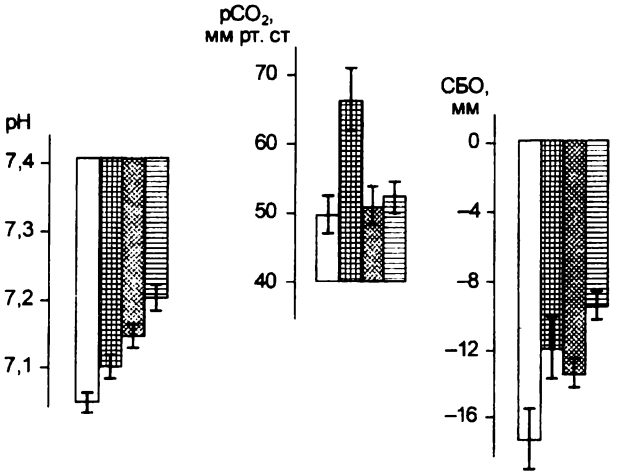


Рис. 26. Влияние предварительного введения сукцината натрия, глутамата натрия и смеси сукцината натрия с глутаматом натрия на кислотно-основное состояние крови крыс при плавании с грузом:
– плавание; – плавание + сукцинат Na; – плавание + глутамат Na; – плавание + сукцинат Na + глутамат Na

Поскольку в экспериментах in vitro сукцинат аммония был еще эффективнее, чем смесь сукцината с глутаматом, мы решили проверить его действие и на уровне целостного организма. Сукцинат аммония вводили животным в желудок в дозе 15 мг на 1 кг массы тела (т. е. почти в три раза меньше, чем суммарная доза сукцината Na и глутамата Na) за 20 мин до плавания с грузом. Сукцинат аммония на уровне целостного организма оказывал также более сильное противоацидотическое действие, как и в экспериментах in vitro (рис. 27).

В случае введения животным перед плаванием сукцината аммония pH крови снижалось в меньшей степени (до 7,28±0,14), отношение лактат/пируват не превышало 28±1,4. Причем противоацидотическое действие сукцината аммония на уровне крови сопровождалось нормализацией параметров фосфорилирующего дыхания митохондрий, выделенных из скелетных мышц: практически полностью ликвидировалась посленагрузочная активация дыхания (см. табл. 20).

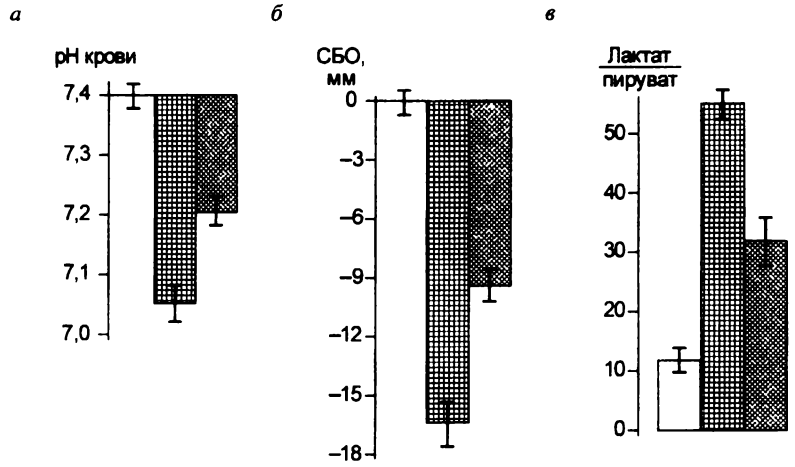


Рис. 27. Влияние предварительного введения сукцината аммония на pH крови (*а*), величину сдвига буферных оснований (*б*) и отношение лактат/пируват (*в*) в крови крыс после 15-минутного плавания:
□ – покой; ▦ – плавание; ▩ – плавание + сукцинат аммония

Данные о влиянии сукцината аммония на выносливость крыс впервые в кратком виде были опубликованы в 1976 г. в сборнике статей «Терапевтическое действие янтарной кислоты» и позже более детально изложены А. С. Розенфельдом (1983). В последние годы эти результаты были подтверждены А. В. Сучковым, В. В. Панюшкиным, С. Н. Португаловым (1997), которые показали, что введение сукцината аммония в дозе 0,25–1,0 г на 1 кг веса существенно повышало физическую работоспособность мышей-самцов. При этом активность препаратов в ряду возрастала так же, как и в наших исследованиях: фармокопейная янтарная кислота < сукцинат натрия < сукцинат аммония. Полученные нами данные и результаты исследований А. В. Сучкова, В. В. Панюшкина, С. Н. Португалова (1997), М. Ю. Алексеева (1977) позволяют сделать вывод о том, что в условиях целостного организма экзогенный сукцинат способен повышать работоспособность животных, очевидно, за счет уменьшения симптомов рабочей гипоксии, в частности глубины посленагрузочного ацидоза, так же, как и на уровне изолированных тканевых препаратов.

5.3. Влияние приема сукцината на кислотно-основную систему крови спортсменов при физических нагрузках

5.3.1. Реакция кислотно-основной системы крови спортсменов на физическую нагрузку

Результаты анализа причин развития метаболического ацидоза при АТФ-азных нагрузках и исследование подходов к субстратной поддержке кислотно-основной системы в модельных экспериментах in vitro и in vivo дали основание приступить к изучению возможности использования препаратов сукцината у спортсменов, у которых в процессе спортивного развития и постоянных интенсивных физических нагрузок состояние метаболического ацидоза и рабочей гипоксии – обычное явление.

Предварительные материалы доклинических испытаний препаратов сукцината натрия и янтарной кислоты были представлены в фармакологический комитет Минздрава СССР Институтом биологической физики РАН совместно с клиникой грудной хирургии, руководимой академиком Н. М. Амосовым. Непосредственно документация для фармкомитета и опытная партия таблетированных препаратов были изготовлены благодаря энтузиазму и огромным усилиям М. Н. Кондрашовой, В. И. Малюка и И. Р. Саакян. В ноябре 1972 г. было получено первое в СССР разрешение на испытание препаратов янтарной кислоты на добровольцах. Следует заметить, что янтарная кислота и сукцинат аммония как лекарственные препараты, правда по иным показаниям, упоминаются в качестве лекарственных средств еще в «Императорской фармакопее», изданной в 1887 г. в Санкт-Петербурге.

По мере роста спортивного мастерства системы физиологической и биохимической адаптации обеспечивают приспособление организма спортсмена таким образом, что он сможет переносить ацидоз или уменьшать его развитие (Н. Н. Яковлев, 1978; K. Sahlin, A. Alvestrand, R. Brandtet et al., 1978; Ф. Д. Голлник, Л. Германсен, 1982; Н. А. Фомин, 1995). Однако систематических исследований, в которых эти процессы были бы проанализированы не фрагментарно, а в такой мере, чтобы послужить критерием оценки состояния

спортсмена и эффективности противоацидотических мероприятий, в частности приема субстратов, окисляющихся в митохондриях, в литературе нет.

В наших исследованиях под наблюдением в течение года находились 66 спортсменов разной квалификации и 26 нетренированных добровольцев, ежемесячно выполнявших тестирующие велоэргометрические (ВЭ) нагрузки: фиксированные по мощности на уровне 70–75% максимального потребления кислорода и предельные ступенчатые нагрузки до отказа (Ф. Дж. Нейгел, 1982). В ходе исследований pH капиллярной крови измеряли микрометодом Аструпа на пике спортивной формы. Кросс – умеренная аэробная нагрузка при частоте пульса 110–120 уд./мин. ВЭ стандартная нагрузка мощностью 300 Вт выполнялась в течение 3 мин. ВЭ нагрузка до отказа – ступенчатая нагрузка с шагом 50 Вт по минуте с возрастающей мощностью на каждой ступени до отказа спортсмена от работы при высокой мотивации.

Нами было проанализировано изменение параметров кислотно-основного состояния крови в течение годичного тренировочного цикла у спортсменов разного квалификационного уровня: I, II, III разрядов и мастеров спорта. Обследование спортсменов при обычных тренировочных нагрузках и велоэргометрическом тестировании показало, что *с ростом спортивного мастерства уменьшается глубина посленагрузочного ацидоза на стандартные нагрузки* (рис. 28).

Уменьшение посленагрузочного ацидоза с ростом тренированности связано с активацией аэробных окислительных процессов в тканях, о чем свидетельствует уменьшение величины СБО более чем на 60%. Адаптация к аэробным нагрузкам происходила быстрее и эффективнее, чем к анаэробным. Так, при кроссовых нагрузках, выполняемых с частотой сердечных сокращений 110–120 уд./мин, мы обнаружили в группе мастеров спорта развитие умеренного дыхательного алкалоза (pH = 7,44 ± 0,009) вместо ацидоза. У перворазрядников значения параметров КОС не отличались от показателей, зафиксированных в состоянии покоя. У второразрядников развивался небольшой ацидоз (pH = 7,34 ± 0,008).

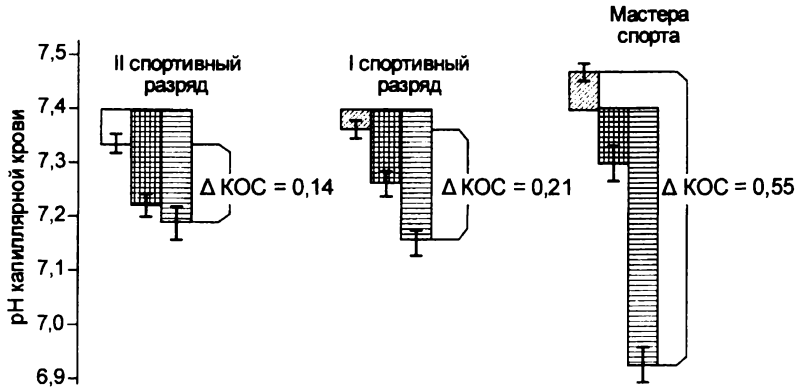


Рис. 28. Изменение диапазона реактивности кислотно-основной системы (dKOC) крови спортсменов по мере роста спортивного мастерства:

□ – кросс; ▦ – ВЭ нагрузка стандартная; ▤ – ВЭ нагрузка до отказа

При адаптации к анаэробным нагрузкам наблюдалось одновременное повышение интенсивности физической работы с развитием способности спортсменов переносить более глубокий ацидоз. Именно поэтому в отличие от стандартных и тренировочных нагрузок *после соревнований в беге на средние дистанции, во время которых нагрузка выполняется с максимально возможной интенсивностью, глубина ацидоза больше у спортсменов высшей квалификации.* Так, у мастеров спорта после бега на дистанцию 1500 м величина pH снижалась до 7,07 ± 0,012, а у второразрядников – только до 7,22 ± 0,014.

Таким образом, по мере функционального развития спортсменов наряду с уменьшением ацидоза при стандартных ВЭ нагрузках и даже развитием дыхательного алкалоза после кросса умеренной интенсивности величина ацидоза после максимальных соревновательных нагрузок возрастает. Поэтому мы пришли к выводу, что функциональное состояние спортсменов лучше оценивать не при каких-либо отдельных видах нагрузок, а по величине диапазона реактивности КОС крови путем сопоставления реакций на умеренные, фиксированные субмаксимальные и максимальные по мощности нагрузки. Под диапазоном реактивности КОС мы понимаем разность между отклонением pH при предельной работе (велоэргометрическая ступенчатая нагрузка до от-

каза или соревнования в беге на средние дистанции) и величиной pH после стандартной, умеренной по мощности аэробной нагрузки (фиксированная велоэргометрическая нагрузка или кросс при пульсе 110–120 уд./мин): $\Delta КОС = pH_{пред.\ анаэроб} - pH_{станд.\ аэроб}$. В ходе адаптации организма к нагрузкам величина ΔКОС градуально возрастает (см. рис. 28).

Таким образом, анализ полученных данных по реакциям КОС крови испытуемых на предъявляемые нагрузки позволил выявить чувствительный функциональный критерий, который мы назвали диапазоном реактивности КОС. Полученные данные свидетельствуют о том, что в процессе спортивного развития по мере адаптации организма к нагрузкам Δ КОС возрастает от 0,14 ед. pH у спортсменов II разряда до 0,55 ед. pH у мастеров спорта международного класса. Расширение Δ КОС обусловлено уменьшением кислотного сдвига pH при стандартной нагрузке и увеличением глубины ацидоза, при котором спортсмен способен выполнять предельную нагрузку до отказа (см. рис. 28).

5.3.2. Влияние сукцината на кислотно-основную систему крови у спортсменов при физических нагрузках

Обследовалось 5 групп добровольцев: 8 студенток из группы общефизической подготовки; 7 второразрядниц и 9 перворазрядниц, выполнявших дозированную ВЭ работу мощностью 75 Вт в первые 3 мин, 125 Вт в последующие 3 мин и 175 Вт в течение последних 2 мин; 6 мужчин и 6 женщин (мастеров спорта), выполнявших более интенсивную ВЭ работу мощностью 300 Вт в течение 3 мин. У всех в результате выполнения дозированной ВЭ нагрузки развивался метаболический ацидоз различной глубины (табл. 21).

Эффективность действия предварительного приема смеси сукцината Na и глутамата Na (по 35 мг на 1 кг массы тела) зависела от мощности выполняемой нагрузки и от функционального состояния организма. Так, ацидоз уменьшался лишь в группе спортсменов II разряда. Недостаточный уровень физической подготовки студентов из группы общефизической подготовки не мог быть существенно повышен с помощью экзогенных субстратов. Отсутствие действия препаратов у перворазрядников, возможно, было связано с малым ацидотическим отклонением, которое достаточно полно компенсировалось собственными механизмами коррекции КОС.

Таблица 21

Влияние однократного приема смеси сукцината Na и глутамата Na на показатели КОС крови спортсменов при разной по мощности дозированной велоэргометрической нагрузке

№ п/п	Условия исследований	$pH_{ист}$	pCO_2, мм рт. ст	СБО, мМ	Концентрация лактата, мМ	Концентрация пирувата, мМ	Избыток лактата, мМ
1	Покой (n = 36)	7,40± ±0,006	40,6± ±0,6	+0,2± ±0,4	0,73± ±0,20	0,08± ±0,01	–
2	Покой + смесь СГ	7,41± ±0,010	38,2± ±1,0	+0,3± ±0,4	1,08± ±0,16	0,11± ±0,01	–
3	Студенты. Ступенчатая работа (n = 8)	[1] 7,24± ±0,012	41,6± ±0,8	[1] –9,4± ±0,7	[1] 4,84± ±0,32	0,10± ±0,01	[1] 4,20± ±0,25
4	То же + смесь СГ	[2] 7,23± ±0,013	40,4± ±1,4	[2] –10,2± ±0,4	[2] 5,28± ±0,29	0,13± ±0,02	4,45± ±0,43
5	Второразрядники. Ступенчатая работа (n = 7)	[1] 7,26± ±0,010	43,9+ ±1,2	[1] –7,2± ±0,8	[1] 4,20± ±0,34	0,10± ±0,02	[1] 3,20± ±0,32
6	То же + смесь СГ	[2,5] 7,30± ±0,015	46,5± ±3,2	[2,5] –3,5± ±1,2	[2] 3,60± ±0,23	0,16± ±0,02	[2,5] 2,00± ±0,33
7	Перворазрядники. Ступенчатая работа (n = 9)	[1] 7,33± ±0,014	39,1± ±1,0	[1] –4,4± ±0,6	[1] 2,36± ±0,30	[1] 0,19± ±0,02	[1] 0,32± ±0,55
8	То же + смесь СГ	[2] 7,32± ±0,013	40,0± ±1,6	[2] –4,5± ±0,5	[2] 2,61± ±0,28	0,18± ±0,02	0,04± ±0,63
9	Мастера спорта. Работа мощностью 300 Вт в течение 3 мин (n = 6)	[1] 7,21± ±0,010	41,4± ±1,0	[1] –11,4± ±0,7	–	–	–
10	То же + смесь СГ	[2,9] 7,29± ±0,014	39,6± ±1,0	[2,9] –7,4± ±0,7	–	–	–
11	Добровольцы. Работа мощностью 300 Вт в течение 3 мин (n = 6)	[1] 7,23± ±0,010	42,1± ±1,2	[1] –9,8± ±0,4	[1] 7,28± ±0,55	0,18± ±0,03	5,54± ±0,21
12	То же + смесь СГ	[11] 7,31± ±0,010	41,4± ±2,2	[11] –5,9± ±0,5	7,20± ±0,44	0,20± ±0,02	[11] 4,40± ±0,23

Примечания:

1. Цифровой индекс при среднем значении указывает номер группы, с которой проводится сравнение ($p < 0,05$).

2. СГ – смесь сукцината Na и глутамата Na.

При более интенсивной работе мощностью 300 Вт и длительностью 3 мин смесь сукцината Na и глутамата Na оказывала выраженный противоацидотический эффект как у мастеров спорта, так и у малотренированных добровольцев. При этом частота сердечных сокращений снижалась у испытуемых обеих групп в среднем на 25 уд./мин ($p < 0,05$).

После однократного приема сукцината аммония (СА) в дозе 20–25 мг на 1 кг массы тела глубина ацидоза в ответ на стандартную нагрузку мощностью 300 Вт и длительностью 3 мин существенно уменьшалась (табл. 22). В последующих исследованиях вместо смеси сукцината Na и глутамата Na мы использовали аммониевую соль янтарной кислоты. Причем доза сукцината аммония была в 3–3,5 раза меньше, чем суммарная доза сукцината натрия и глутамата натрия.

В случае выполнения ступенчатой ВЭ работы до отказа предварительный прием СА способствовал увеличению общей работоспособности на 31%, при этом величина посленагрузочного ацидоза возрастала незначительно.

В группе спортсменов, находящихся на обследовании во врачебно-физкультурном диспансере, мы сравнивали изменение величины КОС крови после приема разных доз сукцината аммония (табл. 23). Оказалось, что при ежедневном ВЭ тестировании без приема сукцината аммония на второй день у спортсменов при ступенчатой ВЭ работе до отказа наблюдалось падение работоспособности по сравнению с первым днем при неизменно высоком содержании лактата. Однократный прием сукцината аммония в дозе 2 мг на 1 кг веса препятствовал падению работоспособности у спортсменов на второй день обследования, но при этом концентрация лактата в крови возрастала. Прием 20 мг сукцината аммония на 1 кг веса также способствовал сохранению работоспособности во второй день обследования. При этом наблюдалось два вида ответной реакции на нагрузку. У части спортсменов содержание лактата в крови возрастало так же, как после приема малой дозы сукцината аммония, а у остальных снижалось.

Ежедневный прием сукцината аммония в течение 10 дней в дозе 20 мг на 1 кг веса способствовал увеличению общей работоспособности на 31% и повышению максимального потребления кислорода на 14%. При этом в группе спортсменов, получавших сукцинат аммония,

вместо ожидаемого улучшения показателей КОС крови наблюдалось дальнейшее углубление ацидоза (табл. 24).

Таблица 22

Влияние однократного приема сукцината аммония перед велоэргометрической нагрузкой на ответную реакцию кислотно-основного состояния крови спортсменов

№ п/п	Условия исследований	$pH_{ист}$	СБО, мМ	Концентрация лактата, мМ	Концентрация пирувата, мМ	Избыток лактата, мМ	Объем работы, кг/м
1	Покой (n = 16)	7,38± ±0,006	–1,3± ±0,4	1,02± ±0,14	0,16± ±0,01	–	–
2	Покой после приема СА (n = 16)	7,39± ±0,006	–0,8± ±0,4	1,26± ±0,13	0,14± ±0,01	–	–
3	Стандартная работа мощностью 300 Вт в течение 3 мин (n = 8)	[1] 7,21± ±0,012	[1] –11,1± ±0,9	[1] 8,23± ±0,31	[1] 0,24± ±0,02	6,04± ±0,32	–
4	Стандартная работа мощностью 300 Вт в течение 3 мин + СА (n = 8)	[3] 7,29± ±0,016	[2,3] –7,9± ±0,9	[2,3] 7,16± ±0,33	[2,3] 0,31± ±0,02	[3] 4,47± ±0,33	–
5	Ступенчатая нагрузка до отказа (n = 8)	[1] 7,21± ±0,016	[1] –14,6± ±1,03	[1] 8,87± ±0,31	[1] 0,29± ±0,01	7,24± ±0,28	11625± ±297
6	Ступенчатая нагрузка до отказа + СА (n = 8)	[2] 7,19± ±0,012	[2] –15,2± ±1,2	[2] 9,12± ±0,33	[2] 0,30± ±0,01	7,16± ±0,29	15305± ±407

Примечание. Цифровой индекс при среднем значении указывает номер группы, с которой проводится сравнение ($p < 0,05$).

Однако величина отношения лактат/пируват после приема сукцината аммония уменьшилась, что свидетельствует об увеличении вклада аэробных окислительно-восстановительных процессов в энергообеспечение физической работы.

Таблица 23

Изменение работоспособности и содержания лактата в крови у спортсменов при повторной ступенчатой ВЭ нагрузке до отказа во второй день обследования при однократном приеме двух разных доз сукцината аммония

№ п/п	День, условия исследований	Уровень работоспособности, %	Содержание лактата, мМ
1	Первый день. ВЭ нагрузка без СА (n = 27)	100	7,1 ± 0,5
2	Второй день. ВЭ нагрузка без СА (n = 9)	73 ± 5 $p_1 < 0,02$	6,9 ± 0,4
3	Второй день. ВЭ нагрузка + + 2 мг СА на 1 кг массы тела (n = 9)	98 ± 7	10,9 ± 1,6 p < 0,05 (1, 2)
4	Второй день. ВЭ нагрузка + + 20 мг СА на 1 кг массы тела (n = 4)	102 ± 9	9,2 ± 0,8 p < 0,05 (1, 2)
5	Второй день. ВЭ нагрузка + + 20 мг СА на 1 кг массы тела (n = 5)	99 ± 7	2,3 ± 0,4 p < 0,05 (1, 2, 3, 4)

Примечание. p < 0,05 указано для групп, с которыми проводилось сравнение.

Итак, однократный и повторный в течение 10 дней прием сукцината аммония или однократный прием смеси сукцината натрия и глутамата натрия приводит к значительному повышению работоспособности при повторных нагрузках до отказа, уменьшает падение pH при стандартных нагрузках и способствует сохранению работоспособности в условиях более глубокого ацидоза. Таким образом, смесь сукцината натрия с глутаматом натрия и сукцинат аммония расширяют диапазон реактивности КОС крови при физических нагрузках подобно тому, как это происходит при увеличении адаптационных возможностей спортсмена в процессе спортивного развития.

Естественно, что в условиях организма нельзя сводить эффекты сукцината только к метаболическим превращениям в митохондриях в качестве субстрата. Исходя из результатов, полученных нами и рядом других исследователей, следует учесть наличие вазодилятационного действия сукцината и его влияние на деоксигенацию гемоглобина (А. С. Розенфельд, 1983). Нами было обнаружено, что в 10 раз меньшие, «досубстратные» дозы сукцината аммония (2 мг на 1 кг ве-

са) также оказывают выраженное действие на физическую работоспособность, повышая ее на фоне более глубокого ацидоза, изменяя отношение лактат/пируват. Эти эффекты нельзя было связать с прямым субстратным действием сукцината. Они могли быть обусловлены его влиянием на регуляторные механизмы нейроэндокринной системы (М. Н. Кондрашова, Е. И. Маевский, 1978).

Таблица 24

Ответная реакция кислотно-основного состояния крови спортсменов на предельную ступенчатую велоэргометрическую нагрузку до и после 10-дневного цикла тренировок с ежедневным приемом сукцината аммония

№ п/п	Условия исследований	$pH_{ист}$	СБО, мМ	Концентрация лактата, мМ	Концентрация пирувата, мМ	Объем работы, кг/м
	Контрольные группы (без приема СА)					
1	Покой (n = 7)	7,40±0,008	–0,5±0,3	1,46±1,2	0,13±0,1	–
2	ВЭ нагрузка (n = 7)	7,24±0,01	–9,6±0,4	7,20±0,29	0,15±0,01	8060±283
3	Покой после 10 дн. тренировки (n = 7)	7,39±0,007	–0,6±0,3	1,94±0,13	0,19±0,1	–
4	ВЭ нагрузка после 10 дн. тренировок (n = 7)	7,19±0,012 $p_2 < 0,001$	–11,7±0,6 $p_2 < 0,01$	9,90±0,27 $p_2 < 0,001$	0,21±0,1 $p_2 < 0,02$	8864±308
	Экспериментальные группы (с приемом СА во время 10 дней тренировок)					
5	Покой (n = 8)	7,39±0,006	–0,3±0,3	1,62±0,13	0,14±0,01	–
6	ВЭ нагрузка (n = 8)	7,23±0,011	–9,5±0,6	7,60±0,27	0,16±0,01	8294±299
7	Покой после 10 дн. тренировок + СА (n = 8)	7,39±0,007	–0,5±0,4	1,25±0,13	0,19±0,01	–
8	ВЭ нагрузка после 10 дн. тренировок + + СА (n = 8)	7,12±0,014 $p_6 < 0,01$ $p_4 < 0,01$	–15,2±0,9 $p_6 < 0,01$ $p_4 < 0,01$	12,30±0,29 $p_6 < 0,01$ $p_4 < 0,01$	0,30±0,01 $p_6 < 0,01$ $p_4 < 0,01$	11129±563 $p_6 < 0,01$ $p_4 < 0,01$

Примечание. Цифровой индекс при р указывает номер группы, с которой проводится сравнение.

Глава 6. Опосредованные механизмы действия сукцината на энергетический обмен в условиях целостного организма

Регуляция pH крови препаратами сукцината на уровне целостного организма положительно сказывается на способности переносить физические нагрузки. Однако высокая эффективность малых доз сукцината не может быть объяснена лишь с позиций участия экзогенного сукцината в окислительно-восстановительных превращениях энергетического обмена. В связи с этим возник ряд предположений о возможном опосредованном действии экзогенного сукцината на энергетический обмен.

6.1. Влияние сукцината на оксигенацию тканей

В условиях организма уменьшение выраженности гипоксии и ацидоза могло быть обусловлено несколькими механизмами. Во-первых, известно, что дикарбоновые кислоты обладают вазодилятационным действием (A. P. Halestrap, N. T. Price, 1999). Во-вторых, мы предположили, что сукцинат может влиять на сродство гемоглобина к кислороду, подобно тому как влияют высокие концентрации лактата и 2, 3-дифосфоглицерата (Ф. И. Гиммерих, 1966; А. Уайт, Ф. Хендлер, Э. Смит и др., 1981). На «докислородных» и «гипоксических» этапах эволюции живой природы (А. Брода, 1980) сукцинат, как и лактат, накапливался в результате анаэробных превращений углеводов и аминокислот (М. Н. Кондрашова, Е. И. Маевский, 1978; П. Хочачка, Дж. Сомера, 1977, 1988). Именно поэтому можно было ожидать, что сукцинат аналогично лактату может сдвигать кривую диссоциации оксигемоглобина (HbO_2) вправо. Для проверки этого предположения был поставлен эксперимент in vitro с целью выявления влияния сукцината натрия на дезоксигенацию HbO_2 крови, определяемую кулонометрически по методу И. М. Эпштейна (1977).

В электролизер конструкции И. М. Эпштейна помещали 0,2 мл цельной крови и вносили 10 мкл 0,02 М раствора сукцината аммония, чтобы конечная концентрация препарата составляла 1 мМ. Расчет строился на основании ранее показанных исследований с меченым

сукцинатом. Мы исходили из следующего: при введении сукцината в дозе 25 мг на 1 кг массы тела (в исследованиях А. В. Сучкова, В. В. Панюшкина, С. Н. Португалова (1997) – 0,25–1,0 г на 1 кг массы тела) при объеме циркулирующей крови 6,5% от массы тела и гематокрите 42% не менее 12% введенного сукцината обнаруживается уже через 30 мин. При дозе 25 мг на 1 кг массы тела это составляет 0,5 мМ сукцината в литре плазмы крови (при дозах, использованных А. В. Сучковым, – 5 и 20 мМ сукцината в плазме после введения 0,25 или 1,0 г сукцината аммония на 1 кг массы тела). Действительно, оказалось, что в присутствии 1 мМ сукцината аммония кривая сродства Hb к O_2 существенно изменяется (рис. 29).

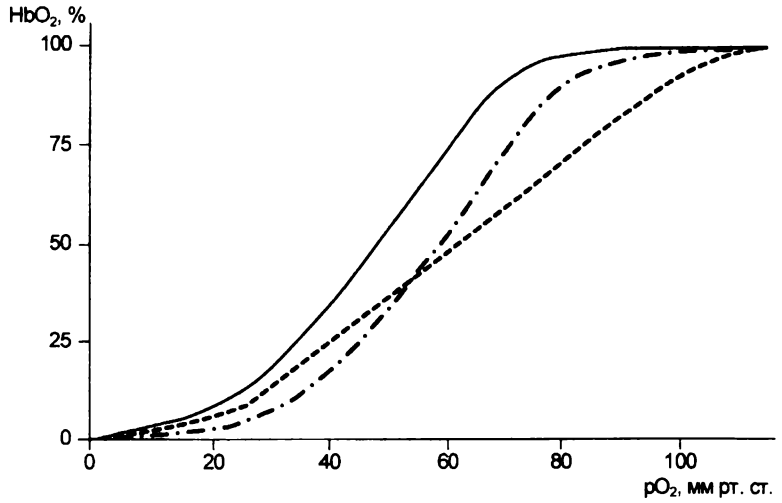


Рис. 29. Изменение кривой диссоциации HbO_2 при инкубации цельной крови с 1 мМ сукцината аммония в течение 20 мин (pH =7,4 при t = 37 °C):

---- кровь; —— кровь в присутствии сукцината аммония; —·— сдвиг при закислении среды (эффект Бора)

Интересно, что в условиях целостного организма в смешанной капиллярной крови при регистрации оксигемограммы мы обнаружили более высокую степень оксигенации гемоглобина у добровольцев через 15 мин после приема сукцината. Реографические исследования

показали, что после приема сукцината через 5–10 мин наблюдается улучшение венозного оттока. При этом обследуемые добровольцы отмечали преходящее ощущение притока крови к голове и мышцам и иногда гиперемию лица.

Возможно, именно лучшей перфузией мышц под влиянием сукцината и более эффективным вымыванием вследствие этого недоокисленных продуктов обусловлено повышение работоспособности во время интенсивных нагрузок. При этом в крови наблюдался более резкий сдвиг pH и увеличение концентрации молочной кислоты (лактата).

Таким образом, в действии экзогенного сукцината на уровне организма важным фактором может быть улучшение оксигенации тканей за счет лучшей микроциркуляции крови и облегчения дезоксигенации HbO_2, что способствует поддержанию окислительного фосфорилирования и уменьшению падения pH при интенсивных нагрузках.

6.2. Опосредованное катехоламинами действие сукцината на энергетический обмен

При обследовании спортсменов мы обнаружили, что несубстратные малые дозы сукцината аммония (2 мг на 1 кг массы тела) способствуют сохранению работоспособности при повторных предельных по мощности тестирующих нагрузках (второй день ВЭ тестирования после однократного приема сукцината аммония), увеличению концентрации лактата в крови и приросту отношения лактат/пируват. Эти факты могли быть обусловлены влиянием малых доз сукцината аммония на регуляторные нейроэндокринные механизмы (В. М. Дильман, В. Н. Анисимов, М. Н. Кондрашова, 1976; М. Н. Кондрашова, Е. И. Маевский, 1978; M. N. Kondrashova, E. I. Maevsky, I. B. Gusar et al., 1980), и прежде всего на катехоламиновую систему, способствующую мобилизации углеводов и активации гликолиза в мышцах. Для проверки этого предположения мы исследовали на добровольцах влияние сукцината на экскрецию катехоламинов с мочой.

Добровольцы – здоровые мужчины в возрасте 18–22 лет - принимали сукцинат аммония в виде водного раствора в двух дозах: 2 и 20 мг на 1 кг массы тела. У обследуемых определяли величину диуреза в течение 2 ч до приема сукцината аммония и через 2 ч после

приема препарата (табл. 25). Концентрацию катехоламинов определяли флуориметрически.

Таблица 25

Величина диуреза и экскреция с мочой адреналина и норадреналина у людей после приема разных количеств сукцината

№ п/п	Условия исследований	Диурез, мл		Концентрация адреналина, нмоль / мин		Концентрация норадреналина, нмоль / мин	
		исходный	через 2 ч	исходная	через 2 ч	исходная	через 2 ч
1	Покой (n = 5)	132±36	138±24	72,5± ±16,1	82,0± ±17,6	160,1± ±29,2	149,2± ±22,3
2	Прием 2 мг сукцината на 1 кг веса (n = 9)	111±18	182±22 $p_и < 0,05$	70,2± ±13,8	133,1± ±21,8 $p_и < 0,05$	132,4± ±24,8	217,3± ±21,1 $p_и < 0,01$ $p_1 < 0,05$
3	Прием 20 мг сукцината на 1 кг веса (n = 4)	175±34	110±17 $p_2 < 0,05$	79± ±11,4	55,2± ±15,3	186,3± ±28,9	140,3± ±20,6
4	Прием 20 мг сукцината на 1 кг веса (n = 5)	122±29	226±28 $p_и < 0,05$ $p_1 < 0,05$ $p_3 < 0,02$	81,7± ±12,7	174,2± ±37,7 $p_и < 0,01$ $p_3 < 0,05$	134,4± ±19,8	279,5± ±20,5 $p_и < 0,01$ $p_1 < 0,01$ $p_3 < 0,05$

Примечание. Цифровой индекс при p указывает группу, с которой проводится сравнение; $p_и$ – исходный уровень диуреза и концентрации катехоламинов.

Исследование уровня экскреции катехоламинов с мочой после приема сукцината аммония показало, что субстратные дозы сукцината (20 мг на 1 кг массы тела) неоднозначно влияют на диурез и экскрецию катехоламинов. У одних людей они вызывают активацию, а у других торможение диуреза и экскреции катехоламинов, особенно норадреналина. Мы разделили группу обследуемых по типу ответной реакции на сукцинат аммония. По крайней мере, в первом приближении можно отметить, что в случае исходно повышенного содержания в моче катехоламинов сукцинат подавляет диурез и экскрецию гормонов, а на фоне обычных показателей прием сукци-

ната способствовал повышению диуреза на 85% и в два раза увеличивал концентрацию адреналина и норадреналина в моче. Малые, несубстратные количества сукцината аммония (2 мг на 1 кг массы тела) оказывали только стимулирующее действие на диурез и выброс катехоламинов, что, по-видимому, отражало сигнальное, в данном случае активирующее, воздействие, которое не могло не сказываться на состоянии энергетического обмена организма.

6.3. Торможение β-адреноблокатором стимулирующего действия введенного животным сукцината на митохондриях печени

Для того чтобы определить, в какой мере воздействие экзогенного сукцината на энергетический обмен опосредовано катехоламиновой системой, мы попытались провести ингибиторный анализ с использованием β-адреноблокатора – пропранолола, выпускаемого в лекарственной форме под названием «обзидан». В качестве объекта исследований были взяты митохондрии печени крыс, получавших сукцинат аммония и обзидан (табл. 26). Выбор объекта исследования не был случайным: Ю. С. Ротенберг сообщил нам, что в ряде экспериментов он наблюдал, как сукцинат, введенный животным, вызывает стимуляцию дыхания митохондрий печени. Позже мы воспроизвели этот результат (E. I. Maevsky, I. G. Gusar, A. S. Rosenfeld et al., 1982).

Таблица 26

Дыхание митохондрий печени крыс, получавших сукцинат аммония или сукцинат аммония и обзидан

Номер группы	Условия исследования	V_3, нг-ат О / (мин · мг белка)	V_4, нг-атом О / (мин · мг белка)	ДК	АДФ/О	$V_ф$, нмоль / (мин · мг белка)
1	2	3	4	5	6	7
		Субстрат 10 мМ сукцината				
1	Покой (n = 5)	93±4,0	24±1,6	3,92±0,18	1,55±0,20	146±8,0
2	Введение сукцината (n = 5)	110±6,0 $p_1 < 0,05$	30±3,1	3,67±0,15	1,60±0,24	175±12,0

Окончание табл. 26

1	2	3	4	5	6	7
3	Введение обзидана и сукцината (n = 5)	90±5,0 $p_2 < 0,05$	23±1,3	3,89±0,20	1,57±0,19	141±8,0 $p_2 < 0,05$
Субстрат – 10 мМ β-оксибутирата						
1	Покой (n = 5)	42±2,4	12±0,8	3,50±0,16	2,49±0,21	104±8,0
2	Введение сукцината (n = 5)	52±3,0 p1 < 0,05	13±0,7	4,01±0,18	2,21±0,8	115±10
3	Введение обзидана и сукцината (n = 5)	44±2,5 p2 < 0,05	13±0,9	3,37±0,15 p2 < 0,05	2,08±0,19	92±8,0

Примечания:

1. Цифровые индексы при p указывают, с какой группой проводится сравнение.

2. V_3, V_4 – скорость дыхания в 3-м и 4-м метаболических состояниях по Чансу – Вильямсу; $V_ф$ – скорость фосфорилирования добавленного АДФ.

3. Среда выделения для митохондрий: 0,25 М сахарозы, 10 мМ трис-HCl буфер (pH = 7,4), 0,5 мМ ЭГТА; инкубационная среда: 150 мМ KCl, 10 мМ трис-HCl буфер (pH = 7,4), 1 мМ ЭГТА, 3 мМ KH_2PO_4, 1 мМ $MgSO_4$; добавки субстратов – по 10 мМ, АДФ – 150 мкМ.

Животным делали подкожную инъекцию обзидана в дозе 1 мг на 1 кг массы тела непосредственно перед введением в желудок раствора сукцината аммония в дозе 25 мг на 1 кг массы тела. Через 30 мин после введения препаратов животных забивали, выделяли митохондрии печени и определяли параметры фосфорилирующего дыхания митохондрий. Оказалось, что введение обзидана предотвращает активацию фосфорилирующего дыхания митохондрий печени, вызываемую введением сукцината.

Следовательно, в какой-то мере воздействие введенного в организм сукцината на энергетический обмен опосредовано катехоламинами.

Заключение

В условиях организма химические буферные системы обеспечивают стабильное поддержание pH, несмотря на то что их буферная емкость невелика. Если принять, что объем циркулирующей крови у взрослого человека равен 5 л, то при концентрации бикарбоната (основного щелочного эквивалента буферной системы плазмы крови) 25 мМ его общая буферная емкость не достигает 100 мМ, поскольку половину объема цельной крови занимают эритроциты. Для энергообеспечения субмаксимальной по мощности работы на уровне 300 Вт должное потребление кислорода составляет примерно 3 л, что при величине коэффициента АДФ/О, равном в среднем 2,5, эквивалентно расходу и воспроизводству 670 мМ АТФ. Учитывая, что при такой мощности кислородный долг составляет 50% от полной энергетической потребности, можно оценить количество АТФ, воспроизводимого «анаэробно» при субстратном фосфорилировании в реакциях гликолиза, что составляет 335 мМ. Соответственно 335 м-эквивалентов ионов водорода может поступить в кровоток. При буферной емкости плазмы крови, равной 100 мМ, ее полное исчерпание произошло бы за 20 с. Только благодаря тому, что химические буферы работают в открытой проточной системе в жесткой связке с физиологическими системами выведения кислотных эквивалентов и метаболическими процессами, обеспечивающими утилизацию ионов водорода (в реакциях окислительного фосфорилирования), окисление лактата до CO_2 (необходимого для воспроизводства бикарбоната) и включение его в глюконеогенез, возможно поддержание буферной емкости тканей и крови на весьма длительном промежутке времени даже при интенсивных АТФ-азных нагрузках.

Анализируя отдельные элементы этой системы, в общем виде представленной на рис. 30, мы предположили, что одним из узких мест, обладающим резервной (не используемой в полной мере) активностью является мощность митохондриальной системы энергообеспечения, поскольку у высокотренированных спортсменов системы выведения кислотных эквивалентов и доставки кислорода работают на близком к физиологическому пределу уровне. При достижении индивидуального предела доставки кислорода к работающим

скелетным мышцам развивается рабочая гипоксия и метаболический ацидоз.

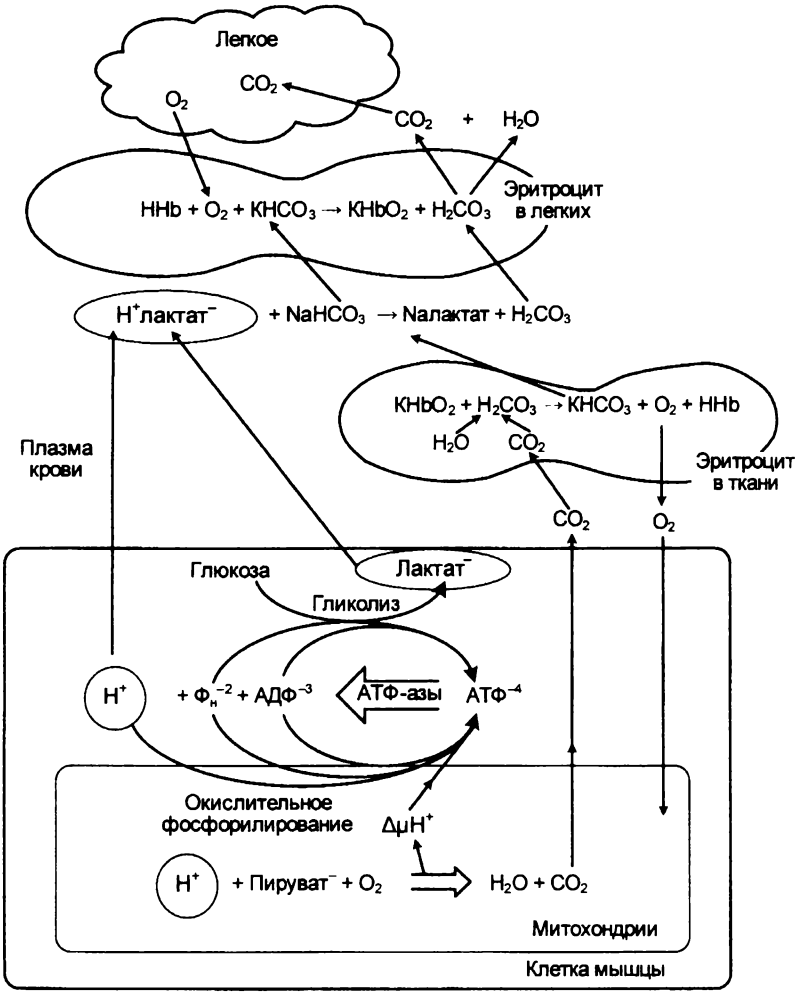


Рис. 30. Схема взаимодействия бикарбонатной буферной системы крови с «гемоглобиновым» буфером и системами тканевого энергообеспечения

Основной вопрос поддержания энергетики митохондрий в этой ситуации сводится к обеспечению их субстратом, способным окисляться в условиях гипоксии. Проведенное нами экспериментальное исследование подтвердило гипотезу о преимущественном окислении сукцината при кислородном дефиците. Именно поэтому в качестве средства метаболической коррекции ацидоза был использован сукцинат, окисляющийся в отличие от NAD-зависимых субстратов при высоком уровне NADH и поддерживающий тем самым воспроизведение АТФ в реакциях окислительного фосфорилирования в гипоксических условиях.

Увеличение вклада митохондрий в энергообеспечение сказывается на функционировании не только скелетных мышц, но и всех других тканей, в частности миокарда, печени и почек. При этом может увеличиваться ударный объем сердца за счет возрастания полноты расслабления миокарда во время диастолы (элемента, наиболее чувствительного к энергетическому дефициту) и повышаться минутный объем без возрастания частоты сердечных сокращений. На уровне печени и почек может существенно увеличиваться интенсивность глюконеогенеза. Кроме того, выяснилось, что даже несубстратные малые концентрации сукцината достаточны для того, чтобы вызвать сдвиг кривой диссоциации оксигемоглобина вправо, что способствует облегчению доставки кислорода и поддержанию бикарбонатной буферной системы эритроцита и плазмы крови. Одновременно происходит улучшение венозного оттока, поскольку сукцинат, по-видимому, обладает вазодиляторным действием. Таким образом, выбор сукцината в качестве средства метаболической коррекции ацидоза обеспечил более эффективное функционирование нескольких сопряженно работающих механизмов в открытой системе естественной коррекции метаболического ацидоза: увеличение вклада митохондрий в ресинтез АТФ – уменьшение количества ионов водорода, остающихся в цитозоле при работе АТФ-аз актомиозина и саркоплазматического ретикулума, улучшение работы всей сердечно-сосудистой системы как на центральном, так и на периферическом участках и дополнительное увеличение участия «гемоглобинового буфера» в доставке кислорода и в поддержании бикарбонатной буферной системы при явно лучших условиях для вовлечения недоокисленного лактата и других метаболитов в глюконеогенез.

В экспериментальном анализе необходимости и возможности поддержания митохондриального энергообеспечения мы исходили из гипотезы, которую в 1977 г. выдвинул W. Gevers, о том, что истоки метаболического ацидоза при любого вида АТФ-азной нагрузке кроются в недостаточной уборке ионов водорода, образующихся в АТФ-азных реакциях. Из теоретического анализа следовало, что развитие и глубина ацидоза зависят от того, какой энергетический источник, потребляющий протон или оставляющий его в среде, обеспечивает воспроизведение АТФ. Поскольку в ходе субстратного фосфорилирования используются только АДФ и неорганический фосфат, а при окислительном фосфорилировании наряду с этими субстратами происходит захват и ионов водорода, постольку работа, обеспечиваемая субстратным фосфорилированием, является причиной ацидоза. Опираясь на эту теорию, можно было конструктивно подойти к выработке методов коррекции ацидоза. Активация митохондриальной системы окислительного фосфорилирования могла бы препятствовать развитию избыточного накопления H^+, если бы была возможность избирательно активировать воспроизводство АТФ в дыхательной цепи митохондрий, минуя гликолиз.

Эти представления нуждались в экспериментальной проверке, которая ранее никем не была выполнена. Дело в том, что при анализе сложных объектов, в которых реакции потребления и воспроизводства АТФ жестко сопряжены, даже на уровне гомогената и тем более на уровне клеток и тканей любое торможение или нарушение процесса окислительного фосфорилирования приводило не только к торможению суммарного воспроизведения АТФ в митохондриях и в исследуемом тканевом препарате, но и к падению активности АТФ-потребляющих процессов. Это легко понять, исходя из закона действующих масс, который проявляется на уровне всех АТФ-аз: накопление АДФ, фосфата и ионов водорода тормозит гидролиз АТФ (В. И. Дещеревский, 1977). Кроме того, при этом компенсаторно включаются реакции гликолитической оксидоредукции, и в итоге выявить вклад собственно митохондрий в уборке H^+ казалось невозможным. Поэтому мы решили дополнить ингибиторный анализ моделированием (воспроизведением) квазистационарных АТФ-азных нагрузок в реконструированной системе. Простейшей системой является экзогенная (внешняя по отношению к митохондриям) АТФ-аза и изо-

лированные митохондрии. В качестве экзогенной АТФ-азы мы использовали в основном наиболее доступную глюкозо-гексокиназную систему. В нескольких экспериментах была проведена проверка основных закономерностей и с другими АТФ-азами, в частности с выделенным фактором F1 Н-АТФ-азы митохондрий. Этот же подход нам удалось использовать и на уровне гомогената. Причем на гомогенате сердца мы использовали наряду с экзогенными АТФ-азами активацию эндогенных АТФ-аз избытком ионов Mg^{2+}, не убирая при этом из инкубационной среды ионы Ca^{2+}, которые присутствовали в концентрации порядка 10^{-6} М. Таким образом, на начальной стадии, порядка одной минуты, при избытке добавленного АТФ удавалось достигать близких к стационарным активностей АТФ-аз.

На фоне таких АТФ-азных нагрузок был проведен ингибиторный анализ и сравнение «щелочной» буферной емкости реакций окислительного фосфорилирования при окислении самых разнообразных субстратов. С помощью малых концентраций ингибитора N-этилмалеимида удалось идентифицировать участок, непосредственно ответственный за уборку ионов водорода в виде переносчика ионов фосфата. Мы показали, что в полном соответствии с хемиосмотической теорией наиболее эффективно способствуют уборке ионов водорода, генерируемого экзогенными АТФ-азами, те субстраты, при окислении которых поддерживается максимальная скорость окислительного фосфорилирования. Таким субстратом оказался сукцинат. Именно поэтому в условиях деэнергизующего действия АТФ-аз весьма важным оказалось предотвращение ингибирования сукцинатдегидрогеназы. Наибольшая скорость уборки АТФ-азного H^+ наблюдалась при окислении сукцината в присутствии глутамата, снимающего щавелево-уксусное торможение СДГ.

Анализ экспериментальных данных, полученных на реконструированной системе «митохондрии – внешняя АТФ-аза», на гомогенате и на изолированном перфузируемом органе, позволил установить, что за счет внесения экзогенного энергетически высокоэффективного субстрата – сукцината – можно существенным образом активировать ресинтез АТФ в митохондриях, минуя гликолитическую оксидоредукцию.

В процессе проведения исследования нам удалось выявить признаки, позволяющие по кинетическим параметрам отличить окисле-

ние сукцината от окисления NAD-зависимых субстратов. Наиболее четким признаком является регистрация потребления кислорода с одновременной регистрацией продукции CO_2, образующегося при декарбоксилировании таких субстратов, как пируват, α-кетоглутарат и изоцитрат. Регистрируя изменение величины дыхательного коэффициента RQ как отношение $\Delta CO_2 / \Delta O_2$, мы показали прогрессивное падение этого параметра (теоретически равного нулю при окислении сукцината) при появлении малой примеси экзогенного или эндогенного сукцината в среде на фоне окисления избытка NAD-зависимого декарбоксилирующегося субстрата. Таким образом, были получены новые экспериментальные подтверждения развиваемого М. Н. Кондрашовой представления о монополизации сукцинатом дыхательной цепи митохондрий. Уменьшая оксигенацию инкубационной среды (снижение pO_2 со 150 до 25–30 мм рт ст.), мы обнаружили, что даже такое ограничение доступности кислорода (далекое от K_m для цитохромоксидазы) достаточно для того, чтобы изменились константы сродства оксидазной системы митохондрий к пирувату и сукцинату в сторону преимущества последнего.

Таким образом, выполненные in vitro экспериментальные исследования позволили прийти к четкому заключению о перспективности использования сукцината для активации фосфорилирующего дыхания митохондрий с целью уборки ионов водорода, образующихся при АТФ-азных нагрузках. В пользу выбора сукцината свидетельствовали как его высокая энергетическая эффективность, так и кинетические преимущества перед NAD-зависимыми субстратами, особенно значимые при ограничении доступности кислорода, что соответствует, на наш взгляд, так называемой рабочей гипоксии, неизбежно развивающейся при интенсивных нагрузках на уровне ткани и организма.

При переходе к уровню целостного организма удалось решить один из ключевых вопросов: может ли экзогенный сукцинат, поступивший в организм через желудочно-кишечный тракт, вступать в метаболические превращения. С помощью сукцината, меченного по углероду (в экспериментах на животных использовался радиоактивный изотоп ^{14}C, в исследованиях на добровольцах – нерадиоактивный стабильный изотоп ^{13}C), мы показали, что сукцинат окисляется до углекислого газа быстрее, чем глюкоза, поскольку в отличие от глюкозы он не откладывается в депо, а сразу включается в метаболичес-

кие превращения. Скорость включения метки в выдыхаемую углекислоту шестикратно возрастает при физической нагрузке. Причем метка обнаруживается практически во всех тканях и ее содержание в 2 раза уменьшается на фоне многократной активации окисления во время нагрузки.

Последующие испытания антиацидотической активности экзогенного сукцината на животных и при обследовании добровольцев, в том числе спортсменов, позволили установить, что «митохондриальный подход» оказался перспективным на уровне целостного организма, хотя конкретные механизмы влияния экзогенного сукцината в условиях организма, очевидно, намного богаче и разнообразнее. В частности, наряду с субстратным действием сукцината не исключено и его регуляторно-сигнальное воздействие на различные системы доставки кислорода и гормональной регуляции энергетического обмена.

Нами показано, что экзогенный сукцинат оказался наиболее эффективным средством коррекции метаболического ацидоза. Причем в условиях смешанного анаэробно-аэробного энергообеспечения при субмаксимальных физических нагрузках прием сукцината способствует увеличению доли аэробных окислительных процессов и тем самым существенно уменьшает глубину постнагрузочного ацидоза. При максимально возможных нагрузках (до отказа) открывается, возможно, более важное сигнальное и регуляторное воздействие сукцината, которое проявляется в стимуляции, как мы полагаем, активного вымывания из работающих мышц недоокисленных продуктов. Благодаря этому спортсмены способны выполнять работу большей мощности на фоне нарастающего в крови метаболического ацидоза. Следует особо отметить, что данные, полученные in vitro, и исследования, выполненные на животных и добровольцах, выявили особенно высокую противоацидотическую эффективность сукцината аммония как при АТФ-азных нагрузках, так и при физической работе. Полученные результаты легли в основу создания нового актопротектора, выпускаемого с 2000 г. под названием «Энерлит», в состав которого входит в качестве действующей субстанции сукцинат аммония.

Библиографический список

Агапов Ю. Я. Кислотно-щелочной баланс. М.: Медицина, 1968. 180 с.

Алексеев М. Ю. Влияние тренинга, характера физических нагрузок и биологически активных веществ на динамику процессов восстановления после мышечной работы у лошадей: Дис. ... канд. биол. наук. Бобровск, 1977. 140 с.

Ашмарин И. П., Стукалов П. В., Ещенко Н. Д. Биохимия мозга. СПб.: Изд-во С.-Петерб. гос. ун-та, 1999. 328 с.

Барбашова З. И. Акклиматизация к гипоксии и физиологические механизмы. Л.: Наука, 1960. 320 с.

Бегшоу К. Мышечное сокращение. М.: Мир, 1985. 115 с.

Благовещенский А. В. Теоретические основы действия янтарной кислоты на растения. М.: Наука, 1968. 218 с.

Бобков Ю. Г., Виноградов В. М., Катков В. Ф. и др. Фармакологическая коррекция утомления. М.: Медицина, 1984. 208 с.

Болдырев А. А. Биохимические аспекты электромеханического сопряжения. М.: Изд-во Моск. ун-та, 1977. 208 с.

Бонензак Р., Сельков Е. Е. Изучение регуляторных процессов в цикле трикарбоновых кислот с помощью простых математических моделей // Цикл трикарбоновых кислот и механизмы его регуляции. М., 1977. С. 27–28.

Борзов Д. Б., Маевский Е. И. Окисляющее действие янтарной кислоты на пиридиннуклеотиды митохондрий печени крыс при заторможенной дыхательной цепи // Окислительные ферменты животной клетки и регуляция их активности. Горький, 1978. С. 38–39.

Брода А. Эволюция энергетического обмена. М.: Мир, 1980. 287 с.

Брустовецкий Н. Н., Амерханов З. Г., Гришина Е. В. и др. Влияние тоничности среды на скорость дыхания и окислительное фосфорилирование в митохондриях печени активных и гибернирующих сусликов // Биохимия. 1990. Т. 55, вып. 2. С. 201–209.

Брустовецкий Н. Н., Гришина Е. В., Амерханов З. Г. и др. Интенсивность окислительного фосфорилирования и состояние аденилатной системы в митохондриях печени активных и гибернирующих

сусликов Citellus undulatus // Эволюц. биохимия и физиология. 1989. Т. 5, вып. 4. С. 448–453.

Брустовецкий Н. Н., Гришина Е. В., Маевский Е. И. Индуцированная свободными жирными кислотами натрий-зависимая активация дыхания изолированных кардиомиоцитов крысы // Тез. докл. VI Всесоюз. конф. по биохимии мышц. Тбилиси, 1989. С. 27–28.

Брустовецкий Н. Н., Гришина Е. В., Маевский Е. И. и др. Активность фосфолипазы А определяет скорость дыхания митохондрий зимнеспящих животных // Бюл. эксперим. биологии и медицины. 1989. Т. 108, № 10. С. 488–490.

Брустовецкий Н. Н., Маевский Е. И. Регуляция степени сопряженности окисления и фосфорилирования в митохондриях печени крысы // Молекулярные механизмы и регуляция энергетического обмена: Материалы Всесоюз. симпоз. Пущино, 1986. С. 78–80.

Брустовецкий Н. Н., Маевский Е. И., Данилова Л. С. и др. Изменения эффективности окислительного фосфорилирования, скорости дыхания и транспорта ионов Ca^{++} в митохондриях печени крыс и сусликов при различных уровнях термогенеза // Докл. АН СССР. 1984. Т. 276, № 5. С. 1260–1263.

Виноградов А. Д. Измерение активности сукцинатдегидрогеназы // Реакции живых систем и состояние энергетического обмена: Материалы Всесоюз. симпоз. Пущино, 1979. С. 98–125.

Виноградов А. Д. Ингибирование окисления янтарной кислоты оксалоацетатом // Биохимия. 1967. Т. 32, вып. 6. С. 1271–1277.

Виноградов А. Д., Кондрашова М. Н. Колебательный характер установления стационарной концентрации пиридиннуклеотидов в митохондриях при переходе от активного дыхания к состоянию покоя // Колебательные процессы в биологических и химических системах. М., 1967. С. 122–127.

Волков М. С., Генкин А. М., Маевский Е. И. и др. Глутаминовая кислота: биохимическое обоснование практического использования. Свердловск: Сред.-Урал. кн. изд-во, 1975. 119 с.

Волков Н. И. Энергетический обмен и работоспособность человека в условиях напряженной мышечной деятельности: Дис. ... канд. биол. наук. М., 1969. 156 с.

Вольский Г. Г., Осадчая Л. М. О характере и особенностях регуляции сукцинатдегидрогеназы глюкокортикоидами // Митохондрии: Транспорт электронов и преобразование энергии. М., 1976. С. 164–168.

Воркель Р. И. Изменение кислотно-щелочного равновесия крови у спортсменов при физических нагрузках различного характера и использование его параметров в оценке состояния тренированности: Дис. ... канд. биол. наук. М., 1974. 147 с.

Генкин А. М., Глотов Н. А., Маевский Е. И. Влияние острой гипоксии и введения глутамата натрия на реакции дыхательной цепи митохондрий некоторых органов // Митохондрии: Биохимия и ультраструктура. М., 1973. С. 82–84.

Генкин А. М., Удинцев Н. А. Влияние глутаминовой кислоты на некоторые обменные процессы в условиях гипоксии и физической работы // Бюл. эксперим. биологии и медицины. 1959. Т. 7. С. 56–58.

Гиммерих Ф. И. О регулировании отдачи кислорода эритроцитами // Кислородный режим организма и его регулирование. Киев, 1966. С. 134–141.

Глотов Н. А. Окислительные процессы в митохондриях при гипоксии и их коррекция глутаминовой кислотой: Дис. ... д-ра мед. наук. Свердловск, 1973. 389 с.

Голлник Ф. Д., Германсен Л. Биохимическая адаптация к упражнениям: анаэробный метаболизм // Наука и спорт. Л., 1982. С. 24–59.

Деркачев Э. Ф., Алексеев В. А., Константинов М. Р. и др. Регуляторные изменения метаболических путей митохондрий и цитозоля // Митохондрии: Транспорт электронов и преобразование энергии. М., 1976. С. 136–155.

Дещеревский В. И. Математические модели мышечного сокращения. М.: Наука, 1977. 160 с.

Дильман В. М., Анисимов В. Н., Кондрашова М. Н. Влияние янтарной, глутаминовой кислот, димедрола и пропранолола на чувствительность гипоталамо-гонадотропной системы старых крыс к тормозящему действию эстрогенов // Терапевтическое действие янтарной кислоты. Пущино, 1976. С. 208–214.

Дынник В. В. Адаптация энергетического метаболизма к увеличению активности АТФ-азы // Математическое моделирование биологических процессов. М., 1978. С. 121–143.

Дынник В. В. Регуляция цикла Кребса адениловыми нуклеотидами в модельных условиях // Метаболическая регуляция физиологического состояния. Пущино, 1984. С. 15–18.

Дынник В. В. Регуляция цикла трикарбоновых кислот адениновыми и пиридиновыми нуклеотидами // Цикл трикарбоновых кислот и механизмы его регуляции. М., 1977. С. 42–43.

Дынник В. В., Маевский Е. И. Регуляция энергетического метаболизма мышц на увеличение активности АТФ-азы: Математическая модель // Математическое моделирование биологических процессов. М., 1979. С. 52–70.

Дынник В. В., Сельков Е. Е. Регуляция энергетического метаболизма и физиологического состояния организма / Под ред. М. Н. Кондрашовой. М., 1978. С. 51–66.

Дынник В. В., Темнов А. В. Математическая модель окисления пирувата в митохондриях печени. Регуляция цикла Кребса адениловыми и пиридиновыми нуклеотидами // Биохимия. 1977. Т. 42, вып. 6. С. 1030–1044.

Евтодиенко Ю. В. Механизмы и регуляция транспорта ионов в митохондриях: Дис. ...д-ра биол. наук. Пущино, 1979. 298 с.

Иванов К. П. Основы энергетики организма: Теоретические и практические аспекты: В 2 т. Т. 1. Л.: Наука, 1990. 307 с.

Иванов К. П. Основы энергетики организма: Теоретические и практические аспекты: В 2 т. Т. 2. СПб.: Наука, 1993. 272 с.

Изаков В. Я., Иткин Г. П., Мархасин В. С. и др. Биомеханика сердечной мышцы. М.: Наука, 1981. 325 с.

Каминский Ю. Г. Флуориметрическое и фотометрическое исследование митохондрий при транспорте ионов: Автореф. дис. ... канд. биол. наук. Пущино, 1973. 22 с.

Каминский Ю. Г., Косенко Е. А., Кондрашова М. Н. Обмен адениннуклеотидов в печени старой крысы при голодании и введении солей янтарной кислоты // Биохимия. 1982. Т. 47, вып. 4. С. 654–659.

Квартовкина Л. К., Минх А. А. О качественной ориентации в питании спортсменов // Актуальные вопросы гигиены физических упражнений и спорта. М., 1968. С. 56–59.

Ким Н. П. Регуляция энергетического обмена в миокарде с помощью комбинации глюкозы, лактата и сукцината: Автореф. дис. ... канд. биол. наук. М., 1987. 21 с.

Ким Н. П., Маевский Е. И., Овчинников И. В. и др. Регуляция энергетического обмена в гомогенате миокарда с помощью сочетания глюкозы, лактата и сукцината // Янтарная кислота в медицине, пищевой промышленности, сельском хозяйстве / Под ред. М. Н. Кондрашовой и др. Пущино, 1996. С. 106–113.

Кондрашова М. Н. Биохимический цикл возбуждения // Митохондрии: Ферментативные процессы и их регуляции. М., 1968. С. 121–131.

Кондрашова М. Н. Введение // Регуляция энергетического обмена и устойчивость организма. Пущино, 1975. С. 3–21.

Кондрашова М. Н. Введение // Терапевтическое действие янтарной кислоты / Под ред. М. Н. Кондрашовой. Пущино, 1976. С. 6–14 с.

Кондрашова М. Н. Введение // Янтарная кислота в медицине, пищевой промышленности, сельском хозяйстве / Под ред. М. Н. Кондрашовой. М., 1996. С. 8–16.

Кондрашова М. Н. Взаимодействие процессов переаминирования и окисления карбоновых кислот при разных функциональных состояниях ткани // Биохимия. 1991. Т. 56, вып. 3. С. 388–405.

Кондрашова М. Н. Предпосылки к проверке предположения о специфической роли янтарной кислоты в обеспечении энергией восстановительных процессов после рабочего акта (при физиологическом торможении). М., 1969. 12 с. Деп. ВИНИТИ, № 431–69.

Кондрашова М. Н. Роль янтарной кислоты в регуляции физиологического состояния ткани: Дис. ... д-ра биол. наук. Пущино, 1970. 314 с.

Кондрашова М. Н., Маевский Е. И. Взаимодействие гормональной и митохондриальной регуляции // Регуляция энергетического обмена и физиологическое состояние организма / Под ред. М. Н. Кондрашовой. М., 1978. С. 217–229.

Кондрашова М. Н., Маевский Е. И. Переменное использование углеводов и липидов как форма регуляции физиологического состояния // Регуляция энергетического обмена и физиологическое состояние организма / Под ред. М. Н. Кондрашовой. М., 1978. С. 5–14.

Кондрашова М. Н., Маевский Е. И., Бабаян Г. В. Адаптация к гипоксии посредством переключения метаболизма на превращении янтарной кислоты // Митохондрии: Биохимия и ультраструктура. М., 1973. С. 112–129.

Кондрашова М. Н., Чаговец Н. Р. Янтарная кислота в скелетных мышцах при интенсивной деятельности и в период отдыха // Докл. АН СССР. 1971. Т. 198, № 1. С. 243–246.

Косенко Е. А., Каминский Ю. Г., Кондрашова М. Н. Некоторые данные об окислении янтарной кислоты в препаратах животных и о действии сукцината аммония на животных, представляющие общий интерес // Янтарная кислота в медицине, пищевой промышленности и сельском хозяйстве. Пущино, 1996. С. 27–34.

Красинская И. П., Литвинов И. С., Захаров С. Д. и др. Два качественно различных структурно-функциональных состояния митохондрий // Биохимия. 1989. Т. 54, вып. 9. С. 1550–1556.

Краснова А. Ф., Чаговец Н. Р. Влияние приема солодового экстракта на биохимические изменения в крови спортсменов при выполнении работы различного характера // Вопр. питания. 1962. № 20. С. 37–44.

Кребс Г. А., Корнберг Г. Л. Превращение энергии в живых системах. М.: Изд-во иностр. лит., 1959. 137 с.

Кулинский В. И., Воробьева В. М., Труфанова Л. В. Влияние катехоламинов на дыхание и NAD-зависимую изоцитратдегидрогеназу митохондрий печени // Митохондрии: Аккумуляция энергии и регуляция ферментативных процессов. М., 1977. С. 12–18.

Курганов Б. И. Коферментная и регуляторная функция никотинамидадениннуклеотидов: Кинетический аспект // Коферменты. М., 1973. С. 82–116.

Лабори А. Регуляция обменных процессов: Пер. с фр. М.: Медицина, 1970. 383 с.

Ленинджер А. Л. Биохимия. М.: Мир, 1974. 996 с.

Лукьянова Л. Д. Биоэнергетическая гипоксия: понятие, механизмы и способы коррекции // Бюл. эксперим. биологии и медицины. 1997. Т. 124, № 9. С. 244–254.

Лукьянова Л. Д., Балмуханов Б. С., Уголев А. Т. Кислородзависимые процесы в клетке и ее функциональное состояние. М.: Наука, 1982. 301 с.

Лукьянова Л. Д., Уголев А. Т., Харадуров С. В. и др. Роль янтарной кислоты во взаимодействии работы дыхательной цепи и системы микросомального окисления ксенобиотиков при различных значениях pO_2 // Митохондриальные процессы во временной организации жизнедеятельности. Пущино, 1978. С. 14–20.

Маевский Е. И. Влияние гипоксии и глутамата на реакции дыхательной цепи митохондрий некоторых органов: Дис. ... канд. мед. наук. Свердловск, 1971. 244 с.

Маевский Е. И., Гришина Е. В., Окон М. С. и др. Анаэробное образование сукцината и ресинтез АТФ в митохондриях тканей крыс // Фармакологическая коррекция гипоксических состояний / Под ред. Л. Д. Лукьяновой. М., 1989. С. 80–86.

Маевский Е. И., Гришина Е. В., Окон М. С. и др. Сравнительная оценка энергетического вклада анаэробного образования сукцината из различных субстратов в митохондриях печени // Янтарная кислота в медицине, пищевой промышленности и сельском хозяйстве. Пущино, 1996. С. 42–51.

Маевский Е. И., Гришина Е. В., Розенфельд А. С. и др. Анаэробное образование сукцината и облегчение его окисления – возможные механизмы адаптации клетки к кислородному голоданию // Биофизика. 2000. Т. 45, № 3. С. 509–513.

Маевский Е. И., Гришина Е. В., Розенфельд А. С. и др. Сукцинат – продукт анаэробных превращений и гипоксический субстрат // Гипоксия: механизмы, адаптация, коррекция: Материалы Второй Всерос. конф., Москва, 5–7 окт. М., 1999. С. 43–44.

Маевский Е. И., Розенфельд А. С., Вазагашвили М. В. и др. Возможность окисления введенной янтарной кислоты в условиях организма // Янтарная кислота в медицине, пищевой промышленности и сельском хозяйстве. Пущино, 1996. С. 52–57.

Маевский Е. И., Розенфельд А. С., Гришина Е. В. Особенности окисления и образования сукцината в митохондриях животных при гипоксии и аноксии // Клинические и патогенетические проблемы нарушений клеточной энергетики: митохондриальная патология: Материалы Первой Всерос. конф., Москва, 17–18 нояб. 1999 г. М., 1999. С. 38–39.

Майстер А. Биохимия аминокислот. М.: Изд-во иностр. лит. 1961. 439 с.

Маркарян Э. В. Фосфорилирование АДФ при окислении разных субстратов митохондриями и тканями // Митохондрии: Структура и функции в норме и патологии. М., 1971. С. 173–176.

Маршак М. Е. Физиологическое значение углекислоты. М.: Медицина, 1969. 143 с.

Машковский Н. Д. Лекарственные средства: Пособие для врачей: В 2 т. 13-е изд. Харьков: Торсинг, 1998. Т. 1. 543 с.

Митин К. С. Структура митохондрий в норме и патологии // Митохондрии: Биохимия и морфология. М., 1967. С. 98–106.

Мусил Я., Новакова О., Кунц К. Современная биохимия в схемах: Пер. с англ. 2-е изд. М.: Мир, 1984. 215 с.

Науменко Р. Г. Оценка показателей кислотно-щелочного равновесия, аэробной и анаэробной работоспособности как критериев двигательной активности юных спортсменов // Медицинские проблемы физической культуры. М., 1976. Вып. 5. С. 61–65.

Нейгел Ф. Дж. Физиологическая оценка максимальной физической работоспособности // Наука и спорт: Пер. с англ. М., 1982. С. 90–118.

Окон Е. Б. Окислительно-восстановительные реакции сопряженной дыхательной цепи при обратном переносе электронов и блокировании ротенончувствительной области: Дис. ... канд. биол. наук. Пущино, 1977. 184 с.

Пандов Х. И. Физиология почек // Болезни почек. София, 1969. 559 с.

Пасынский А. Г. Биофизическая химия. М.: Высш. шк., 1968. 432 с.

Писаренко О. И., Соломатина Е. С., Студнева И. М. Взаимосвязь между содержанием глутамата и адениннуклеотидов в митохондриях сердца при гипоксии // Биохимия. 1987. Т. 52, вып. 4. С. 543–548.

Писаренко О. И., Хлопков В. Н., Рууге Э. К. Изучение методом ЯМР образования сукцината из экзогенных предшественников в неаэрируемых митохондриях сердца крысы // Биохимия. 1986. Т. 51. С. 1174–1179.

Правосудов В. П. Влияние приема глюкозы на сердечную деятельность при выполнении физических нагрузок // Актуальные вопросы гигиены физических упражнений и спорта. М., 1968. С. 62–65.

Регуляция энергетического обмена и устойчивость организма / Под ред. М. Н. Кондрашовой. Пущино, 1975. 317 с.

Робинсон Дж. Р. Основы регуляции кислотно-щелочного равновесия. М.: Медицина, 1969. 89 с.

Родионова М. А., Войцтчак А. Б., Войцтчак Л. К. Регуляция метаболизма пировиноградой кислоты, олеиновой кислоты в митохондриях печени крысы // Митохондрии: Биохимия и ультраструктура. М., 1973. С. 143–151.

Розенфельд А. С. Регуляция сукцинатом вклада митохондрий в поддержание pH при АТФ-азных нагрузках: Дис. ... канд. биол. наук. Пущино, 1983. 145 с.

Рэкер Э. Биоэнергетические механизмы. М.: Мир, 1967. 291 с.

Сакс В. А., Люлина В. Н., Черноусова Г. Б. Изучение роли митохондриального изофермента креотинфосфокиназы (ЕС 2.7.3.2) в процессе переноса энергии в сердечных клетках // Кардиология. 1975. Т. 14. С. 103–111.

Скулачев В. П. Рассказы о биоэнергетике. М.: Мол. гвардия, 1982. 243 с.

Сучков А. В., Панюшкин В. В., Португалов С. Н. Влияние янтарной кислоты и ее солей на физическую работоспособность мышей BALB/C // Янтарная кислота в медицине, пищевой промышленности, сельском хозяйстве. Пущино, 1997. С. 195–200.

Уайт А., Хендлер Ф., Смит Э. и др. Основы биохимии. М.: Мир, 1981. 560 с.

Уэбб Л. Ингибиторы ферментов и метаболизма. М.: Мир, 1966. 862 с.

Уэст Дж. Физиология дыхания. Основы: Пер. с англ. М.: Мир, 1988. 200 с.

Фомин Н. А. Физиология человека. М.: Просвещение; Владос, 1995. 416 с.

Холлоши Д. О. Биохимическая адаптация к физической нагрузке: аэробный метаболизм // Наука и спорт: Пер. с англ. М., 1982. С. 60–89.

Хочачка П., Сомеро Дж. Биохимическая адаптация. М.: Мир, 1988. 568 с.

Хочачка П., Сомеро Дж. Стратегия биохимической адаптации. М.: Мир, 1977. 398 с.

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

Четверикова Е. П. Креатинкиназная система мышцы (свойства, регуляция и взаимодействие с другими ферментными системами): Дис. ... д-ра биол. наук. Пущино, 1975. 443 с.

Шик Л. Л. О внешнем дыхании здорового и больного человека // Современные проблемы биохимии дыхания и клиника. Иваново, 1970. Т. 2. С. 3–4.

Шноль С. Э. Физико-химические факторы биологической эволюции. М.: Наука, 1979. 262 с.

Шольц К. Ф. Транспорт субстратов в митохондриях // Успехи биол. химии. 1994. Т. 34. С. 167–183.

Эльвейм Ц. А. Историческое введение // Дыхательные ферменты. М., 1952. С. 7–30.

Эпштейн И. М. Изучение факторов кинетики обмена кислорода в тканях организма // Полярографическое определение кислорода в организме. М., 1977. С. 175–201.

Яковлев Н. Н. Биохимия движений: Молекулярные основы мышечной деятельности. Л.: Просвещение, 1983. 189 с.

Яковлев Н. Н. Биохимия спорта. М.: Физкультура и спорт, 1974. 286 с.

Яковлев Н. Н. Биохимическая основа утомления и его значение в спортивной практике // Теория и практика физической культуры. 1978. № 7. С. 19–21.

Яковлев Н. Н. Биохимические механизмы адаптации скелетных мышц к повышенной активности // Укр. биохим. журн. 1976. Т. 48, № 3. С. 388–398.

Яковлев Н. Н. Пути повышения работоспособности велосипедистов // Велосипедный спорт. М., 1959. С. 156–162.

Aalkjaer C., Peng H. L. PH and smooth muscle // Acta Physiol. Scand. 1997. 161 (4). 557–566.

Adler S. The role of pH, pCO_2 and bicarbonate in regulating rat diaphragm citrate content // J. Clin. Invest. 1970. 49. 1647–1655.

Alberty R. A. Standard Gibbs Free Energy, Enthalpy, and Entropy Changes as a Function of pH and pMq for Several Reactions Involving Adenosine Phosphates // J. Biol. Chem. 1969. 25. 3290–3302.

Alpern R. J., Sakhaee K. The clinical spectrum of chronic metabolic acidosis: homeostatic mechanisms produce significant morbidity // Am. J. Kidney. Dis. 1997. 29 (2). 291–302.

Aronson P. S., Boron W. F. (ed). Na^+-H^+ exchange, intracellular pH and cell function // Current Topics in Membranes and Transport. Orlando, 1986. Vol. 26. 315 p.

Bangsbo J., Johansen L., Graham T. et al. Lactate and H^+ effluxes from human skeletal muscles during intense, dynamic exercise // J. Physiol. 1993. 462. 115–133.

Bate-Smth E. C. The buffering of muscle in rigor; protein, phosphate and carnosine // J. Physiol. 1938. 92. 336–343.

Becker L. B., van den Hoek T. L., Shao Z. H. et al. Generation of superoxide in cardiomyocytes during ischemia before reperfusion // Am. J. Physiol. 1999. 277 (6 Pt. 2). 2240–2246.

Behm D. G., St-Pierre D. M. The effects of strength training and disuse on the mechanisms of fatigue // Sports. Med. 1998. 25 (3). 173–89.

Belcastro A. N., Albisser T. A., Littlejohn B. Role of calcium-activated neutral protease (calpain) with diet and exercise // Can. J. Appl. Physiol. 1996. 21 (5). 328–46.

Benade A. J. S., Jansen C. R., Rogers G. G. et al. The significance of an increased R. Q. after sucrose ingestion during prolonged aerobic exercise // Pfluegers Arch. 1973. 342, 3. 199–206.

Bergmeyer H. U. Methods of Enzymatic Analysis // Third edition. Weiheim, 1987. Vol. 6–7.

Bergstroem J., Fuerst P., Gellyas F. et al. Aspects of fructose metabolism in normal man // Acta med. scand. 1972. 542. 57–64.

Bernardi P. Mitochondrial transport of cations: channels, exchangers and ermeability transition // Physiol. Rev. 1999. 79 (4). 1127–55.

Bernardi P., Scorrano L., Colonna R. et al. Mitochondria and cell death. Mechanistic aspects and methodological issues // Eur. J. Biochem. 1999. 264 (3). 687–701.

Bettice J. A., Camble J. L. Skeletal of acute metabolis acidosis // Amer. J. Physiol. 1975. 229, 6. 1618–1624.

Bettice J. A., Wang B. C., Brown E. B. Jr. Intracellular buffering of heart and skeletal muscles during the onset of hypercapnia // Respir. Physiol. 1976. 28 (1). 89–98.

Bishopric N. H., Discher D. J., Kaiser S. et al. Hypoxia-activated apoptosis of cardiac myocytes requires reoxygenation or a pH shift and is independent of p53 // J. Clin. Invest. 1999. 104, 3. 239–252.

Boehme G., Hartung K. J., Kunz W. Role of Anion translocation in regulation of oxidative phosphorylation // Bioenergetics at mitochondrial and cellular levels. Warszawa, 1978. P. 79–102.

Bollaert P. E., Robin-Lherbier B., Mallie J. P. et al. Effects of sodium bicarbonate on striated muscle metabolism and intracellular pH during endotoxic shock // Shock. 1994. 12 (3). 196–200.

Bonventre J. V., Cheung J. Y. Effects of metabolic acidosis on viability of cells exposed to anoxia // Am. J. Physiol. 1985. 249 (1 Pt. 1). 149–159.

Brand M. D., Lehninger A. L. H^+/ATP ratio during ATP hydrolysis by mitochondria: Modification of the chemiosmotic theory // Proc. Nath. Acad. Sci. USA. 1977. 74, 5. 1955–1959.

Brouns F., van der Vusse G. J. Utilization of lipids during exercise in human subjects: metabolic and dietary constraints // Br. J. Nutr. 1998. 79 (2). 117–28.

Brooks G. A., Brown M. A., Butz C. E. et al. Cardiac and skeletal muscle mitochondria have a monocarboxylate transporter MCT1 // J. Appl. Physiol. 1999. 87 (5). 1713–1718.

Brustovetsky N., Klingenberg M. Mitochondrial ADP/ATP carrier can be reversibly converted into a large channel by Ca2+ // Biochemistry. 1996. 2, 35 (26). 8483–8488.

Brustovetsky N. N., Mayevsky E. I. Regulation of the degree of coupling of oxidation with phosphorylation in rat liver mitochondria: relation to thermogenesis // 1V Europ. Bioenerg. Conf.: Ann. Acad. Med. Singapore: Short Reports. Singapore, 1986. Vol. 4. 381 p.

Brustovetsky N. N., Maevsky E. I., Kolaeva S. G. et al. Role of the Ca cycle in uncoupling of oxidative phosphorylation in livermitochondriaof cold-acclimated rats // Comp. Biochem. Physiol. 1985. 82, 3. 545–547.

Burnell J. M. In vivo response of muscle to changes in CO_2 tension or extracellular bicarbonate // Am. J. Physiol. 1968. 215. 1376–1383.

Chance B. The mitochondrial permeability transition and the calcium, oxygen and pH paradoxes: one paradox after another // Energy-linked functions of mitochondria. N. Y., 1968. P. 253.

Chance B., Hollunger G. Mitochondria-mediated cell injury: Symposium overview // J. Biol. Chem. 1961. 236, 5. 1534–1584.

Chance B., Williams G. R. Respiratory enzymes in oxidative phosphorylation // J. Biol. Chem. 1955. 217, 1. 383–451.

Chance E. M., Chance B. Oxygen delivery to tissue: calculation of oxygen gradients in the cardiac cell // Adv. Exp. Med. Biol. 1988. 222. 69–75.

Chaplain R. A. Indication for an Allosteric Effect of Adenosine Diphosphate in Actomyosin gels from Insect Fibrillar Flight Muscle // Arch. Biochem. Biophys. 1966. 115. 450–461.

Chin E. R., Lindinger M. I., Heigenhauser G. J. Lactate metabolism in inactive skeletal muscle during lactacidosis // Am. J. Physiol. 1991. 261 (1 Pt. 2). 98–105.

Chirtel S. J., Barbee R. W., Stainsby W. N. Net O_2, CO_2, lactate and acid exchange by muscle during progressive working contractions // J. Appl. Physiol. 1984. 56 (1). 161–165.

Clancy R. L., Brown E. B. Jr. In vivo CO_2 buffer curves of skeletal and cardiac muscle // Am. J. Physiol. 1966. 211. 1309–1312.

Clarkson P. M. Effects of exercise on chromium levels. Is supplementation required? // Sports Med. 1997. 23 (6). 341–349.

Costill D. L., Bennett A., Branam G. et al. Glucose ingestion at rest and during prolonged exercise // J. Appl. Physiol. 1973. 34, 5. 764–769.

Crompton M. Mitochondrial intermembrane junctional complexes and their role in cell death // J. Physiol. 2000. 15, 529 (1). 11–21.

Crompton M. The mitochondrial permeability transition pore and its role in cell death // Biochem. J. 1999. 15, 341 (2). 233–249.

Danforth W. H. Activation of glycolytic pathway in muscle // Control of Energy Metabolism. N. Y., 1965. P. 287–297.

Davis E. J. On the nature of malonate-insensitive oxidation of pyruvate and glutamate by heart sarcosomes // Bioch. Biophys. Acta. 1968. 162, 1. 1–10.

Di Lisa F., Menabo R., Canton M. et al. The role of mitochondria in the salvage and the injury of the ischemic myocardium // Biochim. Biophys. Acta. 1998. 10, 1366 (1–2). 69–78.

Drewnowska K., Schoolwerth A. C. Stimulatory effect of calcium on metabolism and its sensitivity to pH in kidney mitochondria // Am. J. Physiol. 1994. 267 (1 Pt. 2). 153–159.

Drummond G. I., Harwood J. P., Powell C. A. Studies on the Activation of Phosphorylase in Skeletal Muscle by contraction and by Epinephrine // J. Biol. Chem. 1969. 244. 4235–4240.

Eckel R. E., Botschner A. W., Wood D. H. The pH of K-deficient muscle // Am. J. Physiol. 1959. 196. 811–818.

Enger E. A. Cellular metabolic response to regional hypotension and complete ischemia in surgery. Clinical and experimental studies // Acta. Chir. Scand. 1978. Suppl. 481.

Essen B. Studies on the regulation of metabolism in human skeletal muscle using intermittent exercise as an experimental model // Acta. Physiol. Scand. 1978. Suppl. 454.

Ferrari R., Cargnoni A., Bernocchi P. et al. Metabolic adaptation during a sequence of no flow and low-flow ischemia. A possible trigger for hibernation // Circulation. 1996. 15, 94 (10). 2587–2596.

Fuchs F., Reddy Y., Briggs F. N. The interaction of cations with the calcium-binding site of troponin // Biochim. Biophys. Acta. 1970. 221, 2. 407–409.

Fujii Y., Johnson M. E., Gores G. J. Mitochondrial dysfunction during anoxia/reoxygenation injury of liver sinusoidal endothelial cells // Hepatology. 1994. 20 (1 Pt. 1). 177–185.

Gercken G., Schlette V. Metabolite status of the heart in acute insufficiency due to l-fluoro-2,4 dinitrobenzene // Experientia. 1978. 24. 17–19.

Gevers W. Generation of Protons by Metabolic Processes in Heart Cells // Mol. Cell. Cardiol. 1977. 9, 11. 869–873.

Gevers W. Generation of protons by metabolic processes in heart cells: A critical review (Reply to D. R. Wilkie) // Mol. Cell. Cardiol. 1979. 9, 11. 325–330.

Green H. J. Mechanisms of muscle fatigue in intense exercise // J. Sports Sci. 1997. 15 (3). 247–56.

Guddbjarnason S., Mathes P., Ravens K. G. Functional compartment of ATP and creatine phosphate in heart muscle // Mol. Cell. Cardiol. 1970. 1. 325–339.

Gutman M. Modulation of mitochondrial succinate dehydrogenase activity, mechanism and function // Mol. Cell. Biochem. 1978. 15, 20 (1). 41–60.

Halestrap A. P., Doran E., Gillespie J. P. et al. Mitochondria and cell death // Biochem. Society Transactions. 2000. 28, 2. 170–177.

Halestrap A. P., Price N. T. The proton-linked monocarboxylate transporter (MCT) family: structure, function and regulation // Biochem. J. 1999. 15, 343 (2). 281–299.

Halestrap A. P., Woodfield K. Y., Connern C. P. Oxidative stress, thiol reagents and membrane potential modulate the mitochondrial perme-

ability transition by affecting nucleotide binding to the adenine nucleotide translocase // J. Biol. Chem. 1997. 7, 272 (6). 3346–3354.

Harris R. C., Edwards R. H. T., Hultman E. et al. The time course of phosphorylcreatine resynthesis during recovery of the quadriceps muscle in man // Pfluegers Arch. 1976. 367. 137–142.

Harris R. C., Sahlin K., Hultman E. Phosphagen and lactate contents of m. quadriceps femoris of man after exercise // J. Appl. Physiol. 1977. 43. 852–857.

Heisler N. Kinetics of the efflux of hydrogen and lactate ions from isolated rat diaphragms stimulated in anoxia // Pfluegers. Arch. 1973. 339. 51.

Heisler N., Piiper J. Determination of intracellular buffering properties in rat diaphragm muscle // Am. J. Phyaiol. 1972. 222. 747–753.

Hendrikx M., Mubagwa K., Verdonck F. et al. New $Na^+ - H^+$ exchange inhibitor HOE 694 improves postischemic function and high-energy phosphate resynthesis and reduces C^{++} overload in isolated perfused rabbit heart // Circulation. 1994. 89 (6). 2787–2798.

Hermansen L., Osnes J. B. Blood and muscle pH after maximal exercise in man // J. Appl. Physiol. 1972. 32. 304–308.

Hill A. V. The influence of the external medium on the internal pH of muscle // Proc. R. Soc. Lond. Biol. 1955. 144. 1–22.

Hirche H. J., Hombach V., Langohr H. D. et al. Lactic acid permeation rate in working gastrochemii of dogs during metabolic alkalosis and acidosis // Pfluegers Arch. 1975. 376, 3. 209–222.

Holloszy J. O., Kohrt W. M., Hansen P. A. The regulation of carbohydrate and fat metabolism during and after exercise // Front. Biosci. 1998. 15, 3. 1011–1027.

Hultman E., Berstrom J., McLennan N. et al. Breakdown and resynthesis of phosphorylcrea-tine and adenosine triphosphate in correction with muscular work in man // Scand. J. Clin. Lab. Investig. 1967. 19. 55–66.

Iwanaga K., Sakurai M., Minami T. et al. Is the intracellular pH threshold an anaerobic threshold from the view point of intracellular events? // Appl. Human. Sci. 1996. 15 (2). 59–65.

Iwanaga K., Sakurai M., Minami T. et al. Thresholds for decrease in intracellular pH and increase in blood lactate during progressive exercise: 31P-MRS study // Ann. Physiol. Anthropol. 1992. 11 (6). 641–648.

Jackson D. Lactate accumulation in the shell of the turtle chrysemys picta bellii during anoxia at 3 degrees C and 10 degrees C // J. Exp. Biol. 1997. 200 (20). 2295–2300.

Jacobus W. E., Taylor G. J., Hollis D. P. et al. Intracellular pH during myocardial ischemia and anoxia measured by $^{3-}$p nuclear resonanse (NMR) // J. Mol. Cell Cardiol. 1977. 9, 12. Suppl. 29.

Jouannet P., Serres C. The movement of the human spermatozoon: [Article in French] // Bull. Acad. Natl. Med. 1998. 182 (5). 1025–1036.

Kaijser L. Limiting factors for serobic muscle performance // Acta Physiologica Scandinavica. 1970. Suppl. 346.

Kamiike W., Shimizu S., Hatanaka N. et al. Effect of intracellular pH on reoxygenation-induced mitochondrial damage // Transplant. Proc. 1995. 27 (1). 531–532.

Karlsson J., Funderburk C. F., Essen B. et al. Constituents of human muscle in isometric fatigue // J. Appl. Physiol. 1975. 38, 2. 208–211.

Karmazyn M. The myocardial sodium-hydrogen exchanger (NHE) and its role in media ting ischemic and reperfusion injury // Keio J. Med. 1998. 47 (2). 65–72.

Katz A., Edlund A., Sahlin K. NADH content and lactate production in the perfused rabbit heart // Acta Physiol. Scand. 1987. 130 (2). 193–200.

Katz A. M. Contractive Proteins of the Heart // Physiol. Rev. 1970. 50, 1. 64–158.

Kemp G. J., Taylor D. J., Thompson C. H. et al. Quantitative analysis by 31P magnetic resonance spectroscopy of abnormal mitochondrial oxidation in skeletal muscle during recovery from exercise // NMR Biomed. 1993. 6 (5). 302–310.

Kemp G. J., Thompson C. H., Sanderson A. L. et al. pH control in rat skeletal muscle during exercise, recovery from exercise, and acute respiratory acidosis // Magn. Reson. Med. 1994. 31 (2). 103–109.

Kemp G. J., Thompson C. H., Taylor D. J. et al. Proton efflux in human skeletal muscle during recovery from exercise // Eur. J. Appl. Physiol. 1997. 76 (5). 462–471.

Khandoudi N., James F., Feuvray D. Influence of intracellular pH on mitochondrial calcium during ischaemia of the isolated rat heart // Histochem. J. 1989. 21 (2). 99–106.

Kim N. P., Ovchinnikov I. V., Guliamov D. S. et al. Energy value of glucose and lactate for the myocardium in patients with mitral stenosis // Cor. Vasa. 1989. 31 (4). 306–311.

Kondrashova M. N., Gusar I. B., Maevsky E. I. et al. Participation of endogenous succinate in the action of phisiological doses of adrenaline // Abstracts. 6th Joint Symposium of the Biochemical Societies of the GDR and USSR «Regulation in metabolism and bioenergetics». Tallinn, 1981. P. 167.

Kondrashova M. N., Maevsky E. I., Gusar I. B. et al. Endogenous succinate in mitochondria respiration under different states of organism // First european bioenergetic conference. Bologna, 1980. P. 371–372.

Krebs E. G., Gonzaler C., Posner J. B. et al. Interconversion reactions of muscle phosphorylase b and a // Control of Glycogen Metabolism. London, 1964. P. 200–212.

Kroemer G. Mitochondrial control of apoptosis: an overview // Biochem. Soc. Symp. 1999. 66. 1–15.

La Noue K. T., Bryta J., Bassett D. J. P. Energy-driven Aspartate Efflux from Heart and Liver Mitochondria // J. Biol. Chem. 1974. 249. 7514–7528.

Lai Y. L., Attebery B. A., Brown E. B. Intracellular adjustments of skeletal muscle, heart and brain to prolonged hypercapnia // Respir. Physiol. 1973. 19. 115–122.

Langer G. A. Ionic movements and the Control of Contraction // The Mammalian Myocardium. N. Y., 1974. P. 193–217.

Lee B. C. Present status of cardiac relaxing factor // Fed. Proc. 1965. 24, 6. 1432–1437.

Lowenstein J. Acid and Basics. A guide to understanding Acid-Base Disorders. N. Y.; Oxford: Oxford University Press, 1993. 154 p.

Lowry O. H., Passonneau J. V. Kinetic evidence for multiple binding sites on phosphofructokinase // J. Biol. Chem. 1966. 241. 2268–2279.

Maenpaaa P. H., Raivio K. O., Kekomaeki M. P. Fructose induced depletion and its effect on protein synthesis // Science. 1968. 161, 3847. 1253–1254.

Maevsky E. I., Brustovetsky N. N. The origin of the hypoxic activation of the mitochondrial respiration // 9-th Colloquium on bioenergetics and mitochondria: Abstracts. Elbingerode, 1981. P. 1–12.

Maevsky E. I., Gusar I. G., Rosenfeld A. S. et al. Doesn't succinic acid mediate adrenaline stimulation in mitochondria? // II Europ. bioenerg. conf. Lyon, 1982. P. 589–590.

Mainwood G. H., Worseley-Brown P. The effects of extracellular pH and buffer concentration on the efflux of lactate from frog sartorius muscle // J. Physiol. 1975. 250. 1–22.

Mainwood G. W., Renaud J. M. The effect of acid-base balance on fatigue of skeletal muscle // Can. J. Physiol. Pharmacol. 1985. 63 (5). 403–416.

Mak R. H. Effect of metabolic acidosis on branched-chain amino acids in uremia // Pediatr. Nephrol. 1999. 13 (4). 319–322.

Malo C., Wilson J. X. Glucose modulates vitamin C transport in adult human small intestinal brush border membrane vesicles // J. Nutr. 2000. 130 (1). 63–69.

Mason G. F., Gruetter R., Rothman D. L. et al. Simultaneous determination of the rates of the TCA cycle, glucose utilization, alpha-ketoglutarate/glutamate exchange, and glutamine synthesis in human brain by NMR // J. Cereb. Blood. Flow. Metab. 1995. 15 (1). 12–25.

Matsuoka S., Jarmakani J. M., Young H. H. et al. The effect of glutamate on hypoxic newborn rabbit heart // J. Mol. Cell. Cardiol. 1986. 18 (9). 897–906.

Maughan R. J., Greenhaff P. L., Leiper J. B. et al. Diet composition and the performance of high-intensity exercise // J. Sports. Sci. 1997. 15 (3). 265–275.

Mawarati S., Tagaki A., Rowland L. P. Adenyl cyclase in normal and pathologic human muscle // Arch. Neurol. 1974. 30. 96–102.

Mela L. Mitochondrial fucntion in cerebral ischemia and hypoxia comparison of inhibitory and adaptive responses // Neurol. Res. 1979. 1, 1. 51–63.

Mitchelson K. R., Hird F. J. R. Effect of pH and halothane on muscle and liver mitochondria // Am. J. Physiol. 1973. 225. 1393–1398.

Mobasheri A., Mobasheri R., Francis M. J. et al. Ion transport in chondrocytes: membrane transporters involved in intracellular ion homeostasis and the regulation of cell volume, free [Ca^{++}] and pH // Histol Histopathol. 1998. 13 (3). 893–910.

Mohazzab-H K. M., Kaminski P. M., Wolin M. S. Lactate and PO_2 modulate superoxide anion production in bovine cardiac myocytes: potential role of NADH oxidase // Circulation. 1997. 15, 96 (2). 614–620.

Morris R. C. Jr, Schmidlin O., Tanaka M. et al. Differing effects of supplemental KCl and $KHCO_3$: pathophysiological and clinical implications // Semin. Nephrol. 1999. 19 (5). 487–493.

Nakamura N., Schwartz A. The influence of hydrogen ion concentration on Ca^{2+} binding and release by skeletal muscle Sarcoplasmic reticulum // J. General Physiology. 1972. 59. 22–32.

Nanninga L. On the Inhibition of Myosin-ATPase by Adenosine Diphosphate // Arch. Biochem. Biophys. 1962. 96. 51–55.

Opie L. H. Lactate Metabolism and Cardiac Muscle // Lactate: Physiologic, Methodologic and Pathologic Approach. Spronger-Verlag, 1980. P. 4–10.

Opie L. H. Myocardial metabolism and heart disease // Jpn. Circ. J. 1978. 42 (11). 1223–1247.

Paller M. S., Green E. L. Role calcium in reperfusion injury of kidney // Ann. N. Y. acad. scienc. 1994. 260. 1395–1405.

Palmiert F., Quagliariello E. The mitochondrial transport systems for inorganic phosphate and Krebs cycle intermediates // Bioenergetics at mitochondrial and cellular levels. Warszawa, 1978. P. 5–38.

Peters J. P., Van Slyke D. D. Quantitative clinical chemistry. Vol. 1. Interpretations. London: Bailliere; Tindal & Cox, 1931. 326 p.

Pette D. Chemiosmotic hypothesis of oxidative phosphorylation // Regulation of metabolic processes in mitochondria / Ed. J. M. Tager et al. Amsterdam, 1966. P. 28–50.

Pette D. The Adaptive Potentiale of Skeletal Muscle // Europ. J. of Med. Research. 2000. 5 (Suppl.1). 1–62, 11.

Piiper J. Production of Lactic Acid in Heavy Exercise and Acid-Base Balance // Lactate: Physiologic, Methodologic and Pathologic Approach. Springer-Verlag, 1980. P. 35–46.

Ponka P., Beaumont C., Richardson D. R. Function and regulation of transferrin and ferritin // Semin. Hematol. 1998. 35 (1). 35–54.

Portington K. J., Pascoe D. D., Webster M. J. et al. Effect of induced alkalosis on exhaustive leg press performance // Med. Sci. Sports Exerc. 1998. 30 (4). 523–528.

Portzehl H., Zaoralek P., Gaudin J. The activation by Ca^{2+} of the ATP-ase of extracted muscle fibrils with variation of ionic strength, pH and concentration of Mg-ATP // Biochim. Biophys. Acta. 1969. 189. 440–448.

Poulus A. J., Doctor H. J., Westra H. G. Acid-base, balance and subjective feelings of fatigue during physical exercise // Eur. J. Appl. Physiol. and Occup. Physiol. 1974. 33, 3. 207–213.

Ranallo R. F., Rhodes E. C. Lipid metabolism during exercise // Sports Med. 1998. 26 (1). 29–42.

Rassmusen U. E. The oxidation of added NADH by intact heart mitochondria // FEBS Letters. 1969. 2, 3. 157–162.

Ross A. Intracellular pH and distribution of weak acids across cell membranes. A study of D-and L-lactate and of DMO in rat diaphragm // J. Physiol. 1975. 249. 1–25.

Ross A., Boron W. Intracellular pH // Physiol. Rev. 1981. 61. 297–434.

Rouslin W. Effects of acidosis and ATP depletion on cardiac muscle electron transfer complex I // J. Mol. Cell. Cardiol. 1991. 23 (10). 1127–1135.

Rujner J., Chrusciel W. T., Kulczycka H. et al. [Leigh disease in a 17-year-old boy]: [Article in Polish] // Wiad. Lek. 1990. 1, 43 (17–18). 902–904.

Russ U., Balser C., Scholz W. et al. Effects of the Na^+/H^+-exchange inhibitor Hoe 642 on intracellular pH, calcium and sodium in isolated rat ventricular myocytes // Pflugers Arch. 1996. 433 (1–2). 26–34.

Sacktor B. Regulation of intermediary metabolism // Adv. Insect. Physiol. 1970. 7. 267–347.

Sahlin K. Intracellular pH and Energy Metabolism in skeletal Muscle in Man // Acta Physiolog. Scandinav. 1978. Suppl. 455.

Sahlin K., Alvestrand A., Bergstroem J. et al. Intracellular pH and bicarbonate concentration as determined in biopsy samples from the quadriceps muscle of man at rest // Clinic. Science Molec. Medicine. 1977. 53. 459–466.

Sahlin K., Alvestrand A., Brandt R. et al. Intracellular pH and bicarbonate concentration in human muscle during recovery from exercise // J. Appl. Physiol. 1978. 134. 46.

Sahlin K., Harris R. S., Hultman E. Creatine kinase equilibrium and lactate content compared with muscle pH in tissue samples obtained after isometric exercise // Biochemical. 1975. 152. 173–180.

Sahlin K., Harris R. S., Nylind R. et al. Lactate content and pH in muscle samples obtained after dynamic exercise // Pfluegers Archiv. 1976. 367. 143–149.

Sahlin K., Palmskog G., Hultman E. Adenine nucleotide and JMP contents of the quadriceps muscle in man after exercise // Pfluegers Archiv. 1978. 379. 121–126.

Sato K., Kashiwaya Y., Keon C. A. et al. Insulin, ketone bodies and mitochondrial energy transduction // FASEB J. 1995. 9 (8). 651–658.

Sayed M. S., MacLaren D., Rattu A. J. Exogenous carbohydrate utilization: effects on metabolism and exercise performance // Comp. Biochem. Physiol. 1997. 118 (3). 789–803.

Schaedler M. H. Proportionale Aktivierung von ATPase-Aktivitaet und Kontraktinonsspannung durch Calciumionen in isolierten contraktilen Strukturen verschiedener Muskelarten // Arch. Ges. Physiol. 1966. 291. 93.

Schild L., Reinheckel T., Wiswedel I. et al. Short-term impairment of energy production in isolated rat liver mitochondria by hypoxia/ reoxygenation: involvement of oxidative protein modification // Biochem J. 1997. 15, 328 (1). 205–210.

Scholz R., Thurman R. G., Willamson J. R. et al. Flavin and pyridine nucleotide oxidation-reduction changes in perfused rat liver. I. Anoxia and subcellular localization of fluorescent flavoproteins // J. Biol. Chem. 1969. 244, 9. 2317–2324.

Schoolwerth A. C., Strzelecki T., Gesek F. A. Regulation of rat kidney mitochondrial metabolism in acute acidosis // Am. J. Kidney Dis. 1989. 14 (4). 303–306.

Schwartz A. Ouabain-induced inhibition of cardiac (Na^+ plus K^+)-ATPase and the positive inotropic response // Annals of the New York Academy of Sciences. 1974. 242 (0). 683.

Seelye R. N. Proton Generation and Control during Anaerobic Glycolysis in Heart Cells // J. Mol. Cell. Cardiology. 1980. 12. 1483–1486.

Sel'kov E. E. Stabilization of Energy charge oscillations and multiplicity of stationary states in energy metabolism as a Result of purely stoichiometric Regulation // Eur. J. Biochem. 1975. 59. 151–160.

Senger H. Changes of the oxidative phosphorylation in mitochondria of rat skeletal muscle following strenuous exercise // Acta Biol. Med. Germ. 1975. 34. 181–188.

Setlow B., Lowenstein J. M. Adenilate deaminase. II. Purification and some regulatory properties of the enzyme from calf brain // J. Biol. Chem. 1967. 242. 607–615.

Sherman M., Matityahu A., Campbell D. A method for estimating respiratory muscle efficiency using an automated metabolic cart // Respir. Physiol. 1996. 106 (2). 171–177.

Siesjo B. K., Katsura K. I., Kristian T. et al. Molecular mechanisms of acidosis-mediated damage // Acta Neurochir Suppl. 1996. 66. 8–14.

Siesjo B. K., Messeter K. Factors determining intracellular pH // Ion Homeostasis of the Brain. Munksgaard; Copenhagen, 1971. P. 244–262.

Singer T. P. // Comprehensive biochemistry. 1965. 14. 127–198.

Skulachev V. P. Cytochrome c in the apoptotic and antioxidant cascades // FEBS Lett. 1998. 27, 423 (3), 275–80.

Smith G. L., Austin C., Crichton C. et al. A review of the actions and control of intracellular pH in vascular smooth muscle // Cardiovasc Res. 1998. 38 (2). 316–331.

Spriet L. L., Peters S. J. Influence of diet on the metabolic responses to exercise // Proc. Nutr. Soc. 1998. 57 (1). 25–33.

Stone D., Darley-Usmar V., Smith D. R. et al. Hypoxia-reoxygenation induced increase in cellular Ca^{2+} in myocytes and perfused hearts: the role of mitochondria // J. Mol. Cell. Cardiol. 1989. 21. 963–973.

Taegtmeyer H. Metabolic response to cardiac hypoxia. Increased production of succinate by rabbit papillary muscles // Circ. Res. 1978. 43. 808–815.

Taegtmeyer H. Six blind men explore an elephant: aspects of fuel metabolism and the control of tricarboxylic acid cycle activity in heart muscle // Basic. Res. Cardiol. 1984. 79, 3. 220–336.

Tager J. M., Slater E. C. Synthesis of glutamate from α-oxoglutarate and ammonia in rat-liver mitochondria. I. Comparison of different hydrogen donors // Biochim. Biophys. Acta. 1963. 77. 227–245.

Thomas J. A., Buchsbaum R. N., Zimniak A. et al. Intracellular pH Measurements in Ehrlich Ascites Tumor Cells Utilizing Spectroscopic Probes generated in situ // Biochemistry. 1979. 18, 11. 2210–2218.

Thompson C. H., Kemp G. J., Rajagopalan B. et al. Abnormal ATP turnover in rat leg muscle during exercise and recovery following myocardial infarction // Cardiovasc. Res. 1995. 29 (3). 344–349.

Tobin R. B., Macherer C. R., Mehlman M. A. pH effects on oxidative phoaphorylation of rat liver mitochondria // Am. J. Physiol. 1972. 223. 83–88.

Trividi B., Danforth W. H. Effect of pH on the kinetics of frog muscle phosphofructokinase // J. Biol. Chem. 1966. 241. 4110–4114.

Turrens J. F., Alexandre A., Lehninger A. L. Ubisemiquinone is the electro donor for superoxide formation by complex III of heart mitochondria // Archives of Biochem. Biophys. 1985. 237, 2. 408–414.

Ui M. A role of phosphofructokinase in pH-dependent regulation of glycolusis // Biochim. Biophys. Acta. 1966. 124. 310–322.

Van Biervliet J. P., Senders R. C., Lamers J. M. J. et al. Hazards of parenteral glucose in neonatal lactic acidaemia // Lancet. 1976. 7959. 594.

Veksler V., Ventura-Clapier R. Ischaemic metabolic factors-high inorganic phosphate and acidosis-modulate mitochondrial creatine kinase functional activity in skinned cardiac fibres // J. Mol. Cell. Cardiol. 1994. 26 (3). 335–339.

Viru A. Postexercise recovery period: carbohydrate and protein metabolism // Scand. J. Med. Sci. Sports. 1996. 6 (1). 2–14.

Von-Korff R. W. Changes in metabolic control sites of rabbit heart mitochondria // Nature. 1967. 214. 23–26.

Voollestad N. K., Verburg E. Muscular function, metabolism and electrolyte shifts during prolonged repetitive exercise in humans // Acta Physiol. Scand. 1996. 156 (3). 271–278.

Wagenmakers A. J. Muscle amino acid metabolism at rest and during exercise: role in human physiology and metabolism // Exerc. Sport Sci. Rev. 1998. 26. 287–314.

Wagner A., Risse A., Brill H. L. et al. Therapy of severe diabetic ketoacidosis. Zero-mortality under very-low-dose insulin application // Diabetes Care. 1999. 22 (5). 674–677.

Walte O. Hypoxia-reoxygenation induced increase in cellular Ca^{2+} in myocytes and perfused // J. Mol. Cell. Cardiol. 1979. 11. 485–500.

Wang Y., Heigenhauser G. J., Wood C. M. Integrated responses to exhaustive exercise and recovery in rainbow trout white muscle: acid-base, phosphogen, carbohydrate, lipid, amminia, fluid volume and electrolyte metabolism // J. Exp. Biol. 1994. 195. 227–258.

Weiss R. G., Kalil-Filho R., Herskowitz A. et al. Tricarboxylic acid cycle activity in postischemic rat hearts // Circulation. 1993. 87 (1). 270–282.

Wilkie D. K. Discussion // Lactate Physiologic, Methodologic and Pathologic Approach. Springer-Verlag; Berlin; Heidelberg; N. Y., 1980, P. 7–9.

Williamson J. R., Schaffer S. W., Ford C. et al. Contribution of tissue acidosis to ischemic injury in the perfused rat heart // Circulation. 1976. 53, 3. Supp. 1. 3–14.

Yan P., Cheah J. S., Thai A. C. et al. Current concepts of the pathogenesis and management of diabetic ketoacidosis (DKA) // Ann. Acad. Med. Singapore. 1983. 12 (4). 596–605.

Список использованных сокращений

АДФ – аденозиндифосфат
АМР – аденозинмонофосфат
АСП – аспартат
АТР – аденозинтрифосфат
АТФ-аза – аденозинтрифосфатаза
ГАМК – гамма-аминомасляная кислота
ГОМК – гамма-оксимасляная кислота
ДК – дыхательный контроль
ДНФ – динитрофенол
ИМФ – инозинмонофосфат
КОС – кислотно-основное состояние
КрФ – креатинфосфат
МХ – митохондрии
ОАА оксалоацетат
ПН – пиридиннуклеотиды
ПНН – пиридиннуклеотиды восстановленные
$P_н$ – фосфат неорганический
pO_2 – парциальное давление (напряжение) кислорода
pCO_2 – парциальное давление (напряжение) углекислого газа
СА – сукцинат аммония
СБО – сдвиг буферных оснований
СДГ – сукцинатдегидрогеназа
ТФФ – тетрафенилфосфоний
ФАД – флавинадениндинуклеотид
ФЕП – фосфоенолпируват
ФП – флавопротеиды
ЦТК – цикл трикарбоновых кислот
ЩУК – щавелево-уксусная кислота
ЭГТА – этиленгликоль бис(β-аминоэфир)-N,N,N`,N`-тетраацетат
ЭДТА – динатриевая соль этилендиаминтетрауксусной кислоты
NAD – никотинамидадениндинуклеотид
NADP – никотинамидаденидинуклеотидфосфат
RQ – дыхательный коэффициент
α-КГ – α-кетоглутарат
β-ОМ – β-оксимасляная кислота
$\Delta\mu H^+$ – электрохимический трансмембранный потенциал ионов водорода

Практическое использование сукцината аммония

Проведенные исследования дают основание сделать заключение о том, что одним из наиболее эффективных субстратов, обеспечивающих in vitro и in vivo увеличение вклада митохондрий в поддержание pH и мобилизацию аэробных окислительно-восстановительных процессов при нагрузках, является сукцинат аммония. Суммируем основные аргументы, позволяющие обосновать практическое применение СА для купирования метаболического ацидоза при физических нагрузках.

Окисление любой соли сукцината энергетически эффективнее, чем окисление NAD-зависимых субстратов. СА обладает большей эффективностью, чем сукцинат калия in vitro или сукцинат натрия in vivo, превосходя по антиацидотической активности смесь сукцината и глутамата.

Зачастую при развитии энергетического дефицита, сопровождающегося повышением степени окисленности дыхательных переносчиков, окисление сукцината может оказаться заторможенным из-за падения активности сукцинатдегидрогеназы. Как правило, активировать СДГ, заторможенную конкурентным ингибитором – щавелево-уксусной кислотой – достаточно просто, например, с помощью экзогенного глутамата, который вовлекает ЩУК в реакцию переаминирования, или путем повышения степени восстановленности пиридиннуклеотидов при добавлении NAD- или NADP-зависимых субстратов, таких как β-оксимасляная кислота или изоцитрат.

Именно благодаря подобному воздействию на СДГ наиболее эффективно срабатывают, даже в низкоэнергетических условиях, такие субстратные композиции, как смеси сукцината и глутамата. В связи с этим отметим еще одно обстоятельство. В митохондриях практически всех тканей, в первую очередь в митохондриях мозга и печени, весьма активно идет восстановительное аминирование – синтез глутамата из α-кетоглутарата и аммония с использованием NAD(P)H в глутаматдегидрогеназной реакции. Необходимым условием и ограничением для ГДГ-реакции является доступность аммония. Отсюда следует, что для поддержания синтеза глутамата можно использовать

сукцинат аммония. Экзогенный сукцинат способствует торможению α-кетоглутаратдегидрогеназной реакции как ее конечный продукт и вовлечению α-кетоглутарата в ГДГ-реакцию. Иными словами, аммоний как субстрат активирует образование глутамата. В свою очередь, образовавшийся глутамат может обеспечить активацию СДГ, если имеется ЩУК-овое торможение этого фермента, и тем самым поддержать окисление сукцината.

Напомним, что не во всех случаях функциональной нагрузки имеет смысл использовать систему окисления янтарной кислоты на полную мощность. Внимание к этому аспекту проблемы М. Н. Кондрашова привлекла еще в 1978 г., когда было установлено, что при гиперэргических состояниях, связанных с гипервосстановленностью пиридиннуклеотидов, с избыточно быстрым поступлением ионов калия или кальция в митохондрии (в результате чего они набухают и могут «взорваться»), при излишне высокой скорости потребления кислорода, например при «струйном» поступлении сукцината в клетку в случае повреждения клеточной мембраны (при этом может развиться явление кислородного «обкрадывания»), следует притормозить окисление сукцината. И в качестве тормоза могут быть использованы агенты, снижающие степень энергизованности митохондрий и уменьшающие степень восстановленности пиридиннуклеотидов, или просто источники ЩУК. Не касаясь всех сторон указанного явления, отметим, что деэнергизующим воздействием на митохондрии и способностью снижать степень восстановленности пиридиннуклеотидов обладает аммоний. Во-первых, транспорт аммония в митохондрии связан с уменьшением величины трансмембранного потенциала (симпорт с ионом водорода). Во-вторых, аммоний способствует синтезу глутамата, использующего восстановительные эквиваленты с NAD(P)H, что требует включения энергозависимой трансгидрогеназы.

Таким образом, при использовании СА, с одной стороны, должна происходить активация СДГ, если имеет место ЩУК-овое торможение, и, следовательно, активация энергодающих процессов в митохондриях. С другой стороны, СА может вызвать торможение СДГ вследствие некоторой деэнергизации митохондрий и снижение уровня восстановленности NAD(P)H, если имеет место гиперактивация СДГ и митохондрий, например при избыточном окислении липидов, набухании митохондрий или аномально высокой проницаемости кле-

точной мембраны для сукцината и ионов кальция. Такое противоположно направленное – активирующее или тормозящее – действие СА в зависимости от исходного состояния легко наблюдать на изолированных митохондриях при изменении степени восстановленности пиридиннуклеотидов (Д. Б. Борзов, Е. И. Маевский, 1978). На фоне исходно низкого уровня NADH добавление СА приводит к росту степени восстановленности NADH, очевидно, за счет энергозависимого обратного переноса восстановительных эквивалентов в дыхательной цепи при окислении сукцината. На фоне высокого уровня NADH даже в условиях открытой дыхательной цепи СА вызывает уменьшение восстановленности пиридиннуклеотидов за счет включения ГДГ-реакции, поскольку в митохондриях всегда имеется некоторое количество эндогенного α-кетоглутарата. Итак, СА в зависимости от степени восстановленности пиридиннуклеотидов может вызывать их восстановление или окисление.

При ряде патологических состояний и экстремальных нагрузках, сопровождающихся набуханием митохондрий, гипоксией, выходом из митохондрий пиридиннуклеотидов, при многих видах повреждений митохондриальной ДНК наблюдается нарушение окисления NAD-зависимых субстратов. В таких ситуациях сукцинат – чуть ли не единственный субстрат, окисление которого сохранено в той или иной степени. Учитывая выявленную в исследованиях последних лет роль митохондрий в запуске и развитии апоптоза – запрограммированной гибели клеток, возможность энергизации, улучшения состояния митохондрий экзогеными субстратами, в частности сукцинатом, может иметь существенно большее значение, чем это можно было ранее предположить в рамках сугубо «энергетических» представлений.

Итак, на уровне изолированных митохондрий накоплены экспериментальные предпосылки, которые позволяют оценивать СА как агент, способный или стимулировать, или ослаблять избыточно активированные функции митохондрий, что, по-видимому, не может не сказываться на энергозависимых процессах на уровне клетки и целостного организма.

Первые свидетельства об использовании СА в качестве фармакологического препарата приведены в «Императорской российской фармакопее», изданной в Санкт-Петербурге в 1882–1889 гг. В ней указано, что в отличие от довольно слабого препарата янтарной ки-

слоты в практике следует использовать СА, эффективность которого намного выше. Основное показание – применение СА в качестве противосудорожного, успокаивающего средства. Мы не располагаем источниками, определившими подобные показания и послужившими основанием для включения СА в «Российскую фармакопею». Такого рода данные были получены в экспериментальных исследованиях, выполненных в отделе нейрофармакологии (руководитель чл.-кор. РАМН Н. С. Сапронов) Научно-исследовательского института экспериментальной медицины Российской академии медицинских наук (Санкт-Петербург).

Исходя из уровня сегодняшних знаний, можно предположить что эффекты СА связаны, во-первых, с важной ролью митохондриальной энергетики в обеспечении функций возбудимых структур мозга, где переход от состояния покоя к состоянию активности и последующему восстановлению связан с многократным изменением активности энергозависимых процессов; во-вторых, с ключевой ролью глутамата, ГАМК и ГОМК в обеспечении синаптических процессов, регуляции торможения и возбуждения в центральной нервной системе, а также со взаимосвязью обмена этих интермедиатов с образованием и окислением сукцината; в-третьих, с особой ролью системы освобождения и связывания аммония в клетках головного мозга, с жесткой энергозависимостью распада и ресинтеза аденилатов и глутамина, а также с возможностью влияния аммония на изменение степени восстановленности пиридиннуклеотидов и энергизации митохондрий, на NO-синтетазу, продуцирующую один из наиболее мощных модуляторов сосудистого тонуса, кровотока и ряда функций клеток мозга, в том числе активность антиоксидантных систем. И наконец, эффекты СА связаны с зависимостью функций центральной нервной системы при гипероксии и старении от состояния митохондрий как системы, обеспечивающей генерацию или уборку свободно-радикальных форм кислорода, повреждающее воздействие которых вызывает не только прогрессивную утрату памяти, но и многие другие дегенеративные и возрастные изменения.

Не исключено, что СА на уровне организма окажется агентом, способным нормализовать и улучшать многие энергозависимые процессы. Благотворное действие СА на старых животных выявлено в работе Ю. Г. Каминского и Е. А. Косенко, М. Н. Кондрашовой (1982),

показавших, что курсовой прием СА способствует повышению концентрации адениловых нуклеотидов в печени старых крыс до уровня, наблюдаемого у молодых половозрелых животных. Ими же было показано радиопротекторное действие сукцината (Е. А. Косенко, Ю. Г. Каминский, М. Н. Кондрашова, 1996).

Испытания по безопасности использования препарата СА в полном объеме были выполнены в 1994 г. под руководством А. С. Саратикова в Сибирском медицинском институте. Показано, что СА не токсичен при разовом и длительном использовании, не обладает тератогенным, эмбриотоксичным, местнораздражающим, мутагенным или аллергизирующим действием и не может быть отнесен к иммуномодуляторам. На адекватных моделях с временным пережатием сонных артерий установлено, что СА обладает ярко выраженным противоишемическим воздействием в отношении головного мозга животных.

Таким образом, полученные данные и анализ литературы по рассматриваемой проблеме свидетельствуют о том, что СА соответствует большинству требований, предъявляемых к лекарственным препаратам и тем более к пищевым добавкам, что открывает возможность для его применения в качестве средства, коррегирующего обмен метаболита, по крайней мере при купировании метаболического ацидоза гипоксического генеза.

Оглавление

Введение 3

Глава 1. МЕТАБОЛИЧЕСКИЙ АЦИДОЗ – СЛЕДСТВИЕ ИНТЕНСИВНОЙ НАГРУЗКИ 13

1.1. Основные элементы регуляции энергетического обмена в мышцах при нагрузке 13

1.2. Основные метаболические факторы, ограничивающие мышечную активность 22

1.3. Причины развития ацидоза при АТФ-азных нагрузках 25

1.4. Влияние ацидоза на энергообеспечение при АТФ-азных нагрузках 35

1.5. Буферная емкость мышц 39

1.6. Буферные системы организма 48

1.7. Возможные подходы к поддержанию pH при АТФ-азных нагрузках с помощью экзогенных субстратов энергетического обмена 53

Глава 2. МОДЕЛИРОВАНИЕ IN VITRO КИСЛОТНОГО СДВИГА pH В ТКАНЕВЫХ ПРЕПАРАТАХ ПРИ АТФ-АЗНЫХ НАГРУЗКАХ 58

2.1. Подходы к экспериментальной оценке вклада митохондрий в поддержание pH при АТФ-азных нагрузках 58

2.2. Компенсация ацидоза посредством увеличения вклада окислительного фосфорилирования и роль сукцината в компенсации ацидоза при АТФ-азных нагрузках 63

Глава 3. ИЗМЕНЕНИЕ ДЫХАТЕЛЬНОГО КОЭФФИЦИЕНТА И КИНЕТИЧЕСКИХ ПАРАМЕТРОВ МИТОХОНДРИЙ ПРИ ОКИСЛЕНИИ ЭКЗОГЕННЫХ СУБСТРАТОВ В РАЗЛИЧНЫХ ФУНКЦИОНАЛЬНЫХ СОСТОЯНИЯХ И ПРИ УМЕНЬШЕНИИ ОКСИГЕНАЦИИ 79

3.1. Изменение дыхательного коэффициента и сопряженных с дыханием энергозависимых процессов как способ определения вида окисляющегося субстрата 79

3.2. Влияние метаболического состояния и уменьшения оксигенации митохондрий на кинетические параметры окисления экзогенных пирувата и сукцината 99

Глава 4. ОКИСЛЕНИЕ ЭКЗОГЕННОГО СУКЦИНАТА В ТКАНЯХ ЖИВОТНЫХ И ЧЕЛОВЕКА 105
4.1. Активация дыхания сукцинатом – признак повреждения наружной клеточной мембраны 105
4.2. Изотопный анализ превращений экзогенного сукцината в условиях целостного организма 106
Глава 5. ОСОБЕННОСТИ РЕАКЦИЙ ДЫХАТЕЛЬНОЙ ЦЕПИ МИТОХОНДРИЙ ПРИ ГИПОКСИИ И МЕТАБОЛИЧЕСКОМ АЦИДОЗЕ 111
5.1. Активация фосфорилирующего дыхания митохондрий после острой гипоксии 111
5.2. Купирование сукцинатом ацидоза при рабочей гипоксии (физической нагрузке) 116
5.3. Влияние приема сукцината на кислотно-основную систему крови спортсменов при физических нагрузках 120
5.3.1. Реакция кислотно-основной системы крови спортсменов на физическую нагрузку 120
5.3.2. Влияние сукцината на кислотно-основную систему крови у спортсменов при физических нагрузках 123
Глава 6. ОПОСРЕДОВАННЫЕ МЕХАНИЗМЫ ДЕЙСТВИЯ СУКЦИНАТА НА ЭНЕРГЕТИЧЕСКИЙ ОБМЕН В УСЛОВИЯХ ЦЕЛОСТНОГО ОРГАНИЗМА 129
6.1. Влияние сукцината на оксигенацию тканей 129
6.2. Опосредованное катехоламинами действие сукцината на энергетический обмен 131
6.3. Торможение β-адреноблокатором стимулирующего действия введенного животным сукцината на митохондриях печени 133
Заключение 135
Библиографический список 142
Список использованных сокращений 166
Приложение. Практическое использование сукцината аммония 167

Научное издание

Розенфельд Александр Семенович
Маевский Евгений Ильич

ТЕОРЕТИКО-МЕТОДОЛОГИЧЕСКИЕ АСПЕКТЫ ДЕЙСТВИЯ СУКЦИНАТА ПРИ СПОРТИВНЫХ НАГРУЗКАХ И ГИПОКСИИ

Редактор Е. А. Ушакова
Компьютерная верстка В. В. Дайбова

Печатается по постановлению
редакционно-издательского совета университета

Подписано в печать 18.04.07. Формат 60×84/16. Бумага для множ. аппаратов. Печать плоская. Усл. печ. л. 9,2. Уч.-изд. л. 9,5. Тираж 300 экз. Заказ № 115.
Издательство ГОУ ВПО «Российский государственный профессионально-педагогический университет». Екатеринбург, ул. Машиностроителей, 11.

Ризограф ГОУ ВПО «Российский государственный профессионально-педагогический университет». Екатеринбург, ул. Машиностроителей, 11.