

УДК 615.327: 612.354.

**ПРЕДИКТОРЫ РЕАЛИЗАЦИИ ТЕРАПЕВТИЧЕСКИХ  
ЭФФЕКТОВ НАТИВНЫХ И МОДИФИЦИРОВАННЫХ ЯНТАРНОЙ  
КИСЛОТОЙ МИНЕРАЛЬНЫХ ВОД ЭССЕНТУКСКОГО ТИПА ПРИ  
МИТОХОНДРИАЛЬНОЙ ДИСФУНКЦИИ В ПЕЧЕНИ  
(ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНЫЕ ИССЛЕДОВАНИЯ)**

В. В. Козлова<sup>1</sup>, Д. И. Поздняков<sup>2</sup>, Т. М. Симонова<sup>1</sup>, Т. М. Товбушенко<sup>1</sup>

<sup>1</sup> Пятигорский научно-исследовательский институт курортологии филиал

Федерального государственного бюджетного учреждения «Северо -  
Кавказский федеральный научно-клинический центр Федерального медико-  
биологического агентства» в г. Пятигорске (ПНИИК ФФГБУ СКФНКЦ  
ФМБА России в г. Пятигорске)

<sup>2</sup> Пятигорский медико-фармацевтический институт – филиал  
Волгоградского государственного медицинского университета Министерства  
Здравоохранения России

**Ключевые слова:** минеральные воды, янтарная кислота, эксперимент, крысы, респирометрия митохондрий, гликолиз, токсическое поражение формалином и этиловым спиртом.

**Аннотация.** Изучена эффективность коррекции метаболических нарушений, вызванных моделированием подострого поражения печени формальдегидом и этиловым спиртом в экспериментальном исследовании на животных – крысах линии Вистар, курсовыми приемами нативных и модифицированных янтарной кислотой минеральных вод (МВ) источников Эссентукского типа (Эссентуки -17 и Эссентуки-Новая). Выявлено, что наиболее существенное улучшение респирометрической функции митохондрий и стимуляция процессов гликолиза в условиях подострого токсического поражения печени по всем изучаемым показателям наблюдаются при использовании модифицированных янтарной кислотой МВ Эссентуки-17 и Эссентуки-Новая.

**PREDICTORS OF THE THERAPEUTIC EFFECTS OF NATIVE AND SUCCINIC ACID-MODIFIED MINERAL WATER (ESSENTUKI TYPE) WHIS MITOCHONDRIAL HEPATIC DYSFUNCTION (EXPERIMENTAL STUDIES)**

V.V. Kozlova<sup>1</sup>, D.I. Pozdnyakov<sup>2</sup>, T.M. Simonova, T.M. Tovbushenko<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Pyatigorsk scientific research Institute of resort study - a branch of the Federal state budgetary institution of the North-Caucasian Federal scientific and clinical center FMBA of Russia in Pyatigorsk.

<sup>2</sup>Pyatigorsk medico-pharmaceutical Institute – a branch of the Volgograd state medical University Ministry of Health of Russia

**Keywords:** mineral waters, succinic acid, experiment, rats, mitochondrial respirometry, glycolysis, toxic damage by formalin and ethyl alcohol.

**Annotation.** The article presents the results of an experimental study on Wistar rats to correct metabolic disorders caused by modeling of subacute hepatic damage by formaldehyde and ethyl alcohol, course methods of native and modified succinic acid mineral water sources of the Essentuki type (Essentuki -17 and Essentuki-New). The most significant improvement in the respirometric and stimulation of glycolysis processes in conditions of subacute toxic damage in all studied parameters are observed when using modified succinic acid mineral water Essentuki-17 and Essentuki-New.

**Актуальность.** Митохондриальная дисфункция представляет собой неспецифический механизм повреждения клеток, который связан с нарушением структурно-функциональной целостности митохондрий, приводящей к изменениям филогенетически отработанной системы всей «энергетической станции» в клетке [1,2]. В сложившихся условиях отмечается ухудшение синтеза макроэргических соединений, активация апоптоза и окислительного стресса, что, в свою очередь, может инициировать вторичный каскад патогенетических реакций, приводящих к клеточному повреждению [5,6,8]. Напротив, сохранение митохондриальной функции препятствует поражению метаболически активных органов, к которым относится и печень [3,7].

Общеизвестно, что в реализации терапевтических эффектов минеральных вод (МВ) при гастродуоденальных заболеваниях заложены гастропротективные механизмы их воздействия. Выявлено, что лечебно-профилактический потенциал мало минерализованных МВ можно «усилить» за счет введения в их состав различных биологически активных компонентов, регулирующих и оптимизирующих энергетический обмен, таких как янтарная кислота (ЯК). В механизмах действия ЯК как промежуточного звена в цикле

Кребса заложена способность частичного шунтирования I митохондриального дыхательного комплекса посредством донирования электронов непосредственно к II комплексу, что напрямую связано с высокой эффективностью использования ЯК при лечении митохондриальных дисфункций [5].

В связи с этим, весьма интересным как в теоретическом, так и в клиническом плане является поиск и раскрытие универсальных механизмов цитопротекторного влияния модифицированных ЯК минеральных вод региона Кавказские Минеральные Воды, позволяющих защитить структурную целостность и функциональную активность клеток печени [4]. Вместе с тем, исследований в этом направлении пока не проводилось.

**Цель исследования.** Изучение состояния дыхательной функции митохондрий печени и параметров гликолиза после коррекции метаболических нарушений, вызванных моделированием подострого поражения печени формальдегидом и этиловым спиртом, курсовыми приемами нативных и модифицированных ЯК минеральных вод источников Эссентукского типа (Эссентуки -17 и Эссентуки-Новая).

**Методы и организация исследования.** Исследование проводили на 72 крысах-самцах линии Вистар, 3-х месячного возраста, находящихся на стандартном рационе питания гранулированным кормом. Условия содержания и проведение манипуляций с крысами соответствовали требованиям СП 2.2.1.3218-14 «Санитарно-эпидемиологические требования к устройству, оборудованию и содержанию экспериментально-биологических клиник (вивариев)»; ГОСТ 33215-2014 Руководство по содержанию и уходу за лабораторными животными» и Европейской конвенции по защите позвоночных животных, используемых в экспериментальной и научной практике (ETS № 123, Страсбург, 1986).

Подострое токсическое поражение печени моделировали введением 40% раствора формальдегида - per os в дозе 0,2 мл на 100 г массы животного, через день, сочетая со свободным поением 10% раствором этилового спирта ежедневно, в течение 21 дней.

Курсовое зондовое введение исследуемых факторов проводили в утренние часы до кормления животных в течение 21 дня здоровым крысам и животным после воспроизведения патологической модели, из расчета 1,5 мл воды на 100г массы. ЯК (в форме порошка) растворяли в водопроводной воде и в МВ из расчета 1г ЯК на 100 мл воды.

На 43 день эксперимента животных декапитировали под хлоралгидратным наркозом (350 мг/кг), производя забор печени, после чего её гомогенизировали в механическом гомогенизаторе Поттера в среде выделения

(1 ммоль ЭДТА, 215 ммоль маннита, 75 ммоль сахарозы, 0,1% раствор БСА, 20 ммоль HEPES, с pH 7,2). Для получения популяции клеток гомогенат биообразцов печени центрифугировали 3 минуты в режиме 1400 g при t 4°C. Супернатант переносили в градуированные пробирки; для получения нативных митохондрий супернатант дополнительно центрифугировали при 13000g в течение 10 мин, после чего удаляли надосадочную жидкость.

Анализ состояния дыхательной функции митохондрий печени проводили на отечественной системе лабораторного респирометра АКПМ1-01Л (Альфа-Бассенс, РФ) с использованием протокола анализа SEAHORSE. Общую оценку митохондриальной функции печени оценивали по изменению уровня потребления кислорода в среде, в результате последовательного введения разобщителей клеточного дыхания: 1. олигомицина 1µг/мл; 2. 4-(трифлуорометокси) фенил гидразоно) малонитрила (FCCP) 1µг/мл; 3. ротенона 1µМ; 4. натрия азиды 20 ммоль.

По результатам измерений рассчитывали АТФ-генерирующую способность (по разнице потребления кислорода после добавления FCCP и олигомицина), максимальный уровень дыхания (по разнице потребления кислорода после добавления FCCP и ротенона) и респираторную емкость (учитывая разницу потребления кислорода после FCCP и базальным уровнем кислорода в среде).

Активность процессов гликолиза оценивали при использовании в качестве субстрата окисления глюкозу в ходе регистрации потребления кислорода в условиях последовательного добавления в среду: 1. глюкозы 15 ммоль/л; 2. олигомицина 1мкМ/мл; 3. азиды натрия 1 мМ/мл. Состояние анаэробного обмена оценивали по расчетным значениям интенсивности гликолиза (разница потребления кислорода после добавления глюкозы и базальным уровнем), гликолитической емкости (разница потребления кислорода в результате добавления олигомицина и глюкозы) и гликолитического резерва (разница потребления кислорода в результате добавления глюкозы и азиды натрия). Определение базального уровня скорости потребления кислорода (СПК) проводили посредством внесения в супернатант печени комбинации разобщителей митохондриального дыхания ротенона(1мкМ/мл) /антиномицина А (1мкМ/мл) и подавителя анаэробной реакции 2-дезоксиглюкозы (15 ммоль/л). Объем анализируемого биообразца составлял 275 µл, вводимых анализаторов – 25 µл. Потребление кислорода определяли в ppm.

Обработку данных производили с применением пакета статистического анализа «STATISTICA 6.0». Сравнение групп средних производили методом «ANOVA» с пост-тестом Ньюмена-Кейсла при p <0,05.

**Результаты исследований** Исследования по оценке СПК позволяют определять функциональную способность всей дыхательной цепи в изолированных митондриях. В неповрежденных митохондриях транспорт электронов измеряется по потреблению кислорода (дыхание) и образованию АТФ (окислительное фосфорилирование), характеризуя связь протон-движущей силой и протонным градиентом между наружной и внутренней мембранами митохондрий [1,2].

Проведенная оценка респирометрической функции митохондрий печени животных с применением токсинов - разобщителей клеточного дыхания привела к достоверным изменениям уровня потребления кислорода в процессе окислительного фосфорилирования (рисунок 1). Использование специфических митохондриальных ингибиторов позволило изолировать компоненты дыхательной цепи в митохондриях, различно участвующих в потреблении кислорода.

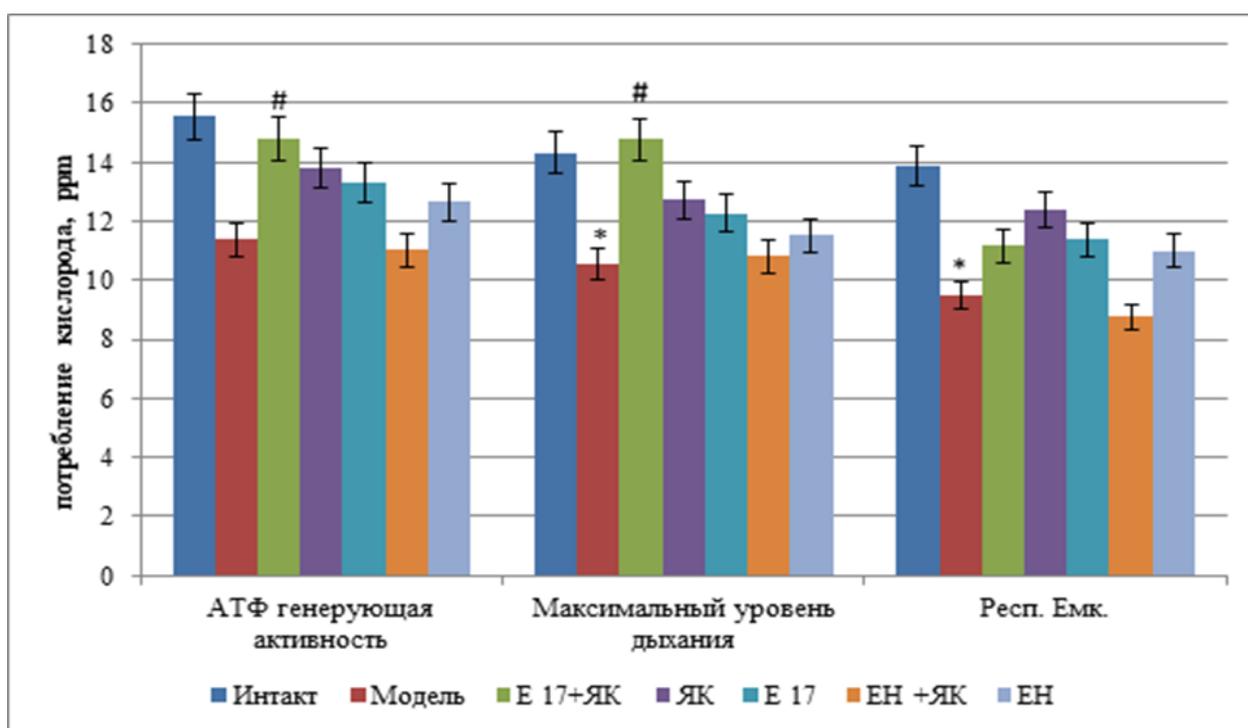


Рисунок 1. Общая оценка респирометрической функции митохондрий в условиях подострого токсического поражения формалином и этиловым спиртом.

Примечание: \* – статистически значимо относительно группы интактных животных (критерий Ньюмена-Кейсла,  $p < 0,05$ ); # – статистически значимо относительно патологической модели (критерий Ньюмена-Кейсла,  $p < 0,05$ )

Начальной точкой при определении АТФ - генерирующей способности митохондрий было измерение базального уровня дыхания, которое включает в себя процессы митохондриального и немитохондриального потребления кислорода. Основными компонентами для определения базального уровня

дыхания являются поток  $H^+$ , приводящий как к обороту АТФ посредством прохождения через  $F_1$ ,  $F_0$  субъединицы АТФ-синтазы, а также воздействующий на субстраты посредством их окисления [2].

Достоверные результаты получены при определении АТФ - генерирующей способности митохондрий у крыс с патологией относительно интактных животных (снижение на 23%,  $p < 0,01$ ). Полученные результаты указывают как на повышение потребления АТФ, так и на нарушения в синтезе АТФ, транспорта адениннуклеотидов или фосфата между митохондриальным матриксом и цитоплазмой, на ухудшение работы дыхательной цепи и снижение немитохондриального потребления кислорода.

Моделирование патологии привело к значительному уменьшению респираторной емкости митохондрий - на 23% ( $p < 0,01$ ), нарушая протонный ток через снижение митохондриального потребления кислорода посредством утечки  $H^+$  через внутреннюю мембрану, и оказывая влияние на процесс окисления субстратов. Такие изменения в коэффициенте респираторной емкости чаще всего сопровождаются повышением немитохондриального потребления кислорода.

При изучении влияния курсового поения нативными МВ и МВ, модифицированными ЯК (ММВ) на АТФ-генерирующую способность митохондрий, наблюдалось повышение этого расчетного коэффициента на 30% ( $p < 0,01$ ) относительно результатов патологического контроля. Несколько слабее показало себя курсовое поение 1%-м раствором янтарной кислоты в водопроводной воде (на 21%,  $p < 0,05$ ) и нативной МВ Эссендуки -17 (на 17%,  $p < 0,05$ ), относительно ММВ. При сравнительном анализе степени курсового воздействия нативной МВ Эссендуки-Новая и 1% раствора ЯК относительно патологического контроля наблюдалось незначительное преобладание (на 8%) последней. Увеличение этого коэффициента после применения 1% раствора ЯК в водопроводной воде по силе влияния оказалось более выраженным (выше на 25%  $p < 0,01$ ) в сравнении с ММВ Эссендуки – Новая относительно патологии.

Расчетная АТФ-генерирующая способность митохондрий в очередной раз доказала преимущества курсового воздействия нативной МВ Эссендуки-17 ( $p < 0,001$ ) по отношению к нативной МВ Эссендуки - Новая ( $p < 0,05$ ) относительно интактных животных.

Таким образом, все изучаемые факторы воздействия приводили к снижению потребления АТФ в митохондриях, повышению синтеза АТФ, увеличивая транспорт адениннуклеотидов или фосфата между митохондриальным матриксом и цитоплазмой, усиливая работу дыхательной цепи.

Курс 1% раствора ЯК в водопроводной воде практически восстановил респираторную емкость митохондрий, повысив этот коэффициент практически до уровня интактных значений. Применение нативной и модифицированной ЯК МВ Эссендуки - 17 менее эффективны, но по силе воздействия на этот коэффициент были практически одинаковы, оставляя преимущество перед нативной МВ Эссендуки - 17 (на 20%,  $p < 0,05$ ) по отношению к референтным цифрам.

Модификация ЯК МВ Эссендуки-Новая снизила респираторную емкость относительно нативной МВ на 26% ( $p < 0,01$ ), и практически не оказала влияния на изменения этого расчетного коэффициента для МВ Эссендуки- 17 (рисунок 1).

Наибольшие различия по сравнению с патологической моделью наблюдались после курса ММВ Эссендуки-17 ( $p < 0,01$ ), превосходя по силе воздействие курса водного раствора ЯК.

Следующим этапом наших исследований была оценка гликолитических процессов клетках печени (рисунок 2). Моделирование патологии приводило к повышению интенсивности гликолиза в 4,5 раза ( $p < 0,0001$ ) по сравнению с группой интактных животных, что характеризует преобладание анаэробного пути утилизации субстратов, способствующее развитию лактат-ацидоза [4]. В то время как уровни гликолитического резерва и гликолитической емкости снизились в 9,1 раз ( $p < 0,0002$ ) и на 33,3% ( $p < 0,01$ ), соответственно.

Применение ЯК в качестве фактора коррекции после моделирования патологии у крыс приводило к снижению интенсивности гликолиза в 2,95 раз ( $p < 0,001$ ) в сравнении с контролем, оставаясь повышенной на 51% ( $p < 0,001$ ) от значений интактных крыс. ЯК способствовала повышению гликолитической емкости в 4,57 раз ( $p < 0,001$ ), которая полностью не восстановилась и оставалась в 2 раза ниже интактных значений. Наилучшие результаты получены для показателя гликолитический резерв в супернатанте печени, который после курса ЯК повысился в 2,96 раз ( $p < 0,001$ ), на 51% ( $p < 0,00$ ) превышая интактные показатели. ЯК способствовала повышению гликолитической емкости в 4,57 раз ( $p < 0,001$ ), полностью восстановив утраченный резерв.

В условиях патологии коррекция нативными МВ приводила к снижению интенсивности процессов гликолиза в обеих группах экспериментальных животных: в 2,1 раза ( $p < 0,001$ ) для МВ Эссендуки-Новая и в 2,4 раза ( $p < 0,001$ ) для Эссендуки-17; однако еще превосходила аналогичный показатель относительно интактной группы животных: в 2,1 раза ( $p < 0,001$ ) для МВ Эссендуки-Новая, и в 1,86 раза ( $p < 0,001$ ) для Эссендуки-17. Эти изменения наблюдались на фоне снижения гликолитической емкости и гликолитического

резерва в 4,9 раз ( $p < 0,001$ ) и в 2,3-3 раза ( $p < 0,001$ ) соответственно для обеих МВ.

Причем, курсовой прием МВ Эссенуки-Новая привел к увеличению гликолитического резерва до интактных значений, а курс МВ Эссенуки-17 способствовал повышению этого показателя в меньшей степени, не доходя до уровня здоровых крыс на 22,6% ( $p < 0,01$ ).

Модификация янтарной кислотой МВ эссенуковского типа способствовала уменьшению интенсивности гликолиза в супернатанте печени у крыс, снижая этот показатель в 7,3 раза ( $p < 0,001$ ) для МВ Эссенуки-17, и в 2,1 раза ( $p < 0,001$ ) для Эссенуки - Новая. ММВ Эссенуки -17 по влиянию на интенсивность гликолиза среди изучаемых вариантов модификаций оказалась наиболее эффективной, на уровне 38,8% ( $p < 0,001$ ) ниже референтных показателей (рисунок 2).

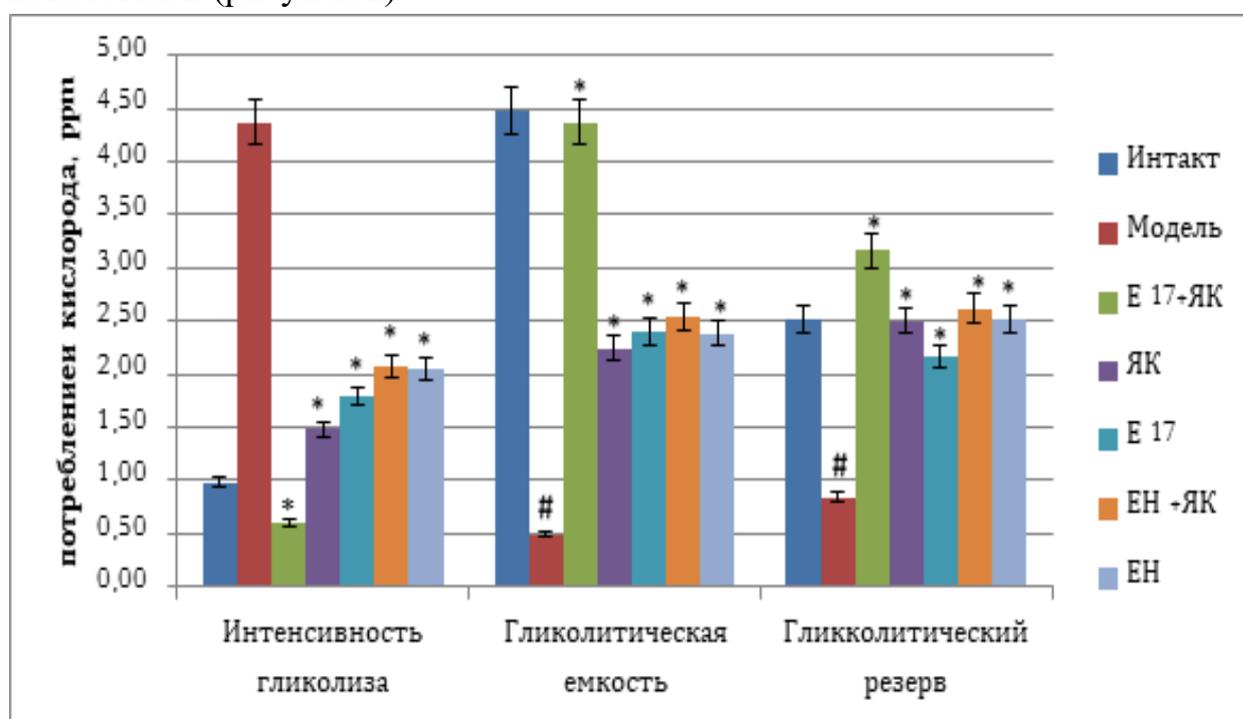


Рисунок 2. Оценка гликолитической функции в супернатанте печени в условиях подострого токсического поражения формалином и этиловым спиртом.

Примечание: # – статистически значимо относительно группы интактных животных (критерий Ньюмена-Кейсла,  $p < 0,05$ ); \* – статистически значимо относительно патологической модели (критерий Ньюмена-Кейсла,  $p < 0,05$ )

Такая же направленность отмечалась и для показателя гликолитической емкости. Курсовой прием ММВ Эссенуки-17 полностью восстановил гликолитическую емкость, повышая ее в 8,72 раза ( $p < 0,001$ ), в отличие от курса МВ Эссенуки–Новая, при котором повышение гликолитической емкости наблюдалось только в 5,2 раза ( $p < 0,001$ ). На фоне наблюдаемых патологических процессов величина гликолитического резерва изменялась не

так значительно: повышение значений в 3,8 раз ( $p < 0,001$ ) отмечены при курсовом поении экспериментальных животных ММВ Эссендуки-17, и в 3,1 раза ( $p < 0,001$ ) - при курсовом поении ММВ Эссендуки-Новая.

### **Выводы:**

1. Полученные экспериментальные данные свидетельствуют о существенном подавлении митохондриальной дыхательной цепи в условиях подострого токсического поражения печени, которое сопровождается снижением АТФ-синтетической способности митохондрий и интенсификацией процессов гликолиза, о чем свидетельствуют уменьшение максимального уровня дыхания, респираторной емкости и АТФ-генерирующей способности митохондрий, достоверное снижение гликолитической емкости и гликолитического резерва относительно интактных крыс.

2. Курсовое использование ЯК в растворе и модифицированных МВ Эссендуки-17 и Эссендуки-Новая повышает дыхательную функцию митохондрий, нивелирует развивающийся энергодефицит в клетках печени и сопряженные с ним механизмы клеточного повреждения в условиях интоксикации.

4. Наиболее существенное улучшение респирометрической функции митохондрий и стимуляция процессов гликолиза в условиях подострого токсического поражения печени по всем изучаемым показателям наблюдаются при использовании модифицированных янтарной кислотой МВ Эссендуки-17 и Эссендуки-Новая.

### **Список литературы**

1. Воронков А.В. Оценка респирометрической функции митохондрий в условиях патологий различного генеза / А.В. Воронков, Д.И. Поздняков, С.А. Нигарян, Е.И. Хури, К.А. Мирошниченко, А.В. Сосновская, Е.А. Олохова // Фармация и фармакология. - 2019. - 7 (1). - С. 20-31.

2. Воронков А.В. Митохондриальная дисфункция при нейродегенеративных и ишемических поражениях головного мозга. / А.В. Воронков Д.И. Поздняков, С.Л. Аджихметова, Н.М. Червонная, Э.Т. Оганесян, Е.А. Олохова. // Экспериментальные и клинические аспекты: монография - Казань: Бук, 2020. - 198 с.

3. Назарова Л.Е., Исследование цитопротекторной активности кислоты феруловой: Автореф. дисс. ... доктора фарм. наук. - 2011. - 37с.

4. Репс В.Ф. Биологические эффекты и основные направления модификации минеральных вод региона Кавказские Минеральные Воды / В.Ф.

Репс, М.Е. Котова, С.Е. Беловодова // Современная наука и инновации, 2017. - №4 (20). - С.205-209.

5. Эскина К.А. Влияние силимарина и янтарной кислоты на метаболические нарушения при экспериментальном сахарном диабете: Автореф. дис. ...на канд. мед. Наук. - 2007. - с.23

6. Lerner C.A., Mitochondrial redox system, dynamics, and dysfunction in lung inflammaging and COPD/ C.A. Lerner, I.K. Sundar, I. Rahman // Int J Biochem Cell Biol. – 2016. – Vol. 81 (Pt B). – P. 294–306.

7. Zorov D.B., Mitochondrial reactive oxygen species (ROS) and ROS-induced ROS release / D.B. Zorov, M. Juhaszova, S.J. Sollott // Physiol Rev. – 2014. – Vol. 94, №3. – P. 909–950.

#### References

1. Voronkov A.V. Assessment of the respirometric function of mitochondria under conditions of pathologies of various origins / A.V. Voronkov, D.I. Pozdnyakov, S.A. Nigaryan, E.I. Khuri, K.A. Miroshnichenko, A.V. Sosnovskaya, E.A. Olokhova // Pharmacy and Pharmacology. - 2019. - 7 (1). - p. 20-31.

2. Voronkov A.V. Mitochondrial dysfunction in neurodegenerative and ischemic brain damage. / A.V. Voronkov, D.I. Pozdnyakov, S.L. Adzhiakhmetova, N.M. Chervonnaya, E.T. Hovhannisyan, E.A. Olokhova. // Experimental and clinical aspects: monograph / [A.V. Voronkov et al.]. - Kazan: Buk, 2020. - 198 p.

3. Nazarova LE, Study of the cytoprotective activity of ferulic acid: Abstract. diss. ... doctors farm. sciences. - 2011. - 37s.

4. Reps V.F. Biological effects and the main directions of the modification of mineral waters of the Caucasian Mineral Water region / V.F. Reps, M.E. Kotova, S.E. Belovodova // Modern Science and Innovation, 2017.- No. 4 (20) .- P.205-209.

5. Eskina K.A. The effect of silymarin and succinic acid on metabolic disorders in experimental diabetes mellitus: Abstract. dis. ... for cand. honey. Science. - 2007.-.-P.23.

6. Lerner C.A., Mitochondrial redox system, dynamics, and dysfunction in lung inflammaging and COPD / C.A.Lerner, I.K.Sundar, I.Rahman // Int J Biochem Cell Biol. – 2016. – Vol. 81 (Pt B). – P. 294–306.

7. Zorov D.B., Mitochondrial reactive oxygen species (ROS) and ROS-induced ROS release/ D.B.Zorov, M.Juhaszova, S.J. Sollott // Physiol Rev. – 2014. – Vol. 94, №3. – P. 909–950.

**Сведения об авторах:** **Дмитрий Игоревич Поздняков** - кандидат фармацевтических наук, доцент кафедры фармакологии с курсом клинической фармакологии Пятигорского медико-фармацевтического института – филиала ФГБОУ ВО «Волгоградский государственный медицинский университет» МЗ

РФ, [pozdniackow.dmitry@yandex.ru](mailto:pozdniackow.dmitry@yandex.ru); **Виктория Вячеславовна Козлова** – кандидат фармацевтических наук, заведующий Отделом изучения механизмов действия физических факторов ПНИИК ФФГБУ СКФНКЦ ФМБА России, [viktoriai-kv@bk.ru](mailto:viktoriai-kv@bk.ru); **Татьяна Михайловна Симонова** – кандидат медицинских наук, главный научный сотрудник отдела восстановительной гастроэнтерологии ПНИИК ФФГБУ СКФНКЦ ФМБА России, [simonova-vrach@mail.ru](mailto:simonova-vrach@mail.ru); **Татьяна Михайловна Товбушенко** – кандидат медицинских наук, заместитель руководителя по научной работе ПНИИК ФФГБУ СКФНКЦ ФМБА России, [tovbush@yandex.ru](mailto:tovbush@yandex.ru).