ЗАТВЕРДЖУЮ
Директор Інституту фізіології
ім. О.О.Богомольця НАН України
академік НАН України
Микола Веселовський
(Власне ім'я та ПРІЗВИЩЕ)

_____ (підпис)

М.П

АНОТОВАНИЙ ЗВІТ
про виконану роботу в рамках реалізації проєкту
із виконання наукових досліджень і розробок
«Розробка нових методів експресії АТФ-чутливих калієвих каналів клітинних мембран, як потужної універсальної системи ендогенного захисту»
(назва Проєкту)

Назва конкурсу: «Наука для безпеки людини та суспільства»
Реєстраційний номер Проєкту: №2020.01/0204

Підстава для реалізації Проєкту з виконання наукових досліджень і розробок (реєстраційний номер та назва Проєкту) №2020.01/0204 «Розробка нових методів експресії АТФ-чутливих калієвих каналів клітинних мембран, як потужної універсальної системи ендогенного захисту»

Рішення наукової ради Національного фонду досліджень України щодо визначення переможця конкурсу «Наука для безпеки людини та суспільства»
протокол від «16-17» вересня 2020 року № 21

1. ЗАГАЛЬНА ІНФОРМАЦІЯ ПРО ПРОЄКТ

Загальна тривалість виконання проєкту 2020 рік – 2021 рік
Тривалість виконання Проєкту у 2021 році
Початок – 30 квітня 2021 року
(дата укладання Договору про виконання наукового дослідження і розробки)

Закінчення – 15 грудня 2021 року

Загальна вартість Проєкту, грн. 7 779 600,00 (сім мільйонів сімсот сімдесят дев'ять тисяч шістсот грн., 00 коп.)

Вартість Проєкту по роках, грн.:
1-й рік 3 000 000,00
2-й рік 4 779 600,00
3-й рік

2. ІНФОРМАЦІЯ ПРО ВИКОНАВЦІВ ПРОЄКТУ

до виконання Проєкту буде залучено 15 виконавців, з них:
доктори наук 3;

кандидати наук ___6_____;
інші працівники ___6_____.

3. ІНФОРМАЦІЯ ПРО ГРАНТООТРИМУВАЧА ТА ОРГАНІЗАЦІЮ(Ї) СУБВИКОНАВЦЯ(ІВ) ПРОЄКТУ

Виконавець проекту: Інститут фізіології ім. О.О. Богомольця НАН України, Київ.
Адреса: 01024, м. Київ, вул. акад. Богомольця, 4

4. ОПИС ПРОЄКТУ

4.1. Мета Проєкту

Метою проекту є розробка нових методів підвищення експресії АТФ-чутливих калієвих каналів клітинних мембран, як потужної універсальної системи ендогенного захисту, що посилює резистентність організму до гіпоксії та ішемії.

.

4.2. Основні завдання Проєкту

- Визначити потенційні механізми підвищення експресії $К_{АТФ}$-каналів методом ПЛР в реальному часі зі зворотною транскрипцією.
- Дослідити зміну щільності $К_{АТФ}$-каналів на клітинних мембранах за допомогою електрофізіологічних експериментів та досліджень на судинних смужках.
- Дослідити кардіопротекторні ефекти та чутливість мітохондріальної пори до її індукторів.
- Провести визначення біохімічних показників у серці.

4.3. Детальний зміст Проєкту:

- Сучасний стан проблеми

  $К_{АТФ}$-канали клітинних мембран є потужною універсальною системою ендогенного захисту від гіпоксичних та ішемічних пошкоджень. Їх активація може попередити та значно полегшити перебіг таких захворювань як ішемічна хвороба серця, інфаркт міокарда, інсульт, а також можливе застосування при COVID-19-індукованій поліорганній гіпоксії та ішемії. На сьогодні механізми підвищення експресії $К_{АТФ}$-каналів залишаються мало вивченими.

- Новизна Проєкту

  Новизною проекту є розробка нових оригінальних методів підвищення експресії $К_{АТФ}$-каналів клітинних мембран та, відповідно, підвищення ендогенної стійкості організму до дії патологічних гіпоксичних та ішемічних чинників.

- Методологія дослідження

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

5. ОТРИМАНІ НАУКОВІ АБО НАУКОВО-ТЕХНІЧНІ РЕЗУЛЬТАТИ (до 2 сторінок) в поточному році/ в рамках реалізації Проєкту, зокрема:

5.1. Опис наукових або науково-технічних результатів, отриманих в рамках виконання Проєкту (із зазначенням їх якісних та кількісних (технічних) характеристик)

Розроблено нові методи підвищення експресії $К_{АТФ}$-каналів, які полягають у застосуванні

піридоксаль-5-фосфату у дозі 0,7 мг/кг один раз на добу протягом 14 днів та внутрішньоочеревинне введення глутатіону у дозі 52 мг/кг, що може сприяти посиленню ендогенних захисних механізмів. Вперше показано, що пероральне введення піридоксаль-5-фосфату дорослим щурам майже вдвічі підвищувало експресію мРНК пороутворюючої Kir6.2 та регуляторної SUR2 субодиниць кардіоспецифічних сарколемальних $К_{АТФ}$-каналів серцевого типу, та у 1,5 раза експресію субодиниці SUR1 $К_{АТФ}$-каналів мітохондрільного типу. Вперше показано, що введення піридоксаль-5-фосфату старим щурам підвищувало у 3,6 раза експресію пороутворюючої субодиниці Kir6.1 $К_{АТФ}$-каналів судинного типу та у 2,4 раза регуляторної SUR2 субодиниці сарколемальних $К_{АТФ}$-каналів судинного і серцевого типу. Вперше показано, що внутрішньоочеревинне введення глутатіону старим щурам у дозі 52 мг/кг за одну годину до відбирання зразків достовірно підвищувало у 9,3 та 2,6 раза відповідно експресію генів KCNJ8 і KCNJ11, що кодують субодиниці Kir6.1 і Kir6.2 сарколемальних $К_{АТФ}$-каналів судинного і серцевого типу та підвищувало у 13,1 раза експресію регуляторної субодиниці $К_{АТФ}$-каналів мітохондрільного типу SUR1. За допомогою електрофізіологічних та тензометричних експериментів на ізольованих кардіоміоцитах та судинних смужках відповідно показано зростання ефектів через $К_{АТФ}$ канали, що може свідчити про підвищення їх щільності на клітинних мембранах. А саме, в електрофізіологічних експериментах по реєстрації мембранних струмів через $К_{АТФ}$-канали ізольованих неонатальних кардіоміоцитів щура за допомогою методу "patch-clamp" в конфігурації "ціла клітина" в кардіоміоцитах вперше показано, що за впливу піридоксаль-5-фосфату відбувається підвищення трансмембранних струмів, опосередкованих $К_{АТФ}$-каналами (I_{KATP}), майже утричі, що, відповідно, може свідчити про збільшення щільності $К_{АТФ}$-каналів на клітинній мембрані. Вперше показано, що пероральне введення піридоксаль-5-фосфату старим щурам значно посилює амплітуду вазодилататорних реакцій кільцевих смужок аорти у відповідь на активацію $К_{АТФ}$ каналів флокаліном у концентраціях від 0,1-100 мкмоль/л, з максимальним ефектом майже вдвічі, що може свідчити про зростання утворення за даних умов $К_{АТФ}$-каналів судинного типу (Kir6.1/SUR2B), тобто про підвищення мембранної щільності цих каналів, та збігається з нашими даними молекулярно-генетичних досліджень про зростанняння у них експресії пороутворюючих Kir6.1 субодиниць судинних $К_{АТФ}$-каналів у 3,4 раза та SUR2 регуляторних субодиниць $К_{АТФ}$ каналів як судинного, так і серцевого типу у 2,4 раза. В експериментах на ізольованих мітохондріях показано, що застосування піридоксаль-5-фосфату, глутатіону та нікотинаміду пригнічувало Ca^{2+}-індуковане відкривання мітохондріальної пори через зменшення її чутливості до індуктора її відкривання – кальцію. Вперше показано, що у тварин із збільшеною експресією Kir6.1 та SUR2 за допомогою піридоксаль-5-фосфату відновлення скоротливої діяльності та коронарного потоку під час реперфузії ішемізованого серця було значно кращим. Пригнічення цих ефектів специфічним інгібітором $К_{АТФ}$-каналів глібенкламідом свідчить, що, принаймні, частково ці захисні ефекти викликані активацією $К_{АТФ}$-каналів. Водночас, у тварин з підвищеною експресією Kir6.1 і Kir6.2 за допомогою глутатіону достовірно кращим відновлення ішемізованого серця було лише на ранній стадії реперфузії. Аналіз біохімічних показників свідчить, що підвищення експресії $К_{АТФ}$-каналів у старих модифікованих тварин асоціюється зі зниженням оксидативного стресу, що полягає в пригніченні утворення супероксид-аніона, пероксиду водню і гідроксильного радикала, зниженні утворення продуктів перекисного окиснення ліпідів – дієнових кон'югатів і малонового діальдегіду, зниженні вмісту вільної арахідонової кислоти та її похідних – лейкотриєну $С_4$ і тромбоксану $В_2$, утворення яких супроводжується продукуванням супероксиду, а також підвищенням конститутивнго синтезу NO, та навпаки, пригніченням індуцибельного синтезу NO, активності нітратредуктази та пригніченні деградації L-аргініну аргіназою, що зберігає субстрат для NO-синтаз.

5.2. За наявності науково-технічної продукції обґрунтування її переваг у порівнянні з існуючими аналогами

Розроблено дві моделі індукції експресії $К_{АТФ}$-каналів судинного і серцевого типу, які полягають у застосуванні піридоксаль-5-фосфату та глутатіону, що може сприяти посиленню

ендогенних захисних механізмів. На разі відомий спосіб підвищення експресії SUR2A-субодиниць $K_{АТФ}$-каналів серцевого типу потребує тривалої (24 год) безперервної дії індуктора, що значно обмежує його застосування. Перевагою наших моделей індукції експресії $K_{АТФ}$-каналів є пероральне та ін'єкційне введення індуктора та можливість збільшувати експресію різних субодиниць цих каналів.

5.3. Практична цінність отриманих результатів реалізації Проєкту для економіки та суспільства (стосується проєктів, що передбачають проведення прикладних наукових досліджень і науково-технічних розробок)

Нові оригінальні методи посилення експресії $K_{АТФ}$-каналів можуть мати значний соціально-економічний ефект, адже $K_{АТФ}$-канали мають широкий спектр захисної дії, від кардіопротекції, нейропротекції та нефропротекції до зменшення бронхоспазмів та судинного тиску при артеріальній гіпертензії. Виконання проекту дасть змогу зменшити захворюваність, інвалідизацію та смертність населення, принаймні, від серцево-судинних захворювань, а отже дозволить знизити бюджетні витрати.

5.4. Опис шляхів та способів подальшого використання результатів виконання Проєкту в суспільній практиці.

Розроблені в результаті виконання проекту оригінальні методи підвищення експресії $K_{АТФ}$-каналів клітинних мембран можуть бути застосовані в терапевтичній практиці з метою профілактики та лікування захворювань, що супроводжуються гіпоксією та ішемією тканин, зокрема, таких як ішемічна хвороба серця, інфаркт міокарда, інсульт, а також можливе застосування при COVID-19-індукованій поліорганній гіпоксії та ішемії.

Примітка: Анотований звіт не повинен містити відомостей, заборонених до відкритого опублікування

Науковий керівник Проєкту

Провідний науковий співробітник, д. б. н.
(посада)

Руслан Струтинський
(Власне ім'я та ПРІЗВИЩЕ)

(підпис)