

## ЗАГАЛЬНА ХАРАКТЕРИСТИКА РОБОТИ

**Актуальність теми.** Важливою проблемою сучасної фізіології та патофізіології є визначення ендогенних механізмів захисту серця та збереження його функції при ішемії міокарда. 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. В Україні за останні 30 років їх поширеність зросла в 3,5 раза, а рівень смертності від них – на 46 %. У структурі захворюваності першими є гіпертонічна – 41 % та ішемічна хвороба серця – 28 % (Горбась І.М., 2015; Дудник С., 2015).

Одним із основних ендогенних механізмів захисту від гіпоксії та ішемії є активація АТФ-чутливих калієвих ( $K_{ATP}$ ) каналів. Їх особливістю є властивість відкриватися у відповідь на зниження внутрішньоклітинного вмісту АТФ нижче від мілімолярних рівнів, що дає змогу вважати цей тип каналу центральним метаболічним сенсором клітини щодо її енергозабезпечення (Nichols C.G., 2006; Olson T.M. et al., 2010).  $K_{ATP}$ -канали реалізують взаємозв'язок між енергоресурсом серця (вмістом АТФ), його електричною та скоротливою функціями (Nichols C.G., 2006; Diehlmann A. et al., 2011; Zhou M. et al., 2011). Це наразі один з небагатьох прикладів взаємозв'язку молекулярних механізмів з ендогенним захистом серця при порушенні його функції. Незважаючи на те, що протекторна роль  $K_{ATP}$ -каналів не викликає сумнівів і їх вважають кінцевими ефекторами антиішемічного захисту, механізми кардіопротекції досі залишаються мало дослідженими (Reyes S. et al., 2009; Brennan S. et al., 2015). Нині невідомо, як активація цих каналів впливає на метаболізм такого важливого медіатора, як оксид азоту, його біосинтез різними шляхами – окисним (активність ферментів ендотеліальної NO-синтази (eNOS) та індукцйбельної NO-синтази (iNOS)) та неокисним реутилізаційним (активність нітратредуктази). Не з'ясовано вплив активації  $K_{ATP}$ -каналів на активність катаболітичних ферментів (а саме: фосфоліпази  $A_2$ , ліпоксигенази, циклооксигенази тощо), утворення патогенних за ішемії міокарда ейкозаноїдів (зокрема, лейкотрієнів та тромбоксанів) та вільної арахідонової кислоти. Недостатньо вивченими при активації цих каналів та ішемії-реперфузії міокарда є зміни ферментативного та перекисного окиснення ліпідів, утворення активних форм кисню (АФК) та азоту (АФА), вплив на активність ферментів антиоксидантної системи (АОС), процеси деградації АТФ, зміну активності гемоксигенази, метаболізм потенційного активатора eNOS сфінгозину, токсична чи антиоксидантна дії сечовини та сечової кислоти, збереження нормальної структури та функції міокарда та мітохондрій, внесок у кардіопротекцію активації  $K_{ATP}$ -каналів мітохондріальної та сарколемальної мембран.

Невідомо про поширення алельних поліморфізмів (SNPs) генів, що кодують Kir6.x та SUR-рецептори  $K_{ATP}$ -каналу у мешканців України та їх можлива роль як генетичних факторів ризику захворювань серця, зокрема, серцевої недостатності. Не вивченим залишається і рівень експресії цих каналних білків у тварин різного віку, в т. ч. у спонтанно гіпертензивних щурів (SHR) та їх можлива роль в механізмах декомпенсації недостатності серця.

**Зв'язок роботи з науковими програмами, планами, темами.** Робота виконувалася в рамках тематичних планів відділу загальної та молекулярної

патофізіології (до 2007 р. відділ експериментальної кардіології) Інституту фізіології ім. О.О. Богомольця НАН України, тем-грантів за договорами між НАН України та Державною адміністрацією м. Києва, за комплексними та інноваційними програмами Президії НАН України та Державного комітету України з питань науки, інновацій та інформатизації, Державної цільової науково-технічної програми розроблення новітніх технологій створення вітчизняних лікарських засобів для забезпечення охорони здоров'я та задоволення потреб ветеринарної медицини.

Автор був відповідальним виконавцем 5 тематичних розділів відділу загальної та молекулярної патофізіології (до 2007 р. відділ експериментальної кардіології) Інституту фізіології ім. О.О. Богомольця НАНУ та 11 грантів, а саме: 2001-2003 рр. "Розробка нового кардіопротекторного препарату – фторвмісного активатора АТФ-залежних калієвих каналів та обґрунтування його використання при патології серця" (№ держреєстрації 0019840044388); 2004-2006 рр. „Дослідження кардіопротекторних властивостей нових вітчизняних фторвмісних активаторів АТФ-залежних калієвих каналів” (№ держреєстрації 0104U008941); 2005 р. „Розробка та підготовка до впровадження нового вітчизняного кардіопротекторного препарату – фторвмісного активатора АТФ-залежних калієвих каналів” (№ держреєстрації 0105U00856); 2006 р. „Завершення комплексних хімічних, токсико-фармакологічних і біологічних досліджень та впровадження нового фторвмісного міотропного спазмолітика і кардіопротектора флокаліна” (№ держреєстрації 0106U012492); 2007 р. „Організація заводського виготовлення нового міотропного спазмолітика і кардіопротектора препарату Флокалін, проведення комплексних досліджень специфічної дії, токсичності лікарської форми заводського виготовлення та отримання дозволу на клінічні дослідження I фази” (№ держреєстрації 0107U005325); 2007-2009 рр. „Дослідження механізмів захисту міокарда при активації АТФ-залежних калієвих каналів новими вітчизняними фторвмісними активаторами” (№ держреєстрації 0107U005334); 2010 р. “Впровадження нового вітчизняного препарату “Флокалін”, кардіопротектора і спазмолітика – виробництво субстанції та препарату “Флокалін” в заводських умовах” (№ держреєстрації 0110U004754); 2013 р. ”Молекулярно-генетичні та фармакологічні засоби для терапії ішемічної патології мозку та серця” (№ держреєстрації 0013U006469); 2013 р. “Створення таргетної бібліотеки прототипів лікарських засобів в порівнянні захворювань ішемічної природи” (№ держреєстрації 0113U002592); 2014 р. ”Розробка новітніх нейро- та кардіопротекторних агентів на базі модуляторів іонних каналів” (№ держреєстрації 0114U003645); 2015 р. ”Розробка інноваційних фокусних бібліотек малих молекул проти ішемічних захворювань серця та головного мозку” (№ держреєстрації 0115U003736).

**Мета роботи** – дослідження впливу активації SUR-рецепторів  $K_{\text{ATP}}$ -каналів на кардіогемодинаміку та біохімічні показники за фізіологічних умов та ішемії-реперфузії міокарда, і можливого зв'язку серцевої недостатності з алельним поліморфізмом та експресією генів, що кодують ці канали.

**Завдання роботи.** Відповідно до мети роботи були поставлені такі завдання:

1. Вивчити дію активації SUR-рецепторів на загальну електричну активність та іонний транспорт через плазматичну мембрану, кардіогемодинаміку, вільнорадикальні процеси, активність ферментів каталази, СОД, iNOS та cNOS,

деградацію АТФ, гемоксигеназну реакцію та утворення вільної арахідонової кислоти, як маркера активності фосфоліпази А<sub>2</sub>.

2. Вивчити вплив активації SUR-рецепторів K<sub>АТФ</sub>-каналів на функцію серця та кардіогемодинаміку при ішемії-реперфузії міокарда.
3. Дослідити дію активації SUR-рецепторів при ішемії-реперфузії міокарда на окисний метаболізм (пули H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, сечової кислоти, дієнових кон'югатів (ДК), малонового діальдегіду (МДА), лейкотриєну С<sub>4</sub> (LTC<sub>4</sub>) та тромбоксану В<sub>2</sub> (TxВ<sub>2</sub>), активність ферментів АОС – каталази та супероксиддисмутази (СОД), біосинтез NO різними шляхами – окисним (активність iNOS, cNOS) та неокисним реутилізаційним (активність нітратредуктази), неокисний катаболізм L-аргініну, degradaцію АТФ, зміни в гемоксигеназній реакції, вміст вільної арахідонової кислоти та сфінгозину.
4. Вивчити дію активації SUR-рецепторів K<sub>АТФ</sub>-каналів при ішемії-реперфузії міокарда на ультраструктурні зміни та розмір зони інфаркту міокарда.
5. Дослідити вплив стимуляції SUR-рецепторів на дихання мітохондрій, Ca<sup>2+</sup>-індуковане відкривання мітохондріальної пори (МП), апоптоз та некроз при аноксії-реоксигенації ізольованих неонатальних кардіоміоцитів.
6. Визначити оптимальну для кардіопротекції ступінь активації SUR-рецепторів та роль K<sub>АТФ</sub>-каналів сарколемальних та мітохондріальних мембран у захисті міокарда при ішемії-реперфузії.
7. Вивчити поширення алельних поліморфізмів Glu23Lys та Ile337Val гена KCNJ11 (Kir6.2) і Ser1369Ala гена ABCC8 (SUR1) в українській популяції та окреслити їх можливий зв'язок із захворюванням на серцеву недостатність.
8. Визначити рівень експресії генів, що кодують SUR1, SUR2, Kir6.1 та Kir6.2 у щурів лінії Wistar-Kyoto та SHR різного віку.

**Об'єкт дослідження** – K<sub>АТФ</sub>-канали клітинних мембран.

**Предмет дослідження** – механізми кардіопротекторної дії активації SUR-рецепторів K<sub>АТФ</sub>-каналів клітинних мембран.

**Методи дослідження.** В роботі використовували електрофізіологічні, біохімічні, морфологічні, функціональні, молекулярно-генетичні методи та статистичний аналіз.

**Наукова новизна одержаних результатів.** В роботі представлено нові механізми кардіопротекторної дії активації SUR-рецепторів K<sub>АТФ</sub>-каналів при ішемії-реперфузії міокарда. Вперше проведено генотипування в українській популяції щодо поширення алельних поліморфізмів генів KCNJ11 та ABCC8, що кодують Kir6.2 та SUR1 субодиниці K<sub>АТФ</sub>-каналу, та виявлено їх зв'язок з таким захворюванням як серцева недостатність. Вперше визначено значно меншу експресію Kir6.1, Kir6.2 та SUR2 білків у дорослих щурів лінії SHR та SUR1 і SUR2 у старих 18-місячних SHR щурів порівняно зі щурами Wistar-Kyoto, що, вірогідно, може бути одним із механізмів декомпенсації недостатності серця.

Показано, що захисний ефект активації SUR калієвих каналів реалізується за рахунок комплексних механізмів, в основі яких лежать гальмівні процеси, що включають кардіогемодинаміку і зміну метаболізму. До перших можна віднести помірне зниження артеріального тиску, що послаблює навантаження на уражене ішемізоване серце і сприяє збереженню серцевого викиду в перші години ішемії,

попередження реперфузійного підвищення загально-периферичного опору та опору коронарних судин, відносно збереження показників скоротливості міокарда у період реперфузії. До другого – попередження значного зростання надлишкового індукцйбельного і реутилізаційного та, навпаки, підвищення протективного конститутивного синтезу оксиду азоту та пригнічення деградації L-аргініну аргіназою; значне зниження оксидативного та нітрозативного стресу в т.ч. за рахунок підвищення активності ферментів антиоксидантної системи – каталази та супероксиддисмутази; зменшення утворення патогенних в умовах ішемії міокарда LTC<sub>4</sub> та TxV<sub>2</sub>, які можуть мати коронароконстрикторну, аритмогенну та прооксидантну дію; пригнічення деградації АТФ, стимуляцію стресзахисної гемоксигеназної реакції та зменшення утворення сечовини та сечової кислоти, які у високих концентраціях є токсичними, а у низьких – антиоксидантами, та підвищення вмісту сфінгозину, який у фосфорильованій формі може підвищувати активність сNOS; мембраностабілізуюча дія як результат пригнічення активності фосфоліпази А<sub>2</sub> та зменшення деградації мембранних фосфоліпідів (про що свідчить зниження вмісту вільної арахідонової кислоти).

Свідченням потужної антиішемічної дії активації SUR є інгібування реутилізаційного синтезу оксиду азоту, який має місце винятково в умовах ішемії, та підвищення вмісту нітрит-аніона, який утворюється спонтанно при окисненні оксиду азоту лише в оксигенованих розчинах. Всі вищеперераховані кардіопротекторні механізми сприяють збереженню цілісності сарколеми та структури внутрішньоклітинних органел, попереджують деструкцію мітохондрій та апоптоз кардіоміоцитів, зменшують розмір некротичної ділянки міокарда на 40%.

Виявлено, що оптимальною для кардіопротекції є помірною активація SUR-рецепторів K<sub>АТФ</sub>-каналів, а в антиішемічному захисті міокарда канали мітохондріальної мембрани більшою мірою відповідають за підтримання скоротливої активності міокарда, тоді як сарколемальної – за коронарний кровообіг.

За допомогою молекулярно-генетичних досліджень вперше показано, що поширення алельних поліморфізмів Ile337Val та Glu23Lys гена KCNJ11 та поліморфізму Ser1369Ala гена ABCC8, що кодують Kir6.2 та SUR1 відповідно, в українській популяції практично не відрізняється від населення європейської та є близьким до азійської. Вперше встановлено, що у хворих на хронічну серцеву недостатність спостерігається зменшення генотипів з мінорною гомозиготою цих поліморфізмів, що корелює з найменшими патологічними змінами за показниками ехокардіографії, зокрема, з найменшою масою лівого шлуночка, його кінцево-систоличним та кінцево-діастоличним об'ємом. Водночас найбільші патологічні зміни за цих поліморфізмів мають носії гетерозигот.

Вперше показано, що рівень експресії Kir6.1, Kir6.2 та SUR2 субодиниць сарколемальних K<sub>АТФ</sub>-каналів у дорослих 6-місячних спонтанно гіпертензивних щурів значно менший порівняно зі щурами Wistar-Kyoto такого ж віку, що ймовірно може бути однією із причин підвищеного судинного тиску. Вірогідно, що значно менша експресія регуляторних рецепторів SUR1 та SUR2 у старих 18-місячних SHR щурів може бути одним із механізмів декомпенсації недостатності серця.

Наукова новизна підтверджена отриманням 10 Патентів України.

**Практичне значення одержаних результатів.** Результати роботи

розкривають суть одного із центральних ендогенних механізмів захисту від ішемії – активації SUR-рецепторів  $K_{ATP}$ -каналів клітинних мембран. Представлені механізми кардіопротекції є обґрунтуванням для створення новітніх методів профілактики та лікування серцево-судинних захворювань. Основні положення роботи планується ввести в навчальний процес у вищих навчальних закладах відповідного профілю. Отримані результати лягли в основу комплексних медико-біологічних досліджень зі створення нових лікарських засобів, активаторів вищезгаданих каналів, проведення їх токсикологічних та доклінічних випробувань. Робота має практичний вихід в медичну галузь, оскільки розроблений та підготовлений до клінічних досліджень новий вітчизняний міотропний спазмолітик та кардіопротектор «Флокалін», лікарська форма якого була виготовлена на базі ПАТ НВЦ «Борщагівський хіміко-фармацевтичний завод», м. Київ.

Найбільш сучасним методом фармакотерапії захворювань людини є фармакогенетичний метод, що дає змогу індивідуалізувати лікування певного хворого. Представлена в роботі залежність патогенезу такого захворювання як серцева недостатність від генетичних особливостей людини (зокрема, алельні поліморфізми Pe337Val та Glu23Lys гена KCNJ11 та Ser1369Ala гена ABCC8, що кодують Kir6.2 та SUR1 субодиниці  $K_{ATP}$ -каналів) та результати щодо значно меншого рівня експресії регуляторних SUR1- та SUR2-рецепторів з віком у спонтанно гіпертензивних щурів, що ймовірно у них є одним із механізмів декомпенсації недостатності серця, може бути використано для розроблення нових методів лікування цього захворювання, зокрема, на базі ДУ ННЦ «Інститут кардіології ім. академіка М.Д. Стражеско» НАМН України.

**Особистий внесок здобувача.** Внесок автора в отриманні експериментальних матеріалів дисертації є основним. Мету, завдання роботи та методи досліджень, аналіз літературних та отриманих матеріалів роботи проведено, опубліковано та викладено в представленій дисертаційній роботі особисто. Деякі дослідження проводили комплексно: морфологічні – разом з н.с. Л.В. Тумановською, біохімічні – пр.н.с. А.В.Коцюробою, електрофізіологічні – д.б.н., професором Я.М. Шубою, дихання-фосфорилування ізольованих мітохондрій – д.б.н., професором Г.Д. Міроновою та співробітниками Інституту теоретичної та експериментальної біофізики РАН, Пушино, РФ. Результати клінічних досліджень отримані разом із співробітниками відділу серцевої недостатності ДУ ННЦ «Інститут кардіології ім. академіка М.Д. Стражеско» НАМН України д.мед.н., професором Л.Г. Воронковим та к.мед.н. І.Д. Мазур. Безпосередня консультативна допомога надавалася д.мед.н., професором, академіком НАН України О.О. Мойбенком.

**Апробація результатів дисертації.** Основні положення і окремі фрагменти роботи були представлені та обговорені на 34 міжнародних та вітчизняних наукових конференціях, пленумах, симпозіумах, з'їздах тощо.

**Публікації.** За результатами дисертації опубліковано 84 наукові праці, у т. ч. розділ у монографії, 41 стаття, з яких закордонних – 12 та у фахових виданнях з переліку МОН України – 29, 10 патентів України, 32 матеріали конференцій.

**Обсяг і структура дисертації.** Матеріали дисертації викладені на 440 сторінках (із них основного тексту – 302), які містять: анотацію, вступ, огляд літератури, розділ «Матеріали та методи досліджень», 5 розділів експериментальних

досліджень, заключення та висновки, список використаної літератури (включає 582 джерела, з яких 102 кирилицею та 480 латиною) та додаток. Робота містить: 138 рисунків, 73 таблиці і 2 схеми.

## ОСНОВНИЙ ЗМІСТ РОБОТИ

У **Вступі** охарактеризована актуальність наукової проблеми і теми дисертації, сформульовані мета і завдання дослідження, визначено новизну отриманих результатів і їх практичне значення.

**Огляд літератури.** В огляді літератури, який включає п'ять підрозділів, представлено сучасні відомості про структуру і функцію SUR-рецепторів зокрема, і  $K_{ATФ}$ -каналу в цілому як центрального метаболічного сенсора енергодефіциту та їх активації, як одного із головних ендогенних механізмів кардіопротекції за ішемії міокарда. А також: сучасні уявлення про енергозабезпечення міокарда та наслідки його порушення при ішемії, протекторні властивості  $K_{ATФ}$ -каналів та зміну їх функціональної активності за алельних поліморфізмів, специфічну дію їх фармакологічних активаторів та сайти їх взаємодії з SUR-рецептором каналу, їх застосування в клініці та розроблення нових оригінальних активаторів цих каналів.

**Матеріали і методи досліджень.** В експериментах були використані морські свинки, щури ліній Wistar-Kyoto та SHR масою 0,2-0,3 кг та безпородні собаки різної статі масою 16-25 кг. Для отримання культури неонатальних кардіоміоцитів – дводобові щури.

Всі експериментальні процедури виконано згідно з Європейською Директивою Ради Громад від 24 листопада 1986 р. (86/609/ЕЕС).

Вплив стимуляції SUR-рецепторів калієвих каналів на загальну електричну активність та іонний мембранний транспорт вивчали за допомогою електрофізіологічного методу “patch clamp” на ізольованих неонатальних кардіоміоцитах щурів та на клітинах НЕК-293 зі стабільною гетерологічною експресією Kir6.2 і SUR2A (клітини НЕК-293<sub>6.2/2A</sub>), що утворюють кардіоспецифічний  $K_{ATФ}$ -канал (сарколемальні  $K_{ATФ}$ -канали кардіоміоцитів), та в дослідях на ізольованих мітохондріях серця і печінки щурів з використанням  $K^+$ -селективного електрода (мітохондріальні  $K_{ATФ}$ -канали) відповідно. Дихання ізольованих мітохондрій вивчали за допомогою двокамерного оксиграфа Oxugraph 2K (Oroboros Instruments, Австрія).  $Ca^{2+}$ -індуковане відкриття МП досліджували за допомогою спектрофотометричної реєстрації ( $\lambda=520$  нм) набухання мітохондрій серця щурів. Первинну культуру неонатальних кардіоміоцитів отримували з міокарда шлуночків дводенних щурів за допомогою ферментного гідролізу як описано в роботі (Reinecke H. et al., 1999). Клітини НЕК-293, що стабільно експресують гени Kir6.2 і SUR2A (клітини НЕК-293<sub>6.2/2A</sub>), культивували за стандартним методом в середовищі MEM з додаванням 10% фетальної телячої сироватки («Gibco», США). Мітохондрії виділяли з печінки і серця статевозрілих самців щурів лінії Wistar масою 220-250 г за методом диференціального центрифугування (Сагач В.Ф. та ін., 2004).

Вплив на серцево-судинну систему досліджували в експериментах на ізольованих судинних смужках, ізольованому та перфузованому за Лангендорфом серці тварин та в експериментах in vivo на анестезованих собаках за умов закритої

грудної клітки та збереження природного дихання. Анастезованим собакам (хлоралоза – 0,07 та уретан – 0,7 г/кг внутрішньовенно) крізь стегові артерії катетеризували черевний відділ аорти для реєстрації артеріального тиску. Для оцінки вазомоторних реакцій периферичних судин виконували аутоперфузію судин задніх кінцівок за допомогою насоса з постійним протоком та вимірювання перфузійного тиску в стеговій артерії. Результати експериментів реєстрували за допомогою полікардіографа “Mingograph-82” фірми “Siemens-Elema” (Швеція).

Вплив стимуляції SUR на зміни біохімічних показників крові та у різних ділянках лівого шлуночка (інтактної, ризику та некрозу) після інфаркту міокарда здійснювали за допомогою стандартних біохімічних методів. Зокрема, активність NOS визначали за комбінацію методів (Salter M. et al., 1991; Chin S.Y. et al., 1991), за допомогою вимірювання одного з продуктів реакції – L-цитруліну (Salter M. et al., 1991); активність аргінази – за утворенням сечовини. Вміст останньої і сечової кислоти визначали в колориметричній реакції за допомогою добірки реактивів фірми «Філіст-Діагностика», Україна; вміст ейкозаноїдів LTC<sub>4</sub>, TxB<sub>2</sub> – за допомогою радіоімунного методу, користуючись стандартними добірками реактивів фірми «Amersham», Англія. Радіоактивність проб визначали на лічильнику фірми «Beckman», Німеччина. Вміст арахідонової кислоти – методом тонкошарової хроматографії на пластинках силікагелю, з наступною елюцією і спектроскопією елюатів в 1,0 см кварцевих кюветах при 210нм. Кількість нітрит-аніону (NO<sub>2</sub><sup>-</sup>) визначали в колориметричній реакції за допомогою реактиву Гріса методом Гріна (Green L.L. et al., 1982); кількість нітрат-аніону (NO<sub>3</sub><sup>-</sup>) – бруциновим методом в спектрофотометричним методом (Шугалей В.С. та ін., 1977); ВМНТ і НМНТ – за методом Saville (Gerdel D. et al., 1996); неорганічний фосфат – колориметричним методом Ю.М.Островського (Покровский А.А., 1969); вміст заліза – спектрофотометричним методом з використанням добірки реактивів фірми «Філіст-Діагностика», Україна; вміст загального білка – методом Бредфорд з використанням барвника Cumassi G-250 (“Ferrak”, Німеччина); інтенсивність вільнорадикальних реакцій – за допомогою H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-індукованої хемілюмінесценції; вміст H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> – за методом (Conte D. et al., 1996); дієнових кон’югатів (ДК) – спектрофотометрично по поглинанню при 232 нм гептанових екстрактів проб по методу (Гаврилов В.Б. и др., 1988); малонового діальдегіду (МДА) – за методом (Стальная И.Д. и др., 1977); активність СОД – за методом (Чевари С. и др., 1985); активність каталази – за методом (Королук М.А. и др., 1985).

Кардіопротекторні ефекти активації SUR вивчали в експериментах з ішемією-реперфузією ізольованого, перфузованому за Лангендорфом серці (20 хв ішемії та 40 хв реперфузії), локальною ішемією-реперфузією лівого шлуночка анестезованих собак (90 хв ішемії та 180 хв реперфузії) та за аноксії-реоксигенації ізольованих неонатальних кардіоміоцитів щурів (30 хв аноксії та 60 хв реоксигенації). Кількість живих, некротичних та апоптотичних клітин оцінювали цитологічно за допомогою забарвлення кардіоміоцитів біс-бензимідом (Noechst 33342) і йодидом пропідіуму. Ультраструктуру міокарда після ішемії-реперфузії визначали електронно-мікроскопічним методом, а розмір інфаркту – планіметрично.

Експерименти з активацією та блокадою вищезазначених каналів за використання інгібіторів K<sub>ATP</sub>-каналів Гбк та 5-ГД (специфічний інгібітор міто-

К<sub>АТФ</sub>-каналів) у дослідях на ізольованих смужках аорти та ізольованому, перфузованому за Лангендорфом серці щурів і морських свинок дало змогу визначити дію активації SUR на функцію серця та відносний внесок у кардіопротекцію каналів мітохондріальної та сарколемальної мембран.

SUR-рецептори К<sub>АТФ</sub>-каналів активували за допомогою нових вітчизняних фторвмісних активаторів: флокаліну (субстанція і таблетки), тіофлокаліну, ДіазоФм, ДіазоФп та діазоксидом. В експериментах *in vivo* субстанцію флокаліну вводили внутрішньовенно в дозах 0,01-1,5 мг/кг, таблетки – в шлунок за допомогою зонда в дозах 1,5, 2,2 і 3,3 мг/кг.

Генотипування мешканців України щодо поширення алельних поліморфізмів генів, що кодують Kir6.x-канали та SUR-рецептори та експресію SUR1, SUR2, Kir6.1 та Kir6.2 білків (рівень мРНК) у щурів лінії Wistar-Kyoto та SHR різного віку було проведено за допомогою молекулярно-генетичних методів, зокрема, за допомогою полімеразної ланцюгової реакції. Виділення ДНК проводили із застосуванням наборів NeoPrep50 (Неоген, Україна). Алельний поліморфізм Glu23Lys та Ile337Val гена KCNJ11 та Ser1369Ala гена ABCC8 визначали за допомогою системи 7500 Fast Real-time PCR System (Applied Biosystems, Foster City, USA), із застосуванням TaqMan® Fast Universal PCR Master Mix, TaqMan® SNP Assay C\_11654065\_10, C\_2991148\_10 та C\_600632\_20 відповідно. Для визначення експресії SUR та Kir6.x РНК екстрагували із міокарда SHR та Wistar-Kyoto щурів. Зворотну транскрипцію проводили із використанням RevertAid First Strand cDNA Synthesis Kit (Thermo Scientific, США). Отриману одностандартну ДНК використовували для полімеразної ланцюгової реакції (PCR) із застосуванням праймерів: Kir6.1 Up 5'-TCT CTT CTC CAT CGA GGT TCA-3', Kir6.1 Dw 5'-CTG CAG AAT CAA AAC CGT GAT-3'; Kir6.2 Up 5'-ATG AGAGAA AGG GGG ACA AGA-3', Kir6.2 Dw 5'-AGG CTG GAG TCA AGG GTA GAG-3'; SUR1 Up 5'-GGG CTT CTG GTG ATC CTC TAC-3', SUR1 Dw 5'-GGC TTT ACT TCC CTT GGT GTC-3'; SUR2 Up 5'-GCT CTG GAA ATT GCT CAG TTG-3', SUR2 Dw 5'-CTG TCC AAC GCT GAA GTT CTC-3'. 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 наступних праймерів: Beta-actin Up 5'-AAG TCC CTC ACC CTC CCA AAA-3', Beta-actin Dw 5'-AAG CAA TGC TGT CAC CTT CCC-3'. Концентрацію загального ДНК і РНК визначали за допомогою NanoDrop спектрофотометра ND1000 (NanoDrop Technologies Inc., США).

**Методи статистичного аналізу.** 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. Достовірність результатів визначали за критерієм t Стьюдента.



Статистичну значущість результатів молекулярно-генетичних досліджень оцінювали за критерієм  $\chi^2$  та моделями успадкування: кодомінантної, домінантної, рецесивної, наддомінантної та адитивної. Поширення поліморфізмів перевіряли на відповідність закону Харді-Вайнберга. 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. Значення  $P < 0,05$  розглядали як статистично достовірні.

## РЕЗУЛЬТАТИ ДОСЛІДЖЕНЬ ТА ЇХ ОБГОВОРЕННЯ

### Вивчення механізмів дії нових вітчизняних активаторів SUR-рецепторів $K_{ATФ}$ -каналів в експерименті

**Вплив активації SUR-рецепторів  $K_{ATФ}$ -каналів на загальну електричну активність та іонний транспорт через плазматичну та мітохондріальну мембрани.** В електрофізіологічних експериментах досліджено дію активації SUR на збудливість нативних культивованих кардіоміоцитів неонатальних щурів та активність рекомбінантного, кардіоспецифічного  $K_{ATФ}$ -каналу в клітинах HEK-293<sub>6.2/2A</sub> зі стабільною гетерологічною експресією Kir6.2 і SUR2A білків. Вперше показано, що в спонтанно скоротливих неонатальних кардіоміоцитах передсердь та шлуночків активація SUR флокаліном спричиняє гіперполяризацію цитоплазматичної мембрани, зменшує тривалість потенціалу дії (ПД) і частоту скорочень, знижує потенціал спокою та вміст внутрішньоклітинного  $Ca^{2+}$  (рис.1).

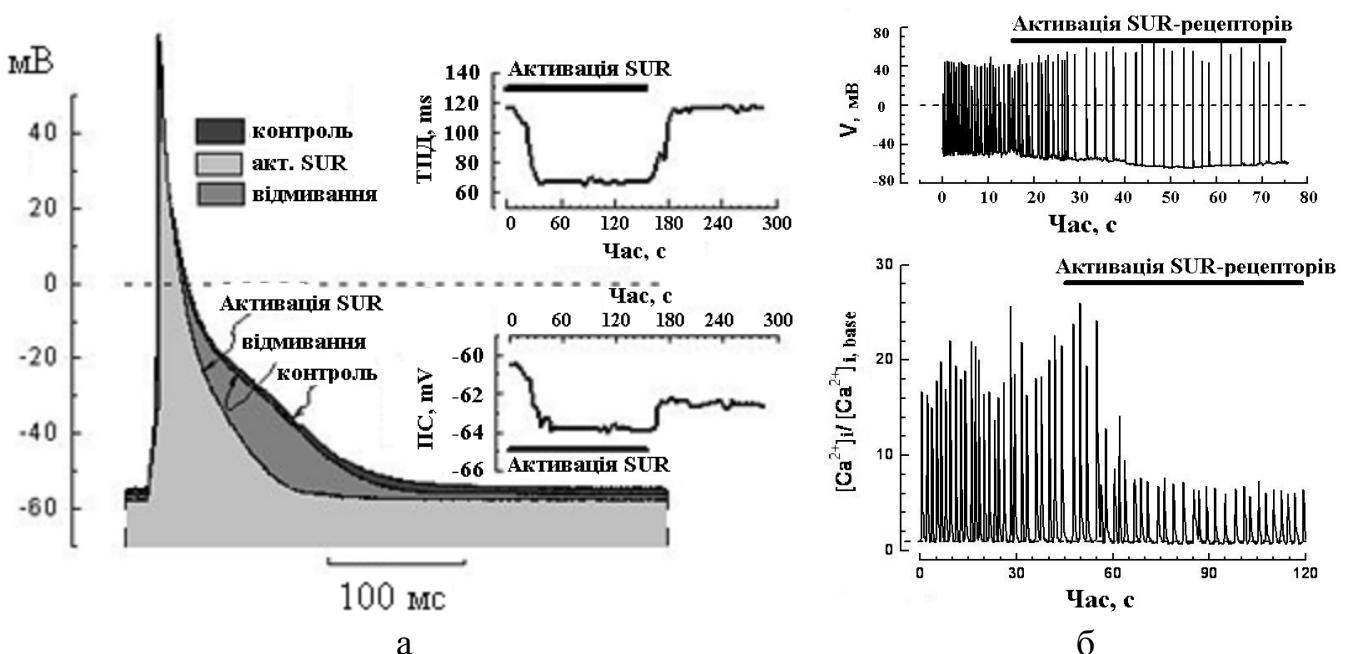


Рис. 1 Вплив активації SUR-рецепторів  $K_{ATФ}$ -каналів флокаліном (5 мкмоль/л) на потенціал дії (а) та в концентрації 10 мкмоль/л – на електричну активність спонтанно скоротливих ендокардіальних вентрикулярних міоцитів (б, зверху) та вміст внутрішньоклітинного  $Ca^{2+}$  в Fluo-4-завантажених міоцитах (б, знизу). На вставках (а) показано зміни тривалості ПД на рівні 90 % реполяризації (ТПД<sub>90</sub>) і значення потенціалу спокою (ПС)

В експериментах на НЕК-293<sub>6,2/2A</sub> клітинах та ізольованих мітохондріях показано, що флокалін є активатором SUR-рецепторів  $K_{ATФ}$ -каналів як сарколемальної, так і мітохондріальної мембран. Про це може свідчити активація калієвого струму з внутрішнім випрямленням через гетерологічно експресовані  $K_{ATФ}$ -канали в НЕК-293<sub>6,2/2A</sub> клітинах з концентрацією половинної активації струму 8,1 мкмоль/л, пряме вимірювання калієвого транспорту в мітохондріях серця і печінки щурів за допомогою калійселективного електрода, властиве для активації міто- $K_{ATФ}$ -каналів каналів помірно набухання ізольованих мітохондрій за дії флокаліну та тіофлокаліну, на яке не впливав інгібітор МП циклоспорин А і, навпаки, попереджував специфічний інгібітор міто- $K_{ATФ}$ -каналів 5-ГД та експерименти на ізольованих судинних препаратах та перфузованих за Лангендорфом серцях з використанням специфічних інгібіторів  $K_{ATФ}$ -каналів – 5-ГД та глібенкламід.

**Вплив стимуляції SUR на показники кардіогемодинаміки.** Характерним для активації SUR-рецепторів калієвих каналів є дилатація коронарних судин, зниження системного артеріального тиску (САТ) та кардіодепресорні реакції (рис. 2). В експериментах на ізольованому, перфузованому за Лангендорфом серці показано, що стимуляція SUR дозозалежно знижувала перфузійний тиск у коронарних судинах (КПТ) – максимально на 24,6 % за дії ДіазоФп (0,1 ммоль/л). А в досліджах *in vivo* на анестезованих собаках активація цих рецепторів флокаліном (0,01-1,5 мг/кг) дозозалежно знижувала САТ, КПТ та загально-периферичний опір (ЗПО) з максимальним ефектом на 44,3, 22,4 та 47,2 % відповідно, та мала значні кардіодепресорні ефекти: ТЛШ знижувався на 37,1 %,  $dP/dt_{max}$  та  $dP/dt_{min}$  на 51,2 та 55,6 % відповідно, ХОК на 10,9 %, ЧСС на 13,1 % при найбільшій дозі активатора.

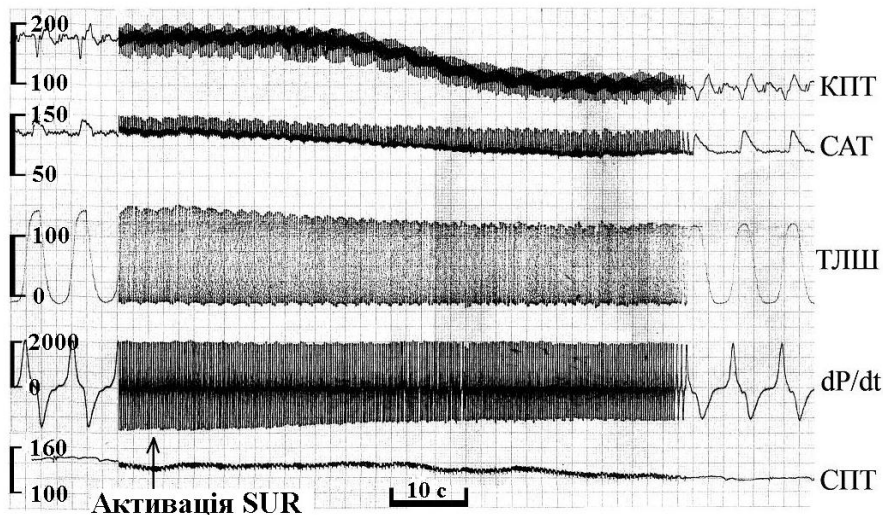


Рис. 2 Вплив активації SUR-рецепторів  $K_{ATФ}$ -каналів флокаліном (0,2 мг/кг) на показники кардіогемодинаміки в експериментах *in vivo* на собаках. КПТ – коронарний перфузійний тиск, мм рт.ст; САТ – системний артеріальний тиск, мм рт.ст; ТЛШ – тиск у лівому шлуночку,

мм рт.ст;  $dP/dt$  – перша похідна тиску у лівому шлуночку, мм рт.ст/с; СПТ – перфузійний тиск у стегновій артерії, мм рт.ст.

Значення вазодилаторних реакцій при активації SUR залежало від природи початкового підвищення судинного тону та наявності патологічного процесу, що може змінювати реактивність судин. Зокрема, вазодилаторні ефекти при стимуляції SUR в експериментах на ізольованих препаратах аорти щурів з цукровим діабетом у хворих тварин були послабленими у 1,29, 1,77 та 1,26 раза на тлі калієвої,

норадреналінової та ангіотензинової вазоконстрикції, проте лише при значному ступені активації великими дозами флокаліну (0,1 ммоль/л). Вперше показано, що вазодилатацію спричиняє активація як сарколемальних, так і міто- $K_{ATP}$ -каналів, адже інгібування останніх зменшувало вазодилаторні ефекти індуковані активацією SUR.

**Вплив активації SUR на зміну біохімічних показників у плазмі крові анестезованих собак *in vivo*.** Стимуляція SUR має виражену антиоксидантну та мембранопротекторну дію, потужний вплив на систему оксиду азоту, значно підвищує оксигенацію крові та пригнічує гемоксигеназну реакцію. Зокрема, флокалін (0,1-1,5 мг/кг) дозозалежно пригнічував утворення пероксиду водню та ДК (максимально у 7,2 та 6,3 раза відповідно через 60 хв після введення дози 1,5 мг/кг), і супероксид-радикала ( $O_2^{\cdot-}$ ), пригнічуючи активність фермента ксантиноксидази, про що свідчить зниження вмісту сечової кислоти (максимально у 5,3 раза через 60 хв при дозі активатора 1,0 мг/кг). Разом з цим, активування SUR-рецепторів за фізіологічних умов не змінювало активність таких ферментів антиоксидантного захисту як СОД та каталаза. Виявлено, що відкривання  $K_{ATP}$ -каналів може обмежувати генерацію не тільки АФК, але й АФА (утворення пероксинітриту) за рахунок пригнічення продукції супероксид-радикала ксантиноксидазою і синтезу оксиду азоту ферментом іNOS. Про це свідчить зменшення пулів  $NO_3^-$  (більше ніж вдвічі), який утворюється при розпаді пероксинітриту нерадикальним шляхом.

Вперше показано, що активація вищезазначених рецепторів флокаліном стимулює окисний метаболізм аргініну – конститутивний синтез NO, на що вказує дозозалежне збільшення пулів цитруліну та підвищення активності сNOS у плазмі крові з максимальним ефектом втричі для обох показників через 20 хв після стимуляції вищезгаданих рецепторів флокаліном (1,0 мг/кг). За цієї ж дози у 3,7 раза підвищуються значення індексу оксигенації плазми артеріальної крові. Підтвердженням цього є збільшення у 3,1 раза в плазмі крові концентрації нітрит-аніона та підвищенням у 5,6 раза його частки як у сумі ( $NO_2^- + NO_3^-$ ). Вперше показано, що активація SUR флокаліном дозозалежно пригнічує активність ферменту іNOS з найбільшим зменшенням (у 2,1 раза) через 60 хв при дозі 1,5 мг/кг.

Виявлено, що за умов, близьких до фізіологічних, стимуляція SUR призводить до зменшення вмісту в плазмі крові вільної арахідонової кислоти (максимально у 1,8 при введенні 1,5 мг/кг таблеток флокаліну), що може свідчити про гальмування деградації фосфоліпідів клітинних мембран (мембраностабілізація), ймовірно, внаслідок пригнічення активності фосфоліпази  $A_2$ .

Вперше показано, що активація вищезгаданих рецепторів не змінює сумарну кількість продуктів неповної деградації АТФ і ГТФ (інозит + гіпоксантин + ксантин) та пули неорганічного фосфату.

Виявлено, що потужна стимуляція згаданих рецепторів пригнічує активність ферменту гемоксигенази, про що свідчить зменшення в плазмі крові пулів одразу двох продуктів цієї реакції – заліза та білірубіну (максимально у 1,9 і 2,9 раза відповідно при найбільшій дозі активатора).

Таким чином, активація SUR призводить до обмеження генерації АФК та АФА, пригнічення індуцибельного і, навпаки, підвищення конститутивного *de novo*

синтезу оксиду азоту, пригнічення гемоксигеназної реакції та зменшення утворення вільної арахідонової кислоти.

**Вплив нових вітчизняних активаторів SUR на дихання мітохондрій.** Вперше показано, що дія флокаліну, ДіазоФп та ДіазоФм на окисне фосфорилування в мітохондріях серця та печінки щурів залежить від субстрату окиснення. Якщо при використанні як субстрату дихання сукцинату натрію флокалін активував дихання мітохондрій в станах  $V_2$  і  $V_4$ , не змінював АДФ-стимульоване дихання ( $V_3$ ) та дещо зменшував спряження дихання та фосфорилування, то в дослідях з  $\alpha$ -кетоглутаратом він посилював дихання в стані  $V_2$ , проте практично не змінював  $V_3$  та дихальний коефіцієнт. Останнє свідчить про відсутність впливу на спряження дихання та фосфорилування за  $\alpha$ -кетоглутарату як субстрату дихання. Водночас, якщо за сукцинату ДіазоФп і ДіазоФм зменшували  $V_3$  та мали тенденцію до зниження  $V_2$  і  $V_4$ , то за  $\alpha$ -кетоглутарату, навпаки, відбувається їх посилення. Проте, не залежно від субстрату дихання вони зменшували спряження дихання та фосфорилування. Вірогідно, що кардіопротекторна дія стимуляції цих рецепторів незначним чином залежить від дихання мітохондрій в різних метаболічних станах, проте, ймовірно, визначальним для кардіопротекції може бути незначне зменшення спряження процесів дихання та фосфорилування та швидке відновлення вмісту АТФ при реперфузії.

#### **Дослідження механізмів кардіопротекторної дії активації SUR-рецепторів $K_{ATP}$ -каналів**

**Кардіопротекторні ефекти стимуляції SUR в експериментах з ішемією-реперфузією міокарда на показники кардіогемодинаміки.** Показано, що до кардіопротекторної дії активації SUR при ішемії-реперфузії міокарда слід віднести помірне зниження артеріального тиску, попередження реперфузійного підвищення опору коронарних судин і ЗПО, зменшення порушень ритму серця та відносне збереження показників скоротливості міокарда в період реперфузії. Оптимальні кардіопротекторні ефекти виявилися при помірній стимуляції цих рецепторів.

В експериментах з ішемією-реперфузією ізольованого за Лангендорфом серця щурів і морських свинок показано, що передішемична активація SUR суттєво поліпшувала відновлення роботи ішемізованого міокарда під час реперфузії. Зокрема, таких показників скоротливої активності серця, як швидкість відновлення скорочень ішемізованого серця з початку реперфузії, відновлення систолічного тиску та тиску, що розвивається у лівому шлуночку (рис. 3). До позитивного ефекту можна віднести попередження підвищення кінцеводіастолічного тиску і реперфузійної вазоконстрикції коронарних судин та значно меншу кількість реперфузійних порушень ритму.

Аналіз результатів кардіогемодинаміки в експериментах з локальною ішемією-реперфузією міокарда анастезованих собак *in vivo* показав, що при ішемії значного зниження зазнає скоротлива функція міокарда: ТЛШ – на 15,8 %, швидкість скорочення ( $dP/dt_{max}$ ) та розслаблення ( $dP/dt_{min}$ ) лівого шлуночка (на 20,7 та 19,9 % відповідно) та ХОК – на 28,7 % (60 хв ішемії). При цьому виникають порушення ритму серця. Під час реперфузії продовжується зниження значень цих показників та значно зростають тиск в коронарних судинах, ЗПО та екстрасистоля.

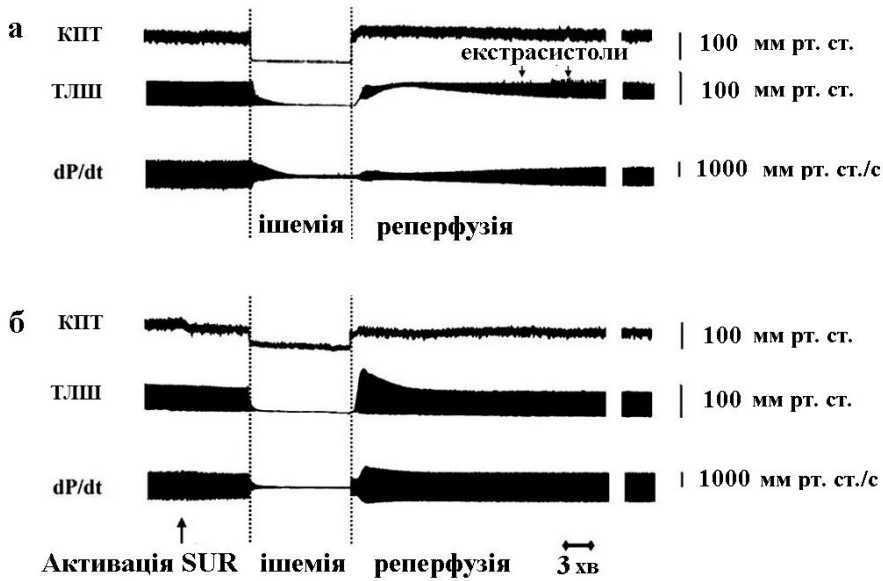


Рис. 3 Зміна показників кардіогемодинаміки ізолюваного та перфузованого за Лангендорфом серця при ішемії-реперфузії (а) та за попередньої активації SUR флокаліном (5 мкмоль/л) (б); КПТ – коронарний перфузійний тиск, мм рт.ст.; ТЛШ – тиск у лівому шлуночку, мм рт.ст.; dP/dt – перша похідна тиску у лівому шлуночку, мм рт.ст./с

Стимуляція SUR спричиняла кардіопротекторні ефекти. Слід відзначити відсутність вазоконстрикції коронарних судин за реперфузії ішемізованого серця, що є одним із важливих механізмів кардіопротекції. Зокрема, при помірній активації цих рецепторів КПТ за реперфузії є наближеним до вихідних значень (рис. 4, а).

Динаміка такого важливого показника, як САТ при помірній активації цих рецепторів не відрізнялася від контрольних експериментів. Проте при потужнішій активації SUR (2,2 та 3,3 мг/кг таблетки флокаліну) САТ знижувався, а саме на початок реперфузії він зменшувався на 17 та 20 % відповідно, а на кінець реперфузії – вже на 20 та 29 % відповідно від вихідних значень. Позитивним для кардіопротекції при ішемії-реперфузії міокарда можна вважати саме помірне зниження артеріального тиску, при якому зменшується навантаження на пошкоджене ішемізоване серце. Особливу увагу привертає вплив на підтримання нормальної функції серця при ішемії-реперфузії міокарда помірної активації SUR-рецепторів  $K_{ATP}$ -каналів. Вперше показано, що вона практично повністю запобігала зниженню ТЛШ та  $dP/dt_{max}$  як під час ішемії, так і реперфузії, та  $dP/dt_{min}$  під час ішемії (рис. 4, б, в, г). Водночас в контрольних експериментах, без активації вищезгаданих рецепторів, ці показники суттєво знижувалися – на 22,8, 41,5 та 29,1 % на кінець реперфузії відповідно.

Протекторні ефекти на скоротливу функцію серця спостерігалися також при середньому ступені активації цих рецепторів, водночас їх потужна активація не мала вираженого захисного ефекту на ТЛШ та швидкість розслаблення лівого шлуночка за ішемії-реперфузії міокарда, проте запобігала значному зниженню  $dP/dt_{max}$  в кінці ішемії і під час реперфузії. Оклюзія коронарної артерії призводила до прогресивного зниження ХОК – на 27 та 45 % на кінець ішемії та реперфузії відповідно (рис. 4, д). Встановлено, що стимуляція SUR запобігала цьому, а на 10-ту та 60-ту хвилину ішемії ХОК навіть дещо перевищував вихідні значення.

Активация SUR-рецепторів значною мірою попереджувала суттєве зростання ЗПО (на 53 %) під час реперфузії (рис. 4, е) ішемізованого серця. Це знижувало

навантаження на нього та значно зменшувало кількість порушень ритму – з найбільшим ефектом на 60-ту хвилину ішемії та протягом реперфузії – майже в 11 разів ( $1,6 \text{ хв}^{-1}$  при активації цих каналів порівняно з  $17,3 \text{ хв}^{-1}$  у контролі).

Таким чином, за показниками кардіогемодинаміки до кардіопротекторної дії активації SUR-рецепторів слід віднести помірне зниження артеріального тиску, що послаблює навантаження на уражене серце і сприяє збереженню серцевого викиду в перші години ішемії, попередження реперфузійного підвищення опору коронарних судин та ЗПО та відносне збереження показників скоротливості міокарда в період реперфузії. Оптимальні кардіопротекторні ефекти виявилися при помірній активації цих рецепторів.

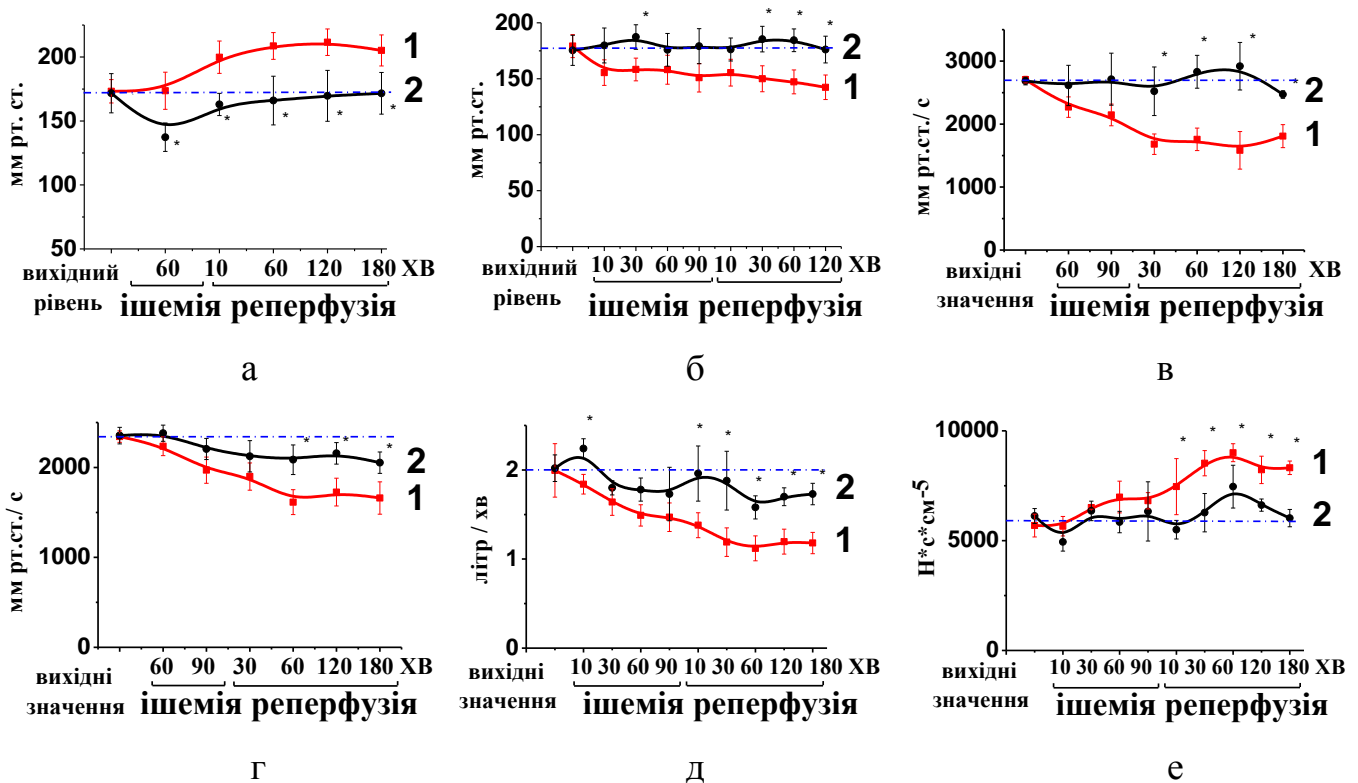


Рис. 4 Вплив помірної активації SUR-рецепторів  $K_{ATP}$ -каналів (таблетки флоксаліну –  $1,5 \text{ мг/кг}$ ) при ішемії-реперфузії міокарда анестезованих собак на КПТ (а), ТЛШ (б), швидкість скорочення (в) та розслаблення (г) міокарда, ХОК (д) та ЗПО (е), де 1 – ішемія-реперфузія, 2 – ішемія-реперфузія при стимуляції SUR; \* $P < 0,05$  порівняно зі значеннями при ішемії-реперфузії

**Вплив активації SUR на систему оксиду азоту при ішемії-реперфузії міокарда.** Вперше показано, що кардіопротекторна дія стимуляції SUR може полягати в збереженні на високому рівні конститутивного синтезу оксиду азоту, пригніченні надлишкового індукцибельного та реутилізаційного синтезу NO і зменшенні деградації L-аргініну аргіназою (рис. 5). Значне гальмування реутилізаційного синтезу і збільшення вмісту  $\text{NO}_2^-$  підтверджує потужну антиішемічну дію активації цих рецепторів.

При ішемії-реперфузії міокарда в лівому шлуночку серця собак значно зростала швидкість індукцибельного синтезу оксиду азоту (ферментом iNOS), зокрема, в інтактній зоні (у 2,8 раза), зоні ризику (у 6,7 раза) та некрозу (у 18,2 раза) порівняно з умовами нормоксії. Натомість швидкість сумарного конститутивного

синтезу оксиду азоту (в основному цитозольним ізоферментом eNOS та ізоферментом nNOS в мітохондріях) при ішемії-реперфузії міокарда, навпаки, була пригнічена, зокрема, у зоні некрозу більш ніж удвічі. А також достовірно зростала неокисна деградація L-аргініну ферментом аргіназою, активність якої збільшувалася порівняно з нормоксією в інтактній зоні (у 1,8 раза), зоні ризику (у 4,1 раза) та некрозу (у 6,5 раза) та активізувався реутилізаційний шлях синтезу оксиду азоту за дії різних нітриг- і нітратредуктаз. Зокрема, відповідно до зон активність НАДФ-залежної нітратредуктази збільшувалася у 9,4, 19,4 та у 52,7 раза (див. рис. 5).



Рис. 5 Вплив активації SUR флокаліном (таблетки, 2,2 мг/кг) на активність ферментів iNOS (а), cNOS (б), аргінази (в) та нітратредуктази (г) при ішемії-реперфузії міокарда в різних зонах серця собак *in vivo*: I – за умов нормоксії, II – інтактна зона, III – зона ризику, IV – зона некрозу, 1 – ішемія-реперфузія, 2 – ішемія-реперфузія при активації SUR, \*P<0,05 порівняно з вихідними значеннями, \*\*P<0,05 порівняно зі значеннями при ішемії-реперфузії

Активація SUR флокаліном (таблетки, 2,2

мг/кг) пригнічувала стимульовані ішемією-реперфузією біохімічні реакції в міокарді (див. рис. 5). Так, активність ферменту iNOS зменшувалася в зоні некрозу порівняно з ішемією-реперфузією у 4,5 раза, аргінази в зоні ризику та некрозу у 2,7 та 3,3 раза відповідно, нітратредуктази у інтактній, зоні ризику та некрозу у 6,8, 7,6 та 12,4 раза відповідно (див. рис. 5). Дещо кращими при активації SUR були значення активності cNOS: в інтактній зоні та зоні некрозу вона збільшується порівняно з ішемією-реперфузією на 29,4 та 18,8 % відповідно (див. рис. 5, б). Останньому може сприяти індуковане активацією SUR підвищення (у зоні ризику у 2,9 та некрозу у 4,7 раза) вмісту сфінгозину, однією з функцій якого є  $Ca^{2+}$ -незалежна активація cNOS через збільшення активності протеїнкінази PKB/Akt.

При ішемії-реперфузії в серці знижувався вміст пулів цитруліну, котрий є супутнім продуктом *de novo* синтезу NO при окисненні L-аргініну, а також метаболітом орнітинового і цитрулінового циклів. Як відомо, останній функціонує в кардіоміоцитах для ресинтезу L-аргініну, який використовується переважно ізоферментом iNOS для індукційного синтезу NO. Отже, зниження вмісту

цитруліну може бути зумовлено його інтенсивним використанням для ресинтезу аргініну, який утилізується не лише для синтезу NO ферментом iNOS, але і аргіназою. З іншого боку, зниження вмісту цитруліну, що є природним інгібітором NOS (за механізмом зворотного зв'язку) за ішемії-реперфузії, створює умови для інтенсивнішого синтезу NO ізоферментом iNOS. Вперше показано, що стимуляція SUR запобігає значному зниженню його вмісту в міокарді, що збігається як зі збереженням високої активності конститутивного синтезу оксиду азоту, так і зі зниженням активності аргінази. Отже, за ішемії-реперфузії стимуляція вищезгаданих рецепторів підтримує конститутивний біосинтез NO на високому рівні, що може бути одним із важливих механізмів його кардіопротекторної дії.

При ішемії-реперфузії в міокарді суттєво зменшується вміст пулів  $\text{NO}_2^-$  (зокрема, у зоні некрозу у 7,3 раза), який утворюється спонтанно при окисненні оксиду азоту лише в оксигенованих розчинах. Активація SUR не тільки запобігає цьому зменшенню, а навпаки, сприяє його підвищенню. Зокрема, в інтактній зоні він збільшується порівняно з умовами нормоксії на 79,0 %, а порівняно з ішемією-реперфузією вдвічі, у зоні некрозу у 8,6 раза. Отже, підвищення пулів  $\text{NO}_2^-$  в міокарді та пригнічення реутилізаційного синтезу NO, який відбувається винятково в умовах ішемії, може свідчити про потужну антиішемічну дію активації SUR.

Аналіз показників плазми крові в динаміці ішемії-реперфузії виявив подібні зміни. Так, під час ішемії активність ферменту iNOS зростала у 2,9 раза, при реперфузії – у 7,5 раза (рис. 6, а). Вперше показано, що стимуляція SUR флокаліном (таблетки, 2,2 мг/кг) попереджувала це підвищення. І навпаки, при ішемії суттєво знижувалась активність ферменту cNOS, а активація SUR не лише запобігала цьому зниженню, але навіть дещо підвищувала її, а саме у 1,6 раза (рис. 6, б).

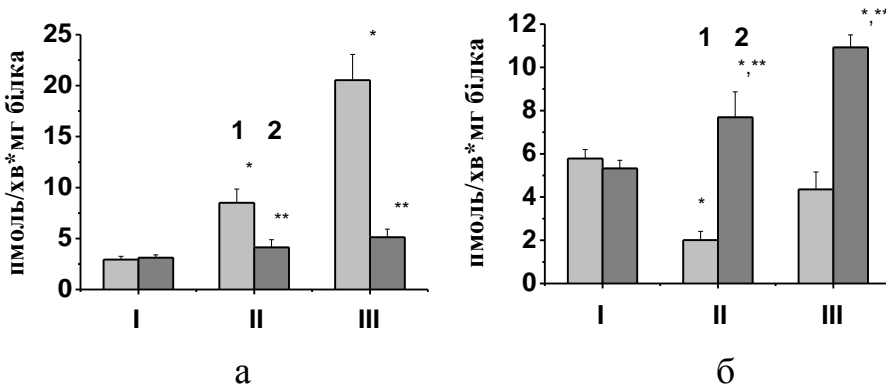


Рис. 6 Зміна активності ферментів iNOS (а) та cNOS (б) у плазмі крові собак при ішемії-реперфузії міокарда (1) та активації SUR флокаліном (таблетки, 2,2 мг/кг) (2): I – за умов

нормоксії (вихідний вміст), II – 90-та хвилина ішемії, III – -180-та хвилина реперфузії, \* $P < 0,05$  порівняно з вихідними значеннями (нормоксією), \*\* $P < 0,05$  порівняно зі значеннями при ішемії-реперфузії

Активність ферменту аргінази у плазмі крові при ішемії та реперфузії зростала у 8 та 17 разів відповідно, а активація SUR значною мірою запобігала цьому (у 3,7 та 11,5 раза на кінець цих процесів відповідно). Вміст пулів  $\text{NO}_2^-$  в плазмі крові при ішемії-реперфузії також знижувався (майже вдвічі). Водночас стимуляція SUR запобігала цьому зниженню, і, навпаки, призводила до практично подвійного підвищення його вмісту, особливо за реперфузії. Аналогічні зміни були зафіксовані і при вимірюванні вмісту цитруліну. Отже, зміни у системі NO в міокарді та плазмі



крові були подібними.

**Пригнічення індукованих ішемією-реперфузією вільнорадикальних реакцій за активації SUR-рецепторів.** Потужним механізмом кардіопротекторної дії стимуляції SUR-рецепторів при ішемії-реперфузії є пригнічення окисного метаболізму внаслідок гальмування генерації АФК і АФА та попередження зниження активності ключових ферментів АОС – каталази та СОД.

**Обмеження окисативного стресу за стимуляції SUR-рецепторів при ішемії-реперфузії міокарда.** Одним із потужних кардіопротекторних механізмів стимуляції SUR-рецепторів  $K_{ATP}$ -каналів можна вважати обмеження окисативного (генерація АФК) стресу при ішемії-реперфузії, про що свідчать зміни вмісту  $H_2O_2$  і продуктів перекисного окиснення ліпідів (ПОЛ) – ДК і МДА (рис. 7, а, б, в).

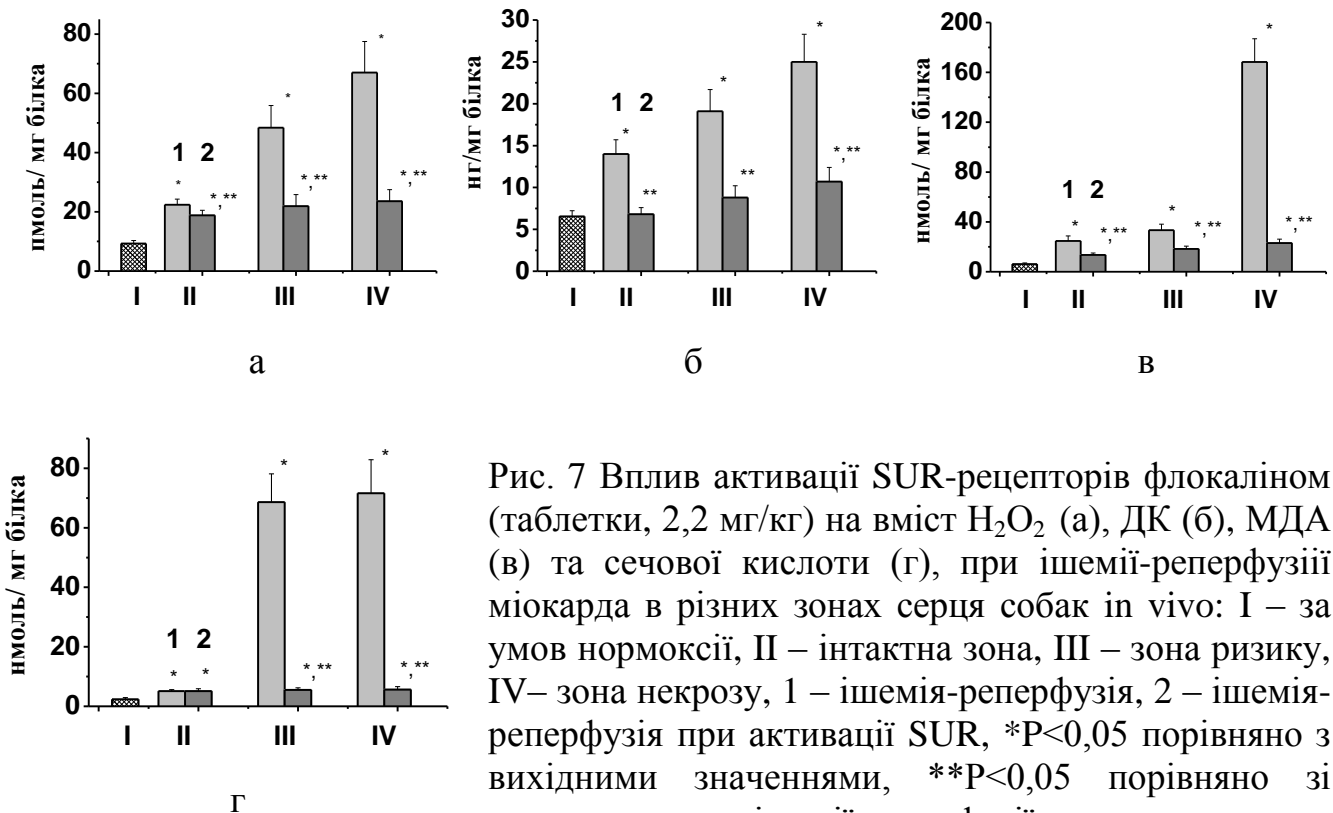


Рис. 7 Вплив активації SUR-рецепторів флокаліном (таблетки, 2,2 мг/кг) на вміст  $H_2O_2$  (а), ДК (б), МДА (в) та сечової кислоти (г), при ішемії-реперфузії міокарда в різних зонах серця собак in vivo: I – за умов нормоксії, II – інтактна зона, III – зона ризику, IV – зона некрозу, 1 – ішемія-реперфузія, 2 – ішемія-реперфузія при активації SUR, \* $P < 0,05$  порівняно з вихідними значеннями, \*\* $P < 0,05$  порівняно зі значеннями при ішемії-реперфузії

#### Пероксид водню в

основному утворюється ферментативно із супероксид-аніона за дії СОД і є маркером на окисний стрес, який розвивається при ішемії-реперфузії. Зокрема, при ішемії-реперфузії міокарда вміст  $H_2O_2$  в інтактній зоні, зоні ризику та некрозу збільшувався у 2,4, 5,2 та 7,2 раза відповідно, вказуючи на значне зростання генерації супероксиду. Тоді як активація SUR флокаліном (таблетки, 2,2 мг/кг) зменшувала пули  $H_2O_2$  (а, отже, і генерацію супероксиду) в тих же зонах у 1,4, 2,2 та 2,8 раза. Подібні результати були отримані при дослідженні плазми крові, в якій протягом ішемії-реперфузії вміст  $H_2O_2$  значно зростав, особливо в першу годину ішемії – у 11 разів. Водночас стимуляція SUR запобігала цьому – з максимальним ефектом майже у 10 та 3,7 раза на 10-й хвилині ішемії та 90-й хвилині реперфузії відповідно.

Аналогічні дані отримали і за допомогою методу  $H_2O_2$ -індукованої хемілюмінесценції (ХЛ), який ґрунтується на реєстрації інтенсивності

випромінення, що виникає внаслідок окиснення біологічних проб  $\text{H}_2\text{O}_2$ . При ішемії-реперфузії міокарда ХЛ за усіма кінетичними параметрами значно зростала, особливо під час реперфузії. Разом з цим, стимуляція SUR в дослідях на собаках *in vivo* зменшувала загальну світлосуму ХЛ за 5 хв реєстрації ( $\Sigma_5$ ), амплітуду швидкого спалаху ХЛ ( $I_0$ ) та кінцеве значення інтенсивності випромінення через 5 хв ( $I_5$ ) на 3-й годині реперфузії на 17,2, 17,2 та 14,6 % відповідно. Зниження вмісту  $\text{H}_2\text{O}_2$  свідчить про потужну антиоксидантну дію активації SUR-рецепторів.

Підтвердженням цього може бути пригнічення утворення пулів як ранніх (ДК), так і пізніх (МДА) продуктів ПОЛ в експериментах з активацією цих рецепторів (див. рис. 7, б, в). При ішемії-реперфузії вміст ДК в інтактній зоні, зоні ризику та некрозу збільшувався у 2,1, 2,9 та 3,8 раза відповідно. Стимуляція SUR попереджувала їх утворення: в інтактній зоні їх вміст (6,8 нг/мг білка) був таким же як і за нормоксії (6,6 нг/мг білка), тоді як без їх активації пули ДК в цій зоні зростали більш ніж удвічі (14,0 нг/мг білка). Подібні зміни відбувалося в зоні ризику та некрозу: зменшення у 2,2 та 2,3 раза відповідно. ДК утворюються при неферментативному окисненні ліпідів, а зниження їх вмісту свідчить про потужну антиоксидантну дію та інгібування утворення ініціаторів ПОЛ:  $\cdot\text{OH}$  (утворюється з  $\text{H}_2\text{O}_2$  в реакціях Фентона і Хабер-Вайса за наявності заліза) та  $\text{NO}_2\cdot$  радикалів, що утворюються при радикальному (на відміну від нерадикального, за якого утворюється нітрат-аніон) розпаді пероксинітриту. Схожими виявилися результати при вимірювання пулів ДК у плазмі крові. За ішемії їх вміст стрімко зростає (у 5-6 разів), з максимумом у першу половину реперфузії – у 7,4 раза. Активація SUR запобігала утворенню ДК.

Подібні зміни відбувалися із вмістом у міокарді та плазмі крові кінцевого продукту ПОЛ МДА, який за ішемії-реперфузії збільшувався порівняно з інтактними тваринами (нормоксія) у зонах серця – інтактній, ризику та некрозу в 4,0, 5,4 у 27,1 раза відповідно (див. рис. 7, в). Разом з цим, стимуляція SUR-рецепторів пригнічувала їх утворення в цих зонах у 2,2, 3,0 та 7,3 раза відповідно. Ішемія-реперфузія призводила до значного зростання вмісту МДА також у плазмі крові – на кінець ішемії та 60-й хвилині реперфузії він збільшувався на 62,5 та 70 % відповідно. Активація SUR повністю запобігала цьому підвищенню під час ішемії та зменшувала його при реперфузії, зокрема, на 60-й хвилині – на 31%. Отже, стимуляція SUR-рецепторів може чинити не лише антиоксидантну, але і антирадикальну дію, укорочуючи (обриваючи) ланцюги реакції ПОЛ.

*Обмеження нітрозативного стресу за стимуляції SUR при ішемії-реперфузії міокарда.* Практично незмінний вміст нітрат-аніона (утворюється при розпаді пероксинітриту нерадикальним шляхом) у плазмі крові в динаміці ішемії-реперфузії при активації SUR може свідчити про пригнічення утворення пероксинітриту. Зокрема, на 180-й хвилині реперфузії вміст нітрат-аніона зростав у 2,5 раза, проте активація SUR значно зменшувала (максимально у 3,2 раза) це підвищення. Дійсно, за стимуляції SUR разом зі зниженням надлишкового індукційного та реутилізаційного синтезу NO при ішемії-реперфузії відбувається також пригнічення генерації супероксид-аніона. Про це може свідчити зниження пулів сечової кислоти (зменшення активності ксантиноксидази) і ейкозаноїдів ( $\text{LTC}_4$  і  $\text{TxB}_2$ ), що утворюються паралельно із супероксид-радикалом його ліпідними генераторами –

ліпоксигеназою і циклооксигеназою. Зокрема, вміст сечової кислоти за ішемії-реперфузії порівняно з нормоксією збільшувався у 2,1 раза (інтактна зона) та майже у 30 разів (зони ризику та некрозу) (рис. 7, г). Вперше показано, що стимуляція SUR значно зменшувала утворення сечової кислоти (а, отже, і супероксиду) – у зоні ризику у 12,5, а у зоні некрозу – у 12,8 раза. Суттєво зменшувався вміст її пулів і в плазмі крові. У низьких концентраціях вона є водорозчинним антиоксидантом за рахунок зв'язування пероксинітриту і  $\text{OH}^\bullet$ , у високих – вона є токсичною і зниження її вмісту може бути ще одним кардіопротекторним механізмом активації SUR.

*Обмеження утворення токсичного вмісту сечовини.* Одним із захистних механізмів активації SUR-рецепторів може бути попередження підвищення вмісту сечовини, який в зоні ризику та некрозу при ішемії-реперфузії міокарда значно збільшується – на 68,1 % та у 3,4 раза відповідно. Адже в низьких концентраціях вона є хелатором вільного заліза, тим самим проявляючи антиоксидантні властивості внаслідок пригнічення генерації  $\text{OH}^\bullet$  та утворення токсичного уреїдосукцинату за рахунок інгібування ресинтезу аргініну в цитруліновому (цитрулін – аргініносукцинат – аргінін) циклі. У процесі ішемії-реперфузії значення активності аргінази і вміст пулів сечовини значно зростають, передбачаючи можливість інтенсивної генерації уреїдосукцинату. У таких високих концентраціях, що є при ішемії-реперфузії, сечовина може чинити кардіотоксичну дію. Виявлено, що стимуляція SUR-рецепторів пригнічувала її утворення в зоні ризику та некрозу на 60,7 та 71,9 % відповідно. Отже, ще одна кардіопротекторна дія може полягати у пригніченні утворення сечовини внаслідок зниження активності аргінази.

*Дія активації SUR-рецепторів  $\text{K}_{\text{ATP}}$ -каналів на активність ферментів антиоксидантної системи.* Вперше показано, що активація SUR-рецепторів калієвих каналів при ішемії-реперфузії не лише запобігає зниженню активності ключових ферментів АОС – каталази і СОД, а навіть дещо підвищує її.

Посилення процесів ПОЛ при ішемії-реперфузії серця супроводжувалося одночасним пригніченням активності каталази та СОД (рис. 8). А саме, на 10-й хвилині ішемії активність каталази порівняно з вихідними значеннями була зменшеною на 10,9 % та продовжувала зниження, сягаючи максимуму на кінець реперфузії – 21,4 %. Активність ферменту СОД насамперед зазнавала значного зменшення під час ішемії – на 23,8 % на 90-й хвилині. Виявлено, що одним із механізмів кардіопротекції активації SUR при ішемії-реперфузії є не лише попередження зниження активності цих ферментів, а навіть її підвищення (див. рис. 8). Так, активність каталази та СОД на 90-й хвилині ішемії при дії флокаліну (таблетки, 1,5 мг/кг) збільшувалися порівняно з вихідними значеннями на 24,2 та 24,3 % відповідно з подальшим посиленням під час реперфузії. Максимальних значень вона сягала на 60-й хвилині реперфузії та становила 58,6 та 73,4 % відповідно. Таким чином, отримані результати свідчать, що стимуляція SUR підвищує стійкість до переокисних процесів при ішемічно-реперфузійному пошкодженні через пригнічення вільнорадикальних процесів та посилення активності ферментів антиоксидантного захисту.

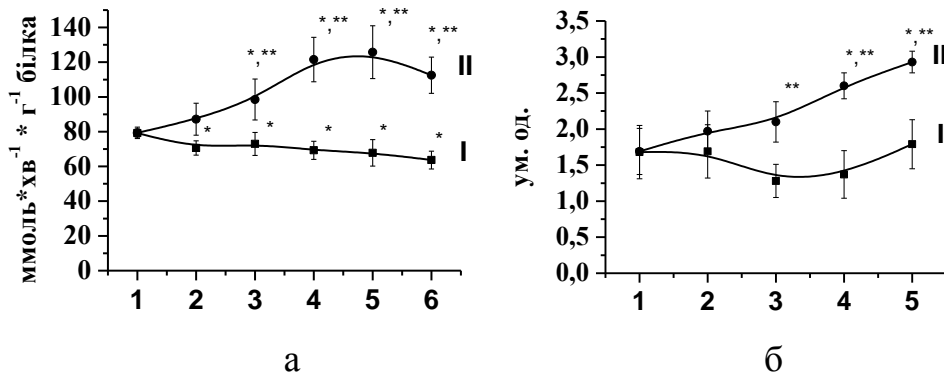


Рис. 8 Зміни активності ферментів каталази (а) та СОД (б) у плазмі крові при ішемії-реперфузії міокарда у контрольній групі (I) та при помірній активації SUR

флокаліном – таблетки, 1,5 мг/кг (II): 1 – вихідний вміст; 2-3 – 10-та та 90-та хвилини ішемії, 4-6 – 10, 60 та 120-та хвилини реперфузії, \* $P < 0,05$  порівняно з вихідними значеннями, \*\* $P < 0,05$  порівняно зі значеннями при ішемії-реперфузії

**Обмеження утворення патогенних за ішемії  $LTC_4$  і  $TxB_2$ .** Ще одним потужним кардіопротекторним механізмом стимуляції SUR є попередження утворення патогенних в умовах ішемії  $LTC_4$  та  $TxB_2$ , які можуть мати коронарострикторну, проаритмічну та прооксидантну дію. Це також може свідчити про зменшення активності ліпоксигенази та циклооксигенази, та відповідно, зменшення утворення АФК та АФА, зокрема супероксиданіону та периксонітриду.

Зокрема, при ішемії-реперфузії в міокарді значно зростає вміст  $LTC_4$  – в інтактній зоні, зоні ризику та некрозу він збільшувався у 31,4, 59,1 і 84,4 раза відповідно (рис. 9, а).

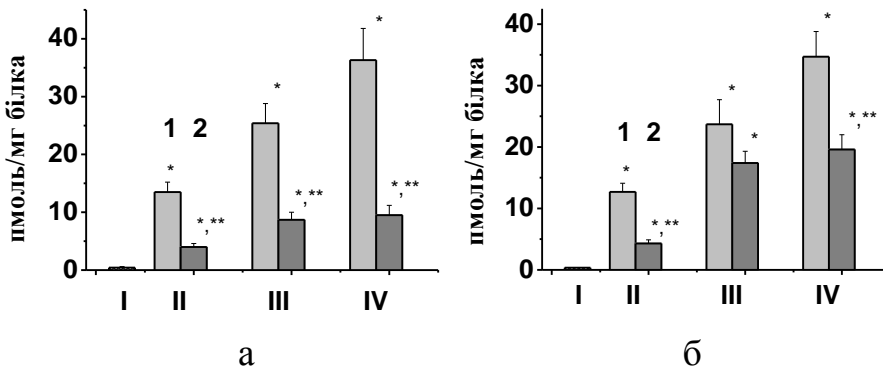


Рис. 9 Вплив активації SUR флокаліном (таблетки, 2,2 мг/кг) на вміст  $LTC_4$  (а) і  $TxB_2$  (б) при ішемії-реперфузії міокарда в різних зонах серця собак *in vivo*: I – за умов нормоксії (вихідний вміст), II – інтактна зона,

III – зона ризику, IV – зона некрозу, 1 – ішемія-реперфузія, 2 – ішемія-реперфузія при стимуляції SUR, \* $P < 0,05$  порівняно з вихідними значеннями, \*\* $P < 0,05$  порівняно зі значеннями при ішемії-реперфузії

Аналогічно збільшувався вміст  $TxB_2$  – у 35,3 та 65,8 раза в інтактній зоні та зоні ризику, та майже на два порядки у зоні некрозу. Вперше показано, що активація SUR флокаліном (таблетки, 2,2 мг/кг) значно зменшувало їх утворення (рис. 9, б). Так, їх вміст в інтактній зоні, ризику та некрозу зменшувався у 3,4, 2,9 та 3,8 раза для  $LTC_4$  та у 3, 1,4 та 1,8 раза для  $TxB_2$  відповідно. Подібним чином змінювався вміст  $LTC_4$  і  $TxB_2$  у плазмі крові – стимуляція SUR зменшувала їх вміст при ішемії-реперфузії протягом експерименту у середньому втричі. Слід зауважити, що таке попередження зростання вмісту цих ейкозаноїдів при ішемії-реперфузії міокарда,

особливо  $LTC_4$ , в крові може сприяти зниженню САТ, ЗПО і констрикції коронарних судин.

**Мембранопротекторна дія активації SUR при ішемії-реперфузії.** Вперше показано зменшення вмісту пулів вільної арахідонової кислоти при ішемії-реперфузії міокарда за стимуляції SUR-рецепторів, вірогідно внаслідок пригнічення активності фосфоліпази  $A_2$  та зменшення деградації фосфоліпідів мембран, що може свідчити про мембранопротекторну дію активації цих рецепторів.

В динаміці ішемії-реперфузії в плазмі крові значно зростав вміст пулів вільної арахідонової кислоти (максимально у 6,3 раза на початок реперфузії), що може свідчити про підвищення активності ферменту фосфоліпази  $A_2$  та збільшення деградації фосфоліпідів мембран. Активація SUR-рецепторів флокаліном (таблетки, 2,2 мг/кг) запобігала цьому підвищенню – максимально у 10 та 7,5 раза протягом ішемії та реперфузії відповідно. Аналогічні результати були отримані при вимірюванні вмісту вільної арахідонової кислоти в міокарді, зокрема в інтактній зоні, зонах ризику та некрозу її вміст збільшувався у 4,0, 7,7 та 11,4 раза відповідно, тоді як стимуляція SUR запобігала цьому, зокрема, у 1,6 (зона ризику) та 1,9 (некрозу) раза відповідно (рис. 10, а).

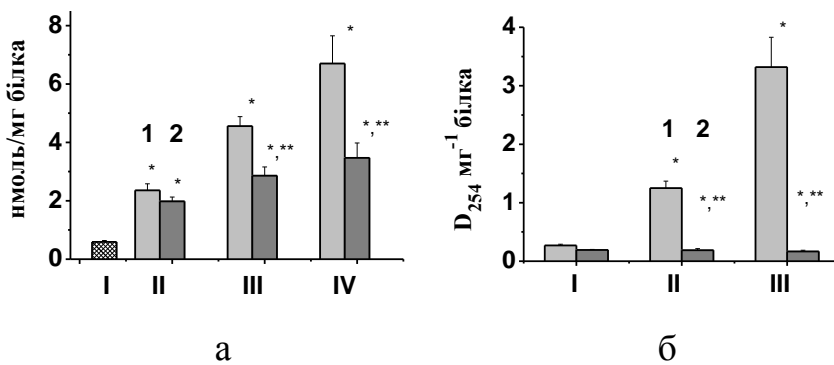


Рис. 10 Вплив активації SUR-рецепторів флокаліном (таблетки, 2,2 мг/кг) на вміст вільної арахідонової кислоти в різних зонах серця (а) та сумарних продуктів деградації пуринових нуклеотидів – інозину,

гіпоксантину, ксантину в плазмі крові (б) при ішемії-реперфузії міокарда собак *in vivo*: I – за умов нормоксії, II – інтактна зона, III – зона ризику, IV – зона некрозу (для а); II – 90-та хвилина ішемії, III – 180-та хвилина реперфузії (для б); 1 – ішемія-реперфузія, 2 – ішемія-реперфузія при активації SUR, \* $P < 0,05$  порівняно з вихідними значеннями, \*\* $P < 0,05$  порівняно зі значеннями при ішемії-реперфузії

Зменшення стрімкого наростання вмісту вільної арахідонової кислоти в міокарді та в плазмі крові при активації SUR за ішемії-реперфузії може свідчити про пригнічення активності фосфоліпази  $A_2$  та зменшення деградації мембранних фосфоліпідів та, відповідно, виявляє ще один механізм кардіопротекції – мембраностабілізацію, яка була підтверджена за допомогою електронномікроскопічних досліджень.

**Вплив активації SUR-рецепторів при ішемії-реперфузії на деградацію пуринових нуклеотидів.** Вперше показано, що стимуляція SUR пригнічує деградацію АТФ при ішемії-реперфузії, що можна вважати ще одним важливим кардіопротекторним механізмом активації цих рецепторів.

При ішемії-реперфузії міокарда значно зростав вміст продуктів деградації

пуринових нуклеотидів: АТФ і ГТФ – ксантину, гіпоксантину та інозину в 7,4, 17,0 та 32,4 раза, та неорганічного фосфату – у 4,5, 9,2 та 15,7 раза в інтактній зоні, зоні ризику та некрозу відповідно. Подібний процес відбувався в плазмі крові (див. рис. 10, б). Зокрема, на 90-й хвилині ішемії ці показники підвищувалися у 4,6 та 6,4 раза, на 90-й хвилині реперфузії – у 14 та 11,6 раза відповідно. Показано, що активація SUR значно знижувала їх вміст в міокарді порівняно з ішемією-реперфузією. А саме, у 3,2, 2,7 та 3,2 раза для проміжних продуктів деградації АТФ та ГТФ, та у 3,6, 2,6 та 3,1 раза для неорганічного фосфату в інтактній зоні, ризику та некрозу відповідно. Аналогічне зниження спостерігали в плазмі крові – на 90-й хвилині ішемії вміст продуктів неповної деградації пуринових нуклеотидів та неорганічного фосфату порівняно з ішемією-реперфузією зменшувалися у 2,8 та 5 разів, на 180-й хвилині реперфузії – у 6,1 та 3,2 раза відповідно (див. рис. 10, б). Попередження значного збільшення при ішемії-реперфузії вмісту неорганічного фосфату та сечової кислоти за стимуляції цих рецепторів може свідчити про пригнічення повної деградації АТФ, а, отже, і утворення як супероксиду ксантинооксидазою, так і пероксинітриту при взаємодії останнього з оксидом азоту. Варто зазначити, що при їх повній деградації втрачається можливість ресинтезу цих молекул. Отже, активація SUR-рецепторів  $K_{ATP}$ -каналів, інгібуючи ксантинооксидазу, не лише запобігає утворенню супероксиду, але і втраті пуринових основ (гіпоксантину і ксантину) для ресинтезу пуринових нуклеотидів.

Таким чином, пригнічення індукованої ішемією-реперфузією деградації молекул АТФ і ГТФ при активації SUR-рецепторів вищезгаданих каналів може бути ще одним важливим механізмом кардіопротекції.

***Дія стимуляції SUR-рецепторів при ішемії-реперфузії на гемоксигеназну реакцію.*** За умов ішемії-реперфузії в кардіоміоцитах зростає деградація гемму ферментом гемоксигеназою (гем = білірубін + CO + Fe), про що свідчить значне збільшення як вмісту білірубіну (в інтактній зоні, зоні ризику та некрозу відповідно у 7,1, 8,3 та 9 разів), так і заліза – у 4,6 і 6,3 раза у зоні ризику та некрозу. Виявлено, що активація SUR посилювала цей процес: вміст білірубіну в інтактній зоні, ризику та некрозу зростали у 8,9, 11,3 і 17,8 раза відповідно, а заліза у зоні ризику та некрозу – у 9,5 і 20,1 раза, що також може бути одним із механізмів кардіопротекції SUR-рецепторів, оскільки відомо про нейро- і кардіопротекторні ефекти CO.

***Вплив активації SUR-рецепторів калієвих каналів на апоптоз і некроз кардіоміоцитів та мітохондріальну пору.*** Вперше показано, що в експериментах з аноксією-реоксигенацією ізольованих неонатальних кардіоміоцитів активація SUR-рецепторів попереджує апоптоз та вдвічі зменшує некроз ізольованих неонатальних кардіоміоцитів. Зменшення вмісту АТФ при ішемії, з одного боку, погіршує роботу серця, з іншого, спричиняє, залежно від ступеня зниження вмісту АТФ і ГТФ у мітохондріях, апоптоз чи некроз кардіоміоцитів та ушкодження міокарда. Дійсно, в експериментах з аноксією-реоксигенацією ізольованих неонатальних кардіоміоцитів активувався некроз у 2,8 та апоптоз у 1,6 раза (рис. 11). Стимуляція SUR-рецепторів флокаліном (5 мкмоль/л) спричиняла зсув співвідношення живих, некротичних та апоптотичних клітин у бік живих (відсоток яких практично не відрізнявся від контролю без аноксії-реоксигенації), вдвічі

зменшувала процеси некрозу та повністю запобігала розвитку апоптозу, що був індукований аноксією-реоксигенацією (рис. 11, в).

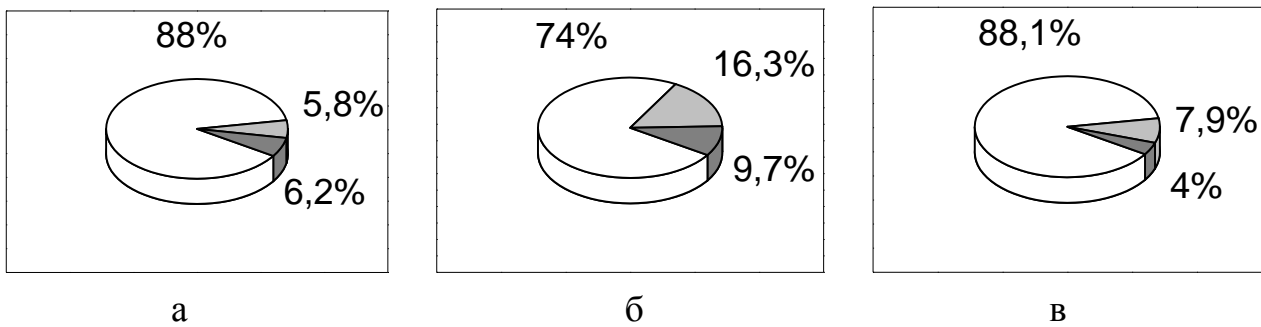


Рис. 11 Вплив активації SUR флокаліном (5 мкмоль/л) на співвідношення живих (білий), некротичних (світло-сірий) та апоптотичних (темний) клітин у культурі неонатальних кардіоміоцитів при аноксії-реоксигенації: а – контроль, б – аноксія-реоксигенація, в – аноксія-реоксигенація при стимуляції SUR

Очевидно, що попередженню цих механізмів смерті може сприяти пригнічення відкриття МП. У досліджах на ізольованих мітохондріях міокарда щурів активація SUR флокаліном і тіофлокаліном дозозалежним чином пригнічувала кальційіндуковане відкриття МП, з напівмаксимальними ефектами  $IC_{50}=50$  та  $IC_{50}=2,7$  мкмоль/л відповідно, та більш потужною дією останнього.

**Морфологічні дослідження з визначенням розміру зони інфаркту та ультраструктури міокарда.** За морфологічних досліджень показано, що активація SUR-рецепторів при ішемії-реперфузії міокарда сприяє збереженню цілісності сарколеми, структури внутрішньоклітинних органел, зменшує контрактири міофіламентів, значною мірою попереджує деструкцію мітохондрій та зменшує розмір інфаркту міокарда на 40 %.

Ішемія-реперфузія серця супроводжується значними ультраструктурними порушеннями міокарда, у більшості кардіоміоцитів спостерігалися такі зміни: конденсація ядерного хроматину, контрактири та лізис міофіламентів, набряк та деструкція мітохондрій, порушення цілісності сарколеми та ін. Це свідчить про розвиток незворотніх некротичних процесів у міокарді, які пов'язані з порушенням кардіогемодинамічних показників (рис. 12, а). Доішемічна активація SUR флокаліном (5 мкмоль/л) протягом 5 хв в експериментах з ішемією-реперфузією ізольованого за Лангендорфом серця щурів значною мірою попереджувала пошкодження кардіоміоцитів: сприяла збереженню цілісності сарколеми (лантан, який при виникненні мікродфектів цитоплазматичної мембрани проникає в міоцити, в наших дослідках, за стимуляції SUR – локалізувався екстрацелюлярно) та структури внутрішньоклітинних органел, призводила до зменшення кількості контрактур міофіламентів. Крім того, активація цих рецепторів значною мірою попереджувала деструкцію мітохондрій, що сприяло збереженню енергетичного потенціалу міокарда (див. рис. 12, б). Ці дані підтверджують описане вище припущення про мембраностабілізуючу дію активації SUR-рецепторів при ішемії-реперфузії міокарда шляхом пригнічення активності ферменту фосфоліпази  $A_2$ .

У дослідках на анестезованих собаках з експериментальною локальною

ішемією-реперфузією міокарда активація SUR-рецепторів флокаліном (субстанція, 0,1 мг/кг, таблетки: 1,5, 2,2 та 3,3 мг/кг) зменшувала розмір інфаркту міокарда порівняно з контролем близько до 40 %.

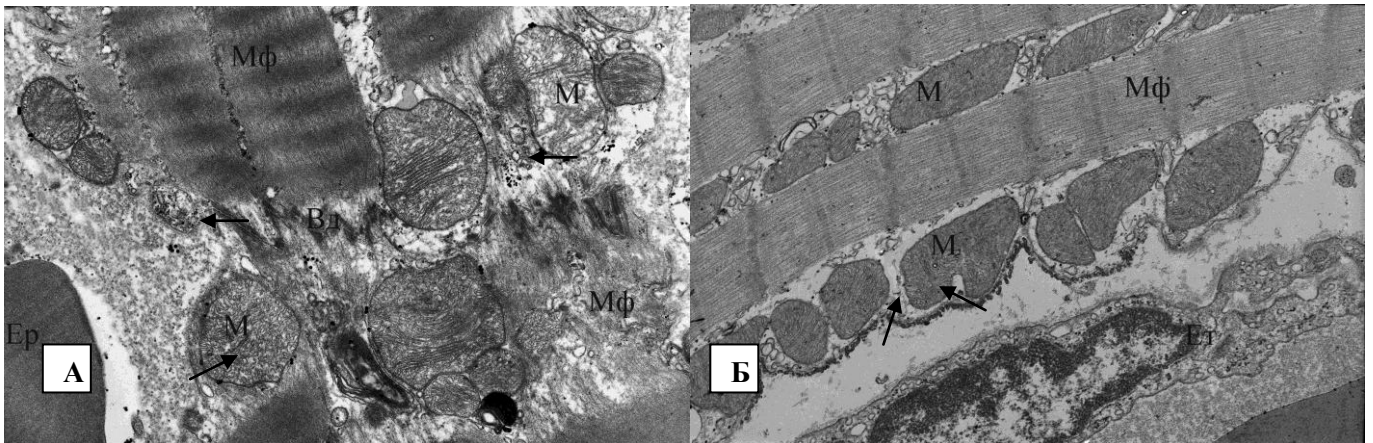


Рис. 12 Вплив активації SUR-рецепторів на розвиток ультраструктурних змін в міокарді при ішемії-реперфузії ізолюваного серця морської свинки.

А. Ішемія-реперфузія міокарда. Виражені контрактири міофіламентів (МФ), набухання мітохондрій (М) з руйнацією крист, наявність колоїдного лантану в цитоплазмі та на зовнішній мембрані мітохондрій (стрілки). Зб. 8000

Б. Ішемія-реперфузія міокарда при активації SUR. Ультраструктура міофіламентів та мітохондрій збережена. Незначний міжклітинний набряк. Колоїдний лантан локалізований екстрацелюлярно (стрілки). Зб. 8000

**Оптимальна для кардіопротекції ступінь активації SUR-рецепторів та відносна роль  $K_{ATP}$ -каналів сарколемальних та мітохондріальних мембран у захисті міокарда при ішемії-реперфузії.** За кардіогемодинамічними, біохімічними і морфологічними показниками визначено, що оптимальними для ефективної кардіопротекції є помірні активації SUR-рецепторів. Вперше показано, що в антиішемичному захисті міокарда та відновленні роботи ішемізованого серця під час реперфузії відіграють роль як мітохондріальні, так і сарколемальні  $K_{ATP}$ -канали. Перші більшою мірою відповідають за відновлення скоротливої активності міокарда, другі, в основному, за відновлення коронарного кровообігу.

### Молекулярно-генетичні дослідження

**Поширення алельних поліморфізмів Glu23Lys та Ile337Val гена KCNJ11 (Kir6.2) і Ser1369Ala гена ABCC8 (SUR1) в українській популяції та їх можлива роль як фактора ризику захворювань серця.** Генотипування населення української популяції щодо розподілу алельних поліморфізмів Ile337Val, Glu23Lys та Ser1369Ala показав, що він є подібним до європейської та близьким до азійської популяцій. Виявлено, що у хворих на хронічну серцеву недостатність частота гомозигот мінорного типу є дещо зменшеною, зокрема у 1,26 (Glu23Lys та Ser1369Ala) та у 1,32 (Ile337Val) рази відповідно, що збігається з попередженням значного зростання маси лівого шлуночка (ЛШ) та її індексу. А саме, за генотипу Val/Val на 27 та 28 % відповідно, і індексу маси ЛШ за генотипів Lys/Lys і Ala/Ala на 22,9 % порівняно з носіями гетерозигот. Достовірно меншим (на 26,8 %) у носіїв генотипу Lys/Lys і Ala/Ala порівняно з гетерозиготами був кінцево-діастолический



об'єм (КДО) ЛШ. Водночас найбільш патологічні зміни таких показників як маса ЛШ, КДО ЛШ та кінцево-систоличний об'єм (КСО) ЛШ у хворих на хронічну серцеву недостатність був у носіїв гетерозигот за цими поліморфізмами.

Найбільш сучасним методом фармакотерапії захворювань людини є фармакогенетичний метод, що дозволяє індивідуалізувати лікування певного хворого, дослідивши його генетичні особливості (алельний поліморфізм, SNPs). Як виявилось, ці одонуклеотидні заміни в геномі можуть приводити до значної структурної перебудови каналних субодиниць (зокрема, Kir6.х та SUR-рецепторів), порушувати їх взаємодію з сусідніми субодиницями та змінювати чутливість каналу до оточуючих лігандів, бути факторами ризику захворювань з механічними та електричними вадами серця (Schwanstecher C. et al., 2002; Reyes S. et al., 2009; Olson T.M. et al., 2010; Delaney J.T. et al., 2012).

За допомогою полімеразної ланцюгової реакції проведено генотипування 529 жителів України щодо поширення алельних поліморфізмів Ile337Val та Glu23Lys гена KCNJ11, а також Ser1369Ala гена ABCC8, що кодують Kir6.2- та SUR1-субодиниці  $K_{ATP}$ -каналу відповідно. Розподіл генотипів Ile/Ile, Ile/Val та Val/Val за поліморфізму Ile337Val у 383 осіб становив 36,6, 46,2 та 17,2 % відповідно. Частота генотипів Glu/Glu, Glu/Lys та Lys/Lys поліморфізму Glu23Lys та генотипів Ser/Ser, Ser/Ala та Ala/Ala поліморфізму Ser1369Ala у 504 осіб складала 40,9, 44,8 та 14,3 % відповідно. Виявилось, що успадкування алельних поліморфізмів Glu23Lys та Ser1369Ala є зчепленим. Поширення поліморфізмів Ser1369Ala, Ile337Val та Glu23Lys в українській популяції відповідало закону Харді-Вайнберга та показало подібність до європейської та близькість до азійської популяцій з деяким збільшенням генотипу Val/Val, та суттєво відрізнялось від африканської (NCBI, Reference SNP (refSNP) Cluster Report\_rs5219, rs5215, rs757110).

**Розподіл алельних варіантів гена KCNJ11 та ABCC8 у практично здорових людей (ПЗЛ), хворих на інфаркт міокарда (ІМ) та серцеву недостатність.** Частота алельного поліморфізму Glu23Lys гена KCNJ11 та Ser1369Ala гена ABCC8 у ПЗЛ (n=98), хворих на ІМ (n=107), гостру (ГСН, n=96) та хронічну (ХСН, n=99) серцеву недостатність представлено в табл. 1.

Таблиця 1  
Генетичні особливості (частота алельного поліморфізму) гена KCNJ11 (Glu23Lys) та ABCC8 (Ser1369Ala) у ПЗЛ, хворих на ІМ, ГСН та ХСН людей

Поліморфізм		ПЗЛ		Хворі люди					
Glu23Lys	Ser1369Ala			ІМ		ГСН		ХСН	
Генотип		n=98	%	n=107	%	n=96	%	n=99	%
Glu/Glu	Ser/Ser	37	37,76	43	40,19	40	41,67	43	43,43
Glu/Lys	Ser/Ala	46	46,94	47	43,93	41	42,71	44	44,44
Lys/Lys	Ala/Ala	15	15,31	17	15,89	15	15,63	12	12,12

Розподіл алельного поліморфізму Ile337Val гена KCNJ11 у ПЗЛ (n=90), хворих на ІМ (n=102), ГСН (n=93) та ХСН (n=98) приведено в табл. 2.

Частота вищезгаданих алельних поліморфізмів у всіх групах відповідала закону Харді-Вайсберга. Дослідження частоти цих поліморфізмів у різних групах

людей достовірних відмінностей не виявило. Проте, серед хворих на ХСН виявлено дещо зменшену кількість генотипів з мінорною гомозиготою. А саме, за поліморфізмів Glu23Lys та Ser1369Ala у 1,26 раза, для поліморфізму Ile337Val у 1,32 раза.

Таблиця 2  
Генетичні особливості (частота алельного поліморфізму) гена KCNJ11 (Ile337Val) у ПЗЛ, хворих на ІМ, ГСН та ХСН людей

Поліморфізм Ile337Val	ПЗЛ		Хворі люди					
			ІМ		ГСН		ХСН	
Генотип	n=90	%	n=102	%	n=93	%	n=98	%
Ile/Ile	32	35,56	33	32,35	35	37,63	40	40,82
Ile/Val	41	45,56	52	50,98	40	43,01	44	44,9
Val/Val	17	18,89	17	16,67	18	19,35	14	14,29

**Зміна показників ехокардіографії у людей з ХСН за алельних поліморфізмів Ile337Val, Glu23Lys та Ser1369Ala.** Аналіз таких показників ехокардіографії хворих на ХСН як маса ЛШ, кінцево-діастолічний та систолічний об'єми ЛШ та фракція викиду показав, що найбільш патологічні зміни спостерігаються у носіїв гетерозиготних генотипів (Ile/Val, Glu/Lys та Ser/Ala) за поліморфізмів Ile337Val, Glu23Lys та Ser1369Ala (табл. 3).

Таблиця 3  
Залежність показників ехокардіографії у хворих на ХСН від генотипу за поліморфізмів Ile337Val, Glu23Lys (ген KCNJ11) та Ser1369Ala (ген ABC8)

Показники ехокардіо- графії	Алельний поліморфізм Ile337Val (n=98)			Алельні поліморфізми Glu23Lys та Ser1369Ala (n=99)		
	Ile/Ile (n=40) 40,8%	Ile/Val (n=44) 44,9%	Val/Val (n=14) 14,3%	Glu/Glu Ser/Ser (n=43) 43,4%	Glu/Lys Ser/Ala (n=44) 44,4%	Lys/Lys Ala/Ala (n=12) 12,2%
КСО ЛШ, мл	133,5 ± 10,44	150,79 ± 8,30	114,37 ± 14,03	131,81 ± 9,85	148,0 ± 8,82	117,91 ± 12,94
Індекс КСО ЛШ, мл/м <sup>2</sup>	64,11 ± 5,02	76,22 ± 4,18	55,99 ± 6,89	64,29 ± 4,8	73,22 ± 4,3	56,94 ± 6,20
КДО ЛШ, мл	199,35 ± 11,02	216,83 ± 10,09	173,86 ± 13,81	195,37 ± 10,14	218,45 ± 10,55	172,23 * ± 11,61
Індекс КДО ЛШ, мл/м <sup>2</sup>	95,84 ± 5,30	109,63 ± 5,08	84,44 ± 6,65	95,77 ± 4,97	107,37 ± 5,14	84,17 ± 5,95
Маса ЛШ, г	396,18 ± 17,61	425,48 ± 19,62	334,15 * ± 19,12	386,07 ± 17,09	423,87 ± 19,34	351,30 ± 23,32
Індекс маси ЛШ, г/м <sup>2</sup>	193,00 ± 8,54	208,45 ± 9,45	162,30 * ± 8,43	188,32 ± 8,39	207,64 ± 9,32	168,99 * ± 9,60
Фракція викиду, %	36,0 ± 4,17	32,0 ± 1,95	37,0 ± 2,41	33,9 ± 3,83	32,8 ± 2,2	35,2 ± 2,42

Примітки:

- \*P<0,05 порівняно з гетерозиготою,

2. КДО – об'єм лівого шлуночка в діастолі,
3. КСО – об'єм лівого шлуночка за систоли,
4. ЛШ – маса лівого шлуночка,
5. Індекс – відношення показника до площі тіла.

Ці результати виявились досить очікуваними, адже алельні поліморфізми іонних каналів в більшості мають призводити до погіршення їх провідної функції (Schwanstecher C. et al., 2002; Riedel M.J. et al., 2005). Проте, для поліморфізмів Glu23Lys та Ile337Val гену KCNJ11 (Kir6.2) показано, що за їх алельних варіантів 23Lys та 337Val відповідно зменшується чутливість  $K_{ATP}$ -каналів до інгібуючої дії АТФ (Schwanstecher C. et al., 2002; Riedel M.J. et al., 2003). Тобто ці канали повинні знаходитись довше у функціонально активному відкритому стані і мати більшу протекторну дію. Дійсно, як з'ясувалося, показники ехокардіографії у хворих на ХСН, що мають генотип з мінорними гомозиготами (Val/Val, Lys/Lys, Ala/Ala) виявились найменш патологічно зміненими (див. табл. 3). Зокрема, за генотипу Val/Val спостерігається достовірне зменшення маси ЛШ та її індексу на 27,3 ( $P<0,05$ ) та 28,4 % ( $P<0,05$ ) відповідно та індексу маси ЛШ на 22,9 % ( $P<0,05$ ) за генотипів Lys/Lys і Ala/Ala порівняно з носіями гетерозигот. Достовірним по відношенню до генотипів з гетерозиготами у двох останніх виявилось також зменшення (на 26,8 %,  $P<0,05$ ) такого показника ехокардіографії як КДО ЛШ.

Таким чином, вперше показано, що у хворих на ХСН з гетерозиготами за поліморфізмів Ile337Val, Glu23Lys та Ser1369Ala спостерігається значне збільшення маси, КСО та КДО ЛШ, порушується його скоротлива функція. Водночас, за генотипів з мінорною гомозиготою (Val/Val, Lys/Lys, Ala/Ala) за цих поліморфізмів вищезгадані показники ехокардіографії є найменш патологічно зміненими.

**Дослідження експресії SUR1, SUR2, Kir6.1 та Kir6.2 у щурів лінії Wistar-Kyoto та SHR різного віку.** Вперше показано, що у дорослих SHR щурів експресія генів, що кодують білки Kir6.1, Kir6.2 та SUR2 значно менша порівняно зі щурами Wistar-Kyoto, а у старих 18-місячних SHR щурів значно менша експресія SUR1 і SUR2, що вірогідно, може бути одним із механізмів декомпенсації недостатності серця.

Дослідження експресії SUR1 (складові мітохондріальних, нейрональних та атріальних  $K_{ATP}$ -каналів) та SUR2 (складові сарколемальних каналів міокарда шлуночків та судин), що кодують гени ABCC8 та ABCC9 відповідно, у міокарді лівого шлуночка дорослих (віком 6 міс) та старих (віком 18 міс) SHR щурів показало, що їх експресія значно змінена порівняно зі щурами лінії Wistar-Kyoto відповідного віку (табл. 4). SUR1 є особливим об'єктом дослідження, адже вони є складовою частиною  $K_{ATP}$ -каналів каналів мітохондріальних мембран. Показано, що у дорослих щурів обох ліній як Wistar-Kyoto, так і SHR рівень мРНК SUR1 достовірно не відрізняється (див. табл. 4). Проте, якщо з віком у щурів Wistar-Kyoto експресія SUR1 значно збільшується (у 7,5 раза,  $P<0,05$ ), то у SHR тварин навпаки, суттєво зменшується (у 9,3 раза,  $P<0,05$ ). Різниця рівнів експресії SUR1 у старих щурів обох ліній була ще біль вражаючою – у тварин лінії SHR він був нижчим у 99,5 раза ( $P<0,05$ ) порівняно з дорослими (див. табл. 4). Вірогідно, збільшення експресії SUR1-рецепторів мітохондріального типу у старих щурів лінії Wistar-

Kyoto є компенсаторним захисним механізмом, спрямованим на підтримання енергозабезпечення (синтез АТФ) клітин, зокрема міокарда. Значне зменшення їх експресії у щурів лінії SHR може сприяти розвитку патологічних процесів.

Таблиця 4

Експресія мРНК SUR1, SUR2, Kir6.1 та Kir6.2 субодиниць  $K_{ATP}$ -каналів у щурів лінії Wistar-Kyoto та SHR різного віку

Щури лінії Субодиниці $K_{ATP}$ -каналу	Wistar-Kyoto		Спонтанно гіпертензивні щури (SHR)	
	Дорослі (6 міс.), n=7	Старі (18 міс.), n=6	Дорослі (6 міс.), n=5	Старі (18 міс.), n=6
SUR1	0,318 ± 0,12	2,390 ± 2,14*	0,222 ± 0,14	0,024±0,005***
SUR2	34,581 ± 13,67	8,804 ± 3,84*	8,812 ± 4,30**	0,183 ± 0,05***
Kir6.1	121,45 ± 40,4	149,17 ± 53,26	19,41 ± 7,35**	131,92 ± 27,24*
Kir6.2	259,23 ± 146,2	67,57 ± 20,0*	12,39 ± 3,98**	73,05 ± 16,56*

Примітки:

1. \* $P < 0,05$  – старі щури відносно дорослих,
2. \*\* $P < 0,05$  – щури лінії SHR відносно щурів лінії Wistar-Kyoto.

SUR2 разом з Kir6.1 та Kir6.2 утворює сарколемальні  $K_{ATP}$ -канали судинних гладенько-м'язових клітин (важливий регулятор судинного тонуусу) та кардіоміоцитів (знижує мембранний потенціал спокою та зменшує тривалість потенціалу дії) відповідно. Виявлено, що експресія SUR2 з віком значно зменшується. А саме, у щурів лінії Wistar-Kyoto у 3,9 раза ( $P < 0,05$ ), у щурів SHR у 48,2 раза ( $P < 0,05$ ); (див. табл. 4). Водночас у старих SHR щурів експресія SUR2 була у 48,1 раза ( $P < 0,05$ ) нижчою, порівняно зі щурами лінії Wistar-Kyoto такого ж віку.

Таким чином, рівні експресії мРНК SUR1 та SUR2 у старих спонтанно гіпертензивних щурів були значно меншими порівняно з дорослими, а також порівняно з рівнем їх експресії у старих щурів лінії Wistar-Kyoto, що у SHR щурів вірогідно може бути одним із механізмів декомпенсації недостатності серця.

Рівні мРНК як судинного (Kir6.1), так і серцевого (Kir6.2) типу  $K_{ATP}$ -каналів у міокарді дорослих щурів лінії SHR були значно менші (у 6,3 та 20,9 раза відповідно,  $P < 0,05$ ) порівняно з аналогічними за віком щурами лінії Wistar-Kyoto (див. табл. 4). З віком їх рівень експресії (на відміну від SUR) зростає та у старих тварин був достовірно більшим у 6,8 та 5,9 раза ( $P < 0,05$ ) порівняно з дорослими 6-місячними щурами (див. табл. 4). При цьому рівні мРНК цих білків у них достовірно не відрізнялися від таких у старих щурів лінії Wistar-Kyoto. Дослідження експресії цих субодиниць у старих щурів лінії Wistar-Kyoto показало, що якщо рівень експресії Kir6.1 (судинного типу) у міокарді зберігався, то рівень експресії Kir6.2 (серцевого типу) у старих щурів знижувався у 3,8 раза. Отже, у старих 18-місячних щурів обох ліній рівень експресії Kir6.2 та Kir6.1 субодиниць  $K_{ATP}$  каналів у міокарді лівого шлуночка практично вирівнюється (див. табл. 4).

Таким чином, виявлено, що рівень експресії Kir6.1, Kir6.2 та SUR2 сарколемальних  $K_{ATP}$ -каналів у дорослих SHR щурів значно менший порівняно зі щурами Wistar-Kyoto. Вірогідно, що низький рівень експресії регуляторних

рецепторів  $K_{\text{ATФ}}$ -каналів SUR1 і SUR2 у старих SHR щурів може бути одним із механізмів декомпенсації недостатності серця.

## ВИСНОВКИ

Захисний ефект активації SUR-рецепторів калієвих каналів реалізується за рахунок комплексних механізмів, в основі яких лежать гальмівні процеси, що включають кардіогемодинаміку і зміну метаболізму. Вперше проведено генотипування в українській популяції щодо поширення алельних поліморфізмів генів KCNJ11 та ABCC8, що кодують Kir6.2 і SUR1 білки  $K_{\text{ATФ}}$ -каналу, та показано їх зв'язок з таким захворюванням, як серцева недостатність. Виявлено, що у старих 18-місячних спонтанно гіпертензивних щурів значно менша експресія SUR1 і SUR2, що може бути одним із механізмів декомпенсації недостатності серця.

1. Показано, що активація SUR-рецепторів  $K_{\text{ATФ}}$ -каналів спричиняє зворотну гіперполяризацію, знижує потенціал спокою, зменшує тривалість ПД та частоту скорочень кардіоміоцитів, спричиняє кардіодепресорні та вазодилаторні реакції (в т.ч. розширює коронарні судини), втричі підвищує оксигенацію крові, має виражену антиоксидантну дію, дозозалежно пригнічує утворення пероксиду водню та ДК (з максимальним ефектом у 7,2 та 6,3 раза відповідно), супероксид-аніона та пероксинітриду, підвищує активність ферменту cNOS та гальмує – iNOS (з максимумальним ефектом у 3 та 2,1 раза відповідно), зменшує утворення вільної арахідонової кислоти, як маркера активності фосфоліпази  $A_2$ .
2. До кардіопротекторних механізмів активації SUR, що реалізуються внаслідок кардіогемодинамічних змін, можна віднести помірне зниження артеріального тиску, попередження реперфузійного підвищення загального периферичного опору і опору коронарних судин, та відносне збереження показників скоротливості міокарда в період реперфузії.
3. Вперше показано, що кардіопротекторні механізми при активації SUR можуть полягати в пригніченні надлишкового індукбельного та реутилізаційного (з максимумом у 4,5 та 12,4 раза відповідно) та, навпаки, підвищенні протективного конститутивного синтезу NO (у 1,6 раза) та пригніченні деградації L-аргініну аргіназою (максимально у 11,5 раза), а також підвищенні вмісту сфінгозину (максимально у 4,7 раза), який може запускати активацію cNOS. Важливим механізмом кардіопротекції є мембранопротекція (про що свідчить зниження вмісту вільної арахідонової кислоти (максимально у 10 разів) та, відповідно, активності фосфоліпази  $A_2$ ), пригнічення деградації АТФ (максимально у 5 разів) та попередження утворення патогенних за ішемії LTC<sub>4</sub> та TxV<sub>2</sub> (втричі), підвищення активності ферменту гемоксигенази. Важливим захисним механізмом є пригнічення вільнорадикальних реакцій: значне обмеження генерації активних форм кисню та азоту (супероксид-аніона (у 12 разів), H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (максимально у 10 разів), пероксинітриду (вдвічі)), як внаслідок перекисного (зменшення ДК і МДА вдвічі-тричі), так і ферментативного (ліпоксигеназою і циклооксигеназою) окиснення ліпідів, та пригнічення активності ксантинооксидази (втричі), а також попередження утворення токсичного вмісту сечовини та сечової кислоти. При цьому активація SUR-рецепторів не лише запобігає зниженню активності ферментів АОС каталази і

СОД при ішемії-реперфузії, а навіть підвищувала її (максимально на 59 та 73 % відповідно). Про її потужну антиішемічну дію може свідчити пригнічення реутилізаційного синтезу NO та підвищення вмісту нітрит-аніона.

4. За морфологічних досліджень показано, що активація SUR-рецепторів за ішемії-реперфузії міокарда сприяє збереженню цілісності сарколеми, структури внутрішньоклітинних органел, зменшує контрактири міофіламентів, значною мірою попереджує деструкцію мітохондрій та зменшує розмір інфаркту міокарда на 40 %.
5. Кардіопротекторними механізмами активації SUR-рецепторів можуть бути помірно зменшення спряження процесів окисного фосфорилування мітохондрій, попередження відкривання мітохондріальної пори, зменшення апоптозу та некрозу кардіоміоцитів.
6. Виявлено, що оптимальною для кардіопротекції є помірна активація SUR-рецепторів, а в антиішемічному захисті міокарда канали мітохондріальної мембрани більшою мірою відповідають за підтримання скоротливої активності міокарда, тоді як сарколемальної – за коронарний кровообіг.
7. Вперше вивчено поширення алельних поліморфізмів Ile337Val та Glu23Lys гена KCNJ11 та поліморфізму Ser1369Ala гена ABCG8, що кодують Kir6.2 та SUR1 відповідно у мешканців української популяції та показано, що воно практично не відрізняється від населення європейської та є близьким до азійської популяції. Виявлено, що у хворих на хронічну серцеву недостатність частота гомозигот мінорного типу є зменшеною у 1,26 (Glu23Lys та Ser1369Ala) та у 1,32 (Ile337Val) рази, що збігається з попередженням зростання маси лівого шлуночка та зниження скоротливої функції міокарда, а саме, достовірне зменшення маси лівого шлуночка та її індексу за генотипу Val/Val на 27,3 та 28,4 % відповідно, індексу маси та кінцево-діастолічного об'єму лівого шлуночка на 22,9 та 26,8 % відповідно за генотипів Lys/Lys і Ala/Ala порівняно з носіями гетерозигот.
8. Вперше показано, що порівняно зі щурами Wistar-Kyoto у дорослих спонтанно гіпертензивних щурів експресія генів, що кодують білки Kir6.1, Kir6.2 і SUR2 менша у 6,3, 20,9 і 3,9 рази відповідно, а у старих 18-місячних SHR щурів значно менша експресія SUR1 та SUR2 (у 99,5 та 48,1 рази відповідно), що може бути одним із механізмів декомпенсації недостатності серця.

## **СПИСОК ОСНОВНИХ ПУБЛІКАЦІЙ ЗА ТЕМОЮ ДИСЕРТАЦІЇ (розділ у монографії, статті, патенти)**

1. Струтинский РБ, Пивовар СМ. АТФ-зависимые калиевые каналы и их роль как центрального звена кардиопротекции при ишемии-реперфузии миокарда. (С. 206-252). – Мойбенко АА. и др. Эндогенные механизмы кардиопротекции как основа патогенетической терапии заболеваний сердца // Наукова думка, Київ. – 2008, 518 с. (*Особистий внесок: пошук та аналіз літературних та власних*

- даних, підготовка матеріалів до друку).
2. Strutynskiy 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 Phys Pathophys*. 2010,1(3): 211-218. *(Особистий внесок: проведення досліджень, оброблення та аналіз результатів, підготовка матеріалів до друку)*.
  3. Strutynskiy 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 Phys Pathophys*. 2010,1(4):305-313. *(Особистий внесок: проведення досліджень, оброблення та аналіз отриманих результатів, підготовка матеріалів до друку)*.
  4. Voitychuk OI, Strutynskiy RB, Yagupolskii LM, Tinker A, Moibenko OO, Shuba YM. Sarcolemmal cardiac K<sub>ATP</sub> channels as a target for the cardioprotective effects of the fluorine-containing pinacidil analogue flocalin. *Brit J Pharmacol*. 2011,162(3):701-711. *(Особистий внесок: проведення частини досліджень, оброблення та аналіз отриманих результатів, підготовка матеріалів до друку)*.
  5. Strutynskiy RB. Vasodilatation Effects of Fluorine-Containing K<sub>ATP</sub> Channels Opener of Flocalin. *Int J Phys Pathophys*. 2011,2(1):69-77. *(Особистий внесок: проведення досліджень, оброблення та аналіз результатів, підготовка до друку)*.
  6. Strutynskiy RB, Kotsiuruba AV, Neshcheret AP, Rovenets RA, Moibenko AA. Changes in Myocardium Metabolism in Ischemia-Reperfusion and Activation of ATP-Sensitive Potassium Channels. *Int J Phys Pathophys*. 2012,3(3):253-267. *(Особистий внесок: проведення досліджень, оброблення отриманих результатів та їх аналіз, підготовка матеріалів до друку)*.
  7. Voitychuk OI, Strutynskiy RB, Moibenko OO, Shuba YM. Effects of fluorine-containing opener of ATP-sensitive potassium channels, pinacidil-derivative flocalin, on cardiac voltage-gated sodium and calcium channels. *Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol*. 2012,385(11):1095-1102. *(Особистий внесок: участь у дослідженнях та інтерпретації результатів)*.
  8. Strutynskiy RB, Rovenets RA, Strutynska NA, Neshcheret AP, Moibenko OO. Effect of ATP-Sensitive Potassium Channel Activation by Flocalin on the Functioning of the Cardiovascular System. *Int J Phys Pathophys*. 2013,4(4):1-6. *(Особистий внесок: проведення досліджень, аналіз результатів та підготовка до друку)*.
  9. Strutynskiy RB, Kotsuruba AV, Rovenets RA, Strutynska NA, Yagupolskii YuL, Sagach VF, Moibenko OO. Biochemical Mechanisms of Cardioprotective Action of the Drug Product Flocalin, ATP-Sensitive K<sup>+</sup> Channel Opener, in Myocardial Ischemia – Reperfusion. *Int J Phys Pathophys*. 2014,5(3):231-244. *(Особистий внесок: проведення досліджень, аналіз результатів та підготовка до друку)*.
  10. Strutynska NA, Strutynskiy RB, Chorna SV, Semenykhina OM, Mys LF, Moibenko OO, Sagach VF. New Fluorine-Containing Openers of ATP-sensitive Potassium Channels Flocalin and Tioflocalin Inhibit Calcium-Induced Mitochondrial Pore Opening in Rat Hearts. *Int J Phys Pathophys*. 2014,5(4):334-343. *(Особистий внесок: проведення досліджень, аналіз результатів та підготовка до друку)*.

11. Хмиль НВ, Горбачёва ОС, Струтинский РБ, Коробейникова МО, Белослудцева НВ, Коломыткін ОВ, Миронова ГД. Изучение влияния флокалина на дыхание и калиевый транспорт митохондрий сердца и печени крыс. *Биофизика (Biofizika)*. 2016,61(5):884–888. *(Особистий внесок: ідея дослідження, участь в інтерпретації отриманих результатів)*.
12. Gorbacheva OS, Strutynskiy RB, Khmil NV, Belosludtseva NV, Mursaeva SV, Korobeynikova MO, Alilova GA, Lezhnev EI, Mironova GD. Study of the influence of floccalin on the energy and ion exchanges in rat liver mitochondria. *Biological Motility. Pushchino*. 2016:73-77. *(Особистий внесок: участь у дослідженнях та аналізі результатів, підготовка матеріалів до друку)*.
13. Khmil NV, Gorbacheva OS, Strutynskiy RB, Korobeynikova MO, Belosludtseva NV, Kolomytkin OV, and Mironova G.D. A Study of the Effects of Floccalin on Respiration and Potassium Transport of Rat- Heart and Liver Mitochondria. *Biophysics*. 2016,61(6):888–892. *(Особистий внесок: ідея дослідження, участь в інтерпретації отриманих результатів)*.
14. Струтинський РБ, Мойбенко ОО, Пивовар СМ, Досенко ВЄ, Ягупольський ЛМ. АТФ-чутливі калієві канали та зміни їх функціональної активності при стрептозотоцин-викликаному цукровому діабеті. *Фізіол журн*. 2003,49(6):22-31. *(Особистий внесок: проведення досліджень, оброблення отриманих результатів та їх аналіз, підготовка матеріалів до друку)*.
15. Пивовар СМ, Струтинський РБ, Мойбенко ОО, Ягупольський ЛМ. Вазодилататорні ефекти нових фторвмісних аналогів діазоксиду. *Доповіді НАН України*. 2004,4:183-187. *(Особистий внесок: участь в експерименті, оброблення та аналіз результатів, підготовка матеріалів до друку)*.
16. Пивовар СМ, Струтинський РБ, Ягупольський ЛМ, Мойбенко ОО. Дослідження механізму дії нових фторвмісних аналогів діазоксиду на судинний тонус. *Фізіол журн*. 2004,50(2):27-34. *(Особистий внесок: участь в експерименті, оброблення результатів та їх аналіз, підготовка матеріалів до друку)*.
17. Пивовар СМ, Струтинський РБ, Коржов ВІ, Мойбенко ОО. Вплив нових активаторів АТФ-чутливих калієвих каналів на окиснювальне фосфорилування митохондрий *in vitro*. *Клінічна та експериментальна патологія*. 2004,III(2),Ч.1:55-57. *(Особистий внесок: участь в експерименті, оброблення отриманих результатів та їх аналіз, підготовка матеріалів до друку)*.
18. Пивовар СМ, Струтинський РБ, Шиш АМ, Ягупольський ЛМ, Мойбенко ОО. Дослідження протекторних властивостей фторованого активатора  $K_{ATP}$  каналів: можливі механізми захисту. *Збірник робіт: "Гомеостаз: фізіологія, патологія, фармакологія і клініка"*. Одеса. 2005:55-58. *(Особистий внесок: участь в експерименті, оброблення та аналіз результатів, підготовка до друку)*.
19. Струтинский РБ, Пивовар СН, Ровенец РА, Піскун ОВ, Ягупольський ЛМ, Мойбенко ОО. Вплив активатора аденозинтрифосфатчутливих калієвих каналів флокаліну на функціонування ізольованого серця. *Фізіол журн*. 2005,51(6):18-24. *(Особистий внесок: проведення досліджень, оброблення отриманих результатів та їх аналіз, підготовка матеріалів до друку)*.
20. Пивовар СМ, Коржов ВІ, Струтинський РБ, Ягупольський ЛМ, Мойбенко ОО.



- Вплив фторвмісних активаторів мітохондріальних аденозинтрифосфатчутливих калієвих каналів на окисне фосфорилування. *Фізіол журн.* 2006,52(3):25-33. *(Особистий внесок: участь в експерименті, оброблення отриманих результатів та їх аналіз, підготовка матеріалів до друку).*
21. Мойбенко ОО, Струтинський РБ, Ягупольський ЛМ, Мохорт МА. Розробка та підготовка до впровадження нового вітчизняного кардіопротекторного препарату – фторвмісного активатора АТФ-залежних калієвих каналів Флокалін. *Наука та інновації.* 2006,2(4):77-82. *(Особистий внесок: проведення досліджень, оброблення та аналіз результатів, підготовка до друку).*
  22. Ягупольський ЛМ, Малетина ІІ, Петко КІ, Денисенко ОН, Мойбенко АА, Струтинський РБ, Пивовар СН, Тарасова ЕВ. Аналоги активатора калієвих каналів діазоксида, що містять дифторметокси та трифторметокси групи. *Журнал органічної та фармацевтичної хімії.* 2008,6 випуск 2 (22):37-47. *(Особистий внесок: дослідження специфічної активності нових сполук).*
  23. Струтинський РБ, Пивовар СМ, Тумановська ЛВ, Мойбенко О.О. Кардіопротекторні ефекти флокаліну: відносна роль активації сарколемальних та мітохондріальних аденозинтрифосфатзалежних калієвих  $K_{ATP}$  каналів. *Фізіол журн.* 2008,54(6):15-23. *(Особистий внесок: проведення досліджень, оброблення та аналіз результатів, підготовка матеріалів до друку).*
  24. Мойбенко ОО, Струтинський РБ, Ягупольський ЛМ, Мохорт МА, Шаламай АС. Організація заводського виготовлення препарату Флокалін – нового вітчизняного міотропного спазмолітика і кардіопротектора. *Наука та інновації.* 2009,5(1):80-84. *(Особистий внесок: проведення досліджень, оброблення отриманих результатів та їх аналіз, підготовка матеріалів до друку).*
  25. Струтинський РБ. Кардіопротекторні ефекти лікарської форми фторвмісного активатора аденозинтрифосфатчутливих калієвих каналів флокаліну. *Фізіол журн.* 2009,55(4):83-90. *(Особистий внесок: проведення досліджень, оброблення та аналіз результатів, підготовка матеріалів до друку).*
  26. Струтинський РБ, Нещерет ОП, Тумановська ЛВ, Ровенець РА, Мойбенко ОО. Кардіопротекторні ефекти флокаліну в експериментах *in vivo*: вплив на гемодинаміку та ураження міокарда за умов його ішемії-реперфузії. *Фізіол журн.* 2009,55(5):9-16. *(Особистий внесок: проведення досліджень, оброблення та аналіз отриманих результатів, підготовка матеріалів до друку).*
  27. Струтинський РБ, Коцюруба АВ, Нещерет ОП, Шиш АМ, Ровенець РА, Мойбенко ОО. Кардіопротекторні ефекти активації аденозинтрифосфатзалежних калієвих каналів в експериментах *in vivo*: вплив на біохімічні параметри крові за умов ішемії-реперфузії міокарда. *Фізіол журн.* 2009,55(6):12-19. *(Особистий внесок: проведення досліджень, аналіз результатів та підготовка до друку).*
  28. Струтинський РБ. Основні кардіопротекторні ефекти нового вітчизняного фторвмісного активатора  $K_{ATP}$  каналів – препарату Флокалін. *Медицина гідрологія і реабілітація.* 2009,7(4):4-12. *(Особистий внесок: проведення досліджень, оброблення та аналіз результатів, підготовка до друку).*
  29. Струтинський Р, Мохорт М, Ягупольський Л, Мойбенко О. Флокалін – новий вітчизняний кардіопротектор. *Вісник фармакології та фармації.* 2010,3:44-56. *(Особистий внесок: проведення досліджень, оброблення та аналіз отриманих*

- результатів, підготовка матеріалів до друку).*
30. Струтинський РБ. Вазодилататорні ефекти флокаліну – фторвмісного активатора аденозинтрифосфатчутливих калієвих каналів. *Фізіол журн.* 2010,56(4):59-65. *(Особистий внесок: проведення досліджень, оброблення та аналіз отриманих результатів, підготовка матеріалів до друку).*
  31. Струтинський РБ, Ровенець РА, Нещерет ОП. Вплив нового активатора аденозинтрифосфатчутливих калієвих каналів флокаліну на зміни вмісту глюкози в крові в експерименті. *Фізіол журн.* 2010,56(6):38-47. *(Особистий внесок: проведення досліджень, аналіз результатів, підготовка до друку).*
  32. Струтинський РБ, Ровенець РА, Нещерет ОП, Тумановська ЛВ, Бойчук ТМ, Джуран БВ, Мойбенко ОО. Вплив лікарської форми флокаліну на перебіг ішемії-реперфузії міокарда. *Фізіол журн.* 2011,57(1):55-65. *(Особистий внесок: проведення досліджень, аналіз отриманих результатів, підготовка до друку).*
  33. Струтинський РБ, Коцюруба АВ, Нещерет ОП, Ровенець РА, Мойбенко ОО. Зміни метаболізму в міокарді при ішемії-реперфузії та активації аденозинтрифосфатчутливих калієвих каналів. *Фізіол журн.* 2012,58(1):13-26. *(Особистий внесок: проведення досліджень, оброблення отриманих результатів та їх аналіз, підготовка матеріалів до друку).*
  34. Струтинський РБ, Ровенець РА, Мойбенко ОО. Механізми кардіопротекторної дії вітчизняного активатора  $K_{ATP}$  каналів Флокаліну. *Таврический медико-биологический вестник.* 2012,15(3),ч.2(59):226-229. *(Особистий внесок: проведення досліджень, аналіз отриманих результатів, підготовка до друку).*
  35. Струтинський РБ, Мойбенко ОО, Чебанов ВА, Горобець МЮ. Моделювання промислового процесу виробництва препарату “Флокалін” та визначення його оптимально-ефективної дози для лікування захворювань серця. *Наука та інновації.* 2013,9(1):55-63. *(Особистий внесок: проведення досліджень, оброблення та аналіз результатів, підготовка матеріалів до друку).*
  36. Струтинський РБ, Ровенець РА, Струтинська НА, Нещерет ОП, Мойбенко ОО. Вплив активації аденозинтрифосфатчутливих калієвих каналів флокаліном на функцію серцево-судинної системи. *Фізіол журн.* 2013,59(1):11-16. *(Особистий внесок: проведення досліджень, аналіз результатів та підготовка до друку).*
  37. Струтинський РБ, Нагібін ВС, Струтинська НА, Янчій ОР, Мойбенко ОО. Вплив флокаліну на розвиток апоптозу та некрозу при аноксії-реоксигенації ізольованих неонатальних кардіоміоцитів. *Фізіол журн.* 2013,59(3):3-9. *(Особистий внесок: проведення досліджень, оброблення отриманих результатів та їх аналіз, підготовка матеріалів до друку).*
  38. Струтинський РБ, Коцюруба АВ, Ровенець РА, Струтинська НА, Ягупольський ЮЛ, Сагач ВФ, Мойбенко ОО. Дослідження біохімічних механізмів кардіопротекторної дії лікарської форми активатора аденозинтрифосфатчутливих калієвих каналів флокаліну за ішемії-реперфузії міокарда. *Фізіол журн.* 2013,59(4):16-27. *(Особистий внесок: проведення досліджень, оброблення та аналіз результатів, підготовка до друку).*
  39. Струтинська НА, Струтинський РБ, Чорна СВ, Семенихіна ОМ, Мись ЛА, Мойбенко ОО, Сагач ВФ. Нові фторвмісні активатори АТФ-чутливих калієвих каналів флокалін і тіофлокалін пригнічують кальційіндуковане відкривання

- мітохондріальної пори у серці щурів. Фізіол журн. 2013,59(6): 3–11. *(Особистий внесок: проведення досліджень, аналіз результатів, підготовка до друку).*
40. Струтинський РБ, Струтинська НА, Максимюк ОП, Платонов МО, Бойко ОМ, Васильченко ОВ, Федянович І М, Досенко ВС, Кришталь ОО. Розроблення нових активаторів АТФ-чутливих калієвих каналів клітинних мембран. Наука та інновації. 2016,12(4):37-7. *(Особистий внесок: проведення досліджень, оброблення та аналіз результатів, підготовка матеріалів до друку).*
41. Strutynskiy RB, Strutynska NA, Maximyuk OP, Platonov MO, Boyko OM, Vasylychenko AV, Fedyanovich IN, Dosenko VE, and Krishtal OA. Design of new openers of ATP-sensitive potassium channels of the cell membranes. Sci innov. 2016, 12(4):36-44. *(Особистий внесок: проведення досліджень, оброблення та аналіз отриманих результатів, підготовка матеріалів до друку).*
42. Струтинський РБ, Ровенець РА, Сваричевський ОВ, Досенко ВС. Поширення алельних поліморфізмів генів, що кодують субодиниці  $K_{ATP}$  каналів ( $Pe_{337} \rightarrow Val$  та  $Glu_{23} \rightarrow Lys$  гена  $KCNJ11$  та  $Ser_{1369} \rightarrow Ala$  гена  $ABCC8$ ) в українській популяції. Фізіол журн. 2017,63(3):3–8. *(Особистий внесок: проведення досліджень, оброблення та аналіз результатів, підготовка матеріалів до друку).*
43. Ягупольський ЛМ, Малетіна ІІ, Петко КІ, Мойбенко ОО, Струтинський РБ, Пивовар СМ, Шевчук ВГ, Карвацький ІМ, Тарасова КВ. Патент України № 77344 А 61 К 31/54. „Дифторметилловий-3-метил-2Н1,2,4-бензотіодіозин-1,1 діоксид”. № а 2005 03296; Заяв. 11.04.2005; Опубл. 15.11.2006. Промислова власність. 2006,11. *(Особистий внесок: експериментальне дослідження специфічної активності нових сполук).*
44. Струтинський РБ, Мойбенко ОО, Ягупольський ЮЛ. Патент України на корисну модель № 59490 А 61 К 31/00. „Спосіб зменшення розміру некротичного ушкодження міокарда при експериментальній ішемії-реперфузії міокарда”. № u 2011 02188; Заяв. 24.02.2011; Опубл. 10.05.2011. Промислова власність. 2011,9. *(Особистий внесок: проведення досліджень, оброблення та аналіз отриманих результатів, підготовка матеріалів до друку).*
45. Струтинський РБ, Мойбенко ОО, Ягупольський ЮЛ. Патент України на корисну модель № 64220 А 61 К 31/00. „Спосіб зниження судинного тонузу при артеріальній гіпертонії, гострих та хронічних коронарних синдромах” № u 2011 08580; Заяв. 08.07.2011; Опубл. 25.10.2011. Промислова власність. 2011,20. *(Особистий внесок: проведення досліджень, оброблення та аналіз отриманих результатів, підготовка матеріалів до друку).*
46. Струтинський РБ, Мойбенко ОО, Ягупольський ЮЛ, Петко КІ, Безпалько ЛВ, Шаламай АС. Патент України на корисну модель № 71067 А 61 К 31/00. „Спосіб зменшення розміру зони інфаркту міокарда при експериментальній ішемії-реперфузії міокарда” № u 2012 04588; Заяв. 12.04.2012; Опубл. 25.06.2012. Промислова власність. 2012,12. *(Особистий внесок: проведення досліджень, оброблення та аналіз результатів, підготовка матеріалів до друку).*
47. Мойбенко ОО, Струтинський РБ, Ягупольський ЮЛ, Струтинський ВР, Петко КІ. Патент України на корисну модель № 91257 А 61 К 31/00. „Спосіб попередження інфаркту міокарда при експериментальній гострій ішемії-реперфузії міокарда” № u 2014 01101; Заяв. 06.02.2014; Опубл. 25.06.2014.

- Промислова власність. 2014,12. *(Особистий внесок: проведення досліджень, оброблення та аналіз результатів, підготовка матеріалів до друку).*
48. Струтинський РБ, Струтинська НА, Сагач ВФ, Мойбенко ОО, Ягупольський ЮЛ. Патент України на корисну модель № 98022 А 61 К 31/00. «Спосіб попередження кальційіндукованого відкривання мітохондріальної пори у серці» № у 2014 12691; Заяв. 26.11.2014; Опубл. 10.04.2015. Промислова власність. 2015,7. *(Особистий внесок: проведення досліджень, оброблення та аналіз отриманих результатів, підготовка матеріалів до друку).*
49. Струтинський РБ, Мойбенко ОО, Нагібін ВС, Ягупольський ЮЛ. Патент України на корисну модель № 98023 А 61 К 31/00. «Спосіб попередження апоптозу та некрозу за аноксії-реоксигенації ізольованих неонатальних кардіоміоцитів» № у 2014 12692; Заяв. 26.11.2014; Опубл. 10.04.2015. Промислова власність. 2015,7. *(Особистий внесок: проведення досліджень, оброблення та аналіз результатів, підготовка матеріалів до друку).*
50. Кришталь ОО, Максимюк ОП, Струтинський РБ, Мойбенко ОО, Платонов МО, Бойко ОМ, Васильченко ОВ. Патент України на корисну модель №99508 А 61 К 31/00. «Спосіб створення нових активаторів АТФ-залежних калієвих каналів клітинних мембран» № у 2014 13557; Заяв. 17.12.2014; Опубл. 10.06.2015. Промислова власність. 2015,11. *(Особистий внесок: участь у розробленні методу, підготовка матеріалів до друку).*
51. Струтинський РБ, Максимюк ОП, Кришталь ОО, Досенко ВС, Струтинська НА, Платонов МО, Бойко ОМ, Васильченко ОВ. Патент України на корисну модель №107758 А 61 К 31/00. «Спосіб відкривання АТФ-чутливих калієвих каналів сарколемальної мембрани клітин» № у 2015 11632; Заяв. 25.11.2015; Опубл. 24.06.2016. Промислова власність. 2016,12. *(Особистий внесок: проведення досліджень, оброблення, аналіз та підготовка до друку результатів).*
52. Струтинський РБ, Максимюк ОП, Кришталь ОО, Досенко ВС, Струтинська НА, Платонов МО, Бойко ОМ, Васильченко ОВ. Патент України на корисну модель №107859 А 61 К 31/00. «Спосіб відкривання АТФ-чутливих калієвих каналів внутрішньої мембрани мітохондрій» № у 2015 12481; Заяв. 17.12.2015; Опубл. 24.06.2016. Промислова власність. 2016,12. *(Особистий внесок: проведення досліджень, оброблення, аналіз та підготовка до друку результатів).*

## АНОТАЦІЯ

**Струтинський Р.Б. Механізми кардіопротекторної дії активації SUR-рецепторів калієвих каналів.** – Рукопис.

Дисертація на здобуття наукового ступеня доктора біологічних наук за спеціальністю 03.00.13 – Фізіологія людини і тварин. – Інститут фізіології ім. О.О. Богомольця НАН України. – Київ, 2018.

В ході роботи показано, що захисний ефект активації SUR-рецепторів  $K_{ATP}$ -каналів реалізується за рахунок помірного зниження артеріального тиску, попередження реперфузійного підвищення загально-периферичного опору та опору коронарних судин, відносного збереження показників скоротливості міокарда, попередження значного зростання надлишкового індуцибельного і реутилізаційного та, навпаки, підвищення протективного конститутивного синтезу NO, значного

пригнічення вільнорадикальних реакцій, зменшення утворення патогенних в умовах ішемії міокарда  $LTС_4$  та  $TxB_2$ , пригнічення деградації АТФ та значного утворення сечовини і сечової кислоти, підвищення вмісту сфінгозину, стимуляції гемоксигеназної реакції, мембранопротекторної дії та попередження відкривання мітохондріальної пори, апоптозу і некрозу. Вперше проведено генотипування мешканців України щодо поширення алельних поліморфізмів генів *KCNJ11* та *ABCC8*, що кодують *Kir6.2* та *SUR1*-рецептори  $K_{ATP}$ -каналу, та показано їх зв'язок з таким захворюванням як серцева недостатність. Виявлено, що у дорослих спонтанно гіпертензивних щурів (SHR) експресія генів, що кодують білки *Kir6.1*, *Kir6.2* та *SUR2* значно менша порівняно зі щурами Wistar-Kyoto (що може сприяти підвищенню судинного тиску), а у старих 18-ти місячних SHR щурів значно менша експресія *SUR1*- та *SUR2*-рецепторів, що може бути одним із механізмів декомпенсації недостатності серця.

**Ключові слова:** *SUR*-рецептори, *Kir6.x*,  $K_{ATP}$ -канали, кардіопротекція, ішемія-реперфузія міокарда, алельні поліморфізми *Pe337Val*, *Glu23Lys* та *Ser1369Ala*, серцева недостатність.

## АННОТАЦІЯ

**Струтинский Р.Б. Механизмы кардиопротекторного действия активации *SUR*-рецепторов калиевых каналов.** – Рукопись.

Диссертация на соискание ученой степени доктора биологических наук по специальности 03.00.13 – Физиология человека и животных. – Институт физиологии им. А.А. Богомольца НАН Украины. – Киев, 2018.

Определение эндогенных механизмов защиты сердца и сохранения его функции при ишемии миокарда является важной проблемой современной физиологии и патофизиологии. Известно, что одним из основных природных механизмов защиты организма от ишемии является активация *SUR*-рецепторов АТФ-чувствительных калиевых ( $K_{ATP}$ ) каналов.

Защитный эффект активации *SUR* реализуется за счет комплексных механизмов, в основе которых лежат тормозные процессы, включающие как изменение кардиогемодинамики, так и метаболических процессов. К первым можно отнести умеренное снижение артериального давления, ослабление нагрузки на пораженное ишемизированное сердце, что способствует сохранению сердечного выброса в первые часы ишемии, предупреждение реперфузионного повышения общего периферического сопротивления и сопротивления коронарных сосудов, существенное уменьшение нарушений ритма сердца и относительное сохранение показателей сократительной активности миокарда в период реперфузии. Ко вторым – предупреждение значительного роста избыточного индуцибельного и редуцтазного, и, наоборот, повышение протекторного конститутивного синтеза  $NO$ , угнетение деградации *L*-аргинаина аргиназой, уменьшение свободнорадикальных реакций, значительное ограничение генерации активных форм кислорода и азота, повышение активности ферментов антиоксидантной системы – супероксиддисмутазы и каталазы, уменьшение образования патогенных в условиях ишемии миокарда  $LTС_4$  и  $TxB_2$  (которым присуще коронароконстрикторное, аритмогенное и прооксидантное действие), угнетение деградации АТФ, стимуляция

гемоксигеназной реакции и повышение содержания сфингозина (в фосфорилированной форме может усиливать активность фермента iNOS), уменьшение образования мочевины и мочевой кислоты (в высоких концентрациях являются токсичными), мембраностабилизирующее действие (вероятно является следствием уменьшения активности фосфолипазы  $A_2$  и деградации фосфолипидов мембран, предупреждение открывания митохондриальной поры и таких процессов клеточной смерти, как апоптоз и некроз).

Свидетельством сильного антиишемического действия SUR-рецепторов  $K_{ATP}$ -каналов является ингибирование синтеза NO редуктазами, который имеет место исключительно в условиях ишемии, и повышение содержания  $NO_2^-$ , который образуется спонтанно при окислении NO только в оксигенированных растворах.

Все вышеперечисленные кардиопротекторные механизмы активации SUR-рецепторов  $K_{ATP}$ -каналов миокарда способствуют сохранению целостности сарколеммы и структуры внутриклеточных органелл, предупреждают деструкцию митохондрий и уменьшают размер инфаркта миокарда на 40%.

В антиишемической защите миокарда участвуют  $K_{ATP}$ -каналы как сарколеммальных, так и митохондриальных мембран. Выявлено, что последние в большей степени отвечают за сохранение и восстановление сократительной активности миокарда, тогда как каналы сарколеммальной мембраны в основном, за коронарное кровообращение. Впервые показано, что для эффективного развития кардиопротекции оптимальной является умеренная активация SUR-рецепторов.

С помощью молекулярно-генетических исследований впервые показано, что частота аллельных полиморфизмов Ile337Val и Glu23Lys гена KCNJ11 и полиморфизма Ser1369Ala гена ABCC8, кодирующих Kir6.2 и SUR1 соответственно, у жителей Украины практически не отличается от населения европейской популяции и близка к азиатской. Обнаружено, что среди больных с хронической сердечной недостаточностью уменьшается частота генотипов с минорной гомозиготой по этим полиморфизмам, что совпадает с наименьшими патологическими изменениями у них по показателям эхокардиографии, в частности с наименьшей массой левого желудочка и его конечно- и конечно-диастолическим объемом. В то же время наиболее патологические изменения при этих полиморфизмах имеют носители гетерозигот.

Впервые показано, что уровень экспрессии Kir6.1, Kir6.2 и SUR2 субъединиц сарколеммальных  $K_{ATP}$ -каналов у взрослых 6-месячных спонтанно гипертензивных крыс (SHR) значительно меньше по сравнению с крысами линии Wistar-Kyoto такого же возраста, что может быть одной из причин повышенного сосудистого давления. Вероятно, что значительное снижение экспрессии регуляторных SUR1- и SUR2-рецепторов калиевых каналов в старых 18-месячных крысах линии SHR может быть одним из механизмов декомпенсации недостаточности сердца.

Таким образом, впервые показано, что защитный антиишемический эффект активации SUR-рецепторов  $K_{ATP}$ -каналов реализуется за счет изменения кардиогемодинамических и метаболических процессов, в частности, сильного влияния на систему оксида азота, угнетения свободнорадикальных реакций, уменьшения образования патогенных в условиях ишемии  $LTC_4$  и  $TxB_2$ , предупреждения открывания митохондриальной поры, апоптоза и некроза, и мембраностабилизации.

С помощью молекулярно-генетических методов впервые проведено генотипирование жителей Украины по распространению аллельных полиморфизмов генов KCNJ11 и ABCC8, кодирующих Kir6.2 и SUR1-рецепторы  $K_{ATP}$ -каналов и показано их связь с таким заболеванием как сердечная недостаточность. Впервые показано, что уровень экспрессии Kir6.1, Kir6.2 и SUR2 субъединиц сарколемальных  $K_{ATP}$ -каналов у взрослых 6-месячных SHR значительно снижен по сравнению с крысами линии Wistar-Kyoto, а значительное снижение экспрессии регуляторных SUR1- и SUR2-рецепторов калиевых каналов в старых крысах линии SHR может быть одним из механизмов декомпенсации недостаточности сердца.

**Ключевые слова:** SUR-рецепторы, Kir6.x,  $K_{ATP}$ -каналы, кардиопротекция, ишемия-реперфузия миокарда, аллельные полиморфизмы Ile337Val, Glu23Lys и Ser1369Ala, сердечная недостаточность.

### ANNOTATION

**Strutynskiy R.B. Mechanisms of cardioprotective action of activation of SUR-receptors of potassium channels.** – Manuscript.

The thesis for obtaining of the doctor of biological sciences degree by the specialty 03.00.13 – Physiology of man and animals. – Bogomoletz Institute of Physiology of NAS of Ukraine. –Kyiv, 2018.

It is found that that the protective effect of activating the SUR-receptors of the  $K_{ATP}$ -channels is realized on the expense of moderate lowering of blood pressure, preventing the increase of general peripheral resistance of vessels and resistance of coronal vessels of the heart, and relative preservation of myocardial contractility in the period of reperfusion. At the base of their cardioprotective action also are the preventing a significant increase of formation excess NO by inducible (by iNOS) and by salvage (by NADH-dependent nitrate reductase) NO synthesis and, conversely, increasing the protective constitutive NO synthesis and the content of sphingosine. Important for cardioprotection is significant inhibition of the formation of active forms of oxygen and nitrogen, and the preservation of a high activity of antioxidant enzymes, reduction of the formation of pathogenic in the conditions of myocardial ischemia  $LTC_4$  and  $TxB_2$ , inhibition of ATP degradation, inhibition of significant formation of urea and uric acid, stimulating of the heme oxygenase reaction, membrane protection and preventing opening of the mitochondrial permeability transition pore, and inhibition of apoptosis and necrosis of cardiomyocytes. The incidence of allelic polymorphisms of KCNJ11 and ABCC8 genes encoding Kir6.2 and SUR1-receptors of  $K_{ATP}$ -channel in Ukrainian population by polymerase chain reaction was determined, and their association with such a disease as chronic heart failure is shown. Reduced expression of Kir6.1, Kir6.2 and SUR2 proteins in young SHR rats was detected. A significant reduction in the expression of SUR1- and SUR2-receptors of potassium channels in the old 18-month SHR rats may be one of the mechanisms of decompensation of heart failure.

**Key words:** SUR receptors, Kir6.x,  $K_{ATP}$ -channels, cardioprotection, ischemia-reperfusion of the myocardium, allelic polymorphisms Ile337Val, Glu23Lys and Ser1369Ala, heart failure.

### ПЕРЕЛІК УМОВНИХ СКОРОЧЕНЬ

- 5-ГД – 5-гідроксидеканоїнова кислота (специфічний блокатор міто- $K_{ATP}$ -каналів)
- АОС – антиоксидантна система
- АФА – активні форми азоту
- АФК – активні форми кисню
- ДК – дієнові кон'югати
- ЗПО – загальний периферичний опір судин
- $K_{ATP}$ -канал – АТФ-чутливий калієвий канал
- КДО – кінцево-діастолічний об'єм лівого шлуночка
- КСО – кінцево-систолічний об'єм лівого шлуночка
- КПТ – коронарний перфузійний тиск
- ЛШ – лівий шлуночок серця
- МДА – малоновий діальдегід
- міто- $K_{ATP}$  –  $K_{ATP}$ -канал внутрішньої мембрани мітохондрій
- МП – мітохондріальна транспортна пора
- ПОЛ – перекисне окиснення ліпідів
- сарко- $K_{ATP}$ -канал –  $K_{ATP}$ -канал сарколемальної мембрани
- САТ – системний артеріальний тиск
- СОД – супероксиддисмутаза
- ТЛШ – тиск в лівому шлуночці серця
- ХОК – хвилинний об'єм крові
- ХСН – хронічна серцева недостатність
- cNOS – контистуційна NO-синтаза
- $dp/dt_{max}$  – швидкість наростання тиску у лівому шлуночку
- $dp/dt_{min}$  – швидкість зниження тиску у порожнині лівого шлуночка
- eNOS – ендотеліальна NO-синтаза
- НЕК-293<sub>6.2/2A</sub> – лінія клітин НЕК-293 із стабільною експресією Kir6.2 і SUR2A субодиниць кардіоспецифічного  $K_{ATP}$ -каналу
- iNOS – індуцибельна NO-синтаза
- LTC<sub>4</sub> – пептидолейкотрієн C<sub>4</sub>
- NO<sub>2</sub><sup>-</sup> – нітрит-аніон
- NO<sub>2</sub><sup>•</sup> – радикал діоксиду азоту
- NO<sub>3</sub><sup>-</sup> – нітрат-аніон
- OH – гідроксильний радикал
- SHR – спонтанно гіпертензивні щури
- SUR – сульфонілсечовинний рецептор
- TxB<sub>2</sub> – тромбоксан B<sub>2</sub>
- V<sub>2</sub> – субстратне дихання
- V<sub>3</sub> – АДФ-стимульоване дихання
- V<sub>4</sub> – контрольоване дихання