



Коваленя Т.А.¹, Кирко С.Н.², Белоновская Е.Б.², Кузьмицкая И.А.², Лапшина Е.А.¹,
Островская О.Б.³, Заводник И.Б.¹✉

¹ Гродненский государственный университет имени Янки Купалы, Гродно, Беларусь

² Институт биохимии биологически активных соединений Национальной академии наук Беларуси, Гродно, Беларусь

³ Гродненский государственный медицинский университет, Гродно, Беларусь

Протекторный эффект флавоноида нарингина при алкогольной кардиомиопатии у крыс

Конфликт интересов: не заявлен.

Вклад авторов: Коваленя Т.А. – дизайн исследования; Лапшина Е.А. – обзор литературы, редактирование; Заводник И.Б. – концепция исследования, редактирование; Белоновская Е.Б. – дизайн исследования; Кирко С.Н. – дизайн исследования; Кузьмицкая И.А. – дизайн исследования; Островская О.Б. – дизайн исследования.

Подана: 05.06.2023

Принята: 13.11.2023

Контакты: zavodnik_il@mail.ru

Резюме

Введение. Алкогольная кардиомиопатия, развивающаяся в результате длительного потребления алкоголя, представляет серьезную медико-социальную проблему.

Цель. Оценить роль митохондриальной дисфункции в развитии алкогольной кардиомиопатии у крыс и выяснить возможный кардиопротекторный эффект флавоноида нарингина при алкогольной кардиомиопатии *in vivo*.

Материалы и методы. Алкогольную интоксикацию крыс-самцов линии Вистар вызывали путем длительного введения этанола (8 недель, 4 г/кг массы) в/ж, нарингин вводили ежедневно в дозе 40,0 мг/кг массы животного. Структуру митохондрий кардиомиоцитов анализировали методом электронной микроскопии, респираторную активность изолированных митохондрий сердца крыс определяли методом полярографии, биохимические параметры сыворотки крови регистрировали, используя тест-наборы НТПК «АНАЛИЗ Х» (Беларусь, Минск).

Результаты. Длительное введение этанола вызывало выраженный цитолиз клеток печени, что регистрировали по возрастанию активности маркерных ферментов в сыворотке крови, накоплению билирубина и триглицеридов, нарушению респираторной активности, диссипации митохондриального мембранного потенциала, повышению чувствительности митохондрий кардиомиоцитов к кальций-индуцируемому формированию пор высокой проницаемости. Введение флавоноида нарингина частично препятствовало развитию токсического эффекта этанола у крыс и восстанавливало респираторную активность митохондрий кардиомиоцитов и их чувствительность к Ca^{2+} . Внесение ионов экзогенного кальция в суспензию изолированных митохондрий сердца крыс *in vitro* индуцировало значительное возрастание гетерогенности митохондрий в результате Ca^{2+} -зависимого открытия митохондриальных пор высокой проницаемости.

Заключение. Обнаруженные функциональные нарушения митохондрий клеток сердца при длительном употреблении алкоголя могут явиться причиной нарушения



энергетики сердечной мышцы, что вносит вклад в прогрессирование алкогольной кардиомиопатии. Введение нарингина предотвращало функциональные нарушения митохондрий кардиомиоцитов крыс при интоксикации *in vivo* и воздействии ионов кальция на митохондрии *in vitro*.

Ключевые слова: алкогольная кардиомиопатия, митохондрии, сердце, флавоноид нарингин, респираторная активность

Kavalenia T.¹, Kirko S.², Belonovskaya E.², Kuzmitskaya I.², Lapshina E.¹, Astrowskaja A.³,
Zavodnik I.¹✉

¹ Yanka Kupala State University of Grodno, Grodno, Belarus

² Institute of Biochemistry of Biologically Active Compounds of the National Academy of Sciences of Belarus, Grodno, Belarus

³ Grodno State Medical University, Grodno, Belarus

Protective Effect of the Flavonoid Naringin in Alcoholic Cardiomyopathy in Rats

Conflict of interest: nothing to declare.

Authors' contribution: Kavalenia T. – design of investigation; Lapshina E. – literature review, edition; Zavodnik I. – conceptualization of investigation, edition; Belonovskaya E. – design of investigation; Kirko S. – design of investigation; Kuzmitskaya I. – design of investigation; Astrowskaja A. – design of investigation.

Submitted: 05.06.2023

Accepted: 13.11.2023

Contacts: zavodnik_il@mail.ru

Abstract

Purpose. Alcoholic cardiomyopathy (ACM), which develops as a result of prolonged alcohol consumption, is a serious medical and social problem. The purpose of this work was to evaluate the role of mitochondrial dysfunction in the development of ACM in rats and to study the possible cardioprotective effect of the flavonoid naringin during ACM *in vivo*.

Materials and methods. Alcoholic intoxication in male Wistar rats was induced by long-term administration of ethanol (8 weeks, 4 g/kg of body weight). Naringin was administered daily at a dose of 40.0 mg/kg of body weight. Cardiomyocyte mitochondria structure was analyzed by the method of electron microscopy, the respiratory activity of isolated rat heart mitochondria was determined using polarography, and the biochemical parameters of rat blood serum were recorded applying test kits Analyz X (Belarus, Minsk).

Results. Long-term administration of ethanol caused a pronounced cytolysis of liver cells, which was recorded by an increase in marker enzyme activities in the blood serum and accumulation of bilirubin and triglycerides, impaired respiratory activity, dissipation of the mitochondrial membrane potential, and an increase in the sensitivity of cardiomyocyte mitochondria to calcium-induced formation of high permeability pores. The administration of naringin partially prevented the development of the toxic effects of ethanol in rats and restored the respiratory activity and sensitivity to Ca^{2+} of cardiomyocyte mitochondria. Exogenous calcium induced a significant increase in heterogeneity of isolated rat heart mitochondria as a result of Ca^{2+} -dependent opening of high-permeability mitochondrial pores.

Conclusion. The functional disorders of heart mitochondria under prolonged alcohol intoxication cause impairment in the energetics of the heart muscle, which contributes to progression of alcoholic cardiomyopathy. The flavonoid naringin prevented functional disorders of cardiomyocyte mitochondria during intoxication in vivo and impairment in rat heart mitochondria by calcium ions in vitro.

Keywords: alcoholic cardiomyopathy, mitochondria, heart, flavonoid naringin, respiration

■ ВВЕДЕНИЕ

Динамические изменения структуры и функции митохондрий, сопровождаемые нарушением энергетики и окислительным стрессом, нарушением кальциевого гомеостаза, клеточной сигнализации, приводят к ряду патологий (сердечно-сосудистые заболевания, диабет, токсическое поражение, ожирение) [1, с. 526; 2, с. 893].

Рассмотрение митохондрий как субклеточной модели позволяет выяснить основополагающие вопросы: каким образом функциональные перестройки системы трансформируются в патологические и каким образом можно корректировать этот процесс. Регуляция внутриклеточной концентрации свободного кальция ($[Ca^{2+}]_i$) представляется определяющим фактором для процесса жизни и смерти кардиомиоцитов [3, с. 101]. При этом митохондрии выступают в качестве важнейшего сенсора кальциевого сигнала в кардиомиоцитах.

Алкогольная кардиомиопатия (АКМ), развивающаяся в результате длительного потребления алкоголя, представляет серьезную медико-социальную проблему и связана с нарушениями сократительной функции сердца, энергетики и ионного баланса сердечной мышцы, гипертензией. Предполагаемые механизмы, ведущие к развитию АКМ, включают взаимосвязанные клеточные процессы: нарушения метаболизма митохондрий сердца, окислительный стресс и апоптоз [4, с. 126]. В то же время детальные механизмы АКМ, как и способы коррекции митохондриальных и клеточных нарушений кардиомиоцитов, требуют своего выяснения. В настоящее время для оценки фармакологической активности тестируемых кардио- и гепатопротекторных агентов используются различные экспериментальные модели алкогольной интоксикации, поскольку отсутствуют модели, точно имитирующие патологию человека [9, с. 176]. В настоящем исследовании мы использовали хроническую интоксикацию крыс этанолом в сочетании с диетой с высоким содержанием жиров (HFD), что непосредственно имитирует образ жизни человека и особенности связанных с ним токсических повреждений тканей.

Митохондриальное поглощение и освобождение ионов Ca^{2+} в ответ на кальциевый сигнал представляет основной механизм регуляции производства АТФ для удовлетворения энергетических потребностей клетки, но также является и фактором риска при перегрузке кальцием, окислительном стрессе, инициации гибели клеток. Перегрузка митохондрий ионами Ca^{2+} в сочетании с окислительным стрессом приводит к открытию митохондриальных пор высокой проницаемости (Mitochondrial Permeability Transition Pore, MPTP) во внутренней митохондриальной мембране, способствуя процессу некроза и/или апоптоза кардиомиоцитов, что в результате приводит к сердечной недостаточности [5, с. 2743].



Флавоноиды, вторичные метаболиты высших растений, не синтезируемые в животных тканях, демонстрируют многочисленные благоприятные эффекты как в экспериментах *in vivo*, так и *in vitro*. Модельными и эпидемиологическими исследованиям было показано, что флавоноиды и их метаболиты обладают рядом важных фармакологических свойств, которые предотвращают развитие неврологических, сердечно-сосудистых, онкологических заболеваний, диабета, токсических повреждений печени и ряда других [6, с. 671; 7, с. 35].

Широко исследуемыми и используемыми флавоноидами являются нарингенин и его гликозид нарингин (нарингин-7-О-неогесперидозид), основные биологически активные полифенолы цитрусовых, благоприятные эффекты которых считаются доказанными. Многочисленные исследования сообщают об антиоксидантных, противовоспалительных, противораковых, регуляторных свойствах этих фитопрепаратов, нарингин и нарингенин модулируют многочисленные сигнальные пути, подавляют синтез цитокинов и факторов роста, регулируют процессы апоптоза, пролиферации клеток, ангиогенеза [8, с. 3].

■ ЦЕЛЬ ИССЛЕДОВАНИЯ

Оценить роль митохондриальной дисфункции в развитии АКМ и выяснить возможность коррекции флавоноидом нарингином нарушений митохондрий кардиомиоцитов при алкогольной интоксикации крыс *in vivo* и нагрузке ионами кальция *in vitro*.

■ МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Реактивы: сахароза, трис(гидроксиметил)аминометан (Трис-HCl), нарингин (4',5,7-тригидроксифлаванон-7-рамногликозид), этиленгликоль-бис(2-аминоэтиловый эфир)-N,N,N',N'-тетрауксусная кислота (ЭГТА), аденозиндифосфат (ADP), сукцинат натрия гексагидрат, калия хлорид, кальция хлорид, аралдит-эпоксид (Araldite 506 ерохуресин), уранил ацетат, сафранин О, карбонилцианид-4-(трифторметокси) фенилгидразон (FCCP), динатриевая соль этилендиаминтетрауксусной кислоты (ЭДТА) (Merck/Sigma-Aldrich Biochemie GmbH, Германия), четырехокись осмия для электронной микроскопии (Carl Roth GmbH, Германия), калий фосфорнокислый однозамещенный, сульфат магния, метанол, этанол и ацетон высшей степени чистоты («Реахим», Россия).

Концентрация свободного кальция: чтобы определить эффекты ионов кальция на состояние митохондрий в присутствии ЭГТА, определяли концентрацию свободного Ca^{2+} для заданной общей концентрации внесенного $[\text{Ca}^{2+}]$ с использованием онлайн-калькулятора Ca-EGTA [10].

Алкогольная интоксикация крыс

Алкогольную интоксикацию аутбредных крыс-самцов линии Wistar разведения вивария Института физиологии НАН Беларуси (Минск) вызывали путем длительного (8 недель) введения этанола в дозе 4 г/кг массы в/ж (использовали 30%-ный раствор) на фоне кормления животных высокожировым рационом, содержание жирового компонента в котором составляло 32%. В опыте использованы животные со средней начальной массой 220–250 г. Каждая экспериментальная группа включала 8–10 животных.

Схема опыта:

- 1-я группа – контроль (высокожировой рацион);
- 2-я группа – алкогольная интоксикация + высокожировой рацион;
- 3-я группа – алкогольная интоксикация + высокожировой рацион + нарингин.

С первого дня эксперимента животным группы 3 на фоне алкогольной интоксикации и высокожирового рациона вводили нарингин в дозе 40,0 мг/кг массы животного. Нарингин растворяли в воде и вводили ежедневно, внутривентрикулярно посредством зонда с 9 до 10 часов утра. Контрольным животным вводили эквивалентное количество воды. Взвешивание крыс проводили еженедельно. По окончании эксперимента животных декапитировали. Кровь забирали для немедленного приготовления сыворотки. Сердце извлекали для выделения митохондриальной фракции. В сыворотке крови определяли активность маркерных ферментов – аланин- и аспартатаминотрансферазы, щелочной фосфатазы, билирубина с помощью наборов Lachema (Чехия), содержание триглицеридов – с помощью наборов НПК «Анализ-Х» (Беларусь).

Выделение митохондрий сердца крысы

Митохондрии кардиомиоцитов выделяли методом дифференциального центрифугирования [11, с. 2]. Использовали среду выделения, содержащую сахарозу (0,25 моль/л), Трис-НCl (0,025 моль/л), ЭДТА (0,00005 моль/л) и 0,1% БСА, pH 7,4. Изолированное сердце быстро переносили в охлажденный 0,9%-ный раствор KCl (+4 °C) и тщательно отмывали от крови. Мышечную ткань взвешивали, измельчали ножницами на льду и гомогенизировали с помощью стеклянного гомогенизатора с тефлоновым пестиком в среде выделения при +4 °C. Ядерную фракцию удаляли центрифугированием при 650 g (10 мин., 4 °C) (центрифуга Hermle Z 32 HK, HERMLE Labortechnik GmbH, Германия). Митохондрии осаждали центрифугированием при 11 000 g (10 мин., +4 °C) и промывали в среде выделения.

Структура и функциональные параметры изолированных митохондрий сердца крысы. На митохондрии сердца крыс (5 мг/мл) воздействовали ионами Ca^{2+} (концентрация свободного Ca^{2+} = 550 мкмоль/л), флавоноидом нарингином (200 мкмоль/л) и ионами Ca^{2+} (550 мкмоль/л) + нарингин (200 мкмоль/л) в среде, содержащей сахарозу (0,25 моль/л), Трис-НCl (0,025 моль/л) и ЭДТА (0,00005 моль/л), pH 7,4, в течение 30 мин. (25 °C) *in vitro*. После воздействия ионов кальция и флавоноида суспензии митохондрий центрифугировали при 10 000 g, +4 °C, в течение 20 мин., фиксировали, как описано ранее, и анализировали, используя электронный микроскоп JEM-1011 (Japanese Electron Optics Laboratory Ltd., Япония) [12, с. 238]. Для оценки ультраструктурных изменений митохондрий использовали такие морфометрические параметры, как фактор элонгации и соотношение сторон.

Степень образования пор высокой проницаемости митохондрий (MPTP) определяли по изменению оптической плотности суспензии митохондрий при 540 нм и 30 °C в среде, содержащей KCl (0,12 моль/л), Трис-НCl (0,02 моль/л), KH_2PO_4 (0,002 моль/л) и ЭДТА (0,0005 или 0,00005 моль/л), pH 7,4, как описано нами ранее [13, с. 227]. Изолированные митохондрии сердца (0,5 мг белка/мл) вносили в среду, содержащую субстрат (5 ммоль/л сукцинат). Через 5 мин. инкубации вносили ионы Ca^{2+} или флавоноид нарингин и измеряли скорость (ΔD 540/мин) терминальной фазы



набухания. По окончании измерений в митохондрии вносили разобщитель FCCP (0,5 мкмоль/л) для контроля завершения процесса образования МПТР.

Мембранный потенциал митохондрий сердца определяли спектрофлуориметрически, используя положительно заряженный липофильный флуоресцентный зонд сафранин О (8 мкмоль/л) в среде, содержащей сахарозу (200 ммоль/л), Трис-НСl (10 ммоль/л), KH_2PO_4 (1 ммоль/л), MgSO_4 (5 ммоль/л), ЭГТА (0,00005 моль/л), субстрат сукцинат (5 ммоль/л), pH 7,4, 27 °C. Митохондрии сердца (0,3 мг белка/мл) помещали в среду, через 5 мин. вносили эффекторы (ионы кальция, флавоноиды) и регистрировали изменения мембранного потенциала как разницу интенсивности флуоресценции зонда сафранина О ($I_{\text{FCCP}} - I$) / мг белка, где I – интенсивность флуоресценции зонда в суспензии митохондрий, I_{FCCP} – интенсивность флуоресценции сафранина О после добавления FCCP (после полной деполяризации мембраны).

Скорость потребления кислорода изолированными митохондриями (0,5 мг белка/мл) в отсутствие и в присутствии ионов кальция и флавоноидов регистрировали полярографически, используя электрод Кларка (Hansatech Instruments Limited, Великобритания) при постоянном легком перемешивании в среде, содержащей KCl (0,125 моль/л), сахарозу (0,05 моль/л), Трис-НСl (0,01 моль/л), KH_2PO_4 (0,0025 моль/л), MgSO_4 (0,005 моль/л), pH 7,2, 25 °C.

Биохимические параметры сыворотки крыс

Статистика. Данные измерений, полученные в 5–7 повторениях, анализировали, используя статистический пакет Statistica 10.0, и представляли в виде медианы (Me) и межквартильного интервала [Q1; Q3]. Нормальность распределения оценивали по критерию Шапиро – Уилка. Достоверность различий между параметрами анализировали с помощью U-критерия Манна – Уитни и H-критерия Краскела – Уоллиса. Уровень значимости считался $p < 0,05$.

■ РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Дисфункция митохондрий кардиомиоцитов при хронической алкогольной интоксикации крыс и протекторный эффект введения нарингина

В условиях выполненного эксперимента хроническая алкогольная интоксикация крыс на фоне жировой диеты приводила к росту массы тела животных и выраженному цитолизу клеток печени, что регистрировали по возрастанию активности индикаторных ферментов в сыворотке крови, АлТ, АсТ, щелочной фосфатазы, содержанию билирубина, что указано в табл. 1. Нарушение метаболизма липидов сопровождалось накоплением в сыворотке крови триглицеридов (табл. 1). Введение животным нарингина на фоне интоксикации в определенной степени уменьшало активности индикаторных ферментов цитолиза (но не щелочной фосфатазы), содержание билирубина и триглицеридов (табл. 1).

Средний вес животных в группе «алкогольная интоксикация» достоверно возрастает по отношению к группе «контроль» и уменьшается в результате введения нарингина. Масса сердца животных (по абсолютной величине, но не в % к массе животного) также уменьшается в группе «алкогольная интоксикация + нарингин» по отношению к группе «алкогольная интоксикация», что отражает благоприятный эффект введения флавоноида.

Таблица 1

Биохимические параметры сыворотки крови, масса животного и сердца крыс при хронической алкогольной интоксикации и введении нарингина

Table 1

Biochemical parameters of blood serum, animal weight and heart weight in rats during chronic alcoholic intoxication and administration of naringin

Параметр	Контроль	Алкогольная интоксикация	Алкогольная интоксикация + нарингин
Масса животного, г	284,0±10,5	332,5±11,5 ^a	304,5±9,5 ^a
Масса сердца, г	0,86±0,03	0,98±0,05 ^a	0,85±0,02 ^b
Масса сердца / масса животного, %	0,30±0,02	0,29±0,03	0,28±0,02
АлТ, Е/л	53,36±2,46	142,2±9,27 ^a	119,1±8,36 ^{a, b}
АсТ, Е/л	76,74±6,41	188,60±25,14 ^a	104,9±13,10 ^{a, b}
Щелочная фосфатаза, Е/л	183,5±11,65	367,6±34,01 ^a	327,0±36,12 ^a
Билирубин (связанный)	2,41±0,08	2,70±0,05 ^a	2,43±0,05 ^b
Триглицериды, сыворотка, ммоль/л	1,64±0,15	2,84±0,38 ^a	1,52±0,22 ^b

Примечания: ^a p<0,05 – достоверные изменения по сравнению с контролем; ^b p<0,05 – достоверные изменения по сравнению с группой «алкогольная интоксикация».

Хроническая алкоголизация животных существенно изменяла респираторную активность митохондрий сердца крыс, митохондриальный мембранный потенциал и чувствительность митохондрий сердца к кальций-зависимому процессу открытия МРТР. В табл. 2 указано, что скорость сукцинат-зависимого потребления кислорода митохондриями кардиомиоцитов (V₂, состояние 2) в группе «алкогольная интоксикация» возрастает более чем в 2 раза по отношению к этому параметру в группе «контроль» и существенно снижается в группе «алкогольная интоксикация + нарингин» при сравнении с этим параметром в группе «алкогольная интоксикация». Скорость АДФ-стимулированного митохондриального потребления кислорода (V₃) также значительно увеличилась в группе «алкогольная интоксикация», снижалась при введении нарингина на фоне интоксикации. Коэффициенты фосфорилирования АДФ/О и акцепторного контроля (V₃/V₂) достоверно уменьшались при длительном введении этанола. Введение нарингина при интоксикации крыс полностью восстанавливало скорость потребления кислорода и во многом нормализовало коэффициент фосфорилирования АДФ/О и коэффициент дыхательного контроля (V₃/V₂).

Результаты, представленные в табл. 2, демонстрируют, что интенсивность флуоресценции сафранина О возрастает в суспензии митохондрий крыс групп «алкогольная интоксикация» и «алкогольная интоксикация + нарингин», что может свидетельствовать о неспособности митохондрий сердца в данных группах животных накапливать сафранин О из-за повреждения мембран и диссипации мембранного потенциала в результате интоксикации этанолом.

Скорость Ca²⁺-индуцированного формирования МРТР в митохондриях сердца крыс, регистрируемое как изменение светорассеяния митохондриальной суспензии, при длительном введении этанола существенно возросла (в 3,7 раза по отношению к контрольной группе), что свидетельствует о значительном повышении



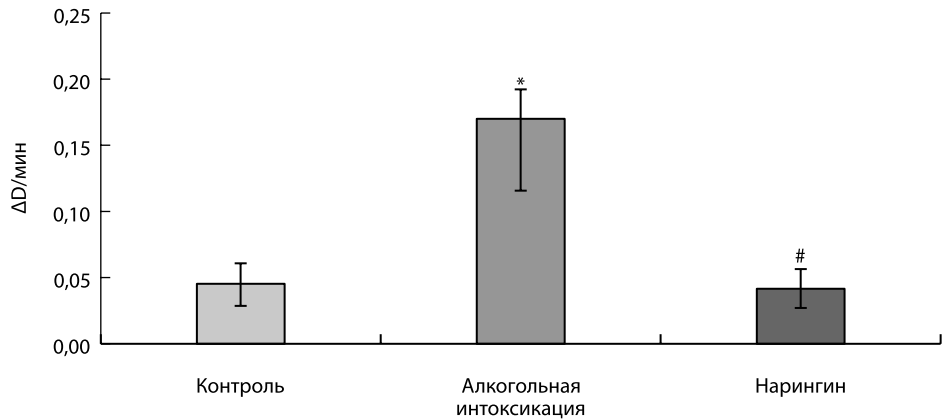
Таблица 2
Респираторная активность и мембранный потенциал митохондрий сердца при хронической алкогольной интоксикации крыс
Table 2
Respiratory activity and membrane potential of heart mitochondria during chronic alcoholic intoxication in rats

	V2, нг атом О/ мин/мг белка	V3, нг атом О/ мин/мг белка	V3/V2	АДФ/О	(I _{фср} – I) / мг белка
Контроль	34,27 [16,46; 41,04]	67,16 [54,28; 74,36]	2,11 [1,80; 2,58]	1,05 [0,90; 1,42]	10,24 [6,89; 18,05]
Алкогольная интоксикация	75,48 [59,54; 107,56] ^a	101,88 [95,60; 124,96] ^a	1,86 [1,79; 1,98] ^a	0,76 [0,48; 1,33] ^a	12,91 [11,71; 13,19] ^a
Алкогольная интоксикация + нарингин	26,77 [19,78; 31,38] ^b	65,24 [38,48; 94,34] ^{a, b}	2,29 [1,93; 2,96] ^b	1,12 [1,01; 1,23] ^b	14,41 [12,24; 14,83] ^a

Примечания: ^a p<0,05 – достоверные изменения по сравнению с контролем; ^b p<0,05 – достоверные изменения по сравнению с группой «алкогольная интоксикация».

чувствительности митохондрий к воздействию ионов кальция в результате интоксикации, что показано на рисунке. Лечение нарингином существенно снижало скорость Ca²⁺-индуцированного набухания митохондрий сердца до контрольных значений.

Длительное введение нарингина на фоне алкоголизации восстанавливало этот измененный параметр, что характеризует устойчивость митохондрий к воздействию ионов кальция.



Скорость Ca²⁺-индуцированного формирования МРТП в митохондриях сердца крыс при алкогольной интоксикации

Примечания: * p<0,05 – достоверные изменения по сравнению с контролем; # p<0,05 – достоверные изменения по сравнению с группой «алкогольная интоксикация».

The rate of Ca²⁺-induced MPTP formation in rat heart mitochondria during alcoholic intoxication

Структурно-функциональные нарушения изолированных митохондрий кардиомиоцитов крыс ионами кальция и эффекты нарингина in vitro

Учитывая определяющую роль нарушений митохондриального и клеточного кальциевого гомеостаза в кардиомиоцитах, мы определили эффекты ионов кальция на структуру и свойства митохондрий сердца in vitro. В нашем эксперименте внесение ионов экзогенного кальция (550 мкмоль/л) в суспензию изолированных митохондрий сердца крыс индуцировало значительное возрастание гетерогенности митохондрий по размерам и электронной плотности за счет появления органелл большего размера с электронно-светлым матриксом, с увеличенными межкристинными промежутками и нарушенной нативной структурой внутренней мембраны в результате Ca^{2+} -зависимого открытия митохондриальных пор высокой проницаемости и деполяризации мембраны (от 150 до 750 мкмоль/л Ca^{2+}), что указано в табл. 3. Ранее нами были определены эффекты ионов экзогенного кальция на ультраструктуру, респираторную активность, процесс формирования МРТР изолированных митохондрий печени крыс [12, с. 247]. Флавоноид гликозид нарингин также изменял морфометрические параметры митохондрий сердца крыс, увеличивал среднюю площадь сечения (200 мкмоль/л), но предотвращал индуцированные ионами Ca^{2+} нарушения ультраструктуры и дозозависимо ингибировал респираторную активность митохондрий сердца крыс (10–75 мкмоль/л).

Как показано в табл. 4, ионы кальция в невысоких концентрациях (15–250 нмоль/л) дозозависимо ингибировали стимулируемую субстратом скорость потребления кислорода V2 и АДФ-зависимую скорость потребления кислорода V3 без существенного изменения коэффициентов дыхательного контроля и фосфорилирования изолированных митохондрий сердца крыс.

Флавоноид нарингин также дозозависимо (10–75 мкмоль/л) ингибировал респираторную активность митохондрий сердца крыс, уменьшая коэффициент дыхательного контроля без изменения коэффициента фосфорилирования, стимулировал набухание митохондрий и потерю мембранного потенциала (25–75 мкмоль/л) в отсутствие Ca^{2+} , но ингибировал стимулированное ионами Ca^{2+} открытие митохондриальных пор высокой проницаемости (75 мкмоль/л) (данные не представлены).

Таблица 3
Ультраструктура митохондрий сердца крыс в присутствии ионов Ca^{2+} и нарингина
Table 3
Ultrastructure of rat heart mitochondria in the presence of calcium and naringin

Параметры	Контроль	550 мкмоль/л Ca^{2+} свободный	550 мкмоль/л Ca^{2+} свободный + нарингин 200 мкмоль/л
Средняя площадь сечения одной Мх, мкм ²	0,62 [0,40; 0,89]	0,74 [0,44; 1,26]*	0,62 [0,39; 0,87] [#]
Средний периметр одной Мх, мкм	3,21 [2,55; 3,90]	3,60 [2,78; 4,68]*	3,21 [2,56; 3,88]*, [#]
Фактор элонгации	1,48 [1,34; 1,61]	1,55 [1,41; 1,73]*	1,56 [1,45; 1,74]*, [#]
Средний диаметр одной Мх, мкм	1,01 [0,79; 1,22]	1,14 [0,85; 1,49]*	1,01 [0,79; 1,25] [#]
Сферичность	0,46 [0,38; 0,55]	0,41 [0,34; 0,50]*	0,42 [0,34; 0,49]*

Примечания: * достоверность различий при сравнении с контролем ($p < 0,05$); [#] достоверность различий при сравнении с группой (550 мкмоль/л Ca^{2+} свободный) ($p < 0,05$).



Таблица 4
Параметры потребления кислорода изолированными митохондриями сердца крыс, эффект ионов кальция
Table 4
Parameters of oxygen consumption by isolated rat heart mitochondria, the effect of calcium ions

	V2, нг атом О/ мин/мг	V3, нг атом О/ мин/мг	V3/V4	АДФ/О
Контроль	35,68 [34,00; 48,00]	55,90 [58; 98]	3,63 [2,13; 3,91]	1,75 [1,22; 2,38]
Ионы кальция, 250 нмоль/л	13,80 [12,00; 16,00] ^a	26,54 [28,00; 50,00] ^a	2,82 [1,89; 4,00] ^a	1,53 [0,98; 1,61]

Примечание: ^a $p < 0,05$ – достоверные изменения по сравнению с контролем.

По сравнению с митохондриями печени чувствительность митохондрий сердца крыс к действию ионов Ca^{2+} оказалась значительно ниже в случае открытия митохондриальных пор высокой проницаемости и значительно выше в случае ингибирования респираторной активности.

Известно, что митохондриальная дисфункция и избыточная генерация активных форм кислорода вовлечены в патогенез АКМ, молекулярные механизмы и мишени, ответственные за дисфункцию миокарда при АКМ, изучены недостаточно [14, с. 1]. Данные о митохондриальных процессах в кардиомиоцитах при алкогольной кардиопатологии противоречивы. Так, при 3-месячной алкогольной интоксикации крыс не наблюдали существенных изменений скорости потребления кислорода митохондриями или активности комплексов OXPHOS I-V, несмотря на уменьшение содержания комплекса V и подавление экспрессии гена *Atp6v1e2* при алкоголизации. Митохондрии алкоголизированных крыс были более чувствительны к Ca^{2+} -индуцированному открытию МРТР, что связано, как предполагают, с увеличением уровня экспрессии адениннуклеотидтранслоказы 1/2 и потенциал-зависимого анионного канала [14, с. 1].

В соответствии с нашими наблюдениями, ранее также было показано уменьшение митохондриального мембранного потенциала при алкоголизации, ингибирование ряда ферментных систем цикла Кребса, нарушение сопряжения окислительного фосфорилирования [4, с. 3]. В то же время нарушения респираторной активности митохондрий сердца при алкогольной интоксикации крыс (или экспонировании кардиомиоцитов этанолом) зависят как от длительности интоксикации, так и от дозы алкоголя [4, с. 7]. Ранее в модели острого инфаркта миокарда у крыс показано, что нарингенин, агликон нарингина, уменьшал повреждения сердца, вызванные ишемией/реперфузией, благодаря деполяризации митохондриальной мембраны и уменьшению накопления Ca^{2+} в митохондриальном матриксе. При этом предполагают прямое взаимодействие флавоноида с калиевыми ВК-каналами высокой проводимости [15, с. 1634].

■ ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Следует полагать, что нарушения респираторной активности, диссипация митохондриального мембранного потенциала при длительном употреблении алкоголя могут явиться причиной нарушения энергетики сердечной мышцы и сократительной

функции сердца, что вносит вклад в развитие и прогрессирование алкогольной кардиомиопатии. Определенную роль в развитии алкогольной кардиомиопатии может играть нарушение кальциевого гомеостаза в кардиомиоцитах, повышенная чувствительность митохондрий кардиомиоцитов к кальций-индуцируемому формированию митохондриальных пор высокой проницаемости. Длительное введение флавоноида нарингина частично препятствовало развитию токсического эффекта этанола у крыс (что регистрировали по уровню маркеров интоксикации в сыворотке крови), предотвращало функциональные нарушения митохондрий кардиомиоцитов при интоксикации *in vivo*. Одновременно нарингин предотвращал повреждение митохондрий кардиомиоцитов при избыточном воздействии ионов кальция на митохондрии сердца крыс *in vitro*. Благоприятные эффекты нарингина могут быть связаны с его антиоксидантным, противовоспалительным эффектом, прямым взаимодействием с мембраной и комплексами электрон-транспортной цепи митохондрий кардиомиоцитов.

■ ЛИТЕРАТУРА/REFERENCES

1. Folmes C.D.L., Dzeja P.P., Nelson T.J. et al. Mitochondria in control of cell fate. *Circulation Research*. 2012;110(4):526–529. DOI: 10.1161/RES.0b013e31824ae5c1.
2. Garbincius J.F., Elrod J.W. Mitochondrial calcium exchange in physiology and disease. *Physiological Reviews*. 2021;102(2):893–992. DOI: 10.1152/physrev.00041.2020.
3. Bernardi P., Di Lisa F. The mitochondrial permeability transition pore: molecular nature and role as a target in cardioprotection. *J Mol Cell Cardiol*. 2015;78:100–106. DOI: 10.1016/j.yjmcc.2014.09.023
4. Steiner J.L., Lang C.H. Etiology of alcoholic cardiomyopathy: Mitochondria, oxidative stress and apoptosis. *Int J Biochem Cell Biol*. 2017;89:125–135. DOI: 10.1016/j.biocel.2017.06.009.
5. Bernardi P. Mechanisms for Ca²⁺-dependent permeability transition in mitochondria. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 2020;117(6):2743–2744. DOI: 10.1073/pnas.1921035117.
6. Ilyich T.V., Veiko A.G., Lapshina E.A. et al. Quercetin and Its Complex with Cyclodextrin against Oxidative Damage of Mitochondria and Erythrocytes: Experimental Results in vitro and Quantum-Chemical Calculations. *Biophysics*. 2018;63(4):690–720. DOI: 10.1134/S0006302918040075. (In Russian)
7. Kostyuk V.A. Plant polyphenolic compounds as components of functional nutrition. *Proceedings of BSU*. 2016;11(1):32–41. (In Russian)
8. Stabrauskienė J., Kopustinskiene D.M., Lazauskas R. et al. Naringin and Naringenin: Their Mechanisms of Action and the Potential Anticancer Activities. *Biomedicines*. 2022;10(7):1686. DOI: 10.3390/biomedicines10071686.
9. Stickel F., Datz C., Hampe J. et al. Pathophysiology and management of alcoholic liver disease: Update 2016. *Gut Liver*. 2017;11(2):173–188. DOI: 10.5009/gnl16477.
10. EGTA. Available at: https://pcwww.liv.ac.uk/~petesmf/petesmf/software/_webware06/EGTA/EGTA.htm. (accessed 20 May 2023).
11. Gostimskaya I., Galkin A. Preparation of highly coupled rat heart mitochondria. *J. Vis. Exp*. 2010;(23):2202. DOI: 10.3791/2202.
12. Zavadnik I.B., Kovalenia T.A., Veiko A.G. et al. Structural and functional changes in rat liver mitochondria under calcium ion loading in the absence and presence of flavonoids. *Biomed. Khim*. 2022;68(4):237–249. DOI: 10.18097/PBMC20226804237.
13. Golovach N.G., Cheshchev V.T., Lapshina E.A. et al. Calcium-induced mitochondrial permeability transitions: parameters of Ca²⁺ ion interactions with mitochondria and effects of oxidative agents. *J. Membr. Biol*. 2017;250(2):225–236. DOI: 10.1007/s00232-017-9953-2.
14. Emelyanova L., Holmuhamedov E., Ryan S. et al. Increased susceptibility of mitochondria to permeability transition pore opening in alcoholic cardiomyopathy. *Circulation Research*. 2017;121:A123. DOI: 10.1161/res.121.suppl_1.123.
15. Testai L., Martelli A., Marino A. et al. The activation of mitochondrial BK potassium channels contributes to the protective effects of naringenin against myocardial ischemia/reperfusion injury. *Biochem. Pharm*. 2013;85(11):1634–1643. DOI: 10.1016/j.bcp.2013.03.018.