

Ефекти глутатіону на експресію АТФ-чутливих калієвих каналів, мітохондріальну пору і окисний стрес у серці старих щурів

Н.А. Струтинська, Ю.В. Гошовська, Ю.П. Коркач, Л.А. Мись, А.Ю. Лучкова,
Р.Б. Струтинський, В.Ф. Сагач

Інститут фізіології ім. О.О. Богомольця НАН України, Київ; e-mail: na-strutynska@biph.kiev.ua

Вивчали ефекти одноразового введення відновленої форми глутатіону на експресію генів KCNJ8 і KCNJ11, що кодують Kir6.1- і Kir6.2-субодиниці АТФ-чутливих калієвих (K_{ATP}) каналів, Ca^{2+} -індуковане відкривання неспецифічної мітохондріальної пори транзитornoї провідності (МППП) у серці старих щурів, а також зміни біохімічних показників, які характеризують інтенсивність окисних процесів у органелах. Рівень експресії мРНК Kir6.1 і Kir6.2 визначали за допомогою зворотної транскрипції та кількісної полімеразної ланцюгової реакції. Показано, що після введення глутатіону старим щурам експресія субодиниць K_{ATP} -каналу значно збільшувалась, а саме для Kir6.1 у 9,3 раза, для Kir6.2 у 2,6 раза. При цьому пригнічувалося відкривання МППП у серці: зменшувалась амплітуда спонтанного і Ca^{2+} -індукованого набухання мітохондрій. Важливим наслідком дії глутатіону при старінні було зниження в органелах швидкості генерації супероксидного та гідроксильного радикалів, а також вмісту пероксиду водню у 1,8; 2,5 і 3,2 раза відповідно порівняно з цими показниками у контрольних старих тварин. Слід також відмітити зменшення перекисного окиснення ліпідів, зокрема пулів дієнових кон'югатів (у 2,5 раза) та малонового діальдегіду (у 1,8 раза) за цих умов. Таким чином, дія глутатіону суттєво підвищує експресію генів KCNJ8 і KCNJ11, що кодують Kir6.1- і Kir6.2-субодиниці K_{ATP} -каналів у серці щурів, регулює МППП, запобігаючи її відкриванню, та зменшує окисний стрес, що свідчить про важливу його роль у захисті міокарда.

Ключові слова: глутатіон; експресія Kir6.1 і Kir6.2; K_{ATP} -канали; окисний стрес; старіння; мітохондрії; серце; щури.

ВСТУП

Відновлений глутатіон (GSH) – трипептид, який синтезується в клітинах з амінокислот L-глутамату, L-цистеїну і гліцину за допомогою ферментів γ -глутамілцистеїнової лігази та глутатіонсинтетази. Співвідношення відновленого і окисненого (GSSG) глутатіону є основою клітинного окисно-відновного гомеостазу, за допомогою якого може підтримуватися редокс-статус клітини загалом [1]. Як природний низькомолекулярний антиоксидант і донор електронів глутатіон бере участь у підтримці клітинного гомеостазу і відіграє ключову роль у захисті клітин від окисного стресу, пригнічує апоптоз, а також необхідний для детоксикації ксенобіотич-

ків, метаболізму ліків тощо. Порушення внутрішньоклітинного балансу GSH/GSSG пов'язане із загальними ознаками старіння, а також із широким спектром патологічних станів, включаючи серцево-судинні захворювання, хворобу Паркінсона, нейродегенеративні розлади тощо [2–5]. Водночас при старінні зменшується експресія АТФ-залежних калієвих (K_{ATP}) каналів, що призводить до ослаблення протекторних механізмів [6, 7], адже система цих каналів є потужним механізмом захисту за дії патологічних чинників, зокрема ішемічної природи [8–10]. При більшій щільності K_{ATP} -каналів на мембрані їх захисний ефект потужніший [6, 11, 12], а при збільшенні їх експресії формується

© Н.А. Струтинська, Ю.В. Гошовська, Ю.П. Коркач, Л.А. Мись, Р.Б. Струтинський, В.Ф. Сагач

стійкий до ішемії фенотип серця [12]. Проте механізми підвищення експресії K_{ATP} -каналів практично не вивчені, оскільки відомі лише поодинокі дослідження про таку властивість гіпоксії [12], ендотоксинів [13], формальдегіду [14] та сірководню [15].

Нині одна із найважливіших медико-соціальних проблем – лікування COVID-19, збудником якої є вірус SARS-CoV-2, чи, принаймні, спроба мінімізувати патогенний вплив цього захворювання на людину. Відомо, що наслідком важкого перебігу COVID-19 може бути поліорганна гіпоксія та ішемія, протидіяти яким є функцією K_{ATP} -каналів. Крім зменшення входу кальцію в клітину і гальмування як механічної роботи, так і метаболічних процесів, що попереджає загибель клітини в умовах енергодефіциту, активація K_{ATP} -каналів має потужну антиоксидантну та протизапальну дію, зокрема пригнічує утворення лейкотрієнів, потужних хемоатрактантів для нейтрофілів, неконтрольоване накопичення яких у легенях при COVID-19 збільшує ураження органа [8,16, 17]. У низці публікацій також згадується про патогенний вплив дефіциту GSH у клітинах на тлі зниження антиоксидантної активності при захворюванні на COVID-19 та, особливо, в процесі агресивного перебігу захворювання. De Flora та співавт. [18] вказують на фармакологічну значущість попередника GSH N-ацетилцистеїну і на потребу застосування тіолвмісних препаратів як для профілактики, так і лікування COVID-19. Відомо, що стійкість до вірусних захворювань позитивно корелює з обсягом запасів GSH, який захищає клітини імунітету за умов окисного стресу та сприяє їх оптимальному функціонуванню [19].

Таким чином, вікове зменшення експресії K_{ATP} -каналів, виснаження пулів GSH та зміни в його метаболізмі мають вирішальне значення при низці патологічних станів, в тому числі і вірусних захворювань. Відомо також, що посилення оксидативного і нітрозативного стресу в серці при старінні в сукупності призводить до дисфункції мітохондріальних

механізмів, зокрема до формуванням неелективного мегаканалу – мітохондріальної пори транзиторної провідності (МПП), що є причиною розвитку багатьох патологічних станів організму [20, 21].

Метою нашої роботи було дослідити вплив одноразового введення відновленої форми глутатіону на експресію генів KCNJ8 і KCNJ11, що кодують Kir6.1- і Kir6.2- субодиниці K_{ATP} -каналів, Ca^{2+} -індуковане відкриття МПП у серці старих щурів, а також зміни біохімічних показників, котрі характеризують інтенсивність окисних процесів.

МЕТОДИКА

Досліди проведено на дорослих (6 міс, 220–250 г) і старих (22–24 міс, 300–350 г) щурах лінії Вістар. Тварин утримували на стандартному раціоні віварію. У кожній серії дослідів використано не менше ніж 10–12 тварин. У дослідженнях дотримувалися Міжнародних принципів Європейської конвенції про захист тварин, які використовуються для експериментальних цілей (Страсбург, 1986). Тварин було поділено на три групи: I (контрольна) – дорослі щури (6 міс), II – старі щури (22–24 міс), III – старі щури, яким внутрішньоочеревинно вводили глутатіон (Neraval, «ВалартінФарма», Італія/Україна) у дозі 52 мг/кг за одну годину до декапітації.

Для дослідження експресії генів здійснювали забір верхівки серця і виділяли тотальну РНК за допомогою реагента TRIZOL («Sigma», США) згідно з інструкцією виробника. Концентрацію загальної РНК визначали за допомогою NanoDrop спектрофотометра ND1000 «NanoDrop Technologies Inc.», США). Зворотну транскрипцію або синтез комплементарної до РНК молекули ДНК проводили за допомогою набору RevertAid™ H Minus First Strand cDNA Synthesis Kit («Fermentas», Литва). Отриману одноланцюгову ДНК використовували для полімеразної ланцюгової реакції (ПЛР) в реальному часі для ампліфікації фрагментів генів Kir6.1,

Kir6.2 із застосуванням флуоресцентного барвника SYBR-Green та наступних праймерів: прямий 5'-TCT CTT CTC CAT CGA GGT TCA-3' та зворотний 5'-CTG CAG AAT CAA AAC CGT GAT-3' для Kir6.1; прямий 5'-ATG AGAGAA AGG GGG ACA AGA-3' та зворотний 5'-AGG CTG GAG TCA AGG GTA GAG-3' для Kir 6.2. Для контролю за якістю виділення РНК та порівняння інтенсивності експресії генів KCNJ8, KCNJ11 паралельно ампліфікували фрагмент гена β -актину – одного із house-keeping-генів з використанням таких праймерів: прямий 5'-AAG TCC CTC ACC CTC CCA AAA-3' та зворотний 5'-AAG CAA TGC TGT CAC CTT CCC-3'. Ампліфікація складалася з циклів: денатурація – 95°C, 20 с, приєднання праймерів – 95°C, 3 с і елонгація 60°C протягом 30 с (45 циклів) з використанням 7500 Fast Real-Time PCR («Applied Biosystems», США). Аналіз результатів проводили з 7500 Fast Real-Time PCR Software. Розраховували відносний рівень експресії мРНК Kir до актину.

Відкривання МПТП досліджували за допомогою спектрофотометричної реєстрації набухання мітохондрій, ізольованих із серця щурів. Серця, видалені з декапітованих щурів, промивали охолодженим 0,9%-м розчином KCl (4°C). Мітохондрії виділяли методом диференційного центрифугування [22] і в суспензії органел визначали вміст білка за методом Лоурі. Органели поміщали в інкубаційне середовище ізотонічного складу (ммоль/л): KCl – 120, тріс-HCl – 25, KH_2PO_4 – 3; сукцинат натрію – 5; рН 7,4 (кінцевий об'єм – 3 мл) і реєстрували зниження оптичної густини суспензії мітохондрій при $\lambda = 520$ нм впродовж 15 хв за наявності індуктора Ca^{2+} . Концентрація білка становила 0,4 мг/мл. Як контроль використовували суспензію мітохондрій в інкубаційному середовищі без додавання кальцію. При цьому обраховували амплітуду спонтанного (контрольного) набухання як різницю значень оптичної густини від 1-ї до 15-ї хвилин ($A_0 = \Delta D_{520}/\text{мг білка}$). Максимальну амплітуду вимірювали за умов

активації пороутворення при дії індуктора МПТП – іонів кальцію ($A_{\text{max}} = \Delta D_{520}/\text{мг білка}$).

У мітохондріях серця визначали такі біохімічні показники оксидативного стресу: швидкість генерації супероксидного ($\text{O}_2^{\cdot -}$) і гідроксильного (OH^{\cdot}) радикалів, пули стабільного пероксиду водню (H_2O_2), дієнових кон'югатів (ДК) та малонового діальдегіду (МДА) за методами, описаними нами раніше [23].

Отримані результати оброблені методами варіаційної статистики з використанням програми Origin 7.0 («Microcall Inc.», США). Міжгрупові різниці між показниками визначали за допомогою критерію t Стьюдента. Статистичний аналіз результатів генетичних досліджень проводили з використанням непараметричного критерію Крускала–Уоліса. Вірогідними вважали зміни при $P < 0,05$.

РЕЗУЛЬТАТИ ТА ЇХ ОБГОВОРЕННЯ

При визначенні рівня експресії мРНК генів KCNJ8 і KCNJ11, що кодують відповідно субодиниці Kir6.1 і Kir6.2 $\text{K}_{\text{АТФ}}$ -каналу у серці дорослих та старих щурів, достовірних відмінностей не виявлено (рис. 1). Рівень експресії Kir6.1 у дорослих та старих щурів становив $0,38 \pm 0,11$ та $0,45 \pm 0,10$ ум.од. відповідно (відносний рівень мРНК Kir6.1/актину). Рівень експресії Kir6.2 у дорослих та старих щурів сягав $5,42 \pm 1,85$ та $4,06 \pm 1,09$ ум.од. відповідно (відносний рівень мРНК Kir6.2/актину). Вперше показано, що за умов введення глутатіону старим щурам експресія пороутворюючих субодиниць $\text{K}_{\text{АТФ}}$ -каналів значно зросла (див. рис. 1), а саме для Kir6.1 у 9,3 раза ($P < 0,01$), для Kir6.2 у 2,6 раза ($P < 0,05$). Слід зауважити, що збільшилася експресія мРНК обох білків, як для Kir6.1 (відповідає судинному типу каналу), так і для Kir6.2, що переважно входить до складу серцевого типу каналу. Таким чином, збільшення експресії субодиниць $\text{K}_{\text{АТФ}}$ -каналів може сприяти посиленню захисних механізмів, адже відомо, що при цьому формується

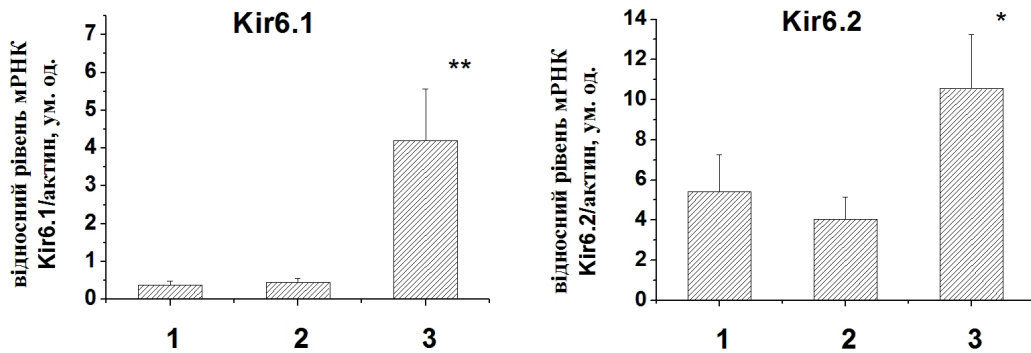


Рис. 1. Рівень експресії мРНК генів KCNJ8 і KCNJ11, що кодують Kir6.1- і Kir6.2- субодиниці АТФ-чутливих калієвих каналів відповідно у серці дорослих (1), старих (2) щурів та старих щурів після введення глутатіону (3). * $P < 0,05$, ** $P < 0,01$ відносно значень у старих щурів

стійкий до ішемії фенотип серця [12], і можливо не тільки до ішемії.

У дослідженні було ідентифіковано кальційіндуковану циклоспоринчутливу МПТП, оскільки при навантаженні іонами Ca (10^{-4} моль/л), за наявності неорганічного фосфату (P_i) і сукцинату в середовищі інкубації, реєстрували високоамплітудне набухання суспензії мітохондрій серця дорослих щурів, яке практично повністю попереджалося циклоспорином А – класичним інгібітором МПТП. На рис. 2 представлено типові кінетичні криві набухання мітохондрій серця старих щурів під час одноразового введення їм

GSH, а також зміни амплітуди контрольного (A_c) та кальційзалежного (A_{\max}) набухання мітохондрій за цих умов. Порівнюючи розраховані кінетичні параметри встановлено, що особливістю мітохондрій серця старих щурів було перевищення на 29% значення A_{\max} порівняно з контролем. Слід відмітити, що дія глутатіону проявлялась у зменшенні набухання мітохондрій як у безкальцієвому середовищі, так і за умов дії індуктора у серці старих щурів і наближалась до значень контрольних дорослих тварин. Ці результати свідчать про здатність трипептиду частково попереджати пороутворення у органелах сер-

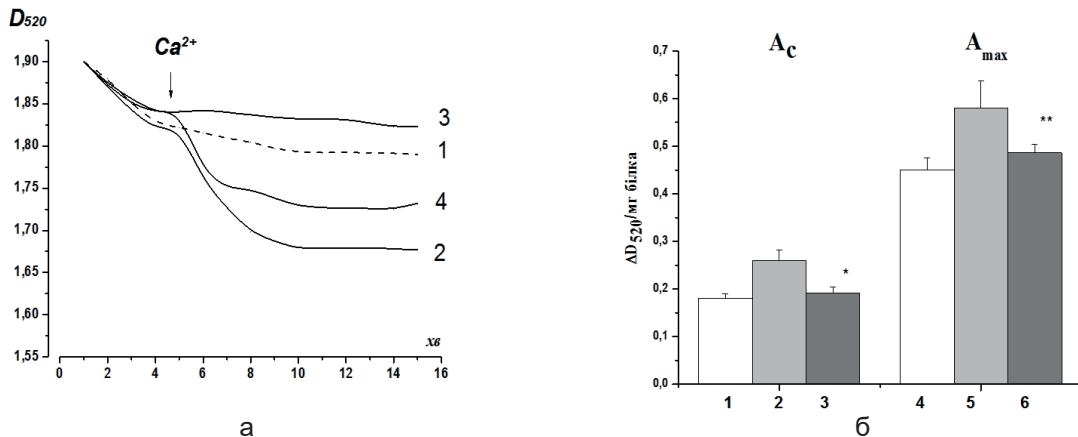


Рис. 2. Кінетичні криві набухання мітохондрій серця старих щурів (а): 1 – контроль; 2 – дія Ca^{2+} (10^{-4} моль/л); 3, 4 – введення *in vivo* глутатіону (52 мг/кг) старим тваринам без та за дії кальцію відповідно. Зміна амплітуди контрольного (A_c) та кальційзалежного (A_{\max}) набухання (б): 1, 4 – контроль (дорослі і старі щури відповідно); 2, 5 – дія Ca^{2+} (дорослі і старі щури відповідно); 3, 6 – введення *in vivo* глутатіону (52 мг/кг) старим тваринам без та за дії кальцію відповідно. * $P < 0,05$, ** $P < 0,05$ відносно значень у старих щурів

ця, тобто про мітопротективні його ефекти.

Отже, ми показали, що глутатіон запобігав збільшенню спонтанного і Ca^{+2} -індукованого набухання мітохондрій, що свідчить про пригнічення пороутворення у серці при старінні. Вважаємо, що, ймовірно, збільшення експресії генів субодиниць $\text{K}_{\text{АТФ}}$ -каналів ініціювало цито- і мітопротекторні механізми, які дали змогу попередити дисфункцію органел.

Оскільки GSH відіграє центральну роль у підтримці окисно-відновного балансу клітин ми визначили показники, які характеризують наявність окисного стресу, а саме швидкість генерації $\cdot\text{O}_2^-$ і $\cdot\text{OH}$ -радикалів, пули H_2O_2 , а також оцінювали інтенсивність перекисного окиснення ліпідів (ПОЛ) за зміною вмісту первинних продуктів окиснення – ДК та кінцевого продукту – МДА. У мітохондріях серця при старінні значення цих показників були вищим від контрольних, що свідчить про посилення вільнорадикальних процесів з віком. Як видно з таблиці, швидкість генерації супероксидного радикала, як результат функціонування ксантинооксидази, НАДФН-оксидази чи дихального ланцюга мітохондрій, значно збільшувалася (у 5,2 раза) у мітохондріях серця при старінні, проте за умов введення глутатіону – знижувався в 1,8 раза. Важливим наслідком дії цього антиоксиданта при старінні було також зниження швидкості генерації гідроксильного радикала, а також вмісту пероксиду водню

у 2,5 і 3,2 раза відповідно порівняно з цими показниками у старих тварин.

За дії вільних радикалів відбувається також окисна деградація ліпідів, а саме ПОЛ. Виявили, що вміст їх продуктів у мітохондріях серця вірогідно зростав з віком, що вказує на інтенсифікацію цього процесу. Так, вміст ДК і МДА у мітохондріях при старінні перевищував контрольні значення у 3,9 і 2,3 раза відповідно (див. таблицю). Дія глутатіону сприяла зменшенню значень цих показників у 2,5 і 1,8 раза для ДК і МДА відповідно. Отже, за умов введення глутатіону старим тваринам спостерігали часткове пригнічення окисного стресу у старих щурів, що свідчить про позитивні ефекти цієї сполуки на функціонування мітохондрій.

Відомо, що збільшення концентрації кальцію в матриксі мітохондрій індукує МПТП, при цьому чутливість пори до катіона посилюється за умов окисного стресу, підвищених концентрацій фосфату і знижених пулів аденінових нуклеотидів. Концентрація іонів кальцію в матриксі мітохондрій знаходиться в межах 10 нмоль/л. При цьому їх кальцієва ємність дуже висока, ізольовані мітохондрії здатні акумулювати понад 1 ммоль/л кальцію із середовища, підтримуючи концентрацію вільного кальцію в мікромолярних межах, коли відбувається регуляція Ca^{2+} -залежних ферментів, наприклад, піруват- та α -кетоглутаратдегідрогенази. У процесі пермеабілізації мітохондріальних мембран від-

Біохімічні показники окисного стресу в мітохондріях серця щурів різного віку та при введенні глутатіону (52 мг/кг)

Показник	Дорослі щури	Старі щури	Старі щури і дія глутатіону
Супероксидний радикал, нмоль $\cdot \text{хв}^{-1} \cdot \text{мг}^{-1}$ білка	2,32 \pm 0,85	12,10 \pm 0,87*	6,70 \pm 0,38**
Пероксид водню, пмоль $\cdot \text{мг}^{-1}$ білка	0,86 \pm 0,11	3,39 \pm 0,24*	1,06 \pm 0,10**
Гідроксильний радикал, нмоль $\cdot \text{хв}^{-1} \cdot \text{мг}^{-1}$ білка	0,98 \pm 0,13	2,78 \pm 0,23*	1,11 \pm 0,11**
Малоновий діальдегід, нмоль $\cdot \text{мг}^{-1}$ білка	3,81 \pm 0,15	8,93 \pm 0,06*	4,71 \pm 0,20**
Дієнові кон'югати, нг $\cdot \text{мг}^{-1}$ білка	1,73 \pm 0,14	6,81 \pm 0,25*	2,70 \pm 0,08**

* $P < 0,05$ відносно значень у дорослих тварин; ** $P < 0,05$ відносно значень у старих щурів

бувається вихід із міжмембранного простору і матриксу близько 100 білків, а також такого важливого елемента антиоксидантної захисту, як глутатіону [24, 25]. Ми вважаємо, що у наших експериментах пригнічення окисного стресу, зокрема супероксидного радикала як відомого модулятора неспецифічної МПТП, внаслідок антиоксидантної дії глутатіону і активації експресії компонентів K_{ATP} -каналу, призводило до зниження амплітуди кальційіндукованого набухання мітохондрій серця, що сприяло пригніченню неспецифічної МПТП у режимі високої провідності. Цей факт може свідчити про зниження проникності мембран мітохондрій до індукторів з віком за дії GSH.

Глутатіон наявний в клітинах або у формі GSH, або в окисненій GSSG, де дві молекули цистеїну пов'язані дисульфідним зв'язком. За нормальних умов GSSG становить 1% від загального глутатіону в більшості клітин. Він рециркулюється глутатіонредуктазою за допомогою НАДФН, який забезпечується переважно через пентозофосфатний шлях. Таким чином, окисно-відновний баланс глутатіону впливає на редокс-статус клітин, субклітинних структур і клітинний гомеостаз в цілому. Відомо, що виснаження GSH, спричинене інгібуванням його синтезу, нестачею амінокислоти цистеїну, або нокдауном глутатіонпероксидази 4, індукує тип загибелі клітин, який також називають «фероптозом». Введення хелатора заліза до клітин майже повністю скасовує фероптоз, що можна пояснити запобіганням внутрішньолізосомальної акумуляції заліза та призводить до пригнічення індукованого окисним стресом пермеабілізації лізосомальних мембран [3].

Таким чином, введення глутатіону старим щурам призводило до швидкого збільшення експресії генів KCNJ8 і KCNJ11, які кодують субодиниці Kir6.1 і Kir6.2 АТФ-чутливих калієвих, та уповільнення окисних процесів, що мало інгібувальний вплив на кальційіндуковану МПТП. Аналізуючи отримані результати, ми припускаємо участь глутатіону у мітопротекторних механізмах, які запобігають

дисфункції органел. Це може бути важливим регуляторним фактором у попередженні серцево-судинних захворювань.

Робота виконана в рамках проєкту №2020.01/0204 «Розробка нових методів експресії АТФ-чутливих калієвих каналів клітинних мембран, як потужної універсальної системи ендогенного захисту» (№ держ. реєстрації 0120 U 1044951) конкурсу «Наука для безпеки людини та суспільства» за фінансової підтримки Національного фонду досліджень України.

The authors of this study confirm that the research and publication of the results were not associated with any conflicts regarding commercial or financial relations, relations with organizations and/or individuals who may have been related to the study, and interrelations of co-authors of the article.

**Н.А. Струтинская, Ю.В. Гошовская,
Ю.П. Коркач, Л.А. Мись, А.Ю. Лучковая,
Р.Б. Струтинский, В.Ф. Сагач**

ЭФФЕКТЫ ГЛУТАТИОНА НА ЭКСПРЕССИЮ АТФ-ЧУВСТВИТЕЛЬНЫХ КАЛИЕВЫХ КАНАЛОВ, МИТОХОНДРИАЛЬНУЮ ПОРУ И ОКИСЛИТЕЛЬНЫЙ СТРЕСС В СЕРДЦЕ СТАРЫХ КРЫС

Изучали эффекты однократного введения восстановленной формы глутатиона на экспрессию генов KCNJ8 и KCNJ11, кодирующих Kir6.1- и Kir6.2-субъединицы АТФ-чувствительных калиевых (K_{ATP}) каналов, Ca^{2+} -индуцированное открытие неспецифической митохондриальной поры (МПТП) в сердце старых крыс, а также на изменения биохимических показателей, характеризующих интенсивность окислительных процессов в органеллах. Уровень экспрессии мРНК Kir6.1 и Kir6.2 определяли с помощью обратной транскрипции и количественной полимеразной цепной реакции. Показано, что после введения глутатиона старым крысам экспрессия субъединиц K_{ATP} -канала значительно возросла, а именно для Kir6.1 в 9,3 раза, для Kir6.2 – в 2,6 раза. При этом происходило угнетение открытия МПТП: снижалась амплитуда спонтанного и Ca^{2+} -индуцированного набухания митохондрий. Важным следствием действия глутатиона при старении было снижение скорости генерации супероксидного и гидроксильного радикалов, а также содержания пероксида водорода в 1,8; 2,5 и 3,2 раза соответственно по сравнению с этими показателями у старых животных. Глутатион также умень-

шал перекисное окисление липидов, в частности пулы диеновых конъюгатов (в 2,5 раза) и малонового диальдегида (в 1,8 раза). Таким образом, глутатион существенно повышает экспрессию генов KCNJ8 и KCNJ11, кодирующих Kir6.1- и Kir6.2-субъединиц K_{ATP} -каналов в сердце крыс, регулирует МПТП, предотвращая ее открывание и уменьшает окислительный стресс, что свидетельствует о важной его роли в защите миокарда.

Ключевые слова: глутатион; экспрессия Kir6.1 и Kir6.2; K_{ATP} -каналы; окислительный стресс; старение; митохондрии; сердце, крысы.

N.A. Strutynska, Yu.V. Goshovska, Yu.P. Korkach, L.A. Mys, A.Yu. Luchkova, R.B. Strutynskyi, V.F. Sagach

EFFECTS OF GLUTATHIONE ON THE EXPRESSION OF ATP-SENSITIVE POTASSIUM CHANNELS, MITOCHONDRIAL PORES, AND ON OXIDATIVE STRESS IN THE HEART OF OLD RATS

O.O. Bogomoletz Institute of Physiology National Academy of Science of Ukraine, Kyiv.

e-mail: na-strutynska@biph.kiev.ua

The effects of a single injection of the reduced form of glutathione on the expression of the KCNJ8 and KCNJ11 genes encoding Kir6.1 and Kir6.2 subunits of ATP-sensitive potassium (K_{ATP}) channels and on Ca^{2+} -induced nonspecific mitochondrial permeability transition pores (mPTP) opening in the heart of old rats were studied. Changes in biochemical parameters characterizing the intensity of oxidative processes in organelles at the action of glutathione were also studied. The expression levels of Kir6.1 i Kir6.2 subunits K_{ATP} channels were determined using reverse transcription and quantitative PCR. It was shown that after the administration of glutathione to old rats, the expression of K_{ATP} channel subunits significantly increased, namely for Kir6.1 9.3 times, for Kir6.2 2.6 times. The use of glutathione in older animals inhibited mPTP opening: reduced the amplitude of spontaneous and Ca^{2+} -induced swelling of mitochondria. An important consequence of the action of glutathione during aging was a decrease in the rate of generation of superoxide (O_2^-) and hydroxyl (OH) radicals, as well as the content of hydrogen peroxide respectively in 1.8, 2.5 and 3.2 times compared with these figures in older animals without treatment. Glutathione also reduced lipid peroxidation, particularly pools of diene conjugates (2.5-fold) and malonic dialdehyde (1.8-fold). Thus, glutathione significantly increases the expression of KCNJ8 and KCNJ11 genes encoding Kir6.1 and Kir6.2 subunits of K_{ATP} channels in the heart of rats, regulates MP, preventing its opening, and reduces oxidative stress, indicating its important role in myocardial protection.

Key words: glutathione; expression of Kir6.1 and Kir6.2; K_{ATP} channels; oxidative stress; aging; mitochondria; heart; rats.

REFERENCES

1. Bellezza I, Riuzzi F, Chiappalupi S, Arcuri C, Giambanco I, Sorci G, Donato R. Reductive stress in striated muscle cells. *Cell Mol Life Sci.* 2020 Sep;77(18):3547-65.
2. Maher P. The effects of stress and aging on glutathione metabolism. *Ageing Res Rev.* 2005;4:288-314.
3. Homma T, Fujii J. Application of glutathione as anti-oxidative and anti-aging drugs. *Curr Drug Metab.* 2015;16(7):560-71.
4. Liu R, Choi J. Age-associated decline in gamma-glutamyl-cysteine synthetase gene expression in rats. *Free Radic Biol Med.* 2000; 28:566-74.
5. Sekhar RV, Patel SG, Guthikonda AP, Reid M, Balasubramanyam A, Taffet GE, Jahoor F. Deficient synthesis of glutathione underlies oxidative stress in aging and can be corrected by dietary cysteine and glycine supplementation. *Am J Clin Nutr.* 2011 Sep;94(3):847-53.
6. Ranki HJ, Crawford RM, Budas GR, Jovanović A. Ageing is associated with decrease in number of sarcolemmal ATP-sensitive K^+ channels in a gender-dependent manner. *Mech. Ageing Dev.* 2002. 123:695-705.
7. Sudhir R, Sukhodub A, Du Q, Jovanović S, Jovanović A. Ageing-induced decline in physical endurance in mice is associated with decrease in cardiac SUR2A and increase in cardiac susceptibility to metabolic stress: therapeutic prospects for up-regulation of SUR2A. *Biogerontology.* 2011; 12(2):147-55.
8. Strutynskyi RB. Protective properties of opening ATP-sensitive potassium channels. *Fiziol Zh.* 2019;65(3):74-86. [Ukrainian].
9. Ngo AT, Riemann M, Holstein-Rathlou NH, Torp-Pedersen C, Jensen LJ. Significance of K(ATP) channels, L-type Ca^{2+} channels and CYP450-4A enzymes in oxygen sensing in mouse cremaster muscle arterioles in vivo. *BMC Physiol.* 2013 May 12;13-8.
10. Strutyn'skyi RB, Kotsiuruba AV, Rovenets' RA, Strutyn'ska NA, Iagupols'kyi IuL, Sagach VF, Moïbenko OO. Biochemical mechanisms of the cardioprotective effect of the K(ATP) channels opener flocalin (medicinal form) in ischemia-reperfusion of myocardium. *Fiziol Zh.* 2013;59(4):16-27. [Ukrainian].
11. Crawford RM, Jovanović S, Budas GR, Davies AM, Lad H, Wenger RH, Robertson KA, Roy DJ, Ranki HJ, Jovanović A. Chronic mild hypoxia protects heart-derived H9c2 cells against acute hypoxia/reoxygenation by regulating expression of the SUR2A subunit of the ATP-sensitive K^+ channels. *J Biol Chem.* 2003; 278:31444-55.
12. Du Q, Jovanović S, Clelland A, Sukhodub A, Budas G, Phelan K, Murray-Tait V, Malone L, Jovanović A. Overexpression of SUR2A generates a cardiac phenotype resistant to ischemia. *FASEB J.* 2006; 20(8): 1131-41.
13. Shi W, Cui N, Wu Z, Yang Y, Zhang S, Gai H, Zhu D, Jiang C. Lipopolysaccharides up-regulate Kir6.1/SUR2B channel expression and enhance vascular KATP channel activity via NF-kappa B-dependent signaling. *J Biol Chem.* 2010 Jan 29;285(5):3021-9.

14. Zhao Y, Ge J, Li X, Guo Q, Zhu Y, Song J, Zhang L, Ding S, Yang X, Li R. Vasodilatory effect of formaldehyde via the NO/cGMP pathway and the regulation of expression of K_{ATP} , BK_{Ca} and L-type Ca^{2+} channels. *Toxicol Lett*. 2019; Sep 15;312:55-64.
15. Sun Y, Huang Y, Zhang R, Chen Q, Chen J, Zong Y, Liu J, Feng S, Liu AD, Holmberg L, Liu D, Tang C, Du J, Jin H. Hydrogen sulfide upregulates K_{ATP} channel expression in vascular smooth muscle cells of spontaneously hypertensive rats. *J Mol Med (Berl)*. 2015 Apr;93(4):439-55.
16. Strutyns'kyi RB, Kotsiuruba AV, Neshcheret OP, Rovenets' RA, Moibenko OO. The changes of metabolism in myocardium at ischemia-reperfusion and activating of the ATP-sensitive potassium channels. *Fiziol Zh*. 2012;58(1):13-26. [Ukrainian].
17. Strutynskyi RB, Moybenko OO, Chebanov VA, Gorobets NY. Modeling of production industrial process of the drug focalin and search of its optimally effective dose for treatment of heart diseases. *Nauka Innov*. 2013; 9 (1):55-63. [Ukrainian].
18. De Flora S, Balansky R, and La Maestra S. Rationale for the use of N-acetylcysteine in both prevention and adjuvant therapy of COVID-19. *FASEB J*. 2020; 34: 13185-93.
19. Sestili P, Fimognari C. Paracetamol-induced glutathione consumption: is there a link with severe COVID-19 illness? *Front Pharmacol*. 2020 Oct 7;11:579944.
20. Strutynska NA, Kotsiuruba AV, Budko AYU, Mys LA, Sagach VF. Mitochondrial dysfunction in the aging heart is accompanied by constitutive no-synthases uncoupling on the background of oxidative and nitrosative stress. *Fiziol Zh*. 2016; 62(2):3-11. [Ukrainian].
21. Kwong J, Molkenin J. Physiological and pathological roles of the mitochondrial permeability transition pore in the heart. *Cell Metab*. 2015;21(2):206-14.
22. Strutynska NA, Semenykhina OM, Chorna SV, Vavilova GL, Sagach VF. Hydrogen sulphide inhibits Ca^{2+} -induced mitochondrial permeability transition pore opening in adult and old rat heart. *Fiziol Zh*. 2011;57(6):3-13. [Ukrainian].
23. Mys LA, Strutynska NA, Strutynskyi VR, Sagach VF. Activation of endogenous hydrogen sulphide synthesis inhibits mitochondrial permeability transition pore opening and restores constitutive no-synthase coupling in old rat hearts. *Fiziol Zh*. 2017; 63(3):16-23. [Ukrainian].
24. Kharechkina ES, Nikiforova AB, Kruglov AG. Pyridine nucleotides regulate the superoxide anion flash upon permeabilization of mitochondrial membranes: An MCLA-based study. *Free Radic Biol Med*. 2018 Aug 20; 124:473-83.
25. Vercesi AE, Castilho RF, Kowaltowski AJ, de Oliveira HCF, de Souza-Pinto NC, Figueira TR, Busanello ENB. Mitochondrial calcium transport and the redox nature of the calcium-induced membrane permeability transition. *Free Radic Biol Med*. 2018 Dec;129:1-24.

*Матеріал надійшов
до редакції 24.10.2020*