

Метаболическое обоснование применения сукцинат-содержащих композиций для поддержания высокой функциональной активности организма

Евгений Маевский*, Анна Васильева¹, Елена Гришина¹, Михаил Учитель¹, Людмила Богданова¹, Михаил Кожурин¹

¹ ФГБУН Институт Теоретической и Экспериментальной Биофизики РАН
Россия, 142290, Московская обл., Пущино, ул. Институтская, 3

* Автор, отвечающий за переписку:
e-mail: eim11@mail.ru

Аннотация

Создание эффективного в спорте средства на основе сукцината потребовало анализа основных механизмов действия этого средства. Настоящая работа отражает базовые принципы, на которых строилась разработка сукцинат-содержащего средства, повышающего работоспособность и скорость восстановления после интенсивной нагрузки. Рассмотрена особая роль метаболических превращений сукцината в энергетическом обмене митохондрий: высокая энергетическая эффективность, возможность преимущественного окисления при кислородном голодании, анаэробное образование и возможные последствия этого явления. Эти ключевые факторы предопределили практическое применение сукцината для поддержания энергетического обмена и создания ряда противогипоксических средств. Предполагается, что указанные особенности метаболизма сукцината могли стать основой формирования сигнальной, регуляторной роли этой молекулы в условиях организма.

Ключевые слова

Сукцинат, Метаболизм, Янтарная кислота, Гипоксия

Выходные данные

Евгений Маевский, Анна Васильева, Елена Гришина, Михаил Учитель, Людмила Богданова, Михаил Кожурин. Метаболическое обоснование применения сукцинат-содержащих композиций для поддержания высокой функциональной активности организма. *Cardiometry*; Выпуск 16; Май 2020; стр.15-25; DOI: 10.12710/cardiometry.2020.16.1525; Онлайн до-
14 | *Cardiometry* | Выпуск 16. Май 2020

ступ: <http://www.cardiometry.net/issues/no16-may-2020/high-performance-in-a-human-organism>

Введение

Тысячелетиями складывались легенды и копились сведения о целебном янтаре, янтарной пудре и масле янтаря [1]. Одним из первых документальных свидетельств фармацевтического применения янтарной кислоты (succinic acid) является руководство *Nagers Handbuch* на немецком и русском языках, издававшееся с 1856 года по 1999 г [2, 3]. В Санкт-Петербургском варианте XIX века «Руководство къ фармацевтической и медико-химической практикѣ». Интересно, что уже тогда для нормализации состояния человека рекомендовалась сукцинат-содержащая композиция «*Mixtura tonico-nervina Stahl*».

Участие янтарной кислоты (ЯК) в метаболических процессах было обнаружено намного позже, в 1910 году Баттели и Штерн [4]. В 1930-е гг. А. Сцент-Дьердьи и Г. Кребс независимо установили участие ЯК в окислительно-восстановительных превращениях энергетического обмена [5, 6], в цикле трикарбоновых кислот (ЦТК), называемом циклом Кребса. Это открытие стимулировало изучение и разработку сукцинат-содержащих фармацевтических композиций (ССК) с целью поддержания энергетики клеток при нагрузках. В настоящее время известны средства для лечения ишемии мозга [7] и кровопотери [8], парафармацевтические биологически активные добавки (БАД), препятствующие развитию метеопатии [9], способствующие купированию патологических проявлений климактерического синдрома [10], повышению работоспособности [11, 12] и устойчивости к алкогольной интоксикации [13, 14], ветеринарные препараты [15] и т.п.. Описано множество весьма эффективных примеров применения различных ССК в медицине и ветеринарии [16, 17, 18]. Среди них наиболее известны Реамберин, Лимонтар, Мексидол, Янтавит, Митомин, Энерлит-Клима, *Amberen*, *Potensa*, Антип, RU-21, Митокальцедар и др.. К средствам, повышающим работоспособность относятся Энерлит, ЯнтарИн-Спорт, Миодон, *Signalom active*, *Signalom pro Sport*. Исходно создатели ССК представляли их в качестве источников сукцината для поддержания

клеточной энергетики. Именно поэтому мы рассматриваем, прежде всего, участие сукцината в метаболических превращениях, имеющих прямое отношение к интенсивным физическим нагрузкам.

Янтарная кислота – интермедиат энергетического обмена

В цикле Кребса янтарная кислоты (ЯК или сукцинат) образуется в результате окислительного декарбоксилирования α -кетоглутарата и протекания сукцитнаттиокиназной реакции. Далее ЯК (сукцинат) окисляется до фумарата сукцинатдегидрогеназой (СДГ), которая является не только ферментов ЦТК, но и комплексом II в дыхательной цепи митохондрий (МХ). В работах Б. Чанса [19], М.Н. Кондрашовой, [20, 21, 22] и последующих исследователей продемонстрирована уникально высокая мощность энергопродукции при окислении сукцината в МХ. Окисление сукцината превосходит все интермедиаты энергетического обмена по скоростям потребления кислорода и синтеза АТФ, величине трансмембранного электрохимического потенциала ионов водорода $\Delta\mu\text{H}^+$, генерируемого на внутренней мембране МХ, а также по способности поддерживать такие энергозависимые процессы, как обратный перенос электронов (ОПЭ) или аккумуляция ионов Ca^{2+} . Окисление сукцината сопровождается освобождением в единицу времени несравненно большего числа энергетических эквивалентов, чем при окислении любого другого субстрата ЦТК или жирных кислот в реакциях β -окисления.

М.Н. Кондрашова и ее научная школа представили концепцию об особой роли окисления сукцината в МХ при энергообеспечении функционального цикла «покой – работа - восстановление» [20, 21, 22]. Эта концепция сыграла ключевую роль в формировании представлений о том, что высокая энергетическая мощность окисления сукцината обеспечивает успех применения ССК при повышенном потреблении энергии, развитии энергетического дефицита и ацидоза, адаптации к тяжелым нагрузкам и посленагрузочном восстановлении [23].

Противогипоксическое действие сукцинат-содержащих композиций

Наиболее ярко особенности окисления и образования ЯК проявляются при гипоксии. Острая гипоксия вплоть до аноксии является атрибутом

большинства функциональных нагрузок и лежит в основе многих адаптивных и патологических состояний. Напомним, что даже при нормоксии всегда встречаются зоны гипоксии в силу гетерогенности обеспечения кислородом различных участков тканей, клеток и МХ [24, 25]. Тканевая гетерогенность распределения pO_2 обусловлено различной длиной диффузионного пути кислорода до клеток, расположенных на разном удалении от кровеносных сосудов. Тем более, что в покое функционируют далеко не все капилляры. Поэтому более удаленные от артериол и артериальной части сети капилляров клетки гипоксичны. Такова же участь МХ, расположенных на большем удалении от клеточной поверхности. При значительном повышении функциональной активности тканей возникает несоответствие между относительно медленной и/или недостаточной мобилизацией системы кровообращения и доставки кислорода, с одной стороны, и весьма быстрым переходом клеток и тканей от покоя к активности, с другой. Особенно велики различия в энергопотребности между покоящимися и активными клетками в возбудимых тканях, к которым относятся сердце, скелетные мышцы и, конечно, нервная система. Энергетические затраты в возбудимых тканях могут возрастать быстро и более, чем на порядок. В результате снижается величина тканевого pO_2 , увеличивается количество гипоксических участков и возникают переходящие зоны аноксии. Далее мы остановимся на различиях превращений ЯК в ЦТК при гипоксии и аноксии – анаэробнозе.

Благодаря высокому сродству цитохромоксидазы к кислороду транспорт восстановительных эквивалентов и окислительное фосфорилирование в дыхательной цепи МХ поддерживается даже при глубокой гипоксии. Снижении концентрации кислорода вплоть до 0,4-0,7 мкМ не останавливает функционирование комплексов II, III и IV [26, 27]. Однако редокс состояние дыхательных переносчиков и цитохромоксидазы в тканях оказались более чувствительны к снижению pO_2 [27, 28], чем *in vitro*. В частности, в первые 5 минут тяжелой гипоксии (при концентрации кислорода на уровне 20 мкМ) на изолированных тканевых срезах пиридиннуклеотиды намного более восстановлены, чем другие переносчики дыхательной цепи [28]. Такие же различия зарегистрированы на перфу-

зируемом органа во время перехода от нормоксии к аноксии [29]: в гипоксическом переходном состоянии наблюдалось практически полное восстановление пиридиннуклеотидов при сохранении достаточно высокой степени окисленности флавопротеидов. Как правило, в гипоксических условиях нарушается окисление NAD-зависимых субстратов, значительно прирастает отношение NADH/NAD, создаются предпосылки для преимущественного окисления сукцината [30]. Комплекс I оказался высокочувствительным к действию множества повреждающих факторов и ингибиторам, представленным различными липофильными соединениями [31,32]. Кроме того, комплекс I может терять простетическую флавинмоноклетотидную группу [33, 34]. Под действием образующихся в клетке повышенных концентраций монооксида азота и других нитрозилирующих соединений при кислородном голодании комплекс I переходит из активного состояния A в ингибированное D [35]. Барбитураты, ацетальдегид и ротенон воспроизводят эту ситуацию и позволяют моделировать ее *in vitro*, нацело ингибируя комплекс I и потребление кислорода при окислении NAD-зависимых субстратов, например, β -оксибутирата (рис. 1). Оказалось, что при этом чрезвычайно важно присутствие электрофильных метаболитов таких, как оксалоацетат, и протекание фумаратредуктазной реакции, которые способствуют образованию сукцината путем восстановительного обращения цикла Кребса. Благодаря функционированию комплексов II, III, IV [26, 27, 36] образованный из-за высокого уровня NADH сукцинат тут же окисляется (рис. 1A). Малонат – ингибитор СДГ – перекрывает как окисление сукцината, так и фумаратредуктажную реакцию. По регистрации малонат-чувствительного потребления кислорода в присутствии ротенона и по генерации трансмембранного потенциала $\Delta\Psi$ (рис. 1B) можно в динамике оценить вклад в образование сукцината NAD-зависимых субстратов, например, α -кетоглутарата или смесей субстратов α -кетоглутарата с аспаратом, малата с пируватом и т.п..

Преимущественное окисление сукцината при гипоксии (на фоне высокой степени восстановленности NADH) обеспечивается наличием окисленных флавопротеидов и коэнзима Q и протока восстановительных эквивалентов на терминальном участке дыхательной цепи. Интересно, что

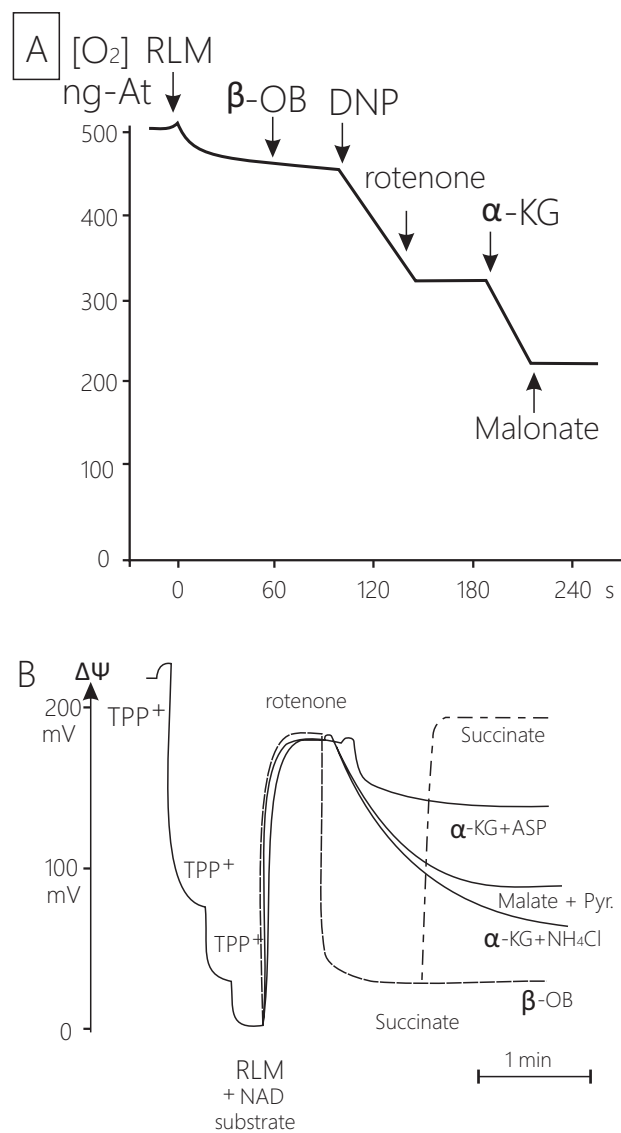


Рис.1 Внесение в суспензию дышащих МХ ротенона подавляет потребления кислорода (А) при окислении β -оксибутирата (β -ОВ). Добавкой α -кетоглутарата (α -КГ) можно легко восстановить дыхание МХ печени (RLM при разобщении окислительного фосфорилирования 2-4-динитрофенолом (ДНФ)). Генерации трансмембранного потенциала наблюдается, несмотря на ротенонный блок (В) в присутствии α -кетоглутарата (α -КГ) с аспаратом (ASP), малата с пируватом или α -кетоглутарата с аммонием. Полноценной трансмембранный потенциал генерируется при окислении добавленного сукцината. Инкубационная среда содержала 250 мМ сахарозы, 10 мМ трис-НCl (рН 7,4), 10 мМ KCl, 3 мМ MgCl₂, 3 мМ KH₂PO₄. Концентрация МХ 3 мг на мл; t 26°C. ДНФ – 30 мкМ, ротенон -10 мкМ, Потребление кислорода регистрировали полярографически. Трансмембранный потенциал измеряли с помощью селективного электрода по изменению концентрации липофильного катиона тетрафенил-фосфония (TPP+).

даже при нормоксии (реально при гипероксии в инкубационной кювете) в 4 состоянии по Чансу-Вильямсу [36] вследствие увеличения степени восстановленности NADH наблюдается преимущественное окисление сукцината, регистрируемое по убыли радиоактивной метки *in vitro* на интактных МХ сердца кролика [37]. В 4 состоянии высокая величина отношения ATP/ADP по механизму дыхательного контроля тормозит поток восстановительных эквивалентов, что и приводит к росту отношения NADH/NAD⁺. В ходе окисления меченного пирувата в МХ обнаруживается непропорциональное снижение концентрации метки в сукцинате (вопреки теоретической стехиометрии ЦТК) в состоянии 4. Напротив, в состоянии 3, когда резко снижаются оба отношения NADH/NAD⁺ и ATP/ADP, непропорционально возрастает накопление метки в сукцинате при ее снижении в интенсивно окисляющихся NAD-зависимых субстратах [37].

В качестве свидетельства преимущественного окисления сукцината *in vivo* в условиях гипоксии может быть расценено почти двукратное падение содержания сукцината в печени крыс, находившихся 30-минут в барокамере «на высоте 8000 м [23]. После пребывания крыс на такой же «высоте» в течение 2-х часов Н.А.Готовым показано значимое снижение концентрации сукцината в крови, печени, сердце и почке, тогда как концентрация NAD-зависимых субстратов возросла вдвое [38]. Косвенным аргументом преимущественного окисления сукцината при произвольной кратковременной, в течение 40 сек, задержке дыхания является аномальное снижение величины дыхательного коэффициента $R = \Delta CO_2 / \Delta O_2$ в первой порции выдыхаемого воздуха до $0,45 \div 0,55$ [39]. При спокойном дыхании величина R у добровольцев достигала $0,95 \div 0,97$. Мы полагаем, что такое падение R отражает окисление субстратов, не подвергающихся декарбоксилированию (при отсутствии сколько-нибудь выраженного дыхательного ацидоза). К таким субстратам, прежде всего, можно отнести сукцинат. Окисление липидов сопровождается снижением R до 0,7. Заметим, что при развитии дыхательного ацидоза величина R может превышать 1,0 вследствие прироста pCO_2 .

Ряд исследователей считает, что именно возможность сохранения окисления сукцината способствует поддержанию окислительного фосфо-

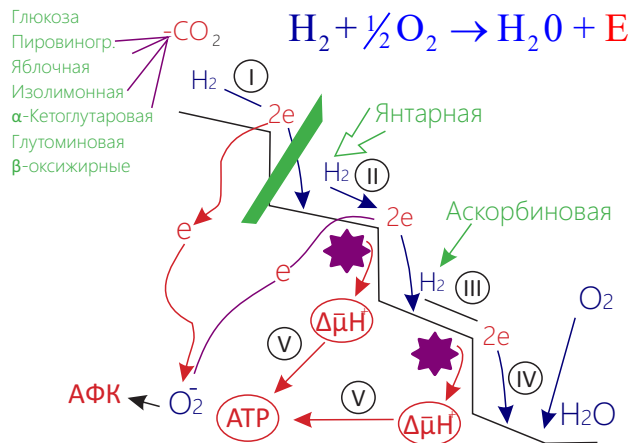


Рис. 2 На фоне гипоксического торможения окисления NAD-зависимых субстратов [26, 27, 35] окисления сукцината сохраняется. СДГ подает пару электронов в дыхательную цепь, независимо от степени восстановленности NADH и функционирования комплекса I. Показано, что энергия, освобождаемая по ходу переноса пары электронов (2e) по дыхательной цепи к кислороду, трансформируется в трансмембранный электрохимический потенциал $\Delta\mu H^+$. С помощью комплекса V – АТФ-синтазы $\Delta\mu H^+$ обеспечивает фосфорилирование АДФ до АТФ. Несмотря на уменьшение величины ATP/O высокая скорость окисления сукцината при сохранении функционирования комплексов II, III, IV и V позволяет сохранять достаточно высокую энергетическую эффективность окислительного фосфорилирования. Показана также одноэлектронная утечка электронов, способствующая генерации супероксида кислорода O_2^- – родоначальника других активных форм кислорода (АФК).

рирования при гипоксии [8, 23, 28, 30, 36, 37,]. Схематическое резюме: торможение при гипоксии окисления NAD-зависимых субстратов на уровне комплекса I и преимущественное окисление сукцината, - представлено на рис. 2.

Представленный материал дает основание полагать, что в условиях гипоксии функциональное нарушение связи NAD-зависимых дегидрогеназ ЦТК с дыхательной цепью и избирательное преимущество окисления сукцината существенным образом изменяют течения редокс реакций в ЦТК. Таким образом, в случае кислородного дефицита сукцинат поддерживает энергопродукцию в МХ.

Анаэробное образование сукцината в митохондриях

В анаэробных условиях в суспензии изолированных МХ также, как и в отключенном от кровотока органе, уже через несколько секунд легко определяется 10-50-кратное накопление сукцина-

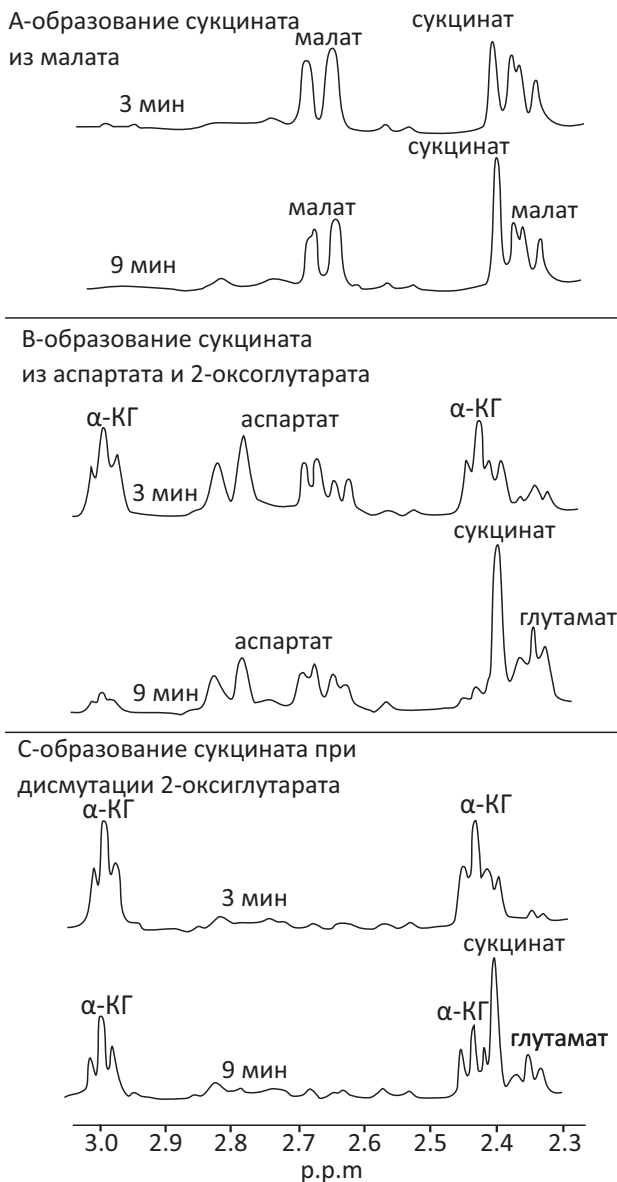


Рис. 3. Спектры Н1-ЯМР при инкубации МХ (16 мг белка в мл) печени крысы с различными субстратами при закрытой дыхательной цепи на уровне комплекса III с помощью антимицина А (0,35 мкг/мг белка МХ). Объем кюветы 0,5 мл, t 26°C. Состав инкубационной среды: 100 мМ КСl, 3 мМ КН₂РO₄, 3мМ MgCl₂, 0,5мМ ЭГТА, 0,4 мМ АDР₂ 0мМ трис-НСl буфера (рН 7,4) и 2,5% D₂O. Субстраты (А – 5 мМ малата, В – 5 мМ аспартата и 5 мМ α-кетоглутарата, С – 5 мМ α-кетоглутарата и 2,5 мМ NH₄Cl. Каждая кривая - результат 90 накоплений за 90 сек. Приведены кривые после 3 и 9 мин инкубации МХ. (Оператор ЯМР-спектрометра М.С. Окон. [50]). Nuclear Magnetic Resonance (NMR) spectroscopy

Таблица 1

Изменение соотношения путей анаэробного образования сукцината в МХ сердца крысы, в процентах от прироста [сукцината] в последовательные промежутки времени

Путь анаэробного образования сукцината	Длительность анаэробноза			
	3 мин	4,5 мин	6 мин	7,5 мин
А. Восстановительное обращение ЦТК	100%	39%	–	–
В. «Сопряженное» окисление α-кетоглутарата	–	51%	–	–
С. Анаэробная дисмутация α-кетоглутарата	–	11%	100%	100%

та [40-47]. П. Хочачка и Сомеро описали всплеск уровня эндогенного сукцината на уровне целого организма у глубоководных животных ныряльщиков и у дайверов [48]. Обычно, в качестве источника сукцината рассматривается восстановительное обращение ЦТК от оксалоацетата.

Мы измерили с помощью Н1-ЯМР-спектроскопии, по методике О.И. Писаренко [40] теоретически возможные пути накопления сукцината при остановленной дыхательной цепи в МХ сердца, печени, коркового слоя почек и головного мозга у крыс и морских свинок [23]. Как ясно из данных, приведенных на рис.3, в исследованных МХ представлены, как минимум, три метаболических пути анаэробного образования сукцината (АОС).

Наиболее известный путь АОС - восстановительное обращение ЦТК от оксалоацета (ОАА) или малата (рис.5 А). Мощным путь АОС представлен сопряженными потоками, когда восстановительное обращение ЦТК поддерживает окислительную часть ЦТК (рис.5 В). И, наконец, в присутствии избытка аммония (порядка 1-1,5 мМ) происходит анаэробная дисмутация α-кетоглутара по Кребсу–Коену [49] (рис 5 С). Приросту концентрации аммония при интенсивной нагрузке способствует в первую очередь дезаминирование адениловых нуклеотидов вследствие энергетического дефицита.

Мы представили на схемах рис.5 анаэробные пути образования сукцината в той последовательности очередности (А, В, С) которая реализуется в МХ независимо от того, из какой ткани они выделены. Первоначально на фоне сохранного окислительного фосфорилирования протекал процесс А. Движущей силой в нем служит высокая степень восстановленности NADH и окислительное фосфорилирование вследствие повышенного уровня АDР и неорганического фосфата. Далее окисление благодаря появлению NAD⁺ включается

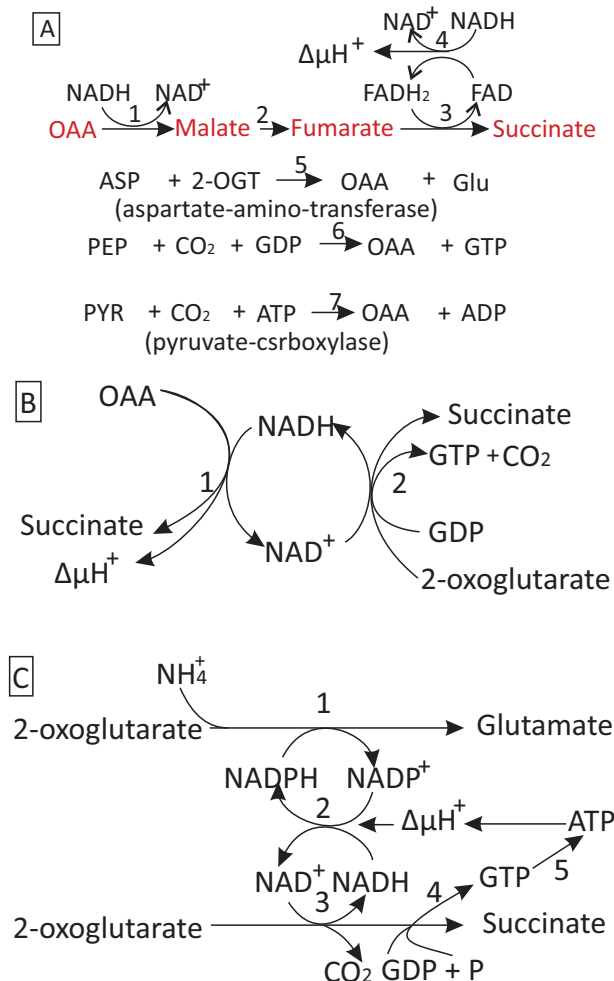


Рис.4 Схемы анаэробного образования сукцината в МХ разных органов Восстановительное обращение ЦТК за счет избытка NADH от оксалоацетата (ОАА) до сукцината (рис. 5 А) идет при участии малатдегидрогеназы (1), фумаразы (2) и СДГ, выполняющей роль фумаратредуктазы (3). В фумаратредуктазной реакции окисляются восстановленный флавопротеид и Коэнзим-Q. Благодаря этому с комплекса I восстановительные эквиваленты переносятся на окисленный Коэнзим-Q и идет окислительное фосфорилирование АТФ (4) [51- 55]. Источником ОАА могут быть аспартат (АСП) в аспаратаминотрансферазной реакции (5), фосфоенолпируват (ФЕП) в фосфоенолпируваткарбокскиназной реакции (6) и пирувата (ПИР) в пируваткарбоксилазной реакции (7). Реакция (6) у крыс на 95% представлена в цитозоле, а у голубей, морских свинок, кроликов и людей практически в равной степени в МХ и в цитозоле. В стрессовых ситуациях активность цитозольной фосфоенолпируваткарбокскиназы существенно возрастает: происходит гормональная индукция синтеза de novo. Рис.5 В (сопряжение двух потоков АОС): восстановительное обращение ЦТК от ОАА до сукцината (1) способствует окислению NADH до NAD⁺, который восстанавливается в обычном течении окислительных реакций ЦТК, в частности, при окислении изоцитрата и α-кетоглутарата до сукцината (2). При этом окислительное фосфорилирование идет также, как при ситуации А в ходе восстановительного обращения ЦТК. Одновременно происходит субстратное фосфорилирование GTP на уровне сукцинил-СоА, образованного в результате окислительного декарбоксилирования α-кетоглутарата. При анаэробной дисмутации α-кетоглутарата (рис. 5 С) [49] в глутаматдегидрогеназной реакции (1) окисляется NAD(P)H вследствие восстановительного аминирования одной молекулы α-кетоглутарата до глутамата. Окисленный NADP⁺ восстанавливается трансгидрогеназой за счет NADH (2). Для этого необходима генерация ΔμH⁺ порядка 100 мВ, почти вдвое меньшего, чем требуется для фосфорилирования АТФ. Окисленный трансгидрогеназой и восстановительным аминированием NAD⁺ способствует окислительному лекарбоксилированию второй молекулы α-кетоглутарата (3) до сукцинил-СоА, который обеспечивает субстратное фосфорилирование (4) GTP. Нуклеозиддифосфаткиназа (5) разряжает малый пул GTP путем переноса фосфата на ADP - образуется АТФ. Возможно, именно этот АТФ тратится на поддержание ΔμH⁺, необходимого для трансгидрогеназной реакции (2).

процесс В. По мере деэнергизации и накопления эндогенного аммония запускается процесс С - анаэробная дисмутация α-кетоглутарата. На примере МХ сердца в таблице 1 приведено типичное соотношение вкладов этих путей в процентах от величины АОС в последовательные промежутки времени при анаэробной инкубации МХ.

Итак, в анаэробных условиях в ЦТК идет образование и накопление сукцината, подобно накоплению лактата в анаэробном гликолизе.

Важно, что в отличие от аноксии при гипоксии, когда имеет место гетерогенность распределения рО₂, одновременно в разных участках могут происходить и АОС, и окисление сукцината. Там, где анаэробно СДГ работает как фумаратредуктаза, восстанавливая фумарат до сукцината. В участках с более высоким рО₂ работает терминальная часть дыхательной цепи, и СДГ функционирует как сукцинат:коэнзим-Q-оксидоредуктаза. Таким образом реализуется фумарат-сукцинатный шунт. Впервые фумарат-сукцинатный шунт был обнаружен между легкими и периферическими тканями при гипоксической экспозиции живот-

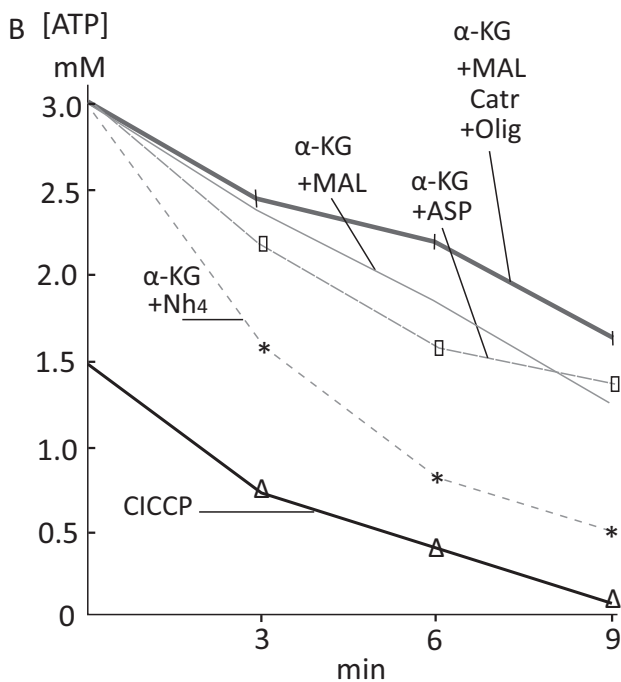
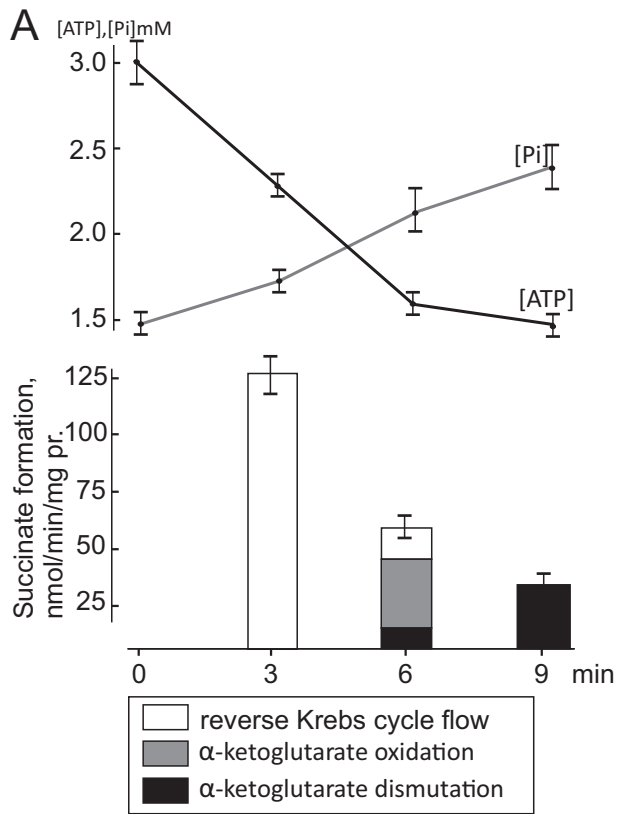


Рис. 5. Изменения энергетического состояния МХ печени крысы при АОС.

А: Динамика [АТФ] и [Pi] в присутствии α -кетоглутара с аспаратом при фиксируемой смене путей АОС. Концентрации АТФ и фосфата рассчитаны по ^{31}P -ЯМР-спектрам.

В: Динамика [АТФ] в суспензии МХ при инкубации в присутствии различных субстратных источников АОС и двух ингибиторов одновременно: 10-5М карбоксиатрактилазида (ингибитора аденилаттрансферазы) и 10-5М олигомицина (ингибитора Н+АТФ-азы). Условия инкубации, как на рис. 4.

ных [54]. Мы полагаем, что такой шунт имеет место между МХ в клетках и между клетками в одной и той же ткани вследствие неоднородности в разных участках уровня pO_2 и степени восстановленности дыхательных переносчиков.

Последствия анаэробного образования сукцината (АОС)

Первоначально АОС в МХ рассматривалось как сугубо адаптивный процесс, способствующий образованию богатых энергией соединений и сохранению в функционирующем состоянии полиферментных систем МХ в отсутствие кислорода. Дополнительным бонусом считалась быстрая ликвидация энергетического дефицита при реоксигенации за счет окисления накопившегося сукцината. Естественно, энергодающая роль АОС в МХ мала и не соответствует даже базовым потребностям собственно МХ в АТФ при остановленной дыхательной цепи (рис.6 А). Энергетической продуктивности АОС достаточно лишь для того, чтобы предотвратить резкое падение отношения АТФ/АДР в течение 3-6 мин при одновременной блокаде аденилаттрансферазы карбоксиатрактилазидом и АТФ-азы МХ олигомицином (рис. 6 В) [50].

По-видимому, в клетках в анаэробных условиях АОС является минорным дополнительным к гликолизу энергетическим источником [23]. В условиях фармакохолодового подавления потребителей энергии в остановленном и отключенном от кровотока сердце (операционная кардиоплегия) положительный вклад АОС в сохранность миокарда весьма заметен [44 - 46].

Реперфузионное повреждение и окисление накопившегося сукцината

Во множестве работ показано, что постишемический всплеск окисления накопленного в сердце сукцината сочетается с взрывным ускорением образования активных форм кислорода (АФК), которые ответственны за развитие постишемических реперфузионных повреждений [56- 62]. Интенсивное образование АФК в момент реперфузии обусловлено быстрым приростом pO_2 . Это способствует свободно-радикальным одноэлектронным утечкам с восстановленных переносчиков - образованию АФК, которое возрастает прямо пропорционально величине pO_2 в широком

диапазоне концентраций кислорода, даже при переходе от нормоксии к гипероксии. Показано, что в полной мере процесс генерации АФК в МХ может быть реализован в том случае, если величина $\Delta\mu\text{H}^+$ превышает 150 mV [58-60]. Однако, оказалось, что уровень $p\text{O}_2$ и величина $\Delta\mu\text{H}^+$ или его электрической $\Delta\psi$ и $\Delta p\text{H}$ компонент не являются ведущими факторами в генерации АФК. Ключевую роль играет высокая степень восстановленности дыхательных переносчиков в комплексах I и III, обеспечиваемых в присутствии кислорода благодаря высокому отношению АТФ/АДФ в состоянии 4 по Чансу-Вильямсу.

Отсюда следует, что в случае окисления сукцината, накапливающегося в избытке после ишемии, ситуация с генерацией АФК далеко не столь проста, как ее представляют во многих работах, включая и упомянутые [57, 58]. Масса работ напрямую связывает избыточную генерацию АФК с окислением избытка сукцината и активной работой СДГ (сукцинатдегидрогеназы, сукцинат:убихинон-оксидоредуктазы) восстановлением в ходе обратного переноса электронов (ОПЭ) комплекса I, а также быстрого нарастания восстановленности компонентов комплексов II и III. Однако, это маловероятная ситуация [62], хотя бы по тому, что к моменту реперфузии множество потребителей АТФ воспроизводят активное состояние 3 – избыток АДФ и даже разобщение окислительного фосфорилирования. В таких условиях невозможно ни поддержание высокого отношения $\text{NAD(P)H}/\text{NAD(P)}^+$, ни удержание высокой величины $\Delta\mu\text{H}^+$. Слишком велики после ишемии деэнергизация и нарушение интактности мембран МХ.

В вышеприведенных экспериментах по АОС нами был оценен фосфорильный потенциал (отношение АТФ/АДФ и пул адениловых нуклеотидов) и сохранность дыхательного контроля (в нашем эксперименте это проявлялось в зависимости скорости АОС от величины отношения АТФ/АДФ в изолированных МХ). Было установлено, что даже *in vitro* в относительно комфортных условиях (закрытая система): без кальциевой перегрузки, без внешних потребителей АТФ, в присутствии избытка субстратов, при сниженной до 26°C температуре, – неизбежно происходит деэнергизация МХ и разобщение окислительного фосфорилирования, прогрессивно нарастающие в течение 9 минут инкубации при остановленной дыхательной цепи

[23]. В клетках тепловая ишемия, реперфузии на фоне не отключенных потребителей энергии, постишемическая кальциевая перегрузка и открывающаяся митохондриальная неспецифическая проницаемая пора (РРТ) препятствуют поддержанию $\Delta\mu\text{H}^+$, высокого отношения NADH/NAD^+ и ОПЭ. Досконально эта ситуация рассмотрена экспериментальных и обзорных работах [60, 61, 62, 63].

Кроме того, имеется пул работ, в которых продемонстрирована защита МХ от перекисного окисления липидов (ПОЛ) мембран за счет окисления сукцината [64]. И, напротив, ингибирование СДГ провоцирует повышение прооксидантной активности МХ [65] и увеличивает образования супероксидных радикалов с последующим развитием апоптоза [66]. *In vitro* экзогенный сукцинат препятствует инактивации СДГ в случае запуска ПОЛ внесением Fe^{2+} [67, 68, 69] и тормозит ПОЛ, индуцированное Fe^{2+} -аденилатным комплексом или потенцируемое старением МХ [70]. Важно отметить, что окисление сукцината более устойчиво к повреждающему действию прооксидантов, чем окисление NAD -зависимых субстратов, в частности α -кетоглутарата (КГ) и пирувата [54]. Следовательно, для установления *in vivo* конкретных условий, в которых окисление избытка сукцината может иметь про- или антиоксидантные последствия необходимы специальные исследования.

Изложенные материал представил метаболические основания применения сукцината и ССК для поддержки энергетического обмена, особенно при гипоксии, а также в качестве антиоксидантного средства. Однако, на этом не может быть завершен анализ роли и эффектов сукцинат. Метаболическая интерпретация базируется на изучении действия достаточно высоких концентраций сукцината *in vitro* и высоких доз сукцината *in vivo*, сопоставимых с теми миллимолярными концентрациями, которые могут оказывать прямое воздействие посредством участия в метаболических процессах. Физиологических оснований для такой интерпретации не так уж много, хотя бы потому, что поступающей через желудочно-кишечный тракт (ЖКТ) сукцинат интенсивно используется эндотелием желудка и кишечника, микрофлорой ЖКТ, печенью и т.д. Следовательно, до митохондрий других тканей могут дойти крайне малые количества экзогенного сукцината. Исследования последних десятилетий существенно обогатили

представления о возможностях воздействия сукцината на организм. Открыта и широко изучается роль внемитохондриального сукцината как стабилизатора цитозольного транскрипционного адаптационного гипоксии-индуцируемого фактора HIF1 α [71]. Установлено, что внеклеточный сукцинат является специфическим лигандом клеточного сукцинатного рецептор SUCNR1 [72], называемого некоторыми исследователями стресс-рецептором. Особая роль сукцинат в метаболизме МХ оказалась востребована и закреплена в процессе эволюции на регуляторном уровне в системах более высокого иерархического уровня. Этот раздел знаний требует отдельного рассмотрения и тщательного анализа.

Заявление о соблюдении этических норм

Проведение научных исследований на человеке и/или на животных полностью соответствуют действующим национальным и международным нормам в области этики.

Конфликт интересов

Не заявлен.

Вклад авторов в работу

Авторы ознакомлены с критериями авторства ICMJE и одобрили конечную версию рукописи.

Список литературы

1. Н.Н. Мошков. Неизвестное об известном. Исцеляющее тепло янтаря. Красота, здоровье и долголетие от природы. Калининград, 2009 г. 148 с.
2. Hager, Hermann Praxis für Apotheker, Ärzte, Drogisten, und Medizinalbeamte. 1816-1897. (Fischer, Bernhard, Hartwich, Carl. Publisher Berlin: J. Springer. 1856-1905)
3. Hagers Handbuch der Pharmazeutischen Praxis. Folgeband 5: Stoffe L-Z. Herausgeber: Bruchhausen, F., Ebel, S., Hackenthal, E., Holzgrabe, U. (Hrsg.). Springer, Berlin. 1999.
4. Battelli F., Stern L, Biochem. Z. 30, 172 (1910). Цит. по В.Х. Мак-Шен Дегидразы. Глава VI p.149-223. В кн. Дыхательные ферменты. Пер. с англ. Под ред. В.А. Энгельгардта (Respiratory enzymes, ed. by H.A. Lardy. 1949) И-Л, М. 1952. 416 с.].
5. Gozsy B., Szent-Gyorgyi A. On the mechanism of primary respiration in pigeon breast muscle. Hoppe Seylers Z. Physiol. Chem. 1934, 224:1-10.

6. Krebs H.A., Johnson W.A. The role of citric acid in intermediate metabolism in animal tissues. Enzymologia. 1937; 4:148-156;]
7. Саратиков А.С., Хазанов В.А., Кондрашова М.Н., Гольдберг Ю.М. Лекарственное средство для лечения ишемии мозга Патент РФ №2 108 095 С1. 10.04.1998]
8. В.А.Исаков, Т.В. Сологуб, А.Л.Коваленко, М.Г. Романцов Реамберин в терапии критических состояний, НТФФ «Полисан» Санкт-Петербург. 2002.
9. Кондрашова М.Н.; Маевский Е.И.; Розенфельд А.С.; Учитель М.Л. Средство для профилактики и лечения метеопатических реакций человека, способ профилактики и лечения этих реакций и лекарственные формы средства. Патент РФ № 2175228. 2001.10]
10. Маевский Е.И., Учитель М.Л. Средство и набор для нормализации функциональных нарушений, возникающих в предклимактерический и климактерический периоды. Патент РФ № 2220712 10.01 2004]
11. Каминский Ю.Г., Косенко Е.А., Маевский Е.И., Кондрашова М.Н., Розенфельд А.С. Средство, обладающее актопротекторной активностью. Патент РФ 2121836. 29.11.1998;
12. E.I. Maevsky. M.V. Kozhurin, .M.E.Maevskaya Formulations and dosage forms for enhancing performance or recovery from stress. № :WO/2019/099731. № международной заявки: PCT/US 2018/061371.Дата публикации: 23.05.2019].
13. Кашлинский А., Мясников Д.Н., Маевский Е.И., Кондрашова М.Н., Учитель М.Л. Средство для снижения алкогольного опьянения, предупреждения и снятия алкогольной интоксикации и похмельного синдрома и способ снижения алкогольного опьянения, предупреждения и снятия алкогольной интоксикации и похмельного синдрома с использованием этого средства. Патент РФ № 2 160 589. Бюл. № 35. 20.12.2000
14. Комиссарова И.А., Гудкова Ю.В., Солдатенкова Т.Д., Бурбенская Н.М. Кондрашова Т.Т., Калантар И.Л., Торопов Ю.М., Семенова Г.Ф., Нарциссов Р.П. Калинина Е.В. Фармацевтическая композиция противопохмельного, стимулирующего энергетический обмен, кислотообразующую и секреторную функцию слизистой желудка, радиопротекторного и противохолерного действия, способ профилактики и лечения алкогольного

- опьянения и алкогольного абстинентного синдрома, способ стимуляции энергетического обмена, способ стимуляции и диагностики кислотообразующей и секреторной функции слизистой желудка и способ защиты от радиационного поражения теплокровных животных. Патент РФ №2 039 556, Опубликовано:20.07.1995.
15. Евглевский А.А., Евглевская Е.П., Рыжкова Г.Ф., Гапусина Н. В., Перекрестова Е.В., Желнин А.Э. Препарат для коррекции обменных процессов и повышения естественной резистентности организма животных. Патент РФ № 2 447 886 Опубликовано: 20.04.2012
16. Терапевтическое действие янтарной кислоты. [Сб. статей] Под ред. проф. М. Н. Кондрашовой. - Пушино: Науч. центр биол. исслед. АН СССР, 1976. 234 с.
17. Митохондриальные процессы во временной организации жизнедеятельности, материалы Всесоюзного семинара «Регуляция Энергетического обмена и физиологическое состояние» [Сборник статей]. НЦБИ АН СССР. Пушино, 1978. 182 с;
18. Янтарная кислота в медицине, пищевой промышленности, сельском хозяйстве [Сборник научных статей] Под ред. М.Н. Кондрашовой, Ю.Г. Каминского, Е.И. Маевского Пушино. Ин-т теорет. и эксперим. биофизики РАН, 1996. 299 с.
19. Chance B., Hollunger G. The interaction of energy and electron transfer reaction in mitochondria. I General properties and nature of the products of succinate-linked reduction and of pyridine nucleotide. *J. Biol. Chem.*, 1961. 236, 5, 1534-1543.
20. Кондрашова М.Н. Биохимический цикл возбуждения. В кн. Митохондрии. Ферментативные процессы и их регуляция. М. Наука. 1968. С. 121-131.
21. Кондрашова М.Н. Роль янтарной кислоты в регуляции физиологического состояния ткани. Докт. дисс. Пушино, 1970.
22. Кондрашова М.Н. (гл. ред.) Регуляция энергетического обмена и устойчивость организма. [Сборник научных статей] НЦБИ АН СССР. Пушино. 1975.
23. Маевский Е.И., А.С. Розенфельд, Е.В. Гришина, М.Н. Кондрашова Коррекция метаболического ацидоза путем поддержания функций митохондрий. Пушино. ИТЭБ РАН 2001. 155 с,
24. Каро К, Педли Т., Шротер Р., Сид У. Механика кровообращения. (С.Г. Caro, Т.Т. Pedley, Р.С. Schroter, W.A. Seed The mechanics of the circulation. Oxford. Oxford University. Press. NY, Toronto. 1978) Пер. с англ. М.: Мир. 1981. 624 с.
25. Джонсон П.К. Периферическое кровообращение. Пер.с англ. М. Медицина, 1982. 440 с.
26. Gnaiger E., Kuznetsov A.V. Mitochondrial respiration at low levels of oxygen and cytochrome c. *Biochem Soc Trans.* 2002; 30(2): 252-8.
27. G. Solaini, A. Baracca, G. Lenaz, G. Sgarbi Hypoxia and mitochondrial oxidative metabolism *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) Bioenergetics.* 2010, V. 1797, Is. 6–7, P. 1171-1177. doi.org/10.1016/j.bbabi.2010.02.011
28. Лукьянова Л.Д., Балмуханов Б.С., Уголев А.Т. Кислородзависимые процессы в клетке и ее функциональное состояние. М. Наука, 1982. 301 с
29. Scholz R., Thurnan R.G., Williamson J.R., Chance B., Bucher T. Flavin and pyridine nucleotide oxidation-reduction changes in perfused rat liver. I. Anoxia and subcellular localization of fluorescent flavoproteins. *J Biol Chem.* 1969. 10;244(9):2317-2324.
30. Кондрашова М.Н., Маевский Е.И., Бабаян Г.И. Адаптация к гипоксии посредством переключения метаболизма на превращения янтарной кислоты. В кн. Митохондрии. Биохимия и ультраструктура. М. Наука. 1973. С.112-129.
31. Ягужинский Л.С., Смирнова Е.Г., Ратникова Л.А., Красинская И.П., Азаренкова Н.А. Гидрофобные площадки ферментов начального участка электронтранспортной системы митохондрий. Докл. АН СССР, 1972, т. 205, № 3, с. 734-737.
32. Ягужинский Л.С., Хосин Ф.М., Колесова Г.М., Смирнова Е.Г. Гидрофобные площадки и электрофильные центры системы окислительного фосфорилирования митохондрий. В кн.: Митохондрии. Биохимия и ультраструктура. М., 1973, с. 24-40
33. Kahl A., Stepanova A., Konrad C., Anderson C., Manfredi G., Zhou P., Iadecola C., Galkin A. Critical Role of Flavin and Glutathione in Complex I-Mediated Bioenergetic Failure in Brain Ischemia/Reperfusion Injury. *Stroke.* 2018 May;49(5):1223-1231. doi: 10.1161/STROKE.AHA.117.019687.
34. Stepanova A., Sosunov S., Niatsetskaya Z., Konrad C., Starkov A.A., Manfredi G., Wittig I., Ten V., Galkin A. Redox-Dependent Loss of Flavin by Mitochondrial Complex I in Brain Ischemia/Reperfusion Injury. *Antioxid Redox Signal.* 2019 Sep 20;31(9):608-622. doi: 10.1089/ars.2018.7693.
35. A. Galkin, A.Y. Abramov, N. Frakich, M.R. Duchon, and S. Moncada Lack of Oxygen Deactivates Mitochondrial Complex I. Implications for ischemic injury? *J. Biol. Chem.* 2009, V. 284, No. 52, pp. 36055–36061. Doi: 10.1074/jbc.M109.054346.

36. B. Chance, G.R. Williams Respiratory enzymes in oxidative phosphorylation/ I-V. J. Bio. Chem. 1955. 217, 1, 383-457.
37. Von Korff R.W. Changes in metabolic control sites of rabbit heart mitochondria. Nature, 1967, v.214. p. 23-26.
38. Волков М.С., Генкин А.М., Маевский Е.И., Глотов Н.А. Глутаминовая кислота. Биохимическое обоснование практического использования. Свердловск. Средне-Уральское кн. изд-во. 1975. 119 с.
39. Maevsky E.I., Zyakun A.M., Rosenfeld A.S., Grichina E.V., Mosyagin L.A. Decrease in the respiratory coefficient is a consequence of predominant oxidation of flavosubstrates in hypoxia. Hypoxia Med. J. 1998. 6. P 49-50.
40. Pisarenko O.I., Khlopkov V.N., Ruuge E.K. A ¹H NMR study of succinate synthesis from exogenous precursors in oxygen-deprived rat heart mitochondria. Biochem. Int. 1986, 12, N 1, p. 145-153.
41. Cascarano I, Ades J. Z., (Y Connor J. D. Hypoxia: a succinate-fumarate electron shuttle between peripheral cells and lung. J. exp. Zool. 1976, v. 198, 149-154.
42. Taegtmeier H. Metabolic response to cardiac hypoxia. Increased production of succinate by rabbit papillary muscles. Circ. Res., 1978, v. 43, p. 808-815.
43. Peuhkurinen K.J., Takala T.E.S., Nuutinen E.M., Hassinen Tricarboxylic acid cycle metabolites during ischemia in isolated perfused rat heart. Am. J. Physiol., 1983, v. 244, H281-H288.
44. Pisarenko O.I., Solomatina E.S., Studneva I.M. et al. Effect of glutamic and aspartic acids on adenine nucleotides, nitrogen compounds and contractile unction during underperfusion of isolated rat heart. J. Mol. Cell. Cardiol., 1983, v. 15, p. 53-60.
45. Sogabe H. Effects of L-malate on ischemic myocardium experimental study. J. Jap. Assoc. Thorac. Surg., 1983, v. p. 1537-1543.
46. Hohl C., Oestreich, Rosen P., Wiesner R., Grieshaber M. Evidens for succinate production by reduction of fumarate during hypoxia in isolated adult rat heart cells. Arch. Biochem. Biophys., 1987, v. 259, 2, p. 527-535.
47. Писаренко О.И., Студнева И.М., Хлопков В.Н., Соломатина, Рууге Э.К. Образование продуктов анаэробного обмена в ишемическом миокарде. Биохимия, 1988, т. 53, (3), с. 491-496.
48. Hochachka P.W., Owen T. G., Allen J. F., Witton G. C. Multiple products of anaerobiosis in diving vertebrates. Comp. Biochem. Physiol., 1975, v. 508, p. 17-22.
49. Krebs HA, Cohen PP. Metabolism of alpha-ketoglutaric acid in animal tissues. Biochem J. 1939 Nov;33(11):1895-1899.
50. Маевский Е.И., Гришина Е.В., Розенфельд А.С., Зякун А.М., Кондрашова М.Н., Верещагина В.М. Анаэробное образование сукцината и облегчение его окисления- возможные механизмы адаптации клетки к кислородному голоданию. Биофиз. 2000, 45, 3,. С. 509-513
51. Hunter F.E. Anaerobic phosphorylation due to a coupled oxidation-reduction between α -ketoglutaric acid and oxalacetic acid. J. Biol. Chem., 1949, v. 177, p. 361-372.
52. Sanadi D.R., Fluharty A.L. On the mechanisms of oxidative phosphorylation. VII. The energy-requiring reduction of pyrine nucleotide by succinate and the energy-yielding oxidation of reduced pyridine nucleotide by fumarate. Biochemistry, 1963, p. 523-528.
53. Wilson M.A., Cascarano J. The energy-yielding oxidation of NADH by fumarate in submitochondrial particles of rat tissues. B.B.A. 1970, v. 216, p. 54-62.
54. J. Cascarano, I.Z. Ades, J.D. O'Connor Hypoxia: A succinate-fumarate electron shuttle between peripheral cells and lung Comparative Physiology and Biochemistry 1976. V.198, 2
55. Grivennikova V.G., Gavrikova E.V., Timoshin A.A., Vinogradov A.D. Fumarate reductase activity of bovine heart succinate-ubiquinone reductase. New assay system and overall properties of the reaction. B.B.A. 1993 Jan v. 1140(3), p. 282-292.
56. E.T. Chouchani, V.R. Pell, E. Gaude, D. Aksentijević, S.Y. Sundier, E.L. Robb, A. Logan, S.M. Nadtochiy, E.N.J. Ord, A.C. Smith, F. Eyassu, R. Shirley, Chou-Hui Hu, A.J. Dare, A.M. James, S. Rogatti, R.C. Hartley, S. Eaton, A.S.H. Costa, P.S. Brookes, S.M. Davidson, M.R. Duchon, K. Saeb-Parsy, M.J. Shattock, A.J. Robinson, L.M. Work, C. Frezza, T. Krieg, and M.P. Murphy Ischaemic accumulation of succinate controls reperfusion injury through mitochondrial ROS Nature. 2014; 15(7527): 431-435.
57. J.L. Martin, A.S.H. Costa, A.V. Gruszczzyk, T.E. Beach, F.M. Allen, H.A. Prag, E.C. Hinchy, K. Mahbubani, M. Hamed, L. Tronci, E. Nikitopoulou, A.M. James, T. Krieg, A.J. Robinson, M.M. Huang, S.T. Caldwell, A. Logan, L. Pala, R.C. Hartley, C. Frezza, K. Saeb-Parsy & M.P. Murphy Succinate accumulation drives ischaemia-reperfusion injury during organ transplantation Nature Metabolism 2019;1:966-974.
58. Grivennikova VG, Vinogradov AD Mitochondrial production of reactive oxygen species Biochemistry (Moscow) 2013 78. 13: 1490-1511 DOI: 10.1134/S0006297913130087

59. Привенникова В.Г., Виноградов А.Д. Генерация активных форм кислорода митохондриями Успехи биологической химии 2013 Том: 53 245-296.
60. S.S. Korshunov, V.P. Skulachev, A.A. Starkov High protonic potential actuates a mechanism of production of reactive oxygen species in mitochondria. FEBS Lett. 1997. 416. p. 15-18.
61. Cadenas S. Mitochondrial uncoupling, ROS generation and cardioprotection. Biochim Biophys Acta Bioenerg. 2018;1859, 9: 940-950. doi: 10.1016/j.bbabi.2018.05.019.
62. R. Moreno-Sanchez, L. Hernandez-Esquivel, N.A. Rivero-Segura, A. Marin-Hernandez, J. Neuzil, S.J. Ralph and S. Rodriguez-Enriquez Reactive oxygen species are generated by the respiratory complex II – evidence for lack of contribution of the reverse electron flow in complex I FEBS Journal 2013. 280. p. 927–938. doi:10.1111/febs.12086.
63. Andrienko T.N., Pasdois P., Pereira G.C., Owens M.J., Halestrap A.P. The role of succinate and ROS in reperfusion injury - A critical appraisal. J Mol Cell Cardiol. 2017 Sep;110:1-14. doi: 10.1016/j.yjmcc.2017.06.016
64. S. Dröse Differential effects of complex II on mitochondrial ROS production and their relation to cardioprotective pre- and postconditioning Biochimica et Biophysica Acta 2013.1827. 578–587
65. Endlicher R., Kriváková P, Rauchová H, Nůsková H, Cervinková Z, Drahoťa Z. Peroxidative damage of mitochondrial respiration is substrate-dependent. Physiol Res. 2009;58(5):685-692.
66. Puntel R.L., Roos D.H., Grotto D., Garcia S.C., Nogueira C.W., Rocha J.B. Antioxidant properties of Krebs cycle intermediates against malonate pro-oxidant activity in vitro: a comparative study using the colorimetric method and HPLC analysis to determine malondialdehyde in rat brain homogenates. Life Sci. 2007. 13; 81 (1):51-62.
67. Dedeoglu A., Ferrante R.J., Andreassen O.A., Dillmann W.H., Beal M.F. Mice overexpressing 70-kDa heat shock protein show increased resistance to malonate and 3-nitropropionic acid. Exp Neurol. 2002;176(1):262-265.
68. L. Tretter, G. Szabados, A. Andó, and I. Horváth, Effect of succinate on mitochondrial lipid peroxidation. 1. Comparative studies on ferrous ion and ADP . Fe/NADPH-induced peroxidation. J.Bioenergetics Biomembranes (1987) 19 (1), 31.
69. G. Szabados, A. Andó, L. Tretter, and I. Horváth, Effect of succinate on mitochondrial lipid peroxidation. 2. The protective effect of succinate against functional and structural changes induced by lipid peroxidation. J.Bioenergetics Biomembranes 1987; 19 (1), 21
70. Е.В. Гришина, Я.В. Хаустова, А.А. Васильева, Е.И. Маевский Возрастные особенности влияния сукцината на индуцированное перекисное окисление липидов митохондрий печени крыс. Биофизика , 2015, 60, 4: 708–715.
71. Wang GL, Yiang B-H, Rue EA, Semenza GL. Hypoxia-inducible factor 1 is a basic-helix-loop-helix-PAS heterodimer regulated by cellular O₂ tension. PNAS USA. 1995; 92: 5510–5514;
72. He W., Miao F.J., Lin D.C., Schwandner R.T., Wang Z., Gao J. et al. Citric acid cycle intermediates as ligands for orphan G-proteincoupled receptors. Nature, 2004, Vol. 429, pp. 188–193.