УДК 616.12+616.2+612.17+612.2
№ держ. реєстрації 0121U112151
Інв. № _____

НАЦІОНАЛЬНА АКАДЕМІЯ НАУК УКРАЇНИ
Інститут фізіології ім. О.О.Богомольця
01024, м. Київ, вул. Богомольця 4, тел. (044) 256-20-00

ЗАТВЕРДЖУЮ

_____
Директор Інституту фізіології
ім. О.О. Богомольця НАН України
академік НАН України
М.С. ВЕСЕЛОВСЬКИЙ
«___» _____ 2021 р.

ЗАКЛЮЧНИЙ ЗВІТ ПРО РЕАЛІЗАЦІЮ ПРОЄКТУ

№ 2020.01/0204

за договорами: №105/01.2020 від 29 жовтня 2020 року
№ 92/01/0204 від 30 квітня 2021 року

РОЗРОБКА НОВИХ МЕТОДІВ ЕКСПРЕСІЇ АТФ-ЧУТЛИВИХ КАЛІЄВИХ КАНАЛІВ КЛІТИННИХ МЕМБРАН, ЯК ПОТУЖНОЇ УНІВЕРСАЛЬНОЇ СИСТЕМИ ЕНДОГЕННОГО ЗАХИСТУ

грантова підтримка Національного фонду досліджень України
у межах конкурсу «Наука для безпеки людини та суспільства»

Науковий керівник НДР
провідний науковий співробітник,
д.б.н. _____ Р.Б. СТРУТИНСЬКИЙ

2021

Затверджено Вченою радою Інституту фізіології ім. О.О. Богомольця НАН України, протокол від 16 грудня 2021 р. № 2

СПИСОК АВТОРІВ

Науковий керівник НДР, провідний науковий співробітник, д.б.н., ст. наук. співр.	14.12.21	Р.Б. Струтинський (вступ, реферат, розділ 1, 2, 3, висновки)
Відповідальний виконавець, старший науковий співробітник, к.б.н., ст. наук. співр.	14.12.21.	Н.А. Струтинська (розділ 1, 2, 3, висновки, список використаної літератури)
Виконавці: **Зав. відділом нервово-м'язової фізіології,** д.б.н, проф.	14.12.21	Я.М. Шуба (розділ 1, 2, 3)
Зав. відділом фізіології кровообігу, д.мед.н, проф.	14.12.21	В.Ф. Сагач (розділ 1, 2, 3)
Провідний науковий співробітник, к.б.н., ст. наук. співр.	14.12.21	А.М. Шиш (розділ 2, 3)
Науковий співробітник, к.б.н.	14.12.21	Ю.В. Гошовська (розділ 2, 3)
Науковий співробітник, к.б.н.	14.12.21	Б.Р. Шаропов (розділ 2, 3)
Науковий співробітник, к.б.н.	14.12.21	Ю.П. Коркач (розділ 2, 3)
Молодший науковий співробітник	14.12.21	Л.А. Мись (розділ 2, 3)
Молодший науковий співробітник	14.12.21	Р.А. Федічкіна (розділ 2, 3)

Провідний інженер	14.12.24	Р.А. Ровенець (розділ 2, 3, список використаної літератури)
Інженер	14.12.24	О.В. Сваричевський (розділ 2, 3)
Інженер	14.12.24	В.Р. Струтинський (розділ 2, 3, список використаної літератури)
Інженер	14.12.24	С.Г. Круковес (розділ 2)
Аспірант	І. Охай 14.12.24	І.Ю. Охай (розділ 3)

РЕФЕРАТ

Проміжний звіт про НДР: 174 ст., містить 3 розділи, 68 рис., 17 табл., 220 джерел літератури.

Об'єкт дослідження – АТФ-чутливі калієві канали клітинних мембран.

Предмет дослідження – експресія АТФ-чутливих калієвих каналів клітинних мембран.

Мета роботи – розробка нових методів підвищення експресії АТФ-чутливих калієвих каналів клітинних мембран, як потужної універсальної системи ендогенного захисту.

Методи: метод полімеразної ланцюгової реакції в реальному часі зі зворотною транскрипцією, метод "patch-clamp" з реєстрацією мембранних струмів, тензометричні вимірювання скорочення судинних препаратів, ішемія-реперфузія ізольованого та перфузованого за Лангендорфом серця, метод реєстрації відкривання мітохондріальної пори, біохімічні дослідження.

Результати та їх новизна. Відповідно до «Технічного завдання» розроблено нові методи підвищення експресії $К_{АТФ}$-каналів, які полягають у застосуванні піридоксаль-5-фосфату у дозі 0,7 мг/кг один раз на добу протягом 14 днів та внутрішньоочеревинне введення глутатіону у дозі 52 мг/кг, що може сприяти посиленню ендогенних захисних механізмів. Вперше показано, що пероральне введення піридоксаль-5-фосфату дорослим щурам майже вдвічі підвищувало експресію мРНК пороутворюючої Kir6.2 та регуляторної SUR2 субодиниць кардіоспецифічних сарколемальних $К_{АТФ}$-каналів серцевого типу, та у 1,5 раза експресію субодиниці SUR1 $К_{АТФ}$-каналів мітохондрільного типу. Вперше показано, що введення піридоксаль-5-фосфату старим щурам підвищувало у 3,6 раза експресію пороутворюючої субодиниці Kir6.1 $К_{АТФ}$-каналів судинного типу та у 2,4 раза регуляторної SUR2 субодиниці сарколемальних $К_{АТФ}$-каналів судинного і серцевого типу. Вперше показано, що внутрішньоочеревинне введення глутатіону старим щурам у дозі 52 мг/кг за одну годину до відбирання зразків достовірно підвищувало у 9,3 та 2,6 раза відповідно експресію генів KCNJ8 і KCNJ11, що кодують субодиниці Kir6.1 і

Kir6.2 сарколемальних $К_{АТФ}$-каналів судинного і серцевого типу та підвищувало у 13,1 раза експресію регуляторної субодиниці $К_{АТФ}$-каналів мітохондрільного типу SUR1. За допомогою електрофізіологічних та тензометричних експериментів на ізольованих кардіоміоцитах та судинних смужках відповідно показано значне зростання ефектів через $К_{АТФ}$ канали (майже втричі та вдвічі у кардіоміоцитах та судинних смужках відповідно), що може свідчити про підвищення їх щільності на клітинних мембранах. В експериментах на ізольованих мітохондріях показано, що застосування піридоксаль-5-фосфату, глутатіону та нікотинаміду пригнічувало Ca^{2+}-індуковане відкривання мітохондріальної пори через зменшення її чутливості до індуктора відкривання – кальцію. Вперше показано, що у тварин із збільшеною експресією Kir6.1 та SUR2 за допомогою піридоксаль-5-фосфату відновлення скоротливої діяльності та коронарного потоку під час реперфузії ішемізованого серця було значно кращим. Пригнічення цих ефектів специфічним інгібітором $К_{АТФ}$-каналів глібенкламідом свідчить, що принаймні частково ці захисні ефекти викликані активацією $К_{АТФ}$-каналів. Водночас у тварин з підвищеною експресією Kir6.1 і Kir6.2 за допомогою глутатіону достовірно кращим відновлення ішемізованого серця було лише на ранній стадії реперфузії.

Аналіз біохімічних показників свідчить, що підвищення експресії $К_{АТФ}$-каналів у старих модифікованих тварин асоціюється зі зниженням оксидативного стресу, що полягає в пригніченні утворення супероксид-аніона, пероксиду водню і гідроксильного радикала, зменшенні утворення продуктів перекисного окиснення ліпідів – дієнових кон'югатів і малонового діальдегіду, зниженні вмісту вільної арахідонової кислоти та її похідних – лейкотриєну $С_4$ і тромбоксану $В_2$, утворення яких супроводжується продукуванням супероксиду, а також підвищенням конститутивнго синтезу NO, та навпаки, пригніченням індуцибельного синтезу NO, активності нітратредуктази та пригніченні деградації L-аргініну аргіназою, що зберігає субстрат для NO-синтаз.

Наукові дослідження даної НДР заслуговують на продовження.

Наукові результати цієї роботи є основою подальших досліджень з метою створення оригінальних методів підвищення експресії $К_{АТФ}$-каналів клітинних мембран, які можуть бути застосовані в терапевтичній практиці з метою профілактики та лікування захворювань, що супроводжуються гіпоксією та ішемією тканин, зокрема, таких як ішемічна хвороба серця, інфаркт міокарда, інсульт, а також можливе застосування при COVID-19-індукованій поліорганній гіпоксії та ішемії.

Ключові слова: ЕНДОГЕННИЙ ЗАХИСТ; $К_{АТФ}$-КАНАЛИ; ЕКСПРЕСІЯ ГЕНІВ; КАРДІОПРОТЕКЦІЯ; ПІРИДОКСАЛЬ-5-ФОСФАТ; ГЛУТАТІОН; СУДИННІ РЕАКЦІЇ; ІЗОЛЬОВАНІ КАРДІОМІОЦИТИ; МІТОХОНДРІАЛЬНА ПОРА; ІШЕМІЯ; ОКИСНИЙ СТРЕС; СИСТЕМА ОКСИДУ АЗОТУ.

ABSTRACT

Interim report SRW: 174 p., contain 3 chapters, 68 figures, 17 tables, 220 sources of literature.

The object of study - ATP-sensitive potassium channels of cell membranes.

The subject of the study - expression of ATP-sensitive potassium channels of cell membranes.

The aim of the work is to develop new methods to increase the expression of ATP-sensitive potassium channels of cell membranes as a powerful universal system of endogenous protection.

Methods: polymerase chain reaction (PCR) with reverse transcription; electrophysiological experiments with the registration of membrane currents through the K_{ATP}-channels of isolated rat cardiomyocytes using the method of "patch-clamp", tensometric measurements of vascular contraction; ischemia-reperfusion of isolated and perfused according to Langendorf of hearts; the study of the sensitivity of the mPTP opening to its inducer of calcium ions will be performed on isolated mitochondria by spectrophotometric registration of organelle swelling; biochemical methods.

Results and their novelty. In accordance with the "Terms of Reference" developed new methods to increase the expression of K_{ATP}-channels, which consist in the use of pyridoxal-5-phosphate at a dose of 0.7 mg/kg once a day for 14 days and intraperitoneal administration of glutathione at a dose of 52 mg/kg, which may enhance endogenous defense mechanisms. Oral administration of pyridoxal-5-phosphate to adult rats was shown for the first time to almost double the expression of mRNA of the pore-forming Kir6.2 and regulatory SUR2 subunits of cardiospecific sarcolemmal heart K_{ATP} channels and 1.5-fold the expression of the regulatory subunit of the K_{ATP} channels of the mitochondrial type SUR1. For the first time, administration of pyridoxal-5-phosphate to old rats was shown to increase 3.6-fold the expression of the pore-forming Kir6.1 subunit of vascular-type K_{ATP} channels and 2.4-fold the regulatory SUR2 subunit of sarcolemmal K_{ATP} channels vascular and

cardiac type. It was shown for the first time that intraperitoneal administration of glutathione to old rats at a dose of 52 mg/kg significantly increased 9.3 and 2.6 times, respectively, the expression of genes KCNJ8 and KCNJ11 encoding subunits Kir6.1 and Kir6.2 sarcolemmal K_{ATP} channels vascular and cardiac type and increased by 13.1-fold the expression of the regulatory subunit of the mitochondrial type K_{ATP} channels SUR1. Electrophysiological and strain gauge experiments on isolated cardiomyocytes and vascular strips, respectively, showed a significant increase in effects through K_{ATP} channels (almost three and twice in cardiomyocytes and vascular strips, respectively), which may indicate an increase in their density on cell membranes. Experiments on isolated mitochondria have shown that the use of pyridoxal-5-phosphate, glutathione, and nicotinamide inhibited Ca2 + -induced opening of mPTP (mitochondrial permeability transition pore) by reducing its sensitivity to the inducer of its discovery - calcium. For the first time, it was shown that in animals with increased expression of Kir6.1 and SUR2 by pyridoxal-5-phosphate, recovery of contractile activity and coronary flow during reperfusion of ischemic heart was significantly better. Inhibition of these effects by the specific inhibitor of K_{ATP} channels by glibenclamide indicates that at least in part these protective effects are caused by the activation of K_{ATP} channels. At the same time, in animals with increased expression of Kir6.1 and Kir6.2 by glutathione, significantly better recovery of an ischemic heart was only at an early stage of reperfusion.

Analysis of biochemical parameters shows that increased expression of K_{ATP} channels in older modified animals is associated with a decrease in oxidative stress, as evidenced by inhibition of the formation of superoxide anion, hydrogen peroxide, and hydroxyl radical, reduction the formation of products of oxidation of lipids - diene conjugates and malonic dialdehyde, a decrease of the content of free arachidonic acid and its derivatives - leukotriene C4 and thromboxane B2, the formation of which is accompanied by the production of superoxide, as well as increasing the protective constitutive synthesis of NO, and contrary, inhibition of excessive inducible and salvage synthesis of NO, and inhibition of L-arginine

degradation by arginase, which is a competing enzyme with NOSs for the common substrate - L-arginine.

Scientific research in this SRW deserves to be continued.

The scientific results of this work are the basis for further research to create original methods to increase the expression of K_{ATP} channels of cell membranes, which can be used in therapeutic practice for the prevention and treatment of diseases accompanied by hypoxia and tissue ischemia, such as coronary heart disease, myocardial infarction, stroke, and possible use in COVID-19-induced multiorgan hypoxia and ischemia.

Key words: ENDOGENOUS PROTECTION; ATP-SENSITIVE POTASSIUM CHANNELS; GENE EXPRESSION; CARDIOPROTECTION; PYRIDOXAL-5-PHOSPHATE; GLUTATHIONE; VASCULAR REACTIONS; ISOLATED CARDIOMYOCYTES; MITOCHONDRIAL PERMEABILITY TRANSITION PORE; ISCHEMIA; OXIDATIVE STRESS; NITRIC OXIDE SYSTEM.

ЗМІСТ

ПЕРЕЛІК УМОВНИХ ПОЗНАЧЕНЬ…… 12
ВСТУП ……..... 14
РОЗДІЛ 1. СТРУКТУРА ТА ЗАХИСНІ ВЛАСТИВОСТІ $К_{АТФ}$-КАНАЛІВ.. 18
1.1. Структура $К_{АТФ}$-каналів.…….…….. 18
1.2. Протекторні властивості $К_{АТФ}$-каналів……...…… 22
1.2.1. Кардіопротекторні ефекти активації сарко-$К_{АТФ}$-каналів…….. 26
1.2.2. Кардіопротекторні ефекти активації міто-$К_{АТФ}$-каналів…… 28
1.2.3. Вплив активації $К_{АТФ}$-каналів на вміст АТФ при ішемії-реперфузії 30
1.2.4. Потужний вплив активації $К_{АТФ}$-каналів на систему оксиду азоту….. 32
1.2.5. Вплив активації $К_{АТФ}$-каналів на вільнорадикальні процеси та антиоксидантну систему…….…… 32
1.2.6. Мембранопротекція та активність катаболічних ферментів……. 33
1.2.7. Узагальнення кардіопротекторних ефектів активації $К_{АТФ}$-каналів…. 34
РОЗДІЛ 2. МАТЕРІАЛИ ТА МЕТОДИ ДОСЛІДЖЕНЬ …….…… 37
2.1. Експериментальні тварини…….. 37
2.2. Розробка способів зміни експресії генів, що кодують $К_{АТФ}$-канали….. 37
2.3. Метод визначення експресії мРНК Kir6.1, Kir6.2, SUR1 і SUR2 субодиниць $К_{АТФ}$-каналів…… 38
2.4. Отримання та культивування неонатальних кардіоміоцитів щура…….. 39
2.5. Електрофізіологічні експерименти та розчини…….. 40
2.6. Дослідження показників скорочувальної функції ізольованого серця щурів за ішемії-реперфузії ……..……..……. 42
2.7. Тензометричні вимірювання реакцій скорочення/розслаблення ізольованих судинних смужок…… 44
2.8. Виділення фракції мітохондрій із серця щурів…….. 44
2.9. Метод реєстрації відкривання мітохондріальної пори……. 45
2.10. Біохімічні методи досліджень……...……..... 45
2.11. Статистичне оброблення результатів …….. 50

РОЗДІЛ 3. РЕЗУЛЬТАТИ ДОСЛІДЖЕНЬ……... 52
3.1. Модуляція експресії генів, що кодують $К_{АТФ}$-канали, у дослідних тварин…… 52
3.1.1. Дослідження експресії генів KCNJ8, KCNJ11, ABCC8 та ABCC9 за дії глутатіону…… 52
3.1.2. Дослідження експресії генів KCNJ8, KCNJ11, ABCC8 та ABCC9 за дії піридоксаль-5-фосфату…… 54
3.1.3. Дослідження експресії генів, що кодують $К_{АТФ}$-канали за дії нікотинаміду у дорослих та старих щурів…… 58
3.1.4. Дослідження експресії генів KCNJ8, KCNJ11, ABCC8 та ABCC9 за дії активатора $К_{АТФ}$-каналів тіофлокаліну…… 60
3.1.5. Дослідження експресії генів KCNJ8, KCNJ11, ABCC8 та ABCC9 за різних моделей гіпоксії…….. 62
3.2. Електрофізіологічні експерименти по реєстрації мембранних струмів ізольованих кардіоміоцитів щура …… 66
3.3. Дослідження реакцій скорочення/розслаблення ізольованих судинних смужок у тварин з підвищеною експресією $К_{АТФ}$-каналів……. 70
3.4. Дослідження чутливості мітохондріальної пори до кальцію у серці за дії можливих індукторів експресії $К_{АТФ}$-каналів …..…..... 74
3.4.1. Дослідження чутливості мітохондріальної пори до кальцію у серці за дії піридоксаль-5-фосфату ……..……..... 74
3.4.2. Дослідження чутливості мітохондріальної пори до кальцію у серці за дії глутатіону…….……..... 77
3.4.3. Дослідження кальційіндукаованого відкривання мітохондріальної пори дорослих і старих щурів в умовах курсового введення нікотинаміду …….……..…….. 82
3.5. Кардіопротекторні ефекти у тварин з підвищеною експресією $К_{АТФ}$-каналів за ішемії-реперфузії міокарду……. 86
3.5.1. Дослідження кардіопротекторних ефектів у тварин з підвищеною експресією $К_{АТФ}$-каналів за дії глутатіону…… 86

3.5.2. Дослідження кардіопротекторних ефектів у тварин з підвищеною експресією $К_{АТФ}$-каналів за дії піридоксаль-5-фосфату…….. 93
3.6. Дослідження біохімічних показників, що характеризують окисний стрес та систему оксиду азоту у тварин з підвищеною експресією $К_{АТФ}$-каналів …… 102
3.6.1. Дослідження біохімічних показників, що характеризують окисний стрес та систему оксиду азоту за дії піридоксаль-5-фосфату……. 102
3.6.1.1. Дослідження впливу піридоксаль-5-фосфату на показники окисного стресу та систему оксиду азоту у мітохондріях серця старих щурів…… 102
3.6.1.2. Визначення впливу піридоксаль-5-фосфату на показники окисного стресу та систему оксиду азоту у тканинах серця старих щурів…… 115
3.6.1.3. Дослідження впливу піридоксаль-5-фосфату на показники окисного стресу та систему оксиду азоту в плазмі крові старих щурів. 123
3.6.1.4. Визначення впливу піридоксаль-5-фосфату на показники оксидативно- нітрозативного стресу та конститутивного синтезу NO в тканинах аорти старих щурів…….. 132
3.6.2. Дослідження біохімічних показників, що характеризують окисний стрес та активність mtNOS за дії глутатіону……. 140
ВИСНОВКИ……. 147
СПИСОК ВИКОРИСТАНОЇ ЛІТЕРАТУРИ..……..... 151
ПЕРЕЛІК НАКОВИХ ПРАЦЬ, ВИДАНИХ ЗА ТЕМОЮ ДОСЛІДЖЕННЯ. 174

ПЕРЕЛІК УМОВНИХ ПОЗНАЧЕНЬ

$^{\bullet}OH$ – гідроксильний радикал

ABCC8 – ген, що кодує SUR1 субодиницю $К_{АТФ}$-каналу

ABCC9 – ген, що кодує SUR2 субодиницю $К_{АТФ}$-каналу

GSH – відновлений глутатіон

GSSG – окиснений глутатіон

H_2O_2 – пероксид водню

KCNJ11 – ген, що кодує Kir6.2 субодиницю $К_{АТФ}$-каналу

KCNJ8 – ген, що кодує Kir6.1 субодиницю $К_{АТФ}$-каналу

Kir6.1 – пороутворююча субодиниця АТФ-чутливого калієвого каналу

Kir6.2 – пороутворююча субодиниця АТФ-чутливого калієвого каналу

mtNOS – мітохондріальна NO-синтаза

NAM – нікотинамід

$O_2^{\bullet-}$ – супероксид-аніон

PLP – піридоксаль-5-фосфат

ROMK (Kir1) – мембранний канал

SUR1 – регуляторна субодиниця АТФ-чутливого калієвого каналу

SUR2 – регуляторна субодиниця АТФ-чутливого калієвого каналу

TMD0, TMD1 и TMD2 – ділянки у структурі SUR субодиниці $К_{АТР}$-каналу

ГМК – гладеньком'язові клітини

ГРДС – гострий респіраторний дистрес-синдром

ІПК – ішемічне прекондиціювання

ІСФ – інтенсивність скоротливої функції

$К_{АТФ}$ канал – АТФ-чутливий калієвий канал

міто-$К_{АТФ}$-канал – АТФ-чутливий калієвий канал внутрішньої мембрани мітохондрій

МП – мітохондріальна транспортна пора

сарко-$К_{АТФ}$-канал – АТФ-чутливий калієвий канал сарколемальної мембрани

ВСТУП

Сучасний розвиток людства супроводжується урбанізацією населення та технолізацією життя, що змінює спосіб життя людей, зменшуючи рухливість та збільшуючи кількість рафінованих продуктів споживання. Все це, разом з підвищенням соціальних негараздів та стресових станів суттєво збільшує розвиток «цивілізаційних» захворювань, до яких з впевніностю можна віднести захворювання серцево-судинної системи. Незважаючи на істотний прогрес у профілактиці та лікуванні серцево-судинних захворювань вони все ще залишаються основною причиною смертності (67%) та інвалідності населення у більшості країн світу [1, 2]. В Україні за останні 30 років їх поширеність зросла в 3,5 раза, а рівень смертності від них – на 46 % [1]. Наслідком постійного збільшення техногенного втручання людей у природне середовище та неуклінний ріст збільшення населення на планеті все частіше виникають нові захворювання різної природи. Одним із них є найважливіша на сьогодні медико-соціальна проблема – лікування COVID-19, збудником якої є вірус SARS-CoV-2 та його нові модифікації, чи, принаймні, спроба мінімізувати патогенний вплив цього захворювання на людину. Одним із таких наслідків COVID-19 може бути поліорганна гіпоксія та ішемія, індуковані різними факторами, такими як пневмонія, гострий респіраторний дистрес-синдром (ГРДС), порушенням функції еритроців, тромбоутворення, порушенням функції мітохондрій [3]. Гострі стани кисневого голодування призводять до порушення функції органів та у важких випадках до некрозу тканин та загибелі організму в цілому. Проте природа еволюційно підготувалась до захисту від таких патологічних факторів (зокрема, COVID-19-індукованих), створивши ендогенні механізми протидії ішемічним ушкодженням, одним із яких є система АТФ-чутливих калієвих ($К_{АТФ}$) каналів клітинних мембран [4-6]. Їх особливістю є властивість відкриватися у відповідь на зменшення внутрішньоклітинної концентрації АТФ (енергоресурсів) нижче від мілімолярних значень [6]. Це дає змогу вважати $К_{АТФ}$-канали центральним метаболічним сенсором клітини щодо

її енергозабезпечення [5, 7]. Такі високочутливі до вмісту АТФ молекулярні структури відіграють виняткову роль у синхронизації метаболізму та електричної активності клітин, регулюють потенціалзалежні мембранні функції та підтримують гормональний гомеостаз, а їх дисфункція може сприяти патогенезу [7-10]. І навпаки, активація цих каналів має захисні ефекти. Зокрема особливу роль $К_{АТФ}$-канали мають у серцево-судинній системі, адже реалізують взаємозв'язок енергоресурсу серця, його електричної та скоротливої функцій та регулюють судинний тонус [11]. Потужна кардіопротекторна дія активації $К_{АТФ}$-каналів є актуальною також при COVID-19 [12]. Етіологія серцевих порушень при цьому захворюванні багатофакторна і включає як пряме вірусне ураження міокарда, так і гіпоксію, запальні процеси, порушення АПФ2-рецепторів та катехоламін-адренергічної регуляції та інше [12].

Потужність захисних ефектів залежить від щільності $К_{АТФ}$-каналів на клітинних мембранах. В експериментах з ішемією-реперфузією та експериментальним інфарктом міокарда було показано, що при більшій щільності $К_{АТФ}$-каналів на мембрані захисний ефект потужніший [13-15]. При збільшенні експресії $К_{АТФ}$-каналів формується стійкий до ішемії фенотип серця [15]. Навіть потужний ендогенний кардіопротекторний феномен ішемічного прекондиціювання пов'язують із збільшенням щільності $К_{АТФ}$-каналів на мембранах кардіоміоцитів [15, 16]. Проте механізми, що підвищують експресію $К_{АТФ}$-каналів мало відомі. Це поодинокі дослідження про таку властивість в більшості патологічних чинників, таких як гіпоксія [15, 17], ендотоксини [18], формальдегід [19] та сірководень[20].

Таким чином, розробка нових оригінальних методів підвищення експресії $К_{АТФ}$-каналів клітинних мембран, як потужної універсальної системи ендогенного захисту, що підвищує стійкість організму до дії патологічних гіпоксичних та ішемічних чинників є вельми актуальним напрямком сучасної фізіології та медицини. Розроблені в ході реалізації проекту методи підвищення експресії $К_{АТФ}$-каналів можуть бути використані з метою профілактики та лікування патологій ішемічної природи, зокрема, захворювань серцево-

судинної системи та для попередження дисфункції органів при поліорганній гіпоксії та ішемії, в т.ч. при COVID-19 [3], та значно полегшувати перебіг захворювання.

Навза Етап 2. Електрофізіологічні дослідження по реєстрації мембранних струмів через $К_{АТФ}$-канали ізольованих кардіоміоцитів щура за допомогою методу "patch-clamp" та визначення біохімічних показників міокарда при дії різних модуляторів експресії генів, що кодують $К_{АТФ}$-канали. Реакції скорочення/розслаблення ізольованих судинних смужок та зміни чутливості мітохондріальної пори до її індукторів у серці при дії різних модуляторів експресії генів, що кодують $К_{АТФ}$-канали. Оформлення звітної документації.

Ціллю Етапу 2 цієї НДР було: дослідження зміни щільності $К_{АТФ}$-каналів на клітинних мембранах за дії різних модуляторів експресії генів та біохімічних показників, що характеризують окисний стрес та активність ферментів системи оксиду азоту, проведення реакції скорочення/розслаблення ізольованих судинних смужок з активацією $К_{АТФ}$-каналів фармакологічним способом, як одного з показників щільності $К_{АТФ}$-каналів на клітинних мембранах, дослідження чутливості мітохондріальної пори до її індукторів у серці, як одного із показників кардіопротекції.

Завданнями Етапу 2 цієї НДР було:

1. Дослідження зміни щільності $К_{АТФ}$-каналів на клітинних мембранах за допомогою електрофізіологічних експериментів по реєстрації мембранних струмів через $К_{АТФ}$-канали ізольованих кардіоміоцитів щура за допомогою методу "patch-clamp" в конфігурації "ціла клітина".
2. Визначення біохімічних показників у серці, що характеризують окисний стрес та активність ферментів системи оксиду азоту при зміні експресії генів,що кодують $К_{АТФ}$-канали.
3. Модуляція експресії генів, що кодують $К_{АТФ}$-канали, у дослідних тварин.
4. Провести реакції скорочення/розслаблення ізольованих судинних смужок з активацією $К_{АТФ}$-каналів фармакологічним способом, як одного з показників

щільності $К_{АТФ}$-каналів на клітинних мембранах.

5. Дослідження чутливості мітохондріальної пори до її індукторів у серці при дії різних модуляторів експресії генів.
6. Оформлення звітної документації.

РОЗДІЛ 1.

СТРУКТУРА ТА ЗАХИСНІ ВЛАСТИВОСТІ $К_{АТФ}$-КАНАЛІВ

1.1. Структура $К_{АТФ}$-каналів

Один із основних ендогенних механізмів захисту клітини при зниженні її енергоресурсів – активація АТФ-чутливих калієвих ($К_{АТФ}$) каналів, які були відкриті трохи більше 30 років тому [4-7, 11]. Їх особливістю є властивість відкриватися у відповідь на зменшення внутрішньоклітинної концентрації АТФ нижче від мілімолярних значень [5, 6]. Це дає змогу вважати $К_{АТФ}$-канали центральним метаболічним сенсором клітини щодо її енергозабезпечення [5, 7]. Такі високочутливі до вмісту АТФ молекулярні структури відіграють виняткову роль у синхронизації метаболізму та електричної активності клітин, регулюють потенціалзалежні мембранні функції та підтримують гормональний гомеостаз, а їх дисфункція може сприяти патогенезу [7-10]. І навпаки, активація $К_{АТФ}$-каналів має захисні ефекти, зокрема, за ішемічного та епілептичного інсульту – підтримує електричну стабільність нейронів та попереджує їх ушкодження, адже їх активація призводить до гіперполяризації цитоплазматичної мембрани та зменшення вмісту цитозольного кальцію, що послаблює електричну збудливість цих клітин, а в мязових клітинах – відповідно скоротливість [9, 11].

Відомо, що цей канал має октаметричну структуру - пора каналу утворюється чотирма Kir6.x субодиницями, які зовні оточуються чотирма SUR субодиницями (рис.1.1), і, щонайменше, чотирма допоміжними білками - аденілаткіназами та креатинкіназами першого типу, м'язову форму лактатдегідрогеназами (ЛДГ-м) і гліцероальдегід 3-фосфатдегідрогеназами (GAPDH) [21-25].

Є декілька типів субодиниць, які відрізняються між собою за складом трансмембранних доменів і визначають специфічні властивості каналу.

Принаймні дві Kir6.x субодиниці – Kir6.1 та Kir6.2, та три SUR-рецептора – SUR1, SUR2A та SUR2B [26, 27]. Комбінації цих білків утворюють різні підтипи $К_{АТФ}$-каналів, які визначають їх властивості та відповідають певним тканинам організму [27, 28]. Зокрема, комбінація SUR2B/Kir6.1 переважно відповідає судинним ГМК. Проте у ворітній вені виявлено також підтип SUR2B/Kir6.2, який проявляє спонтанну активність на окремих ділянках мембрани, високу чутливість до інгібуючої дії АТФ ($К_{1/2\ АТФ} \approx 20$ мкмоль/л) та підвищену провідність, подібну до провідності SUR2A/Kir6.2 у кардіоміоцитах.

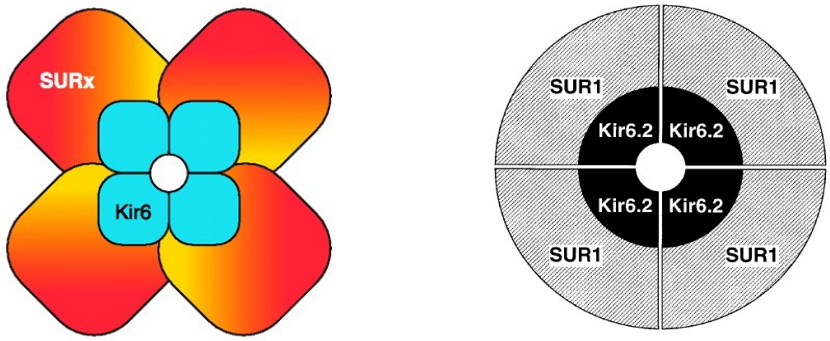


Рис. 1.1 Октаметрична структура $К_{АТФ}$-каналу.

Підтип SUR2B/Kir6.2 відповідає також переважно не судинним ГМК. SUR2B, Kir6.1 та Kir6.2 – ендотеліальним клітинам коронарних судин [29] та аорти [30-32]. SUR2A/Kir6.2 – скелетним м'язам, SUR1/Kir6.2 – панкреатичним β-клітинам [27, 28]. В яєчках та кардіоміоцитах зустрічаються всі 5 вище перерахованих субодиниць. Проте для останніх комбінація SUR2A/Kir6.2 є найбільш поширеною [27, 28, 32, 33]. Слід зауважити, що у мишей сарколемальні канали кардіоміоцитів передсердя складаються переважно з SUR1/Kir6.2, тоді як у шлуночках з SUR2A/Kir6.2 [34, 35]. Можливо, що у великих тварин та людей такої чіткої диференціації цих SUR білків у структурі каналу клітин передсердя та шлуночків немає [36]. Ситуація зі структурою $К_{АТФ}$-каналів клітин сіноатриальних вузлів та провідних пучків є ще більш заплутаною [37]. Можлива присутність як Kir6.2, так і Kir6.1 білків [38]. Крім

того, субодиниця SUR1 є частиною $К_{АТФ}$-каналу нейрональних клітин та внутрішньої мембрани мітохондрій. Згодом виявилось, що цей канал, в подальшому названий міто-$К_{АТФ}$-каналом, задіяний в механізмах кардіопротекції. Зокрема, в ішемічному пре- та посткондиціонуванні [39-42].

Раніше вважали, що міто-$К_{АТФ}$-канал складається з SUR1 і Kir6.1 [43], проте пізніше виявилось, що структура цих каналів значно складніша [28]. За сучасними уявленнями він утворюється модифікованими SUR1 та ROMK2 (Kir1) субодиницями, та має значно складнішу структуру ніж канал плазматичної мембрани [28, 44]. За Ardehali et al [45, 46] макромолекулярний комплекс каналу складається з ключового ферменту циклу Кребса і електрон-транспортного ланцюжка – сукцинатдегідрогенази, мітохондріальної АТФ-зв'язуючої касети протеїну-1 (mABC-1), АТФ-синтази, аденіннуклеотидтранслокази, фосфатних білків-переносників та невідомих компонентів, що утворюють канальну пору [60, 61]. У 2012 р. останні були ідентифіковані як ROMK2 [44]. Відомо, що крім мітохондрій в клітині $К_{АТФ}$ - канали також є на мембранах ядер [47] та ендоплазматичного ретикулюма (Kir6.2/SUR1 чи SUR2) [48], інсулін-секреторних гранул ß-клітин (SUR1/Kir6.2) [49, 50] та зимогенних гранулах ацинарних клітин (Kir6.1) підшлункової залози [51]. Нервові $К_{АТФ}$-канали переважно складаються з комбінації SUR1/Kir6.2, проте варіанти SUR2B/Kir6.1, та SUR2B/Kir6.2 також присутні [7]. Таким чином, $К_{АТФ}$-канали в різних тканинах мають різну чутливість до модуляторів їх активності.

Слід зауважити, що насамперед ступінь відкривання/інгібірування каналу залежить від стану нуклеотид-зв'язуючих ділянок каналу та співвідношення інгібуючих та стимулюючих канал нуклеотидів, а саме АТФ і АДФ відповідно. Відомо, SUR субодиниця (~160 kDa) каналу є регуляторною та відноситься до нуклеотид-зв'язуючих білків (рис. 1.2).

Kir6.x субодиниця (~40 kDa) є білком, який відноситься до калієвих каналів внутрішнього випрямлення та переважно визначає провідні властивості $К_{АТФ}$-каналу [52]. Проте АТФ-зв'язуюча ділянка, що інгібує канал, розташована

саме на тетраметричному комплексі, що утворюється з чотирьох Kir6.x субодиниць (див. рис. 1.2) [26].

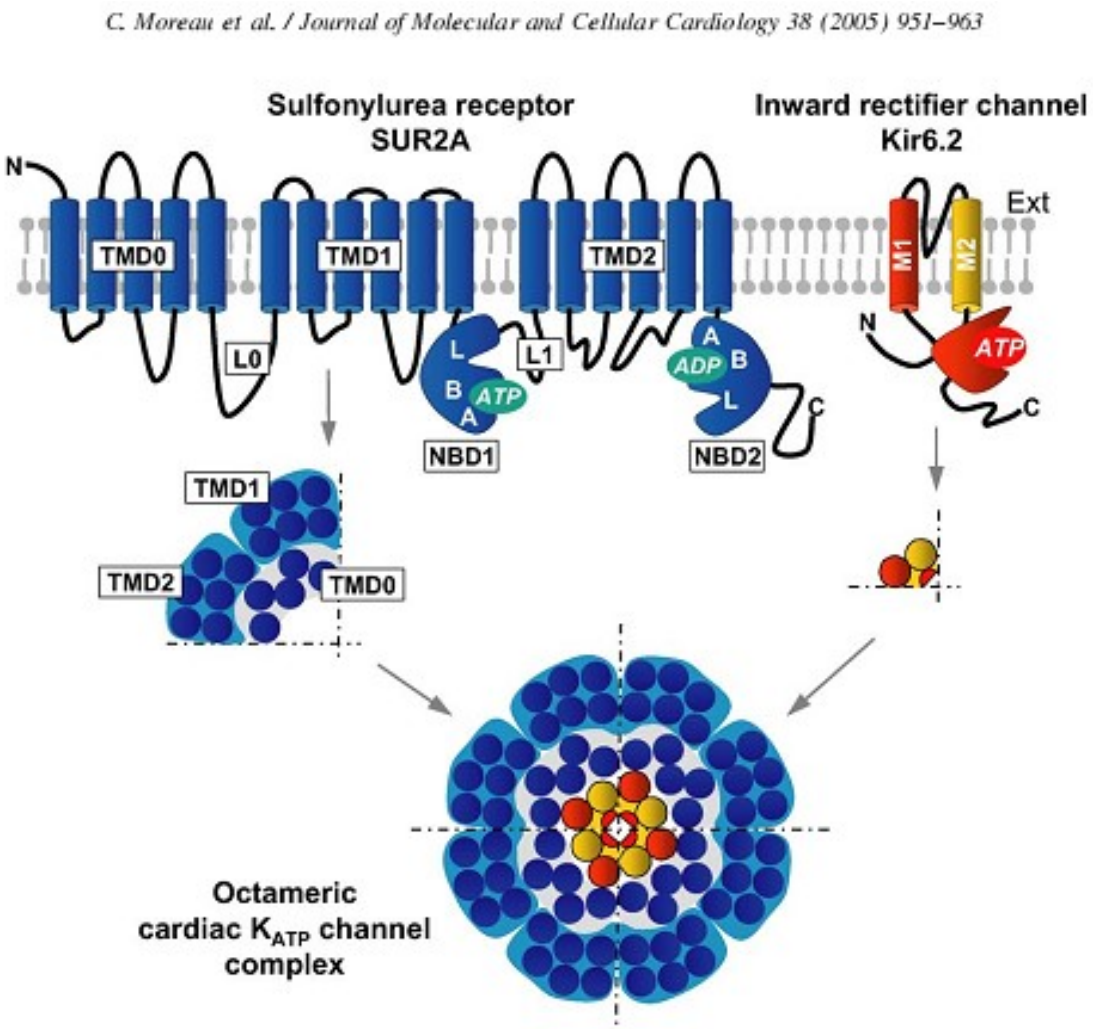


Рис. 1.2 Мембранна топологія і структурна організація $К_{АТФ}$-каналу кардіоміоцита по Moreau C. et al [57]. Основними структурними компонентами $К_{АТФ}$-каналу кардіоміоцита є Kir6.2 субодиниця (390 амінокислот) і SUR2A регуляторний рецептор (1549 амінокислот).

Кожна Kir6.x субодиниця складається з двох трансмембранних окремих доменів: M1 і M2. Водночас NH_2- і COOH-кінці субодиниць розташовані в цитоплазмі клітини та утворюють ділянку, що відповідає за зв’язування молекул АТФ. Вважається, що у приєднанні однієї молекули АТФ приймають

участь два Kir6.x білка [28, 34, 53]. Зокрема, коли K185 і R201 ділянки C-закінчення однієї Kir6.x субодиниці і R50 в N-закінченні іншої прямо взаємодіють з γ- і β- фосфатами АТФ відповідно, аденінове кільце молекули АТФ взаємодіє з E179 та R301 ділянками другої субодиниці Kir6.x [54]. Також цей комплекс може посилювати здатність каналу до відкривання та зменшувати чутливість каналу до АТФ, відповідає за регулювання чутливості каналу фосфоліпідами, зокрема PIP2 [55, 56].

У структурі SUR-рецептору виділяють три окремих ділянки, названих TMD0, TMD1 и TMD2, що складаються з 5, 6 і 6 трансмембранних доменів відповідно (див. рис. 1.2, SUR2A). NH_2-кінець SUR білка від плазматичної мембрани розташований зовні. COOH-кінець – в цитоплазмі клітини [28, 58]. SUR-рецептор каналу також містить два гідрофільні АТФ-зв'язуючі домени (нуклеотид-зв’язуючі ділянки): NBD1 і NBD2, кожен з яких утворює по дві ділянки, названі Walker A і Walker B motifs, що сполучені так званою Linker L-сайтом, та утворюють каркас для LSGGQ-зв'язуючої ділянки та два залишки – глутаміновий (Q-петля) і гістаминовий (H-петля).

Таким чином, $К_{АТФ}$-канал є складним комплексом, що містить 96 переважно трансмембранних доменів і 12 нуклеотид-зв’язуючих регуляторних зон. Інгібування каналу за допомогою АТФ відбувається на комплексі Kir6.x, а активація каналу за допомогою MgАТФ та АДФ на комплексі SUR [26, 28, 53].

1.2. Протекторні властивості $К_{АТФ}$-каналів

$К_{АТФ}$-канали є високочутливими до рівнів [АТФ]і молекулярними структурами, що регулюють потенціал-залежні мембранні функції [7, 8, 54, 59]. Зважаючи на їх виняткову роль в синхронизації метаболізму та трансмембранної електричної активності слід зазначити, що їх дисфункція підвищує сприйнятливість людей до цілого ряду небезпечних для життя захворювань [7, 60-62].

Зокрема, ці канали підтримують електричну стабільність нейронів

(особливо за ішемічного та епілептичного інсульту), де вони не лише зменшують електричну збудливість, пригнічуючи постсинаптичну деполяризацію, що була індукована звільненням збуджуючих нейротрансміттерів, зокрема, глутамату та аспартату (які виділяються за гіпоксії при деполяризації нейронів), а також завдяки зменшенню цитозольного кальцію, при цьому попереджують ушкодження нейронів [63-65]. Крім того, відкривання вищезазначених калієвих каналів інгібує індукований окисним стресом апоптоз нейронів [66] та захищає нейрони і судинні ендотеліальні клітини від β-амілоїдної токсичності, яка є головною нейропатологічною рисою хвороби Альцгеймера і старіння [67]. Відомо, що порушення реполяризації мембран нейронів сприяє генерації судом та розладів руху. Водночас відкривання $К_{АТФ}$-каналів призводить до гіперполяризації мембрани нейронів та зменшення їх збудливості, що попереджує епілептичні напади [65].

Фармакологічні активатори цих каналів також зменшують втомлюваність скелетних м’язів та покращують їх роботу при гіпокаліємічному паралічі [68]. Стимуляція $К_{АТФ}$-каналів може мати знеболюючий ефект, що опосередковується вивільненням ендорфінів, енкефалінів та активацією опіоїдних рецепторів [69, 70]. Синтетичні активатори можуть посилювати анальгетичну дію наркотичних препаратів [71] та попереджувати синдром відміни морфіну [72]. Отже, активатори цих каналів можна використовувати в терапевтичних цілях як анальгетики при хронічних больових синдромах замість наркотичних знеболювальних засобів та при лікуванні наркозалежності.

Значну роль ці канали відіграють в попередженні порушень гормонального гомеостазу [73, 74].

У пульмонології стимуляцію $К_{АТФ}$-каналів можна застосовувати для зняття бронхоспазму та покращення вентиляції легень при астмі, хронічному обструктивному бронхіті та у хворих на ГРДС [15, 75]. Водночас ГРДС часто супроводжує COVID-19, а люди з супутньою патологією легень відносяться до групи ризику [12]. Позитивний ефект активації цих каналів полягає не лише в зменшенні гіперактивності м’язової стінки бронхів, а також у зниженні

збудливості нейронів та зменшенні утворення слизу секреторними клітинами у відповідь на алергени та інші подразники [76].

В урології фармакологічна активація цих каналів може бути застосована при гіперактивності сечовидільної системи [77] та еректильній дисфункції нейрогенної та судинної етіології [78], для нефропротекції [79]. За відкривання вищезазначених каналів відбувається гіперполяризація мембран ГМК та, як наслідок, їх розслаблення та заповнення печеристих тіл [79, 80].

У дерматології синтетичні активатори вищезазначених каналів, завдяки їх властивості посилювати кровопостачання волосяних фолікул, застосовують для відновлення нормального росту волосся [81].

При ішемії активація $К_{АТФ}$-каналів має потужну антиоксидантну [82, 83] та протизапальну дію – пригнічує утворення лейкотриєнів [84, 85], які є одними з найбільш потужних хемоатрактантів для нейтрофілів, неконтрольоване накопичення яких в легенях при COVID-19 збільшує їх ураження [86]. Слід зазначити, що ці канали пригнічують утворення надлишкового NO індуцибельною NO-синтазою [87], який значно збільшується в легенях при ГРДС і вважається патологічним чинником [86]. З огляду на ряд повідомлень про згущення крові при COVID-19 позитивною дією $К_{АТФ}$-каналів можна вважати зменшення утворення при ішемії тромбоксану $ТхВ_2$ [85, 87]. Таким чином, активація $К_{АТФ}$-каналів може зменшувати клітинні енергозатрати при поліорганній гіпоксії та ішемії, в т.ч. при COVID-19 [3], може попереджувати дисфункцію органів та значно полегшувати перебіг захворювання.

Проте особливу роль $К_{АТФ}$-канали мають у серцево-судинній системі, адже реалізують взаємозв’язок енергоресурсу серця (вмістом АТФ), його електричної та скоротливої функцій та регулюють судинний тонус. Зниження вмісту АТФ є характерним для таких загальнопатологічних станів, як ішемія і гіпоксія міокарда – найбільш поширених причин гострих порушень діяльності серця. Водночас $К_{АТФ}$-канал, що миттєво реагує на зниження АТФ чи співвідношення вмісту АТФ/АДФ вважають одним із головних ендогенних механізмів захисту від ішемії [5, 6]. Зокрема, такі ключові природні механізми

кардіопротекції, як ішемічне прекондиціювання (ІПК) та посткондиціювання опосередковуються активністю цих каналів [40, 88, 89]. Помірне їх відкривання попереджує та скасовує вже існуючі аритмії різної етіології, а саме атріальні та шлуночкові зміни ритму ішемічної та реперфузійної природи [90-92], індуковані порушеннями процесів реполяризації, деполяризації та автоматії аритмії [90, 93, 94], синдромом з вродженою чи набутою пролонгацією QT-періоду [95, 96], синдромом Бругада [90]. Незначна стимуляція $К_{АТФ}$-каналів знімає фібриляції, тахікардію та катехоламініндуковані аритмії шлуночків [90, 96, 97]. При метаболічних порушеннях міокарда вона стабілізує мембранний потенціал спокою, пригнічує патологічну міжклітинну сигналізацію і ектопічну пейсмейкерну активність [93].

Фармакологічні активатори $К_{АТФ}$-каналів зменшують зону інфаркту міокарда, попереджують ішемічну хворобу та серцеву недостатність, ремодилювання та гіпертрофію шлуночків серця [98-102]. Завдяки пригніченню метаболізму, їх активація може значно покращувати збереження донорського серця за глобальної ішемії при трансплантації [103, 104]. Значний кардіопротекторний ефект спостерігається при коронарних синдромах, церебральних вазоспазмах, легеневій та артеріальній гіпертензії, патології периферичних судин [92, 105-108]. Така потужна протекторна дія активаторів $К_{АТФ}$-каналів є наслідком не тільки коронаролітичного ефекту, але і зниження пост- і переднавантаження на серце внаслідок дії на резистивні і венозні судини [109].

Важливість $К_{АТФ}$-каналів як захисного механізму при патологічних змінах в енергетичному забезпеченні міокарда підкреслює їх щільність на плазматичній мембрані кардіоміоцита. Якщо щільність $К_{АТФ}$-каналів на плазматичній мембрані гладенькоm'язових клітин (ГМК) сечовода і сечового міхура становить близько 160 і 425 каналів відповідно або 1 канал на 39 мкм^2 клітини сечовода [110, 111], то на плазматичній мембрані ГМК артерій їх розташовано близько 300-700 (десь 0,1-1 канал на 10 мкм^2 артерії) [112, 113] і близько 330 на ГМК легеневої та 350-700 на коронарних артерій [112, 114-117].

На міоцитах комірної вени – 200-600 каналів [118, 119]. Водночас на плазматичній мембрані кардіоміоцитів розташовано на порядок більше цих каналів – близько 3000 на кардіоміоцит або 1-10 каналів на 10 мкм^2 поверхні кардіоміоцита [4, 52]. Така значна щільність $К_{АТФ}$-каналів у кардіоміоцитах порівняно з іншими клітинами свідчить про їх важливість для міокарда.

У кардіопротекції виділяють $К_{АТФ}$-канали сарколемальних (сарко-$К_{АТФ}$) і мітохондріальних (міто-$К_{АТФ}$) мембран. Ступінь антиішемічного захисту міокарда залежить від типу активованих каналів: плазматичної і мітохондріальної мембран кардіоміоцитів, ГМК та ендотеліальних судинних клітин. Слід зауважити, що індуковані активацією сарко-$К_{АТФ}$ і міто-$К_{АТФ}$-каналів механізми протекції примножуються, а через низку внутрішньоклітинних месенджерів, зокрема, протеїнкінази та активні форми кисню (АФК), можуть взаємодіяти [120, 121].

1.2.1. Кардіопротекторні ефекти активації сарко-$К_{АТФ}$-каналів

Суть антиішемічного захисту активації $К_{АТФ}$-каналів плазматичної мембрани полягає в тому, що звичайно закриті при нормальному внутрішньоклітинному вмісту АТФ, при його зниженні (гіпоксія, ішемія міокарда) вони відкриваються [4]. Це зміщує потенціал мембрани в бік гіперполяризації, зменшує тривалість потенціалу дії кардіоміоцитів, під час якого Ca^{2+} надходить в клітину, зокрема через Ca^{2+}-канали L-типу та, відповідно, знижує внутрішньоклітинну концентрацію кальцію (рис. 1.3), який є одним із головних вторинних посередників численних метаболічних реакцій і активатором багатьох ферментів [28, 122]. Це, по-перше, повинно гальмувати метаболічні процеси в клітині і зменшувати її потреби в кисні та призводити до економії енергетичних матеріалів, що дуже важливо у разі дефіциту кровопостачання серця. По-друге, гальмування входу кальцію в клітину повинно зменшувати активність ферментів, зокрема, з одного боку, може попереджати деградацію фосфоліпідів мембран фосфоліпазами

(мембраностабілізуюча дія) [123, 124], з іншого – зменшувати утворення патогенних в умовах ішемії міокарда ейкозаноїдів, зокрема – лейкотрієнів [123-125].

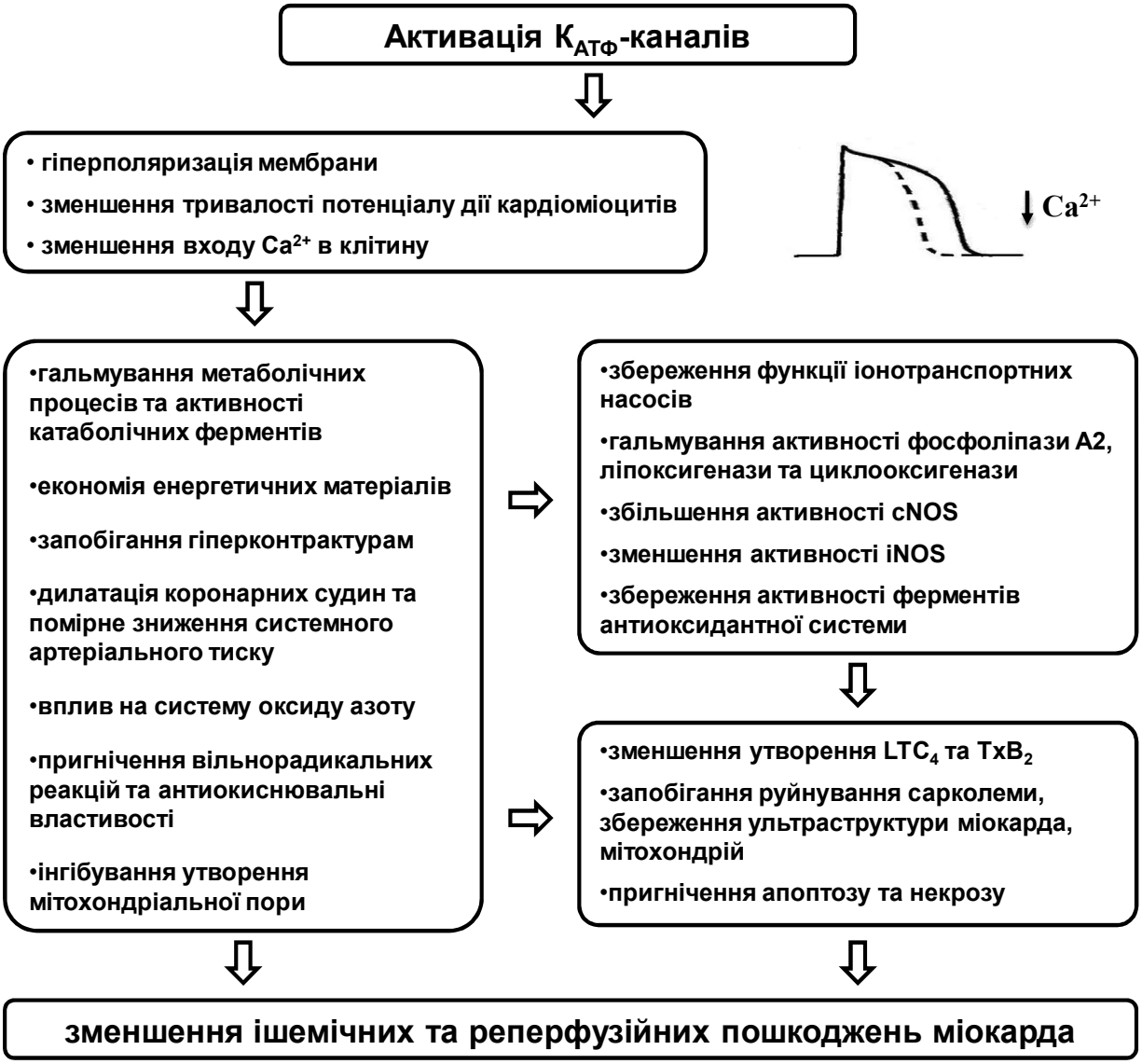


Рис. 1.3 Основні кардіопротекторні механізми активації $К_{АТФ}$-каналів за ішемії-реперфузії міокарда; cNOS та iNOS – конституційна і індуцибельна NO-синтази відповідно; LTC_4 та TxB_2 – лейкотрієн C_4 і тромбоксан B_2 відповідно [11].

По-третє, активація сарко-$К_{АТФ}$-каналів міоцитів та ендотеліоцитів коронарних судин розширює їх, що збільшує приток крові, кисню та

енергоресурсів до міокарда та попереджує реперфузійні вазоконстрикції в ішемізованому міокарді [126-129]. Тобто зумовлює краще кровопостачання міокарда. По-четверте, активація цих каналів попереджує перенавантаження кардіоміоцитів іонами кальцію і, відповідно, запобігає контрактурам міофібрил, які приводять до некротичних пошкоджень міокарда [28, 130]. Протекторним також можна вважати помірне зниження артеріального тиску, що послаблює навантаження на уражене ішемізоване серце, попередження реперфузійного підвищення загального периферичного опору, та відносне збереження показників скоротливості міокарда в період реперфузії [126, 127, 131].

1.2.2. Кардіопротекторні ефекти активації міто-$К_{АТФ}$-каналів

Один із важливих механізмів антиішемічного захисту міокарда при активації міто-$К_{АТФ}$-каналів полягає в зменшенні входу в мітохондрію кальцію та попередження її перенавантаження цим іоном (рис. 1.4) [107, 132, 133-135]. Саме відкривання цих каналів супроводжується входом калію в матрикс, деполяризацією внутрішньої мітохондріальної мембрани (зменшення її потенціалу) [134] та інгібуванням потенціалзалежного кальцієвого уніпортера. Це попереджує надмірне накопичення кальцію в мітохондрії [136], посилює її резистентність до цього іона [134, 137] та сприяє збереженню функції мітохондрій за ішемії-реперфузії серця.

Надмірне збільшення в матриксі мітохондрії Ca^{2+} та вільних радикалів при ішемії та, особливо, під час реперфузії ішемізованого міокарда призводить до підвищення проникності їх мембран і утворення мітохондріальної транспортної пори високої провідності. Збільшення цієї проникності, по-перше, спричинює порушення окисного фосфорилювання та зменшення синтезу АТФ, по-друге – вихід з мітохондрій проапоптотичних сполук (зокрема, цитохрому *c*), які через каскад каспаз запускають апоптоз [138]. Стимуляція міто-$К_{АТФ}$-каналів пригнічує утворення АФК [139], запобігає відкриванню мітохондріальної пори [137, 138], апоптозу і некрозу [8, 132, 140].

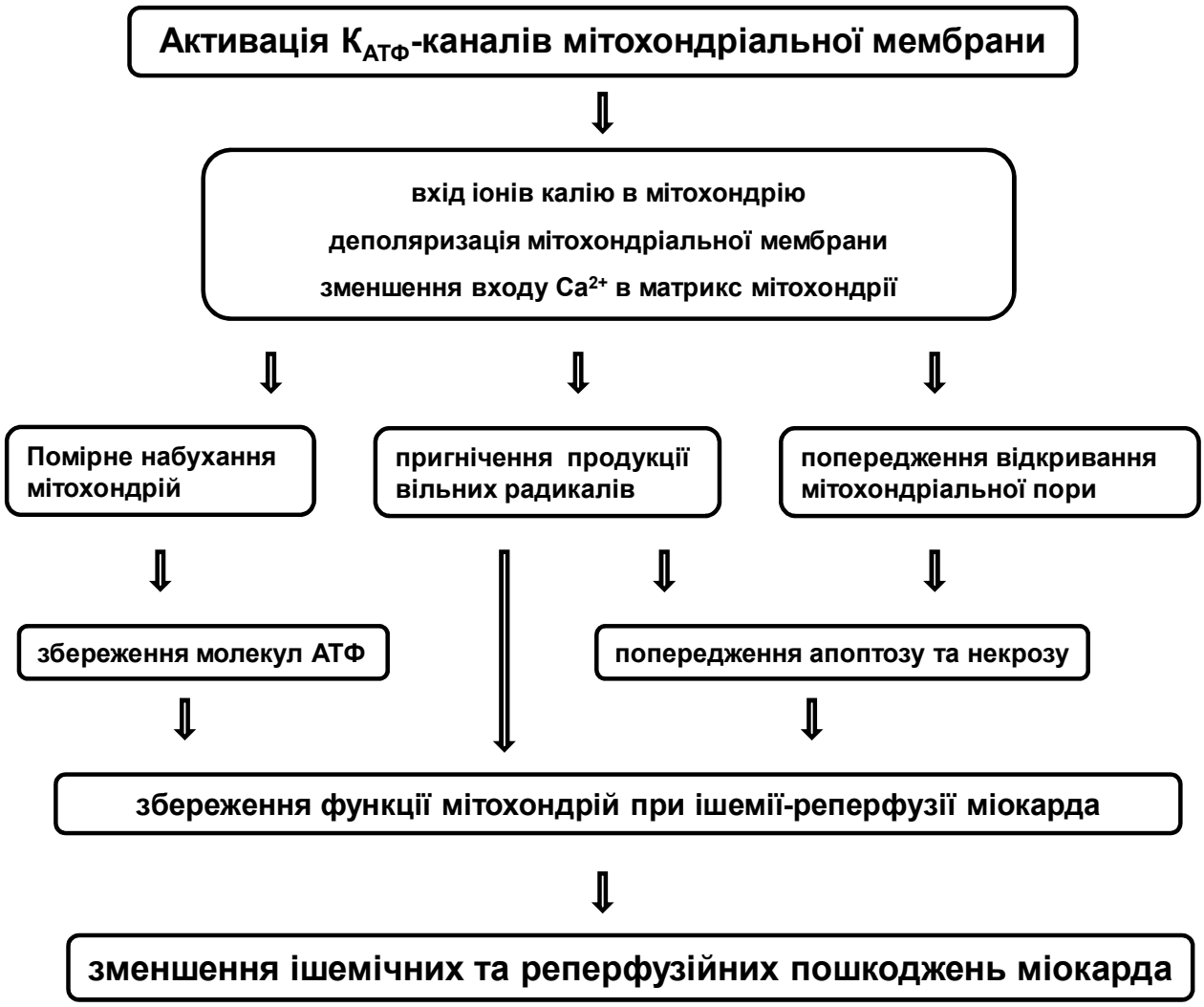


Рис. 1.4 Можливі кардіопротекторні механізми при активації $К_{АТФ}$-каналів внутрішньої мітохондріальної мембрани [11]

Активація вищезгаданих каналів спричиняє помірне набухання мітохондрій, що попереджує розпад АТФ [133, 141], стимулює дихання і зниження потенціалу на НАД-залежних субстратах [133, 142, 143]. Вхід у мітохондрію іонів калію при відкриванні цих каналів супроводжується входом неорганічного фосфату і води (що призводить до помірного осмотичного набухання матриксу мітохондрій), змінами процесів дихання та фосфорилювання, алкалізацією мітохондрій [139, 144]. Причиною алкалозу

матриксу є збереження загальної електронейтральності транспорту іонів – вхід K^+ компенсується виходом H^+, концентрація яких у матриксі мітохондрій зменшується, а pH збільшується. Проте частково цей процес компенсується активацію K^+/H^+-обмінника [144]. Кардіопротекторна роль помірного набухання ймовірно зумовлена збереженням за ішемії контактних сайтів між зовнішньою та внутрішньою мембранами в оптимальній орієнтації для входу АДФ у матрикс мітохондрії та збереженням взаємодії транспортних систем [141]. Транспорт нуклеотидів у матрикс мітохондрії через потенціалзалежний аніонний канал зовнішньої мембрани, міжмембранний простір (Мі-СК) та розташовані на внутрішній мембрані АДФ/АТФ-транслокази. Водночас змінюється енергетичне перенесення фосфату та пригнічується використання АТФ [145].

1.2.3. Вплив активації $К_{АТФ}$-каналів на вміст АТФ при ішемії-реперфузії

Одним із потужних захисних антиішемічних кардіопротекторних механізмів відкривання $К_{АТФ}$-каналів є пригнічення витрат АТФ та його накопичення в кардіоміоцитах [8, 146], що супроводжується збереженням роботи іонних насосів та репаративних процесів при ішемії-реперфузії [147]. Проте якщо механізми, що зменшують споживання високоенергетичних фосфатів за відкривання сарко-$К_{АТФ}$-каналів, не викликають сумнівів, то питання про процеси, що підтримують високий вміст АТФ при ішемії за активації міто-$К_{АТФ}$-каналів є досить дискусійними. Відомо, що стимуляція цих каналів мітохондріальної мембрани пригнічує гідроліз АТФ та підвищує його вміст при ішемії [135]. Ішемічне та фармакологічне (за допомогою пінацидилу та діазоксиду) прекондиціювання збільшувало вміст АТФ та креатинфосфату [146, 148]. Подібне підвищення було отримане при дії флокаліну в експериментах з гострим порушенням мозкового кровообігу [149]. У разі реперфузії в одних дослідженнях синтез АТФ не змінювався [145], в інших ІПК

забезпечувало швидкий ресинтез АТФ та креатинфосфату [147]. Отже, ймовірно, що адаптація мітохондрій до гіпоксичних умов при активації $К_{АТФ}$-каналів робить ці органели стійкішими і більш резистентними до ішемії, що дає їм змогу швидко відновлювати вміст високоенергетичних фосфатів у клітині під час реперфузії [147, 150]. Виділені з прекондиціонованого міокарда мітохондрії, на відміну від органел з інтактного серця, є більш толерантними до патогенної дії високих доз кальцію [137, 147, 150]. Потужне навантаження мітохондрій цим іоном за ішемії-реперфузії є одним із ключових механізмів пошкодження кардіоміоцитів [134], тому поява резистентності мітохондрій до кальцієвого навантаження за активації $К_{АТФ}$-каналів може відігравати важливу роль в механізмах адаптації міокарда до ішемії [137, 147]. Водночас при умовах, що є близькими до фізіологічних, фармакологічна стимуляція цих каналів діазоксидом і флокаліном посилювала мітохондріальне дихання та зменшувала спряження окисного фосфорилювання, тобто синтез АТФ [122, 123, 151]. В інших експериментах діазоксид практично не змінював ні вміст креатинфосфату, ні АТФ [152]. Разом з цим активатор $К_{АТФ}$-каналів пінацидил за різних умов експерименту або підвищував вміст АТФ, або не впливав на концентрацію цих макроергів [152, 153]. Стимуляція вищезгаданих каналів бімакалімом зменшувала, а хронічна гіпоксія посилювала синтез АТФ у мітохондріях серця кроликів [151]. Ймовірно, що в разі зменшення синтезу АТФ, відкривання міто-$К_{АТФ}$-каналів може стимулювати транспорт електронів у дихальному ланцюзі і збільшувати окиснення жирних кислот [134].

Позитивним при активації $К_{АТФ}$-каналів за ішемії-реперфузії вірогідно є пригнічення активності ферменту ксантиноксидази, про що може свідчити зменшення вмісту сечової кислоти і неорганічного фосфату [123, 124, 128]. Це попереджує повний розпад АТФ і ГТФ, при якому відбувається деградація пуринових основ (гіпоксантину і ксантину) і втрачається можливість ресинтезу цих молекул.

Таким чином, досі залишається до кінця не вивченою роль змін у синтезі АТФ за кардіопротекторної дії ішемічного та фармакологічного

прекондиціювання. Проте беззаперечно, що активація $К_{АТФ}$-каналів підвищує стійкість мітохондрій до ішемії, забезпечує збереження їх функції, зменшує витрати АТФ та швидко відновлює його вміст під час реперфузії [151].

1.2.4. Потужний вплив активації $К_{АТФ}$-каналів на систему оксиду азоту

Кардіопротекторні механізми стимуляції $К_{АТФ}$-каналів можуть полягати в збереженні на високому рівні протекторного конститутивного синтезу оксиду азота та, навпаки, пригніченні надлишкового індуцибельного та реутилізаційного синтезу NO і гальмування деградації L-аргініну аргіназою [123, 124] (див. рис. 1, справа). Першому може сприяти індуковане відкриванням цих каналів підвищення вмісту сфінгозину [154], однією з функцій якого є Ca^{2+}-незалежна активація конститутивноої NO-синтази через збільшення активності протеїнкінази PKB/Akt [155].

Слід зауважити, що зменшення активності нітратредуктаз, як і збільшення вмісту нітрит-аніона може свідчити про збільшення оксигенації та потужну антиішемічну дію активації цих каналів. Адже реутилізаційний синтез NO відбувається виняткова в умовах ішемії, а нітрит-аніон утворюється при окисненні оксиду азоту лише в оксигенованих розчинах [123, 124].

1.2.5. Вплив активації $К_{АТФ}$-каналів на вільнорадикальні процеси та антиоксидантну систему

Потужним механізмом кардіопротекторної дії активації $К_{АТФ}$-каналів при ішемії-реперфузії є пригнічення окисного метаболізму за рахунок гальмування генерації активних форм кисню і азоту, та попередження зниження активності ключових ферментів антиоксидантної системи – каталази та супероксиддисмутази [128, 154]. Зменшення стрімкої генерації вільних радикалів при ішемії-реперфузії міокарда при відкриванні міто-$К_{АТФ}$-каналів, можливо, є наслідком зниження вмісту Ca^{2+} в матриксі мітохондрій та

пригнічення активності ферментів циклу трикарбонових кислот [156].

Про обмеження оксидативного стресу при активації $К_{АТФ}$-каналів при ішемії-реперфузіїї свідчать зменшення вмісту пероксиду водню і продуктів перекисного окиснення (ПОЛ) – дієнових кон'югатів і малонового діальдегіду [123, 124, 128]. Пригнічення утворення малонового діальдегіду (кінцевий продукт ПОЛ) свідчить, що стимуляція цих каналів може чинити не лише антиоксидантну, але і антирадикальну дію, укорочуючи (обриваючи) ланцюги реакції ПОЛ.

Про обмеження нітрозативного стресу та пригнічення генерації пероксинітриту у разі активації цих каналів при ішемії-реперфузії міокарда може вказувати практично незмінний вміст нітрат-аніона (утворюється при розпаді пероксинітриту нерадикальним шляхом) [123, 128]. При активації $К_{АТФ}$-каналів за ішемії-реперфузії разом із попередженням надмірної генерації індуцибельного та реутилізаційного синтезу оксиду азоту пригнічується також утворення супероксид-аніона, який при взаємодії з оксидом азоту якраз формує пероксинітрит. Про зниження генерації супероксид-аніона за активації цих каналів може свідчити попередження стрімкого зростання при ішемії-реперфузії вмісту ейкозаноїдів, що утворюються паралельно із супероксидним радикалом його ліпідними генераторами – ліпоксигеназою і циклооксигеназою, та практично незмінний вміст сечової кислоти і неорганічного фосфату, що вказує на зменшення генерації супероксид-аніона ксантиноксидазою [123, 124, 128, 154].

Позитивним при активації $К_{АТФ}$-каналів також можна вважати попередження значного утворення вже вищезгаданої сечової кислоти та сечовини, які у високих концентраціях є токсичними, а у низьких – антиоксидантами [123, 124].

1.2.6. Мембранопротекція та активність катаболічних ферментів

Важливим показником антиішемічного захисту активації $К_{АТФ}$-каналів

при ішемії-реперфузії міокарда є попередження стрімкого наростання вмісту вільної арахідонової кислоти та її похідних – лейкотрієнів і тромбоксанів [123, 124, 154]. Зниження вмісту арахідонової кислоти при активації цих каналів може свідчити про пригнічення активності фосфоліпази A_2 та зменшення деградації мембранних фосфоліпідів при ішемії-реперфузії, і таким чином, мембранопротекцію. Ці мембраностабілізуючі ефекти активації $К_{АТФ}$-каналів були підтверджені за допомогою елекронно-мікроскопічних досліджень [130]. Стимуляція згаданих каналів при ішемії-реперфузії міокарда сприяла збереженню цілісності сарколеми, структури внутрішньоклітинних органел, зменшувала контрактури міофіламентів , значною мірою попереджувала деструкцію мітохондрій [130].

Попередження значного утворення патогенних при ішемії лейкотрієнів і тромбоксанів (зокрема, LTC_4 та TxB_2), які можуть мати коронароконстрикторну, проаритмічну та прооксидантну дію, є ще одним потужним кардіопротекторним механізмом активації $К_{АТФ}$-каналів [123, 124]. Це також може свідчити про зменшення активності ліпоксигенази та циклооксигенази (див. рис. 1, справа). До позитивної дії вищезазначених каналів при ішемії-реперфузії міокарда слід віднести також посилення гемоксигеназної реакції [123, 124], оскільки відомо про нейро- і кардіопротекторні ефекти її кінцевого продукту – моноксиду вуглецю [157].

1.2.7. Узагальнення кардіопротекторних ефектів активації $К_{АТФ}$-каналів

Таким чином, зниження внутрішньоклітинного вмісту АТФ (зокрема при гіпоксії чи ішемії) призводить до швидкого відкривання $К_{АТФ}$-каналів та розвитку протекторних і компенсаторних реакцій, в основі яких лежать гальмівні процеси, що реалізуються судинною системою та безпосередньо міокардом (зміни у цитоплазмі кардіоміоцитів та міжклітинному просторі). Перша, через гіперполяризацію мембрани ГМК коронарних судин призводить

до їх розширення, посиленого кровотоку та забезпечення міокарда енергетичними ресурсами і киснем. Друга, через економний режим роботи та пригнічення метаболічних процесів призводить до заощадження клітинних енергоресурсів. Енергодефіцит міокарда призводить до відкривання двох типів вище зазначених каналів – плазматичної та мітохондріальної мембран. Внаслідок гіперполяризації першої (та зменшення ТПД) та деполяризації другої відбувається зменшення входу іонів кальцію як в цитоплазму клітини, так і в матрикс мітохондрій. Що по-перше, попереджує патологічне за ішемії-реперфузії навантаження як цитоплазми клітин, так і матриксу мітохондрій кальцієм, по-друге – гальмує метаболічні процеси (пригнічується активність Ca^{2+}-залежних ферментів). Наслідком чого є зниження активності міокарда – який переходить в економний режим роботи з меншими витратами АТФ, зменшення пошкоджень міокарда та збереження функції серця (в т.ч. структури та функції мітохондрій, як основних енергогенеруючих одиниць кардіоміоцитів) при ішемії та, особливо, під час реперфузії ішемізованого серця. До позитивних змін кардіогемодинаміки при активації $К_{АТФ}$-каналів слід віднести помірне зниження артеріального тиску (що послаблює навантаження на уражене ішемізоване серце і сприяє збереженню серцевого викиду в перші години ішемії), попередження реперфузійного підвищення опору коронарних судин та загального периферичного опору та відносне збереження показників скоротливості міокарда в період реперфузії. Кардіопротекторні ефекти активації $К_{АТФ}$-каналів при ішемії-реперфузії також полягають в пригніченні надлишкового індуцибельного та реутилізаційного та, навпаки, підвищенні протективного конститутивного синтезу оксиду азоту, генерації сфінгозину і монооксиду вуглецю, пригніченні деградації L-аргініну аргіназою. Важливим захисним механізмом активації $К_{АТФ}$-каналів при ішемії є мембранопротекція, збереження цілісності сарколеми та структури клітинних органел (в т.ч. мітохондрій), зменшення контрактури міофіламентів, попередження утворення мітохондріальної пори, пригнічення апоптозу та некрозу кардіоміоцитів, зменшення розпаду АТФ та попередження утворення патогенних за ішемії

лейкотриєнів і тромбоксанів. Важливим антиішемічним механізмом активації $К_{АТФ}$-каналів є гальмування утворення вільних радикалів та збереження на високому рівні активності ферментів антиоксидантної системи – каталази і супероксиддисмутази.

РОЗДІЛ 2.

МАТЕРІАЛИ ТА МЕТОДИ ДОСЛІДЖЕНЬ

2.1. Експериментальні тварини

Дослідження проведено на дорослих (6-8 міс, маса тіла 200-250 г) та старих (22-24 міс, маса тіла 350-450 г) щурах-самцях лінії Вістар. Тварини перебували в стандартних умовах утримання та на раціоні віварію Інституту фізіології ім. О.О. Богомольця НАН України з вільним доступом до їжі та води. Усі експериментальні процедури проводились з урахуванням Міжнародних принципів Європейської конвенції про захист тварин, які використовуються для експериментальних цілей (Страсбург, 1986) та Директиви ЄС 2010/63/EU «Стосовно захисту тварин, що використовуються у наукових цілях». Протоколи експериментів були затверджені Комітетом з біомедичної етики Інституту фізіології імені Богомольця НАН України (дозвіл №1/13 від 15.03.2017 та №2/21 від 16.06.2021).

Тварин було поділено на три групи: I (контрольна) – дорослі щури (6 міс), II – старі щури (22-24 міс), III – дорослі щури, яким вводили вірогідний індуктор експресії генів, що кодують $К_{АТФ}$-канали, IV – старі щури, яким вводили вірогідний індуктор експресії генів, що кодують $К_{АТФ}$-канали.

2.2. Розробка способів зміни експресії генів, що кодують $К_{АТФ}$-канали

Аналіз літературних даних дозволив нам припустили, що можливими індукторами експресії генів, які кодують $К_{АТФ}$-канали, можуть бути кофактор H_2S-синтезуючих ферментів – піридоксаль-5-фосфат (PLP), ендогенний антиоксидант – глутатіон, нікотинамід, фармакологічні активатори цих каналів та гіпоксія.

В усіх моделях, крім гіпоксичних, тварин було поділено на три групи: I (контрольна) – дорослі щури (6 міс), II – старі щури (22-24 міс), III – старі щури, яким вводили вірогідний індуктор експресії генів, що кодують $К_{АТФ}$-канали.

PLP розводили в дистильованій воді і вводили per os у дозі 0,7 мг/кг один раз на добу протягом 14 днів. Курсове введення PLP здійснювали старим щурам. Тварини усіх груп отримували стандартні корми, що містять вітамін B_6 3,2 мг/кг корму. Глутатіон (Hepaval, "ВалартінФарма", Італія/Україна) вводили внутрішньоочеревинно вводили у дозі 52 мг/кг за одну годину до декапітації. Нікотинамід вводили per os у дозі 0,1 мг/кг один раз на добу протягом 7 днів. Активатор АТФ-чутливих калієвих каналів вводили старим щурам per os у дозі 2 мг/кг протягом 7 днів.

Використовували три моделі гіпоксії: гостру, інтервальну і поєднану (інтервальна і гостра).

Перша модель – 12%-на гіпоксія протягом однієї години (28 днів);

Друга – інтервальна гіпоксія: 15 хв 12%-ї гіпоксії і 15 хв нормоксії (5 циклів щодня протягом 28 днів);

Третя – інтервальна гіпоксія 15 хв 12%-ї гіпоксії і 15 хв нормоксії (5 циклів щодня 28 днів), гостра гіпоксія (12%-на гіпоксія протягом однієї години) по завершенню інтервальної.

2.3. Метод визначення експресії мРНК Kir6.1, Kir6.2, SUR1 і SUR2 субодиниць $К_{АТФ}$-каналів.

Для дослідження експресіїї 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, SUR1 і SUR2 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; прямий 5′-GGG CTT CTG GTG ATC CTC TAC-3′ та зворотній 5′-GGC TTT ACT TCC CTT GGT GTC-3′ для SUR1; прямий 5′-GCT CTG GAA ATT GCT CAG TTG-3′ та зворотний 5′-CTG TCC AAC GCT GAA GTT CTC-3′ для SUR2. Для контролю за якістю виділення РНК та порівняння інтенсивності експресії генів KCNJ8, KCNJ11, ABCC8 та ABCC9 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 ° С протягом 30 с (45 циклів) з використанням 7500 Fast Real-Time PCR («Applied Biosystems»). Аналіз результатів проводили з 7500 Fast Real-Time PCR Software. Розраховували відносний рівень експресії мРНК Kir до актину.

2.4. Отримання та культивування неонатальних кардіоміоцитів щура.

Первинну культуру неонатальних кардіоміоцитів отримували з міокарда шлуночків дводенних щурів за допомогою ферментного гідролізу як описано в роботі Reinecke et al [158]. Шлуночки серця щурів механічно подрібнювалися ножицями до отримання шматків розміром 1-2 $мм^3$ та ферментативно розщеплювали у середовищі виділення: колагеназа II типу (95 ОД/мл) та панкреатин (0,6 мг/мл), та були розведені в буфері наступного складу (ммоль/л): HEPES – 20,0; KCL – 5,4; NaCL – 116,4; глюкоза – 5,5; Na_2HPO_4 –

0,4; K_2HPO_4 – 0,4, яке попередньо оксигенували карбогеном та перемішували за допомогою магнітної мішалки. Перетравлення відбувалося у три цикли по 10 хвилин кожний. Після кожного з циклів шматочкам міокарда давали осісти, рідину видаляли, а до міокарда знову додавали середовище виділення, що містив Ca^{2+} в концентрації 0,2 ммоль/л. Після цього концентрацію Ca^{2+} підвищували до 1,5 ммоль/л. Це дозволяло підготувати Ca^{2+}-толерантні клітини до перенесення в розчин з його фізіологічною концентрацією. Після третього циклу кардіоміоцити відмивали шляхом центрифугування в буфері при 3000 g. Кількість живих та загиблих клітин визначалася за допомогою 0,2 % розчину трипанового синього, який не здатен проникати крізь непошкоджену мембрану клітин і відповідно зафарбовує лише загиблі клітини. Для культивування клітини розміщували на скельця, покриті 2%-м розчином желатину, зі щільністю 50000 та 180000 $см^{-2}$ для електрофізіологічних досліджень та експериментів з аноксією-реоксигенацією відповідно. Культивування проводили протягом 1-3 днів у живильному середовищі такого складу: середовище Ігла в модифікації Дюльбекко (DMEM), середовище 199 (співвідношення DMEM/199 – 4 : 1), теляча сироватка – 15%, Na_2CO_3 – 4,2 ммоль/л, HEPES – 15 ммоль/л та антибіотики (стрептоміцин – 100 мкг/мл, гентаміцин – 0,05 мг/мл, пеніцилін – 100 ОД/мл) при 37°С у газовому середовищі – 5% CO_2 та 95% атмосферного повітря. Кожні 24 години середовище замінювали на свіже. Життєздатні клітини, що прикріпились до скла, спонтанно скорочувалися через 12 годин після культивування. Аноксію моделювали аерацією клітин протягом 30 хв газовою сумішшю без кисню такого складу: 5% CO_2 та 95% Ar. Реоксигенацію моделювали зміною живильного середовища та культивуванням клітин за вихідних умов протягом 60 хв.

2.5. Електрофізіологічні експерименти та розчини

Дослідження проведено на новонароджених щурах лінії Вістар. Усі

процедури проводили відповідно до Директиви ЄС 2010/63/EU «Стосовно захисту тварин, що використовуються у наукових цілях» і вказівок інститутського біотичного комітету.

Електрофізіологічний експеримент проводили з допомогою методу “петч-клемп” в конфігурації “ціла клітина” при температурі 20-25º С з використанням підсилювача PC-ONE («Dagan Corp.», США), аналогово-цифрового перетворювача Digidata 1200A («Axon Instr.», США) та програмного забезпечення pCLAMP-8 («Axon Instr.», США). Для швидкої заміни зовнішньоклітинних розчинів (за час близько 1 с) та дії речовин в умовах сталої температури використовували багатоканальну, термостабільну мікроперфузійну систему власної розробки. Піпетки з кінцевим опором 1 – 2 МОм і оплавленими кінчиками виготовляли з боросилікатних скляних капілярів 1,5 мм («WPI», США) на пулері P-1000 («Sutter Instrument», США). Для обробки та аналізу записів і візуалізації результатів використовували програмне забезпечення Origin («OriginLab Corp.», США) і R (версія 4.0.4, «Foundation for Statistical Computing», Австрія).

Протягом експерименту неонатальні кардіоміоцити перфузували за кімнатної температури (20 – 25° С) у розчині Тіроде (ммоль/л: NaCl – 145, KCl – 2.7, CaCl2 – 1.8, MgCl2 – 2, HEPES – 10, глюкоза – 5.5, pH – 7.4(доводили з допомогою NaOH)), який також використовували для локальної аплікації 10 мкмоль/л блокатора глібенкламіду (маточний розчин 40 ммоль/л речовини, розчиненої у ДМСО, кінцева концентрація ДМСО в розчині складає менше 0.03%); всі речовини фірми «Sigma» (США). Мікропіпетку для реєстрації струмів заповнювали штучним внутрішньоклітинним розчином такого складу (ммоль/л): KCl – 120, KOH – 20, HEPES – 20, EGTA – 5, $MgCl_2$ –1, HEPES – 10, pH – 7,2.

Запис струмів проводили за протоколом типу «епізодична стимуляція» за стаціонарних значень Vcomm, фіксованих на +50 мВ і -100 мВ протягом 400 мс.

2.6. Дослідження показників скорочувальної функції ізольованого серця щурів за ішемії-реперфузії

Для індукції ішемії-реперфузії у серці старих щурів застосовували модель перфузії коронарних судин ізольованого серця методом Лангендорфа [159]. Після декапітації та розтину грудної порожнини серце швидко вилучали і одразу поміщали в охолоджений (5°С) розчин Кребса-Хензелейта до повної його зупинки. Серця приєднували до апарату (рис. 2.1), в якому перфузія коронарних судин здійснювалася через аорту. Для перфузії застосовували розчин Кребса-Хензелейта з постійним тиском 75-80 мм.рт.ст., який містив (ммоль/л): NaCl – 118; KCl – 4,7; $MgSO_4$ – 1,2; $NaHCO_3$ – 24; KH_2PO_4 – 1,2; глюкоза – 10; $CaCl_2$ – 2,5 (pH 7,4), та який аерували карбогеном (95% O_2 та 5% CO_2). Розчин фільтрували за допомогою фільтру «Sinpore» (діаметр пори – 2,0 мкм) та насичували киснем за допомогою карбогену. За допомогою автоматичного термостата температуру системи підтримували на рівні 37^0С з точністю до $\pm 0{,}5^0$С. Перед початком експериментальних вимірювань кожному серцю давали стабілізуватися протягом 20 хв. Після періоду стабілізації серця піддавали 20-хвилинній тотальній ішемії через повне перекривання перфузійного потоку з подальшим періодом 40-хвилинної реперфузії у всіх групах. Зміну скоротливої діяльності та кінцевий діастоличний тиск визначали за змінами тиску в латексному балончику, який вводили в лівий шлуночок, а також за першою похідною тиску в лівому шлуночку – dp/dt. Реєстрацію здійснювали за допомогою тензометричного датчика 746 («Мінограф – 82», «Elema», Швеція) і реєстрували на комп’ютері за допомогою програмного забезпечення Global Lab. Швидкість коронарного потоку оцінювали як об’єм перфузійного розчину, який відтікав від серця за 1 хв. Інтенсивність скоротливої функції (ІСФ) розраховували як добуток $Р_{лшл}$ і частоти серцевих скорочень (ЧСС). Для розрахунку артеріо-венозної різниці вимірювали парціальний тиск кисню у пробах розчину, що притікав і відтікав від серця, за допомогою газоаналізатора BMS3Mk2 (Данія). Напруження кисню в буфері на

вході в серце становило в середньому 400-450 мм рт. ст. Споживання кисню міокардом розраховували за методом Neely [160], враховуючи коронарний потік і суху масу серця, яка в середньому становила 0,212 г у дорослих і 0,237 г у старих тварин. Розраховували також кисневу вартість роботи міокарда як співвідношення споживання кисню до інтенсивності скоротливої функції.

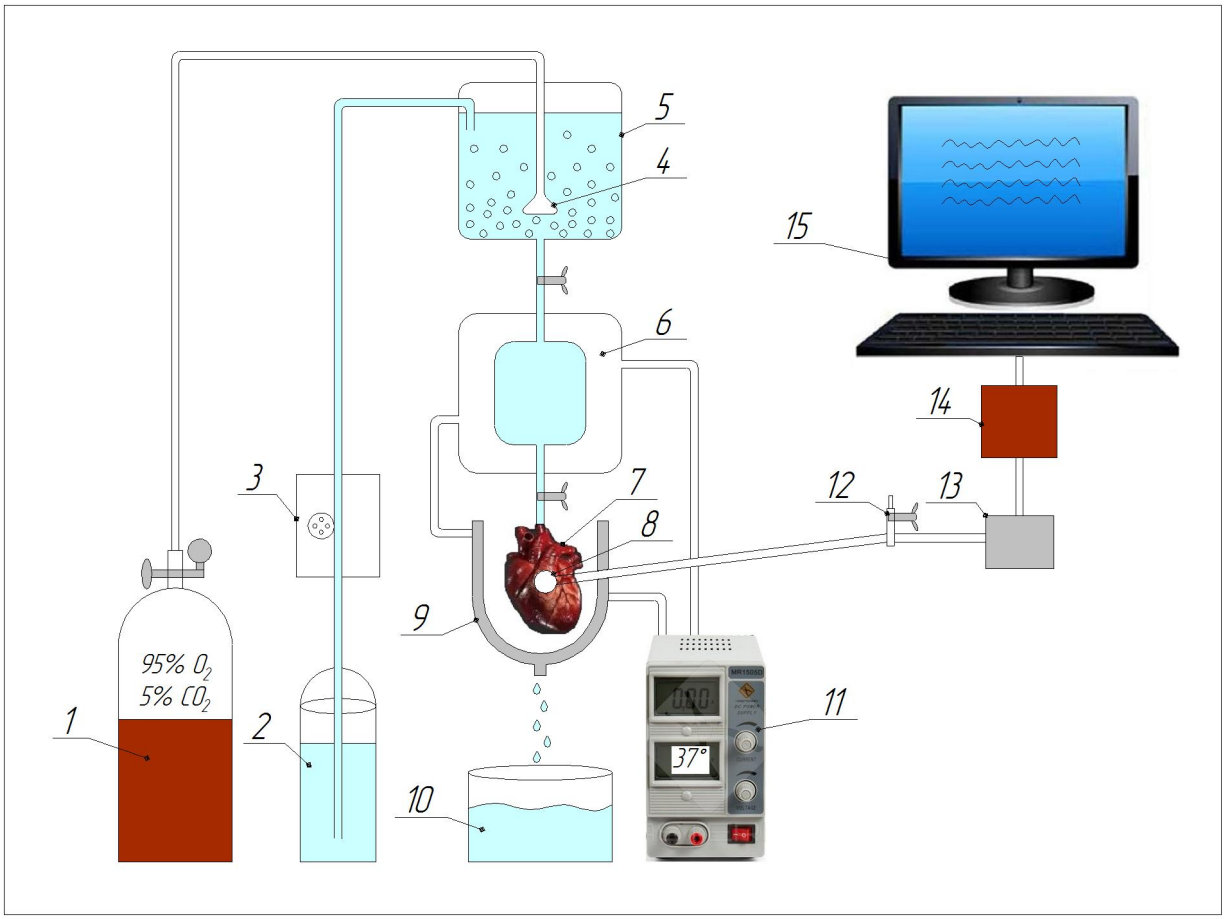


Рис. 2.1 Схема установки для перфузії ізольованого серця за Лангендорфом при постійному тиску. 1 – балон з карбогеном; 2 – резервуар з розчином Кребса-Хейнзелейта; 3 – перистальтичний насос; 4 – розпилювач; 5 – резервуар з перфузійним розчином Кребса-Хейнзелейта, насиченим киснем; 6 – колба для обігріву перфузійного розчину та для стравлення газу; 7 – ізольоване серце; 8 – латексний балончик у лівому шлуночку; 9 – термостатована камера для обігріву серця; 10 – ємність з відпрацьованим розчином Кребса; 11 – термостат; 12 – шприц, що підтримує герметичність системи «балончик-тензодатчик»; 13 – тензодатчик; 14 – підсилювач; 15 – комп'ютер. Блакитним кольором відмічено розчин Кребса.

2.7. Тензометричні вимірювання реакцій скорочення/розслаблення ізольованих судинних смужок

Досліди проведені на ізольованих, перфузованих при температурі 37^0 С нормальним розчином Кребса, кільцевих смужках аорти дорослих і старих щурів. Ізольовані судинні кільця мали діаметр 2 мм, ширину 1,5 мм. Усі тестування проводили в ізометричному режимі при початковій заданій напруженості, при якій вони генерували максимальну силу у відповідь на інфузію норадреналіну (10 мкмоль/л). Температуру розчину в експериментальній камері (37^0С з точністю до $\pm 0,5^0$С) підтримували за допомогою автоматичного термостату. Робочий розчин насичувався киснем за допомогою карбогену (газова суміш 95% O_2 і 5% CO_2). Перед вимірюванням, препарати, закріплені в експериментальній камері, витримувалися протягом 60 хв у нормальному розчині Кребса такого складу (в ммоль/л): NaCl – 120,4; KCl – 5,9; $NaHCO_3$ – 15,5; NaH_2PO_4 – 1,2; $MgCl_2$ – 1,2; $CaCl_2$ – 2.5; глюкоза – 11,5. Дослідження вазодилататорних ефектів відкривая $К_{АТФ}$-каналів проводили на фоні підвищеного тонусу препаратів аорти, яке отримували за допомогою норадреналіну (10 мкмоль/л). Цілісність судинного ендотелію визначали за наявністю ендотелій-залежних тестових реакцій на ацетилхолін (1мкмоль/л).

Для відкривання $К_{АТФ}$ каналів використовували вітчизняний фармакологічний активатор $К_{АТФ}$ каналів флокалін в дозах від 0,1-100 мкмоль/л. Характер вазодилататорних реакцій судинних смужок визначали за допомогою специфічного інгібітора $К_{АТФ}$ каналів глібенкламіду, який в дозі 100 мкмоль/л вводили в перфузійний розчин за 10 хвилин до дії флокаліну та продовжували перфузію протягом активації $К_{АТФ}$ каналів.

2.8. Виділення фракції мітохондрій із серця щурів

Фракцію мітохондрій отримували із серця щурів за методом диференційного центрифугування у нашій модифікації [161]. Видалені серця промивали охолодженим 0,9 %-м розчином KCl. Серцеву тканину

подрібнювали та гомогенізували у середовищі виділення у співвідношенні 1:9, що містило (ммоль/л): сахарозу – 250, ЕДТА – 1, тріс-HCl – 25, pH 7,4. Для осадження ядер і грубої клітинної фракції гомогенат центрифугували при 700 g протягом 8 хв (2ºС). Отриманий супернатант центрифугували при 11000 g протягом 16 хв (2ºС) для осадження мітохондрій. Мітохондріальний осад ресуспендували в середовищі ресуспендування, що містив (ммоль/л): сахароза – 250, тріс-HCl – 25 (pH 7,2) та одразу використовували в експерименті.

2.9. Метод реєстрації відкривання мітохондріальної пори

Відкривання МП 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 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; pH 7,4 (кінцевий об'єм – 3 мл) і реєстрували зниження оптичної густини суспензії мітохондрій при λ=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 ($A_0=\Delta D_{520}$/мг білка). Максимальну амплітуду вимірювали за умов активації пороутворення при дії індуктора МП – іонів кальцію ($A_{max}=\Delta D_{520}$/мг білка). Надалі будували концентраційну залежність амплітуди набухання мітохондрій від дії йонів кальцію і оцінювали чутливість МП до цього індуктора.

2.10. Біохімічні методи досліджень

Дослідження проводилися на препаратах мітохондрій серця, тканин серця

та плазмі крові тварин різних груп. Вміст білка у зразках визначали за методом Лоурі [162].

Визначення вмісту ендогенного H_2S

Вміст H_2S визначали у мітохондріях серця, гомогенатах тканин серця тварин різних груп [163]. До 0,5 мл 1% розчину ацетату цинку ($Zn(CH_3COO)_2$) додавали аліквоти проб та інкубували при температурі 37,5 °С протягом 10 хвилин. Потім додавали 0,5 мл 20 ммоль/л N,N-DPD (диметил-п-фенілендіамін) і 0,5 мл 30 ммоль/л розчину $FeCl_3$. Отриману суміш інкубували в холодному (t=4 °С) та темному місці протягом 10 хв. Всі процедури проводились у центрифужних пробірках з кришками, для забезпечення герметичності. Після інкубації до реакційної суміші додавали 1 мл 10% трихлороцтової кислоти і центрифугували при 1,5 тис. об/хв впродовж 5 хв. Далі проводили фотоелектроколориметричне вимірювання оптичної щільності надосадової рідини при λ=670 нм. Кількість H_2S у зразках розраховували на основі калібрувальної кривої NaHS, а концентрацію H_2S виражали в нмоль/г білка.

Визначення швидкості утворення супероксиду

Метод визначення супероксиду ($^{\bullet}O_2^-$) грунтується на здатності цитохрому *c* окиснювати $^{\bullet}O_2^-$ до O_2. Зміни екстинції проб реєстрували після 30 хв інкубації (t=37 °С) при λ=550 нм. Кількість супероксиду визначали за допомогою молярного коефіцієнта поглинання 28 000 моль $^{-1}$ · см $^{-1}$ [164].

Визначення швидкості утворення гідроксильного радикалу

Швидкість генерування гідроксильного радикала ($^{\bullet}$OH-радикала) визначали методом окиснення дезоксирибози [165]. Швидкість утворення $^{\bullet}$OH-радикала визначали за збільшенням поглинання при λ=532 нм, і виражали в умовних одиницях $\Delta E*10^2$ за 60 хв на 1мг білка проби.

Визначення вмісту пероксиду водню

Метод визначення пероксиду водню (H_2O_2) базувався на опосередкованій реєстрації споживання H_2O_2 в ході окиснення йодиду (I^-) до йоду (I_3^-) за наявності надлишку лактопероксидази [166]. Формування I_3 реєстрували спектрофотометрично при λ=353 нм, а кількість визначали за допомогою молярного коефіцієнта поглинання 26 000 моль $^{-1}$ · см $^{-1}$.

Визначення вмісту дієнових кон'югатів

Метод визначення дієнових кон'югатів (ДК) включав вилучення ліпідів із зразків органічним розчинником (гептан/ізопропанол 1:1) та вимірювання оптичної густини при λ=232 нм [167]. Кількість ДК визначали за допомогою молярного коефіцієнта поглинання 21 000 моль $^{-1}$ · см $^{-1}$.

Визначення вмісту малонового діальдегіду

Метод визначення малонового діальдегіду (МДА) базувався на реакції МДА з 2'-тіобарбітуровою кислотою та утворенні триметинового комплексу з максимумом поглинання при λ=532 нм [168]. Кількість МДА визначали за допомогою молярного коефіцієнта поглинання 15 600 моль $^{-1}$ · см $^{-1}$.

Визначення активності NO-синтаз

Активність конститутивних (cNOS=eNOS+nNOS) та індуцибельної (iNOS) NO-синтаз визначали за комбінацію класичного метода [169] та його сучасної модифікації [170], пристосованої до спектрофотометричного вимірювання одного з продуктів реакції – L-цитруліну. Для визначення активності сумарної NO-синтази (cNOS+iNOS) аліквоти проб інкубували в загальному об’ємі 1 мл суміші такого складу (ммоль/мл): KH_2PO_4 – 50, $MgCl_2$ – 1, $CaCl_2$ – 2, НАДФН –1, L-аргінін – 2, pH 7,0 протягом 60 хв при 37˚С. Для визначення рівнів Ca^{2+}-незалежної активності (iNOS) такі ж зразки інкубували в подібній реакційній суміші лише з додаванням EGTA (5 мМ) замість $CaCl_2$. Реакцію зупиняли додаванням 300 мкл 2N $HClO_4$, потім суміш центрифугували

(3500 g протягом 10 хв) і 1 мл супернатанту збирали для вимірювання L-цитруліну методом описаним Бойдом [171]. Спосіб включав додавання 2 мл реагента (1 мл 59 ммоль/л диацетилмонооксиму (“Sigma”, США), 1 мл 32 мМ антипірину (“Sigma”, США) і 55 мкМ сульфату заліза (II) в 6 N H_2SO_4) до безбілкових аліквот проб. Далі суміш кип’ятили на водяній бані протягом 15 хв, після охолодження визначали величину екстинції при λ=465 нм. Концентрацію L-цитруліну виявили за допомогою калібрувальних кривих. Сумарну активність cNOS (eNOS+nNOS) вираховували, віднімаючи від сумарної активності NOS активність iNOS. Активність ферментів виражалася у пікомолях новоутвореного L-цитруліну протягом 1 хв на 1 мг загального білка у зразку.

Розрахунок індексу спряження cNOS.

Індекс спряження (coupling) cNOS розраховували як відношення активності cNOS до швидкості генерації $^{\bullet}O_2^-$. Цей індекс характеризує наявність субстратів (L-аргінін, O_2) і кофактора тетрагідробіоптерину (BH4) для утворення NO, а не $^{\bullet}O_2^-$ – при окисному метаболізмі L-аргініну.

Визначення вмісту нітрит-аніона

Вміст нітрит-аніона (NO_2^-) визначали методом Гріна за допомогою реактиву Гріса [172]. Аликвоту безбілкового зразка змішували з реактивом Гріса в пропорції 1:1. Через 5 хв інкубації при кімнатній температурі визначали оптичну густину поглинання при λ=546 нм. Концентрацію нітрит-аніона визначали за побудованими калібрувальними кривими $NaNO_2$.

Визначення вмісту нітрат-аніона

Вміст нітрат-аніона (NO_3^-) визначали за допомогою бруцинового реактива в безбілкових аліквотах проб спектрофотометричним методом [173]. Аліквоти проб інкубували при 100˚С протягом 10 хв після чого охолоджували. Величину екстинції визначали при λ=405 нм. Бруциновий реактив готували розчиненням

60 мг бруцину у 100 мл 50 % сірчаної кислоти. Кількість NO_3^- визначали за допомогою калібрувальної кривої, побудованої з використанням $NaNO_3$.

Визначення активності аргінази

Метод визначення активності аргінази базувався на здатності аргінази метаболізувати L-аргінін з утворенням стабільного продукту сечовини. Дослідження проводилося за допомогою стандартизованого набору "Філісіт-Діагностика" (Україна). Суміш, що містила аліквоту зразка та 50 мкл L-аргініну (Tris-HCl; pH 9,7) інкубували при 37 °C протягом 60 хв, реакцію зупиняли, додаючи 300 мкл 2N $HClO_4$ [174]. Суміш центрифугували при 3500 об/хв протягом 10 хв. Для колориметричного визначення сечовини 100 мкл супернатанту додавали до суміші діацетилмоноксим/тіосемікарбазид (1:1) і нагрівали при 100°C протягом 15 хв, потім визначали величинуекстинції при λ=550 нм. Вміст сечовини виражали в пмоль$^{-1}$ ·хв· мг $^{-1}$білка.

Визначення активності нітратредуктази

Метод визначення активності нітратредуктази базувався на здатності редуктази перетворювати NO_3^- до NO_2^-. Інкубаційне середовище готували на фосфатному буфері (pH 7,4), воно містило 100 мкл проби, НАДН як кофактор, та NO_3^- як субстрат [175]. Суміш інкубували при 37°C протягом 60 хв і реакцію зупиняли додаванням 300 мкл 2N $HClO_4$, центрифугували при 3500 об/хв протягом 10 хв. 0,5 мл супернатанту збирали для вимірювання NO_2, як описано в аналізі нітритів вище [172].

Визначення вмісту нітрозотіолів

Загальний вміст низькомолекулярних нітрозотіолів (НМНТ) визначали використовуючи реактив Гріса з $HgCl_2$ [176]. До аликвоти зразка додавали розчин $HgCl_2$/сульфаніламіду (який готували змішуючи 1 об'єм 1% $HgCl_2$ у воді з 4 об’ємами 3,4% сульфаніламіду в 0,4 М HCl) та залишали на 5 хв. Потім суміш змішували з 0,1% N-(1-нафтил) етилендіаміном дигідрохлориду в 0,4 М

HCl у пропорції 2:1. Величину екстинції вимірювали при λ=543 нм. Кількість НМНТ визначали за допомогою молярного коефіцієнта поглинання 42 000 моль $^{-1}$ · см $^{-1}$.

Визначення вмісту арахідонової кислоти, LTC_4 та TxB_2

Вміст арахідонової кислоти, LTC_4 та TxB_2 визначали в спиртових екстрактах із заморожених в рідкому азоті і розтертих у порошок кусочків серця та плазми крові. Спиртові екстракти висушували при 40°С у повітряному термостаті і методом тонкошарової хроматографії на пластинках силікагелю, з наступною елюцією і спектроскопією елюатів в 1,0 см кварцевих кюветах при 210 нм визначали вміст арахідонової кислоти. Вміст ейкозаноїдів визначали за допомогою радіоімунного методу, користуючися стандартними добірками реактивів фірми «Amersham», Англія. Радіоактивність проб визначали на лічильнику фірми «Beckman», Німеччина.

Визначення вмісту сечової кислоти

Вміст сечової кислоти визначали в колориметричній реакції за допомогою добірки реактивів фірми «Філіст-Діагностика», м. Дніпропетровськ, Україна. До безбілкових аліквот гомогенатів серця та плазми крові додавали розчин карбонату натрію та фосфорновольфрамового реактиву зі стандартного набору. Інкубували суміш 30 хв при кімнатній температурі, потім визначали величину екстинції при 650 нм. Кількість сечової кислоти в пробах розраховували за екстинцією стандартного розчину сечової кислоти.

2.11. Статистичне оброблення результатів

Отримані результати обробляли математично за методом варіаційної статистики за допомогою комп’ютерних програм "Excel 2000", Origin 7.0 («Microcall Inc.», США) та статистичного програмного пакета IBM SPSS Statistics 22.0. Дані були виражені як середнє арифметичне значення ±

стандартна похибка середнього (M ± m). Достовірність результатів визначали за критерієм t Стьюдента. Нормальність розподілу було перевірено тестом Колмогорова-Смирнова. Рівність відмінностей між групами оцінювалася за допомогою тесту Левене. One-Way ANOVA (аналіз дисперсії) виконували, якщо спостерігалася гомоскедастичність. Тести Брауна-Форсайт та Велха були використані в разі гетероскедастичності. Тест Tukey HSD був використаний для мультимірних порівнянь. Статистичну обробку результатів експериментів по вивченню впливу глутатіону на функцію ізольованого серця проводили за допомогою Microsoft Excel. Для перевірки нормальності розподілу використовували критерій Шапіро–Уілка. Для з'ясування наявності відмінностей використовували критерій Мана-Вітні. Значення $P<0,05$ розглядали як статистично достовірні.

РОЗДІЛ 3.

РЕЗУЛЬТАТИ ДОСЛІДЖЕНЬ

3.1. Модуляція експресії генів, що кодують $К_{АТФ}$-канали, у дослідних тварин

3.1.1. Дослідження експресії генів KCNJ8, KCNJ11, ABCC8 та ABCC9 за дії глутатіону.

При визначенні рівня експресії мРНК генів KCNJ8 і KCNJ11, що кодують субодиниці Kir6.1 і Kir6.2 $К_{АТФ}$-каналу відповідно у серці дорослих та старих щурів, достовірних відмінностей не виявлено (рис. 3.1). Рівень експресії Kir6.1 у дорослих (n=7) та старих (n=11) щурів становив 0,38±0,11 та 0,45±0,10 ум.од. відповідно (відносний рівень мРНК Kir6.1/актину). Рівень експресії Kir6.2 у дорослих (n=7) та старих (n=10) щурів сягав 5,42±1,85 та 4,06±1,09 ум.од. відповідно (відносний рівень мРНК Kir6.2/актину).

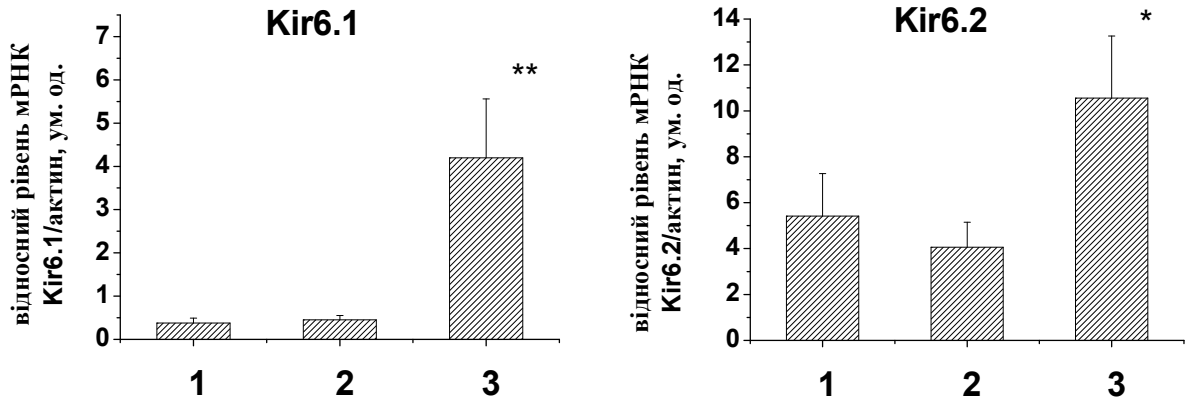
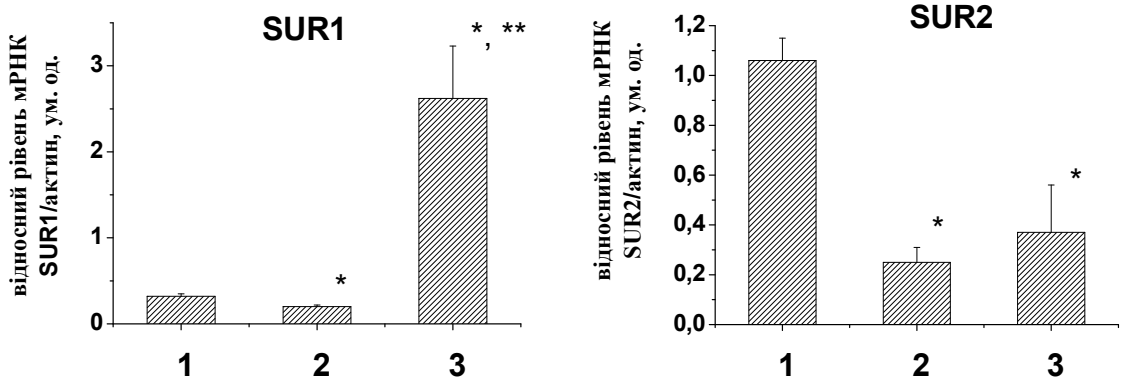


Рис. 3.1 Рівень експресії мРНК генів KCNJ8 і KCNJ11, що кодують Kir6.1- і Kir6.2- субодиниці АТФ-чутливих калієвих каналів відповідно у серці дорослих (1), старих (2) щурів та старих щурів після введення глутатіону (3). *P<0,05, **P<0,01 відносно значень у старих щурів.

Вперше показано, що за умов введення глутатіону старим щурам експресія пороутворюючих субодиниць $К_{АТФ}$-каналів значно зросла (див. рис.3.1), а саме для Kir6.1 у 9,3 раза (P<0,01, n=6), для Kir6.2 у 2,6 раза (P<0,05, n=6). Слід зауважити, що збільшилася експресія мРНК обох білків, як для Kir6.1 (переважно відповідає судинному типу каналу), так і для Kir6.2, що переважно входить до складу серцевого типу каналу.

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 судинного і серцевого типу відповідно, що може сприяти посиленню ендогенних захисних механізмів.

При визначенні рівня експресії мРНК генів ABBC8 і ABCC9, що кодують SUR1 і SUR2 субодиниці $К_{АТФ}$-каналу відповідно у серці дорослих та старих щурів, показано значне (P<0,05) зменшення їх експресії у серці старих щурів, а саме для SUR1 у 1,6 раза (n=12), для SUR2 у 4,24 раза (n=13), (рис. 3.2).



а б

Рис. 3.2 Рівень експресії мРНК генів ABCC8 (а) і ABCC9 (б), що кодують SUR1 і SUR2 субодиниці АТФ-чутливих калієвих каналів відповідно у серці дорослих (1), старих (2) щурів та старих щурів після введення глутатіону (3). *P<0,05 відносно значень у дорослих щурів, **P<0,01 відносно значень у старих щурів.

Вперше показано, що введення глутатіону старим щурам підвищувало експресію регуляторних SUR субодиниць $К_{АТФ}$-каналу (див. рис. 3.2). Проте якщо експресія мРНК SUR2 збільшувалася у 1,48 раза (n=3), то експресія мРНК регуляторної субодиниці мітохондрільного типу каналу – SUR1 підвищується у 13,1 раза (P<0,05, n=5).

При введенні глутатіону дорослим щурам у дозі 52 мг/кг за одну годину до відбирання зразків підвищення рівнів експресії генів KCNJ8, KCNJ11, ABCC8 та ABCC9, що кодують Kir6.1, Kir6.2, SUR1 і SUR2 субодиниці $К_{АТФ}$-каналів не виявлено.

Таким чином, виявлено, що одноразове внутрішньоочеревинне введення глутатіону старим щурам у дозі 52 мг/кг підвищувало експресію мРНК регуляторної субодиниці SUR1 $К_{АТФ}$-каналу мітохондрільного типу у 13,1 раза. Що може бути дуже важливим для нормалізації функції мітохондрій при старінні і підвищення їх резистентності, а також серцевих та судинних міоцитів до ішемічних впливів.

3.1.2. Дослідження експресії генів KCNJ8, KCNJ11, ABCC8 та ABCC9 за дії піридоксаль-5-фосфату.

Результати дослідження експресії мРНК субодиниць $К_{АТФ}$-каналів Kir6.1, Kir6.2, SUR1 і SUR2 та її зміни при дії піридоксаль-5-фосфату представлені в табл. 3.1.

Вперше показано, що за умов введення піридоксаль-5-фосфату старим щурам експресія пороутворюючих субодиниць $К_{АТФ}$-каналів судинного типу значно Kir6.1 зросла у 3,64 рази (P<0,05) до 1,64±0,70 ум.од. Водночас пороутворюючі субодиниці $К_{АТФ}$-каналів серцевого типу Kir6.2 достовірно не відрізнялися (рис. 3.3).

При визначенні рівня експресії мРНК генів ABBC8 і ABCC9, що кодують SUR1- і SUR2-субодиниці $К_{АТФ}$-каналу відповідно у серці дорослих та старих щурів, достовірних відмінностей не виявлено (табл. 1), проте у старих щурів

спостерігається тенденція до збільшення експресії регуляторної субодиниці мітохондрільного типу SUR1(рис. 3.4).

Таблиця 3.1.

Експресія мРНК субодиниць Kir6.1, Kir6.2, SUR1 та SUR2 K_{ATP}-каналів у міокарді дорослих і старих щурів, і старих щурів при дії піридоксаль-5-фосфату; (M±m).

Субодиниці K_{ATP}-каналів	Дорослі щурі	Старі щурі	Старі щурі + піридоксаль-5-фосфат
Kir6.1	0,38 ± 0,11 (n=7)	0,45 ± 0,10 (n=11)	1,64 ± 0,70 * (n=8)
Kir6.2	5,42 ± 1,85 (n=7)	4,06 ± 1,09 (n=10)	2,97 ± 0,95 (n=8)
SUR1	5,66 ± 1,6 (n=6)	15,04 ± 6,26 (n=11)	7,41 ± 1,85 (n=8)
SUR2	25,44 ± 7,23 (n=6)	27,23 ± 3,79 (n=10)	64,8 ± 16,98 * (n=6)

Примітка: *P<0.05 порівняно зі старими щурами.

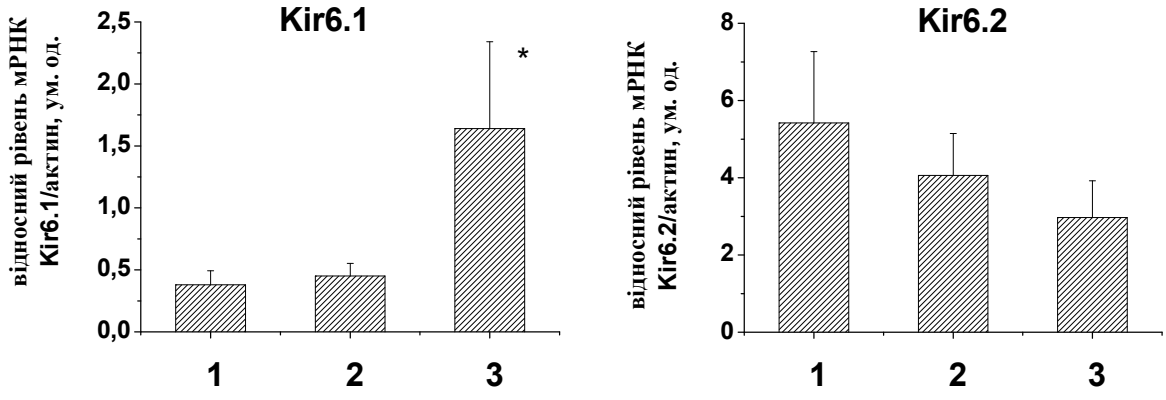


Рис. 3.3 Рівень експресії мРНК генів KCNJ8 і KCNJ11, що кодують Kir6.1- і Kir6.2-субодиниці АТФ-чутливих калієвих каналів відповідно у серці дорослих (1), старих (2) щурів та старих щурів після введення піридоксаль-5-фосфату (3). *P<0,05 відносно значень у старих щурів.

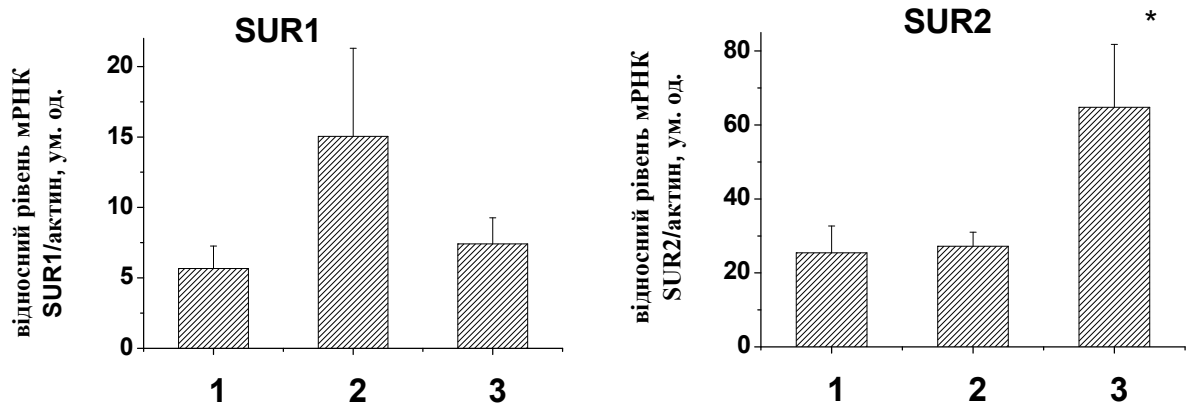


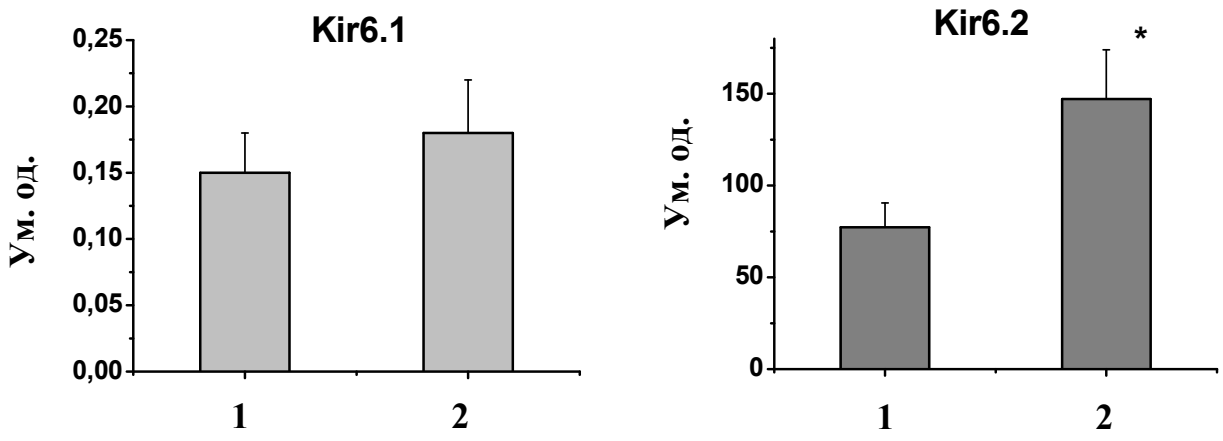
Рис. 3.4 Рівень експресії мРНК генів ABCC8 і ABCC9, що кодують SUR1- і SUR2- субодиниці АТФ-чутливих калієвих каналів відповідно у серці дорослих (1), старих (2) щурів та старих щурів після введення піридоксаль-5-фосфату (3). *P<0,05 відносно значень у старих щурів.

Водночас за умов введення піридоксаль-5-фосфату старим щурам експресія регуляторної субодиниць $К_{АТФ}$-каналів SUR2 була у 2,38 раза (P<0,05) вищою (див. рис. 3.4).

Як згадувалося в розділі 1, $К_{АТФ}$-канал має октаметричну структуру – пора каналу утворюється чотирма Kir6.x субодиницями, які зовні оточуються чотирма SUR субодиницями, а комбінація субодиниць Kir6.1 та Kir6.2, та рецепторів SUR1, SUR2A та SUR2B утворюють різні підтипи $К_{АТФ}$-каналів, які визначають їх властивості та відповідають певним тканинам організму. Зокрема, SUR2B/Kir6.1 переважно відповідає судинним гладенькомязовим клітинам, тоді як SUR2A/Kir6.2 кардіоміоцитам.

Результати дослідження зміни рівня експресії мРНК генів KCNJ8 і KCNJ11, що кодують субодиниці Kir6.1 і Kir6.2 $К_{АТФ}$-каналу відповідно у серці дорослих щурів при введенні піридоксаль-5-фосфату у дозі 0,7 мг/кг один раз на добу протягом 14 днів представлені на рис. 3.5.

Показано, що введення піридоксаль-5-фосфату достовірно не змінювало експресію мРНК Kir6.1 і майже вдвічі (P<0,05, n=7) підвищувало експресію мРНК Kir6.2, яка є кардіоспецифічною субодиницею $К_{АТФ}$-каналів.



а б

Рис. 3.5 Зміни рівня експресії мРНК генів KCNJ8 (а) і KCNJ11 (б), що кодують субодиниці Kir6.1 і Kir6.2 $К_{АТФ}$-каналів відповідно у серці дорослих щурів, контроль (1), та після введення піридоксаль-5-фосфату (2). *P<0,05 відносно значень у дорослих щурів

При дослідженні впливу піридоксаль-5-фосфату на зміну рівня експресії мРНК генів ABBC8 і ABCC9, що кодують SUR1 і SUR2 субодиниці $К_{АТФ}$-каналу відповідно, виявлено значне достовірне підвищення їх експресії при дії піридоксаль-5-фосфату (рис.3.6). А саме, збільшення експресії мРНК субодиниці SUR1 (переважно $К_{АТФ}$-каналів мітохондріального типу) у 1,5 раза (P<0,05, n=7), та підвищення експресії мРНК субодиниці SUR2 (переважно $К_{АТФ}$-каналів сарколемального типу судин та кардіоміоцитів) у 1,9 раза (P<0,05, n=6).

Таким чином, виявлено, що введення піридоксаль-5-фосфату у дозі 0,7 мг/кг один раз на добу протягом 14 днів дорослимим щурам майже у двічі підвищувало експресію пороутворюючої Kir6.2 та регуляторної SUR2 субодиниць $К_{АТФ}$-каналів серцевого типу, що може мати важливе значення для підвищення стійкості серця до патологічних впливів ішемічної природи.

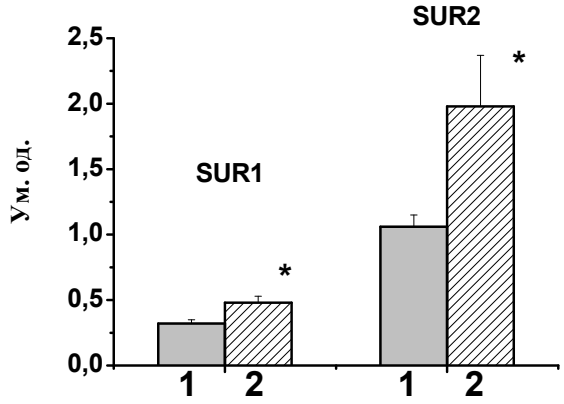


Рис. 3.6 Рівень експресії мРНК генів ABCC8 і ABCC9, що кодують SUR1 і SUR2 субодиниці АТФ-чутливих калієвих каналів відповідно у серці дорослих щурів (1) та після введення піридоксаль-5-фосфату (2). *P<0,05 відносно значень у дорослих щурів

Вперше показано, що введення піридоксаль-5-фосфату вищезгаданим методом призводить до достовірного у 1,5 раза підвищення рівня експресії мРНК регуляторної субодиниці SUR1 $К_{АТФ}$-каналу мітохондрільного типу, що може мати важливе значення у підвищенні резистентності мітохондрій до дії патологічних чинників, та підвищувати загальну стійкість організму.

3.1.3. Дослідження експресії генів, що кодують $К_{АТФ}$-канали за дії нікотинаміду у дорослих та старих щурів

Результати дослідження експресії генів KCNJ8, KCNJ11, ABCC8 та ABCC9, що кодують Kir6.1, Kir6.2, SUR1 і SUR2 субодиниці $К_{АТФ}$-каналів відповідно при введенні нікотинаміду дорослим і старим щурам представлені в таблиці 3.2.

Дослідження експресії Kir6.1, Kir6.2, SUR1 і SUR2 субодиниць $К_{АТФ}$-каналів у дорослих та старих щурів показало значні зміни у вікових тварин (табл. 3.2). А саме, зменшення експресії пороутворюючої субодиниці Kir6.1переважно судинного типу каналу (рис. 3.7, а), зменшення експресії

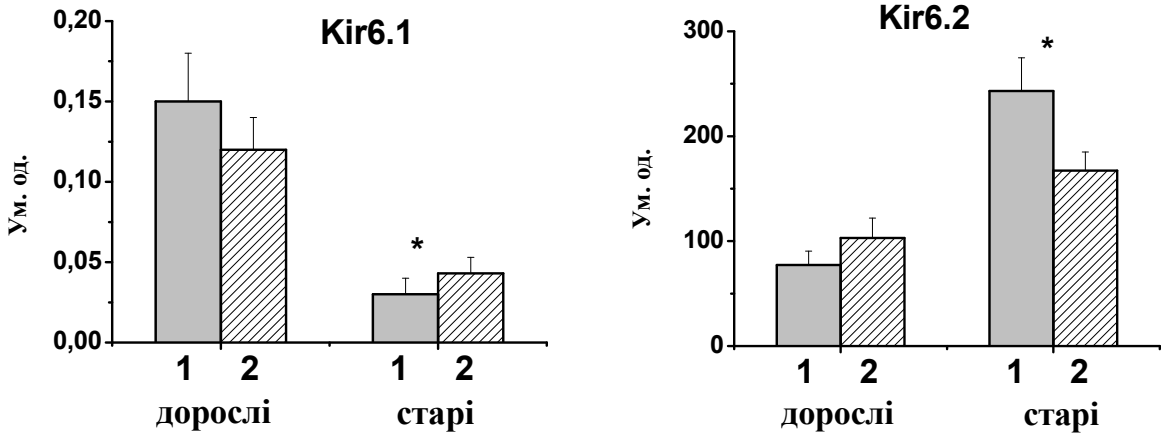
регуляторних субодиниць каналу SUR1 і SUR2 (рис. 3.8), та навпаки, підвищення експресії Kir6.2 (рис. 3, б), переважно пороутворюючої субодиниці $К_{АТФ}$-каналу серцевого типу.

Таблиця 3.2.

Рівні експресії Kir6.1, Kir6.2, SUR1 і SUR2 субодиниць $К_{АТФ}$-каналів у дорослих та старих щурів та їх зміни при введенні per os нікотинаміду у дозі 0,1 мг/кг один раз на добу протягом 7 днів, (M±m).

Субодиниці $К_{АТФ}$-каналів	Дорослі щури (n=6-8)	Старі щури (n=7-12)	Дорослі щури + нікотинамід (n=7)	Старі щури + нікотинамід (n=6)
Kir6.1	0,15 ± 0,03	0,03 ± 0,01*	0,12 ± 0,02	0,043 ± 0,01
Kir6.2	77,31 ± 13,17	243,15 ± 31,64*	103,08 ± 18,98	167,16 ± 17,85
SUR1	0,32 ± 0,03	0,20 ± 0,02 *	0,37 ± 0,05	0,14 ± 0,04
SUR2	1,06 ± 0,09	0,25 ± 0,06 *	1,21 ± 0,26	0,35 ± 0,12

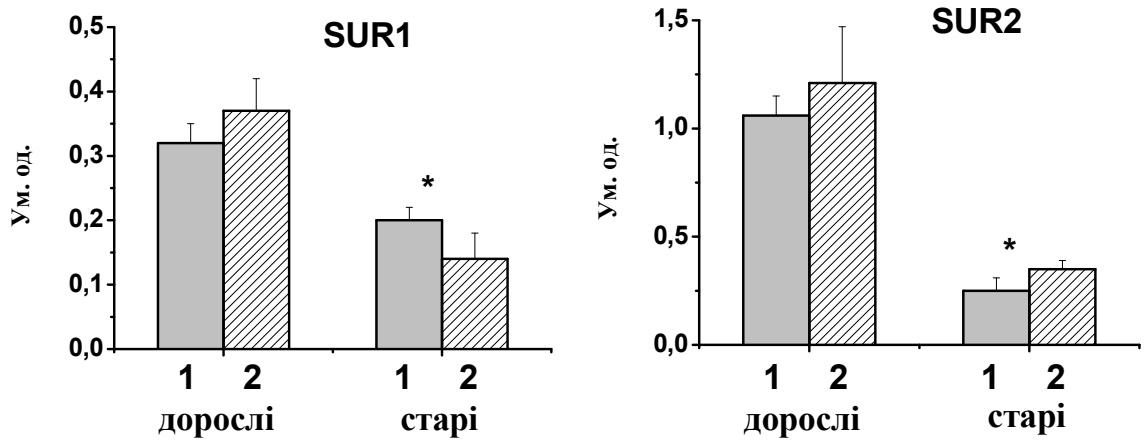
Примітка: *P<0,05 відносно значень у дорослих щурів.



а б

Рис. 3.7 Зміни рівня експресії мРНК генів KCNJ8 (а) і KCNJ11 (б), що кодують субодиниці Kir6.1 і Kir6.2 $К_{АТФ}$-каналів відповідно у серці дорослих та старих щурів, без дії нікотинаміду (1) та при його введенні (2). *P<0,05 відносно значень у дорослих щурів без дії нікотинаміду

Водночас введення per os нікотинаміду у дозі 0,1 мг/кг один раз на добу протягом 7 днів суттєвим чином не вплинуло на вікові зміни експресії субодиниць $К_{АТФ}$-каналів у старих щурів (див. рис. 3.7 і 3.8). Проте слід зазначити, про тенденцію до збільшення експресії при дії нікотинаміду субодиниць Kir6.1 і SUR2, на 43 і 40% відповідно. Тенденції до зменшення експресії Kir6.2 не будемо придавати значної уваги, адже у літніх тварин порівняно з дорослими вона збільшилася більш ніж втричі (див. рис. 3.7 б).



а б

Рис. 3.8. Зміни рівня експресії мРНК генів ABCC8 (а) і ABCC9 (б), що кодують SUR1 і SUR2 субодиниці $К_{АТФ}$-каналів відповідно у серці дорослих та старих щурів, без дії нікотинаміду (1) та при його введенні (2). *P<0,05 відносно значень у дорослих щурів без дії нікотинаміду

3.1.4. Дослідження експресії генів KCNJ8, KCNJ11, ABCC8 та ABCC9 за дії активатора $К_{АТФ}$-каналів тіофлокаліну.

Одним із завдань нашої роботи було визначення впливу нового вітчизняного активатора $К_{АТФ}$-каналів тіофлокаліну на експресію генів KCNJ8, KCNJ11, ABCC8 та ABCC9, що кодують Kir6.1, Kir6.2, SUR1 і SUR2 субодиниці $К_{АТФ}$-каналів. Дослідження впливу фармакологічних активаторів зазначених каналів на експресію субодиниць каналу залишається практично не вивченим, і здається важливим, адже постійна активація каналу вірогідно може

змінювати експресію каналу. Яким чином будуть відбуватися ці зміни не відомо, чи буде відбуватися пригнічення експресії канальних субодиниць по зворотному зв'язку з огляду на постійну стимуляцію каналів, чи може, навпаки, присутність активатора зможе спонукати клітину до необхідності підвищення щільності каналу на мембранах. Літературних даних про вплив фармакологічних активаторів цих каналів на експресію окремих субодиниць каналу досить мало [177, 178].

Результати дослідження експресії мРНК субодиниць $К_{АТФ}$-каналів Kir6.1, Kir6.2, SUR1 і SUR2 та її зміни при дії піридоксаль-5-фосфату представлені в табл. 3.3.

В наших експериментах пероральне введення старим щурам протягом 7 днів фармакологічного активатора $К_{АТФ}$-каналів тіофлокаліну в дозі 2 мг/кг експресію генів KCNJ8, KCNJ11, ABCC8 та ABCC9, що кодують Kir6.1, Kir6.2, SUR1 і SUR2 субодиниці $К_{АТФ}$-каналів відповідно, достовірно не змінювало.

Таблиця 3.3.

Експресія субодиниць Kir6.1, Kir6.2, SUR1 та SUR2 $К_{АТР}$-каналів у міокарді дорослих і старих щурів, і старих щурів при дії нового вітчизняного активатора $К_{АТФ}$-каналів тіофлокаліну; (M±m)

Субодиниці $К_{АТР}$-каналів	Дорослі щурі	Старі щурі	Старі щурі + тіофлокалін
Kir6.1	7,24 ± 2,07 (n= 4)	3,34 ± 0,33 (n= 8)	2,77 ± 0,27 (n= 8)
Kir6.2	2,73 ± 0,62 (n= 4)	1,70 ± 0,16 (n= 8)	1,96 ± 0,336 (n= 8)
SUR1	0,34 ± 0,07 (n= 4)	0,19 ± 0,01 (n= 8)	0,04 ± 0,01 (n= 8)
SUR2	43,58 ± 13,91 (n= 4)	24,16 ± 3,22 (n= 8)	6,79 ± 2,40 (n= 8)

В наших експериментах пероральне введення старим щурам протягом 7 днів фармакологічного активатора $К_{АТФ}$-каналів тіофлокаліну в дозі 2 мг/кг

експресію генів KCNJ8, KCNJ11, ABCC8 та ABCC9, що кодують Kir6.1, Kir6.2, SUR1 і SUR2 субодиниці $К_{АТФ}$-каналів відповідно, достовірно не змінювало.

3.1.5. Дослідження експресії генів KCNJ8, KCNJ11, ABCC8 та ABCC9 за різних моделей гіпоксії.

Використовували три моделі гіпоксії: гостру, інтервальну і поєднану (інтервальна і гостра).

Перша модель – 12%-на гіпоксія протягом однієї години (28 днів).

Друга – інтервальна гіпоксія: 15 хв 12%-ї гіпоксії і 15 хв нормоксії (5 циклів щодня протягом 28 днів).

Третя – інтервальна гіпоксія 15 хв 12%-ї гіпоксії і 15 хв нормоксії (5 циклів щодня 28 днів), гостра гіпоксія (12%-на гіпоксія протягом однієї години) по завершенню інтервальної.

Результати дослідження експресії мРНК субодиниць $К_{АТФ}$-каналів Kir6.1, Kir6.2, SUR1 і SUR2 та її зміни при різних моделях гіпоксії представлені в табл. 3.4.

Таблиця 3.4.

Експресія мРНК субодиниць Kir6.1, Kir6.2, SUR1 та SUR2 $К_{АТР}$-каналів у міокарді експериментальних щурів при різних моделях гіпоксії; (M±m)

Субодиниці $К_{АТР}$-каналів	Контроль	12% гостра гіпоксія	Інтервальна гіпоксія	Інтервальна + 12% гостра гіпоксія
Kir6.1	0,91 ± 0,06 (n= 7)	1,15 ± 0,36 (n= 7)	0,75 ± 0,07 (n= 7)	0,88 ± 0,09 (n= 6)
Kir6.2	0,41 ± 0,07 (n= 7)	0,62 ± 0,33 (n=7)	0,31 ± 0,05 (n= 6)	0,37 ± 0,09 (n= 6)
SUR1	0,012 ± 0,009 (n= 7)	0,006 ± 0,004 (n= 7)	0,00011 ± 0,00008 (n= 5)	0,00007 ± 0,000042 (n= 5)
SUR2	0,06 ± 0,03 (n= 6)	0,36 ± 0,2 (n= 7)	0,07 ± 0,036 (n= 6)	0,035 ± 0,016 (n= 6)

Як видно з табл. 3.4 достовірних змін експресії $К_{АТФ}$-каналів при дії гіпоксії ми не отримали, проте за гострої гіпоксії спостерігається тенденція до збільшення експресії серцевого типу Kir6.2 і SUR2 субодиниць, а саме, у 1,5 та 6 разів відповідно (рис. 3.9). З літератури відомо, що гіпоксія підвищує експресію саме SUR2A-субодиниць $К_{АТФ}$-каналів серцевого типу [17, 179, 180].

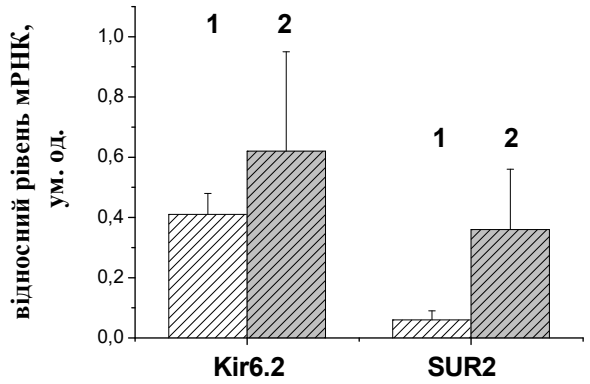


Рис. 3.9. Рівень експресії генів KCNJ11 і ABCC9, що кодують Kir6.2 і SUR2 субодиниці АТФ-чутливих калієвих каналів серцевого типу відповідно у серці контрольних (1) та експериментальних (2) щурів за 12% гострої моделі гіпоксії; де ум.од. – відносний рівень мРНК Kir6.2/актин для Kir6.2 і відносний рівень мРНК SUR2/актин для SUR2.

Таким чином, експериментально перевірено сім потенційних моделей індукції експресії генів KCNJ8, KCNJ11, ABCC8 та ABCC9, що кодують Kir6.1, Kir6.2, SUR1 і SUR2 субодиниці $К_{АТФ}$-каналів каналів відповідно у серці дорослих та старих щурів. А саме, пероральне введення піридоксаль-5-фосфату у дозі 0,7 мг/кг один раз на добу протягом 14 днів, внутрішньоочеревинне введення глутатіону старим щурам у дозі 52 мг/кг за одну годину до відбирання зразків, введення per os нікотинаміду у дозі 0,1 мг/кг один раз на добу протягом 7 днів, введення per os вітчизняного фторвмісного фармакологічного відкривача АТФ-чутливих калієвих каналів тіофлокаліну у дозі 2 мг/кг протягом 7 днів, три моделі гіпоксії: гостра (12%-на гіпоксія протягом однієї

години), інтервальна (15 хв 12%-ї гіпоксії і 15 хв нормоксії – 5 циклів щодня протягом 28 днів) і поєднана інтервальна і гостра (5 циклів щодня 28 днів).

Виявлено, що за гострої гіпоксії спостерігається тенденція до збільшення експресії мРНК Kir6.2 і SUR2 субодиниць $К_{АТФ}$-каналів серцевого типу, а саме, у 1,5 та 6 разів відповідно (див. рис. 3.9).

Вперше показано, що внутрішньоочеревинне введення глутатіону старим щурам у дозі 52 мг/кг за одну годину до відбирання зразків достовірно підвищувало у 9,3 та 2,6 рази експресію генів KCNJ8 і KCNJ11 відповідно, що кодують пороутворюючі субодиниці Kir6.1 і Kir6.2 $К_{АТФ}$-каналів судинного і серцевого типу (рис. 3.1).

Вимірювання рівнів експресії мРНК генів ABBC8 і ABCC9, що кодують регуляторні SUR1 і SUR2 субодиниці $К_{АТФ}$-каналу відповідно, показало значне зменшення їх експресії у серці старих щурів. Вперше виявлено, що введення глутатіону старим щурам у дозі 52 мг/кг за одну годину до відбирання зразків підвищувало експресію регуляторних SUR субодиниць $К_{АТФ}$-каналу. Проте якщо експресія мРНК SUR2 субодиниці $К_{АТФ}$-каналів сарколемального типу лише мала тенденцію до збільшення, то експресія мРНК регуляторної субодиниці SUR1 переважно мітохондрільного типу каналу підвищувалася у 13 разів (див. рис. 3.2).

Вперше показано, що пероральне введення піридоксаль-5-фосфату дорослим щурам у дозі 0,7 мг/кг один раз на добу протягом 14 днів майже вдвічі достовірно підвищує рівні експресії мРНК генів KCNJ11 і ABCC9, що кодують кардіоспецифічні Kir6.2 і SUR2 субодиниці сарколемальних $К_{АТФ}$-каналів серцевого типу (рис. 3.10).

Вперше показано, що також при вищезазначеному пероральному введенні піридоксаль-5-фосфату дорослим щурам у 1,5 раза збільшується експресія мРНК SUR1 субодиниці $К_{АТФ}$-каналів переважно мітохондріального типу (див. рис. 3.6).

Вперше показано, що за умов введення піридоксаль-5-фосфату старим щурам експресія пороутворюючих субодиниць $К_{АТФ}$-каналів судинного типу

Kir6.1 зросла у 3,64 рази, і експресія регуляторної SUR2 субодиниці $К_{АТФ}$-каналів як судинного, так і серцевого типу зросла у 2,38 раза (рис. 3.11).

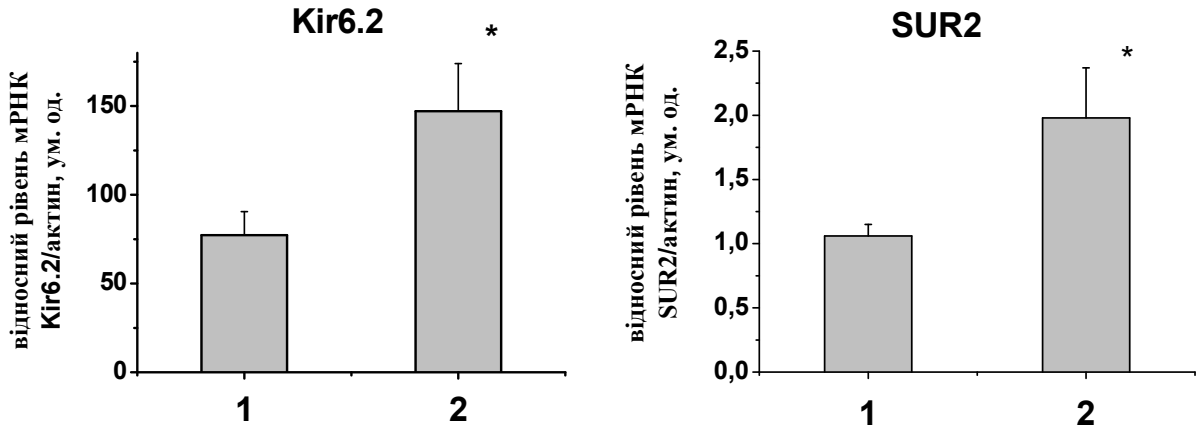


Рис. 3.10 Зміни рівня експресії мРНК генів KCNJ11 (а) і ABCC9 (б), що кодують Kir6.2 і SUR2 субодиниці АТФ-чутливих калієвих каналів серцевого типу у серці дорослих щурів у контрольних тварин (1) та після введення піридоксаль-5-фосфату (2). *P <0,05 відносно значень у контрольних щурів

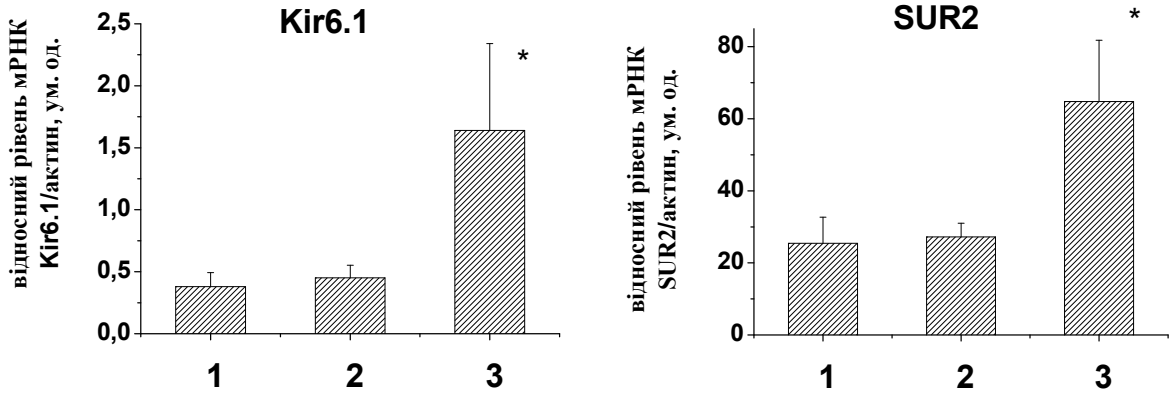


Рис. 3.11. Рівень експресії мРНК генів KCNJ8 і ABCC9, що кодують Kir6.1 і SUR2 субодиниці АТФ-чутливих калієвих каналів відповідно у серці дорослих (1), старих (2) щурів та старих щурів після введення піридоксаль-5-фосфату (3). *P<0,05 відносно значень у старих щурів.

Таким чином, з огляду на те, що піридоксаль-5-фосфат значно підвищував експресію SUR2, Kir6.1 і Kir6.2 субодиниць $К_{АТФ}$-каналів, ми можемо припустити збільшення мембранної щільності сарколемальних $К_{АТФ}$-каналів як судинного, так і серцевого типу у цих тварин, що було нами перевірено за допомогою електрофізіологічних експериментів по реєстрації мембранних струмів ізольованих кардіоміоцитів щура за допомогою методу "patch-clamp" та тензометричних вимірювання реакцій скорочення/ розслаблення ізольованих судинних смужок з активацією $К_{АТФ}$-каналів фармакологічним способом.

Підвищення щільності як сарколемальних, так і мітохондріальних $К_{АТФ}$-каналів як судинного, так і серцевого типу може мати важливе значення для підвищення стійкості серця до патологічних впливів ішемічної природи, що нами було показано на попередньому етапі роботи в експериментах по дослідженню кардіопротекторних ефектів у тварин з підвищеною експресією $К_{АТФ}$-каналів в експериментах з ішемією-реперфузією ізольованого серця щурів.

Відповідно до «Технічного завдання» II етапу 2021 року проводили модуляцію експресію генів, що кодують $К_{АТФ}$-канали, у дослідних тварин для проведення електрофізіологічних експериментів по реєстрації мембранних струмів ізольованих кардіоміоцитів щура, тензометричних вимірювань реакцій скорочення/розслаблення ізольованих судинних смужок та вимірювань біохімічних показників.

3.2. Електрофізіологічні експерименти по реєстрації мембранних струмів ізольованих кардіоміоцитів щура

Відповідно до отриманих нами даних щодо значного підвищення експресії мРНК генів KCNJ11 і ABCC9, що кодують Kir6.2 і SUR2 субодиниці

$К_{АТФ}$-каналів серцевого типу та SUR1 субодиниці $К_{АТФ}$-каналів переважно мітохондріального типу (рис. 3.10 і 3.6) у серці щурів після введення піридоксаль-5-фосфату ми спробували підтвердити ці дані за допомогою електрофізіологічних експериментів. Ми провели експерименти з неонатальними кардіоміоцитами щурів, які інкубувалися у середовищі з 50 мкмоль/л піридоксаль-5-фосфату, оскільки зміна щільності трансмембранних струмів, опосередкованих $К_{АТФ}$-каналами (I_{KATP}) вказує про зміну експресії і, відповідно, щільності $К_{АТФ}$-каналів на клітинній мембрані. Дослідна група внаслідок заміщення власного внутрішньоклітинного розчину на штучний без вмісту АТФ продемонструвала більшу середню амплітуду $I_{KATP} = 41.90 \pm 3$ пА, ніж контрольна група – $I_{KATP} = 13.94 \pm 1{,}5$ пА при командному потенціалі +50мВ (рис. 3.12, а, б).

Вольт-амперна характеристика I_{KATP} контрольних кардіоміоцитів та PLP-кардіоміоцитів представлена на рис. 3.13, а. Показано, що щільність трансмембранних струмів, опосередкованих АТФ-чутливими калієвими каналами для кардіоміоцитів інкубованих у PLP становить 1.4 ± 0.1 пА/пФ, а для контрольних 0.47 ± 0.05 пА/пФ (див. рис. 3.13, б).

Таким чином, в електрофізіологічних експериментах по реєстрації мембранних струмів через АТФ-чутливі калієві канали ізольованих неонатальних кардіоміоцитів щура за допомогою методу "patch-clamp" в конфігурації "ціла клітина" в кардіоміоцитах, що були інкубовані в присутності 50 мкмоль/л піридоксаль-5-фосфату вперше показано, що за впливу піридоксаль-5-фосфату відбувається підвищення у 2,98 раза трансмембранних струмів, опосередкованих $К_{АТФ}$-каналами (I_{KATP}), що, відповідно, вказує про збільшення експресії і, відповідно, щільності $К_{АТФ}$-каналів на клітинній мембрані.

Що підтвержує отримані нами дані щодо значного підвищення експресії мРНК генів KCNJ11 і ABCC9, що кодують кардіоспецифічні Kir6.2 і SUR2 субодиниці сарколемальних $К_{АТФ}$-каналів серцевого типу після введення піридоксаль-5-фосфату.

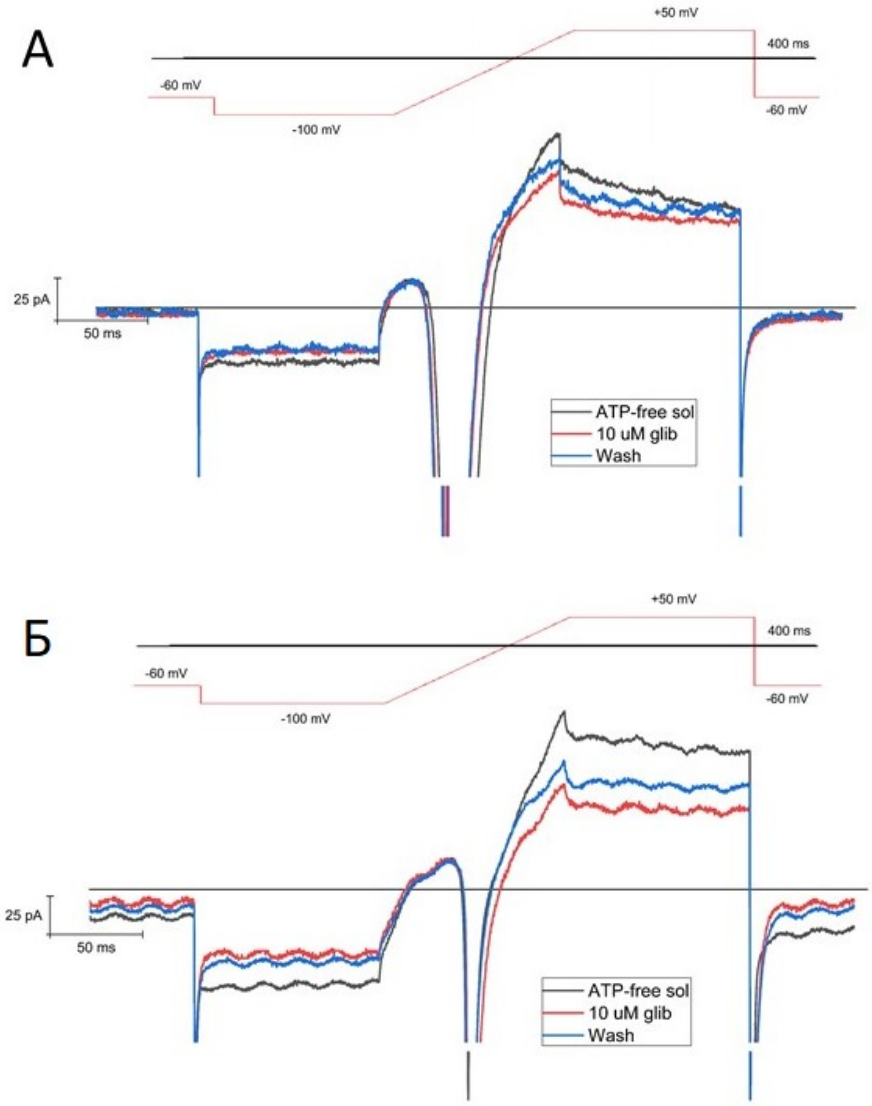
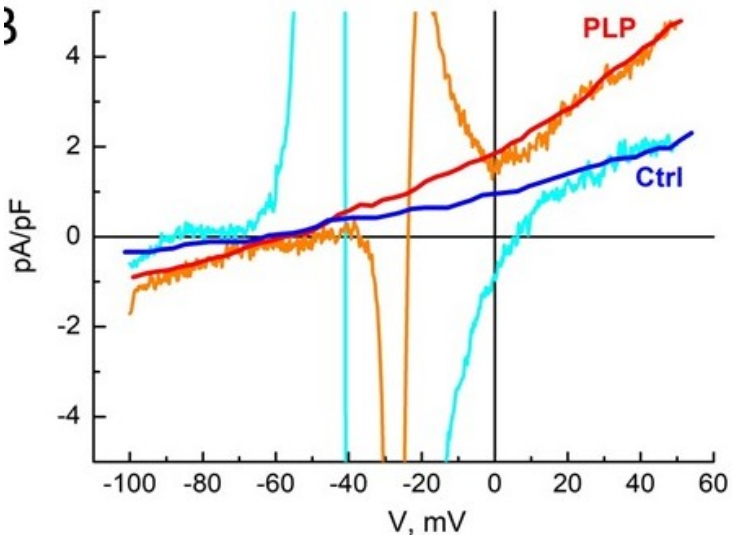
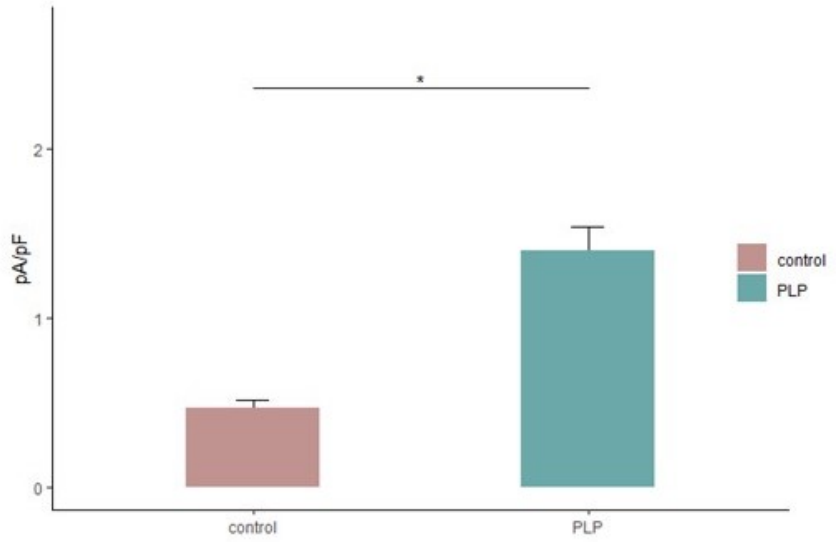


Рис. 3.12 Трансмембранні струми, опосередковані $К_{АТФ}$ каналами неонатальних кардіоміоцитів щура в нормі та під впливом PLP. Репрезентативні електрофізіологічні записи в конфігурації «ціла клітина» неонатальних контрольних кардіоміоцитів щура (а) та кардіоміоцитів, інкубованих у середовищі 50 мкмоль/л піридоксаль-5-фосфату (PLP кардіоміоцити) (б); чорна крива демонструє струми кардіоміоцитів, в тому числі трансмембранних струмів, опосередкованих $К_{АТФ}$ каналами ($I_{КАТР}$), які розвинулися внаслідок використання внутрішньоклітинного розчину без вмісту АТФ; червона крива відображає вплив селективного блокатора $К_{АТФ}$ каналів глібенкламіду на $I_{КАТР}$; синя крива демонструє струми, після відмивання блокатора зовнішньоклітинного розчину; для стимуляції кардіоміоцитів використовувався протокол командного потенціалу, зображений на верхній частині (а) та (б).



а



б

Рис. 3.13 Трансмембранні струми, опосередковані $К_{АТФ}$ каналами неонатальних кардіоміоцитів щура в нормі та під впливом PLP. а: вольт-амперна характеристика I_{KATP} контрольних кардіоміоцитів (темна синя лінія) та PLP-кардіоміоцитів (червона лінія); проведена інтерполяція точок кривої ВАХ, щоб виключити вплив натрієвого струму; більший нахил ВАХ кривої PLP-кардіоміоцитів свідчить про вищий рівень експресії $К_{АТФ}$ каналів; б: порівняння щільності I_{KATP} контрольних кардіоміоцитів (коричневий стовпчик), та PLP-кардіоміоцитів (зелений стовпчик) при командному потенціалі +50 мВ.

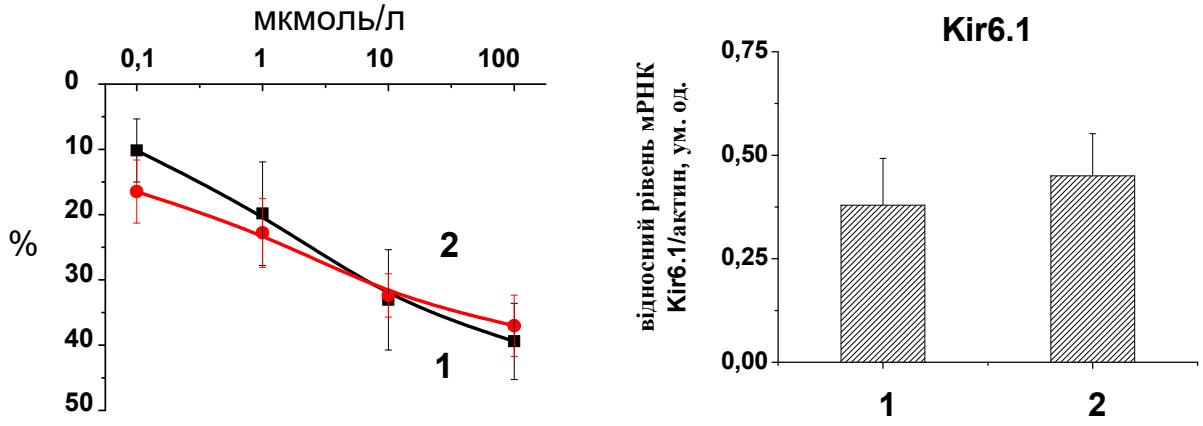
3.3. Дослідження реакцій скорочення/розслаблення ізольованих судинних смужок у тварин з підвищеною експресією $К_{АТФ}$-каналів

За допомогою молекулярно-генетичних досліджень нами було встановлено, що пероральне введення піридоксаль-5-фосфату у дозі 0,7 мг/кг один раз на добу протягом 14 днів може змінювати експресію пороутворюючої субодиниці Kir6.1 АТФ-чутливих калієвих каналів судинного типу, та регуляторних субодиниць SUR2 і SUR1 $К_{АТФ}$ каналів сарколемальних та внутрішньої мітохондріальної мембрани $К_{АТФ}$ каналів. Зокрема, введення піридоксаль-5-фосфату дорослим щурам достовірно підвищує експресію мРНК генів ABCC8 і ABCC9, що кодують регуляторні SUR1 і SUR2 субодиниці $К_{АТФ}$ каналів відповідно (див. рис. 3.6).

Для відкривання $К_{АТФ}$ каналів використовували вітчизняний фармакологічний активатор $К_{АТФ}$ каналів флокалін в дозах від 0,1-100 мкмоль/л. Характер вазодилататорних реакцій судинних смужок визначали за допомогою специфічного інгібітора $К_{АТФ}$ каналів глібенкламіду, який в дозі 100 мкмоль/л вводили в перфузійний розчин за 10 хвилин до дії флокаліну та продовжували перфузію протягом активації $К_{АТФ}$ каналів.

Перфузія смужок грудної аорти дорослих та старих щурів фармакологічного активатором $К_{АТФ}$ каналів флокаліном в дозах від 0,1-100 мкмоль/л призводило до дозозалежних вазодилататорних реакцій препаратів судин. Достовірних відмінностей в амплітуді розслаблюючого ефекту флокаліну у дорослих і старих щурів не спостерілалося (рис. 3.14). Що цілком відповідає нашим даним про відсутність значних відхилень у значеннях експресії мРНК Kir6.1 субодиниць АТФ-чутливих калієвих каналів судинного типу у дорослих щурів (рис. 3.14 б), та складала 0,38 ± 0,11 в.од. та 0,45 ± 0,10 в.од. у дорослих та старих щурів відповідно. Попередня (10 хвилин) та продовжена під час дії флокаліну перфузія цих судинних препаратів специфічним інгібітором $К_{АТФ}$ каналів глібенкламідом в дозі 10 млмоль/л повністю попереджувала вазодилататорні реакції, що може свідчити, що ці

вазодилататорні реакції відбуваються внаслідок активації $К_{АТФ}$ каналів клітинних мембран.



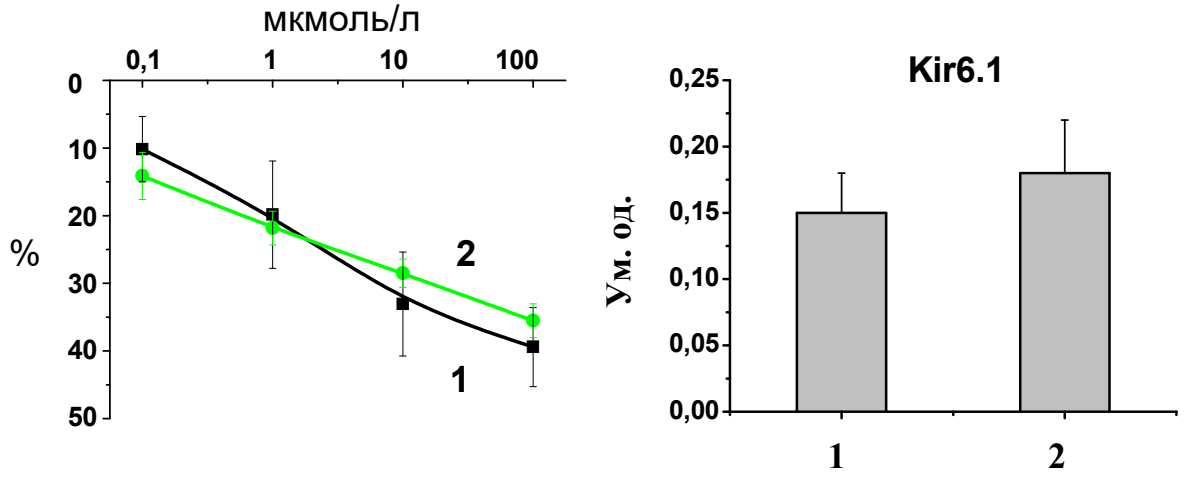
а б

Рис. 3.14 Вазодилататорні реакції (а) препаратів аорти дорослих (1) та старих (2) щурів і рівень експресії (б) мРНК пороутворюючих Kir6.1 субодиниць $К_{АТФ}$ каналів судинного типу у дорослих (1) та старих (2) щурів.

Значних відмінностей в амплітуді вазодилататорних реакцій препаратів аорти контрольних дорослих щурів і дорослих тварин після введення піридоксаль-5-фосфату також не спостерігалося (рис. 3.15 а). Попередня (10 хвилин) та продовжена під час дії флокаліну перфузія цих судинних смужок специфічним інгібітором $К_{АТФ}$ каналів глібенкламідом в дозі 10 млмоль/л повністю попереджувала вазодилататорні реакції, що може свідчити, що ці вазодилататорні реакції відбуваються внаслідок активації $К_{АТФ}$ каналів клітинних мембран.

Підвищення експресії мРНК регуляторних SUR1 і SUR2 субодиниць $К_{АТФ}$ каналів на введення піридоксаль-5-фосфату для підвищення вазодилататорних реакцій на активацію вищезазначених каналів виявилося замало, адже експресія мРНК пороутворюючої Kir6.1 субодиниці $К_{АТФ}$ каналів судинного типу у

дорослих щурів за введення піридоксаль-5-фосфату практично не змінилася (рис. 3.15 б). Відомо, що цей мембранний канал складається з 4-х Kir6.1 і 4-х SUR2B субодиниць, і відсутність одного із цих компонентів внаслідок його низької експресії унеможливлює збільшення утворення каналів, і збільшення їх щільності на клітинній мембрані.

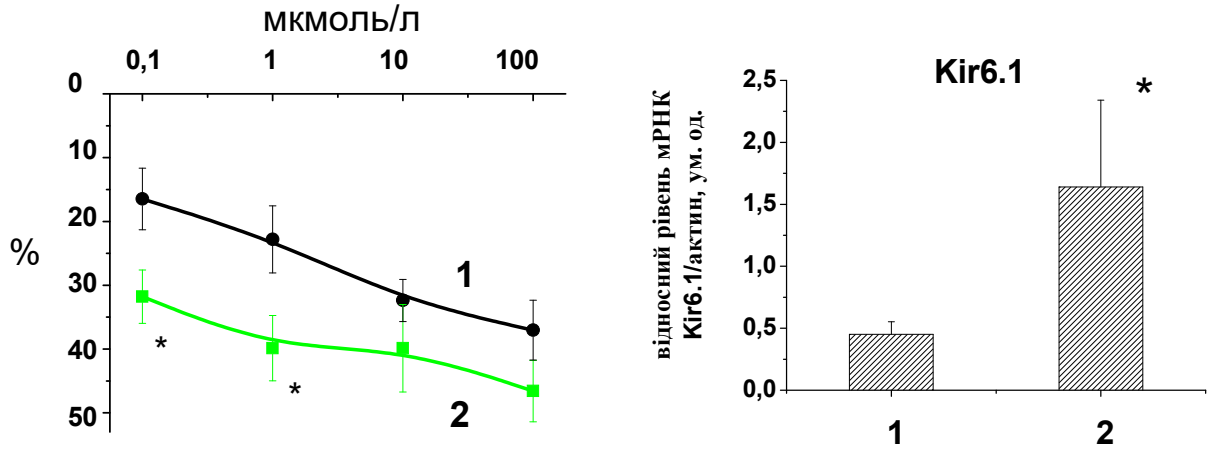


а б

Рис. 3.15. Вазодилататорні реакції (а) препаратів аорти дорослих щурів до (1) і після (2) введення піридоксаль-5-фосфату і рівень експресії (б) мРНК пороутворюючих Kir6.1 субодиниць $К_{АТФ}$ каналів судинного типу до (1) і та після (2) введення піридоксаль-5-фосфату (2).

Водночас ведення піридоксаль-5-фосфату старим щурам достовірно підвищувало експресію мРНК гену KCNJ8 (у 3,4 раза), що кодує Kir6.1 субодиницю судинних $К_{АТФ}$ каналів (рис. 3.16 б), що значно підвищило амплітуду вазодилататорних ефектів флокаліну (рис. 3.16 а), а саме на 93% ($P<0,05$), на 73% ($P<0,05$), на 23 та 26 % при дозах фармакологічного активатолра $К_{АТФ}$ каналів 0,1, 1, 10 та 100 мкмоль/л відповідно. Це може

світчити про підвищення мембранної щільності цих каналів, вірогідно завдяки посиленню експресії саме Kir6.1. Значне посилення амплітуди реакції при малих дозах активатора $К_{АТФ}$ каналів та гальмування наростання амплітуди реакції за великих доз флокаліну (10 мкмоль/л і більше) може вказувати на якийсь обмежуючий фактор для утворення $К_{АТФ}$ каналів у обох типах тварин, контрольних і з модифікованою експресією цих каналів. Вірогідно таким лімітуючим фактором є обмеженна кількість SUR2B субодиниць, які у тварин експресуються з запасом, а зі збільшенням експресії Kir6.1 у модефікованих тварин цей запас вичерпується на утворення $К_{АТФ}$ каналів.



а б

Рис. 3.16 Вазодилататорні реакції (а) препаратів аорти старих щурів до (1) і після (2) введення піридоксаль-5-фосфату і рівень експресії (б) мРНК пороутворюючих Kir6.1 субодиниць $К_{АТФ}$ каналів судинного типу до (1) і та після (2) введення піридоксаль-5-фосфату (2). *P<0,05 відносно значень у контрольних щурів

Таким чином, вперше показано, що пероральне введення піридоксаль-5-фосфату у дозі 0,7 мг/кг один раз на добу протягом 14 днів старим щурам

значно посилює амплітуду вазодилататорних реакцій препаратів аорти у відповідь на активацію $К_{АТФ}$ каналів флокаліном в дозах від 0,1-100 мкмоль/л, що може свідчити про зростання утворення за даних умов $К_{АТФ}$ каналів судинного типу (Kir6.1/ SUR2B), тобто про підвищення мембранної щільності цих каналів, та збігається з даними молекулярно-генетичних досліджень про підвищення у них у 3,4 раза ($P<0,05$) експресії мРНК гену KCNJ8, що кодує Kir6.1 пороутворюючі субодиниці судинних $К_{АТФ}$ каналів, та зростання у 2,4 раза ($P<0,05$) експресії мРНК гену ABCC9, що кодує SUR2 регуляторні субодиниці $К_{АТФ}$ каналів як судинного, так і серцевого типу.

3.4. Дослідження чутливості мітохондріальної пори до кальцію у серці за дії можливих індукторів експресії $К_{АТФ}$-каналів

3.4.1. Дослідження чутливості мітохондріальної пори до кальцію у серці за дії піридоксаль-5-фосфату.

У дослідженні було ідентифіковано кальційіндуковану циклоспоринчутливу МП: при навантаженні іонами Са (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 МП. У наших дослідах *in vitro* на ізольованих мітохондріях реєстрували відкривання МП у серці щурів, використовуючи природний її індуктор Ca^{2+} у концентрації 10^{-4} моль/л. На рис. 3.17 представлено типовий експеримент, у якому продемонстровано зміну спонтанного (контрольного у безкальцієвому середовищі) та кальційіндукованого набухання мітохондрій серця старих щурів і таких після курсового введення PLP.

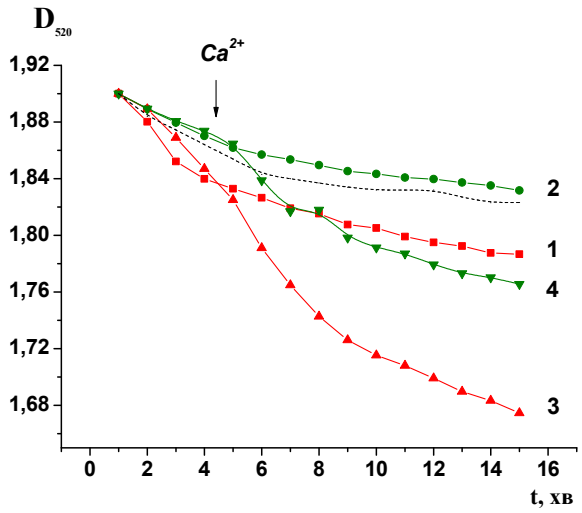


Рис. 3.17 Вплив піридоксаль-5-фосфату (PLP) на набухання мітохондрій у серці старих щурів за умов курсового введення PLP: 1 – контроль (старі щури), 2 – мітохондрії серця старих щурів, яким вводили PLP, у безкальцієвому середовищі, 3 – мітохондрії серця старих щурів і дія Ca^{2+} (10^{-4} моль/л), 4 – мітохондрії серця старих щурів, яким вводили PLP, та дія Ca^{2+}. Пунктиром показано контроль дорослих щурів.

Виявили, що використання цього модулятора зменшувало амплітуду набухання мітохондрій порівняно зі старими тваринами як у безкальцієвому середовищі. Як відомо, однією з ключових ланок процесів старіння організму є накопичення та тривала дія вільних радикалів, які є індукторами МП. Пошук системи захисту мітохондрій від впливу вільнорадикальних процесів займає вагоме місце у сучасних дослідженнях.

У роботі було також розраховано кінетичні параметри пороутворення в мітохондріях, а саме амплітуди контрольного (A_c) та кальційзалежного (A_{max}) набухання органел за умов дії PLP (табл. 3.5). Як видно з таблиці, у разі дії PLP значення амплітуди контрольного набухання у перерахунлк на кількість білка наближалася до таких у дорослих щурів. Щодо капльційзалежного набухання органел після впливу PLP, то спостерігали зниження цього значення менше на 20% ніж у дорослих тварин. що свідчить про мембраностабілізуючий ефект цього модулятора.

Таблиця 3.5.

Зміни амплітуди контрольного (A_c) та кальційзалежного (A_{max}) набухання мітохондрій серця щурів різного віку та за умов дії піридоксаль-5-фосфату (PLP)

	A_c, ум.од./мг білка	A_{max}, ум.од./мг білка
Дорослі щури	0,16±0,004	0,43±0,012
Старі щури	0,28±0,012	0,56±0,016
Старі щури і дія PLP	0,17±0,009*	0,34±0,018*

*P<0,05 відносно значень у старих щурів

Дані попередніх досліджень показали, що мітохондрії тканин серця старих щурів на відміну від таких у дорослих мають підвищену проникність мембран, у результаті чого набувають здатності до вивільнення через пору низькомолекулярних речовин з молекулярною масою більше ніж 1,5 кДа, що є показником її відкривання. Також відомо, що відкривання МП у серці дорослих щурів повністю пригнічується специфічним її інгібітором циклоспорином А, а у старих тварин – лише частково. Це свідчить про те, що в мітохондріях серця старих щурів поряд з утворенням класичної МП, формується неспецифічна циклоспорин А-нечутливої пора.

Було досліджено вплив PLP на чутливість МП до дії природного індуктора Ca^{2+}, використовуючи його в діапазоні концентрацій 10^{-7}–10^{-4} моль/л (рис. 3.18). Поріг чутливості відповідав найменшій концентрації Ca^{2+}, яка викликала набухання мітохондрій у серці. Як видно з рисунку, при старінні відбувається зсув концентраційної кривої вверх відносно контролю, що свідчить про зниження порогу дії Ca^{2+} на набухання органел і, як наслідок, збільшення чутливості МП до дії цього іона.

Показано, що використання PLP зменшувало амплітуду набухання мітохондрій за дії всіх використаних концентрацій індуктора порівняно з цим показником у старих тварин. Спостерігали зменшення чутливості МП до

кальцію внаслідок підвищення на три порядки порогової концентрації індуктора, яка спричиняла набухання органел.

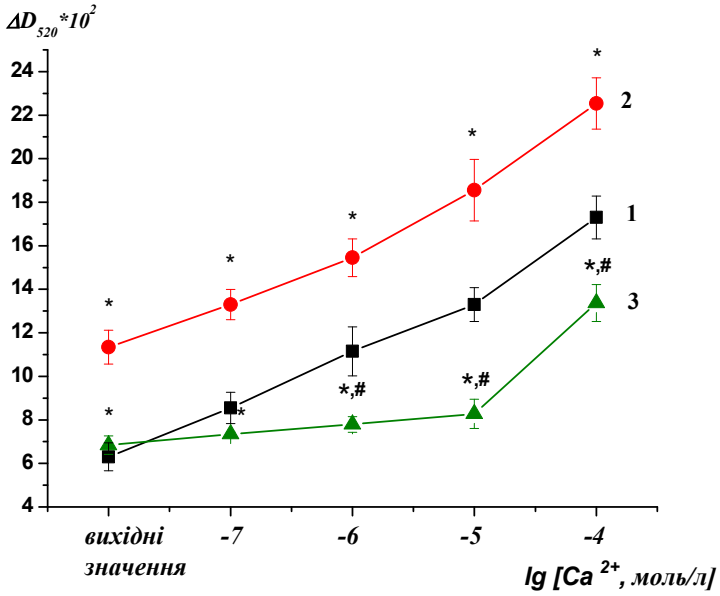


Рис. 3.18 Зміни чутливості мітохондріальної пори до індуктора Ca^{2+} у серці дорослих (1) та старих (2) щурів, а також за умов введення піридоксаль-5-фосфату (PLP) старим тваринам (3) (0.7 мг/кг). *P<0,05 відносно у дорослих тварин, **P<0,05 відносно значень у старих тварин. *P<0,05 статистично достовірна різниця відносно значень у дорослих щурів; #P<0,01 статистично достовірна різниця відносно значень у старих щурів.

Таким чином, результати наших досліджень показали, що застосування піридоксаль-5-фосфату пригнічувало Ca^{2+}-індуковане відкривання МП через зменшення чутливості до кальцію у серці старих щурів.

3.4.2. Дослідження чутливості мітохондріальної пори до кальцію у серці за дії глутатіону.

Як відомо, виснаження пулів GSH та зміни в його метаболізмі мають вирішальне значення при низці патологічних станів, в тому числі і вірусних захворювань. Окрім цього посилення оксидативного і нітрозативного стресу в

серці при старінні в сукупності призводить до дисфункції мітохондріальних механізмів, зокрема до формуванням неселективного мегаканалу – МП у режимі високої провідності, що є причиною розвитку багатьох патологічних станів організму [181, 182]. Метою нашої подальшої роботи було дослідити вплив одноразового введення відновленої форми глутатіону на Ca^{2+}-індуковане відкривання МП у серці старих щурів.

На рис. 3.19 представлено типові кінетичні криві набухання мітохондрій серця старих щурів після одноразового введення їм GSH.

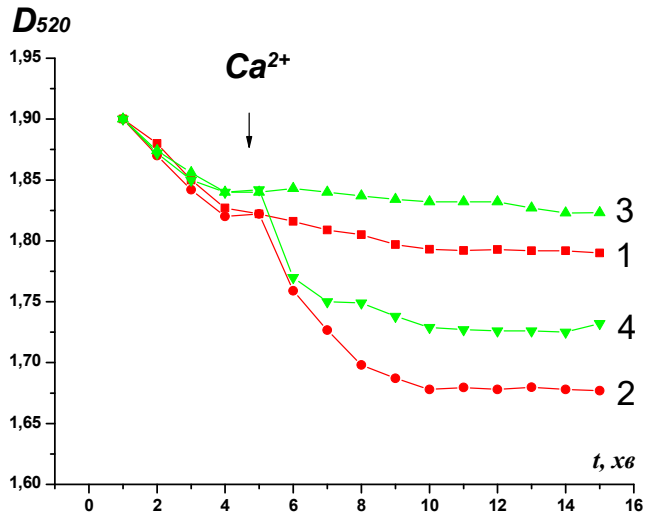


Рис. 3.19 Кінетичні криві набухання мітохондрій серця старих щурів: 1 – контроль; 2 – дія Ca^{2+} (10^{-4} моль/л); 3, 4 – введення *in vivo* глутатіону (52 мг/кг) старим тваринам без та за дії кальцію відповідно.

Зміни амплітуди контрольного (A_c) та кальційзалежного (A_{max}) набухання мітохондрій за умов дії глутатіону представлено на рис. 3.20. Порінюючи 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 серця, 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 $K_{АТФ}$-каналів ініціювало цито- і мітопротекторні механізми, які дали змогу попередити дисфункцію органел.

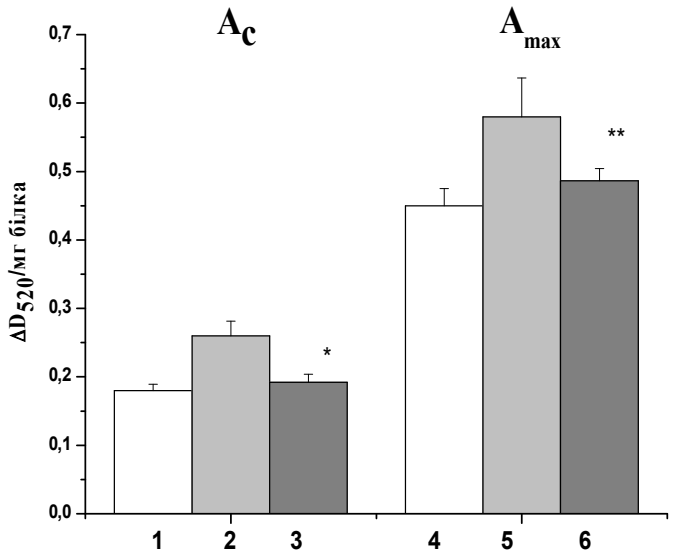


Рис. 3.20 Зміна амплітуди контрольного (A_c) та кальційзалежного (A_{max}) набухання: 1, 4 – контроль (дорослі і старі щури відповідно); 2, 5 – дія Ca^{2+} (дорослі і старі щури відповідно); 3, 6 – введення *in vivo* глутатіону (52 мг/кг) старим тваринам без та за дії кальцію відповідно. *P<0,05, **P<0,05 відносно старих щурів.

Відомо, що збільшення концентрації кальцію в матриксі мітохондрій індукує МП, при цьому чутливість пори до катіона посилюється за умов окисного стресу, підвищених концентраціях 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 відбувається вивільнення із міжмембранного простору і матриксу близько 100 білків, а також такого важливого елемента антиоксидантної захисту, як глутатіону [183, 184].

Ми вважаємо, що у наших експериментах дії глутатіону як модулятора експресії компонентів $К_{АТФ}$-каналу, призводила до зниження амплітуди кальційіндукованого набухання мітохондрій серця, що сприяло пригніченню неспецифічної МП у режимі високої провідності. Цей факт може свідчити про зниження проникності мембран мітохондрій до індукторів з віком за дії GSH.

У наступній серії експериментів нами отримано результати щодо чутливості МП до індуктора МП – Ca^{2+} у серці старих щурів за дії відновленої форми глутатіону. Так, за умов дії Ca^{2+} в діапазоні концентрацій 10^{-7}–10^{-4} моль/л на мітохондрії, ізольовані з тканини серця дорослих і старих щурів, спостерігали дозозалежне їх набухання (рис.3.21). Відмінність полягала в різниці величин набухання мітохондрій тканини серця старих щурів порівняно з такими у дорослих тварин. За відсутності в інкубаційному середовищі індуктора Ca^{2+}, мітохондрії серця старих щурів мали більшу здатність до набухання, що свідчить про підвищену проникність мембран, внаслідок чого МП знаходиться частково у відкритому стані. Крім того, зміна проникності мембран органел можливо пов’язана з підвищеною концентрацією цитозольного кальцію та посиленням оксидативних процесів як в клітині, так і цілому організмі при старінні. Більша величина набухання мітохондрій за умов дії Ca^{2+} у діапазоні концентрацій 10^{-7}–10^{-4} моль/л у серці старих щурів порівняно з дорослими свідчить про підвищену чутливість МП до дії досліджуваного індуктора. Однак при введені глутатіону старим щурам ми спостерігали достовірне зниження чутливості МП до кальцію.

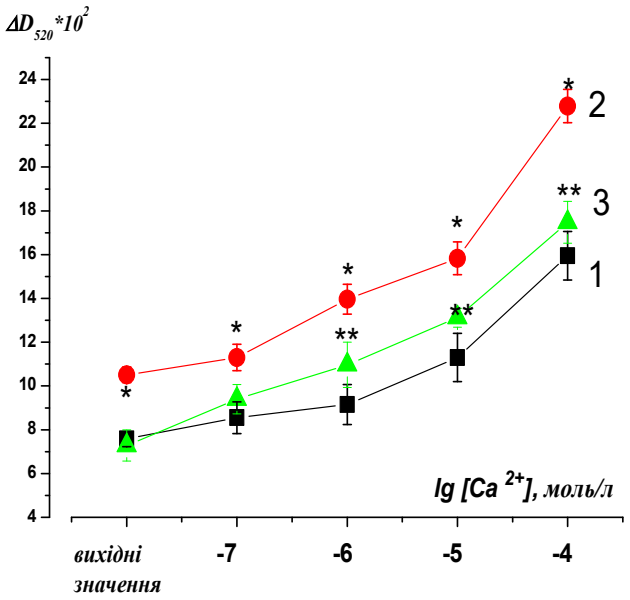


Рис. 3.21 Зміни чутливості мітохондріальної пори до індуктора Ca^{2+} у серці дорослих (1) та старих (2) щурів, а також за умов введення *in vivo* глутатіону (52 мг/кг) старим щурам (3). *P<0,05 відносно у дорослих тварин, **P<0,05 відносно значень у старих тварин

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 [185].

Таким чином, введення глутатіону старим щурам попереджало відкривання кальційіндукованої МП. 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.

3.4.3. Дослідження кальційіндукаованого відкривання мітохондріальної пори дорослих і старих щурів в умовах курсового введення нікотинаміду

Порушення функціональної діяльності серця з віком супроводжується підвищеною чутливістю МП до її індукторів. Відкривання МП пов’язано з критичним навантаженням мітохондрій йонами кальцію, накопиченням і тривалою дією вільних радикалів кисню та азоту, що спостерігається при патологічних станах, а також при старінні. Тому важливим є пошук нових, в першу чергу ендогенного походження, нетоксичних речовин з антиоксидантними властивостями та інгібуючою щодо відкривання МП дією. Нікотинамідаденіндинуклеотид або NAD^+ є одним з найважливіших молекул в клітинах ссавців. NAD^+ взаємодіє з більш ніж 500 ферментами і відіграє важливу роль майже в усіх життєво важливих аспектах біології клітини та фізіології людини. Порушення регуляції гомеостазу NAD^+ пов'язано з низкою захворювань, включаючи серцево-судинні захворювання [186]. Відомо, що зміна метаболізму NAD^+ може призвести до серцевих захворювань, а саме ішемічно-реперфузійного пошкодження, серцевої недостатності та аритмії [187].

Біологічні функції NAD^+ і його попередників охоплюють шляхи клітинної енергетики, запалення, метаболізму та виживання клітин. За деяких метаболічних та неврологічних захворювання спостерігається зниження рівня NAD^+ у тканинах. Суттєво знижений вміст NAD^+ також пов’язаний зі старінням, натомість його підвищення впливає на тривалість життя модельних

тварин. Останні дослідження показують причинний зв'язок між старінням, віковим зниженням вмісту NAD^+ у тканині та ферментативною його деградацією. Крім того, відкриття транспортерів і рецепторів, які беруть участь у метаболізмі попередників NAD^+ (нікотинова кислота або ніацин, нікотинамід і нікотинамідрибозид), дало змогу краще зрозуміти їх роль у клітинному гомеостазі, включаючи сигнальні функції, які не залежать від їх функцій в окислювально-відновних реакціях [188].

Серце, поряд з нирками і печінкою, має найвищий вміст NAD^+ серед усіх органів [189]. У клітинах ссавців NAD^+ синтезується двома різними шляхами: de novo та реутилізаційним шляхом. У разі синтезу de novo NAD^+ генерується із амінокислоти триптофану через метаболічний шлях кінуреніну [190], водночас клітини також здатні утворювати NAD^+ із готової нікотинової кислоти і деяких її похідних (ниіотинамід і нікотинамідрибозид) [191]. Тим не менш, більшість органів, включаючи серце, використовують реутилізаційний шлях як основний шлях генерації NAD^+ [189, 192]. Mori et al. (2014) встановили метаболічний профіль шляхів біосинтезу NAD^+ в тканинах мишей, вимірюючи in vitro активність ферментів, рівні субстратів та продуктів, і виявили, що в серці 99,3% NAD^+ генерується реутилізаційним способом [189]. З іншого боку, ферменти, що беруть участь у шляху de novo мають низькі експресію та активність у серці [193].

Реутилізаційний синтез NAD^+ відбувається з продукту його розпаду – нікотинаміду (NAM) [186]. NAM перетворюється в проміжний продукт нікотинамідмононуклеотид (NMN) за допомогою ферменту NAM-фосфорибозилтрансферази. На останньому етапі NMN перетворюється в NAD^+ за допомогою NMN-аденилтрансферази 1-3 (NMNAT1-3). Крім того, NMN також може бути утворений з іншого попередника NAD^+, а саме нікотинамідрибозиду (NR) за допомогою NR-кінази 1/2 (NRK1/2). Серцева експресія NRK2 набагато вища, ніж NRK1, що свідчить про те, що NRK2 може контролювати фосфорилювання NR в серці. Більше того, NR можна генеруватися з позаклітинного NAD^+ або NMN через CD73. Понад 80% NAD^+

міститься в мітохондріальному пулі в кардіоміоцитах гризунів. Оскільки внутрішня мітохондріальна мембрана непроникна для NAD^+, мітохондріальний NAD^+ повинен походити від імпорту попередників NAD^+ або NAD^+ з цитозолю через транспортери або непрямого обміну через малат-аспартатний човник. На основі всебічного аналізу локалізацій субклітинних ферментів і попередників NAD^+ було припущено, що NMN є попередником мітохондрій для генерації NAD^+. Інше нещодавнє дослідження з використанням ізотопного мічення показало, що NAD^+ можна безпосередньо імпортувати в мітохондрії з цитозолю [194].

Насамперед ми дослідили кінетику контрольного незалежного від екзогенного кальцію набухання мітохондрій серця дорослих і старих щурів (рис. 3.22).

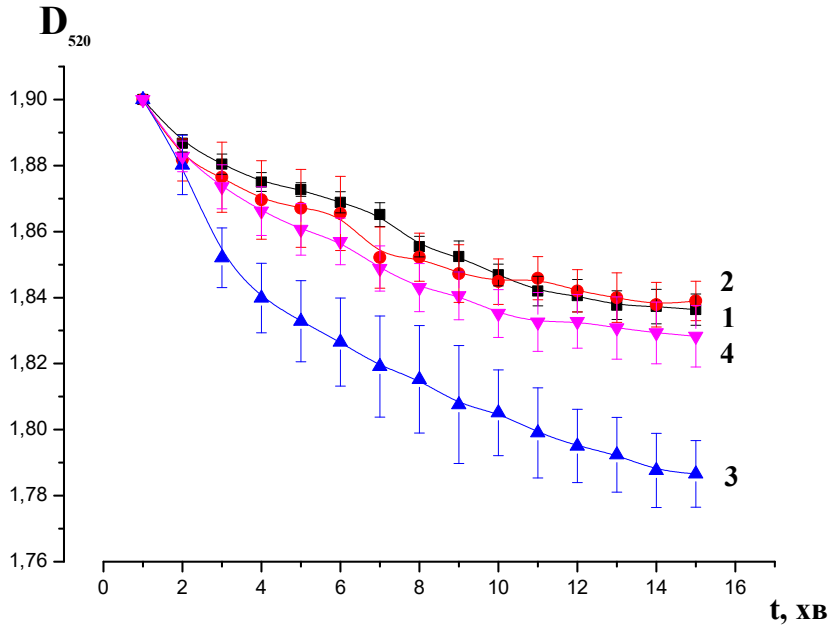


Рис. 3.22 Кінетичні криві контрольного (кальційнезалежного) набухання мітохондрій серця дорослих і старих щурів: 1 – дорослі щури; 2 – введення дорослим щурам *in vivo* нікотинаміду (NAM) у дозі 0,1 мг протягом 7 днів; 3 – старі щури, 4 – введення старим щурам *in vivo* NAM у дозі 0,1 мг протягом 7 днів.

Ми показали, що NAM запобігав збільшенню спонтанного кальційнезалежного набухання мітохондрій серця у старих тварин, що свідчить про мембраностабілізуючий його ефект при старінні.

Кальцій, який є природним індуктором МП, у високих концентраціях викликає відкривання пори шляхом приєднання до кальційзв'язуючих ділянок одного з її білків – циклофіліну Д на внутрішній мітохондріальній мембрані. Було досліджено відкривання МП в умовах кальцієвого навантаження у серці дорослих і старих щурів за попереднього впливу NAM (рис. 3.23)

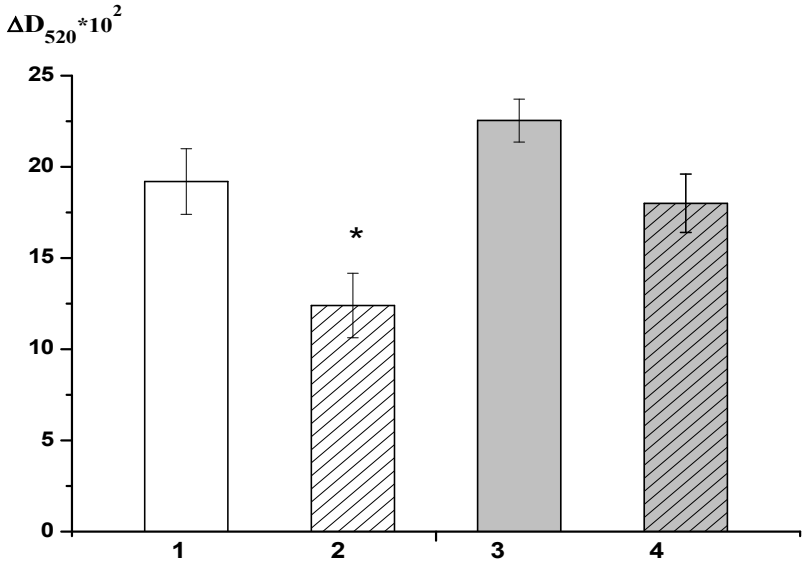


Рис. 3.23 Зміна чутливості мітохондріальної пори до її індуктора Ca^{2+} у концентрації 10^{-4} моль/л у серці дорослих та старих щурів за умов курсового введення per os нікотинаміду (NAM) у дозі 0,1 мг протягом 7 днів: 1 – дорослі щури; 2 – введення дорослим щурам NAM; 3 – старі щури, 4 – введення старим щурам NAM. *P<0,05 статистично достовірна різниця відносно значень у дорослих щурів.

При цьому з'ясували, що NAM сприяв зменшенню у 1,5 раза амплітуди набухання мітохондрій серця дорослих тварин порівняно з контролем, у старих тварин також цей показник зменшувався, а саме у 1, 3 раза порівняно зі

старими контрольними тваринами.

Цей факт засвідчує, що в умовах курсового введення NAM ступінь чутливості мітохондрій до дії Ca^{2+} в концентрації 10^{-4} моль/л значно зменшується як у дорослих, так і старих тварин, що ймовірно супроводжується відновленням бар'єрних властивостей мембрани органел серця, тобто зменшенням її проникності.

Таким чином, на підставі експериментальних даних можна зробити висновок, що в умовах курсового введення щурам NAM відбувається зменшення чутливості МП до індуктора її відкривання – Ca^{2+}. Отже, підвищення вмісту NAM за рахунок його екзогенного введення в організм є ефективним щодо інгібування МП в серці при старінні, що свідчить про його кардіопротекторні властивості. Цей шлях, як і спосіб вживання per os існуючих лікувальних препаратів, збагачених NAM, може бути ефективним щодо корекції мітохондріальної дисфункції при різних патологічних станах серцево-судинної системи та при старінні. Отже, на основі прогресу в розумінні механізму та функції NAD^+ і його попередників в клітинному метаболізмі актуальним є розробка нових стратегій для використання фармакологічного потенціалу цих молекул у підтримці метаболічного балансу.

3.5. Кардіопротекторні ефекти у тварин з підвищеною експресією $К_{АТФ}$-каналів за ішемії-реперфузії міокарду

3.5.1. Дослідження кардіопротекторних ефектів у тварин з підвищеною експресією $К_{АТФ}$-каналів за дії глутатіону

Функціональний стан і киснева вартість роботи серця старих щурів після введення препарату глутатіону.

Ізольовані серця перфузували за методом Лангендорфа. Через 15-20 хвилин періоду стабілізації серця виходили на функціональне плато з повторюваними значеннями тиску у лівому шлуночку і коронарного потоку. На

початку кожного експерименту значення кінцево-діастолічного тиску встановлювалось на рівні 5-6 мм рт ст., тому різниця в показниках в різних групах може розглядатись як вплив досліджуваного препарату. Результати досліджень кардіодинаміки ізольованого серця наведені у таблиці 3.6.

Таблиця 3.6.

Вихідні показники функціонального стану ізольованого серця експериментальних щурів до і після введення глутатіону, (M±m)

	Дорослі щури (n=48)	Старі щури (n=21)	Старі щури+ глутатіон (n=6)
Тиск у лівому шлуночку, мм рт. ст.	122,1±3,6	149,1±6,7***	169,6±7,2
Швидкість скорочення міокарда, мм рт.ст./с	2281±79	2765±140**	3265±188
Швидкість розслаблення міокарда,мм рт.ст./с	2117±68	2112±91	1955±295
Коронарний потік, мл/хв.	11,9±0,6	15,8±1,4**	13,3±1,3
Частота серцевих скорочень, уд/хв.	252±6	207±12***	186±8
Інтенсивність скоротливої функції, ум.од.	29851±1119	31929±2896	31389±1466
Споживання кисню, $x10^{-3}$ ммоль O_2/хв на г тканини	4,89±0,25	7,20±0,46***	$4,97±0,27^{\#\#}$
Киснева вартість роботи, $x10^{-7}$ ммоль O_2/хв на г тканини	1,61±0,09	2,43±0,23***	$1,55±0,07^{\#}$

Примітка: * P<0.05, ** P<0.01, *** P<0.001 порівняно з групою дорослих щурів; $^{\#}$ P<0.05, $^{\#\#}$ P<0.01 порівняно з групою старих щурів

Насамперед слід зауважити про відмінності у скоротливій функції дорослих і старих тварин, про що свідчить достовірне збільшення систолічного тиску в лівому шлуночці (на 22%) і максимального значення його першої похідної (на 21%). Водночас інтенсивність скоротливої функції (ІСФ) зростала всього на 7%, що зумовлено значно зниженою частотою серцевих скорочень (на 18%).

Процес розслаблення міокарда (діастола) залежить від швидкості відкачування йонів кальцію з цитоплазми кальцієвими помпами (SERCA) у сарколазматичний ретикулум і ефективності синтезу АТФ мітохондріями. Слід відмітити, що швидкість розслаблення міокарда практично не відрізнялася як у дорослих, так і у старих тварин, що при збільшених розмірах серця (на 11,7%, при обрахунку сухої маси) і збільшеному коронарному потоку (на 32,7%) у старих тварин вказує на порушення у них дилатаційної функції. Разом з тим споживання кисню міокардом і киснева вартість у старих щурів значно зростали (на 47,2% і 51,0% відповідно), що може свідчити про розпряження процесів окислення речовин і фосфорилювання АДФ, зниження ефективності використання кисню міокардом старих щурів і надмірне утворення активних форм кисню (АФК). Отримані результати є характерними для старих тварин і свідчать про кальцієве перевантаження кардіоміоцитів, енергодефіцит і інтенсифікацію окисного метаболізму в міокарді старих щурів.

Внутрішньоочеревинне одноразове введення старим щурам глутатіону за 1 год до початку експерименту достовірно не впливало на скоротливу функцію ізольованого серця (див. табл. 3.6). Так, тиск у лівому шлуночку та максимальна швидкість скорочення були збільшені на 12,6% і 18% відповідно. ЧСС була збільшена на 10% порівняно з контрольною групою, що може бути певним компенсаторним механізмом для підтримання роботи серця. І дійсно, інтенсивність скоротливої функції, яка в наших умовах відображає роботу серця, за дії глутатіону не відрізнялась від цього показника в контрольній групі. Дещо зниженою була максимальна швидкість розслаблення, і коронарний потік (на 7,4% і 15,8% відповідно). І хоча ці зміни не були достовірними, споживання

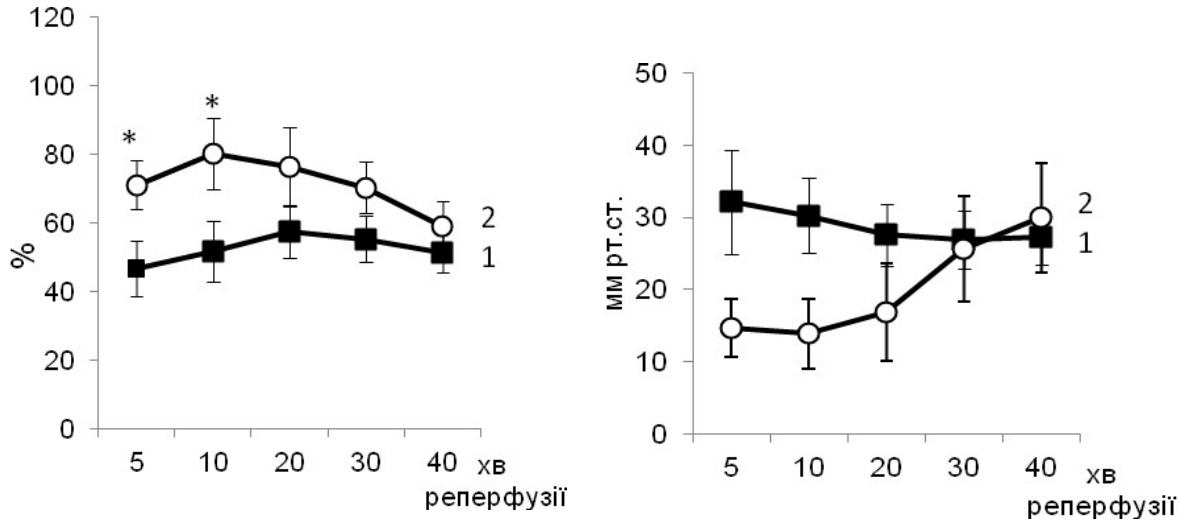
кисню та киснева вартість роботи серця були достовірно нижчі, ніж в контролі. Враховуючи те, що метаболізм міокарда старих тварин характеризується збільшеною витратою кисню на продукцію АФК, а не на процеси спряження окислення поживних речовин і фосфорилювання АДФ в мітохондріях, то можна вважати, що препарат відновленого глутатіону проявляв певні антиоксидантні властивості, зменшуючи неефективне використання кисню міокардом старих щурів. Однак, таке припущення потребує експериментального підтвердження і вимірювання маркерів окисного стресу в серцевій тканині за дії досліджуваного препарату. Внутрішньоочеревинне введення старим щурам глутатіону достовірно знижувало споживання кисню та кисневу вартість роботи серця до значень, що спостерігався у дорослих щурів (див. табл. 3.6). Тобто, можна вважати, що глутатіон проявляв антиоксидантні властивості, нівелюючи неефективне споживання кисню міокардом старих щурів.

Вплив глутатіону на відновлення функції серця старих щурів після ішемії-реперфузії.

Ішемія-реперфузія серця характеризується припиненням/зменшенням кровопостачання органа або його частини з подальшим його відновленням [195]. Такий стан може розвиватися внаслідок тимчасового звуження просвіту судин, що призводить до кисневого дефіциту та енергетичної недостатності кардіоміоцитів в ішемізованій ділянці. Це супроводжується зниженням ефективності окисного фосфорилювання, збільшенням продукції вільних радикалів кисню, дисфункцією ендотелію коронарних судин і активацією сигнальних шляхів апоптозу чи некрозу в кардіоміоцитах. Ішемія-реперфузія серця супроводжуються значними ультраструктурними порушеннями міокарда, збільшенням коронарного перфузійного тиску та порушенням ритму під час реперфузії ішемізованого серця. Також зменшується скоротлива функція серця, що проявляється в значному зниженні тиску у лівому шлуночку, першої

похідної – dP/dt, збільшенням кінцево-діастолічного тиску (КДТ) та значно повільнішим відновленням скоротливої активності серця з початку реперфузії.

Попереднє введення глутатіону дещо покращувало відновлення скоротливої функції міокарда ізольованого серця старих щурів в ранній постішемічний період. Так, на 5-й хвилині реперфузії тиск, що розвивається у лівому шлуночку становив 71% відносно вихідного рівня проти 46,8% в контрольній групі (P<0,05), а на 10-й хвилині – 80,2% проти 51,8% в контролі (P<0,05) (рис. 3.24 а).



а б

Рис. 3.24 **З**міни тиску, що розвивається (а) та кінцево-діастолічного тиску (б) улівому шлуночку під час реперфузії ішемізованого серця старих щурів в контролі, n=12 (1) та при попередній дії глутатіону, n=6 (2). *P<0,05 по відношенню до контролю відповідно до критерію Мана-Вітні.

Кінцево-діастолічний тиск на 5 хв реперфузії був значно нижчим і становив 14,6 мм рт. ст., що було вдвічі менше, ніж в контролі – 32 мм рт. ст. (рис. 3.24 б). Коронарний потік навпаки, на 5 хв реперфузії був в 1,5 рази більший, ніж в контрольній групі (P<0,05) (рис. 3.25 б).

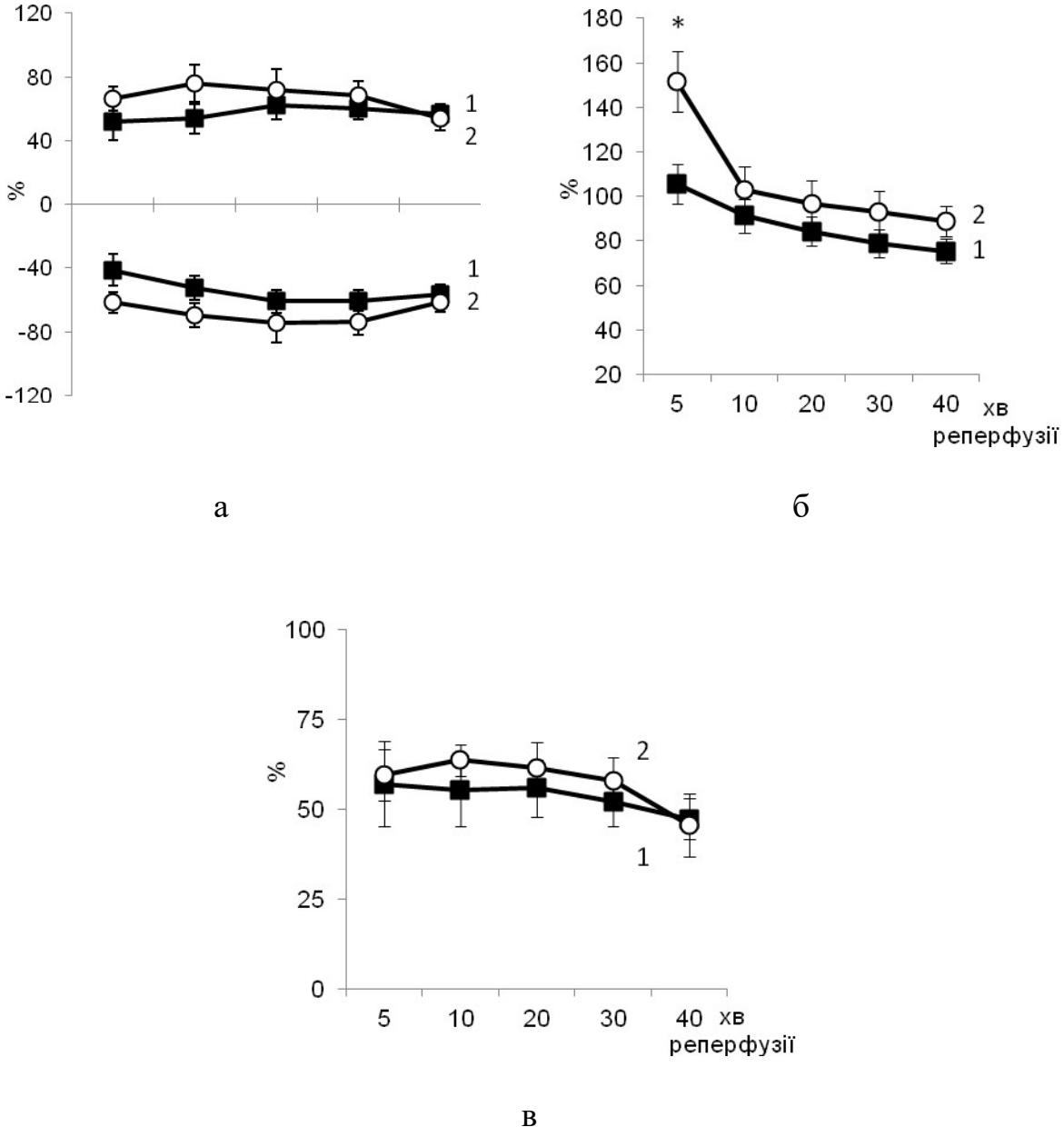
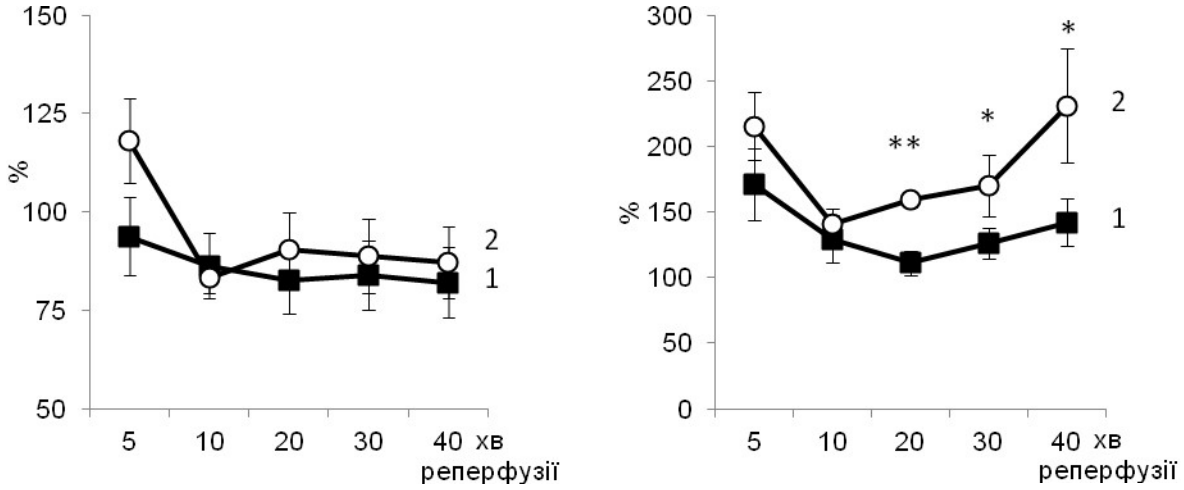


Рис. 3.25. Зміни швидкості наростання та зменшення тиску у лівому шлуночку (а), коронарного потоку (б) і інтенсивності скоротливої функції сеця (в) під час реперфузії ішемізованого серця старих щурів в контролі, n=12 (1) та при попередній дії глутатіону, n=6 (2). *P<0,05 по відношенню до контролю відповідно до критерію Мана-Вітні.

Достовірної різниці від контрольної групи ні в dP/dt міокарда (рис. 3.25 а), ні інтенсивності скоротливої функції (рис. 3.25 в) не спостерігалось ні на жодному з етапів реперфузії, хоча дещо кращою була динаміка в групі із

введенням глутатіону. Варто зазначити, що споживання кисню ішемізованим міокардом під впливом глутатіону не відрізнялось від контролю протягом всього експерименту (рис. 3.26 а), в той час як киснева вартість роботи різко зростала з 20 хв спостереження (рис. 3.26 б), що очевидно було наслідком погіршення скоротливої активності (зниження $P_{лшл}$, зростання КТД) і збільшення тонусу коронарних судин.



а б

Рис. 3.26 Зміна споживання кисню (а) і кисневої вартості роботи (б) ізольованого серця старих щурів в контролі, n=12 (1) та при попередньому введенні глутатіону, n=6 (2). *P<0,05, **P<0,01 по відношенню до контролю відповідно до критерію Мана-Вітні.

Таким чином, попереднє внутрішньоочеревинне одноразове введення старим щурам глутатіону в дозі 52 мг/кг за 1 год до початку експерименту з ішемією-реперфузією ізольованого серця спричиняє кардіопротекторні ефекти на ранній стадії реперфузії, а саме, покращення скоротливої активності міокарду (відновлення тиску в лівому шлуночку), збільшення коронарного потоку та збільшення ефективності використання спожитого кисню.

3.5.2. Дослідження кардіопротекторних ефектів у тварин з підвищеною експресією $К_{АТФ}$-каналів за дії піридоксаль-5-фосфату

Як і в серії експериментів з глутатіоном, що описані вище, у скоротливій функції дорослих і старих тварин, про що свідчить достовірне збільшення систолічного тиску в лівому шлуночці (на 47,9%) і швидкості наростання ти\ску в лівому шлуночку (на 53,3%). Водночас на 40,5% у старих тварин збільшився коронарний потік та зменшилася ЧСС (табл. 3.2).

Таблиця 3.2

Вихідні показники функціонального стану ізольованого серця експериментальних щурів до і після введення піридоксаль-5-фосфату (M±m).

	дорослі щури (n=11)	старі щури (n=11)	старі щури + PLP (n=11)
Тиск у лівому шлуночку, мм рт.ст.	98,8±5,1	146,16±8,2 ***	91,42±7,8 ###
Кінцевий діастолічний тиск, мм рт.ст.	4,98±0,9	4,86±1,0	4,28±1,3
dP/dt_{max}, мм рт.ст./с	1807±116	2770±175 ***	1670±132 ###
dP/dt_{min}, мм рт.ст./с	2109±130	2162±96	1466±123 ###
Коронарний потік, мл/хв	11,1±1,3	15,6±1,6*	12,3±0,7
Частота серцевих скорочень, уд/хв	306±14	226±16 **	210±15

Примітка: *P<0,05; ** P<0,01; *** P<0,001 відносно значень у дорослих щурів; #P<0,05; ## P<0,01; ### P<0,001 відносно значень у старих щурів.

Загальновідомо, що 20-хвилинна тотальна ішемія серця та наступна його реперфузія призводять до розвитку суттєвих порушень кардіодинаміки та

окисного метаболізму міокарда. Курсове введення PLP в наших дослідах запобігало розвитку значних ішемічно-реперфузійних порушень функції серця. Відновлення кардіодинаміки після 20 хвилин ішемії і протягом всієї реперфузії було значно кращим, ніж у старих щурів, яким не вводили PLP. Через 40 хвилин реперфузії показники відновлення функції ішемізованого серця також були значно вищими. Показано, що двотижневе введення старим щурам PLP сприяє кращому відновленню скорочувальної функції ішемізованого серця під час реперфузії (рис. 3.27-3.29).

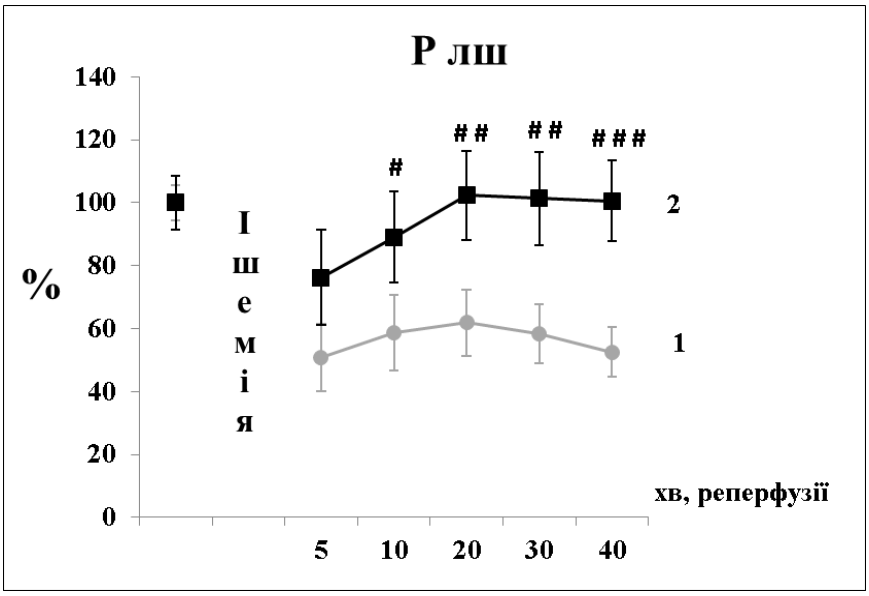


Рис. 3.27 **З**міни тиску, що розвивається у лівому шлуночку під час реперфузії ішемізованого серця старих щурів в контролі (1) та при дії піридоксаль-5-фосфату (2). $^{\#}P<0,05$, $^{\#\#}P<0,01$, $^{\#\#\#}P<0,001$ статистично достовірна різниця відносно значень у контролі.

Зокрема, відновлення тиску, що розвивається у лівому шлуночку на 5-й хвилині реперфузії становило 76 % порівняно з 50,7 % у тварин, яким не вводили PLP (див. рис. 3.27). Позитивна динаміка відновлення тиску спостерігалася до кінця експерименту і на 40-й хвилині реперфузії його величина становила 100,6% порівняно з 52,5% у контрольних щурів ($P<0,001$).

Водночас кінцево-діастолічний тиск під час всього періду реперфузії при впливі PLP був значно нижчим ніж в контролі і на 40-й хвилині реперфузії становив 9,6 ± 2,7 мм рт.ст. порівняно з 26,7 ± 5,3 мм рт.ст. у старих контрольних щурів (P<0,05) (див. рис. 3.28).

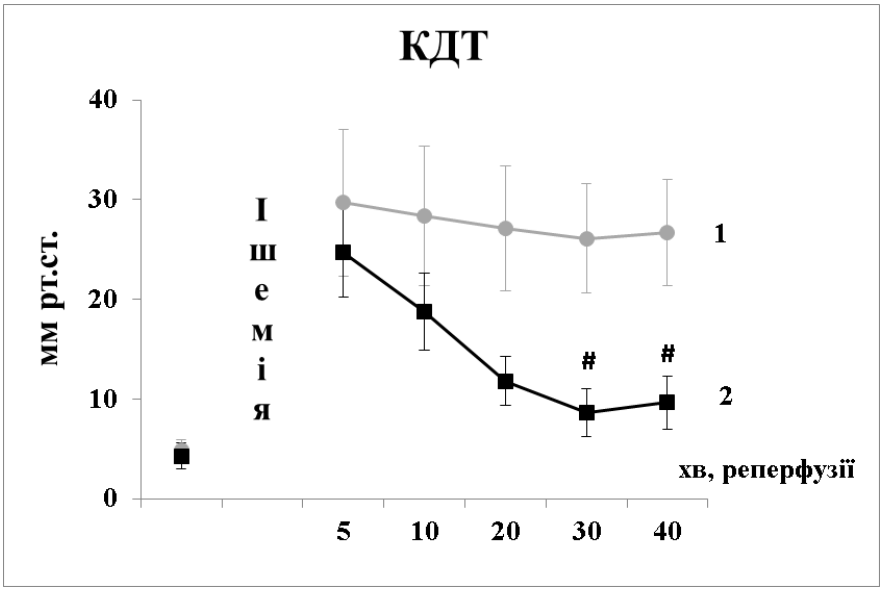


Рис. 3.28 **З**міни кінцево-діастолічного тиску у лівому шлуночку під час реперфузії ішемізованого серця старих щурів в контролі (1) та при дії піридоксаль-5-фосфату (2). $^{\#}$P<0,05, $^{\#\#}$P<0,01, $^{\#\#\#}$P<0,001 статистично достовірна різниця відносно значень у контролі.

Показники швидкості скорочення та розслаблення міокарда в умовах курсового введення PLP також були значно кращими, ніж у контрольних тварин (див. рис. 3.29. Зокрема, швидкість наростання тиску у лівому шлуночку, тобто швидкість скорочення міокарда (dP/dt_{max}), після введення PLP значно зросла: 107,9 ± 13,1% порівняно з 54,7 ± 8,4% у контрольних старих щурів на 40-ій хвилині реперфузії (див. рис. 3.29). Швидкість зменшення тиску у лівому шлуночку, тобто швидкість розслаблення міокарда (dP/dt_{min}), також була збільшена, що вказує на краще відновлення діастолічної функції міокарда: 101,9 % відносно 51,5% у старих щурів (див. рис. 3.29).

Водночас, PLP збільшував величину коронарного потоку порівняно з контрольними старими щурами (рис. 3.30). Отже, введення PLP сприяло зменшенню ішемічно-реперфузійних порушень роботи серця, що справляло позитивний ефект на його функціонування.

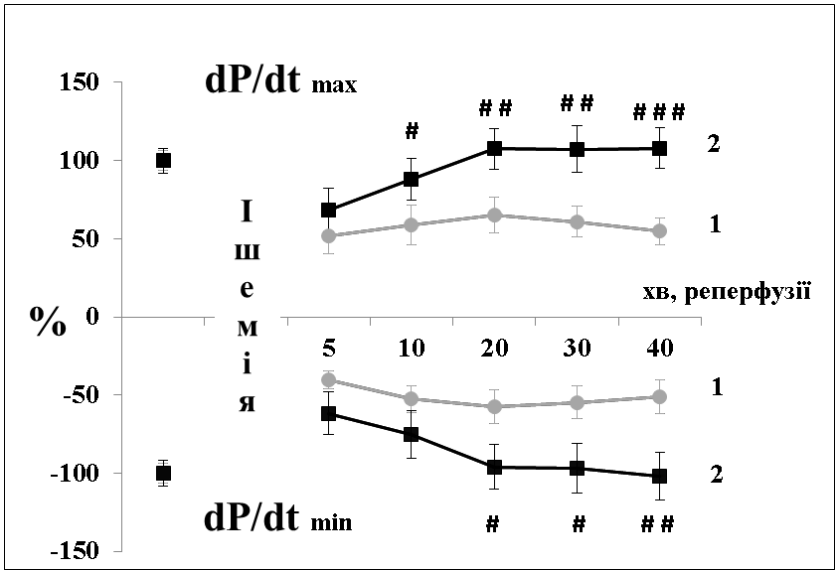


Рис. 3.29 Зміни швидкості скорочення (dP/dt_{max}) та розслаблення міокарда (dP/dt_{min}) під час реперфузії ішемізованого серця старих щурів в контролі (1) та при дії піридоксаль-5-фосфату (2). $^{\#}P<0,05$, $^{\#\#}P<0,01$, $^{\#\#\#}P<0,001$ статистично достовірна різниця відносно значень у контролі.

При ішемії-реперфузії серця відбувається перевантаження (overload) кардіоміоцитів іонами Ca^{2+}, а відновлення оксигенації під час реперфузії призводить до утворення великої кількості АФК/АФА та відкривання мітохондріальної пори (МП) [196, 197]. Crompton M. та співавт. (1987) першими зафіксували МП, як критичну детермінанту смерті кардіоміоцитів в умовах гострої ішемії-реперфузії, показавши, що виснаження АТФ, перевантаження мітохондрій кальцієм, окисний стрес і високий вміст фосфатів були ключовими чинниками відкривання МП, яка інгібується CsA [198, 199]. Потім Griffiths E.J. та Halestrap A.P. (1995) зробили важливий висновок, що МП залишався

закритою протягом ішемічного періоду і відкривався лише в перші 2-3 хв реперфузії [200]. Водночас активація $К_{АТФ}$-каналів запобігає як перевантаженню кардіоміоцитів (та інших клітин) іонами Ca^{2+}, пригнічує утворення АФК/АФА та попереджує відкривання МП [11, 201].

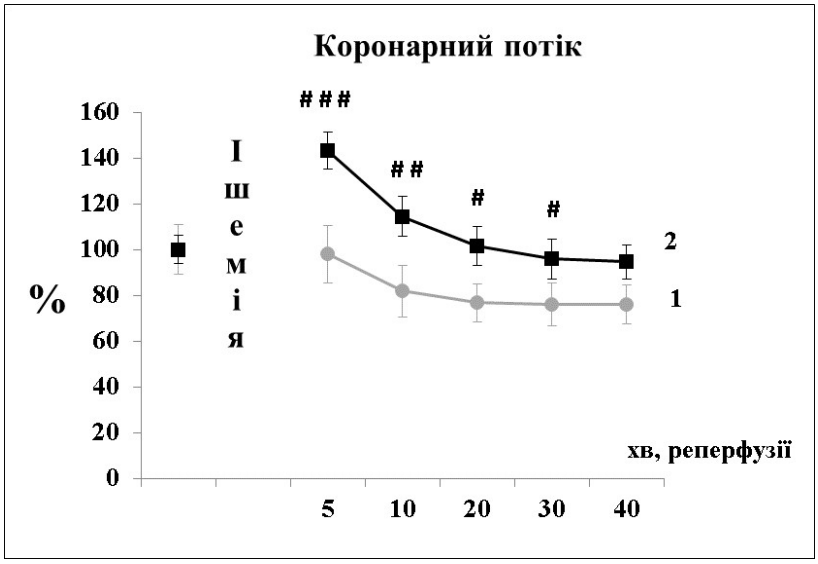


Рис. 3.30 **З**міни коронарного потоку під час реперфузії ішемізованого серця старих щурів в контролі (1) та при дії піридоксаль-5-фосфату (2). $^{\#}P<0,05$, $^{\#\#}P<0,01$, $^{\#\#\#}P<0,001$ статистично достовірна різниця відносно значень у контролі.

Для з’ясування внеску підвищеної експресії $К_{АТФ}$-каналів клітинних мембран при курсовому введення PLP в цих кардіопротекторних ефектах ми використовували специфічний блокатор $К_{АТФ}$-каналів глібенкламід. У результаті дії глібенкламіду (15 мг/кг, одноразово, внутрішньочеревинно, за 20 хв до декапітації) на тлі курсового введення PLP тиск, що розвивається у лівому шлуночку знизився вдвічі порівняно з групою без введення глібенкламіду. Цей результат спостерігався як до моделювання ішемії так і в період реперфузії (рис. 3.31). Кінцево-діастолічний тиск в цих експериментах достовірно не відрізнявся (рис. 3.32).

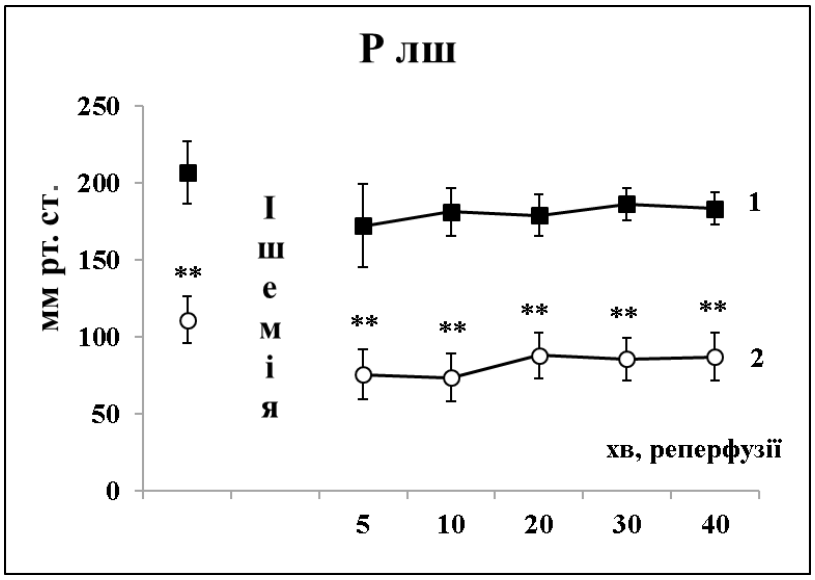


Рис. 3.31 Вплив інгібітора $К_{АТФ}$-каналів глібенкламіду на зміну тиску, що розвивається у лівому шлуночку (а) та на кінцево-діастолічний тиск (б) при ішемії-реперфузії ізольованого серця щурів підданих дії піридоксаль-5-фосфату; де 1 – PLP (контроль), 2 – PLP + гібенкламід. **P<0,01 статистично достовірна різниця відносно значень у контролі.

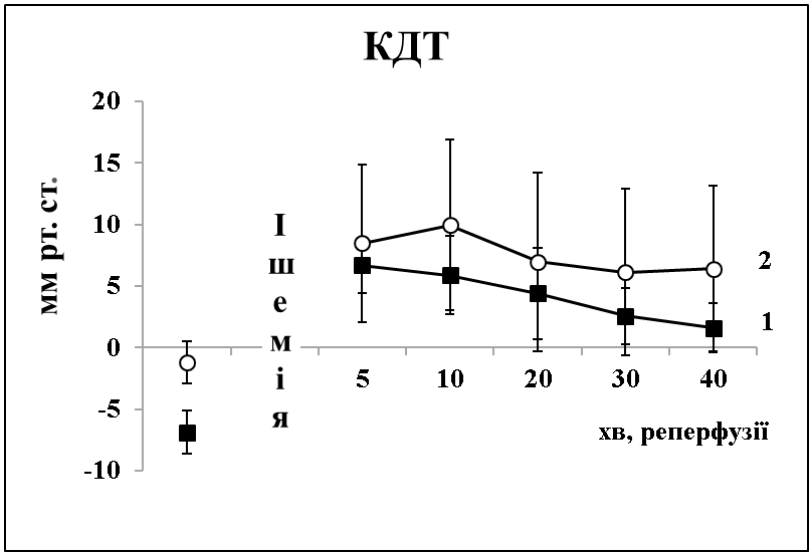


Рис. 3.32 Вплив інгібітора $К_{АТФ}$-каналів глібенкламіду (2) на кінцево-діастолічний тиск при ішемії-реперфузії ізольованого серця старих щурів підданих дії піридоксаль-5-фосфату; де 1 – PLP (контроль), 2 – PLP + гібенкламід контроль.

Швидкість наростання тиску в лівому шлуночку та швидкість зниження тиску в лівому шлуночку при інгібуванні $К_{АТФ}$-каналів глібенкламідом також значно знизилися (рис. 3.33)

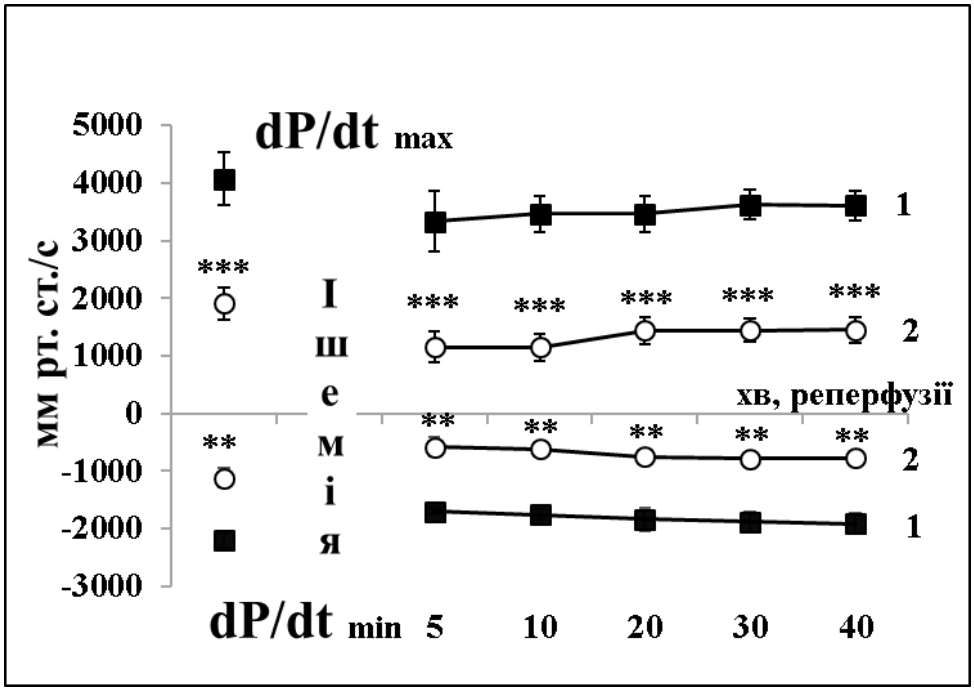


Рис. 3.33 Зміни швидкості скорочення (dP/dt_{max}) та розслаблення міокарда (dP/dt_{min}) під час реперфузії ішемізованого серця старих підданих дії піридоксаль-5-фосфату щурів без глібенкламіду (1) і після введення інгібітора $К_{АТФ}$-каналів глібенкламіду (2). **P<0,01, ***P<0,001 статистично достовірна різниця відносно значень у контролі (без дії глібенкламіду).

Як і очікувалося, глібенкламід значним чином знизив коронарний потік, що був збільшений під впливом 14-ти добового введення піридоксаль-5-фосфату (рис. 3.34).

Інтенсивність скоротливої функції серця під впливом глібенкламіду також знизилась в середньому в 2,5 раза на тлі курсового введення PLP (рис. 3.35).

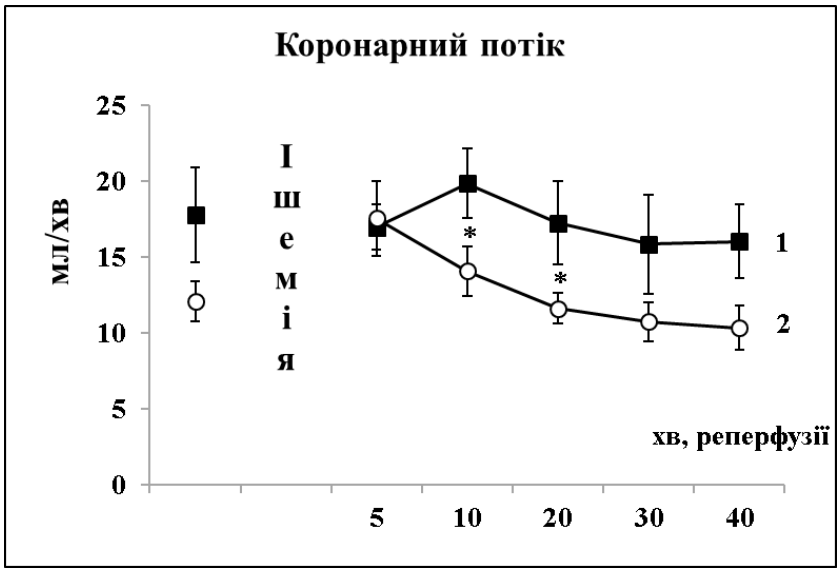


Рис. 3.34 Вплив інгібітора $К_{АТФ}$-каналів глібенкламіду на зміни коронарного потоку при ішемії-реперфузії ізольованого серця старих щурів підданих дії піридоксаль-5-фосфату; де 1 – PLP (контроль), 2 – PLP + гібенкламід. *P<0,05 статистично достовірна різниця відносно значень у контролі.

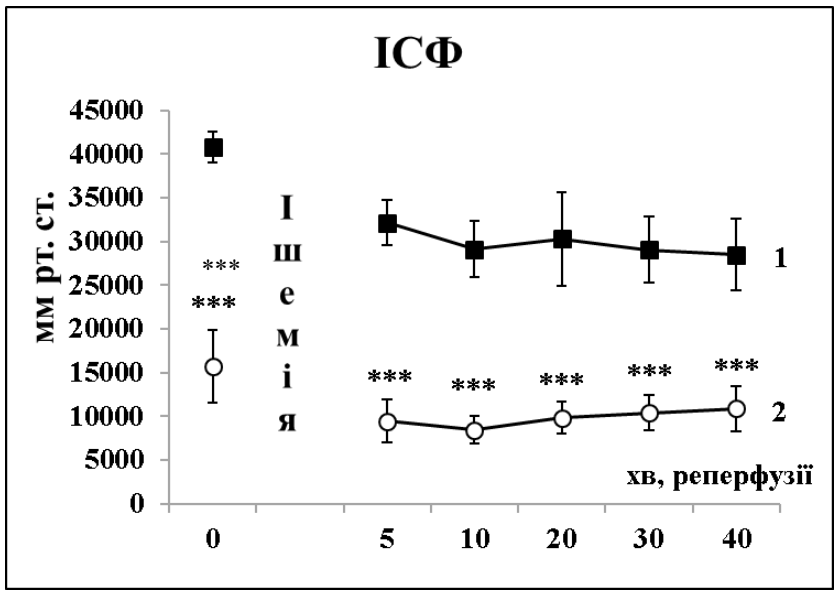


Рис. 3.35 Вплив інгібітора $К_{АТФ}$-каналів глібенкламіду на інтенсивність скоротливої функції серця при ішемії-реперфузії ізольованого серця щурів підданих дії піридоксаль-5-фосфату; де 1 – PLP (контроль), 2 – PLP + гібенкламід. ***P<0,001 статистично достовірна різниця відносно значень у контролі.

Отже, значне зменшення кардіопротекторних ефектів двотижневого введення піридоксаль-5-фосфату старим щурам при ішемії-реперфузії серця при застосуванні специфічного інгібітора $К_{АТФ}$-каналів глібенкламіду свідчить, що принаймні частково ці кардіопротекторні ефекти викликані активацією $К_{АТФ}$-каналів. Що також підтверджує дані молекулярно-генетичних досліджень про збільшення експресії $К_{АТФ}$-каналів при двотижневому введенні PLP старим щурам, що може бути однією з причин підвищення резистентності міокарда до ішемії. Введення піридоксаль-5-фосфату per os у дозі 0,7 мг/кг один раз на добу протягом 14 днів значно покращувало відновлення ішемізованого серця під час реперфузії, зокрема підвищувало скоротливу діяльність та коронарний потік. Значне зменшення кардіопротекторних ефектів піридоксаль-5-фосфату глібенкламідом свідчить, що принаймні частково ці захисні ефекти викликані активацією $К_{АТФ}$-каналів.

Таким чином, в молекулярно-генетичних дослідженнях вперше показано, що пероральне введення піридоксаль-5-фосфату у дозі 0,7 мг/кг один раз на добу протягом 14 днів, внутрішньоочеревинне введення глутатіону старим щурам у дозі 52 мг/кг за одну годину до відбирання зразків в різній ступені та залежно від віку тварин можуть підвищувати експресію мРНК генів KCNJ8, KCNJ11, ABCC8 та ABCC9, що кодують пороутворюючі Kir6.1 і Kir6.2, та регуляторні SUR1 і SUR2 субодиниці $К_{АТФ}$-каналів, як кардіоспецифічних $К_{АТФ}$-каналів серцевого, так і судинного типу, як сарколемальних, так і мітохондріальних клітинних мембран. Водночас, підвищення щільності згаданих мембранних каналів може змінювати фенотип серця, посилюючи резистентність (стійкість) серця до патологічних впливів ішемічної природи, що нами і було підтверджено на попередньому етапі роботи в експериментах з ішемією-реперфузією ізольованого серця щурів.

Зокрема, було показано, що у тварин із збільшеною експресією Kir6.1 та SUR2 субодиниць $К_{АТФ}$-каналів за допомогою піридоксаль-5-фосфату відновлення скоротливої діяльності та коронарного потоку під час реперфузії ішемізованого серця було значно кращим, ніж в контрольних тварин. А саме,

тиск у лівому шлуночку на 5-ту хвилину реперфузії відновлювався на 50% краще ніж в контрольній групі тварин. На кінець реперфузії (40 хв) цей показник вже був майже вдвічі, а кінцево-діастолічний тиск майже втричі краще, ніж в контрольній групі. Пригнічення цих ефектів специфічним інгібітором $К_{АТФ}$-каналів глібенкламідом свідчить, що принаймні частково ці захисні ефекти викликані активацією $К_{АТФ}$-каналів.

В експериментах з ішемією-реперфузією ізольованого серця щурів з підвищеною експресією Kir6.1 і Kir6.2 субодиниць $К_{АТФ}$ каналів за допомогою глутатіону відновлення ішемізованого серця було достовірно кращим, ніж в контрольній групі тварин лише на ранній стадії реперфузії. Зокрема, тиск у лівому шлуночку на 5-ту і 10-ту хвилини реперфузії відновлювався на 52 та 55% краще ніж в контрольній групі тварин. Кінцево-діастолічний тиск на 5-ту хв реперфузії був вдвічі нижче, а коронарний потік, навпаки, в 1,5 раза більший, ніж в контрольній групі. Також у модифікованих тварин відбувалося збільшення ефективності використання спожитого кисню.

3.6. Дослідження біохімічних показників, що характеризують окисний стрес та систему оксиду азоту у тварин з підвищеною експресією $К_{АТФ}$-каналів

3.6.1. Дослідження біохімічних показників, що характеризують окисний стрес та систему оксиду азоту за дії піридоксаль-5-фосфату.

3.6.1.1. Дослідження впливу піридоксаль-5-фосфату на показники окисного стресу та систему оксиду азоту у мітохондріях серця старих щурів.

На моделі щурів з підвищеною експресією $К_{АТФ}$-каналів було визначено вміст ендогенного синтезу H_2S і відновлення його пулів у мітохондріях серця старих тварин. Порушення синтезу сірководню характерні для розвитку таких патологічних станів як гіпертензія, атеросклероз, діабет, серцева недостатність, нейродегенеративні захворювання та ін. [202-204]. Тим паче, що більшість цих

патологічних станів характерні і частіше всього розвиваються у старих організмів, у яких синтез сірководню суттєво знижений [205, 206]. У наших дослідженнях показано, що вміст H_2S у мітохондріях зменшується з віком (рис.3.36).

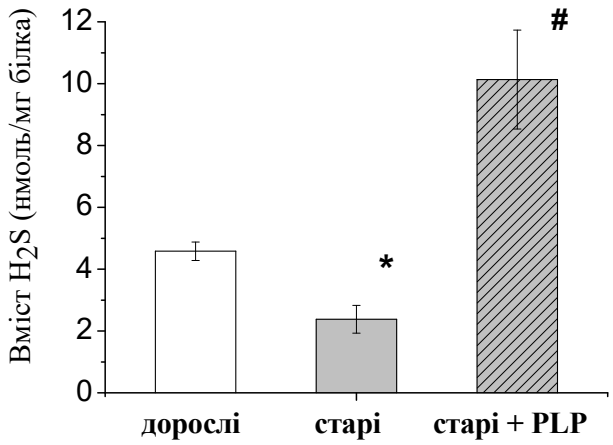


Рис. 3.36 Вміст H_2S у мітохондріях серця старих щурів після курсового введення піридоксаль-5-фосфату (PLP). *P<0,05 статистично достовірна різниця відносно значень у дорослих щурів; $^{\#}$P <0,05 статистично достовірна різниця відносно значень у старих щурів.

Встановлено, що у мітохондріях серця старих щурів він виявився у 1,9 раза нижче (2,38±0,45 нмоль/мг), ніж у дорослих щурів (4,58±0,3 нмоль/мг, P<0,05) (рис. 3.36). Застосування PLP призводило до зростання вмісту сірководню у мітохондріях серця у 4,2 раза (10,13±1,6 нмоль/мг білка у старих тварин після дії PLP, P<0,05) порівняно зі старими тваринами. Таким чином, ми спостерігали відновлення синтезу ендогенного сірководню у старих тварин, ймовірно, за рахунок активації H_2S-синтизуючих ферментів кофактором PLP.

Отже, курсове введення PLP відновлювало синтез ендогенного сірководню у мітохондріях серця старих щурів, що, безумовно, має позитивний вплив на функціонування органел.

Активні форми кисню, азоту та сірки являють собою продукти нормальної функції клітин та їх реакції на різноманітні стимули. Дисбаланс цих проміжних продуктів обміну речовин призводить до такого відомого феномену, як оксидативно-нітрозативний стрес, за якого вільні радикали можуть пошкоджувати різні біомолекули, призводячи до порушень функції органів та їх систем. У тканині серцево-судинної системи цей процес є характерним для старих організмів і, як наслідок, вільно-радикальна теорія старіння є домінуючою протягом багатьох років [207, 208].

До найбільш токсичних вільних радикалів відносять $^{\bullet}O_2^-$, H_2O_2, $^{\bullet}OH$, синглетний кисень і пероксинітрит ($ONOO^-$). Основними джерелами утворення $^{\bullet}O_2^-$, як ініціатора оксидативного стресу, є комплекси I і III дихального ланцюга мітохондрій, НАДФН- і ксантиноксидаза, неспряжена cNOS, цикло- і ліпооксигеназа [209]. Утворений $^{\bullet}O_2^-$ за дії супероксиддисмутази дисоціює у H_2O_2, метаболізм якого відбувається двома шляхами: нетоксичним за участі каталази з утворенням H_2O і O_2 і токсичним у реакції Фентона з утворенням $^{\bullet}OH$ [210]. Як відомо, останній ініціює перекисне окиснення ліпідів (ПОЛ), розпад яких призводить до появи різноманітних вторинних і кінцевих продуктів, а саме ДК і МДА. У разі одночасної надмірної продукції $^{\bullet}O_2^-$ і NO, що спостерігається, зокрема, при неспряженій cNOS та підвищеній активності iNOS, вони взаємодіють із утворенням високотоксичного $ONOO^-$.

Відмо про кардіопротекторні властивості $К_{АТФ}$-каналів, які зумовлені, зокрема, їх здатністю пригнічувати оксидативно-нітрозативний стрес і розвиток апоптозу. Для з'ясування конкретних механізмів у серцево-судинній системі старих щурів за умов дії PLP, ми визначили біохімічні показники, які характеризують наявність оксидативно-нітрозативного стресу та конститутивного синтезу NO у мітохондріях серця старих щурів за цих умов.

Як видно з табл. 3.4, рис. 3.37 та рис. 3.38 більшість показників оксидативного стресу у мітохондріях при старінні були більшими від контрольних значень, або мали тенденцію до зростання, що свідчить про посилення вільнорадикальних процесів. Так, швидкості генерації нестабільних

активних форм кисню, а саме $^{\bullet}O_2^-$, як результат функціонування ксантиноксидази, НАДФН-оксидази, чи дихального ланцюга мітохондрій, а також $^{\bullet}OH$ збільшувалися при старінні у 4 і 2,7 раза відповідно у мітохондріях серця. Підвищувався також вміст стабільного H_2O_2 порівняно з контролем (див. рис. 3.19).

Таблиця 3. 4

Швидкість генерації $^{\bullet}O_2^-$, $^{\bullet}OH$-радикалів і пули стабільного H_2O_2 та маркерів перекисного окиснення ліпідів в мітохондріях серця старих щурів за дії піридоксаль-5-фосфату (PLP) (M±m, n=9).

Показники	дорослі щурі	старі щурі	старі щурі + PLP
Швидкість генерації $\bullet O_2^-$, *ум.од.*	4,46±0,41	17,54±4,44*	5,06±1,76 #
Пули H_2O_2, *пмоль/мг білка*	12,2±1,6	25,71±3,18*	8,3±1,83 #
Швидкість генерації $^{\bullet}OH$, *ум. од.*	4,2±0,35	11,34±1,97*	8,7±2,16
Малоновий діальдегід, *нмоль/мг білка*	2,06±0,38	5,61±0,48*	1,85±0,28 #
Дієнові кон'югати, *нг/мг білка*	3,6±0,23	32,98±2,5*	11,94±2,01 #

Примітка: *P<0,05 статистично достовірно відносно значень у дорослих щурів; #P <0,05 статистично достовірно відносно значень у старих щурів.

Показано, що в умовах застосування PLP швидкість генерації $^{\bullet}O_2^-$ знижувалася у 3,5 раза порівняно з таким у старих тварин. Зокрема, вміст H_2O_2 після дії PLP був нижчим у 3,1 раза порівняно з контрольними значеннями. Швидкість утворення найбільш активного радикала кисню – $^{\bullet}OH$, який є продуктом деградації H_2O_2 в реакції Фентона, після модуляції синтезу H_2S знижувалася в 1,3 раза порівняно зі значеннями у старих щурів (див. рис. 3.37).

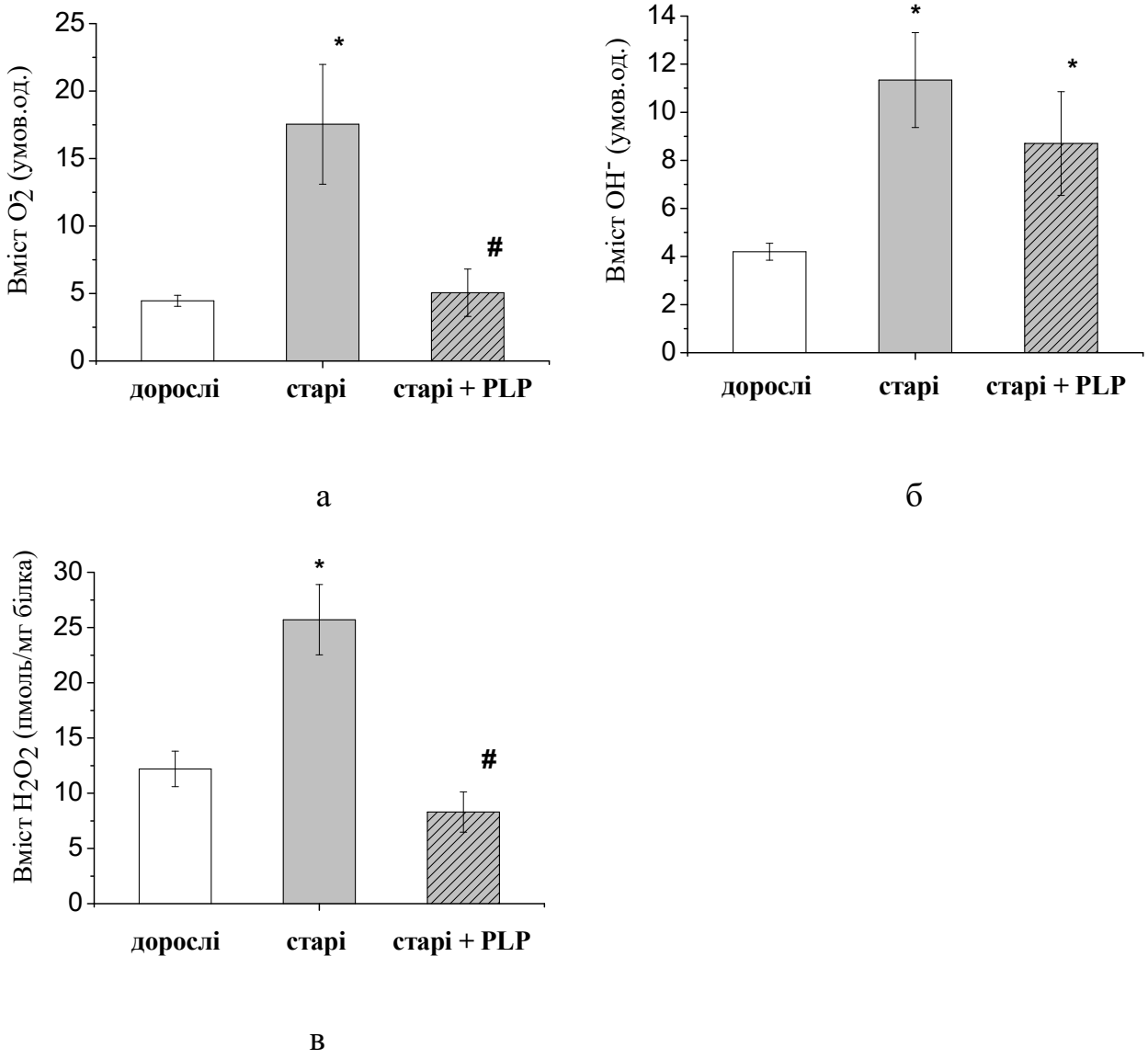
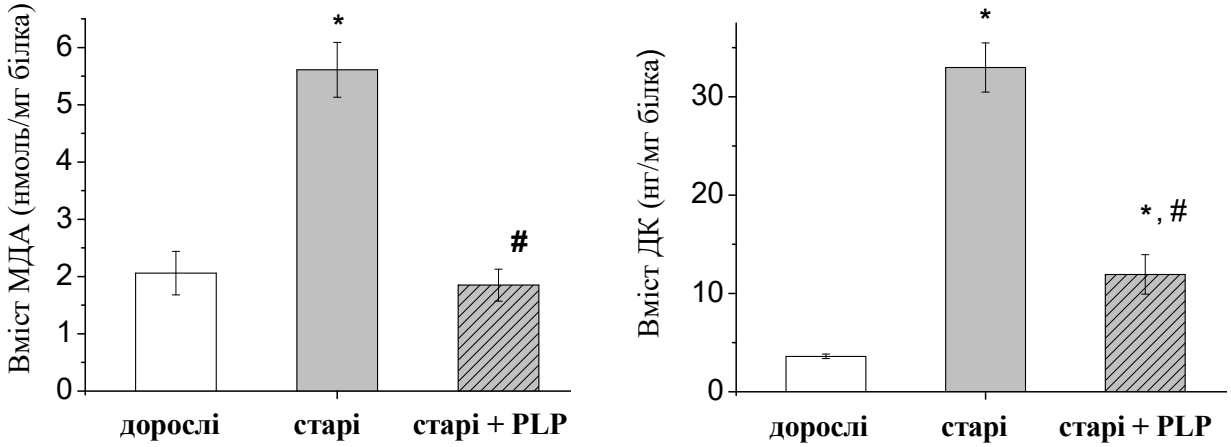


Рис. 3.37 Вплив піридоксаль-5-фосфату (PLP) на вміст у мітохондріях серця старих щурів таких показників оксидативного стресу, як супероксид аніон (а), $^{\bullet}OH$-радикал (б) і пероксид водню (в). *P<0,05 статистично достовірна різниця відносно значень у дорослих щурів; #P<0,05 статистично достовірна різниця відносно значень у старих щурів.

Ще одним проявом антиоксидантної дії PLP може бути зменшення вмісту продуктів ПОЛ – сполук ДК та МДА (див. рис. 3.38). Ці речовини не лише негативно впливають на мембрани, але й ініціюють мітохондіальний процес

апоптозу, що призводить до пошкодження клітин внаслідок відкривання МП. У мітохондріях серця при старінні ми отримали збільшення в 9,2 раза вмісту ДК та в 2,7 раза МДА щодо контролю.



а б

Рис. 3.38 Вплив піридоксаль-5-фосфату (PLP) на вміст у мітохондріях серця старих щурів малонового диальдегіду (а) та дієнових кон'югатів (б). *P<0,05 статистично достовірна різниця відносно значень у дорослих щурів; #P<0,05 статистично достовірна різниця відносно значень у старих щурів.

Введення PLP достовірно зменшувало у 2,7 і 3 рази пули ДК та МДА порівняно з такими при старінні (див. рис. 3.38), що свідчить про потужний протекторний ефект $К_{АТФ}$-каналів та пригнічення утворення ініціаторів ПОЛ – $^{\bullet}OH^{-}$ та $^{\bullet}NO_2^{-}$-радикалів.

У старих тварин вірогідно не відрізнялися від контрольних значень пули тромбоксану $В_2$, які характеризують активність циклооксигеназного метаболічного шляху продукції $^{\bullet}O_2^{-}$ та пули ейкозаноїдів пептидолейкотриєну $С_4$, як маркера утворення $^{\bullet}O_2^{-}$ ліпоксигеназою із залученням потужного антиоксиданта глутатіону (табл. 3.7). Пули сечової кислоти, як кінцевого продукту обміну пуринів, які характеризують активність ксантиноксидази в

мітохондріях зростали на порядок, що засвідчує інтенсифікацію вільнорадикальних процесів (табл. 3.7, рис. 3.39).

Таблиця 3.7

Зміни пулів маркерів ферментативного утворення $\dot{O}_2^-$ в мітохондріях серця старих щурів за дії піридоксаль-5-фосфату, (M±m, n=9).

Показники	дорослі щурі	старі щурі	старі щурі + PLP
Тромбоксан B_2, *пмоль/мг білка*	2,37±0,16	2,62±0,33	0,62±0,13#
Лейкотрієн C_4, *пмоль/мг білка*	1,26±0,12	1,35±0,15	0,41±0,08#
Сечова кислота, *нмоль/мг білка*	1,19±0,26	14,18±1,27*	6,03±0,47#

Примітка: *P<0,05 статистично достовірна різниця відносно значень у дорослих щурів; #P <0,05 статистично достовірна різниця відносно значень у старих щурів.

Введення PLP знижувало у 3,3 раза пули LTC_4 і в 2,3 раза (порівняно зі значенням у старих тварин) пули сечової кислоти, які характеризують активність ксантиноксидази і одночасно є маркером гіпоксії та деградації АТФ. Вміст TxB_2 знижувався у 4,3 раза за дії кофактора синтезу H_2S (див. рис. 3.39). Зменшення продукції LTC4 і TxB2 може свідчити про пригнічення активності ферментів ліпооксигенази, циклооксигенази і, як результат, призводити до зниженого утворення супероксид-аніона.

Слід відмітити значне зниження майже втричі пулів вільної арахідонової кислоти, що в умовах стабільного її окислення у мітохондріях серця старих щурів свідчить про порушення її утворення фосфоліпазою А. В умовах дії піридоксаль-5-фосфату вміст арахідонової кислоти достовірно зростав і наближався до значень контролю в групі дорослих щурів (рис. 3.40). Таким чином, застосування PLP для стимуляції експресії субодиниць $К_{АТФ}$-каналів

призводив до пригнічення оксидативного стресу і ПОЛ у мітохондріях серця старих тварин.

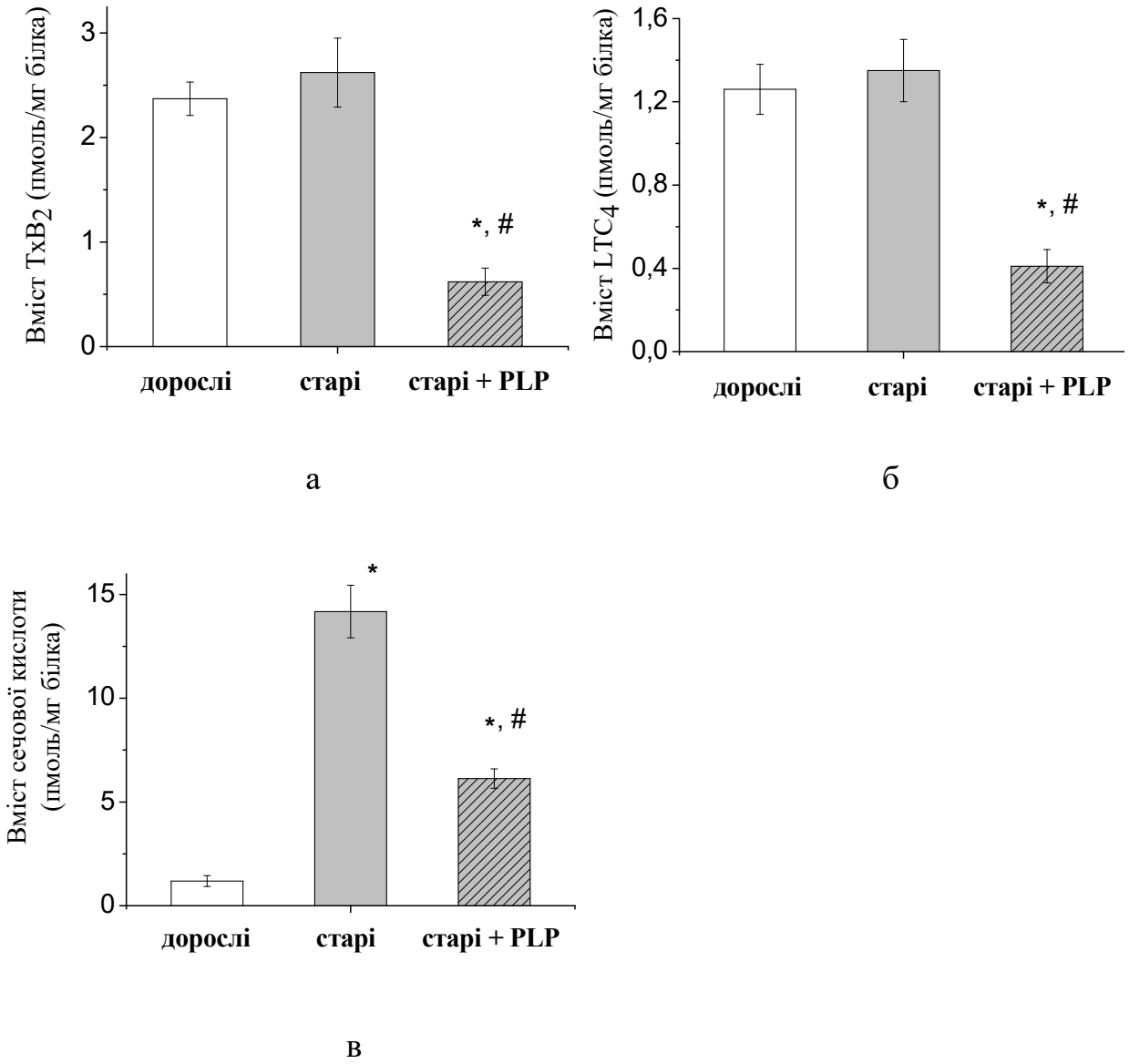


Рис. 3.39 Зміни пулів маркерів ферментативного утворення супероксид аніону ($O_2^{\bullet-}$) у мітохондріях серця старих щурів за дії піридоксаль-5-фосфату (PLP) тромбоксану B_2 (а), лейкотриєну C_4 (б) та пулів сечової кислоти (с). *P<0,05 статистично достовірна різниця відносно значень у дорослих щурів; #P<0,05 статистично достовірна різниця відносно значень у старих щурів.

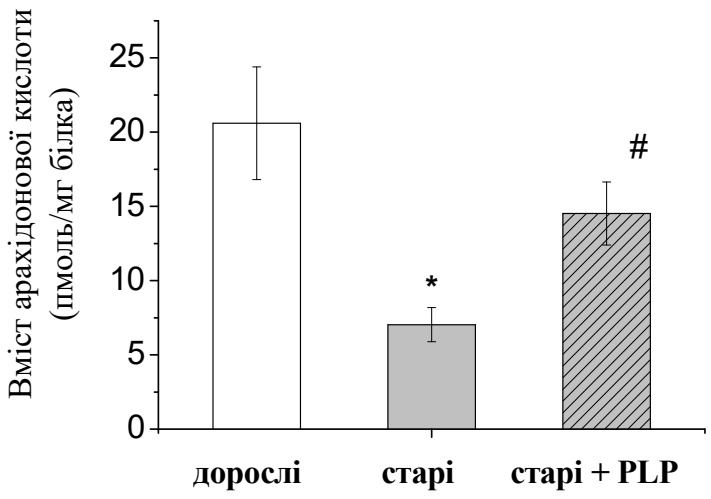


Рис. 3.40 Вміст арахідонової кислоти у мітохондріях серця старих щурів за дії піридоксаль-5-фосфату. *P<0,05 статистично достовірна різниця відносно значень у дорослих щурів; #P<0,05 статистично достовірна різниця відносно значень у старих щурів.

Як видно з табл. 3.8, при старінні в мітохондріях серця значно знижувалися активність cNOS, яку ідентифіковано як мітохондріальну NOS (mtNOS), пули NO_2^- і низькомолекулярних нітрозотіолів (P<0,05). Зростання активності нітратредуктази – НАДН-залежного ензиму, що відновлює нітрати до нітритів, може свідчити про компенсаторне підвищення реутилізаційного синтезу NO. Відомо, що NO трансформується в такі стабільні метаболіти, як нітрит- та нітрат-аніони [211]. Вміст цих метаболітів відображає стан окисного обміну аргініну в кардіоміоцитах. Спонтанним продуктом окиснення NO за фізіологічних умов при нормальній оксигенації (нормоксії) є NO_2^-. Встановлено, що в мітохондріях серця старих щурів пули NO_2^-, що є маркером доступності кисню для спонтанного неферментативного окиснення NO, знижуються втричі. При цьому пули NO_3^- що є маркером утворення і розпаду пероксинітриту, не змінювалися. Це свідчить про підвищення в умовах окисного стресу утилізації NO, що посилено синтезувався ферментом iNOS, не

на спонтанне окиснення молекулами кисню до аніонів нітриту, а на утворення пероксинітриту і його вільнорадикальний розпад, на що вказує відсутність достовірного підвищення мітохондріальних пулів аніонів нітрату.

Таблиця 3.8.

Зміна активності ферментів синтезу NO, аргінази та вмісту нітрит, нітрат аніонів та низькомолекулярних нітрозотіоліл в мітохондріях серця старих щурів за дії піридоксаль-5-фосфату (M±m, n=9).

Показники	дорослі щурі	старі щурі	старі щурі + PLP
mtNOS, *пмоль/хв. мг білка*	3,64±0,27	1,71±0,12*	3,28±1,15#
Нітратредуктаза, *пмоль/хв. мг білка*	0,86±0,05	2,77±0,45*	0,64±0,11#
Аргіназа, *пмоль/хв. мг білка*	2,11±0,17	8,78±1,05*	3,02±0,9#
NO_2^-, *пмоль/мг білка*	488,2±60,3	159,33±30,68*	575,88±83,01#
NO_3^-, *нмоль/мг білка*	76,3±4,1	83,41±11,72	45,33±4,07#
Низькомолекулярні нітрозотіоли, *пмоль/мг білка*	735,24±84,9	375,66±26,03*	1210,18±72,96#

Примітка; *P<0,05 статистично достовірна різниця відносно значень у дорослих щурів; #P<0,05 статистично достовірна різниця відносно значень у старих щурів.

Пероральне введення старим тваринам протягом 14 днів піридоксаль-5-фосфату у дозі 0,7 мг/кг один раз на добу призводило до підвищення активності mtNOS у мітохондріях серця у 1,9 раза (P<0,05) (рис. 3.41 а, табл. 3.8).

Активність нітратредуктази, ферменту, що забезпечує відновлення метаболітів NO – NO_3^- і NO_2^-, знижувалася у 4,3 раза (див. рис. 3.41 б) і, як результат, зменшувалася в 1,8 раза концентрація NO_3^- (рис. 3.24 б).

Значно у мітохондріях серця старих щурів за дії піридоксаль-5-фосфату знижувалася також активність ферменту аргінази – у 2,91 раза (P<0,05) (рис. 3.41 в).

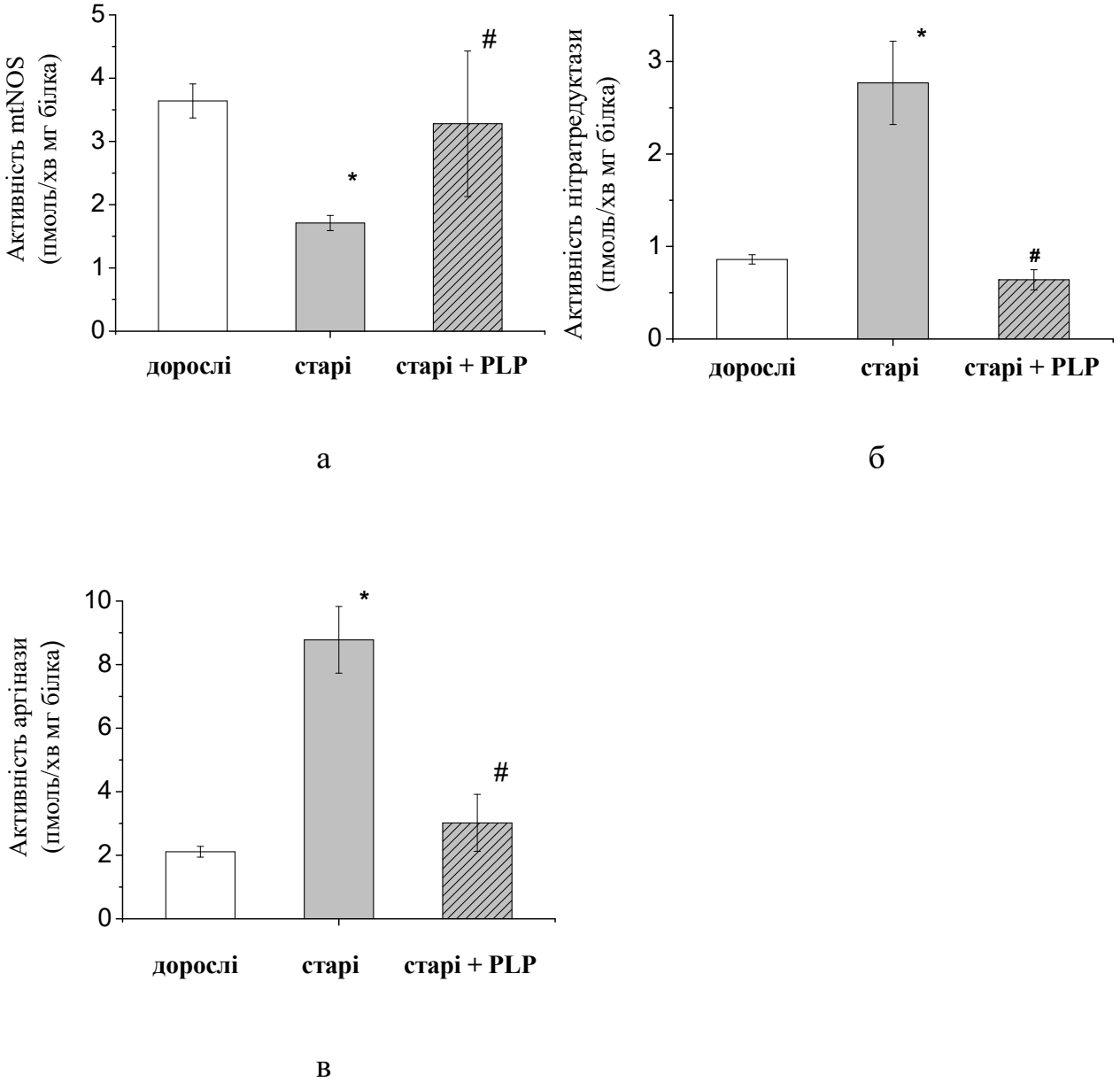


Рис. 3.41 Зміна активності mtNOS (а), нітратредуктази (б) та аргінази (в) у мітохондріях серця старих щурів за дії піридоксаль-5-фосфату. *P<0,05 статистично достовірна різниця відносно значень у дорослих щурів; #P<0,05 статистично достовірна різниця відносно значень у старих щурів.

Вміст NO_2^- який утворюється спонтанно при окисненні NO лише в оксигенованих розчинах, зростав при курсовому введенні піридоксаль-5-фосфату у 3,6 раза порівняно зі значеннями у старих тварин (рис. 3.42 а).

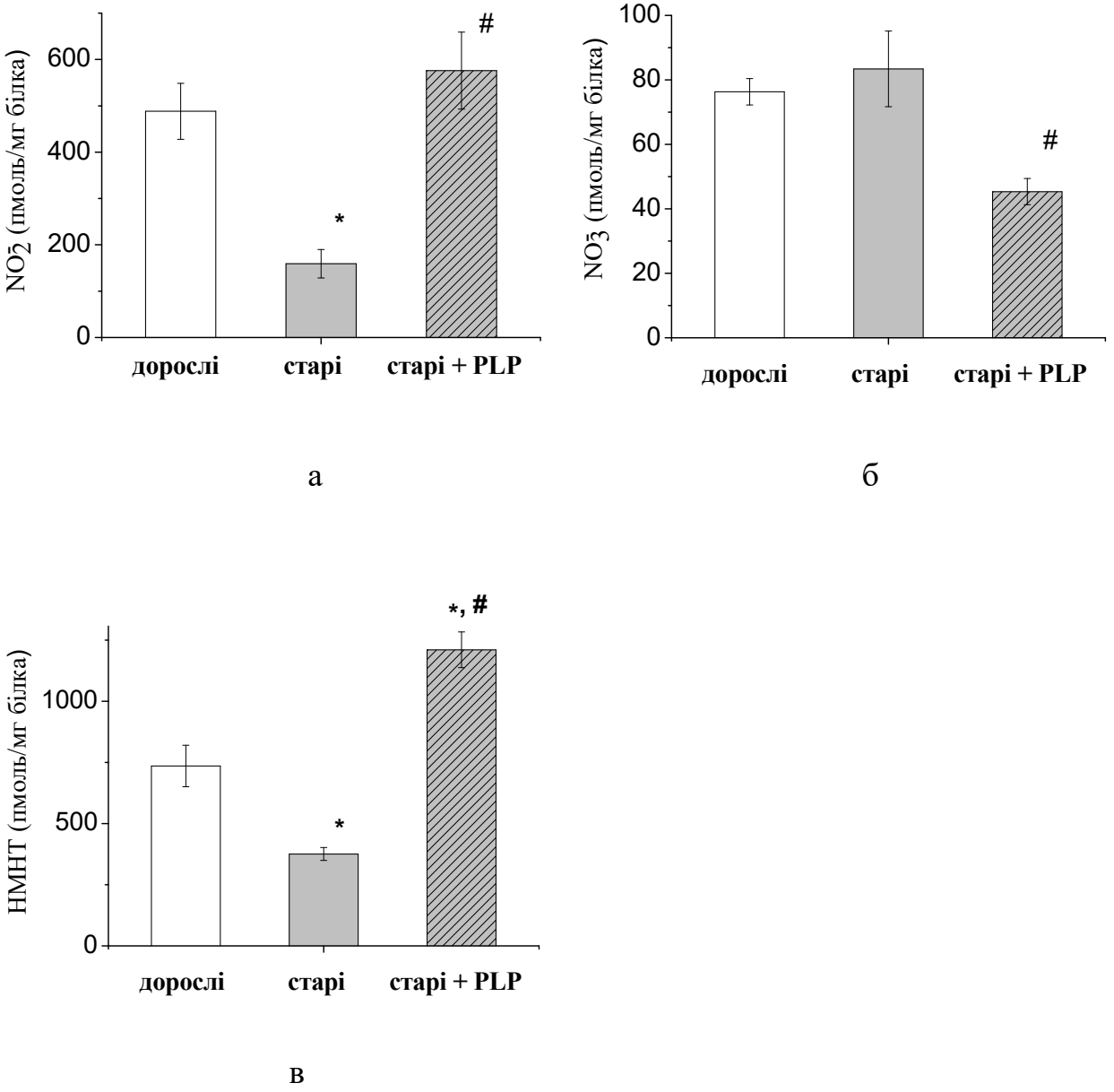


Рис. 3.42 Зміна вмісту нітрит (а) та нітрат (б) аніонів, та низькомолекулярних нітрозотіоліл (в) у мітохондріях серця старих щурів за дії піридоксаль-5-фосфату. *P<0,05 статистично достовірна різниця відносно значень у дорослих щурів; #P<0,05 статистично достовірна різниця відносно значень у старих щурів.

Пули НМНТ у мітохондріях старих тварин знижувалися вдвічі (див. рис. 3.42 в). Цей комплекс включає три компоненти: нітрозильовану амінокислоту L-цистеїн, що є попередником de novo синтезу H_2S, нітрозоглутатіон (GSNO), що містить у своєму складі L-цистеїн, і нітрозильований сірководень (HSNO). НМНТ беруть участь у транспортуванні і депонуванні NO з вивільненням останнього в процесі декомпозиції. Зниження цих пулів характеризує зменшення інтенсивності процесів нітрозилювання (включення NO) і декомпозиції (вивільнення NO). За дії PLP пули НМНТ збільшувалися в мітохондріях у 3,2 раза (див. рис. 3.42 в).

Також нами було показано, що у мітохондріях серця в умовах старіння суттєво знижувалися значення індексу спряження cNOS. У результаті застосування PLP спостерігалось відновлення спряження cNOS, що супроводжується пригніченням оксидативно-нітрозативного стресу у мітохондріях серця старих щурів. Про це свідчить зростання розрахованого нами індексу спряження до значень 0,73±0,38 ум. од. порівняно зі 0,083±0,02 ум. од у старих тварин ($P<0,01$).

Цей індекс характеризує наявність субстратів (L-аргінін, O_2) і кофактора тетрагідробіоптерину для утворення NO, а не $^{\bullet}O_2^-$ при окисному метаболізмі L-аргініну. Вважається [212], що будь-яке підвищення генерації $^{\bullet}O_2$ (мітохондріями, ксантиноксидазою чи НАДФН-оксидазою) спричиняє неспряження cNOS. Внаслідок цього ізоферменти конститутивного *de novo* синтезу NO (eNOS і nNOS) продукують $^{\bullet}O_2^-$ замість NO, тим самим утворюючи замкнуте коло взаємопідсилення окисного стресу і неспряження cNOS. Отже, старіння характеризується неспряженим станом cNOS на тлі окисного і нітрозотивного стресу. Таке неспряження конститутивних NO-синтаз було показано при гіпертензії, що супроводжувалося порушення кардіогемодинаміки [213].

Ми припустили, що причиною відновлення спряженого стану cNOS стало не лише пригнічення окидативного стресу, але й збільшення біодоступності L-

аргініну, субстрату синтезу NO, у результаті зниження активності аргінази в 2,9 раза порівняно зі старими тваринами (табл. 3.8).

Отримані результати свідчать про те, що у разі активації експресії субодиниць $К_{АТФ}$-каналів пригнічувався нітрозативний стрес, одночасно відновлювався спряжений стан cNOS і конститутивний синтез оксиду азоту у мітохондріях старих щурів.

3.6.1.2. Визначення впливу піридоксаль-5-фосфату на показники окисного стресу та систему оксиду азоту у тканинах серця старих щурів.

Показано, що вміст H_2S у тканинах серця істотно зменшується з віком (рис. 3.43). Так, у тканинах серця старих щурів вміст H_2S був удвічі нижчим, ніж у дорослих щурів (12,1±1,47 нмоль/мг білка порівняно з 22,97±4,13 нмоль/мг білка відповідно, $P<0,05$). Застосування PLP призводило до зростання вмісту сірководню до 26,35±2,18 нмоль/мг білка у тканинах серця старих тварин (див. рис. 3.43). Таким чином, ми спостерігали відновлення синтезу ендогенного сірководню у старих тварин.

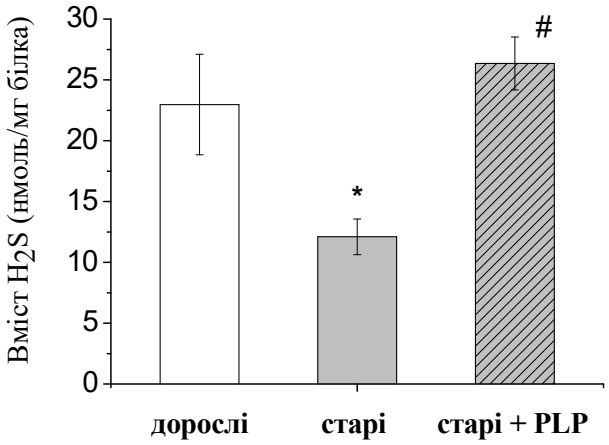


Рис. 3.43 Вміст H_2S у тканинах серця старих щурів після курсового введення піридоксаль-5-фосфату (PLP). *$P<0,05$ статистично достовірна різниця відносно значень у дорослих щурів; #$P<0,05$ статистично достовірна різниця відносно значень у старих щурів.

Встановлено, що більшість показників оксидативного стресу в тканинах серця у старих щурів були також вищими від контрольних значень, що свідчить про посилення у серці вільнорадикальних процесів (табл. 3.9, рис. 3.44). Так, швидкість генерації $^{\bullet}O_2^-$ в тканинах серця при старінні була вищою у 4 рази від контрольних значень, а після застосування PLP показник знижувався утричі відповідно до значень у старих тварин (див. рис. 3.44 а). Дисмутація нестабільного радикала $^{\bullet}O_2^-$ в стабільний H_2O_2 при старінні перевищувала контрольні значення у 1,4 раза, а за дії PLP ці значення знижувалися до контрольних (див. рис. 3.44 б). Вміст $^{\bullet}OH$-радикала в тканинах серця старих щурів порівняно з контролем був у 4 рази вищим, ніж у дорослих тварин, а після активації ендогенного синтезу H_2S PLP цей показник знижувався в 1,8 раза (див. рис. 3.44 в).

Таблиця 3.9

Вміст маркерів оксидативного стрессу, а також тромбоксану B_2, лейкотрієну C_4 та пулів сечової кислоти в тканинах серця старих щурів за дії піридоксаль-5-фосфату (M±m, n=9).

Показники	дорослі щурі	старі щурі	старі щурі + PLP
Швидкість генерації $\bullet O_2^-$, *ум.од.*	3,49±0,59	12,98±2,02*	4,19±0,75#
Пули H_2O_2, *пмоль/мг білка*	2,79±0,35	3,96±0,36	2.55±0,69
Швидкість генерації $^{\bullet}OH$, *ум. од.*	0,87±0,09	3,54±0,52*	1,9±0,34#
Дієнові кон'югати, *нг/мг білка*	3,4±0,47	28,52±2,28*	7,8±0,5#
Малоновий діальдегід, *нмоль/мг білка*	3,75±0,43	27,23±1,86*	13,8±2,25#
Тромбоксан B_2, *пмоль/мг білка*	2,25±0,2	2,4±0,46	1,46±0,18#
Лейкотрієн C_4, *пмоль/мг білка*	0,9±0,02	0,98±0,16	0,62±0,29#
Сечова кислота, *нмоль/мг білка*	1,98±0,38	5,12±0,5*	2,82±0,97#

Примітка: *P<0,05 статистично достовірно відносно значень у дорослих щурів; #P <0,05 статистично достовірно відносно значень у старих щурів.

Про обмеження оксидативного стресу при старінні за дії PLP можуть свідчити також зміни вмісту продуктів неферментативного (ДК та МДА) та ферментативного (LTC_4 і TxB_2) окиснення ліпідів (табл. 3.9). У тканинах серця при старінні ми отримали достовірне збільшення ДК та МДА порівняно з контролем. Водночас введення PLP достовірно зменшувало пули ДК у 3,7 раза, а вміст МДА – вдвічі, що свідчить про потужну антиоксидантну дію H_2S та інгібування утворення ініціаторів ПОЛ – ·OH та $\cdot NO_2$ радикалів (рис. 3.45).

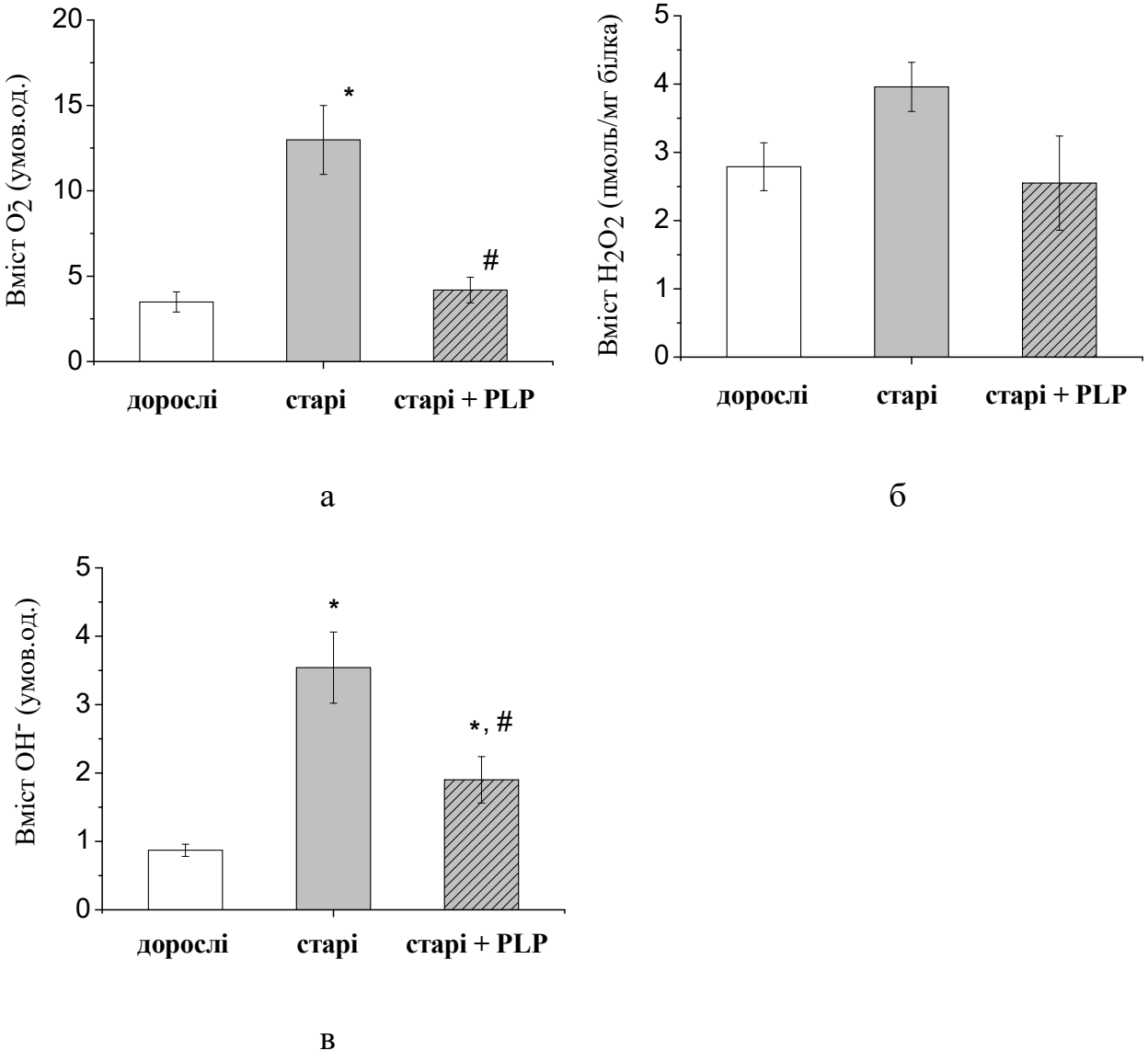
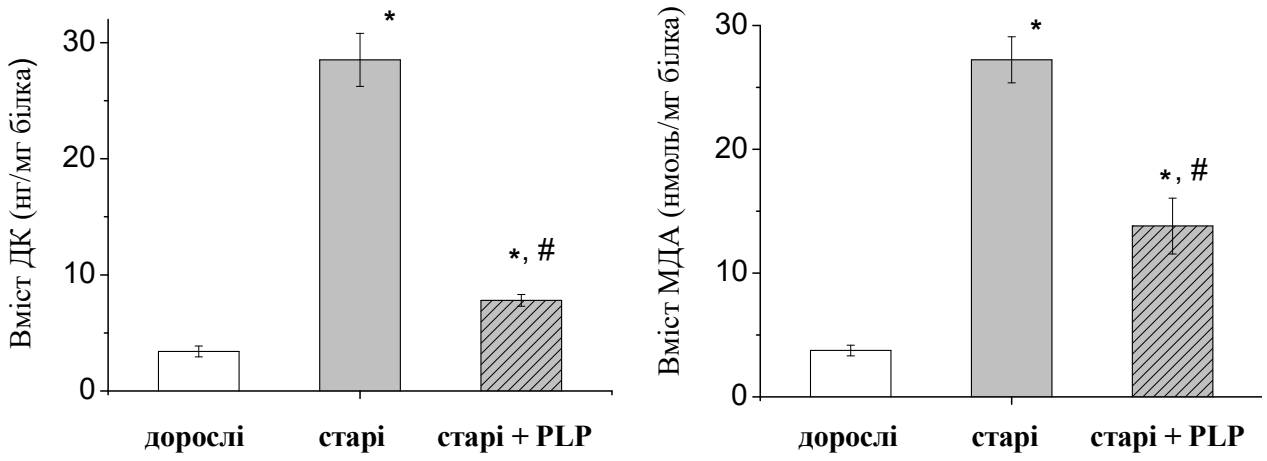


Рис. 3.44 Вплив піридоксаль-5-фосфату на вміст у міокарді старих щурів супероксид аніону (а), пероксиду водню (б) і ˙OH-радикалу (в). *P<0,05 статистично достовірна різниця відносно значень у дорослих щурів; #P<0,05 статистично достовірна різниця відносно значень у старих щурів



а б

Рис. 3.45 Вплив піридоксаль-5-фосфату (PLP) на вміст у міокарді старих щурів дієнових кон'югатів (а) та малонового диальдегіду (б). *P<0,05 статистично достовірна різниця відносно значень у дорослих щурів; #P<0,05 статистично достовірна різниця відносно значень у старих щурів.

Застосування піридоксаль-5-фосфату, що сприяє відновленню вмісту H_2S, чинить виражену антиоксидантну дію, інгібуючи у тканинах серця активність ксантиноксидази (про що свідчить зниження вдвічі вмісту сечової кислоти), ліпооксигенази (зниження вмісту LTC_4 до рівня нижче контрольних значень) та циклооксигенази (зниження вмісту TxB_2), за активації яких утворюється супероксиданіон. Це може бути одним із важливих біохімічних механізмів кардіопротекторної дії сірководню при старінні. Більше того, LTC_4, так TxB_2 за ішемії мають коронароконстрикторну та аритмогенну дію, а лейкотрієни ще і прооксидантну [214]. Отже, на моделі старих тварин з підвищеною експресією субодиниць $K_{АТФ}$-каналів показано зниження оксидативного стресу в тканинах серця.

В тканинах серця старих щурів спостерігали також підвищення активності iNOS, нітратредуктази, аргінази, пулів NO_3^-, а також зниження

активності cNOS (eNOS і nNOS), пулів NO_2^- та НМНТ (табл. 3.10). Зокрема, в наших дослідженнях в тканинах серця старих тварин вдвічі знижувався такий важливий показник, як швидкість сумарного конститутивного Ca^{2+}-залежного синтезу оксиду азоту (cNOS), який свідчить про кардіопротекторні властивості ферменту. І, навпаки, після застосування піридоксаль-5-фосфату показники активності цього ферменту зростає у 3,4 раза, порівняно зі такими у старих тварин (рис. 3.46 а). Натомість активність ферменту Ca^{2+}-незалежної iNOS при старінні зростає у 8,8 раза порівняно з дорослими тваринами, а курсове ведення PLP знижувало ці показники у 1,7 раза (рис. 3.46 б).

Таблиця 3.10

Маркери нітрозативного стресу та активність ферментів синтезу NO в тканинах серця старих щурів за дії піридоксаль-5-фосфату (M±m, n=9).

Показники	дорослі щурі	старі щурі	старі щурі + PLP
cNOS, *пмоль/хв. мг білка*	6,99±1,11	3,37±0,45*	11,57±2,66#
iNOS, *пмоль/хв. мг білка*	1,78±0,26	15,88±1,18*	9,08±1,51#
Нітратредуктаза, пмоль/хв. мг білка	0,49±0,05	2,42±0,32*	0,9±0,22#
Аргіназа, пмоль/хв. мг білка	1,07±0,1	4,23±0,31*	0,84±0,35#
NO_2^-, пмоль/мг білка	354,4±22,6	214,88±30,6	343,88±61,85
NO_3^-, *нмоль/мг білка*	11,72±0,64	75,45±8,28*	30,35±8,45#
Низькомолекулярні нітрозотіоли, *пмоль/мг білка*	178,52±16,36	67,84±7,12*	126,15±15,74#

Примітка: *P<0,05 статистично достовірна різниця відносно значень у дорослих щурів; #P<0,05 статистично достовірна різниця відносно значень у старих щурів.

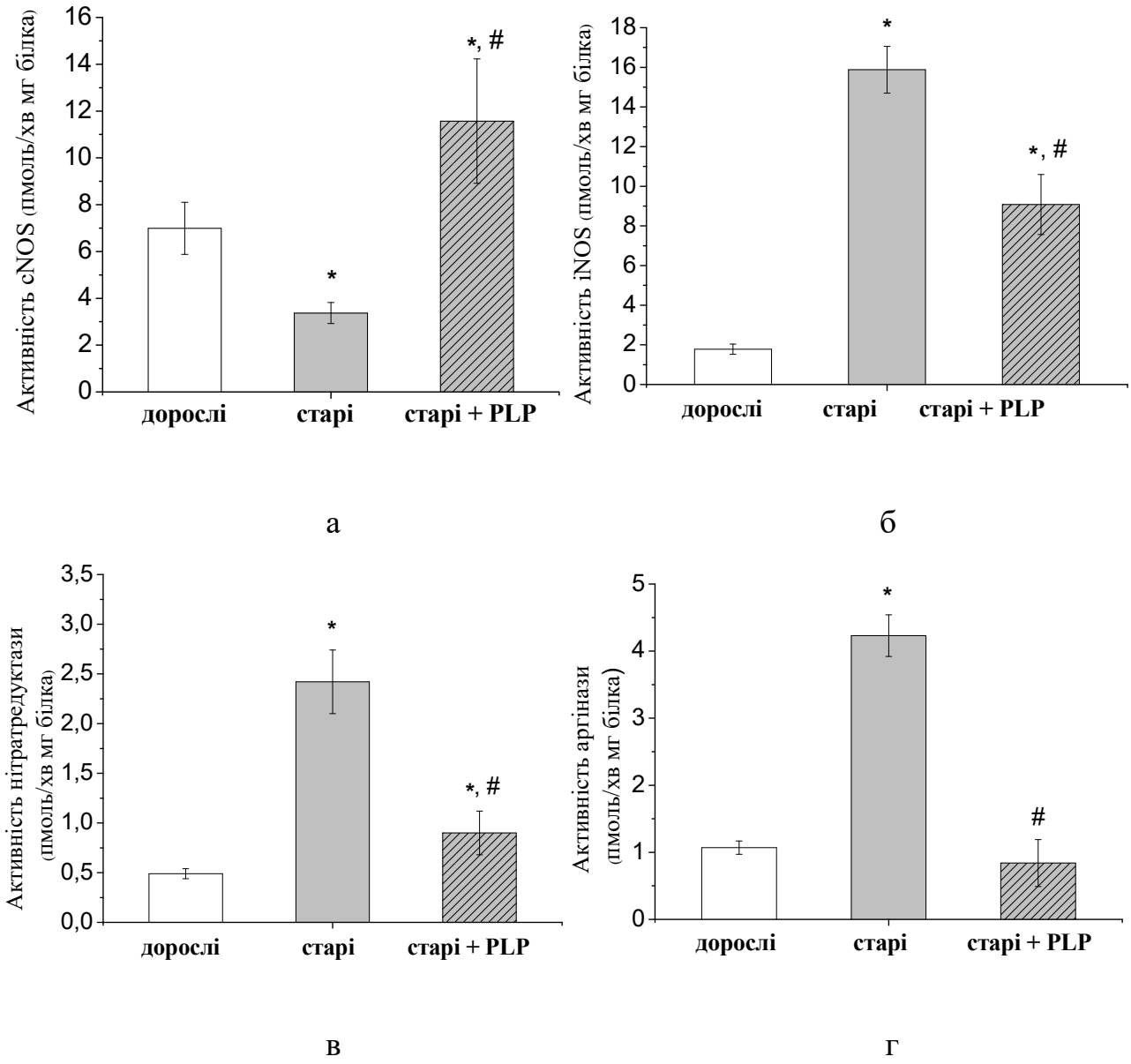


Рис. 3.46 Зміна активності ферментів cNOS (а), iNOS (б), нітратредуктази (в) та аргінази (г) в тканинах серця старих щурів за дії піридоксаль-5-фосфату. *P<0,05 статистично достовірна різниця відносно значень у дорослих щурів; #P<0,05 статистично достовірна різниця відносно значень у старих щурів.

Також після застосування PLP відбувається зменшення активності у досліджуваних об’єктах ферменту нітратредуктази – НАДН-залежного ензиму, що відновлює нітрати до нітритів. Нітратредуктазна активність у тканинах серця при старінні перевищувала контрольні значення у 2,6 раза (рис. 3.46 в).

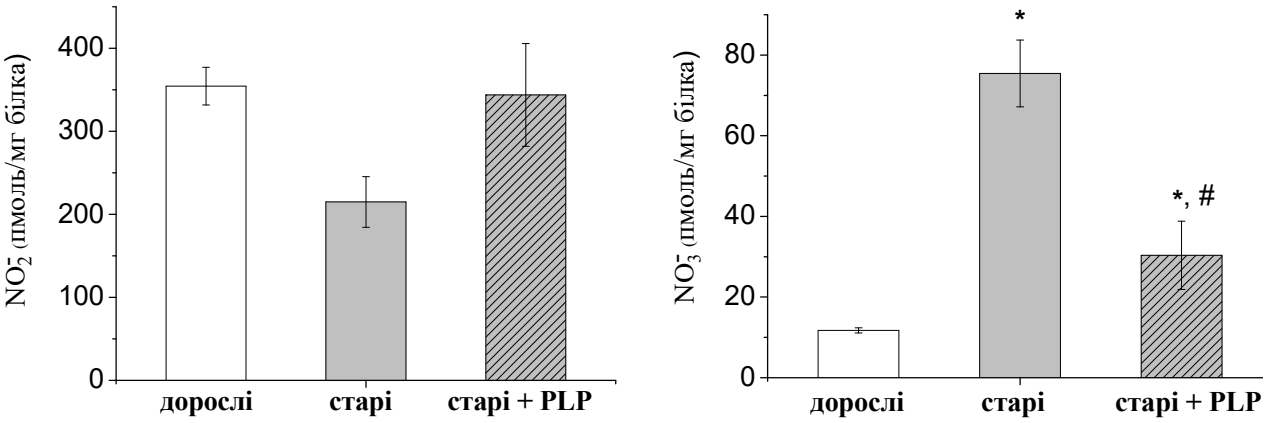
Застосування PLP суттєво знижувало рівень активності нітратредуктази, що свідчить про значне зниження надлишкового реутилізаційного синтезу NO та про пригнічення нітрозативного стресу за цих умов при старінні. Оскільки значне підвищення за старіння активності неокисних ферментів – нітратредуктази, як і активності ферменту de novo синтезу оксиду азоту iNOS, може бути доказом регуляторної ролі не лише АФК, але і АФА в тканинах серця.

При старінні посилюється також неокисна деградація L-аргініну ферментом аргіназою, що за рахунок обмеження пулів спільного субстрату (L-аргініну) створює умови для одночасної генерації $^{\bullet}O_2^-$ і оксиду азоту всіма ізоферментами NOS і, тим самим, утворення $ONOO^-$, реалізації його пошкоджувальної дії в кардіоміоцитах і порушення роботи серця в цілому [214]. Стимуляція ендогенного синтезу сірководню у старих тварин призводила до зниження у 5 разів активності цього ферменту у тканинах серця (рис. 3.46 г).

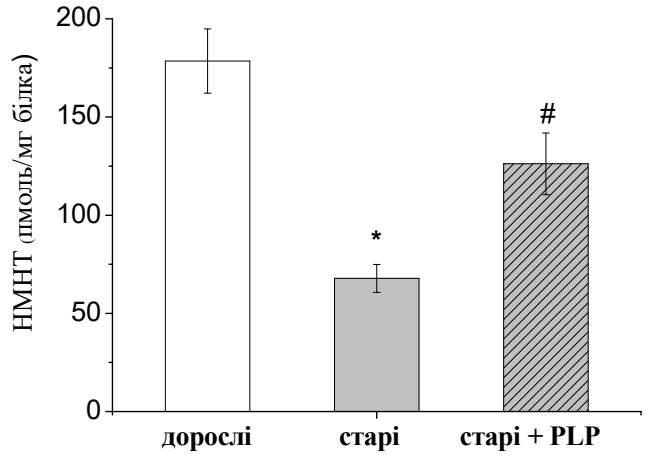
Досліджуючи прояви нітрозативного стресу у тканинах серця старих щурів за дії PLP, ми також визначали зміни пулів стабільних метаболітів NO: нітрит (NO_2^-)- і нітрат (NO_3^-)-аніони (табл. 3.8), та продуктів нітрозилювання активних форм азоту НМНТ, в основному це нітрозильований глутатіон. Відомо, що NO трансформується в такі стабільні метаболіти, як NO_2^- і NO_3^- [215]. Встановлено, що в тканинах серця старих щурів пули NO_2^-, що є маркером доступності кисню для спонтанного неферментативного окиснення NO, знижуються майже вдвічі (рис. 3.47 а). Водночас введення PLP призводило до повернення цих значень до контрольного рівня. При цьому пули NO_3^-, що є маркером утворення і розпаду пероксинітриту, при старінні суттєво зростали у серці у 6,4 раза (рис. 3.47 б). Двотижневе введення PLP нормалізувала вміст пулів NO_3^-. Це може свідчити про те, що надлишок синтезованого ферментом iNOS NO іде на спонтанне окиснення молекулами кисню до аніонів нітриту, а не на утворення $ONOO^-$ і його вільнорадикальний розпад.

У дослідженнях вмісту НМНТ у тканинах серця показано, що при старінні спостерігається зниження значень цього показника у 2,6 раза

відповідно до контролю. Проте, суттєве збільшення цих тіолів, майже удвічі, відбувається після застосування кофактора H_2S-синтезуючих ферментів – PLP (рис. 3.47 в).



а б



в

Рис. 3.47 Зміна вмісту нітрит (а) та нітрат (б) аніонів, та низькомолекулярних нітрозотіоліл (в) в тканинах серця старих щурів за дії піридоксаль-5-фосфату. *P<0,05 статистично достовірна різниця відносно значень у дорослих щурів; #P<0,05 статистично достовірна різниця відносно значень у старих щурів.

Нітрит-аніон є стабільним метаболітом оксиду азоту, та є маркером конститутивного синтезу NO [211]. Причиною порушення конститутивного синтезу NO міг бути неспряжений стан cNOS. Дія PLP призводила до пригнічення нітрозативного стресу та відновлення спряженого стану cNOS, що супроводжувалось посиленням конститутивного синтезу NO в тканинах серця старих щурів.

Таким чином, піридоксаль-5-фосфат не лише підвищував експресію $К_{АТФ}$-каналів в серці, що можна вважати одним із його можливих кардіопротекторних механізмів, але і зменшував оксидативний стрес та нормалізував роботу системи оксиду азоту, зокрема, відновлював активність cNOS.

3.6.1.3. Дослідження впливу піридоксаль-5-фосфату на показники окисного стресу та систему оксиду азоту в плазмі крові старих щурів.

Очікувано, що зміни концентрації сірководню, як одної із антиоксидантних сполук, у плазмі крові були подібні до таких як у тканині серця і мітохондріях, а саме: зниження вмісту у 1, 67 рази у старих щурів і відновлення вище рівня контролю (рис. 3.48).

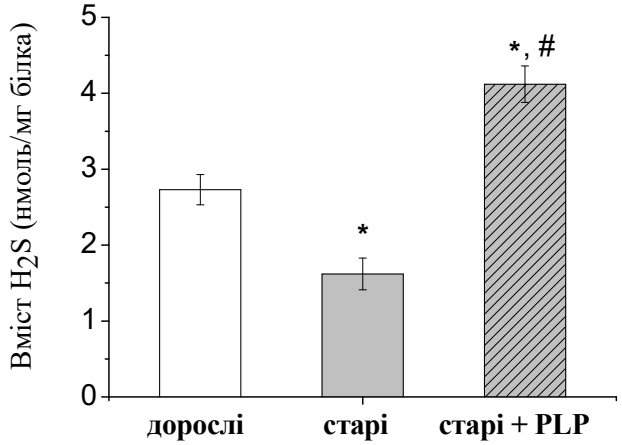


Рис. 3.48 Вміст H_2S у плазмі крові старих щурів після курсового введення піридоксаль-5-фосфату (PLP). *P<0,05 статистично достовірна різниця відносно значень у дорослих щурів; #P <0,05 статистично достовірна різниця відносно значень у старих щурів.

Як показано у табл. 3.11 у плазмі старих щурів швидкість генерації $^{\bullet}O_2^-$ значно збільшилася (майже втричі) порівняно з дорослими тваринами, а курсове ведення PLP знизило цей показник у старих тварин (рис. 3.49 а). Також при старінні спостерігали збільшення стабільного H_2O_2 у 3,65 раза та швидкості утворення $^{\bullet}OH$-радикала (ініціатора ПОЛ) майже у 7 разів (рис. 3.49 б і в). Проте, за умов застосування PLP ці показники зменшувались у 4,5 раза та втричі відповідно (див. табл. 3.11 і рис. 3.49 б і в).

Таблиця 3.11

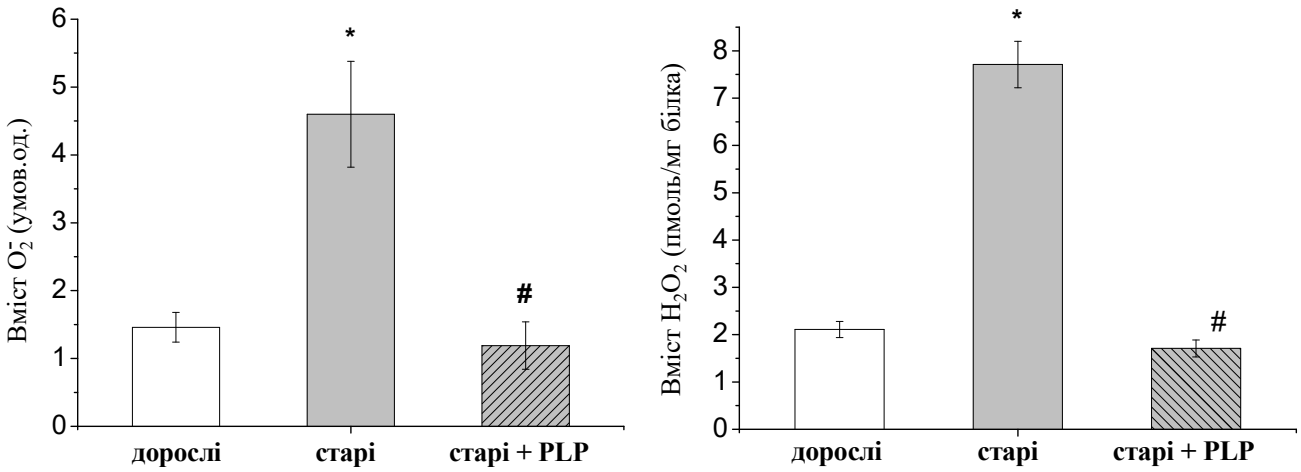
Швидкість генерації $^{\bullet}O_2^-$, $^{\bullet}OH$-радикалів і пули стабільного H_2O_2 та маркерів перекисного окиснення ліпідів у плазмі крові старих щурів за дії піридоксаль-5-фосфату (M±m, n=9).

Показники	дорослі щурі	старі щурі	старі щурі + PLP
Швидкість генерації $\bullet O_2^-$, *ум.од.*	1,46±0,22	4,6±0,78*	1,19±0,35#
Пули H_2O_2, *пмоль/мг білка*	2,11±0,17	7,71±0,49*	1,71±0,18#
Швидкість генерації $^{\bullet}OH$, *ум. од.*	1,25±0,15	8,64±2,24*	2,95±0,42*,#
Малоновий діальдегід, *нмоль/мг білка*	15,95±2,61	31,86±4,48	15,17±2,95
Дієнові кон'югати, *нг/мг білка*	2,76±0,47	18,29±2,3*	2,48±0,59#

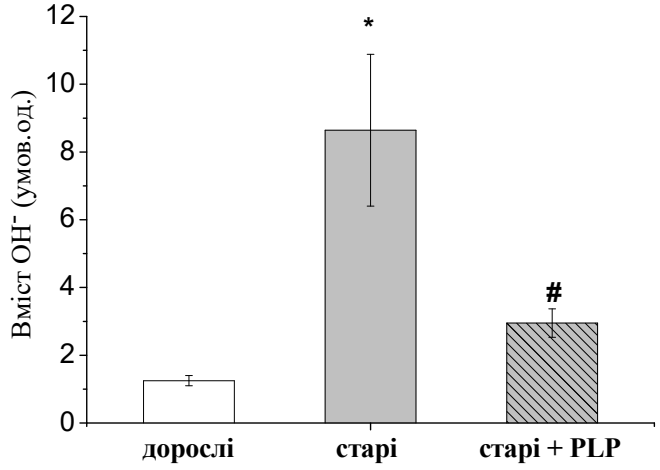
Примітка: *P<0,05 статистично достовірна різниця відносно значень у дорослих щурів; #P<0,05 статистично достовірна різниця відносно значень у старих щурів.

Суттєве збільшення пулів ранніх продуктів перекисного окиснення ліпідів – ДК та МДА, що є маркерами інтенсивності окисного стресу, також підтверджує стан окисного процесу у плазмі крові зокрема при старінні (табл.

3.11). PLP зменшував вміст ДК та МДА в аорті у 7,4 раза та вдвічі відповідно (рис. 3.50).



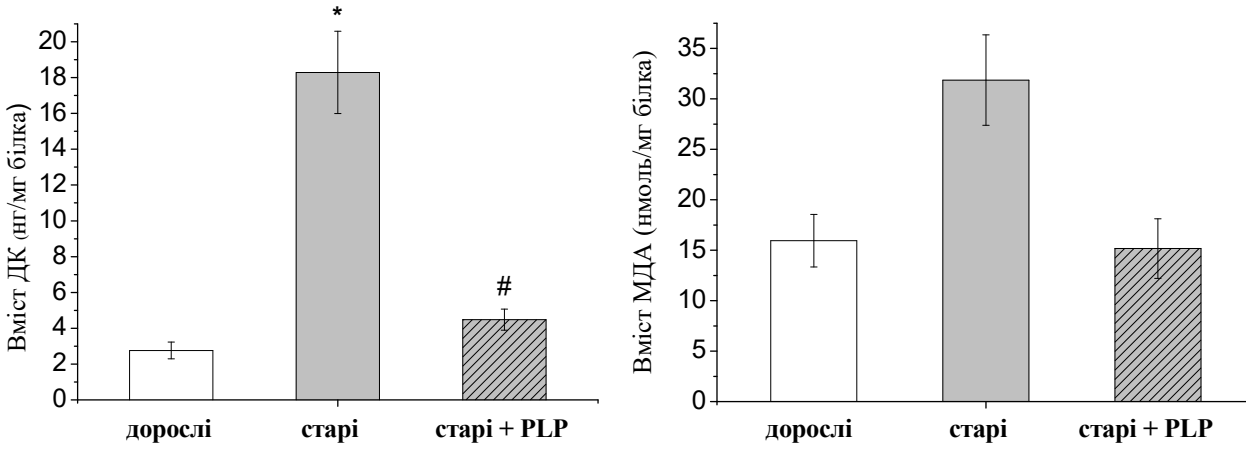
а б



в

Рис. 3.49 Вплив піридоксаль-5-фосфату на вміст у плазмі крові старих щурів супероксид аніону (а), пероксиду водню (б) і ˙OH-радикалу (в). *P<0,05 статистично достовірна різниця відносно значень у дорослих щурів; #P<0,05 статистично достовірна різниця відносно значень у старих щурів

Про обмеження окисного стресу після курсового введення PLP також може свідчити зменшення вмісту LTC_4, TxB_2 та сечової кислоти, адже побічним продуктом їх утворення є генерація супероксидного радикалу, та зниження показників ПОЛ (табл. 3.12, рис. 3.51).



а б

Рис. 3.50 Вплив піридоксаль-5-фосфату (PLP) на вміст у плазмі крові старих щурів дієнових кон'югатів (а) та малонового диальдегіду (б). *P<0,05 статистично достовірна різниця відносно значень у дорослих щурів; #P<0,05 статистично достовірна різниця відносно значень у старих щурів.

Таблиця 312

Зміни пулів маркерів ферментативного утворення $^{\bullet}O_2^-$ у плазмі крові старих щурів за дії піридоксаль-5-фосфату (M±m, n=9).

Показники	дорослі щурі	старі щурі	старі щурі + PLP
Тромбоксан B_2, *пмоль/мг білка*	2,11±0,3	15,46±1,4*	2,28±0,41#
Лейкотрієн C_4, *пмоль/мг білка*	2,06±0,31	12,93±0,89*	2,12±0,39#
Сечова кислота, *нмоль/мг білка*	3,53±0,29	5,01±0,42	1,65±0,47*,#

Примітка: *P<0,05 статистично достовірно відносно значень у дорослих щурів; #P<0,05 статистично достовірно відносно значень у старих щурів.

Двотижневе введення піридоксаль-5-фосфату також відновлювало у плазмі крові старих щурів пули арахідонової кислоти (рис. 3.52), яка як відомо є попередником при утворенні тромбоксанів і лейкотриєнів.

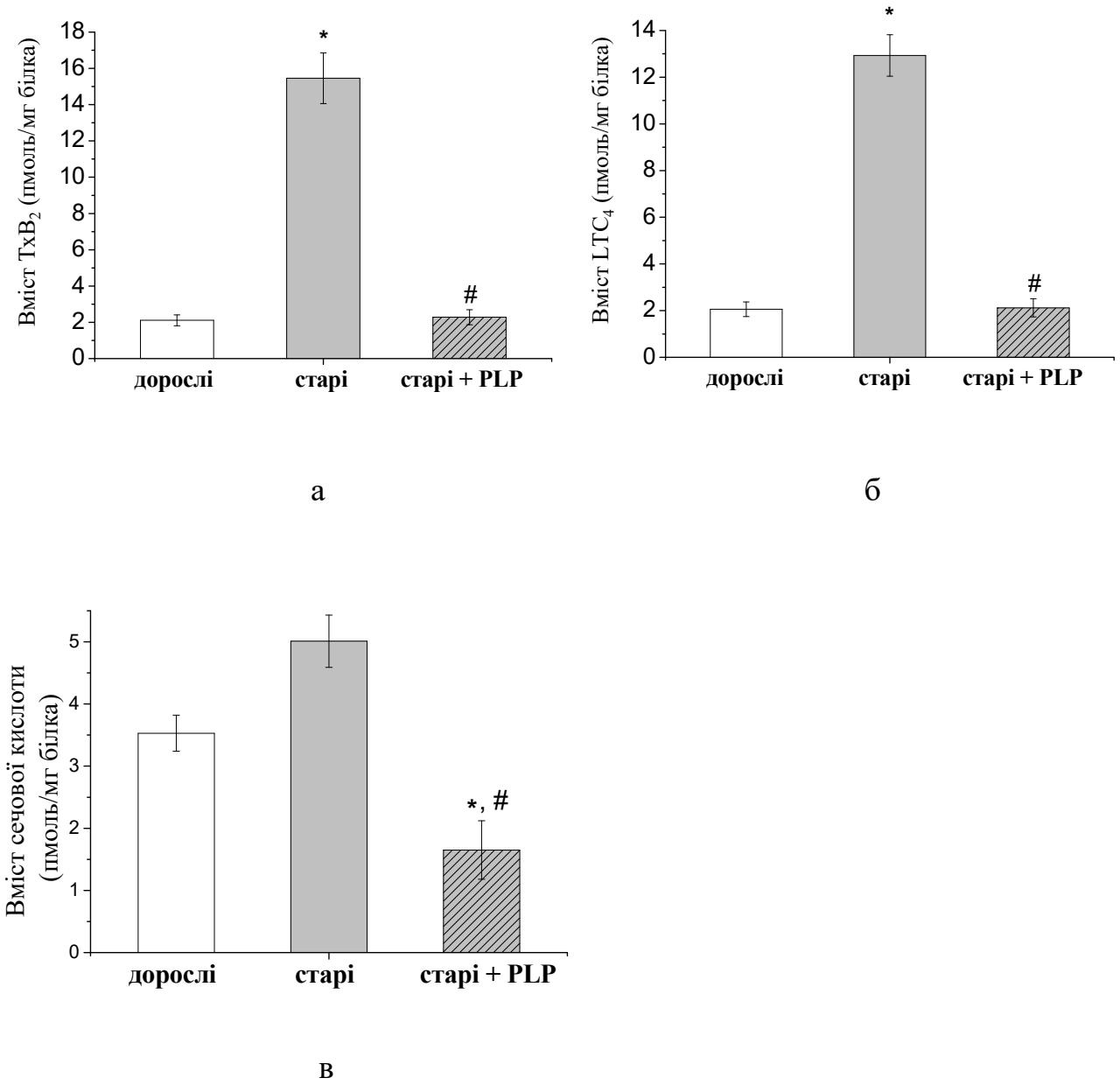


Рис. 3.51 Зміни пулів маркерів ферментативного утворення супероксид аніону ($O_2^{\bullet-}$) у плазмі крові старих щурів за дії піридоксаль-5-фосфату (PLP) тромбоксану B_2 (а), лейкотриєну C_4 (б) та пулів сечової кислоти (с). *P<0,05 статистично достовірна різниця відносно значень у дорослих щурів; #P<0,05 статистично достовірна різниця відносно значень у старих щурів.

Одночасно з розвитком оксидативного стресу у старих тварин відбуваються зміни у системі оксиду азоту (табл. 3.13). Показано значне зниження активності cNOS, зростання активностей iNOS та нітратредуктази (шлях реутилізаційного синтезу NO) і зниження пулів НМНТ (шлях декомпозиційного синтезу NO).

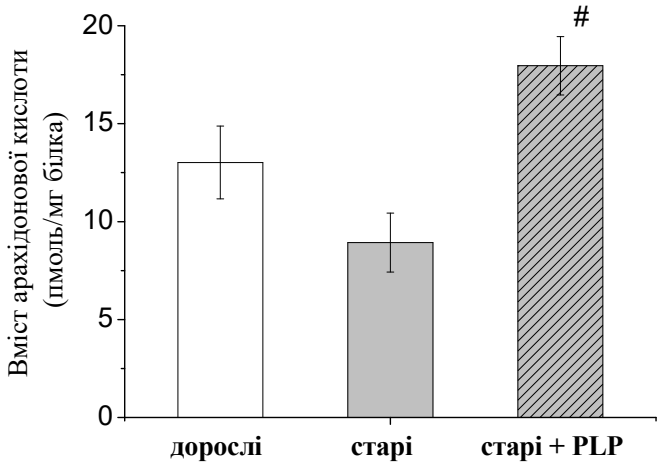


Рис. 3.52 Вміст арахідонової кислоти у плазмі крові старих щурів за дії піридоксаль-5-фосфату (PLP). *P<0,05 статистично достовірна різниця відносно значень у дорослих щурів; #P<0,05 статистично достовірна різниця відносно значень у старих щурів.

Активність cNOS знижується удвічі, а активність Ca^{2+}-незалежної індуцибельної NO-синтази (iNOS) та нітратратредуктазна активність навпаки зростали у 4 та 7,7 раза відповідно (табл. 3.13, рис. 3.53).

Важливим наслідком застосування PLP у вікових тварин є підвищення активності cNOS 1,4 раза та зниження у 2,2 та 3,6 раза активності iNOS та нітратредуктази відповідно порівняно зі старими контрольними тваринами (див. рис. 3.53 а, б, в). Аргіназна активність у плазмі крові при старінні

перевищувала контрольні значення у 3,2 раза. Введення PLP суттєво (у 7,2 раза) знижувало активність даного ферменту (рис. 3.53 г).

Таблиця 3.13

Зміна у плазмі крові старих щурів за дії піридоксаль-5-фосфату активності ферментів cNOS, iNOS, нітратредуктази, аргінази та вмісту нітрит та нітрат аніонів, та низькомолекулярних нітрозотіоліл (M±m, n=9).

Показники	дорослі щурі	старі щурі	старі щурі + PLP
cNOS, *пмоль/хв. мг білка*	21,83±2,4	11,3±1,8*	15,45±3,03
iNOS, *пмоль/хв. мг білка*	14,36±0,87	58,07±8,41*	26,49±3,44*,#
Нітратредуктаза, *пмоль/хв. мг білка*	0,35±0,06	2,7±0,19*	0,74±0,31#
Аргіназа, *пмоль/хв. мг білка*	1,17±0,13	3,75±0,5*	0,52±0,22*,#
NO_2^-, *пмоль/мг білка*	277,69±17,76	79,6±7,01*	117,43±74,87*
NO_3^-, *нмоль/мг білка*	11,5±0,95	54,8±7,02*	11,13±3,33#
Низькомолекулярні нітрозотіоли, *пмоль/мг білка*	197,34±18,8	23,43±4,18*	95,51±5,04*,#

Примітка: *P<0,05 статистично достовірна різниця відносно значень у дорослих щурів; #P <0,05 статистично достовірна різниця відносно значень у старих щурів.

В наших експериментах у плазмі крові старих щурів вміст пулів NO_2^- був зменшений у 3,5 раза порівняно з дорослими тваринами. При курсовому введенні PLP спостерігалася тенденція до збільшення значень цього показка (рис. 3.54 а). Водночас пули NO_3^- значно збільшились (у 4,8 раза) у старих щурів, проте PLP нормалізував вміст цих пулів до рівня контролю дорослих щурів (рис. 3.54 б). Крім того, у плазмі крові старих щурів спостерігалося суттєве зменшення вмісту НМНТ у 8,4 раза порівняно з контролем (табл. 3.11,

рис. 3.54 б). Застосування PLP призводило до збільшення НМНТ у 4,1 раза (див. табл. 3.13 і рис. 3.54 в).

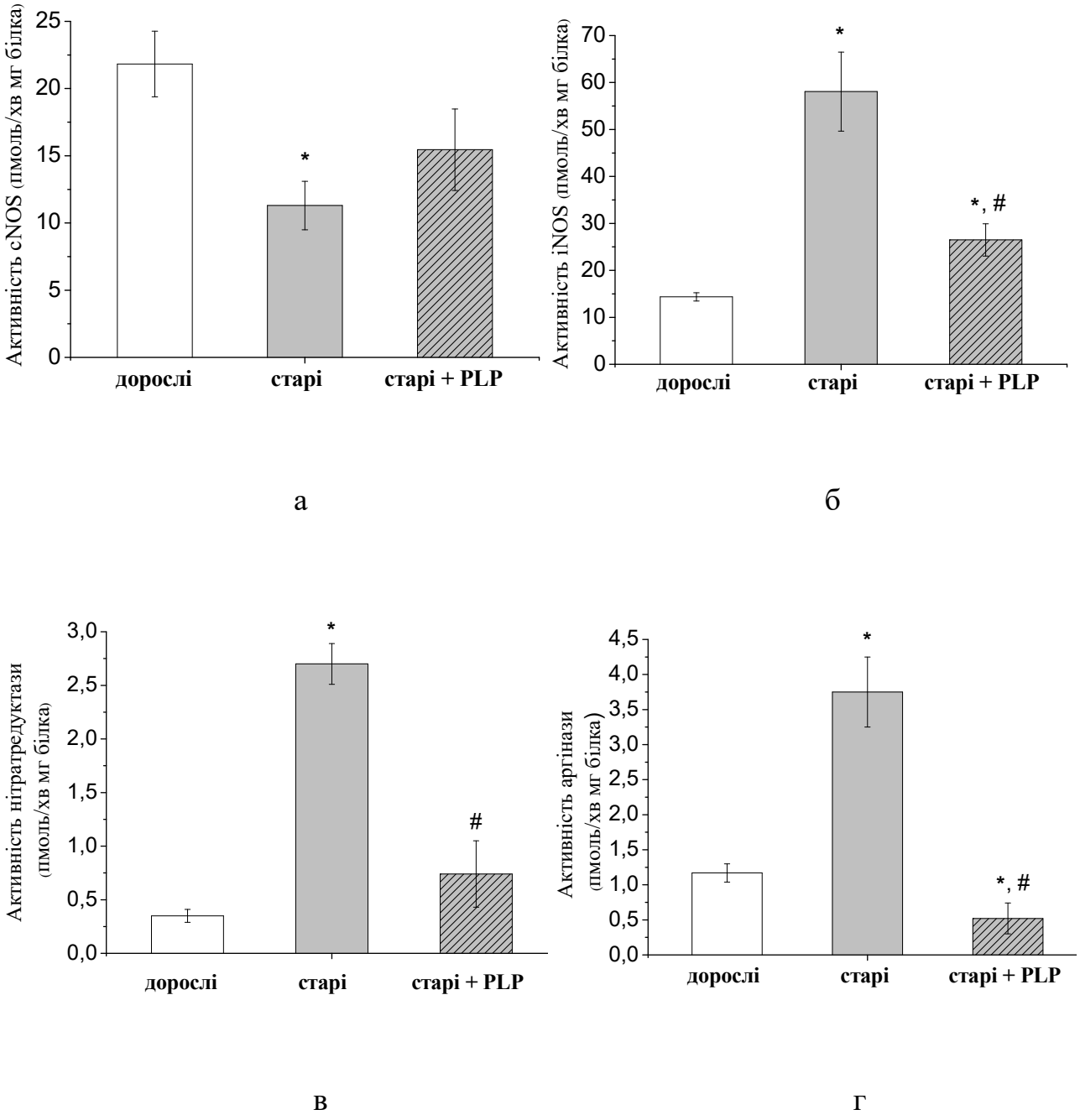


Рис. 3.53 Зміна активності ферментів cNOS (а), iNOS (б), нітратредуктази та аргінази у плазмі крові старих щурів за дії піридоксаль-5-фосфату. *P<0,05 статистично достовірна різниця відносно значень у дорослих щурів; #P<0,05 статистично достовірна різниця відносно значень у старих щурів.

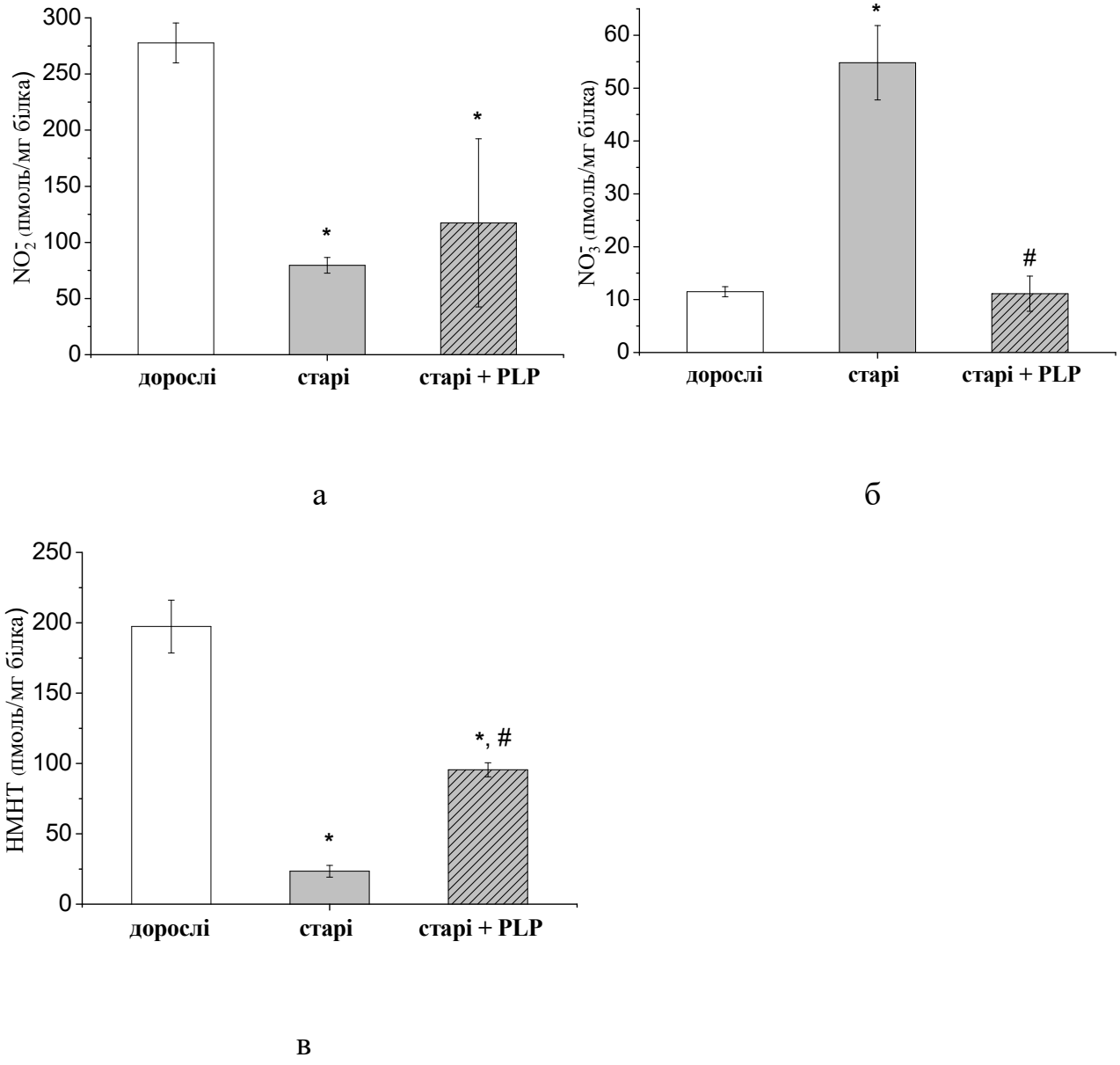


Рис. 3.54 Зміна вмісту нітрит (а) та нітрат (б) аніонів, та низькомолекулярних нітрозотіоліл (в) у плазмі крові старих щурів за дії піридоксаль-5-фосфату. *P<0,05 статистично достовірна різниця відносно значень у дорослих щурів; #P<0,05 статистично достовірна різниця відносно значень у старих щурів.

Таким чином, отримані результати свідчать про те, що застосування піридоксаль-5-фосфату сприяє зниженню оксидативного стресу у старих щурів, що полягає в пригніченні вмісту пулів $^{\bullet}O_2^-$, H_2O_2 і $^{\bullet}OH$, зниженні утворення продуктів ПОЛ – ДК і МДА, зниженні вмісту арахідонової кислоти та її

похідних – LTC_4 і TxB_2, утворення яких супроводжується продукуванням супероксид аніонів, та супроводжується нормалізацією роботи системи оксиду азоту – підвищенням конститутивнго синтезу NO, та навпаки, пригніченням активності iNOS і нітратредуктази, та зменшенням активності аргінази, що зберігає субстрат (L-аргінін) для NO-синтаз.

3.6.1.4. Визначення впливу піридоксаль-5-фосфату на показники оксидативно- нітрозативного стресу та конститутивного синтезу NO в тканинах аорти старих щурів.

Показано, що вміст H_2S у тканинах аорти істотно зменшується з віком. Встановлено, що у тканинах аорти він знижувався у 1,6 раза (13,53±1,47 нмоль/мг білка порівняно з 22,1±2,93 нмоль/мг білка відповідно, $P<0,05$) (рис. 3.55). Застосування PLP призводило до зростання вмісту сірководню у тканинах аорти старих тварин у 2,4 раза (32,4±6,92 нмоль/мг білка у тканинах аорти старих тварин після дії PLP, $P<0,05$). Таким чином, ми спостерігали відновлення синтезу ендогенного сірководню у старих тварин, ймовірно, за рахунок активації H_2S-синтизуючих ферментів кофактором PLP (рис. 3.55).

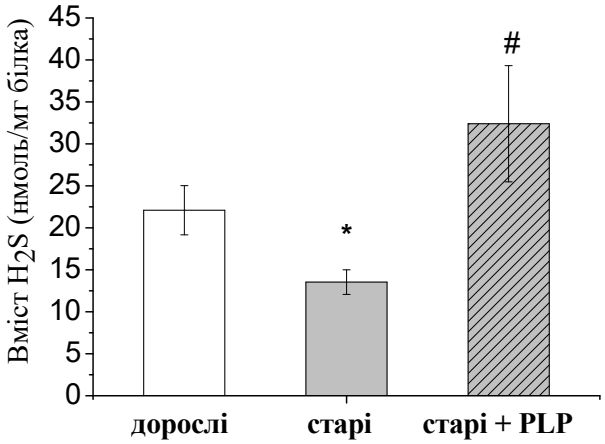


Рис. 3.55 Вміст H_2S у тканинах аорти старих щурів після курсового введення піридоксаль-5-фосфату (PLP); *$P<0,05$ статистично достовірна різниця відносно значень у дорослих щурів; #$P<0,05$ статистично достовірна різниця відносно значень у старих щурів.

Як показано у табл. 3.14, швидкість генерації $^{\bullet}O_2^-$ значно збільшилася майже в 6 разів у аорті старих щурів порівняно з дорослими, а курсове ведення PLP знизило цей показник у старих тварин у 2,2 раза. Також при старінні спостерігали збільшення стабільного H_2O_2 у 4,3 раза та швидкості утворення $^{\bullet}OH$-радикала (ініціатора ПОЛ) майже у 12 разів. Проте, після застосування PLP ці показники зменшувались у 3,2 та 2,1 раза відповідно (рис. 3.56).

Суттєве збільшення пулів ранніх продуктів перекисного окиснення ліпідів – ДК та МДА, що є маркерами інтенсивності окисного стресу, також вказує на розвиток цього окисного процесу у тканинах аорти зокрема при старінні. PLP зменшував вміст ДК та МДА в аорті у 1,6 та 1,5 раза відповідно (табл. 3.14, рис. 3.56).

Таблиця 3.14

Швидкість генерації $^{\bullet}O_2^-$, $^{\bullet}OH$-радикалів і пули стабільного H_2O_2 та маркерів перекисного окиснення ліпідів в тканинах аорти старих щурів за дії піридоксаль-5-фосфату (PLP) (M±m, n=9)

Показники	дорослі щурі	старі щурі	старі щурі +PLP
Швидкість генерації $\bullet O_2^-$, *ум.од.*	4,58±0,77	26,67±3,01*	12,29±1,98#
Пули H_2O_2, *пмоль/мг білка*	3,2±0,6	13,7±1,6*	4,3±1,59#
Швидкість генерації $^{\bullet}OH$, *ум. од.*	0,33±0,03	3,92±0,51*	1,85±0,43#
Дієнові кон'югати, *нг/мг білка*	7,42±0,94	32,64±4,61*	19,81±1,83
Малоновий діальдегід, *нмоль/мг білка*	1,74±0,06	11,24±2,05*	7,31±1,79

Примітка: *P<0,05 статистично достовірна різниця відносно значень у дорослих щурів; #P <0,05 статистично достовірна різниця відносно значень у старих щурів.

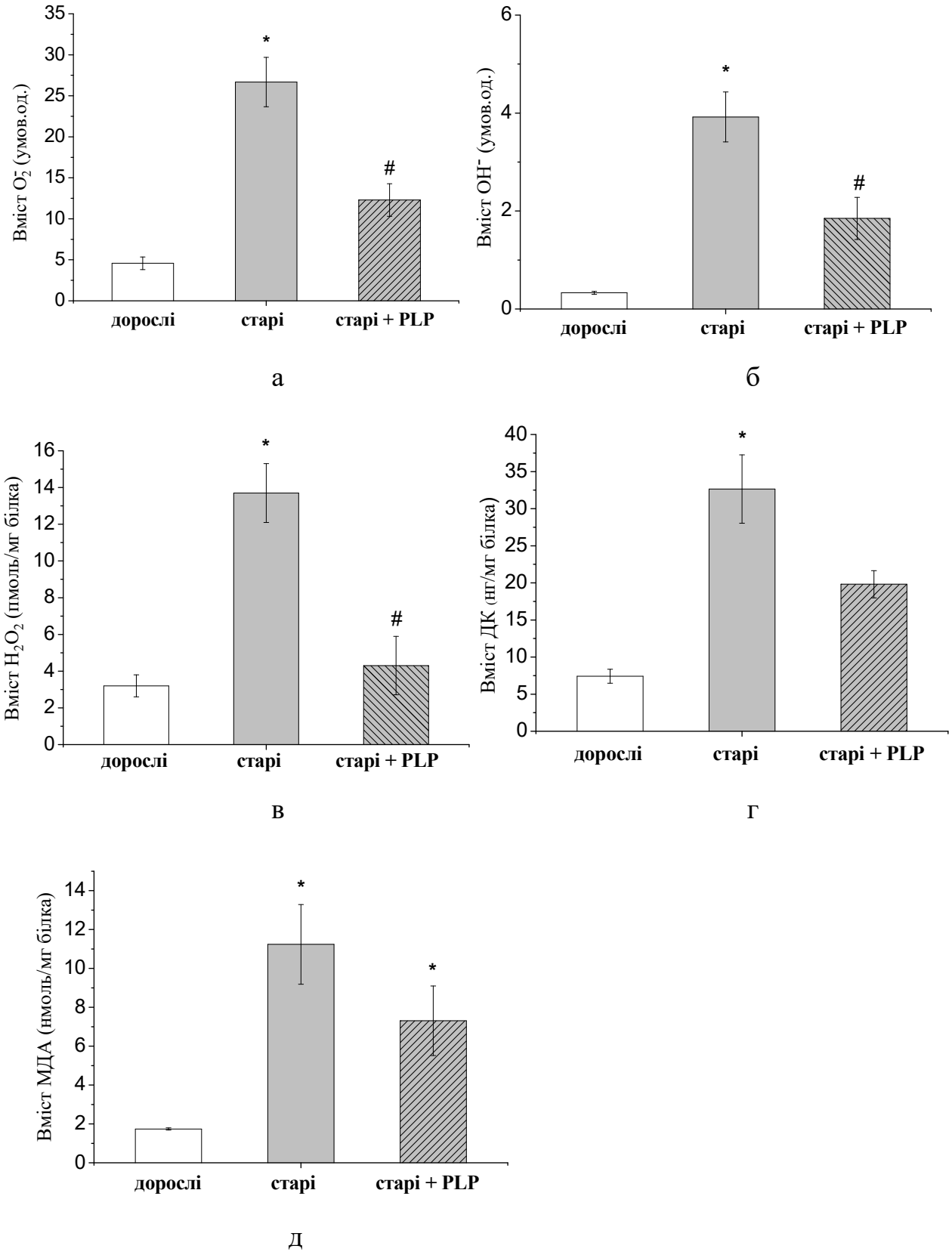


Рис. 3.56 Вплив піридоксаль-5-фосфату (PLP) на показники оксидативного стресу у тканинах аорти старих щурів; *P<0,05 статистично достовірна різниця відносно значень у дорослих щурів; #P<0,05 статистично достовірна різниця відносно значень у старих щурів.

Обмеження окисного стресу після курсового введення PLP також виявлялося зменшенням утворення LTC_4, TxB_2 та сечової кислоти, які є основними шляхами генерації $^{\bullet}O_2$-радикала та зниженню показників ПОЛ. (табл. 3.15, рис. 3.57).

Таблиця 3.15

Зміни пулів маркерів ферментативного утворення $O_2^{\bullet-}$ в тканинах аорти старих щурів за дії піридоксаль-5-фосфату (PLP) (M±m, n=9).

Показники	дорослі щурі	старі щурі	старі щурі + PLP
Тромбоксан B_2, *пмоль/мг білка*	1,88±0,32	2,26±0,27	1,28±0,21#
Лейкотрієн C_4, *пмоль/мг білка*	0,65±0,05	1,78±0,28*	1,22±0,2
Сечова кислота, *нмоль/мг білка*	5,16±0,83	42,7±5,75*	23,62±3,4#

Примітка: *P<0,05 статистично достовірна різниця відносно значень у дорослих щурів; #P <0,05 статистично достовірна різниця відносно значень у старих щурів.

Досліждували також вміст арахідонової кислоти у трьох груп тварин. Ця жирна кислота входить до складу фосфоліпідів, тригліцеридів та ефірів холестерину. Вона є попередником сполук з високою біологічною активністю — простагландинів, тромбоксанів і лейкотрієнів, які утворюються при дії ферментів циклооксигеназ та ліпоксигеназ. Останні діють лише на вільну арахідонову кислоту, у той час як основна її кількість міститься в складі фосфоліпідів. Арахідонова кислота в організмі не синтезується і належить до незамінних харчових факторів, тому основним її джерелом є продукти харчування, що містять фосфоліпіди та ненасичені жирні кислоти. Нами було показано зменшення вмісту цієї кислоти у тканинах аорти з віком і відновлення при дії PLP (рис. 3.58).

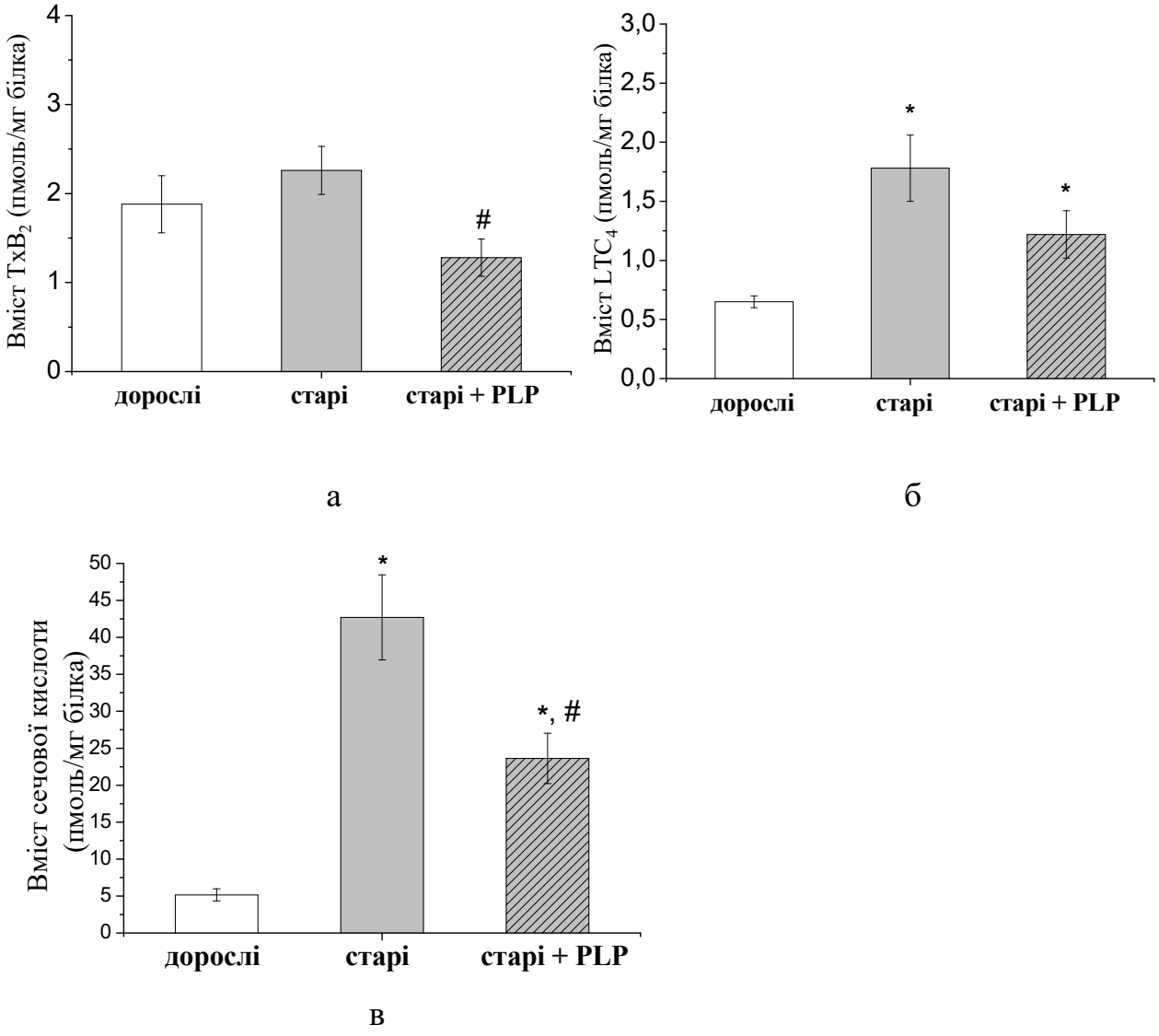


Рис. 3.57 Зміни пулів маркерів ферментативного утворення $O_2^{\bullet-}$ у тканинах аорти старих щурів за дії піридоксаль-5-фосфату (PLP); *P<0,05 статистично достовірна різниця відносно значень у дорослих щурів; #P<0,05 статистично достовірна різниця відносно значень у старих щурів.

Отримані результати свідчать про те, що застосування коензима H_2S-синтезуючих ферментів – PLP чинить відновлення ендогенного синтезу сірководню, що в свою чергу сприяє зниженню оксидативного стресу, а саме пригніченню утворення пулів $^{\bullet}O_2^-$, H_2O_2 і $^{\bullet}OH$ в тканинах аорти старих щурів.

Одночасно з розвитком оксидативного стресу спостерігається і нітрозативний стрес у тканинах аорти старих тварин (табл. 3.16). Показано значне зниження активності cNOS, зростання активностей iNOS та нітратредуктази (шлях реутилізаційного синтезу NO) і зниження пулів НМНТ (шлях декомпозиційного синтезу NO).

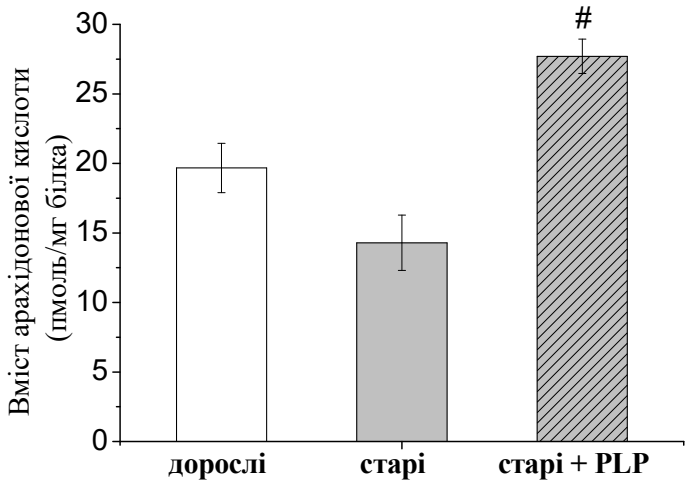


Рис. 3.58 Вміст арахідонової кислоти у тканинах аорти старих щурів за дії піридоксаль-5-фосфату (PLP); *P<0,05 статистично достовірна різниця відносно значень у дорослих щурів; #P<0,05 статистично достовірна різниця відносно значень у старих щурів.

Активність cNOS знижується утричі, а активність Ca^{2+}-незалежної індуцибельної NO-синтази (iNOS) та нітратратредуктазна активність навпаки зростали у 3,8 та 9,8 раза відповідно (рис. 3.59 а, б).

Важливим наслідком застосування PLP при старінні є підвищення активності cNOS удвічі та зниження у 1,9 та 4,6 раза активності iNOS та нітратредуктази відповідно (рис. 3.59 а, б, в). Аргіназна активність у тканинах аорти при старінні перевищувала контрольні значення у 3,4 раза. Введення PLP суттєво знижувало активність даного ферменту (рис. 3.59 г).

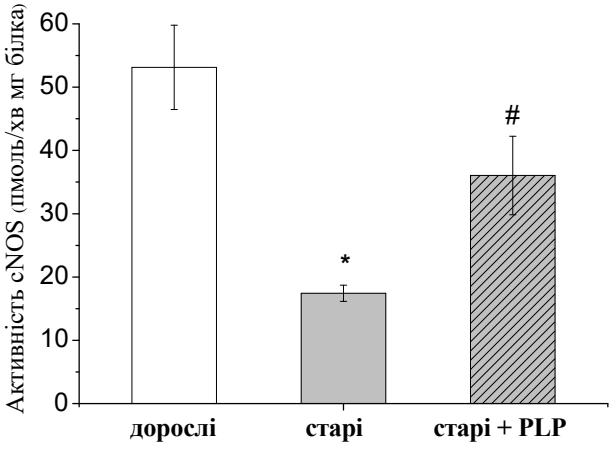
Таблиця 3.16

Маркери нітрозативного стресу та активність ферментів синтезу NO в тканинах аорти старих щурів за дії піридоксаль-5-фосфату (PLP) (M±m, n=9).

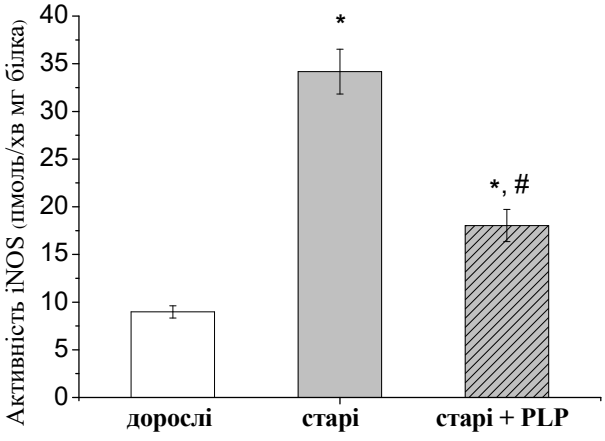
Показники	дорослі щурі	старі щурі	старі щурі + PLP
cNOS, *пмоль/хв. мг білка*	53,12±6,66	17,43±1,29*	36,04±6,19#
iNOS, *пмоль/хв. мг білка*	8,98±0,64	34,18±2,35*	18,03±1,69#
Нітратредуктаза, *пмоль/хв. мг білка*	0,58±0,07	5,66±1,44*	1,23±0,28#
Аргіназа, *пмоль/хв. мг білка*	2,73±0,43	9,38±1,98*	6,42±1,08
NO_2^-, *пмоль/мг білка*	522,4±60,9	307,75±17,99*	491,73±25,14#
NO_3^-, *нмоль/мг білка*	29,57±5,45	165,5±23,71*	46,95±12,16#
Низькомолекулярні нітрозотіоли, *пмоль/мг білка*	1499,66±188,2	681,93±92,45*	1287,28±312,51#

Примітка: *P<0,05 статистично достовірна різниця відносно значень у дорослих щурів; #P <0,05 статистично достовірна різниця відносно значень у старих щурів.

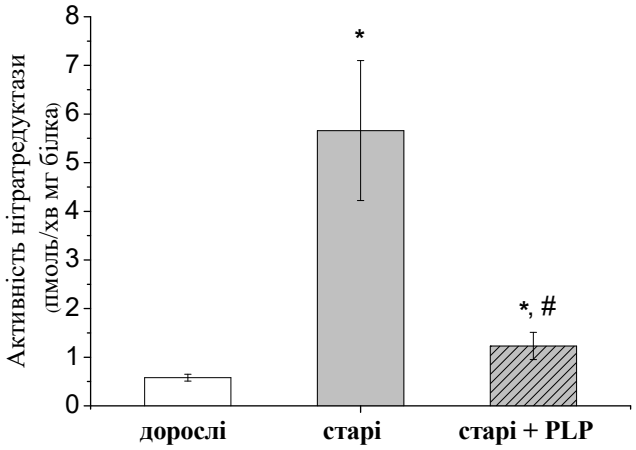
Було встановлено, що пули NO_2^- зменшені майже вдвічі в тканинах аорти старих щурів. Курсове введення PLP відновлювало ці значення до рівня контролю (рис. 3.59 д).



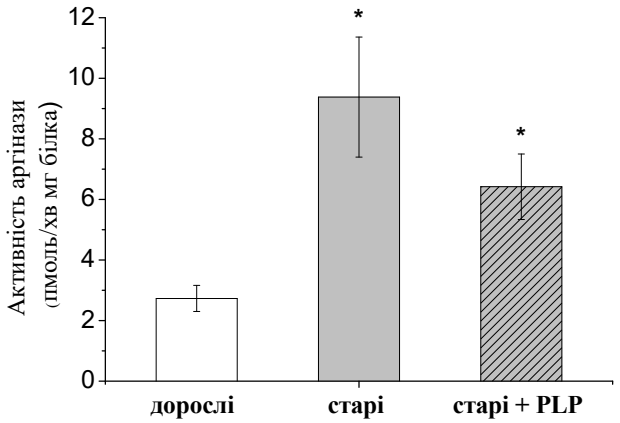
а



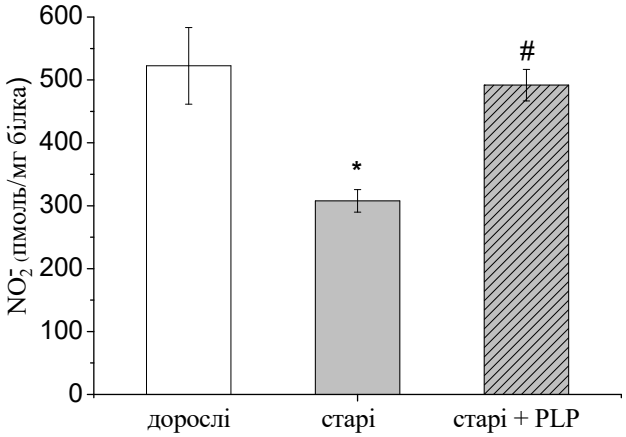
б



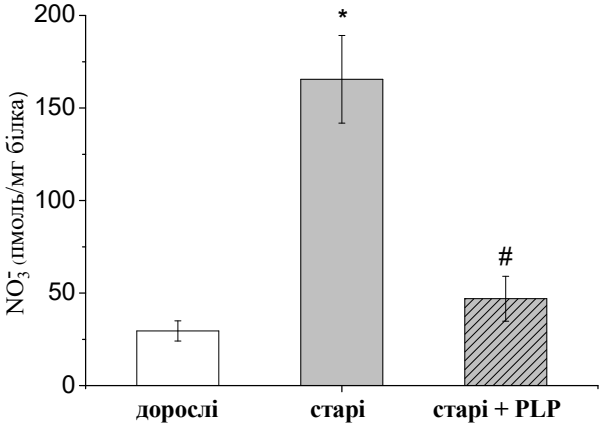
В



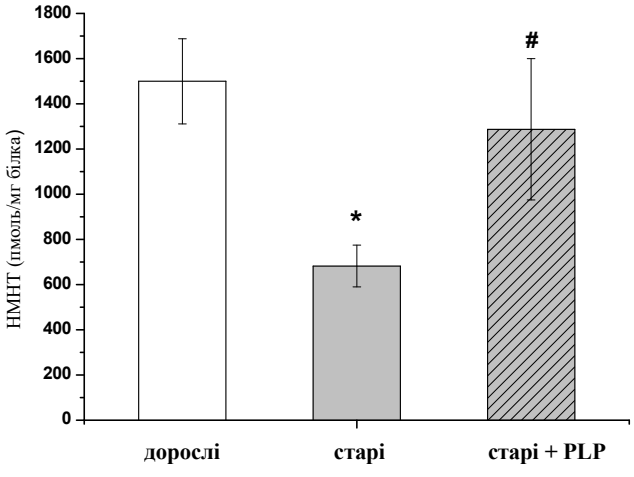
Г



Д



Е



З

Рис. 3.59 Маркери нітрозативного стресу та активність ферментів синтезу NO у тканинах аорти старих щурів за дії піридоксаль-5-фосфату (PLP); *P<0,05 статистично достовірна різниця відносно значень у дорослих щурів; #P<0,05 статистично достовірна різниця відносно значень у старих щурів.

Водночас пули NO_3^- значно збільшились у 5,6 раза у старих щурів, проте PLP нормалізував вміст цих пулів (рис. 3.59 е). Крім того, у тканинах аорти старих щурів спостерігалося зменшення вмісту НМНТ у 2,2 раза порівняно з контролем. Однак активація ендогенного синтезу сірководню у старих тварин за умов застосування PLP призводила до збільшення НМНТ майже вдвічі (табл. 3.16, рис. 3.59 з).

Таким чином, отримані нами результати свідчать про те, що застосування PLP відновлює рівень сірководню у старих тварин, сприяє пригніченню нітрозативного стресу, а також відновлює спряжений стан cNOS і конститутивний синтез NO у тканинах аорти старих щурів. Отже, H_2S виступає як регулятор системи NO, що свідчить про важливу роль цього газового трансмітера в патології серцево-судинної системи.

3.6.2. Дослідження біохімічних показників, що характеризують окисний стрес та активність mtNOS за дії глутатіону

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 (GSH) і окисленого (GSSG) глутатіону є основою клітинного окислювально-відновного гомеостазу, за допомогою якого може підтримуватися редокс-стан тіольний груп білків і редокс-статус клітини загалом [216]. Як природний низькомолекулярний антиоксидант і донор електронів глутатіон бере участь у підтримці клітинного гомеостазу і відіграє ключову роль у захисті клітин від окисного стресу, пригніченні апоптозу, а також необхідний для детоксикації ксенобіотиків, 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 [185, 217-219]. Водночас, при старінні

зменшується експресія $К_{АТФ}$-каналів, що призводить до ослаблення захисних механізмів [220], адже система цих каналів є потужним механізмом захисту за дії патологічних чинників, зокрема ішемічної природи [6, 11, 84, 131].

Таким чином, вікове зменшення експресії $К_{АТФ}$-каналів, виснаження пулів GSH та зміни в його метаболізмі мають вирішальне значення при низці патологічних станів (захворювань). Метою даної частини роботи було дослідити ефекти одноразового введення відновленої форми глутатіону на зміни біохімічних показників, що характеризують інтенсивність окисних процесів, насамперед у мітохондріях серця.

Оскільки GSH відіграє центральну роль у підтримці окисно-відновного балансу клітин ми визначили показники, які характеризують наявність окисного стресу, а саме швидкість генерації $^{\bullet}O_2^-$ і $^{\bullet}OH$-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 3.17, швидкість генерації супероксидного радикала, як результат функціонування ксантиноксидази, НАДФН-оксидази чи дихального ланцюга мітохондрій, у мітохондріях серця вікових тварин значно збільшувалася (у 3,7 раза), проте за введення глутатіону – була меншою в 2,5 раза (рис. 3.60 а). Значним чином при введенні глутатіону старим щурам достовірно знижувалися також такі показники окисного стресу як швидкість генерації гідроксильного радикала (у 2,3 раза, $P<0,05$) та вдвічі вміст пероксиду водню (рис. 3.60 б і в).

При вивченні дії глутатіону на базальні значення показників оксидативного стресу у мітохондріях серця дорослих щурів спостерігали лише тенденцію до зменшення (у 2,3 раза) утворення супероксидного радикала.

За дії вільних радикалів відбувається також окисна деградація ліпідів, а саме ПОЛ. Показано, 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 9,6 і 2,8 раза (P<0,05) відповідно (див. табл. 3.17). Дія глутатіону достовірно сприяла зменшенню значень цих показників у 2,8 і 1,6 раза (P<0,05) для ДК і МДА відповідно (рис. 3.61). Отже, за умов введення глутатіону старим тваринам відбувалося зменшення вмісту показників окисного стресу у мітохондріях, що може свідчити про протекторні ефекти цієї сполуки на функціонування мітохондрій.

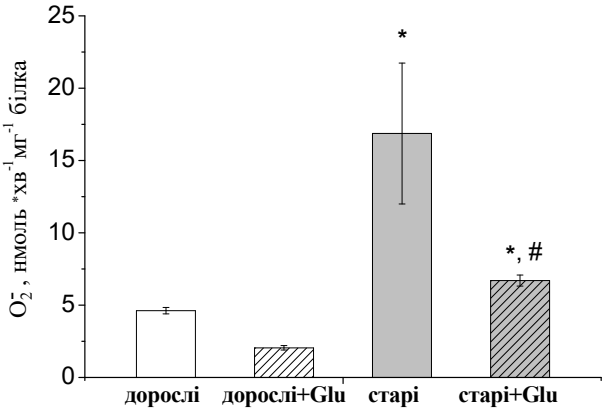
Таблиця 3.17

Зміна біохімічних показників у мітохондріях серця щурів різного віку при введенні глутатіону (52 мг/кг), (M±m, n=7)

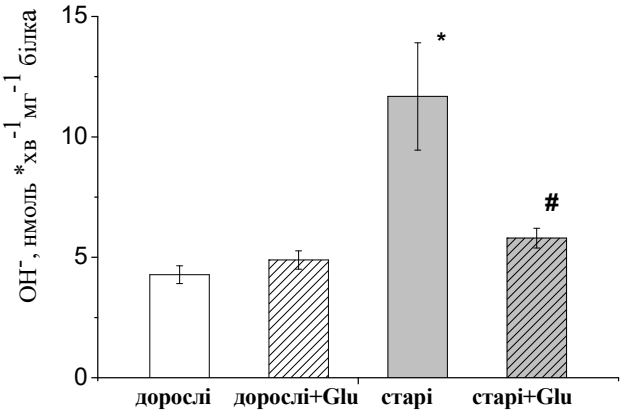
Показник	Дорослі щури	Дорослі щури і дія глутатіону	Старі щури	Старі щури і дія глутатіону
Супероксидний радикал, нмоль ·хв$^{-1}$мг$^{-1}$ білка	4,62±0,22	2,05±0,15	16,87±4,87*	6,70±0,38*,#
Пероксид водню, пмоль·мг$^{-1}$ білка	12,36±3,11	10,98±0,05	25,59±3,24*	11,06±0,10#
Гідроксильний радикал, нмоль ·хв$^{-1}$мг$^{-1}$ білка	4,28±0,37	4,89±0,38	11,68±2,23*	5,8±0,41#
Малоновий діальдегід, нмоль·мг$^{-1}$ білка	2,11±0,15	2,78±0,18	5,93±0,36*	3,71±0,20#
Дієнові кон'югати, нг·мг$^{-1}$ білка	3,73±0,24	2,01±0,07	36,01±4,55*	12,70±4,1#
Мітохондріальна NOS, пмоль ·хв$^{-1}$мг$^{-1}$ білка	3,72±0,21	7,25±0,25*	1,03±0,10*	3,82±0,18*,#
H_2S, нмоль·мг$^{-1}$ білка	4,5±0,24	9,35±0,91	2,28±0,39*	8,62±2,05#

Примітка: *P<0,05 відносно значень у дорослих тварин; #P<0,05 відносно значень у старих щурів

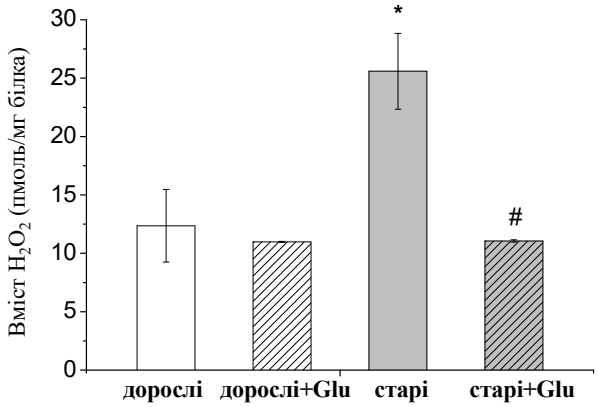
На тлі посилення вільнорадикальних процесів у мітохондріях серця при старінні встановлено зниження більш як втричі активності cNOS, яку ідентифіковано як мітохондріальну NOS (mtNOS), однак при дії глутатіону її активність відновлювалася до значень у дорослих тварин (рис. 3.62).



а

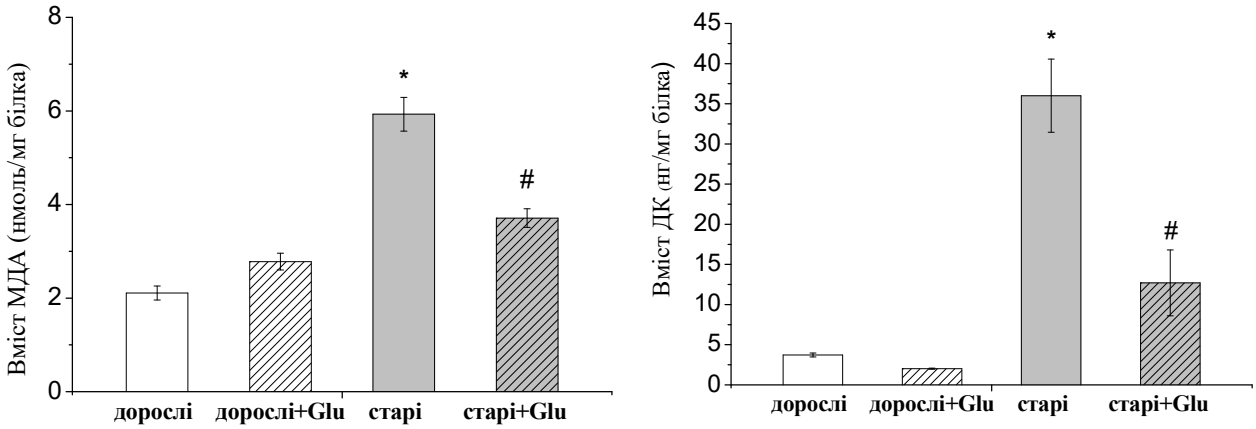


б



в

Рис. 3.60 Вплив глутатіону на швидкість генерації супероксидного (а) та гідроксильного (б) радикалів, та вміст пероксиду водню (в) у мітохондріях серця дорослих та старих старих щурів. *P<0,05 статистично достовірна різниця відносно значень у дорослих щурів; #P <0,05 статистично достовірна різниця відносно значень у старих щурів.



а б

Рис. 3.61 Вплив глутатіону на вміст у мітохондріях серця дорослих та старих старих щурів малонового диальдегіду (а) та дієнових кон'югатів (б). *P<0,05 статистично достовірна різниця відносно значень у дорослих щурів; #P<0,05 статистично достовірна різниця відносно значень у старих щурів.

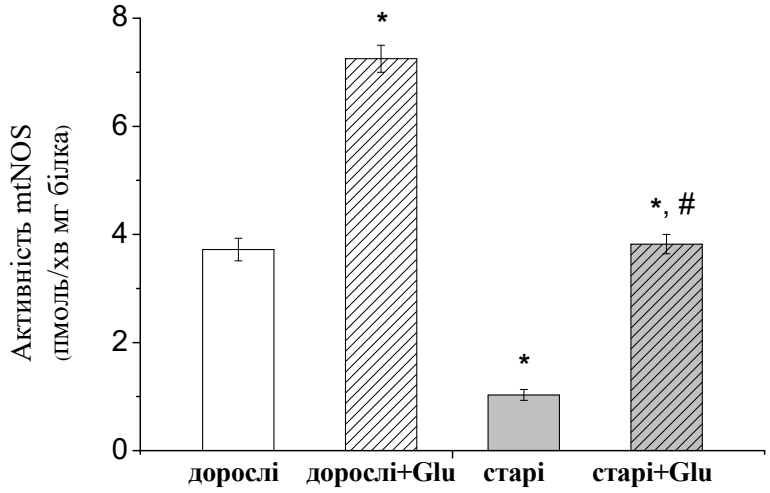


Рис. 3.62 Вплив глутатіону на активність мітохондріальної NO-синтази у серці щурів різного віку. *P<0,05 статистично достовірна різниця відносно значень у дорослих щурів; #P<0,05 статистично достовірна різниця відносно значень у старих щурів.

Також показана здатність досліджуваного антиоксиданта збільшувати активность цього фермента у нормі. При попередньому одноразовому введенні глутатіону зростає концентрація ендогенного сірководню як у старих щурів (у 3,8 раза порівняно зі зниженим його вмістом у цих тварин), так і вдвічі у дорослих (рис. 3.63).

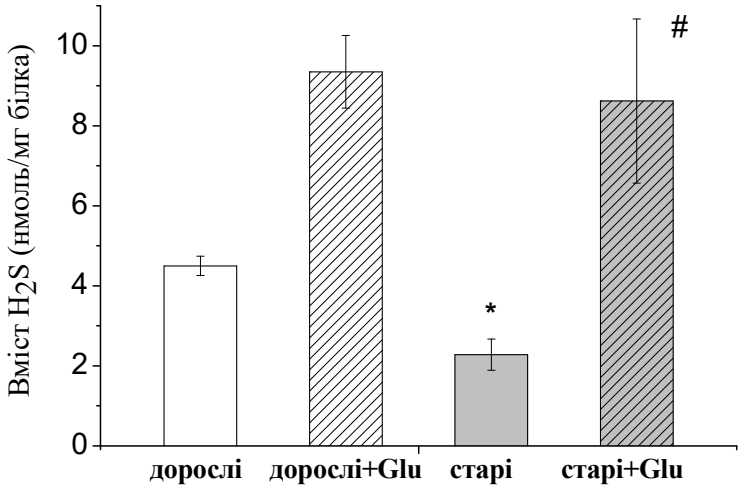


Рис. 3.63 Вплив глутатіону на вміст H_2S у мітохондріях серця щурів різного віку. *P<0,05 статистично достовірна різниця відносно значень у дорослих щурів; #P<0,05 статистично достовірна різниця відносно значень у старих щурів.

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 індукаваного окисним стресом пермеабілізації лізосомальних мембран [185].

Отже, важливим наслідком дії глутатіону у вікових тварин було значне достовірне зниження швидкості генерації супероксидного та гідроксильного радикалів (у 2,5 і 2,3 раза відповідно), та вмісту пероксиду водню (вдвічі) у мітохондріях серця, а також таких показників ПОЛ, як дієнові кон'югати та малоновий діальдегід (у 2,8 і 1,6 раза відповідно). Отже, введення глутатіону старим щурам призводило до швидкого уповільнення окисних процесів. Аналізуючи отримані результати, можна припустити участь глутатіону у мітопротекторних механізмах, які запобігають дисфункції органелл, що може бути важливим регуляторним фактором у попередженні серцево-судинних захворювань.

Таким чином, аналіз біохімічних показників у тканині серця, у мітохондріях серця, тканині судин та плазмі крові свідчить, що підвищення експресії $К_{АТФ}$-каналів у старих модифікованих тварин асоціюється зі зниженням оксидативного стресу, що полягає в пригніченні утворення супероксид-аніона, пероксиду водню і гідроксильного радикала, зниженні утворення продуктів перекисного окиснення ліпідів – дієнових кон'югатів і малонового діальдегіду, зниженні вмісту вільної арахідонової кислоти та її похідних – лейкотриєну $С_4$ і тромбоксану $В_2$, утворення яких супроводжується продукуванням супероксиду, а також підвищенням протекторного конститутивнго синтезу NO (в т. ч. і в мітохондріях), та навпаки, пригніченням надлишкового індуцибельного та реулітизаційного синтезу NO, та пригніченні деградації L-аргініну аргіназою, що зберігає субстрат для NO-синтаз. Певним чином змінювався вміст нітрит- та нітрат-аніонів та низькомолекулярних нітрозотіолів.

ВИСНОВКИ

1. Розроблено нові методи підвищення експресії АТФ-чутливих калієвих каналів клітинних мембран, за допомогою електрофізіологічних та тензометричних експериментів на ізольованих кардіоміоцитах та судинних смужках відповідно показано зростання ефектів через $К_{АТФ}$-канали, що може свідчити про підвищення їх щільності на клітинних мембранах, результати експериментів з ішемією-реперфузією ізольованого серця щурів та дослідження чутливості мітохондріальної пори до її індукторів можуть свідчити про підвищення кардіозахисту у модифікованих тварин, аналіз біохімічних показників вказує на асоціацію підвищення експресії $К_{АТФ}$-каналів у старих тварин зі зниженням оксидативного стресу та позитивними змінами у системі оксиду азоту.

2. У молекулярно-генетичних дослідженнях експериментально перевірено сім потенційних моделей індукції експресії генів KCNJ8, KCNJ11, ABCC8 та ABCC9, що кодують Kir6.1, Kir6.2, SUR1 і SUR2 субодиниці $К_{АТФ}$-каналів відповідно у серці дорослих та старих щурів. Розроблено дві моделі підвищення експресії $К_{АТФ}$-каналів судинного і серцевого типу сарколемальних та мітохондріальних клітинних мембран, які полягають у застосуванні піридоксаль-5-фосфату у дозі 0,7 мг/кг один раз на добу протягом 14 днів та внутрішньоочеревинне введення глутатіону у дозі 52 мг/кг, що може сприяти посиленню ендогенних захисних механізмів.

3. Вперше показано, що пероральне введення піридоксаль-5-фосфату дорослим щурам майже вдвічі підвищувало експресію мРНК пороутворюючої Kir6.2 та регуляторної SUR2 субодиниць кардіоспецифічних сарколемальних $К_{АТФ}$-каналів серцевого типу, та у 1,5 раза експресію субодиниці SUR1 $К_{АТФ}$-каналів мітохондрільного типу.

4. Вперше показано, що введення піридоксаль-5-фосфату старим щурам

підвищувало у 3,6 раза експресію пороутворюючої субодиниці Kir6.1 $К_{АТФ}$-каналів судинного типу та у 2,4 раза регуляторної SUR2 субодиниці сарколемальних $К_{АТФ}$-каналів судинного і серцевого типу.

5. Вперше показано, що внутрішньоочеревинне введення глутатіону старим щурам у дозі 52 мг/кг за одну годину до відбирання зразків достовірно підвищувало у 9,3 та 2,6 раза відповідно експресію генів KCNJ8 і KCNJ11, що кодують субодиниці Kir6.1 і Kir6.2 сарколемальних $К_{АТФ}$-каналів судинного і серцевого типу та підвищувало у 13,1 раза експресію регуляторної субодиниці $К_{АТФ}$-каналу мітохондрільного типу SUR1.

6. В електрофізіологічних експериментах по реєстрації мембранних струмів через $К_{АТФ}$-канали ізольованих неонатальних кардіоміоцитів щура за допомогою методу "patch-clamp" в конфігурації "ціла клітина" в кардіоміоцитах вперше показано, що за впливу піридоксаль-5-фосфату відбувається підвищення трансмембранних струмів, опосередкованих $К_{АТФ}$-каналами (I_{KATP}), майже утричі, що, відповідно, може свідчити про збільшення щільності $К_{АТФ}$-каналів на клітинній мембрані.

7. Вперше показано, що пероральне введення піридоксаль-5-фосфату старим щурам значно посилює амплітуду вазодилататорних реакцій кільцевих смужок аорти у відповідь на активацію $К_{АТФ}$-каналів флокаліном у концентраціях від 0,1-100 мкмоль/л, з максимальним ефектом майже вдвічі, що може свідчити про зростання утворення за даних умов $К_{АТФ}$-каналів судинного типу (Kir6.1/SUR2B), тобто про підвищення мембранної щільності цих каналів, та збігається з нашими результатами молекулярно-генетичних досліджень про зростанняння у них експресії пороутворюючих Kir6.1 субодиниць судинних $К_{АТФ}$-каналів та SUR2 регуляторних субодиниць $К_{АТФ}$-каналів як судинного, так і серцевого типу.

8. В експериментах з ішемією-реперфузією ізольованого серця щурів

вивчено кардіопротекторні ефекти у тварин з підвищеною експресією $К_{АТФ}$ каналів. Вперше показано, що у тварин із збільшеною експресією Kir6.1 та SUR2 субодиниць $К_{АТФ}$-каналів за допомогою піридоксаль-5-фосфату відновлення скоротливої діяльності та коронарного потоку під час реперфузії ішемізованого серця було значно кращим, ніж в контрольних тварин. Зокрема, тиск у лівому шлуночку на 5-ту хвилину реперфузії відновлювався на 50% краще, ніж в контрольній групі тварин. На кінець реперфузії (40 хв) цей показник вже був майже вдвічі, а кінцево-діастолічний тиск майже втричі краще, ніж в контрольній групі. Пригнічення цих ефектів специфічним інгібітором $К_{АТФ}$-каналів глібенкламідом свідчить, що принаймні частково ці захисні ефекти викликані активацією $К_{АТФ}$-каналів.

9. В експериментах з ішемією-реперфузією ізольованого серця щурів з підвищеною експресією Kir6.1 і Kir6.2 субодиниць $К_{АТФ}$ каналів за допомогою глутатіону відновлення ішемізованого серця було достовірно кращим, ніж в контрольній групі тварин лише на ранній стадії реперфузії. Зокрема, тиск у лівому шлуночку на 5-ту і 10-ту хвилини реперфузії відновлювався на 52 та 55% краще, ніж в контрольній групі тварин. Кінцево-діастолічний тиск на 5-ту хв реперфузії був вдвічі нижче, а коронарний потік, навпаки, в 1,5 раза більший, ніж в контрольній групі. Також у модифікованих тварин відбувалося збільшення ефективності використання спожитого кисню.

10. В експериментах на ізольованих мітохондріях показано, що застосування піридоксаль-5-фосфату, глутатіону та нікотинаміду пригнічувало Ca^{2+}-індуковане відкривання мітохондріальної пори через зменшення чутливості до індуктора її відкривання – йонів кальцію.

11. Аналіз біохімічних показників у тканині серця, у мітохондріях серця, тканині судин та плазмі крові може свідчити про асоціацію підвищення

експресії $К_{АТФ}$-каналів у старих тварин зі зниженням оксидативного стрессу, що полягає в пригніченні утворення супероксид-аніона, пероксиду водню і гідроксильного радикала, зниженні утворення продуктів перекисного окиснення ліпідів – дієнових кон'югатів і малонового діальдегіду, зниженні вмісту вільної арахідонової кислоти та її похідних – лейкотриєну $С_4$ і тромбоксану $В_2$, утворення яких супроводжується продукуванням супероксиду, а також підвищенням протекторного конститутивнго синтезу NO (в т. ч. і в мітохондріях), та навпаки, пригніченням надлишкового індуцибельного та реулітизаційного синтезу NO, та пригніченні деградації L-аргініну аргіназою, що зберігає субстрат для NO-синтаз. Певним чином змінювався вміст нітрит- та нітрат-аніонів та низькомолекулярних нітрозотіолів.

СПИСОК ВИКОРИСТАНОЇ ЛІТЕРАТУРИ

1. Горбась І.М. Фактори ризику серцево-судинних захворювань: поширеність і контроль. Медичний портал «здоровя України». Опубліковано 28.03.2015. Режим доступу: www.health-ua/com
2. Дудник С. Серцево-судинні захворювання в Україні: прогнози — невтішні. Медична газета «Ваше здоров'я», Кардіологія. Опубліковано 09.01.2015. Режим доступу: www.vz.kiev.ua.
3. Gong Feng, Kenneth I Zheng, Qin-Qin Yan, Rafael S Rios , Giovanni Targher , Christopher D Byrne, Sven Van Poucke, Wen-Yue Liu, Ming-Hua Zheng. COVID-19 and Liver Dysfunction: Current Insights and Emergent Therapeutic Strategies. J Clin Transl Hepatol. 2020 Mar 28;8(1):18-24.
4. Noma A. ATP-regulated K^+ channels in cardiac muscle. Nature. 1983 Sep 8-14;305(5930):147-8.
5. Nichols CG. KATP channels as molecular sensors of cellular metabolism. Nature. 2006; 440(7083): 470-6.
6. 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.
7. Olson TM, Terzic A. Human KATP channelopathies: diseases of metabolic homeostasis. Pflugers Arch. 2010 Jul;460(2):295-306.
8. Teshima Y, Akao M, Li RA, Chong TH, Baumgartner WA, Johnston MV, Marbán E. Mitochondrial ATP-sensitive potassium channel activation protects cerebellar granule neurons from apoptosis induced by oxidative stress. Stroke. 2003 Jul;34(7):1796-802.
9. Wickenden AD. Potassium channels as anti-epileptic drug targets. Neuropharmacology. 2002 Dec;43(7):1055-60.
10. Harel S, Cohen AS, Hussain K, Flanagan SE, Schlade-Bartusiak K, Patel M, et al. Alternating hypoglycemia and hyperglycemia in a toddler with a

homozygous p.R1419H ABCC8 mutation: an unusual clinical picture. J Pediatr Endocrinol Metab. 2015 Mar;28(3-4):345-51.

11. Strutynskyi RB. Protective properties of opening ATP-sensitive potassium channels. Fiziol Zh. 2019;65(3):74-86.
12. Kochi AN, Tagliari AP, Forleo GB, Fassini GM, Tondo C. Cardiac and arrhythmic complications in patients with COVID-19. J Cardiovasc Electrophysiol. 2020 May;31(5):1003-8.
13. 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.
14. 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.
15. 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.
16. Budas GR, Jovanović S, Crawford RM, Jovanović A. Hypoxia-induced preconditioning in adult stimulated cardiomyocytes is mediated by the opening and trafficking of sarcolemmal K_{ATP} channels. FASEB J. 2004;18:1046-8.
17. Ranki HJ, Budas GR, Crawford RM, Jovanović A. Gender-specific difference in cardiac ATP-sensitive K^+ channels. J Am Coll Cardiol. 2001;38:906-15.
18. 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-kappaB-dependent signaling. J Biol Chem. 2010 Jan 29;285(5):3021-9.
19. 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.

20. 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 KATP channel expression in vascular smooth muscle cells of spontaneously hypertensive rats. J Mol Med (Berl). 2015 Apr;93(4):439-55.
21. Ashcroft FM, Gribble FM. Correlating structure and function in ATP-sensitive K+ channels. Trends Neurosci. 1998 Jul;21(7):288-94.
22. Carrasco AJ, Dzeja PP, Alekseev AE, Pucar D et al. Adenylate kinase phosphotransfer communicates cellular energetic signals to ATP-sensitive potassium channels. Proc Acad Natl Sci USA. 2001 Jun 19;98(13):7623-8.
23. Crawford RM, Ranki HJ, Botting CH, Budas GR, Jovanovic A. Creatine kinase is physically associated with the cardiac ATP-sensitive K^+ channel in vivo. FASEB J. 2002 Jan;16(1):102-4.
24. Russell M Crawford , Grant R Budas, Sofija Jovanović, Harri J Ranki, Timothy J Wilson, Anthony M Davies, Aleksandar Jovanović. M-LDH serves as a sarcolemmal K_{ATP} channel subunit essential for cell protection against ischemia. EMBO J. 2002 Aug 1;21(15):3936-48.
25. Jovanović S, Du Q, Crawford RM, Budas GR, Stagljar I, Jovanović A. Glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase serves as an accessory protein of the cardiac sarcolemmal K_{ATP} channel. EMBO Rep. 2005 Sep;6(9):848-52.
26. de Araujo ED. and Kanelis V. Successful development and use of a thermodynamic stability screen for optimizing the yield of nucleotide binding domains. Protein Expr Purif. 2014;103:38-47.
27. Zhou M, He HJ, Tanaka O, Zhouet M.al. Different localization of ATP sensitive K+ channel subunits in rat testis. Anat Rec (Hoboken). 2011 Apr;294(4):729-37.
28. Nichols C.G. KATP channels and cardiovascular disease: suddenly a syndrome. Nichols CG[1], Singh GK, Grange DK. Circ Res. 2013 Mar 29;112(7):1059-72.

29. Malester B, Tong X, Ghiu I, et al. Transgenic expression of a dominant negative KATP channel subunit in the mouse endothelium: effects on coronary flow and endothelin-1 secretion. FASEB J 2007;21:2162-72.
30. Katnik C, Adams DJ. Characterization of ATP-sensitive potassium channels in freshly dissociated rabbit aortic endothelial cells. Am J Physiol. 1997;272:H2507–H2511.
31. Mederos y Schnitzler M, Derst C, Daut J, Preisig-Muller R. ATPsensitive potassium channels in capillaries isolated from guinea-pig heart. J Physiol. 2000;525 (Pt 2):307-17.
32. Miki T, Suzuki M., Shibasaki T. et al. Mouse model of Prinzmetal angina by disruption of the inward rectifier Kir6.1. Nat Med. 2002; 8 (5):466-72.
33. Morrissey A, Rosner E, Lanning J, et al. Immunolocalization of KATP channel subunits in mouse and rat cardiac myocytes and the coronary vasculature. BMC Physiol 2005;5:1.
34. Flagg TP, Kurata HT, Masia R, Caputa G, Magnuson MA, Lefer DJ, Coetzee WA, Nichols CG. Differential structure of atrial and ventricular KATP: atrial KATP channels require SUR1. Circ Res. 2008;103:1458-65.
35. Glukhov AV, Flagg TP, Fedorov VV, Efimov IR, Nichols CG. Differential K(ATP) channel pharmacology in intact mouse heart. J Mol Cell Cardiol. 2010; 48 (1): 152-160.
36. Fedorov VV, Glukhov AV, Ambrosi CM, Kostecki G, Chang R, Janks D, Schuessler RB, Moazami N, Nichols CG, Efimov IR. Effects of KATP channel openers diazoxide and pinacidil in coronary-perfused atria and ventricles from failing and non-failing human hearts. J Mol Cell Cardiol. 2011;51:215-25.
37. Han X, Light PE, Giles WR, French RJ. Identification and properties of an ATP-sensitive K+ current in rabbit sino-atrial node pacemaker cells. J Physiol (Lond). 1996; 490(2):337-50.
38. Fukuzaki K, Sato T, Miki T, Seino S, Nakaya H. Role of sarcolemmal ATP-sensitive K+ channels in the regulation of sinoatrial node automaticity: an evaluation using Kir6.2-deficient mice. J Physiol (Lond). 2008;586:2767-78.

39. Barsukevich V, Basalay M, Sanchez J, Mrochek A, Whittle J, Ackland GL, Gourine AV, Gourine A. Distinct cardioprotective mechanisms of immediate, early and delayed ischaemic postconditioning. Basic Res Cardiol. 2015 Jan;110(1):452-62.
40. Hanley PJ, Daut J. K(ATP) channels and preconditioning: a re-examination of the role of mitochondrial K(ATP) channels and an overview of alternative mechanisms. J Mol Cell Cardiol. 2005 Jul;39(1):17-50.
41. Penna C, Pasqua T Perrelli MG, Pagliaro P, Cerra MC, Angelone T. Postconditioning with glucagon like peptide-2 reduces ischemia/reperfusion injury in isolated rat hearts: role of survival kinases and mitochondrial KATP channels. Basic Res Cardiol. 2012 Jul;107(4):272.
42. Rana A, Goyal N, Ahlawat A, Jamwal S, Reddy B, Sharma S. Mechanisms involved in attenuated cardio-protective role of ischemic preconditioning in metabolic disorders. Perfusion. 2015 Mar;30(2):94-105.
43. Liu Y, Ren G, O'Rourke Be, Marbon E, Seharaseyon J. Pharmacological comparison of native mitochondrial K(ATP) channels with molecularly defined surface K(ATP) channels. Mol Pharmacol. 2001;59: 225-30.
44. Foster DB, Ho AS, Rucker JJ, Garlid AO, Chen L, Sidor A, Garlid KD, O'Rourke B. Mitochondrial ROMK Channel Is a Molecular Component of MitoKATP. Circ Res. 2012;111:446-54.
45. Ardehali H, O'Rourke B, Marbбn E. Cardioprotective role of the mitochondrial ATP-binding cassette protein 1. Circ Res. 2005;97: 740-42.
46. Ardehali H, Chen Z, Ko Y, Mejна-Alvarez R, Marbбn E. Multiprotein complex containing succinate dehydrogenase confers mitochondrial ATP-sensitive K+ channel activity. Proc Natl Acad Sci USA. 2004;101:11880-5.
47. Quesada I, Rovira JM, Martin F, Roche E, Nadal A, Soria B. Nuclear KATP channels trigger nuclear Ca^{2+} transients that modulate nuclear function. Proc Natl Acad Sci USA. 2002;99:9544-9.
48. Salari S, Ghasemi M, Fahanik-Babaei J, Saghiri R, Sauve R, Eliassi A. Evidence for a KATP Channel in Rough Endoplasmic Reticulum (rerKATP Channel) of

Rat Hepatocytes/ PLoS One. 2015;10 (5): e0125798.

49. Ozanne SE, Guest PC, Hutton JC, Hales CN. Intracellular localization and molecular heterogeneity of the sulphonylurea receptor in insulin-secreting cells. Diabetologia. 1995;38:277-82.
50. Varadi A, Grant A, McCormack M, Nicolson T, Magistri M, Mitchell KJ, Halestrap AP, Yuan H, Schwappach B, Rutter GA. Intracellular ATP-sensitive K+ channels in mouse pancreatic ß cells: against a role in organelle cation homeostasis. Diabetologia. 2006;49:1567-77.
51. Kelly ML, Abu-Hamdah R, Jeremic A, Cho SJ, Ilie AE, Jena BP. Patch clamped single pancreatic zymogen granules: direct measurements of ion channel activities at the granule membrane. Pancreatology. 2005;5:443-9.
52. Hiraoka M, Furukawa T. Functional modulation of cardiac ATP-sensitive K^+ channels. News Physiol Sci. 1998 Jun;13:131-7.
53. Enkvetchkul D and Nichols CG. Gating mechanism of K_{ATP} channels: function fits form. J Gen Physiol. 2003; 122:471-80.
54. Alekseev AE, Hodgson DM, Karger AB. ATP-sensitive K^+ channel channel/enzyme multimer: Metabolic gating in the heart. J Mol Cell Cardiology. 2005 Jun;38(6):895-905.
55. Moreau C., Prost A-L., Derand R., Vivaudou M. SUR, ABC proteins targeted by KATP channels openers // J Molec and Cell Cardiology .-2005 .-Vol.38.- P.951-63.
56. Baukrowitz N, Shulte U, Oliver D, Herlitze S, Krauter T, Tucker SJ et al. PIP2 and PIP as determinants for ATP ingibition of K_{ATP} channels. Science. 1998;282:1141-4.
57. Campbell J.D., Sansom M.S., Ashcroft F.M. Potassium channel regulation. EMBO Rep. 2003; 4(11):1038-42.
58. Andersson KE, Arner A. Urinary bladder contraction and relaxation: physiology and pathophysiology. Physiol Rev 2004;84:935-86.
59. Terzic A, Jahangir A, Kurachi Y. Cardiac ATP-sensitive K^+ channes: regulation by intracellular nucleotides and K^+ channel-opening drugs. Am. J. Physiol.

1995; 269 (Cell. Physiol. 38)(3): C525-C545.

60. Ashcroft FM. ATP-sensitive potassium channelopathies: focus on insulin secretion. J Clin Invest. 2005;115:2047-58.
61. Reyes S, Kane GC, Miki T, Seino S, Terzic A. KATP channels confer survival advantage in cocaine overdose. Mol Psychiatry. 2007;12:1060-1.
62. Vivaudou M, Moreau CJ, Terzic A. Structure and function of ATP-sensitive K+ channels. In: Kew J, Davies C, editors. Ion channels: from structure to function. Oxford: Oxford University Press, 2009:454-73.
63. Blondeau N, Plamondon H, Richelme C, Heurteaux C, Lazdunski M. K-ATP channel openers, adenosine agonists and epileptic preconditioning are stress signals inducing hippocampal neuroprotection. Neurosci 2000;100:465-74.
64. Kis B, Nagy K, Snipes JA, Rajapakse NC, Horiguchi T, Grover GJ, et al. The mitochondrial K(ATP) channel opener BMS-191095 induces neuronal preconditioning. Neuroreport 2004;15:345-9.
65. Wickenden AD. Potassium channels as anti-epileptic drug targets. Neuropharmacology. 2002; 43:1055-60.
66. Teshima Y, Akao M, Li RA, Chong TH, Baumgartner WA, Johnston MV, Marban E. Mitochondrial ATP-sensitive potassium channel activation protects cerebellar granule neurons from apoptosis induced by oxidative stress. Stroke. 2003;34 (7): 1796-802.
67. Chi X, Sutton ET, Hellermann G, Price JM. Potassium channel openers prevent beta-amyloid toxicity in bovine vascular endothelial cells. Neurosci. Lett. 2000; 290:9-12
68. Tricarico D, Servidei S, Tonali P, Jurkat-Rott K, Camerino DC. Impairment of skeletal muscle ATP-sensitive K+ channels in patients with hypokalemic periodic paralysis. J Clin Invest. 1999 Mar;103(5):675-82.
69. Campbell VC, Welch SP. The role of minoxidil on endogenous opioid peptides in the spinal cord: a putative co-agonist relationship between K-ATP openers and opioids. Eur J Pharmacol. 2001 Apr 6;417(1-2):91-8.

70. Tinker A, Aziz Q, Li Y, Specterman M. ATP-Sensitive Potassium Channels and Their Physiological and Pathophysiological Roles. Compr Physiol. 2018 Sep 14;8(4):1463-1511.

71. Kang YM, Zhang ZH, Yang SW, Qiao JT, Dafny N. ATP-sensitive K+ channels are involved in the mediation of intrathecal norepinephrine- or morphine-induced antinociception at the spinal level: a study using EMG planimetry of flexor reflex in rats. Brain Res Bull. 1998;45(3):269-73.

72. Robles LI, Barrios M, Baeyens JM. ATP-sensitive K+ channel openers inhibit morphine withdrawal. Eur J Pharmacol. 1994 Jan 4;251(1):113-5.

73. Bonfanti DH, Alcazar LP, Arakaki PA, Martins LT, Agustini BC, de Moraes Rego FG, Frigeri HR. ATP-dependent potassium channels and type 2 diabetes mellitus. Clin. Biochem. 2015; 48(7-8):476-82.

74. Rahman SA, Nessa A, Hussain K. Molecular mechanisms of congenital hyperinsulinism. J Mol Endocrinol. 2015 Apr;54(2):R119-R129.

75. Meng Xinke. A Clinical Study on Levosimendan Improvement of Prognosis of ARDS Patients by Optimizing Pulmonary Hemodynamics. https://www.clinicaltrials.gov/ct2/show/NCT04020003.

76. Fozard JR, Manley PW. Potassium channel openers: agents for the treatment of airways hyperreactivity. In: Hansel TT, Barnes PJ, editors. New drugs for asthma, allergy and COPD. Prog. Respir. Res. 2001: 77-80.

77. Fey TA, Gopalakrishnan M, Strake JG, et al. Effects of ATP-sensitive K+ channel openers and tolterodine on involuntary bladder contractions in a pig model of partial bladder outlet obstruction. Neurourol Urodyn. 2003;22:147-55.

78. Bella AJ, Brock GB. Intracavernous pharmacotherapy for erectile dysfunction. Endocrine. 2004; 23:149-55.

79. Filipets ND. Filipets OO. The state of homeostatic function of the kidneys after repeated activation of potassium channels with flocalin at salt load. Med Ukraine. 2012;1-2:66-9.

80. Venkateswarlu K, Giraldi A, Zhao W, Wang HZ, Melman A, Spektor M, et al. Potassium channels and human corporeal smooth muscle cell tone: diabetes and relaxation of human corpus cavernosum smooth muscle by adenosine triphosphate sensitive potassium channel openers. J Urol 2002;168:355-61.

81. Messenger AG, Rundegren J. Minoxidil: mechanisms of action on hair growth. Br J Dermatol. 2004;150:186-94.

82. Ozcan C, Bienengraeber M, Dzeja PP, Terzic A. Potassium channel openers protect cardiac mitochondria by attenuating oxidant stress at reoxygenation. Am J Physiol Heart Circ Physiol. 2002 Feb;282(2):H531-9.

83. Ertracht O, Malka A, Atar S, Binah O. The mitochondria as a target for cardioprotection in acute myocardial ischemia. Pharmacol Ther. 2014;142 (1): 33-40.

84. Strutyns'kyĭ RB, Kotsiuruba AV, Neshcheret OP, Rovenets' RA, Moĭbenko 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.

85. Moybenko OO, Strutynskyi RB, Yagupolskii LM, Mohort MA, Shalamai AS. Organization of industrial production of flokalin — new myotropic spasmolytic and cardioprotector. Nauka Innov. 2013; 9(1): 55-63.

86. J A Frank, J-F Pittet, C Wray, M A Matthay. Protection from experimental ventilator-induced acute lung injury by IL-1 receptor blockade. Thorax. 2008 Feb;63(2):147-53.

87. Strutyns'kyĭ RB, Kotsiuruba AV, Rovenets' RA, Strutyns'ka NA, Iagupols'kyĭ IuL, Sagach VF, Moĭbenko 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.

88. Zhang L, Cao S, Deng S, Yao G, Yu T. Ischemic postconditioning and pinacidil suppress calcium overload in anoxia-reoxygenation cardiomyocytes via down-regulation of the calcium-sensing receptor. Peer J. 2016 Nov 1;4:e2612.

89. Aggarwal S, Randhawa PK, Singh N, Jaggi AS. Role of ATP-Sensitive Potassium Channels in Remote Ischemic Preconditioning Induced Tissue Protection. J Cardiovasc Pharmacol Ther. 2017 Sep;22(5):467-75.
90. Nakaya H. Role of ATP-sensitive K+ channels in cardiac arrhythmias. J Cardiovasc Pharmacol Ther. 2014;19(3):237-243.
91. Strutyns'kyĭ RB. Cardioprotective effects of fluorine-containing activator of adenosine triphosphate-dependent potassium channels flokalin. Fiziol Zh. 2009;55(4):83-90.
92. Das B, Sarkar C. MitochondrialKATP channel activation is important in the antiarrhythmic and cardioprotective effects of non-hypotensive doses of nicorandil and cromakalim during ischemia/reperfusion: a study in an intact anesthetized rabbit model. Pharmacol Res. 2003;47:447-61.
93. Flagg TP, Nichols CG. Sarcolemmal K_{ATP} channels: what do we really know? J Mol Cell Cardiol. 2005;39:61-70.
94. Jahandir A, Terzic A. K_{ATP} channel therapeutics at the bedsise. J Mol Cell Cardiol. 2005 Jul;39(1):99-112.
95. Jang Z, Shi G, Wang H, Liu K, Liu Y. Electrophysiologic effects of nicorandil on the guinea pig long QT1 syndrome model. J Cardiovasc Electrophysiol. 2004 Jul;15(7):815-20.
96. Ueda H, Nakayama Y, Tsumura K, Yoshimaru K, Hayashi T, Yoshikawa J. Intravenous nicorandil can reduce the occurrence of ventricular fibrillation and QT dispersion in patients with successful coronary angioplasty in acute myocardial infarction. Can J Cardiol. 2004;20:625-9.
97. Liu XK, Yamada S, Kane GC, AlekseevAV, Hodgson DM, O'Cochlain F, Jahangir A, Miki T, Seino S, Terzic A. Genetic disruption of Kir.6.2, the pore-forming subunit of ATP-sensitive K^+ channels, predisposes to catecholamine-indused ventricular dysrhythmia. Diabetes. 2004 Dec;53 Suppl 3:S165-8.
98. Sun JM, Wang CM, Guo Z, Hao YY, Xie YJ, Gu J, Wang AL. Reduction of isoproterenol-induced cardiac hypertrophy and modulation of myocardial connexin43 by a KATP channel agonist. Mol Med Rep. 2015;11(3):1845-50.

99. Strutyns'kyĭ RB, Rovenets' RA, Neshcheret OP, Tumanovs'ka LV, Boĭchuk TM, Dzhuran BV, Moĭbenko OO. Effect of medical form of flocalin on the course of myocardial reperfusion injury. Fiziol Zh. 2011;57(1):55-65.
100. Mazur I, Voronkov L, Dosenko V, Strutynskyi R, Gorovenko N. Impact of KCNJ11 gene polymorphisms of ATP-sensitive potassium channel on left ventricular end-diastolic volume and mass in chronic systolic heart failure. Europ J Heart Failure. 2016;18(1):284.
101. Strutynskyi RB, Neshcheret AP, Tumanovska LV, Rovenets RA, Moibenko AA Cardioprotective effects of flocalin in *in vivo* experiments: influence of the hemodynamic and on the damage of myocardium under ischemia-reperfusion. Int J Physiol Pathophysiol. 2010;1(3):211-8.
102. Park WS Alteration of ATP-sensitive K+ channels in rabbit aortic smooth muscle during left ventricular hypertrophy. Park WS, Hong DH, Son YK, Kim MH, Jeong SH, Kim HK, Kim N, Han J. Am J Physiol Cell Physiol. 2012 303(2):C170-178.
103. Muntean DM, Kiss L, Jost N, Baczko I. ATP-sensitive potassium channel modulators and cardiac arrhythmias: an update. Curr Pharm Des. 2015;21(8):1091-102.
104. Konstantinov IE, Li J, Cheung MM, Shimizu M, Stokoe J, Kharbanda RK, Redington AN. Remote ischemic preconditioning of the recipient reduces myocardial ischemia-reperfusion injury of the denervated donor heart via a Katp channel-dependent mechanism. Transplantation. 2005 Jun 27;79(12):1691-5.
105. Smith KJ, Chadburn AJ, Adomaviciene A, Minoretti P, Vignali L, Emanuele E, Tammaro P. Coronary spasm and acute myocardial infarction due to a mutation (V734I) in the nucleotide binding domain 1 of ABCC9 Int J Cardiol. 2013 Oct 9;168(4):3506-13.
106. Rosenblum WI. ATP-sensitive potassium channels in the cerebral circulation. Stroke. 2003 Jun;34(6):1547-52.
107. Strutynsk'kyĭ R B, Moĭbenko OO. Modeling of K+ATP channel activity in normotensive and hypertensive animals. Fiziol. Zh. 2000; 46(6):54-60.

108. Sica DA. Minoxidil: an underused vasodilator for resistant or severe hypertension. J Clin Hypertens (Greenwich). 2004 May;6(5):283-7.
109. Saito S, Mizumura T, Takayama T, Honye J, Fukui T, Kamata T, Moriuchi M, Hibiya K, Tamura Y, Ozawa Y, et al. Antiischemic effects of nicorandil during coronary angioplasty in humans. Cardiovasc Drugs Ther. 1995 Mar;9 Suppl 2:257-63.
110. Bonev AD, Nelson MT. ATP-sensitive potassium channels in smooth muscle cells from guinea-pig urinary bladder. Am J Physiol. 1993 May;264(5 Pt 1):C1190-200.
111. Teramoto N, McMurray G, Brading AF. Effects of levcromacalim and nucleotide diphosphates on glibenclamide-sensitive K^+ channels in pig uretal myocytes. Br J Pharmacol. 1997 Apr;120(7):1229-40.
112. Nelson MT, Quayle JM. Physiological roles and properties of potassium channels in arterial muscle. Am J Physiol. 1995 Apr;268(4 Pt 1):C799-822.
113. Quayle JM, Nelson MT, Standen NB. ATP-sensitive and inwardly rectifying potassium channels in smooth muscle. Physiol Rev. 1997 Oct;77(4):1165-232.
114. Clapp LH, Gurney AM. ATP-sensitive K+ channels regulate resting potential of pulmonary arterial smooth muscle cells. Am J Physiol. 1992 Mar;262(3 Pt 2):H916-20.
115. Clapp LH, Gurney AM, Standen NB, Langton PD. Properties of the ATP-sensitive K+ current activated by levcromakalim in isolated pulmonary arterial myocytes. J Membr Biol. 1994 Jun;140(3):205-13.
116. Xu X, Lee KS. Characterization of the ATP-inhibited K^+ current in canine coronary smooth muscle cell. Pflugers Arch. 1994 May;427(1-2):110-20.
117. Yokoshiki H, Sunagawa M, Seki T, Sperelakis N. ATP-sensitive K^+ channels in pancreatic, cardiac, and vascular smooth muscle cells. Am J Physiol. 1998 Jan;274(1 Pt 1):C25-37.
118. Beech DJ, Zhang H, Nakao K, Bolton TB. K channel activation by nucleotide diphosphates and its inhibition by glibenclamide in vascular smooth muscle cells. Br J Pharmacol. 1993 Oct;110(2):573-82.

119. Noack T, Deitmer P, Edwards G, Weston AH. Characterization of potassium currents modulated by BRL 38227 in rat portal vein. Br J Pharmacol. 1992 Jul;106(3):717-26.

120. Sanada S, Kitakaze M, Asanuma H, Harada K, Ogita H, Node K, Takashima S, Sakata Y, Asakura M, Shinozaki Y, Mori H, Kuzuya T, Hori M. Role of mitochondrial and sarcolemmal K_{ATP} channels in ischemic preconditioning of the canine heart. Am J Physiol Heart Circ Physiol. 2001 Jan;280(1):H256-63.

121. Pyvovar SM, Strutyns'kyĭ RB, Iagupol's'kyĭ LM, Moĭbenko OO. Study of the mechanism of action of novel fluoro-containing analogs of diazoxide on the vascular tonus. Fiziol Zh. 2004;50(2):27-33.

122. Voitychuk OI, Strutynskyi RB, Yagupolskii LM, Tinker A, Moibenko OO, Shuba YM. Sarcolemmal cardiac K(ATP) channels as a target for the cardioprotective effects of the fluorine-containing pinacidil analogue, flocalin. Br J Pharmacol. 2011 Feb;162(3):701-11.

123. Jones SP, Bolli R.The ubiquitous role of nitric oxide in cardioprotection. J Mol Cell Cardiol. 2006;40(1):16-23.

124. Strutyns'kyĭ RB, Kotsiuruba AV, Neshcheret OP, Rovenets' RA, Moĭbenko 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.

125. Moybenko OO, Strutynskyi RB, Yagupolskii LM, Mohort MA, Shalamai AS. Organization of industrial production of flokalin — new myotropic spasmolytic and cardioprotector. Nauka Innov. 2013; 9(1): 55-63.

126. Strutyns'kyĭ RB, Pyvovar SM, Rovenets' RA, Piskun OV, Iahupol's'kyĭ LM, Moĭbenko OO. Effect of adenosine triphosphate-sensitve potassium channel activator flokalin on the isolated heart functions. Fiziol Zh. 2005;51(6):18-24.

127. Strutyns'kyĭ RB. The vasodilation effects of flokalin, a fluorine-containing K(ATP) channel opener. Fiziol Zh. 2010;56(4):59-65.

128. Strutynskyi RB, Kotsuruba AV, Neshcheret AP, Shysh AN, Rovenets RA, Moibenko AA. Cardioprotective Effects of ATP-Sensitive Potassium Channels

Activation in Experiments *in Vivo*: Influence on Biochemical Parameters of Blood Following Ischemia-Reperfusion of Myocardium. Int J Physiol Pathophysiol. 2010;1(4):305-313.

129. Strutyns'kyĭ RB, Rovenets' RA, Strutyns'ka NA, Neshcheret OP, Moĭbenko OO. The influence of activation of the ATP-sensitive potassium channels by flocalin on the function of the cardiovascular system. Fiziol Zh. 2013;59(1):11-6.
130. Strutyns'kyĭ RB, Pyvovar SM, Tumanovs'ka LV, Moĭbenko OO. Cardioprotective effects of flokalin: relative role of activation of sarcolemmal and mitochondrial adenosine triphosphate-dependent potassium channels. Fiziol Zh. 2008;54(6):15-23.
131. Strutyns'kyĭ RB, Neshcheret OP, Tumanovs'ka LV, Rovenets' RA, Moĭbenko OO. Cardioprotective effects of flokalin in experiments in vivo: influence on hemodynamic and myocardial lesions in ischemia-reperfusion. Fiziol Zh. 2009;55(5):9-16.
132. Wang Y, Ashraf M. Role of protein kinase C in mitochondrial K_{ATP} channel-mediated protection against Ca^{2+} overload injury in rat myocardium Circ Res. 1999 May 28;84(10):1156-65.
133. Mironova GD, Kachayeva YeV, Krylova IB, Rodionova OM, BolinaMI, Yevdokimova NR, Sapronov NS. Mitochondrial ATP-dependent potassium channel. 2. The role of the channel inprotection of the heart against ischemia. Bul Rus AMS. 2007; 2: 44-50.
134. Holmuhamedov EL, Jovanović S, Dzeja PP, Jovanović A, Terzic A. Mitochondrial ATP-sensitive K+ channels modulate cardiac mitochondrial function. Am J Physiol. 1998 Nov;275(5 Pt 2):H1567-76.
135. Storey NM, Stratton RC, Rainbow RD, Standen NB, Lodwick D. Kir6.2 limits Ca(2+) overload and mitochondrial oscillations of ventricular myocytes in response to metabolic stress. Am J Physiol Heart Circ Physiol. 2013 Nov 15;305(10):H1508-18.
136. Murata M, Akao M, O'Rourke B, Marbán E.Mitochondrial ATP-Sensitive potassium channels attenuate matrix Ca^{2+} overload during simulated ischemia

and reperfusion: Possible mechanism of cardioprotection. Circ Res. 2001 Nov 9;89(10):891-8.

137. Strutynska NA, Strutynskyi RB, Chorna SV, Semenykhina OM, Mys LA, Moibenko OO, Sahach VF. New Fluorine-Containing Openers of ATP-sensitive Potassium Channels Flocalin and Tioflocalin Inhibit Calcium-Induced Mitochondrial Pore Opening in Rat Hearts. Int J Physiol Pathophysiol. 2014;5(3):231-44.
138. Halestrap AP, Clarke SJ, Javadov SA. Mitochondrial permeability transition pore opening during myocardial reperfusion – a target for cardioprotection. Cardiovasc Res. 2004 Feb 15;61(3):372-85.
139. O'Rourke B. Myocardial K_{ATP} channels in preconditioning. Circ Res. 2000 Nov 10;87(10):845-55.
140. Strutyns'kyĭ RB, Nagibin VS, Strutyns'ka NA, Ianchiĭ OR, Moĭbenko OO. Influence of flocalin on development of apoptosis and necrosis at anoxia-reoxygenation of culture rats neonatal cardiomyocytes. Fiziol Zh. 2013;59(3):3-9.
141. Dunne MJ, Aynsley-Green A, Lindley KJ. Nature's K_{ATP} channels knockout. News Physiol Sci. 1997;12:197-203.
142. Khmil NV, Gorbacheva OS, Strutinskiy RB, Korobeynikova MO, Belosludtseva NV, Kolomytkin OV, and Mironova GD. A study of the effects of flocalin on respiration and potassium transport of rat – heart and liver mitochondria. Biophysics. 2016; 61(6): 888-92.
143. Gorbacheva OS, Strutynskyi RB, Khmil NV, Belosludtseva NV, Mursaeva SV, Korobeynikova MO, Alilova GA, Lezhnev EI, Mironova GD. Study of the influence of flocalin on the energy and ion exchanges in rat liver mitochondria. Biological Motility, Pushchino. 2016: 73-7.
144. Costa AD, Quinlan CL, Andrukhiv A, West IC, Jaburek M, Garlid KD. The direct physiological effects of mitoK(ATP) opening on heart mitochondria. Am J Physiol Heart Circ Physiol. 2006; 290(1):406-15.
145. Belisle E, Kowaltowski AJ. Opening of mitochondrial K^+ channels increases

ATP levels by preventing hydrolysis. J Bioenerg Biomembr. 2002 Aug;34(4):285-98.

146. Dzeja PP, Bast P, Ozcan C, Valverde A, Holmuhamedov EL, Van Wylen DG, Terzic A. Targeting nucleotide-requiring enzymes: implications for diazoxide-induced cardioprotection. Am J Physiol Heart Circ Physiol. 2003 Apr;284(4):H1048-56.
147. Maslov LN, Lishmanov YuB, Solenkova NV. Adaptation of Myocardium to Ischemia. The Early Phase of Ischemic Preconditioning. Succes Physiol Sci 2006; 37(3): 25-41.
148. McPherson CD, Pierce GN, Cole WC. Ischemic cardioprotection by ATP-sensitive K+ channels involves high-energy phosphate preservation. Am J Physiol. 1993 Nov;265(5 Pt 2):H1809-18.
149. Tricarico D, Servidei S, Tonali P, Jurkat-Rott K, Camerino DC. Impairment of skeletal muscle ATP-sensitive K+ channels in patients with hypokalemic periodic paralysis. J Clin Invest. 1999 Mar;103(5):675-82.
150. Crestanello JA, Doliba NM, Babsky AM, Doliba NM, Niibori K, Whitman GJ, Osbakken MD. Ischemic preconditioning improves mitochondrial tolerance to experimental calcium overload. J Surg Res. 2002 Apr;103(2):243-51.
151. Eells JT, Henry MM, Gross GJ, Baker JE. Increased mitochondrial K_{ATP} channel activity during chronic myocardial hypoxia. Is cardioprotection mediated by improved bioenergetics? Circ Res. 2000 Nov 10;87(10):915-21.
152. Jilkina O, Kuzio B, Grover GJ, Kupriyanov VV. Effects of K(ATP) channel openers, P-1075, pinacidil, and diazoxide, on energetics and contractile function in isolated rat hearts. J Mol Cell Cardiol. 2002 Apr;34(4):427-40.
153. Lembert N, Idahl LA, Ammon HP. K-ATP channel independent effects of pinacidil on ATP production in isolated cardiomyocyte or pancreatic β-cell mitochondria. Biochem Pharmacol. 2003 Jun 1;65(11):1835-41.
154. Strutynskyi RB. Mechanisms of cardioprotective action of activation of SUR receptors of potassium channels: dissert. Doctor of Biological Sciences; 03.00.13; Kyiv 2018:440.

155. Marletta MA. Another activation switch for endothelial nitric oxide synthase: why does it have to be so complicated? Trends Biochem Sci. 2001 Sep;26(9):519-21.
156. Ozcan C, Bienengraeber M, Dzeja PP, Terzic A. Potassium channel openers protect cardiac mitochondria by attenuating oxidant stress at reoxygenation. Am J Physiol Heart Circ Physiol. 2002 Feb;282(2):H531-9.
157. Reinecke H. Survival, integration and differentiation of cardiomyocyte grafts / H. Reinecke, M. Zhang, T. Bartosek, C.E. Murry // Circulation. – 1999. – V. 100, № 2. – P. 193–202.
158. Kim HH, Choi S. Therapeutic Aspects of Carbon Monoxide in Cardiovascular Disease. Int J Mol Sci. 2018 Aug 13;19(8). pii: E2381.
159. Doring H.J. The isolated perfused heart according to Langendorff technique—function application. Physiol Bohemoslov. 1990; 39(6): 481-504.
160. Neely J., Liebermeister H., Battersby E. Effect of pressure development on oxygen consumption by isolated heart. Am J Physiol. 1967; 221:804 – 813.
161. Сагач В.Ф. Старіння підвищує чутливість до індукторів мітохондріальної пори в серці щурів / В.Ф. Сагач, Г.Л. Вавілова, Н.А. Струтинська, О.В. Рудик // Фізіол. журн. – 2004. – 50. – № 2. – С. 49–63.
162. Lowry O., Rosebrough N., Farr A., and Randall R. Protein measurement with Folin phenol reagent. J Biol Chem. 1951; 193(1): 265-75.
163. Xie Y.H., Zhang N., Li L.F., Zhang Q.Z., Xie L.J., Jiang H. et. al. Hydrogen sulfide reduces regional myocardial ischemia injury through protection of mitochondrial function. Mol Med Rep. 2014; 10(4): 1907-14.
164. Kuthan H., Ullrich V., Estabrook R.W. A quantitative test for superoxide radicals produced in biological systems. Biochem J. 1982; 203(3): 551-8.
165. Halliwell B, Grootveld M, and Gutteridge JM. Methods for the measurement of hydroxyl radicals in biomedical systems: deoxyribose degradation and aromatic hydroxylation. Methods Biochem Anal. 1988; 33: 59-90.
166. Huwiler M and Kohler H. Pseudo-catalytic degradation of hydrogen peroxide in the lactoperoxidase / H_2O_2 / iodide system. Eur J Biochem. 1984; 141(1): 69-74.

167. Gavrilov VB, Gavrilova AR, and Khmara NF. Measurement of diene conjugates in blood plasma using the UV absorption of heptane and isopropanol extracts. Lab Delo. 1988; (2): 60-4.

168. Mihara M. and Uchiyama M. Determination of malonaldehyde precursor in tissues by thiobarbituric acid test. Anal Biochem. 1978; 86(1): 271-8.

169. Salter M, Knowles RG, Moncada S. Widespread tissue distribution, species and changes in activity of Ca^{2+}-dependent and Ca^{2+}-independent nitric oxide syntases. FEBS Lett. 1991; 291(1):145-9.

170. Chin SY, Pandey KN, Shi SJ et al. Increased activity and expression of Ca^{2+}-dependent NOS in renal cortex of ANG II-infused hypertensive rats. Amer J Physiol. 1999; 277(5):797-804.

171. Boyde TR, Rahmatullah M. Optimization of conditions for the colorimetric determination of citrulline, using diacetyl monoxime. Anal Biochem. 1980;107(2):424-431.

172. Green LC, Wagner DA, Glogowski J, Skipper PL, Wishnok JS, and Tannenbaum SR. Analysis of nitrate, nitrite, and [15N]nitrate in biological fluids. Anal Biochem. 1982; 126(1): 131-8.

173. Tsukahara H, Miura M, Tsuchida S, Hata I, Hata K, Yamamoto K. et al. Effect of nitric oxide synthase inhibitors on bone metabolism in growing rats. Am J Physiol. 1996; 270(5 Pt 1): E840-5.

174. Zhang C, Hein TW, Wang W, Chang CI, Kuo L. Constitutive expression of arginase in microvascular endothelial cells counteracts nitric oxide-mediated vasodilatory function. FASEB J. 2001; 15(7): 1264-6.

175. Alikulov ZA, L'vov NP and Kretovich VL. Nitrate and nitrite reductase activity of milk xanthine oxidase. Biokhimiia. 1980; 45(9): 1714-8.

176. Percival MD, Ouellet M, Campagnolo C, Claveau D, Li C. Inhibition of Cathepsin K by Nitric Oxide Donors: Evidence for the Formation of Mixed Disulfides and a Sulfenic Acid. Biochemistry. 1999; 38(41): 13574-83.

177. Guozhao Ma, Jianxin Gao, Qingxi Fu, Liangliang Jiang, Ruixia Wang, Yong Zhang, Kejing Liu. Diazoxide Reverses the Enhanced Expression of KATP

Subunits in Cholinergic Neurons Caused by Exposure to $A\beta_{1-42}$. Neurochem Res. 2009 Dec;34(12):2133-40.

178. Gao M, Xue H, Wang Y, Wang H. Iptakalim, opener of K(ATP), reverses the enhanced expression of genes encoding K(ATP) subunits in spontaneously hypertensive rats. Life Sci. 2005 Oct 14;77(22):2743-51.
179. Khaja Shameem Mohammed Abdul, Sofija Jovanović, Andriy Sukhodub, Qingyou Du, Aleksandar Jovanović. Upregulation of cardioprotective SUR2A by sub-hypoxic drop in oxygen. Biochim Biophys Acta . 2014 Nov;1843(11):2424-31.
180. Russell M. Crawford, Sofija Jovanović, Grant R. Budas, Anthony M. Davies, Harish Lad, Roland H. Wenger, Kevin A. Robertson, Douglas J. Roy, Harri J. Ranki, and Aleksandar Jovanović. Chronic Mild Hypoxia Protects Heart-derived H9c2 Cells against Acute Hypoxia/Reoxygenation by Regulating Expression of the SUR2A Subunit of the ATP-sensitive K+ Channel. J Biol Chem. 2003 August 15; 278(33): 31444-55.
181. Kwong J, Molkentin J. Physiological and Pathological Roles of the Mitochondrial Permeability Transition Pore in the Heart. Cell Metabolism. 2015; 21(2):206-14.
182. Strutynska NA, Semenykhina OM, Chorna SV, Vavilova GL, Sagach VF. Hydrogen sulfide inhibits Ca^{2+}-induced mitochondrial permeability transition pore opening in adult and old rat heart. Fiziol Zh. 2011; 57(6):3-13.
183. 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.
184. 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.
185. Homma T, Fujii J. Application of glutathione as anti-oxidative and anti-aging drugs. Curr Drug Metab. 2015;16(7):560-71.

186. Ralto, KM, Rhee EP, and Parikh SM. NAD(+) homeostasis in renal health and disease. Nat. Rev. Nephrol. 2020; 16:99-111.

187. Xu W, Li Le, Zhang L. NAD^+ Metabolism as an Emerging Therapeutic Target for Cardiovascular Diseases Associated With Sudden Cardiac Death. Front Physiol. 2020; Aug 13;11:901. doi: 10.3389/fphys.2020.00901. eCollection 2020.

188. Chu X, Raju RP. Regulation of NAD(+) metabolism in aging and disease. Metabolism. 2022 Jan;126:154923. doi: 10.1016/j.metabol.2021.154923.

189. Mori V, Amici A, Mazzola F, Di Stefano M, Conforti L, Magni G, et al. Metabolic profiling of alternative NAD biosynthetic routes in mouse tissues. PLoS One. 2014; 9: e113939. doi: 10.1371/journal.pone.0113939

190. Badawy AA. Kynurenine pathway of tryptophan metabolism: regulatorynand functional aspects. Int J Tryptophan Res. 2017; 10:1178646917691938. doi: 10.1177/1178646917691938

191. Preiss J, and Handler P. Biosynthesis of diphosphopyridine nucleotide. II. Enzymatic aspects. J Biol Chem. 1958; 233, 493-500.

192. Liu L, Su X, Quinn WJIII, Hui S, Krukenberg K, Frederick DW, et al. Quantitative analysis of NAD synthesis-breakdown fluxes. Cell Metab. 2018; 27: 1067.e5-1080.e5. doi: 10.1016/j.cmet.2018.03.018

193. Ikeda M, Tsuji H, Nakamura S, Ichiyama A, Nishizuka Y, and Hayaishi O. Studies on the biosynthesis of nicotinamide adenine dinucleotide. Ii. A role of picolinic carboxylase in the biosynthesis of nicotinamide adenine dinucleotide from tryptophan in mammals. J Biol Chem. 1965; 240: 1395-401.

194. Davila A, Liu L, Chellappa K, Redpath P, Nakamaru-Ogiso E, Paolella LM, et al. Nicotinamide adenine dinucleotide is transported into mammalian mitochondria. eLife. 2018; 7:e33246. doi: 10.7554/eLife.33246.020

195. Eltzschig HK, and Eckle T. Ischemia and reperfusion—from mechanism to translation. Nat Med. 2011; 17(11) :1391-401.

196. Halestrap AP. A pore way to die: the role of mitochondria in reperfusion injury and cardioprotection. Biochem Soc Trans. 2010; 38(4): 841-60.

197. Yellon DM, and Hausenloy DJ. Myocardial reperfusion injury. N Engl J Med. 2007; 357(11): 1121-35.

198. Crompton M, Costi A, and Hayat L. Evidence for the presence of a reversible Ca^{2+}-dependent pore activated by oxidative stress in heart mitochondria. Biochem J. 1987; 245: 915-8.

199. Crompton M, Ellinger H, and Costi A. 1988. Inhibition by cyclosporin A of a Ca2+-dependent pore in heart mitochondria activated by inorganic phosphate and oxidative stress. Biochem J. 1988; 255: 357-360.

200. Griffiths EJ, and Halestrap AP. Mitochondrial non-specific pores remain closed during cardiac ischaemia, but open upon reperfusion. Biochem J. 1995; 307 (Pt 1): 93-8.

201. Strutynska NA, Strutynskyi RB, Chorna SV, Semenykhina OM, Mys LA, Moibenko OO, Sahach VF. New Fluorine-Containing Openers of ATP-sensitive Potassium Channels Flocalin and Tioflocalin Inhibit Calcium-Induced Mitochondrial Pore Opening in Rat Hearts. Int J Physiol Pathophysiol. 2014;5(3):231-44.

202. Wang R. Physiological implications of hydrogen sulfide: a whiff exploration that blossomed. Physiol Rev. 2012; 92(2): 791-896.

203. Yan H, Du J, Tang Ch. The possible role of hydrogen sulfide on the pathogenesis of spontaneous hypertension in rats. Biochem Biophys Res Commun. 2004;313(1):22-17.

204. Jiang HL, Wu HC, Li ZL, Geng B, Tang CS. Changes of the new gaseous transmitter H_2S in patients with coronary heart disease. Di Yi Jun Yi Da Xue Xue Bao. 2005;25(8):951-954.

205. Jin S., Pu S.X., Hou C.L., Ma F.F., Li N., Li X.H., et al. Cardiac H2S generation is reduced in ageing diabetic mice. Oxid Med Cell Longev. 2015: 758358.

206. Drachuk KO, Kotsjuruba AV, and Sagach VF. Hydrogen sulfide donor, NAHS, recovers constitutive NO synthesis and endothelium-dependent relaxation of isolated aorta in old rats. Fiziol Zh. 2015; 61(6): 3-10.

207. Wang R. Two's company, three's a crowd: can H_2S be the third endogenous gaseous transmitter? FASEB J. 2002; 16:1793–8.
208. Rose P., Moore P.K., Zhu Y.Z. H_2S biosynthesis and catabolism: new insights from molecular studies. Cell Mol Life Sci. 2017; 74 (8):1391–1412.
209. Dai D.-F., Chiao Y., Marcinek D. J., Szeto H. H., and Rabinovitch P. S. Mitochondrial oxidative stress in aging and healthspan. Longev Healthspan. 2014; 3(1): 6.
210. Weydert CJ, and Cullen J J. Measurement of superoxide dismutase, catalase and glutathione peroxidase in cultured cells and tissue. Nat Protoc. 2009; 5(1): 51-66.
211. Bachmann S., and Mundel P. 1994. Nitric oxide in the kidney: synthesis, localization, and function. Amer J Kidney Diseases. 1994; 24:112-29.
212. Paravicini TM, and Touyz RM. Redox signaling in hypertension. Cardiovasc Res. 2006; 71(2):247-58.
213. Kotsuruba AV, Dorofeyeva NA, Sagach VF. 2015. NOS Uncoupling is accompanied with Induction of the Oxidative Stress and the Cardiohemodynamics Disturbances in Hypertension. Fiziol. Zh. 2015; 61(3):3-10.
214. Strutyns'kyĭ R.B., Kotsiuruba A.V., Rovenets' R.A., Strutyns'ka N.A., Iagupols'kyĭ Iu.L., Sagach V.F., Moĭbenko O.O. 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.
215. Kleinbongard P. Plasma nitrite reflects constitutive nitric oxide synthase activity in mammals. Free Radic Biol Med. 2003; 35(7):790-6.
216. 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.
217. Maher P. The effects of stress and aging on glutathione metabolism. Ageing Res Rev, 2005; 4: 288-314.
218. Liu R, Choi J. Age-associated decline in gamma-glutamylcysteine synthetase

gene expression in rats. Free Radic Biol Med, 2000; 28:566-74.

219. 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.
220. 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.

ПЕРЕЛІК НАКОВИХ ПРАЦЬ, ВИДАНИХ ЗА ТЕМОЮ ДОСЛІДЖЕННЯ

1. Strutynska NA, Goshovska YuV, Korkach YuP, Mys LA, Strutynskyi RB, Sagach VF. Effects of glutathione on the expression of atp-sensitive potassium channels, mitochondrial pores, and on oxidative stress in the heart of old rats. Fiziol. Zh. 2020; 66(6): 66-73. DOI: https://doi.org/10.15407/fz66.06.066

2. Strutynska NA, Goshovska YuV, Korkach YuP, Mys LA, Luchkova AYu, Strutynskyi RB, Sagach VF. Glutathione increases the expression of genes encoding the Kir6.1 and Kir6.2 subunits of ATP-sensitive potassium channels, prevents mPTP opening and oxidative stress in the heart of old rats. Cardio Genomics 2021, May 20, 2021, ePoster in online event.

3. Мись Л.А., Струтинська Н.А., Гошовська Ю.В., Сагач В.Ф.. Піридоксаль 5-фосфат відновлює експресію CSE та 3-MST та зменшує чутливість мітохондріальної пори до Ca2+ у серці старих щурів. VII Національний конгрес геронтологів і геріатрів України, 6-8 жовтня 2021 року, м. Київ, доповідь на онлайн-конгресі, с. 30.

4. Ruslan B. Strutynskyi, Serhii V. Goncharov, Lesya V. Tumanovska, Vasyl S. Nagibin, Victor E. Dosenko. Cardiac Dysfunction in Spontaneously Hypertensive Old Rats is Associated with a Significant Decrease of SUR2 Expression. Mol Cell Biochem. 2021 Dec;476(12):4343-4349. DOI:10.1007/s11010-021-04237-8. (Q2 – другий квартиль) https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/34455535/

5. Lidiia Mys, Yulia Goshovska, Nataliia Strutynska, Raisa Fedichkina, Yuliia Korkach, Ruslan Strutynskyi, Vadim Sagach. Pyridoxal-5-phosphate induced cardioprotection in aging associated with up-expression of cystathionine-γ-lyase, 3-mercaptopyruvate sulfurtransferase, and ATP-sensitive potassium channels. Eur J Clin Invest. 2021. Sep 29; e13683. DOI: 10.1111/ECI.13683. (Q1 – перший квартиль) https://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1111/eci.13683