

Вплив екзогенного глутатіону на кардіодинаміку і відкривання мітохондріальної пори при ішемії–реперфузії серця щурів

Р.А. Федічкіна¹, Ю.В. Гошовська¹, І. Ю. Охай¹, К.В. Войтко², В.Ф. Сагач¹

¹Інститут фізіології ім. О.О. Богомольця НАН України, Київ; e-mail: fedichkina@biph.kiev.ua;

²Інститут хімії поверхні ім. О.О. Чуйка

На моделі ішемії–реперфузії ізольованого за Лангендорфом серця щурів вивчали вплив посткондиціювання відновленим глутатіоном (препарат гепавал «Італія/Україна») на скоротливу функцію міокарда, кисневу вартість його роботи і вивільнення мітохондріального фактора як маркера утворення мітохондріальних пор транзитornoї провідності (МППП). Виявили, що додавання глутатіону (10 мг/л) під час реперфузії сприяло відновленню тиску у лівому шлуночку (70,2 і 56% на 5-й і 40-й хвилині реперфузії щодо 23,6 і 30,9% в контролі), зменшувало кисневу вартість роботи ішемізованого міокарда (184 і 157% на 5-й і 40-й хвилині реперфузії щодо 413 і 216%) і втрічі зменшувало вивільнення мітохондріального фактора, що свідчить про інгібування відкривання МППП. Вміст відновленого глутатіону в тканинах серця достовірно збільшувався в 1,5 раза через 30 хв після введення гепавалу внутрішньоочеревинно (52 мг/кг), що вказує на накопичення його в тканинах. Таким чином, посткондиціювання відновленим глутатіоном здійснює кардіопротекторний ефект, пригнічує утворення МППП і може використовуватись як засіб для зменшення постішемічних порушень функції серця.

Ключові слова: ішемія; посткондиціювання; глутатіон; серце; киснева вартість роботи; мітохондріальна пора.

ВСТУП

Порушення кровопостачання при інфаркті міокарда внаслідок тромбозу коронарних судин призводить до кисневого голодування серцевих тканин. Найефективнішим лікуванням інфаркту є невідкладне втручання і так звана рання реперфузія, однак у реальних клінічних умовах відновлення кровопостачання інфарктної зони відбувається уже після ініціації і прогресії патологічного процесу в міокарді, внаслідок чого реперфузія може мати руйнівні наслідки (реперфузійний синдром). Надходження кисню в ішемізовані тканини призводить до різкого зростання продукції активних форм кисню (АФК), які ініціюють пошкодження білків, ДНК, ліпідів, активацію прозапальних каскадів [1] і утворення мітохондріальних пор транзитornoї провідності (МППП) з

наступним запуском апоптозу [2]. Ішемічно–реперфузійні стани також спостерігаються і під час операцій на зупиненому серці або/і зі штучним кровообігом, наприклад, трансплантаціях, шунтуванні, заміні клапанів тощо [3]. У таких випадках, як і при інфаркті, є ризик реперфузійного пошкодження не лише міокарда, а й інших органів, у тому числі мозку [4]. Тому пошук можливих засобів, що допоможуть знизити ступінь реперфузійного пошкодження тканин під час реперфузії, залишається актуальним завданням експериментальної кардіології.

У відповідь на збільшення АФК активується система антиоксидантного захисту. Однією з її найбільш активних ланок є глутатіон – низькомолекулярний тіол, трипептид глутамінової кислоти, цистеїну та гліцину. Він представлений у клітині в відновленій

© Р.А. Федічкіна, Ю.В. Гошовська, І. Ю. Охай, К.В. Войтко, В.Ф. Сагач

(GSH) та окисненій формах (GSSG), концентрація яких динамічно змінюється залежно від метаболічних процесів та рівня окисного стресу. Завдяки наявності вільної –SH-групи глутатіон надзвичайно реакційноздатний. Основні функції GSH – це відновлення дисульфідних зв'язків та утворення глутатіонільованих форм білків, що захищає їх від окиснення. Також він може виступати скавенджером вільних радикалів [5]. Показано, що ефективність взаємодії з АФК у глутатіону вища, ніж у каротинів, мелатоніну та кофеїну [5, 6]. Виявлено, що ішемія–реперфузія супроводжується вичерпанням його запасів [7, 8]. Більше того, вміст GSH може розглядатись як показник ступеня вільнорадикального пошкодження міокарда при окисному стресі, індукованому трансплантацією [9], а також як важливий індикатор життєздатності органів, призначених для трансплантації, від «несерцебитних» донорів [10]. Таким чином, вміст глутатіону являє собою важливий антиоксидантний ресурс тканини, а застосування його відновленої форми може мати протекторну дію при надмірній продукції АФК за умов ішемії–реперфузії міокарда.

Метою нашої роботи було дослідити вплив посткондиціонування екзогенним глутатіоном на відновлення функції ізолюваного серця щурів після ішемії–реперфузії.

МЕТОДИКА

Експерименти проводили відповідно до Директиви 2010/63/EU Європейського парламенту про захист тварин, що використовуються для наукових цілей (22.09.2010) та Закону України №3447-IV «Про захист тварин від жорстокого поводження» (редакція від 13.02.20). Використовували щурів-самців лінії Вістар віком 6 міс, яких утримували на стандартному раціоні віварію Інституту фізіології ім. О.О. Богомольця із вільним доступом до питної води. Тварин було поділено на дві групи: контрольну ($n = 6$),

і дослідну ($n = 5$), щурам якої вводили глутатіон. Перфузію коронарних судин ізолюваного серця щурів здійснювали за методом Лангендорфа в режимі постійного перфузійного тиску, що становив 75–80 мм рт. ст., розчином наступного складу (у ммоль/л): NaCl – 118; KCl – 4,7; MgSO₄ – 1,2; NaHCO₃ – 24; KH₂PO₄ – 1,2; глюкоза – 10; CaCl₂ – 2,5. Перфузійний розчин безперервно аерували карбогеном (95% O₂ і 5% CO₂), pH 7,2 – 7,4. Тиск у порожнині лівого шлуночка ($P_{\text{лшл}}$) та швидкість його зміни dP/dt_{max} і dP/dt_{min} , кінцевий діастолічний тиск (КДТ) вимірювали за допомогою латексного балончика, введенного в порожнину лівого шлуночка та з'єднаного з тензодатчиком 746 (Мінгограф-82, «Elema», Швеція). Реєстрацію показників здійснювали за допомогою програмного забезпечення Global Lab. Вимірювали коронарний потік як об'єм розчину, що відтікав від серця за 1 хв. Розраховували інтенсивність скоротливої функції (ІСФ) як добуток тиску, що розвивається в лівому шлуночку, і частоти серцевих скорочень (ЧСС). Вимірювали напруження кисню у пробах розчину, що притікав і відтікав від серця, за допомогою газоаналізатора BMS 3 Mk 2 (Данія) і розраховували споживання кисню міокардом за рівнянням Neely [11]. Кисневу вартість роботи серця виражали як співвідношення споживання кисню до ІСФ.

Ішемічно–реперфузійне пошкодження моделювали за допомогою повного припинення перфузії коронарних судин протягом 20 хв з наступною реперфузією впродовж 40 хв. За допомогою спектрофотометра (СФ-46) визначали мітохондріальний фактор: реєстрували оптичну щільність розчинів, що відтікали від серця до та після ішемії при довжинах хвиль 230–260 нм. У дослідній групі здійснювали посткондиціонування відновленим глутатіоном (гепавал, Лаб. Італіяно Біокіміко Фарма Лісафарма С.П.А. для «Валартін Фарма», Італія/Україна), який вводили в перфузійний розчин з розрахунку 10 мг/л.

В окремих дослідях вивчали вміст GSH і

GSSG у тканинах сердець контрольних щурів ($n = 4$) і тварин, яким гепавал вводили внутрішньоочеревинно в дозі 52 мг/кг за 10 хв ($n = 4$) та за 30 хв ($n = 5$) до декапітації. Серця промивали в холодному ($+4^{\circ}\text{C}$) 0,9%-му розчині KCl, зважували та гомогенізували в середовищі для виділення в співвідношенні 1:9. Розчин для виділення готували на основі 0,1 М калій-фосфатного буфера з додаванням 5 ммоль/л ЕДТА при рН 7,5, 0,1% тритон X-100 та 0,6% сульфосаліцилової кислоти. Гомогенати центрифугували при $+4^{\circ}\text{C}$, 8000g 10 хв. Надосад відбирали в чисті мікроцентрифужні пробірки. Аліквоту, призначену для вимірювання вмісту GSH, негайно заморожували. До аліквоти, призначеної для вимірювання вмісту GSSG, додавали 2-вінілпіридин, перемішували, за годину додавали триетаноламін, знову перемішували та заморожували. Вимірювання проводили спектрофотометрично з використанням реактиву Елмана [12] та мікропланшетного спектрофотометра BiosanHiPoMPP-96 при 405 нм. У комірку додавали зразок, глутатіон редуктазу, її кофактор β -НАДФН, дитіобіснітробензоєву кислоту. Вимірювання проводили протягом 2 хв кожні 30 с. Результат вираховували відносно

калібрувальних кривих, побудованих за стандартними концентраціями GSH і GSSG з використанням рівняння лінійної регресії, отриманого з калібрувальної кривої. Всі реактиви були фірми «Sigma» (США).

Статистичну обробку результатів проводили за допомогою Microsoft Excel. Для перевірки нормальності розподілу використовували критерій Шапіро–Уїлка. Для з'ясування наявності відмінностей у ступені реперфузійного відновлення показників серця і вмісту глутатіону в тканинах серця використовували критерій Манна–Уїтні (U-тест).

РЕЗУЛЬТАТИ ТА ЇХ ОБГОВОРЕННЯ

На рис. 1 представлено нативні криві тиску у $P_{\text{лшл}}$, які демонструють позитивний вплив посткондиціонування глутатіоном на реперфузійне відновлення скоротливої функції міокарда.

На рис. 2 представлено статистично оброблені показники кардіодинаміки і окисного метаболізму міокарда. В контрольній серії експериментів відновлення $P_{\text{лшл}}$ на 5-й хвилині реперфузії становило 23,6% порівняно з вихідними значеннями. Надалі цей показник мав тенденцію до зростання, однак до кінця

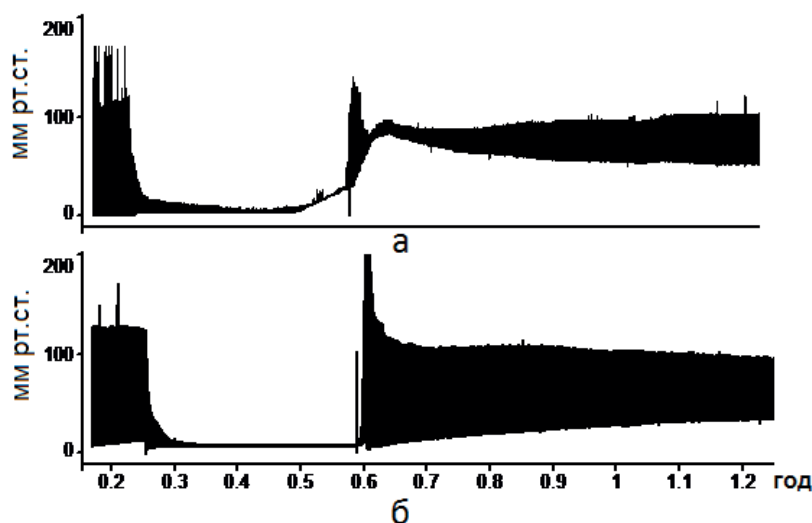


Рис. 1. Нативні криві тиску у лівому шлуночку за умов ішемії–реперфузії в контролі (а) та при посткондиціонуванні глутатіоном (б)

спостереження (40 хв) він становив всього 30,9% (див. рис. 2, а). ІСФ різко зменшилася при реперфузії аж до 20,8% від початкових значень, що свідчить про значне зниження скоротливої функції ізольованого серця (див. рис. 2, г).

У разі введення глутатіону на 5-й хвилині реперфузії $P_{\text{лшл}}$ відновлювався до 70,2% порівняно з вихідними значеннями, а на 40-й становив 56%, що було вище ніж, у контрольній групі ($P < 0,05$; див. рис. 2, а). dP/dt_{max} і dP/dt_{min} , тобто максимальна швидкість скорочення і розслаблення міокарда, були

вищими у дослідній групі і на 5-й хвилині реперфузії становили 68,8 і 62,3% відповідно щодо 21 і 20% у контрольній групі ($P < 0,05$; див. рис. 2, б). На 40-й хвилині реперфузії ці показники сягали 58 і 57% відносно 31 і 32,2% у контрольній групі ($P < 0,05$). Крім того, КДТ був значно нижчий у групі із введенням глутатіону (див. рис. 2, д) і на 5-й хвилині реперфузії становив 18 мм рт. ст., що в 2,5 раза нижче, ніж у контрольній серії ($P < 0,05$). І хоча до кінця реперфузії він дещо зростав, його значення все одно було у 1,5 раза нижче, ніж у

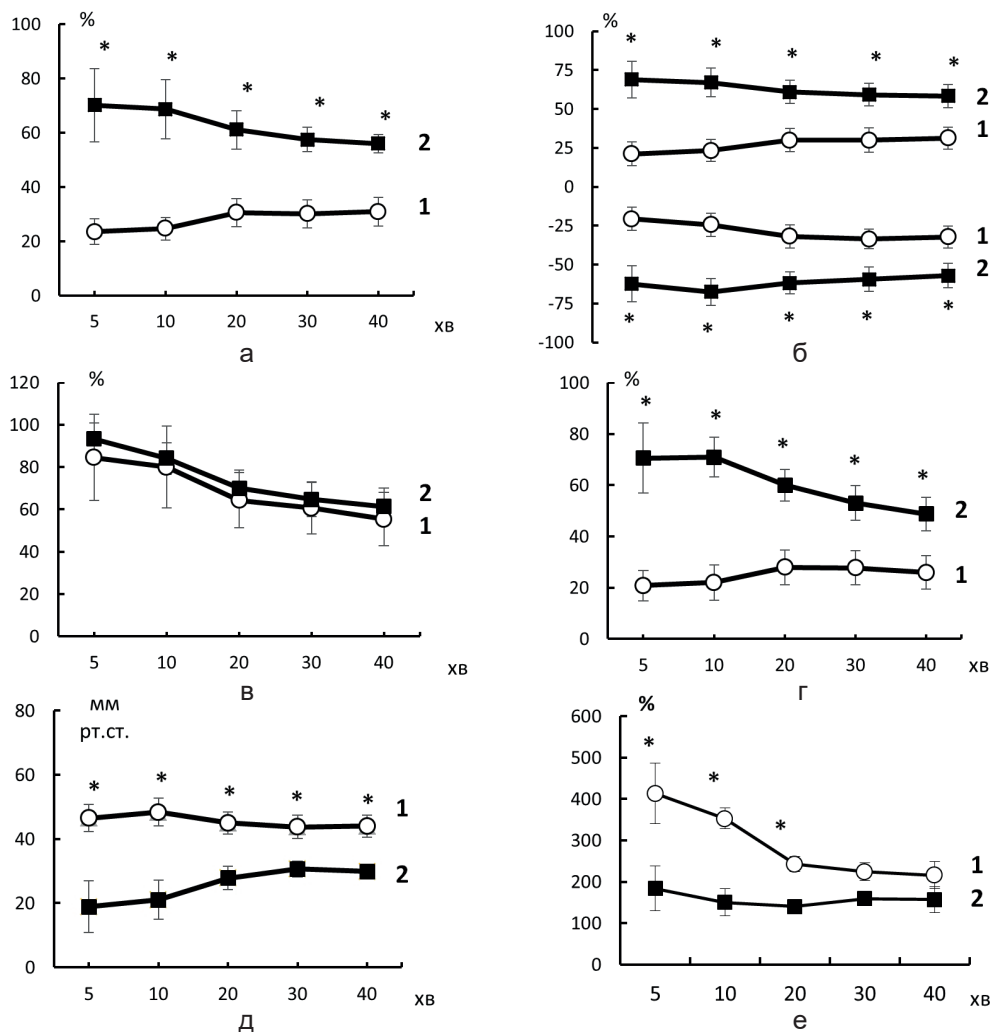


Рис. 2. Вплив посткондиціонування відновленим глутатіоном на показники кардіодинаміки ізольованого серця щурів підчас реперфузії: 1 – контроль, 2 – глутатіон; а – тиск у лівому шлуночку, б – перша похідна тиску у лівому шлуночку, в – коронарний потік, г – інтенсивність скоротливої функції, д – кінцево-діастолічний тиск, е – киснева вартість роботи міокарда. * $P < 0,05$

контрольній групі. Ці результати вказують на покращення процесів розслаблення і більш ефективну продукцію енергії в міокарді сердець за дії глутатіону, оскільки зростання КДТ і погіршення дилатації розвиваються внаслідок перевантаження кардіоміоцитів кальцієм і неможливості відкачування його у внутрішньоклітинні депо через дефіцит АТФ.

Значення коронарного потоку було вищим у дослідній групі та в кінці реперфузії становило 61,4% від початкових значень, в той час як у контрольній серії – 55,3% (див. рис. 2, в). Така сама динаміка спостерігалась і при аналізі ЧСС: в дослідній групі вже на 5-й хвилині реперфузії вона відновилася до вихідного рівня (252 хв^{-1}) і до кінця спостереження становила 217 хв^{-1} щодо 192 хв^{-1} у контрольній групі. Разом з тим ІСФ на початку реперфузії становила 70,6% від початкових значень і до кінця реперфузії сягала 49% відносно 25% у контролі (див. рис. 2, г). Таке відновлення функції серця достовірно відрізняється від контрольної групи і дає можливість стверджувати, що посткондиціювання глутатіоном нормалізує вихід міокарда з ішемії, полегшує його роботу, покращує дилатаційні властивості і зменшує постішемічні порушення функції ізолюваного серця щурів.

Відображенням ефективності використання кисню міокардом на моделі ізолюва-

ного серця є показники споживання кисню і кисневої вартості роботи. У контрольній групі під час реперфузії споживання кисню змінювалося з 65,8 до 48,6% на 40-й хвилині спостереження, в той час як у групі із введенням глутатіону – зі 100,8% на 5-й хвилині реперфузії до 76,5% на 40-й хвилині, що в 1,5–2 рази вище і може свідчити про більш повне забезпечення кисневих потреб ішемізованого міокарда. І дійсно, киснева вартість роботи міокарда в контрольній групі різко зростала і становила 413% у ранній період реперфузії, поступово знижуючись до 216%. Посткондиціювання глутатіоном зменшувало ці значення до 184 і 157% на початку і в кінці реперфузії відповідно (див. рис. 2, е). Це вказує на покращення процесів спряження окиснення і синтезу АТФ в ішемізованому міокарді щурів за дії екзогенного глутатіону, а також про реалізацію антиоксидантної дії препарату гепавал.

Додатковим підтвердженням позитивної дії препарату глутатіону було значне зниження вивільнення мітохондріального фактора в цій групі (рис. 3). Таким чином, введення екзогенного глутатіону мало кардіо-протекторний вплив і попереджувало розвиток реперфузійного порушення скоротливої функції і кисневого метаболізму міокарда, а одним із механізмів дії глутатіону може виступати

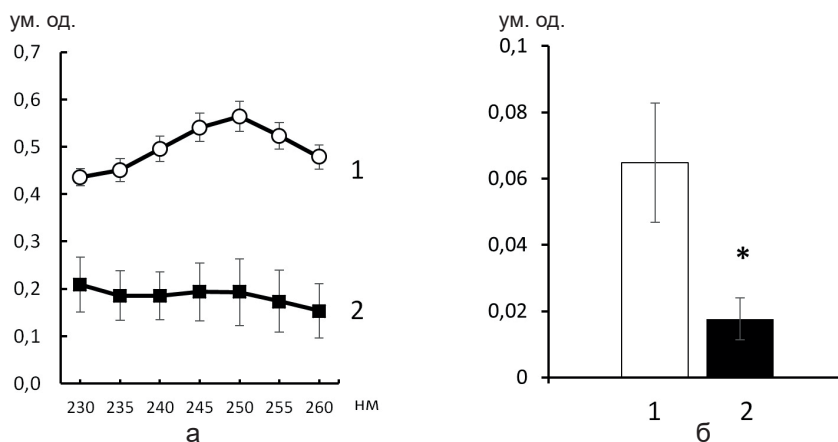


Рис. 3. Оптичні щільності розчинів (а), що відтікали від ізолюваного серця та значення мітохондріального фактора (б) після ішемії в контрольній серії (1) та при постішемічному введенні глутатіону (2). * $P < 0,05$

інгібування утворення МПТП.

Для перевірки чи накопичується екзогенний глутатіон тканинами серця *in vivo* препарат глутатіону вводили внутрішньо-очеревинно. Згідно з інструкцією виробника, концентрація препарату в крові зростає через 5–10 хв і поступово знижується, майже сягаючи вихідних значень приблизно через 60 хв після введення. В нашому досліді вміст ні GSH, ні GSSG достовірно не змінювався в тканинах серця через 10 хв, однак вміст GSH зростав в 1,5 раза через 30 хв після введення препарату ($P < 0,05$; рис. 4, а). Це дає підстави вважати, що за цей час препарат із крові поглинається органами в тому числі і міокардом.

Здатність екзогенного глутатіону зменшувати ступінь реперфузійного пошкодження було продемонстровано і раніше, але тільки GSH. Показано, що внутрішньовенне введення 5–15 мг/кг GSSG щурам перед моделюванням коронарооклюзії супроводжувалося погіршенням відновлення електричної активності міокарда під час реперфузії: спостерігався розвиток порушень ритму (тахікардія, екстрасистолія) з наступним перебігом у фібриляцію та припинення життєдіяльності тварин [13]. Водночас введення GSH у такий моделі супроводжувалося відновленням ритму вже на 4-й хвилині реперфузії, а важких порушень шлуночкового ритму не спостерігали. Також показано, що перфузія мікромолярними концентраціями GSH за 10 хв перед ішемією покращувала

постішемичне відновлення функції серця і знижувала продукцію пероксинітриту [14]. Результати наших досліджень вказують, що не лише preconditionування глутатіоном, але й введення його під час реперфузії також має кардіопротекторний ефект і запобігає постішемичним порушенням функції ізолюваного серця, що важливо з точки зору застосування в клінічних умовах.

Важливим місцем локації глутатіону в клітині є мітохондрії. Від співвідношення GSH/GSSG значною мірою залежить їх редокс-потенціал. Оскільки GSH не синтезується в мітохондріях, його вміст в цих органелах залежить від швидкості цього процесу в цитоплазмі і активності дикарбоксилатного та 2-оксиглутаратного переносників, які забезпечують його потрапляння в мітохондрії [15]. Показано, що надекспресія цих аніонних транспортерів супроводжується збільшенням поглинання GSH мітохондріями і захищає клітини від АФК-індукованого апоптозу [16]. Вміст мітохондріального GSH може знижуватися під дією патологічних та токсикологічних чинників, зокрема при хворобі Паркінсона та алкогольної інтоксикації [17], при чому не лише виснажуються пули GSH, але й пригнічується його транспорт в мітохондрії. Також було показано, що зниження мітохондріального GSH при апоптозі сприяє виходу цитохрому с і посилює продукцію АФК III дихальним комплексом [18], котрі, як відомо, здатні індукувати утворення

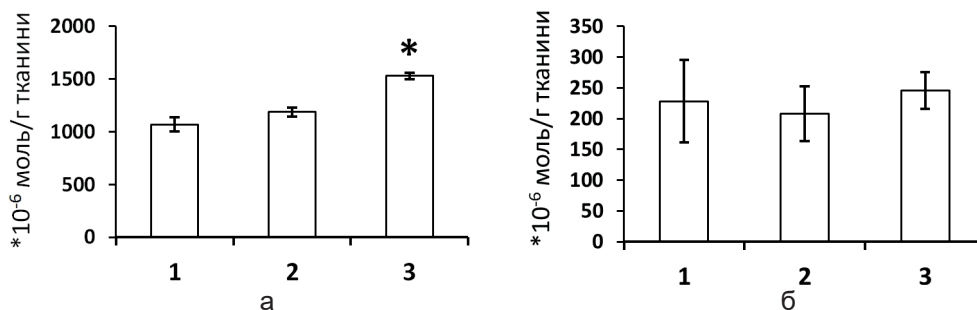


Рис. 4. Вміст відновленої (а) та окисненої (б) форми глутатіону в тканинах серця контрольних щурів (1), після введення препарату глутатіону за 10 хв (2) та за 30 хв (3) до декапітації. * $P < 0,05$ щодо контролю

МПТП. Імовірно, додавання глутатіону до перфузійного розчину під час реперфузії в нашому досліді знизило вміст АФК у міокарді, пригнітило утворення великої кількості МПТП і, відповідно, вивільнення мітохондріального фактора. Це сприяло збереженню цілісності мітохондріальних мембран та їх здатності продукувати АТФ, проявилось кращим відновленням скоротливої функції ізолюваного серця і більш ефективним використанням спожитого кисню.

Таким чином, ми вперше показали, що посткондиціювання GSH проявляє кардіопротекторну дію через інгібування МПТП, а тканини серця здатні накопичувати глутатіон з руслу крові при екзогенному його введенні. Це робить його зручним і ефективним у використанні для корекції постішемічних порушень функції міокарда та, ймовірно, інших органів.

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 coauthors of the article.

Робота виконана за підтримки Національного фонду досліджень України (реєстр. номер 0120U105074).

Р.А. Федичкина, Ю.В. Гошовская, И.Ю. Охай, К.В. Войтко, В.Ф. Сагач

ВЛИЯНИЕ ЭКЗОГЕННОГО ГЛУТАТИОНА НА КАРДИОДИНАМИКУ И ОТКРЫТИЕ МИТОХОНДРИАЛЬНОЙ ПОРЫ ПРИ ИШЕМИИ-РЕПЕРФУЗИИ СЕРДЦА КРЫС

На модели ишемии–реперфузии изолированного по Лангендорфу сердца крыс изучали влияние посткондиционирования восстановленным глутатионом (препарат гепавал «Италия / Украина») на сократительную функцию миокарда, кислородную стоимость его работы и высвобождение митохондриального фактора как маркера образования митохондриальных пор транзитной проводимости (МПТП). Обнаружили, что добавление

глутатиона (10 мг/л) во время реперфузии способствовало восстановлению давления в левом желудочке (70,2 и 56% на 5-й и 40-й минуте реперфузии против 23,6 и 30,9% в контроле), уменьшало кислородную стоимость работы ишемизированного миокарда (184 и 157% на 5-й и 40-й минуте реперфузии против 413 и 216%) и втрое уменьшало митохондриальный фактор, что свидетельствует о ингибировании открывания МПТП. Содержание восстановленного глутатиона в тканях сердца достоверно увеличивается в 1,5 раза через 30 мин после введения гепавала внутривенно (52 мг/кг), что указывает на накопление его тканями из кровотока. Таким образом, мы показали, что посткондиционирование восстановленным глутатионом осуществляет кардиопротекторный эффект, угнетает образование МПТП и может использоваться как средство для уменьшения постишемических нарушений функции сердца.

Ключевые слова: ишемия; посткондиционирование; глутатион; сердце; кислородная стоимость работы; митохондриальная пора.

R.A. Fedichkina, Yu.V. Goshovska, K.V. Voytko, I. Yu. Okhai, V.F. Sagach

GLUTATHIONE POSTCONDITIONING ATTENUATES MYOCARDIAL ISCHEMIA-REPERFUSION INJURY IN RATS VIA INHIBITION OF MPTP

*O.O. Bogomoletz Institute of Physiology, National Academy of Sciences of Ukraine, Kyiv;
Chuiiko Institute of Surface Chemistry, National Academy of Sciences of Ukraine, Kyiv; e-mail: fedichkina@biph.kiev.ua*

The effect of post-conditioning with reduced glutathione (GSH, hepaval Italy/Ukraine) on myocardial contractility, oxygen cost, and mitochondrial factor release as a marker of mitochondrial permeability transition pore (MPTP) opening was studied in ischemia–reperfusion model at Langendorff-isolated rat heart. It was found that reperfusion with Krebs-Henseleit solution containing GSH (10 mg / l) provided more complete restoration of the left ventricle developed pressure (70.2 and 56% at 5th and 40th min of reperfusion against 23.6 and 30.9% in control, $P < 0.05$ for both), reduced oxygen cost of myocardial work (184 and 157% at 5th and 40th min of reperfusion against 413 and 216% in control, $P < 0.05$ for both), and decreased the value of mitochondrial factor by 3 times, indicating inhibition of MPTP. It was shown that the level of GSH in cardiac tissues was significantly increased by 1.5 times 30 min after administration of hepaval (52 mg/kg) intraperitoneally, indicating accumulation of GSH from the bloodstream. Thus, we have shown that post-conditioning with GSH had cardioprotective effect, inhibited the formation of MPTP and can be used as a tool for correction of post-ischemic disturbances of heart function.

Key words: ischemia; post-conditioning; glutathione; heart; oxygen cost of work; mitochondrial permeability transition pore.

REFERENCES

1. Cadenas S. ROS and redox signaling in myocardial ischemia-reperfusion injury and cardioprotection. *Free Radic Biol Med.* 2018;117:76-89.
2. Halestrap AP. A pore way to die: the role of mitochondria in reperfusion injury and cardioprotection. *Biochem Soc Trans.* 2010;38(4):841-60.
3. Bronicki RA, Hall M. Cardiopulmonary bypass-induced inflammatory response. *Pediatr Crit Care Med.* 2016;17:S272-8.
4. Binks A, Nolan JP. Post-cardiac arrest syndrome. *Minerva Anesthesiol.* 2010;76(5):362-8.
5. Galano A, Alvarez-Idaboy JR. Glutathione: mechanism and kinetics of its non-enzymatic defense action against free radicals. *RSC Adv.* 2011;1(9):1763.
6. Galano A. On the direct scavenging activity of melatonin towards hydroxyl and a series of peroxy radicals. *Phys Chem Chem Phys.* 2011;13(15):7178-88.
7. Curello S, Ceconi C, Bigoli C, Ferrari R, Albertini A, Guarnieri C. Changes in the cardiac glutathione status after ischemia and reperfusion. *Experientia.* 1985;41(1):42-3.
8. Ozer MK, Parlakpınar H, Cigremis Y, Ucar M, Vardi N, Acet A. Ischemia-reperfusion leads to depletion of glutathione content and augmentation of malondialdehyde production in the rat heart from overproduction of oxidants: Can caffeic acid phenethyl ester (CAPE) protect the heart? *Mol Cell Biochem.* 2005;273(1-2):169-75.
9. Renner A, Sagstetter MR, Götz ME, Lange V, Bengel D, Harms H, et al. Heterotopic rat heart transplantation: Severe loss of glutathione in 8-hour ischemic hearts. *J Hear Lung Transplant.* 2004;23(9):1093-102.
10. Golling M, Kellner H, Fonouni H, Rad MT, Urbaschek R, Breitskreutz R, et al. Reduced glutathione in the liver as a potential viability marker in non-heart-beating donors. *Liver Transplant.* 2008;14(11):1637-47.
11. Neely, Liebermeister H, Battersby E, Morgan H. Effect of pressure development on oxygen consumption by isolated rat heart. *Am J Physiol Content.* 1967;212(4):804-14.
12. Rahman I, Kode A, Biswas SK. Assay for quantitative determination of glutathione and glutathione disulfide levels using enzymatic recycling method. *Nat Protoc.* 2006;1(6):3159-65.
13. Rutkevich S, Luzina KM, Polukhovich GS, Chumak AG. Effect of exogenous reduced glutathione at heart rhythm of rats in transitory ischemia. *Work of BSU "Animal Physiology".* 2014;9(1):45-50.
14. Cheung P-Y, Wang W, Schulz R. Glutathione protects against myocardial ischemia-reperfusion injury by detoxifying peroxynitrite. *J Mol Cell Cardiol.* 2000;32(9):1669-78.
15. Lash LH. Mitochondrial glutathione transport: Physiological, pathological and toxicological implications. *Chem Biol Interact.* 2006;163(1-2):54-67.
16. Lash LH, Putt DA, Matherly LH. Protection of NRK-52E cells, a rat renal proximal tubular cell line, from chemical-induced apoptosis by overexpression of a mitochondrial glutathione transporter. *J Pharmacol Exp Ther.* 2002;303(2):476-86.
17. Fernández-Checa JC, Colell A, García-Ruiz C. S-Adenosyl-L-methionine and mitochondrial reduced glutathione depletion in alcoholic liver disease. *Alcohol.* 2002;27(3):179-83.
18. Ghibelli L, Coppola S, Fanelli C, Rotilio G, Civitareale P, Scovassi AI, et al. Glutathione depletion causes cytochrome c release even in the absence of cell commitment to apoptosis. *FASEB J.* 1999;13(14):2031-6.

Матеріал надійшов до редакції 01.10.2020