

ВІДЗИВ ОФІЦІЙНОГО ОПОНЕНТА

на дисертаційну роботу Струтинського Руслана Борисовича “Механізми кардіопротекторної дії активації SUR–рецепторів калієвих каналів”, що подана на здобуття наукового ступеня доктора біологічних наук за спеціальністю 03.00.13 – фізіологія людини і тварин.

Актуальність теми роботи.

Незважаючи на наявність величезного арсеналу лікарських препаратів, захворювання серцево-судинної системи залишаються основною причиною смертності та інвалідизації населення в більшості країн світу. Основна проблема сучасної фармакотерапії полягає, перш за все, в її низькій ефективності. Монотерапія одним з препаратів гемодинамічної дії в більшості випадків виявляється недостатньо ефективною. На практиці широко застосовуються комбінації двох або трьох препаратів. При цьому очікується істотне збільшення ефективності терапії, проте дані ряду досліджень свідчать скоріше про зворотне. Таким чином, в даний час існує необхідність посилення ефективності медикаментозних підходів і пошук нових способів захисту міокарда від небажаних впливів.

Однією із важливих проблем сучасної фізіології та патофізіології є ідентифікація фармакологічних мішеней, тобто клітинних і субклітинних структур, які є тригерами патологічного процесу, та визначення ендогенних механізмів захисту серця та збереження його функції при ішемії міокарда. Кардіальна ендогенна цитопротекція, а саме комплекс подій, що пов'язані з активацією ендогенних факторів, є найважливішим механізмом захисту клітин міокарда від будь-якого шкідливого фактора. Зміни метаболізму кардіоміоцитів при ішемії можуть розглядатися як точка здійснення медикаментозного впливу, зокрема за допомогою препаратів, здатних прямо впливати на клітинний метаболізм.

Активатори калієвих каналів на сьогодні представляють реально існуючий клас засобів, механізм дії яких пов'язаний зі стимуляцією адаптивних процесів в клітині, що сприяють захисту від пошкодження, тому їх в прямому сен-

сі вважають цітокардіопротекторами. Саме в зв'язку з їх унікальними кардіопротекторними властивостями в рекомендації Робочої групи Європейського товариства кардіологів щодо ведення хворих стабільною стенокардією (2006) в якості базисної терапії введений клас активаторів калієвих каналів.

Калієві канали являють собою найбільш поширене сімейство іонних каналів, які пов'язані з регуляцією багатьох важливих фізіологічних функцій, таких як реполяризація серця, вивільнення інсуліну і розслаблення гладких м'язів. Особливе місце в цьому сімействі займають АТФ-чутливі калієві канали (K_{ATP} -канали), активність яких регулюється внутрішньоклітинними нуклеотидами, такими як АТФ і АДФ, і які в умовах нестачі енергії у вигляді АТФ переводять клітини в стан спокою, знижуючи їх збудливість і скоротливість. K_{ATP} -канали можуть слугувати мішенями для дії лікарських засобів, спрямованих на захист серця і судин під час перевантаження. В даний час використовується лише кілька модуляторів K_{ATP} -каналів. З них найбільш часто при діабеті, аритмії, гіпертонії і стенокардії застосовуються препарати сульфонілсечовини міноксидил і нікорандил.

Основна проблема при застосуванні модуляторів K_{ATP} -каналів полягає в відсутності специфічності, що призводить до небажаних побічних ефектів. Однак, K_{ATP} -канал являє собою сімейство кількох підтипів з тканинозалежними відмінностями в чутливості до фармакологічної модуляції, тому різноманітний характер структури K_{ATP} -каналів дає можливість для розробки нових ліків з таргетним типом дії. Детальна класифікація типів і підтипів K_{ATP} -каналів і розуміння механізмів їх функціонування можуть сприяти подоланню проблеми неспецифічності та розробці високоселективних фармакологічних засобів з мінімальними побічними ефектами.

У серці K_{ATP} -канали містяться в сарколемі кардіоміоцитів і в мембранах мітохондрій, причому ці два види каналів розрізняються за своїми фармакологічними властивостями. Встановлено, що мітохондріальні K_{ATP} -канали залучені у здійснення кардіопротекції. Тому мітохондрія як мішень для реалізації терапевтичного впливу останнім часом привертає все більшу увагу дослідників.

Особливий інтерес в цьому напрямку виник після встановлення ролі мітохондрій у реалізації, мабуть, найважливішого кардіопротекторного механізму, названого прекодиціонуванням. Є численні докази, що фармакологічне відкриття K_{ATP} -каналів повністю відтворює захисний ефект ішемічного прекодиціонування, а їх блокада, навпаки, сприяє погіршенню перебігу ІХС. Таким чином, дослідження в цьому напрямку можуть сприяти створенню нових ефективних фармакологічних препаратів, які здійснюють протективну дію за допомогою взаємодії з мітохондріальними каналними структурами.

Насьогодні відомо, що на функціональні властивості і фармакологічну чутливість K_{ATP} -каналів може впливати алельний поліморфізм генів, що кодуєть структурні одиниці K_{ATP} -каналів. Є дані, що мутації в генах, що кодуєть SUR1 і KIR6.2 одиниці K_{ATP} -каналу, можуть призводити до розвитку різних патологічних процесів і станів, таких як вроджена гіперінсулінемія, порушення толерантності до глюкози і розвитку діабету типу 2. Встановлено зв'язок алельного поліморфізму зі зниженою чутливістю KIR6.2 до АТФ і зниженою секрецією інсуліну, крім того є дані про різну чутливість K_{ATP} -каналів до фармакологічних активаторів в залежності від генотипу. Однак в даний час майже немає даних про зв'язок алельного поліморфізму вищезазначених генів зі станом судинного тонуусу і ризиком розвитку патологічних змін серцево-судинної системи. Подібні дослідження цих поліморфізмів можуть мати важливе значення у встановленні їх ролі в якості генетичних факторів ризику захворювань серця, зокрема серцевої недостатності, що може мати важливе значення у визначенні стратегії лікування пацієнтів із захворюваннями серцево-судинної системи на основі генотипу пацієнта.

Таким чином, вивчення кардіопротекторних властивостей і механізмів дії активаторів калієвих каналів, створення на основі цих даних нових фармакологічних засобів для профілактики та лікування серцево-судинних захворювань, є насьогодні важливим науково-практичним завданням.

Це обумовлює безперечну актуальність роботи Струтинського Р.Б., оскільки вона присвячена вирішенню саме цієї наукової проблеми, розробці та до-

слідженню властивостей саме таких нових кардіопротекторних засобів, механізмом дії яких є активація як сарколемальних, так і мітохондріальних $K_{ATФ}$ -каналів.

Новизна дослідження та одержаних результатів.

Новизна проведеної роботи полягає перш за все у тому, що запропоновано цілий ряд нових вітчизняних сполук, аналогів пінациділу і діазоксиду, які об'єднані однією загальною властивістю - здатністю активувати SUR-рецептори АТФ-залежного калієвого каналу. В роботі встановлені кардіопротекторні властивості цих сполук, крім того, серед них знайдено найбільш перспективну, що отримала назву Флокалін, доведені його кардіопротекторні властивості та розроблено його лікарську форму для впровадження в медичну практику.

Проаналізовано різні аспекти дії цих сполук, в результаті широкого спектру досліджень встановлено ефекти, які викликають ці сполуки, а також вивчені механізми їх дії.

Всебічно та переконливою проаналізовано фармакологічні властивості досліджених сполук із застосуванням різноманітних експериментальних підходів на кількох моделях. Зокрема, досліджено вплив Флокаліну на електричну активність ізольованих кардіоміоцитів, а також продемонстровано його активуючу дію на калієві канали на клітинній лінії НЕК-293 із стабільною експресією Kir6.2 и SUR2A $K_{ATФ}$ -каналів. Вперше показано, що нові сполуки Флокалін та тіоФлокалін можуть відкривати K_{ATP} -канали не тільки в сарколемальній мембрані клітин, а і канали, що розташовані у внутрішній мітохондріальній мембрані. Досліджено та проаналізовано ефекти нових сполук в умовах *in vitro* на ізольованих препаратах аорти та ізольованих, перфузованих за Лангендорфом серцях тварин, вивчено їх вплив на кардіогемодинаміку в експериментах *in vivo*. Окрім того, проведено біохімічний аналіз змін показників плазми крові під дією Флокаліну, показано, що ця сполука володіє потужними ан-

тигіпоксичними, антиоксидантними та мембранопротекторними властивостями.

В результаті проведених досліджень експериментально встановлено виражений кардіопротекторний потенціал Флокаліну, продемонстровано суттєве поліпшення відновлення функцій ішемізованого міокарда під час реперфузії. Вперше показано, що кардіопротекторні властивості сполук, що вивчалися, і які обумовлені активацією SUR-рецепторів, можуть бути пов'язані з пригніченням надлишкового індуцибельного та реутилізаційного та підвищенні протективного конститутивного синтезу NO. Окрім того показано, що важливими механізмами кардіопротекції можуть бути пригнічення деградації L-аргініну аргіназою, мембранопротекція, пригнічення деградації АТФ, пригнічення вільнорадикальних реакцій: значне обмеження генерації активних форм кисню та азоту. Кардіопротекторні властивості Флокаліну підтверджені морфологічними дослідженнями, які показали, що його дія сприяє збереженню цілісності сарколеми, структури внутрішньоклітинних органел, зменшує контрактири міофіламентів, значною мірою попереджує деструкцію мітохондрій та зменшує розмір інфаркту міокарда. Окрім того встановлено, що дія Флокаліну викликає помірне зменшення спряження процесів окисного фосфорилування мітохондрій, попередження відкривання мітохондріальної пори, зменшення апоптозу та некрозу кардіоміоцитів.

Експериментально визначено оптимальні для кардіопротекції дози Флокаліну, встановлено, що в антиішемічному захисті міокарда канали мітохондріальної мембрани більшою мірою відповідають за підтримання скоротливої активності міокарда, тоді як сарколемальної – за коронарний кровообіг.

Успішне вирішення всіх поставлених завдань досягнуто автором завдяки застосуванню сучасних та цілком адекватних методичних підходів (низка біохімічних методик, молекулярно-генетичні, електрофізіологічні, біохімічні, морфологічні, функціональні методи, статистичний аналіз та ін.), за допомогою яких всебічно і переконливо характеризувано фармакологічну активність

нових фармакологічних сполук – активаторів калієвих каналів в якості кардіопротекторних засобів.

Теоретичне та практичне значення результатів дослідження.

Результати проведеного дослідження, яке носить як фундаментальний, так і практичний прикладний характер, мають безсумнівне практичне значення, оскільки проаналізовано цілу низку нових вітчизняних сполук в класі активаторів K_{ATP} -каналов, серед яких виявлено найбільш перспективний, розроблено та підготовлено 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. Отримані результати обґрунтовують доцільність створення цього нового фармакологічного кардіопротекторного засобу, доводять його ефективність та перспективність розробки нових фармакологічних препаратів для профілактики та лікування серцево-судинних захворювань в цьому класі хімічних сполук. Важливим практичним результатом проведеної роботи є те, що вона є по суті частиною доклінічних досліджень, які характеризують фармакологічні властивості розробленого засобу, та є обґрунтуванням його фармацевтичної розробки та клінічного вивчення. За результатами дисертації отримано 10 патентів України.

Отримані дані свідчать, що Флокалін є перспективним засобом для впровадження в практичну медицину у якості кардіопротекторного препарату для лікування серцево-судинних захворювань, та безумовно вимагає подальшого клінічного вивчення. Результати проведеного дослідження можуть знайти широке використання в курсі лекцій з нормальної та патологічної фізіології при підготовці лікарів та наукових співробітників, практична діяльність яких пов’язана з питаннями фармакології, а також можуть бути використані фармакологами для створення нових кардіопротекторних препаратів в класі активаторів АТФ-залежних калієвих каналів..

Ступінь обґрунтованості та достовірність наукових положень та висновків.

Наведені в роботі дані та зроблені висновки в основному можна вважати цілком вірогідними та обґрунтованими. Про це свідчить великий обсяг проведеної роботи, адекватність застосованих експериментальних моделей, багатосторонній аналітичний підхід до оцінки досліджених процесів.

Результати експериментів, представлені в Розділах 3, 4, 5 не викликають сумнівів, викладені з вичерпною повнотою, переконливі і резюмовані у відповідних адекватних висновках. Певне непорозуміння викликають результати, викладені в Розділах 6 і 7. Ці результати справляють враження незавершеності, виглядають не надто переконливими і знаходяться ніби осторонь від основного напрямку представленої роботи. На наш погляд, ця частина даних перевантажує представлену дисертацію, не вносить принципового суттєвого вкладу в цілісність роботи, а необхідність їх внесення в дану роботу є сумнівною. Тем не менш, висновки, що відносяться до основної частині роботи, викладені логічно, повністю відображують характер дослідження і відповідні його результатам.

Зауваження по дисертаційній роботі.

Дисертаційна робота в цілому справляє позитивне враження, проте в ході рецензування виникли деякі питання і зауваження:

Зауваження:

1. Невдало сформульовано визначальну характеристику роботи «Об'єкт дослідження», оскільки таке формулювання ($K_{ATФ}$ -канали клітинних мембран) не відображає проблему, яка ініціювала цю роботу. Проблема скоріше полягає в можливості кардіопротекції при активації $K_{ATФ}$ -каналів.
2. Для активації SUR-рецепторів $K_{ATФ}$ -каналів крім Флокаліну автор використовував і інші нові синтезовані сполуки тіоФлокалін, ДіазоФм і ДіазоФп,

проте доказів наявності у цих сполук таких властивостей в роботі надано явно недостатньо.

3. Викликає сумнів висновок автора про зв'язок ризику розвитку хронічної серцевої недостатності з алельним поліморфізмом генів, що кодують субодініці K_{ATP} -каналу (Висновок 7), оскільки аналіз не виявляє відповідної статистичної значущості відмінностей для подібних тверджень. Крім того, незрозуміло, що хоче сказати автор, коли наводить деякі відмінності показників ехокардіографії у хворих з різними генотипами без порівняння з здоровими людьми.

4. Робота несе явно виражений фармакологічний відтінок, тому представляється дуже бажаним провести порівняння нового препарату Флокалін з іншими препаратами цього класу, які є на ринку, а також продемонструвати його переваги перед ними.

5. Викликає незрозуміння і вносить плутанину велика кількість досліджених Флокалінів з різними індексами (С, Л, Зд, З і без індексу), які використовувалися в роботі. Відсутній однозначний висновок про їх ідентичність або про існуючі відмінності.

6. Незрозуміло, для чого використовувалася велика кількість різних активаторів K_{ATP} -каналів, якщо мова в роботі, за твердженням автора, йде про вивчення наслідків активації цих каналів. Якщо ж передбачалося їх порівняльне дослідження, то відсутні висновки про їх порівняльні властивості, їх ефективності, і взагалі не визначена мета їх дослідження в даній роботі.

Питання:

1. В роботі апріорно стверджується, що вивчаються ефекти стимуляції SUR-рецепторів K_{ATP} -каналів. Однак частина експериментальних даних явно вказує на те, що Флокалін володіє також і властивостями блокатора кальцієвих каналів. Наскільки отримані ефекти можна пояснити цією властивістю нового препарату? Чи проводилося його порівняння з відомими кальцієвими блокато-

рами, а також з відомими активаторами калієвих каналів, наприклад, з пінаціділом?

2. Що таке помірна активація SUR-рецепторів в термінах кривої доза-ефект? Що є причиною існування максимуму на цій кривій? Чи означає цей факт те, що невелике передозування препарату призведе до відсутності позитивного ефекту або навіть до якихось небажаних наслідків?

3. Однією з головних проблем при застосуванні модуляторів K_{ATP} -каналів є відсутність селективності, що призводить до небажаних побічних ефектів. Чи проводилася перевірка препарату Флокалін на селективність дії? Як він впливає, наприклад, на рівень цукру в крові?

4. Чи всі з досліджених препаратів є активаторами SUR-рецепторів K_{ATP} -каналів? Які є докази наявності таких властивостей, чи проводилося порівняння їх ефективності? Чому для використання в якості лікарського засобу обраний саме Флокалін, якщо по ряду параметрів більшу ефективність проявляє, наприклад, тіоФлокалін?

5. Незрозуміло в який спосіб проводився статистичний аналіз і в якому вигляді представлені дані Розділу 7 щодо досліджень експресії каналних субодиниць у щурів SHR (що таке $M \pm m$?). У зв'язку з цим виникають великі сумніви щодо достовірності висновків цього розділу, оскільки використання параметричного аналізу при такій малій кількості піддослідних тварин може з великою ймовірністю привести до помилки першого роду.

Вищевказані питання і зауваження стосуються деяких суперечних моментів інтерпретації автором отриманих результатів. Частково вони мають характер побажань для подальших досліджень і не впливають на загальну позитивну оцінку роботи.

Повнота викладу матеріалів дисертації в опублікованих працях і авторефераті.

За результатами проведеного дослідження автором опубліковані 84 наукових праці, у т.ч. розділ у монографії, 40 статей, з яких закордонних – 11 та у фахових виданнях з переліку ДАК України – 29, 10 патентів України, 33 матеріалів конференцій та з'їздів, які в повній мірі відображують зміст роботи.

Основні положення дисертації повністю представлені в авторефераті, що за змістом ідентичний дисертації.

Відповідність дисертації вимогам ДАК України.

Дисертаційна робота оформлена згідно сучасних вимог ДАК України. Її зміст викладений на 440 сторінках машинописного тексту, ілюстрований 73 таблицями, 138 рисунками і 2 схемами. Робота побудована за класичним планом і складається зі вступу, огляду літератури, п'яти розділів, що містять матеріали і методи, результати власних досліджень та аналіз і узагальнення результатів дослідження, висновків та переліку посилань, який містить 582 джерела. У вступі викладені мета та завдання дослідження, актуальність теми, наукова новизна та практична значимість роботи. В огляді літератури достатньо повно відображено сучасний стан проблеми, представлені перспективні підходи до її вирішення, які існують на теперішній час.

У цілому, позитивні якості дисертації переважають деякі наявні недоробки і сумнівні інтерпретації, а безсумнівний вагомий практичний вихід у вигляді нового фармакологічного препарату набуває вирішальне значення в оцінці роботи. У цілому, представлена дисертаційна робота може бути оцінена позитивно. Отримані експериментальні дані мають безперечну наукову новизну, демонструють ефективність нового вітчизняного міотропного спазмолітика «Флокалін», що можна вважати вирішенням важливої науково-прикладної проблеми. Окрім того, отримані результати вносять суттєвий вклад в розуміння одного із центральних ендогенних механізмів захисту від ішемії – активації

SUR-рецепторів K_{ATP} -каналів клітинних мембран, та можуть служити обґрунтуванням для створення новітніх методів профілактики та лікування серцево-судинних захворювань.

Основні положення дисертації повністю викладені в опублікованих автором працях.

Таким чином, дисертаційна робота **Струтинського Руслана Борисовича** “Механізми кардіопротекторної дії активації SUR-рецепторів калієвих каналів” є закінченим експериментальним дослідженням, у результаті якого автор переконливо продемонстрував суттєву кардіопротекторну активність нового вітчизняного міотропного спазмолітика «Флокалін», та показав перспективність його впровадження в практичну медицину.

За своєю актуальністю, високим методичним рівнем, обсягом проведених досліджень, новизною, науковою та практичною значимістю отриманих результатів, обґрунтованістю висновків, дисертаційна робота **Струтинського Руслана Борисовича** відповідає вимогам п. 10 Порядку присудження наукових ступенів, затвердженого постановою Кабінету Міністрів України від 24.07.2013 р. за № 567, а здобувач заслуговує присудження йому наукового ступеня доктора біологічних наук за спеціальністю 03.00.13 – фізіологія людини і тварин.

Головний науковий співробітник
відділу фармакології клітинних сигнальних
систем та експериментальної терапії
ДУ „Інститут фармакології та токсикології
НАМН України”,
доктор біол. наук



С.М. Тишкін

*Підписе д.б.н. Тишкіна С.
Заєві згідно
заяв. директора з
наукової роботи
д.хім наук
29 травня 2018р.*


