

## ALLENAMENTO DI DURATA, TRATTAMENTO FARMACOLOGICO ED ATTIVITA' ENZIMATICHE MUSCOLARI

Benzi G., Villa R.F., Arrigoni E.

Istituto di Farmacologia dell'Università di Pavia

### ABSTRACT

The adaptation of some enzymatic activities of glycogenolysis (adenyl cyclase, phosphorylase), glycolysis (phosphofructokinase, pyruvate kinase, lactate dehydrogenase), tricarboxylic acid cycle (citrate synthase, isocitrate dehydrogenase, 2-ketoglutarate dehydrogenase, malate dehydrogenase) and of subsidiary pathways of pyruvate metabolism (glutamate pyruvate transaminase) was studied in the rat as a function of training time (25, 50, 100, 125 and 150 days). The workload was set at 25 m/min for 150 min/day. Some groups of animals were treated daily with active doses of vasodilators such as papaverine, caffeine, nicergoline and bamethan. With a steady daily workload, at least three different phases can be recognized as a function of training time: 1) a period of *noncompensated mitochondrial adaptation*, where an increase is observed both in the Krebs' cycle enzymatic activities and in the enzymatic activities related to glycogenolysis and glycolysis; 2) a period of *compensated mitochondrial adaptation*, where mitochondrial enzymatic activities further increase, while those of glycogenolysis and glycolysis return to base values; 3) a period of *overcompensated mitochondrial adaptation*, where mitochondrial enzymatic activities are in a steady-state, while pyruvate is to a larger extent transaminated to 2-ketoglutarate and to a lower extent reduced to lactate. The phase of mitochondrial adaptation is compensated for the actual workload performed. As a consequence, a variation in the *intensity* factor causes the biological system to go back to the stage of mitochondrial non-compensation. Drugs can play a role during the phase of non-compensated mitochondrial adaptation by modifying the aerobic mechanism (e.g. nicergoline), or the anaerobic mechanism (e.g. caffeine) or both (e.g. bamethan). These actions do not seem to be ascribable to the vasodilating properties of these drugs, since papaverine is always inactive. The administration of the drugs is totally ineffective when the adaptation of enzymatic activities to the endurance workload has been reached.

### INTRODUZIONE

Le concentrazioni ematiche e muscolari di lattato e di piruvato, durante un esercizio submassimale, sono più basse nei soggetti allenati

che in quelli non allenati (1, 2, 3, 4), dal momento che, in funzione del l'allenamento, il piruvato può essere metabolizzato mediante il potenziamento di varie vie metaboliche, alternative. Infatti, un adeguato allenamento di durata è in grado di determinare un aumento delle capacità ossidative mitocondriali (5, 6, 7). Si potrebbe pertanto supporre che l'incremento della ossidazione del piruvato rappresenti, almeno a livello mitocondriale, un decisivo fattore limitante. Nel ciclo di Krebs, il destino metabolico dell'acetil-Coenzima A è intimamente legato alla reazione di condensazione con ossalacetato. Conseguentemente, la disponibilità muscolare di ossalacetato diviene il fattore limitante forse più importante; e ciò sia per la scarsa disponibilità di ossalacetato sia per la reazione di condensazione stessa, sia per la velocità della reazione catalitica che è modulata dalla ossalacetato-dipendenza dell'enzima citrico sintasi. In tal caso, lo shunt del piruvato ad  $\alpha$ -chetoglutarato, a malato o ad ossalacetato, potrebbe costituire una importante via metabolica vicariante (8, 9, 10) in quanto permette di aggirare l'ostacolo della limitazione indotta dalla tappa di condensazione « ossalacetato + acetil-CoA  $\rightarrow$  citrato », con cui il ciclo di Krebs inizia la sua attività.

E' poi interessante prendere in considerazione il problema dell'influenza del trattamento farmacologico sull'adattamento enzimatico all'allenamento di durata. In tale contesto, virtualmente non è possibile reperire altri dati sperimentali oltre a quelli che dimostrano come alcuni farmaci vasodilatanti siano in grado di anticipare l'incremento nel tempo di alcune attività enzimatiche mitocondriali indotto a livello muscolare dall'allenamento. Queste sostanze tuttavia non modificano in alcun modo il plateau massimo delle attività enzimatiche stesse e non sono in grado di sostenere il raggiunto livello contro il decadimento spontaneo di tali attività in risposta ad un diminuito lavoro muscolare (5).

Nel presente studio sono stati presi in esame globalmente i problemi sopra menzionati. Così è stato studiato, nel muscolo gastrocnemio di ratto, l'effetto dell'allenamento sulle attività degli enzimi della glicogenolisi, della glicolisi e del ciclo degli acidi tricarbossilici, e su eventuali vie vicarie di metabolizzazione del piruvato. Inoltre si è valutato l'effetto di alcuni farmaci vasodilatanti (papaverina, caffeina, nicergolina, bamephan) sull'adattamento enzimatico stesso.

## MATERIALI E METODI

In questo studio sono stati utilizzati n. 151 ratti del peso di 120-140 g selezionati da un gruppo di 400 animali allevati in condizioni di stabulazione ottimali (temperatura:  $23 \pm 1^\circ$  C; umidità relativa: 55-60%), nutriti con dieta Rieper e acqua *ad libitum*.

Durante una *prima fase*, 400 animali sono stati sottoposti ad adattamento psicomotorio su un rotarod per 6 giorni la settimana e per due settimane consecutive, aumentando la velocità di scorrimento della pista da 2,5 a 10 m/min. In una *seconda fase*, 200 animali sono stati selezionati in base al loro tempo di prestazione alla velocità di 10 m/min; in tali animali selezionati, il carico di lavoro è stato progressivamente aumen-

tato da 20 m/min per 60 min al giorno, a 25 m/min per 150 min al giorno, in un tempo massimo di 50 giorni. Gli animali che non sono stati capaci di mantenere questo carico di lavoro nel tempo prestabilito sono stati scartati. Conseguentemente, le attività enzimatiche muscolari al 25° giorno sono state valutate nel pregiudizio che gli animali esaminati sarebbero stati capaci di eseguire la loro prestazione nel tempo stabilito. In ogni caso, tali valutazioni sono state eseguite su ratti con una capacità di lavoro di 25 m/min per almeno 120 min al giorno. È importante notare che, passando da questo carico di lavoro a quello del 50° giorno (25 m/min per 150 min al giorno), si determina lo scarto di circa il 20% degli animali. Oltre che essere sottoposti al prestabilito training di endurance, 103 animali sono stati trattati giornalmente per via intraperitoneale con 0,5 ml/kg di una soluzione 1,6 o 4 o  $10 \times 10^{-3}$  M delle seguenti sostanze: *papaverina* (6,7-dimetossi-1-veratril isochinolina); *caffeina* (1, 3, 7-trimetilxantina); *nicergolina* (1, 6-dimetil-8β-(5-bromonicotinoil-ossimetil)-10α-metossi ergolina); *bamethan* (1-(p-idrossifenil)-2-butilaminoetanolo). I ratti sono stati sottoposti al test motorio 30 min dopo il trattamento.

Le attività enzimatiche sono state valutate dopo il 25°, 50°, 100°, 125° e 150° giorno di allenamento. I ratti sono stati sospesi dall'allenamento 72 ore prima del loro sacrificio. La preparazione degli estratti enzimatici è consistita essenzialmente nell'isolamento del muscolo gastrocnemio, nella sua omogenazione e nella procedura della centrifugazione differenziale (11). In breve il tessuto muscolare, dopo essere stato isolato dai materiali connettivali, è stato omogenato in saccarosio 250 mM utilizzando un apparato Potter-Elvehjem pre-raffreddato in un refrigeratore. Gli omogenati diluiti al 10% (p/v) sono stati centrifugati a 700 x g per 10 min in una supercentrifuga Sorvall RC-5. Il surnatante, decantato, è stato ricentrifugato a 700 x g per 10 min. I surnatanti ottenuti sono stati successivamente centrifugati a 14.000 x g per 15 min ed il sedimento mitocondriale è stato risospeso in saccarosio 250 mM. Sono state valutate le seguenti attività enzimatiche: adenil ciclasi (12, 13); fosforilasi (14); fosfofruttochinasi (15); piruvato chinasi (15); lattato deidrogenasi (16); citrato sintasi 17, 18); isocitrato deidrogenasi (19); α-chetoglutarato deidrogenasi (20); succinato deidrogenasi (21); malato deidrogenasi (15, 22); glutamico piruvico transaminasi (10). La concentrazione proteica è stata valutata secondo Lowry e coll. (23).

Le attività enzimatiche sono state valutate con uno spettrofotometro a doppio raggio Perkin-Elmer 124/56 con compartimento termostato per cuvette da 3 ml. Le attività sono state calcolate dal segmento lineare della curva ottenuta e corrette per attività non specifiche. Le attività enzimatiche sono espresse come micromoli di substrato utilizzato per minuto per grammo di tessuto fresco.

## RISULTATI

L'adattamento enzimatico ad un lavoro intenso di durata (25 m/min, per 150 min/giorno) si manifesta nel muscolo gastrocnemio di ratto con modificazioni a livello sia dello ialoplasma che dei mitocondri. Come si

osserva nella Tabella I, a 25 giorni di allenamento alcune attività enzimatiche mitocondriali sono significativamente incrementate (citrato sintetasi, isocitrato deidrogenasi, succinato deidrogenasi) mentre altre non mostrano variazioni statisticamente significative ( $\alpha$ -chetoglutarato deidrogenasi, malato deidrogenasi). Parallelamente, si osserva un significativo incremento delle attività enzimatiche legate alla glicogenolisi (adenil ciclasi, fosforilasi) e alla glicolisi (fosfofruttochinasi, piruvato chinasi, lattato deidrogenasi).

I rilievi a 50 e 100 giorni dell'allenamento sopra indicato, evidenziano un progressivo incremento delle attività enzimatiche mitocondriali, mentre quelle ialoplasmatiche ritornano ai valori iniziali (Tabella I). Ciò indica che l'attività mitocondriale tende ad un equilibrio con il lavoro muscolare di durata a cui gli animali sono stati sottoposti.

Dopo questa fase di equilibrio, continuando regolarmente l'allenamento al ritmo ed all'intensità indicata, si evidenziano al 150° giorno sia il notevole aumento dell'attività della glutamico-piruvico transaminasi che la diminuzione dell'attività della lattato deidrogenasi (Tabella I). Ciò indica che il primo enzima può competere sempre più efficacemente con il secondo per il piruvato, con il risultato di spostare l'utilizzazione del piruvato (eccedente rispetto alla velocità di immissione nel ciclo di Krebs) verso la transaminazione ad  $\alpha$ -chetoglutarato piuttosto che verso la riduzione a lattato.

Tutti questi adattamenti enzimatici sono direttamente correlati con il carico di lavoro di durata. Nella Tabella II sono indicati i risultati relativi ad animali che, dopo 100 giorni di allenamento a 25 m/min per 150 min/giorno, hanno eseguito per i successivi 25 giorni un lavoro a 30 m/min per 150 min/giorno. In questi animali, già in steady-state fra intensità del lavoro di durata ed adattamento enzimatico mitocondriale, tale intensità di lavoro è stata soltanto moderatamente aumentata. Tuttavia, questa semplice variazione nell'intensità del lavoro (da 25 a 30 m/min), è stata largamente sufficiente ad alterare tale steady-state, inducendo un significativo aumento delle attività enzimatiche sia della glicogenolisi che della glicolisi. Si ripete cioè una situazione analoga a quella iniziale che si sviluppa allorché i ratti sedentari vengono sottoposti al lavoro di durata.

In alcuni animali, l'allenamento (25 m/min per 150 min/al giorno) è stato associato alla somministrazione intraperitoneale di tre dosi efficaci di farmaci capaci, tra l'altro, di indurre vasodilatazione periferica. Nella Tabella III, si evidenzia come al 25° giorno di allenamento, la *papaverina* non induce nessuna variazione significativa nelle attività enzimatiche studiate. La *caffèina* induce invece un aumento di parecchie attività della glicogenolisi e della glicolisi, mentre a livello mitocondriale non si osserva alcuna modificazione statisticamente significativa. Il trattamento con *nicergolina* evidenzia una attivazione a livello della succinato deidrogenasi e della malato deidrogenasi, mentre la lattato deidrogenasi mostra un significativo decremento. La somministrazione di *bamethan* infine ha evidenziato sia un significativo incremento dell'attività dell'adenil ciclasi che della succinato deidrogenasi.

Queste azioni farmacologiche non sono però più a lungo rilevabili negli animali allenati e trattati per 100 o 150 giorni, come ad esempio

Tabella 1 - Attività degli enzimi del muscolo gastrocnemio dei ratti sedentari e di ratti allenati a correre continuamente per 150 min al giorno a 25 m/min. Le attività sono espresse come  $\mu\text{moli di substrato utilizzato per min per g di peso fresco di tessuto}$ . I valori sono le medie  $\pm$  E.S. di 8 ratti. (\*) = differenza significativa,  $P < 0.01$  (t-test di Student).

GRUPPI	Adenil ciclas X 10 <sup>-6</sup>	Fosforilasi	Fosfo- fruttochinasi	Piruvato chinasi	Lattato deidrogenasi	Citrato sintasi	Isocitrate deidrogenasi	$\alpha$ -Chetogluc- tarato deid.	Succinato deidrogenasi	Malato deidrogenasi	Glutamato piruvato transamin.
Sedentari	28.6 $\pm$ 1.7	19.6 $\pm$ 1.3	31.2 $\pm$ 2.5	248 $\pm$ 12	516 $\pm$ 11	22.7 $\pm$ 1.9	2.65 $\pm$ 0.16	1.24 $\pm$ 0.11	3.84 $\pm$ 0.19	278 $\pm$ 27	21.4 $\pm$ 1.2
Esercitati per 25 giorni	52.4 <sup>*</sup> $\pm$ 3.9	29.6 <sup>*</sup> $\pm$ 1.1	45.6 <sup>*</sup> $\pm$ 3.4	338 <sup>*</sup> $\pm$ 23	759 <sup>*</sup> $\pm$ 74	32.5 <sup>*</sup> $\pm$ 1.8	3.92 <sup>*</sup> $\pm$ 0.29	1.66 $\pm$ 0.10	5.33 <sup>*</sup> $\pm$ 0.29	366 $\pm$ 26	20.3 $\pm$ 1.5
Esercitati per 50 giorni	32.5 $\pm$ 2.1	21.2 $\pm$ 1.7	35.3 $\pm$ 2.5	287 $\pm$ 8	592 $\pm$ 21	36.6 <sup>*</sup> $\pm$ 1.7	4.45 <sup>*</sup> $\pm$ 0.23	1.74 $\pm$ 0.10	6.33 <sup>*</sup> $\pm$ 0.26	411 <sup>*</sup> $\pm$ 42	24.3 $\pm$ 2.3
Esercitati per 100 giorni	26.5 $\pm$ 1.7	18.6 $\pm$ 1.1	26.8 $\pm$ 2.6	204 $\pm$ 20	485 $\pm$ 17	41.6 <sup>*</sup> $\pm$ 3.2	5.12 <sup>*</sup> $\pm$ 0.34	1.92 <sup>*</sup> $\pm$ 0.09	6.97 <sup>*</sup> $\pm$ 0.27	444 <sup>*</sup> $\pm$ 38	33.3 <sup>*</sup> $\pm$ 1.4
Esercitati per 150 giorni	30.6 $\pm$ 1.5	22.2 $\pm$ 0.6	33.8 $\pm$ 1.2	271 $\pm$ 9	366 <sup>*</sup> $\pm$ 29	44.5 <sup>*</sup> $\pm$ 1.8	5.16 <sup>*</sup> $\pm$ 0.22	1.85 <sup>*</sup> $\pm$ 0.11	7.17 <sup>*</sup> $\pm$ 0.32	464 <sup>*</sup> $\pm$ 14	51.3 <sup>*</sup> $\pm$ 3.1

Tabella II - Attività degli enzimi del muscolo gastrocnemio dei ratti allenati a correre continuamente per 150 min al giorno, per 100 giorni a 25 m/min, con o senza un successivo periodo di allenamento per 25 giorni a 30 m/min. Le attività sono espresse come  $\mu\text{moli di substrato utilizzato per min per g di peso fresco di tessuto}$ . I valori sono le medie  $\pm$  E.S. di 8 ratti. (\*) = differenza significativa,  $P < 0.01$  (t-test di Student).

GRUPPI	Adenil ciclas e X 10 <sup>-8</sup>	Fosforilasi	Fosfo- fruttochinasi	Piruvato chinasi	Lattico deidrogenasi	Citrato sintasi	Isocitrato deidrogenasi	$\alpha$ -Chetoglul- tarato deid.	Succinato deidrogenasi	Malato deidrogenasi	Glutamato piruvato transamin.
Esercitati per 100 giorni a 25 m/min	26.5 $\pm 1.7$	18.6 $\pm 1.1$	26.8 $\pm 2.6$	204 $\pm 20$	485 $\pm 17$	41.6 $\pm 3.2$	5.12 $\pm 0.34$	1.92 $\pm 0.09$	6.97 $\pm 0.27$	444 $\pm 38$	33.3 $\pm 1.4$
Esercitati per 100 giorni a. 25 m/min + 25 giorni a 30 m/min	44.7 <sup>1</sup> $\pm 4.0$	26.8 <sup>1</sup> $\pm 2.0$	38.8 <sup>1</sup> $\pm 1.6$	285 $\pm 14$	687 <sup>1</sup> $\pm 34$	43.2 $\pm 2.6$	5.26 $\pm 0.18$	2.15 $\pm 0.13$	7.23 $\pm 0.23$	470 $\pm 36$	40.3 $\pm 3.4$

Tabella III - Attività degli enzimi del muscolo gastrocnemio dei ratti allenati a correre continuamente per 150 min al giorno, a 25 m/min, per 25 giorni con o senza trattamento farmacologico (0.5 ml/kg i.p. giornaliere di una soluzione 1.6 o 4 o 10 x 10<sup>-3</sup> M). Le attività sono espresse come  $\mu$ mol di substrato utilizzato per min per g di peso fresco di tessuto. I valori sono le medie  $\pm$  E.S. di N ratti. (\*) = differenza significativa dai ratti allenati e non trattati, P < 0.01 (t-test di Student).

GRUPPI	Concentraz. X 10 <sup>-3</sup>	N	Adenil ciclasti X 10 <sup>-6</sup>	Fosforilasi	Fosfo- fruttochinasi	Lattico deidrogenasi	Citrato sintasi	Succinato deidrogenasi	Malato deidrogenasi	Glutamato piruvico transamin.
Allenati non trattati	—	8	52.4 $\pm$ 3.9	29.6 $\pm$ 1.1	45.6 $\pm$ 3.4	759 $\pm$ 74	32.5 $\pm$ 1.8	5.33 $\pm$ 0.29	366 $\pm$ 26	20.3 $\pm$ 1.5
Allenati e trattati con caffaina	1.6	5	66.3 <sup>1</sup> $\pm$ 3.7	35.2 $\pm$ 3.9	52.4 $\pm$ 4.4	850 <sup>1</sup> $\pm$ 21	29.2 $\pm$ 1.7	5.04 $\pm$ 0.36	321 $\pm$ 17	24.6 $\pm$ 2.7
	4.0	5	68.9 <sup>1</sup> $\pm$ 5.4	34.8 $\pm$ 3.0	56.3 <sup>1</sup> $\pm$ 2.3	905 <sup>1</sup> $\pm$ 23	35.2 $\pm$ 1.4	5.40 $\pm$ 0.46	375 $\pm$ 10	21.6 $\pm$ 1.5
	10.0	5	70.2 <sup>1</sup> $\pm$ 4.6	33.3 $\pm$ 2.8	58.4 <sup>1</sup> $\pm$ 3.1	876 <sup>1</sup> $\pm$ 32	31.4 $\pm$ 2.3	4.92 $\pm$ 0.61	354 $\pm$ 16	17.6 $\pm$ 3.8
Allenati e trattati con papaverina	1.6	5	52.6 $\pm$ 3.3	25.6 $\pm$ 3.1	40.6 $\pm$ 2.6	730 $\pm$ 64	27.7 $\pm$ 3.6	5.52 $\pm$ 0.46	348 $\pm$ 21	19.9 $\pm$ 2.2
	4.0	5	49.2 $\pm$ 4.1	26.6 $\pm$ 2.4	47.1 $\pm$ 2.6	782 $\pm$ 35	30.2 $\pm$ 2.2	5.20 $\pm$ 0.21	324 $\pm$ 23	22.1 $\pm$ 1.6
	10.0	5	47.7 $\pm$ 3.2	24.7 $\pm$ 2.5	39.2 $\pm$ 1.8	765 $\pm$ 71	29.3 $\pm$ 1.8	5.28 $\pm$ 0.17	402 $\pm$ 61	24.3 $\pm$ 1.9
Allenati e trattati con bamehan	1.6	5	60.2 $\pm$ 4.8	29.9 $\pm$ 2.1	43.6 $\pm$ 2.2	858 $\pm$ 70	32.4 $\pm$ 2.7	5.96 <sup>1</sup> $\pm$ 0.31	336 $\pm$ 26	19.1 $\pm$ 2.0
	4.0	5	69.5 <sup>1</sup> $\pm$ 5.0	33.5 $\pm$ 3.3	52.6 $\pm$ 3.1	842 $\pm$ 53	37.3 $\pm$ 1.7	6.37 <sup>1</sup> $\pm$ 0.19	404 $\pm$ 28	23.0 $\pm$ 1.6
	10.0	5	71.8 <sup>1</sup> $\pm$ 6.3	34.4 $\pm$ 1.7	47.4 $\pm$ 3.6	836 $\pm$ 50	37.6 $\pm$ 2.0	6.23 <sup>1</sup> $\pm$ 0.24	373 $\pm$ 28	25.6 $\pm$ 3.7
Allenati e trattati con nicergolina	1.6	6	49.4 $\pm$ 4.6	27.2 $\pm$ 1.3	39.4 $\pm$ 4.2	613 <sup>1</sup> $\pm$ 48	36.6 $\pm$ 2.9	6.18 <sup>1</sup> $\pm$ 0.37	394 $\pm$ 17	20.6 $\pm$ 1.9
	4.0	6	57.6 $\pm$ 1.9	31.2 $\pm$ 1.5	47.7 $\pm$ 1.8	642 <sup>1</sup> $\pm$ 14	40.4 $\pm$ 3.5	6.74 <sup>1</sup> $\pm$ 0.41	438 <sup>1</sup> $\pm$ 25	22.5 $\pm$ 1.8
	10.0	6	58.4 $\pm$ 2.6	29.2 $\pm$ 1.4	41.3 $\pm$ 3.3	600 <sup>1</sup> $\pm$ 36	40.2 $\pm$ 4.1	6.82 <sup>1</sup> $\pm$ 0.51	444 <sup>1</sup> $\pm$ 36	21.4 $\pm$ 1.7

riportato nella Tabella IV per 100 giorni di allenamento. Ciò indica che gli interventi farmacologici possono attuarsi durante le fasi iniziali di scompensato adattamento fisiologico all'allenamento di durata. Quando tale adattamento fisiologico si è stabilizzato, non è più possibile ai farmaci studiati di agire in modo significativo.

*Tabella IV* - Attività degli enzimi del muscolo gastrocnemio dei ratti allenati a correre continuativamente per 150 min al giorno, a 25 m/min, per 100 giorni con o senza trattamento farmacologico (0.5 ml/kg i.p. giornalieri di una soluzione  $4 \times 10^{-3}$  M). Le attività sono espresse come  $\mu\text{moli}$  di substrato utilizzato per min per g di peso fresco di tessuto. I valori sono le medie  $\pm$  E.S. di N ratti. (\*) = differenza significativa dai ratti allenati e non trattati,  $P < 0.01$  (t-test di Student).

GRUPPI	N	Adenil ciclasti $\times 10^{-6}$	Lattato deidrogenasi	Succinato deidrogenasi
Allenati non trattati	8	26.5 $\pm 1.7$	485 $\pm 17$	6.97 $\pm 0.27$
Allenati e trattati con caffeina	5	30.2 $\pm 2.6$	510 $\pm 22$	7.10 $\pm 0.37$
Allenati e trattati con papaverina	5	24.3 $\pm 2.4$	510 $\pm 25$	6.65 $\pm 0.20$
Allenati e trattati con bamethan	5	31.2 $\pm 3.6$	503 $\pm 33$	6.72 $\pm 0.27$
Allenati e trattati con nicergolina	5	27.6 $\pm 1.8$	468 $\pm 24$	7.20 $\pm 0.35$

## DISCUSSIONE

A parità di carico di lavoro di durata, le varie attività enzimatiche muscolari studiate variano in maniera non omogenea in funzione del tempo di allenamento. Infatti, le attività enzimatiche ialoplasmatiche presentano variazioni diverse da quelle mitocondriali. D'altra parte, anche nell'ambito di queste ultime, quelle del ciclo degli acidi tricarbossilici presentano variazioni quantitativamente diverse. Tuttavia, questa disomogeneità di comportamento può essere considerata in parte solo apparente. Infatti, in presenza di un carico di lavoro efficace (5), si possono ipotizzare almeno tre fasi sequenziali, in funzione del *tempo di allenamento*.

1) *Fase di scompensato adattamento mitocondriale*. L'iniziale aumento (Fig. 1) delle attività enzimatiche mitocondriali del ciclo di Krebs è accompagnato da un aumento significativo anche di quelle ialoplasmatiche. In particolare, l'aumento dell'attività sia dell'adenil ciclasti e della



fosforilasi, sia della fosfofruttocinasi e della piruvato chinasi evidenzia l'attivazione della glicogenolisi e della glicolisi, rispettivamente. L'aumento dell'attività della lattato deidrogenasi induce a supporre che una parte del piruvato venga ridotto a lattato, invece di essere smaltito come acetil-CoA nel ciclo degli acidi tricarbossilici. In tale caso, quindi, l'adattamento delle attività mitocondriali sarebbe non commisurato alle richieste energetiche conseguenti all'allenamento, per cui entrerebbe in funzione compensativa il meccanismo anaerobico lattacido.

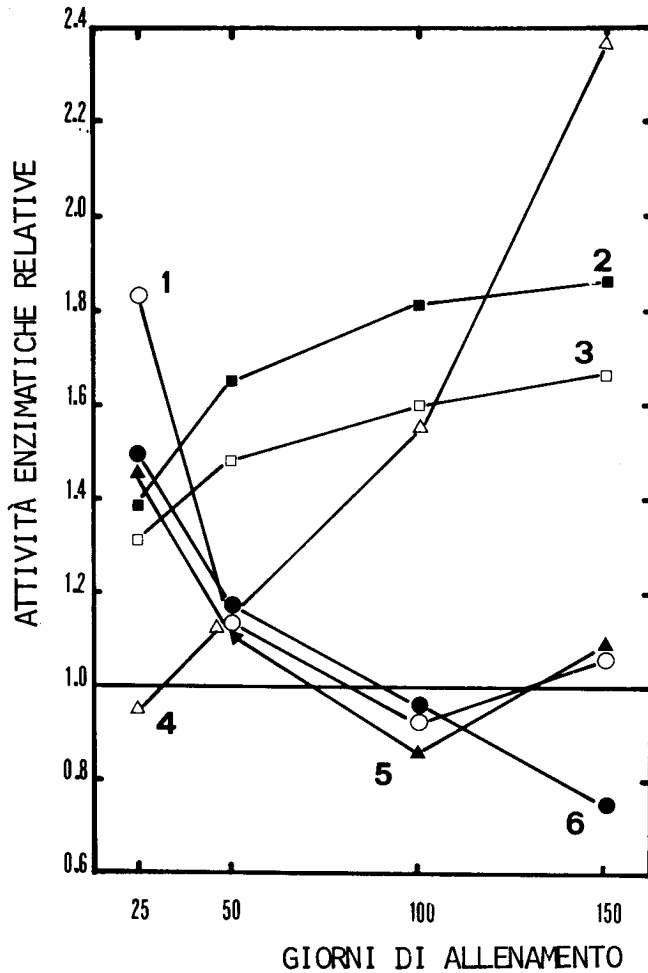


Figura 1 - Attività enzimatiche relative (ordinata) di gastrocnemio di ratti allenati a correre continuamente per 150 min al giorno a 25 m/min, in funzione dei giorni di allenamento (ascissa). Le attività enzimatiche sono espresse assumendo l'attività dei controlli sedentari (al tempo 0) eguale a 1. Ciascun punto rappresenta la media di 8 ratti. Legenda: 1 = adenilciclasi; 2 = succinato deidrogenasi; 3 = malato deidrogenasi; 4 = glutamico piruvico transaminasi; 5 = fosfofruttochinasi; 6 = lattato deidrogenasi.

Anche l'intervento dei farmaci studiati convalida questa ipotesi. La *nicergolina* è un agente  $\alpha$ -bloccante che attiva sostanzialmente i processi ossidativi mitocondriali (5, 24, 25, 26) ed in parte il sistema adenil ciclasico (28). Rispetto agli animali allenati e non trattati, in questa prima fase la nicergolina (Fig. 2) evidenzia sia un incremento di parecchie attività enzimatiche mitocondriali, sia una diminuzione dell'incremento da allenamento dell'attività della lattato deidrogenasi. La *caffeina* è un farmaco xantinico che attiva notoriamente il sistema dell'adenil ciclasi a mezzo della inibizione della fosfodiesterasi (28). Rispetto agli animali allenati e non trattati, in questa prima fase la caffeina non induce alcun significativo incremento delle attività mitocondriali, mentre determina un incremento nell'attività dell'adenil ciclasi

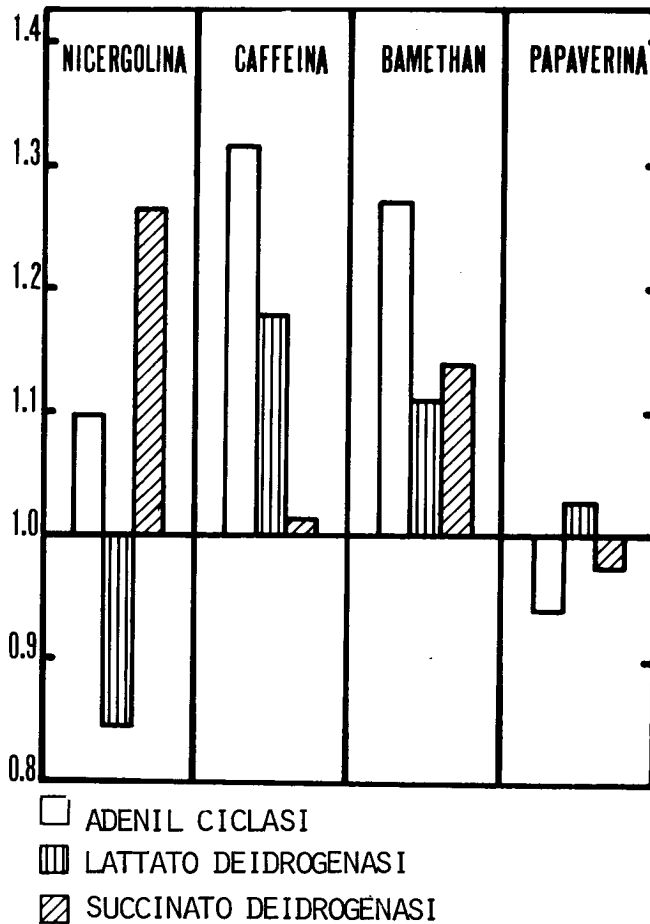


Figura 2 - Attività enzimatiche relative (ordinata) di gastrocnemio di ratti allenati a correre continuamente per 150 min al giorno a 25 m/min per 25 giorni e trattati giornalmente con le sostanze indicate (0,5 ml/kg i.p. di una soluzione  $4 \times 10^{-3}$  M) espresse in funzione della attività dei ratti allenati e non trattati.

(attivazione della glicogenolisi), della fosfofruttochinasi (attivazione della glicolisi) e della lattato deidrogenasi (attivazione della riduzione del piruvato a lattato). Il *bamethan* è un agente  $\beta$ -stimolante che stimola sostanzialmente il sistema adenil ciclasico (29) ed in parte i processi ossidativi (24, 25). Rispetto agli animali allenati e non trattati, il *bamethan* induce un moderato incremento in alcune delle attività mitocondriali, con un più evidente incremento a carico dell'attività della adenil ciclasi. Il comportamento dei sistemi enzimatici, esaminati anche in funzione di stimoli esogeni diversificati (quali quelli dei farmaci utilizzati), conferma che esiste un meccanismo « a bascula » fra l'adattamento ossidativo mitocondriale e il meccanismo anaerobico lattacido, per far fronte alle richieste energetiche indotte dall'allenamento. Di rilievo è infine il fatto che la somministrazione cronica di *papaverina*, in dose atta ad indurre una efficace azione vasodilatante periferica, non determina alcuna variazione nelle attività degli enzimi glicolitici e mitocondriali.

2) *Fase di compensato adattamento mitocondriale*. Proseguendo l'allenamento al livello prestabilito, nella seconda fase si osserva un incremento progressivo delle attività enzimatiche mitocondriali del ciclo di Krebs. Invece, le attività enzimatiche legate alla glicogenolisi ed alla glicolisi vanno diminuendo sino a non diversificarsi sostanzialmente da quelle iniziali pre-allenamento (Fig. 1). In questa fase quindi, l'incremento delle attività mitocondriali sembrerebbe in grado di supplire l'entità delle richieste energetiche indotte dall'allenamento, senza necessità di alcuna compensazione ialoplasmatica. Durante questa fase, il trattamento cronico con i farmaci saggiati non modifica l'andamento globale dei fenomeni di adattamento mitocondriale.

3) *Fase di supercompensato adattamento mitocondriale*. Proseguendo l'allenamento al livello di intensità prestabilito, si osserva che le attività enzimatiche mitocondriali rimangono per lo più in steady state. Contemporaneamente (Fig. 1) aumentano però alcune attività enzimatiche legate alle vie collaterali di metabolizzazione del piruvato (per es. « piruvato + glutamato  $\rightleftharpoons$  alanina +  $\alpha$ -chetoglutarato », reazione catalizzata dalla glutamico piruvico transaminasi). Al contrario, la lattato deidrogenasi diminuisce al di sotto dei valori pre-allenamento. In questa fase quindi, pur essendo le attività enzimatiche mitocondriali adeguate al carico di allenamento svolto giornalmente, si enfatizza una « terza via » di metabolizzazione del piruvato. Questa via collaterale (8, 10) permette di smaltire il piruvato a scapito della riduzione a lattato.

In prima istanza va rilevato che, nella nostra condizione sperimentale in cui l'intensità e la durata del lavoro sono costanti, appare abbastanza strana questa successiva specializzazione di uno shunt metabolico con il ciclo di Krebs, proprio quando i valori delle attività enzimatiche del ciclo stesso, sono in *plateau*. D'altra parte appare anche poco chiaro il fatto che alcune attività enzimatiche del ciclo di Krebs, ad es. dopo 100 giorni di allenamento, aumentino dell'80-90% (per esempio, isocitrato deidrogenasi, succinato deidrogenasi), mentre altre aumentino solo del 50-60% (per esempio,  $\alpha$ -chetoglutarato deidrogenasi, malato deidro-

genasi). Vorremmo sottolineare che i metodi di determinazione delle attività enzimatiche alterano le interazioni autoregolative che fanno della cellula un sistema a funzionalità integrata (5). Solo uno studio globale delle correlazioni biochimiche a livello subcellulare potrebbero effettivamente offrire una completa e reale visione della funzionalità enzimatica.

Infatti, la valutazione dell'attività di un enzima non offre alcuna informazione circa la *concentrazione* dell'enzima stesso. Né la valutazione globale delle proteine dei mitocondri è in grado di fornire indicazioni attendibili sulla concentrazione di un singolo enzima mitocondriale. D'altra parte, anche la valutazione ponderale dell'enzima purificato può avere poco significato qualora la proprietà più efficacemente modulata dall'allenamento o da un farmaco sia, ad es., l'affinità fra enzima e substrato. Queste considerazioni vanno tenute ben presenti per non essere indotti a trarre conclusioni drastiche ed assolute da una serie di dati sperimentali che, per quanto numerosi o sofisticati, sono magari correlabili fra loro solo in maniera relativa.

Una seconda considerazione riguarda il fatto che le fasi di adattamento mitocondriale sono relative all'effettivo carico di lavoro. Così, allorché si è stabilizzata la fase di compensato adattamento mitocondriale, il passaggio ad un carico di lavoro maggiore riporta i substrati biologici allo stato di scompensato adattamento mitocondriale. Infatti si inducono nuovamente gli aumenti significativi negli enzimi della glicogenolisi (adenil ciclasi, fosforilasi), della glicolisi (fosfofruttocinasi) e della riduzione del piruvato (lattato deidrogenasi).

Una terza considerazione riguarda il fatto che la fase di scompensato adattamento mitocondriale sembrerebbe essere l'unica modificabile dai farmaci, anche se in modo diverso a seconda del loro diverso atteggiamento metabolico, piuttosto che della loro azione vasodilatante. Alcuni farmaci possono stimolare soprattutto i processi ossidativi (nicergolina), altri possono agire sulla glicolisi (caffaina), altri ancora possono presentare caratteristiche intermedie (bamethan). Nelle fasi di compensato adattamento mitocondriale i farmaci saggiati sono del tutto inattivi.

## BIBLIOGRAFIA

- 1) L.A. Cobb and W.P. Johnson, *J. Clin. Invest.*, **42**, 800 (1963).
- 2) S. Robinson and P.M. Harmon, *Am. J. Physiol.*, **132**, 757 (1941).
- 3) B. Saltin and J. Karlsson, in « Muscle metabolism during exercise », B. Pernow and B. Saltin ed., New York, Plenum, 1971, p. 289.
- 4) B. Saltin and J. Karlsson, *ibidem*, p. 395.
- 5) G. Benzi, P. Panceri, M. De Bernardi, R.F. Villa, E. Arcelli, L. D'Angelo, E. Arrigoni and F. Berté, *J. Appl. Physiol.*, **38**, 565 (1975).
- 6) J.O. Holloszy, *J. Biol. Chem.*, **242**, 2278 (1967).
- 7) J.O. Holloszy, L.B. Oscari, I.J. Don and P.A. Molè, *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **40**, 1368 (1970).
- 8) G. Benzi and R.F. Villa, *Il Farmaco, Ed. Sc.*, **30**, 311 (1975).

- 9) P. Felig and J. Wahren, *J. Clin. Invest.*, 50, 2703 (1971).
- 10) P.A. Molè, K.M. Baldwin, R.L. Terjung and J.O. Holloszy, *Am. J. Physiol.*, 224, 50 (1973).
- 11) L.B. Oscail and J.O. Holloszy, *J. Biol. Chem.*, 246, 6968 (1971).
- 12) R.W. Butcher, R.J. Ho, H.C. Meng and E.W. Sutherland, *J. Biol. Chem.*, 240, 4515 (1965).
- 13) E. De Robertis, G. Rodriguez De Lores Arnaiz and M. Alberici, *J. Biol. Chem.*, 242, 3487 (1967).
- 14) A. Bass, D. Brdiczka, P. Eyer, S. Hofer and D. Pette, *European J. Biochem.*, 10, 198 (1969).
- 15) C.E. Shonk and G.E. Boxer, *Cancer Res.*, 24, 709 (1964).
- 16) A.R. Pesce, R.H. McKay, F. Stolzenbach, R.D. Cahn and N.O. Kaplan, *J. Biol. Chem.*, 239, 1753 (1964).
- 17) S. Ochoa, *Methods Enzymol.*, 1, 685 (1955).
- 18) P.A. Srere, *Methods Enzymol.*, 13, 3 (1969).
- 19) G.W.E. Plaut, *Methods Enzymol.*, 13, 34 (1969).
- 20) L.J. Reed and B.B. Mukherjee, *Methods Enzymol.*, 13, 55 (1969).
- 21) W.D. Bonner, *Methods Enzymol.*, 1, 722 (1955).
- 22) S. Ochoa, *Methods Enzymol.*, 1, 735 (1955).
- 23) O.H. Lowry, N.J. Rosebrough, A.L. Farr and R.J. Randall, *J. Biol. Chem.*, 193, 265 (1951).
- 24) G. Benzi, E. Arrigoni, L. Manzo, M. De Bernardi, A. Ferrara, P. Panceri and F. Berté, *J. Pharm. Sci.*, 62, 758 (1973).
- 25) G. Benzi, *Japan J. Pharmac.*, 25, 251 (1975).
- 26) A. Moretti and G. Arcari, *Il Farmaco, Ed. Sc.*, 27, 800 (1972).
- 27) R.F. Villa, *Il Farmaco, Ed. Sc.*, 30, 561 (1975).
- 28) E.W. Sutherland and T.W. Rall, *Pharmac. Rev.*, 12, 265 (1960).
- 29) G. Benzi and R.F. Villa, *J. Neurol. Neurosur. Psych.*, 39, 77 (1976).