

ВІДГУК ОФІЦІЙНОГО ОПОНЕНТА

на дисертаційну роботу Кулика Вячеслава Борисовича
“ОПІОЇДЕРГІЧНА РЕГУЛЯЦІЯ АКТИВНОСТІ P2X3-РЕЦЕПТОРІВ У
НЕЙРОНАХ СПІНАЛЬНИХ ГАНГЛІЇВ”
на здобуття наукового ступеня кандидата біологічних наук за спеціальністю
03.00.13 – фізіологія людини і тварин

Загальновизнано, що знеболювальний ефект опіоїдів зумовлений їх дією на ЦНС. Однак на сьогодні існують переконливі свідчення на користь того, що аналгетичний ефект опіоїдів може досягатися шляхом активації опіоїдних рецепторів на периферії в первинних сенсорних нейронах, що відбувається наприклад при запальних процесах. З огляду на те, що периферична опіоїдна аналгезія має низку переваг над центральною, з'ясування молекулярних механізмів такого знеболення є надзвичайно актуальним. Беручи до уваги функціональне призначення опіоїдних та P2X3 рецепторів у організмі, дослідження їх взаємодії на клітинному рівні набувають особливого значення.

З огляду на зазначене актуальність теми дисертаційної роботи не викликає сумніву.

Дисертаційну роботу Кулика Вячеслава Борисовича Роботу виконано відповідно до загального плану наукових досліджень відділу фізико-хімічної біології клітинних мембран Інституту фізіології ім. О. О. Богомольця НАН України.

В процесі виконання роботи автором отримано низку пріоритетних даних. Вперше встановлено існування подвійного впливу ендogenous агоніста опіоїдних рецепторів – лейенкефаліну (ЛЕК) на струми, опосередковані P2X3-рецепторами у соматосенсорних нейронах спінальних гангліїв щурів. Встановлено, що вплив ЛЕК на P2X3-опосередковані струми в сенсорних нейронах забезпечується низкою G-білок-спряжених процесів.

Доведено, що ЛЕК не впливає на десенситизацію P2X3-рецепторів, а амбівалентна дія опіюїда на зазначені рецептори може опосередковуватися активацією чутливих до токсину кашлюку Gi/o- та нечутливих до цього токсину – Gq-білків. Зокрема, вперше доведено, що зв'язування ЛЕК з μ -опіюїдними рецепторами призводить до одночасної активації G-білків обох типів, які мали б справляти подвійний вплив на P2X3-рецептори. Відповідно, вперше показано, що ендogenousний агоніст опіюїдних рецепторів викликає два протилежно спрямовані впливи на P2X3-рецептори нейронів СГ, причому обидва ефекти опосередковані активацією фосфоліпази С.

Існування різноспрямованих ефектів викликаних ЛЕК мають істотне практичне значення для розуміння проблем, пов'язаних з добре відомим переходом інгібуючої дії опіюїдів (аналгезії) до стимулюючих ефектів (розвитку гіпералгезії та/або алодинії) в умовах хронічного застосування опіюїдів. З'ясування біохімічних шляхів, що змінюють чутливість до опіюїдів є важливим завданням для майбутніх досліджень у галузі фізіології та фармакології болю.

Достовірність наукових положень, що виносяться на захист, базується на великому масиві одержаних експериментальних даних.

Роботу побудовано за традиційною для дисертацій на здобуття наукового ступеня кандидата біологічних наук схемою.

Дисертація складається із вступу, огляду літератури, опису матеріалів та методів дослідження, викладення результатів дослідження, обговорення результатів, висновків та списку використаних джерел. Список використаної літератури охоплює 209 найменувань. Робота викладена на 128 сторінках та проілюстрована 24 рисунками.

Вступ містить достатню аргументацію актуальності роботи, постановку мети та відповідних завдань дослідження, обґрунтування наукової новизни дослідження та практичної цінності отриманих результатів,

що виносяться на захист. У вступі також зазначено особистий внесок здобувача.

Огляд літератури складається з дев'яти підрозділів. На початку дисертантом представлено сучасні уявлення про пуринергічні рецептори. Розглянуто питання особливостей їхньої експресії в сенсорних нейронах та електрофізіологічні властивості P2X3-рецепторів. Висвітлено фармакологічні властивості P2X3-рецепторів. Особливу увагу присвячено модуляція P2X3-рецепторів вторинними месенджерами. В цьому контексті розглянуто вплив фосфоінозитидів на регуляцію активності P2X3-рецепторів та вплив протеїнкіназ на регуляцію активності P2X3-рецепторів. Надалі розглянуто фізіологічну роль P2X3-рецепторів в умовах патології. Для цього розглянуто питання опіоїдних рецепторів периферичних сенсорних нейронів, утворення опіоїдних пептидів в імунних клітинах та сенсорних нейронах та значення ендогенної опіоїдної системи у механізмах антиноціцепції.

Матеріал, викладений в огляді літератури, свідчить про високу наукову ерудицію дисертанта та здатність до критичного аналізу і узагальнення фактичного матеріалу.

При виконанні роботи дисертантом застосовано широкий спектр методів сучасної фізіології, що детально описані у розділі “Матеріали і методи досліджень”. Цей розділ демонструє відмінне володіння автором сучасними методичними підходами.

Розділ “Результати власних досліджень” складається з восьми підрозділів.

В першому підрозділі наведено експериментальні дані які свідчать про інгібіторну роль активації опіоїдних рецепторів в регуляції активності P2X3-рецепторів. Дисертантом було досліджено активність P2X3-рецептрів за рівнем P2X3-опосередкованих струмів індукованих прикладанням α, β -Me-АТФ до тестованих нейронів за умови активації опіоїдних рецепторів

лейенкефаліном (ЛЕК). Отримано переконливі свідчення того, що ендogenousний агоніст опіоїдних рецепторів – ЛЕК здатний відчутно пригнічувати активність P2X3-рецепторів нейронів спінальних гангліїв (СГ). Крім того, застосування селективного для μ -опіоїдних рецепторів агоністу ендоморфіну-1 мало подібний ефект, що свідчить на користь участі в регуляції саме μ -опіоїдних рецепторів.

В наступному підрозділі наведено додаткові свідчення, щодо інгібіторної дії опіоїдних рецепторів на P2X3-рецептри. Дисертантом встановлено, що застосування конкурентного антагоністу опіоїдів налоксону усувало інгібуючий вплив опіоїда ЛЕК. До того ж, застосування найселективнішого антагоніста μ -опіоїдних рецепторів СТОР, що практично повністю відміняв інгібуючий ефект опіоїда вказує на залучення саме цього типу опіоїдних рецепторів до регуляції.

З огляду на те, що за даними літератури хронічне застосування опіоїдних антагоністів, в тому числі і налоксону підвищує ефективність дії агоністів опіоїдних рецепторів було зроблено припущення, що попередня обробка нейронів налоксом може впливати на ефективність дії ЛЕК.

Надалі це було підтверджено експериментально. З'ясувалося, що налоксон дуже сильно підвищував ефективність інгібуючої дії ЛЕК на P2X3-струми навіть за тих концентрацій ЛЕК для яких інгібіторний вплив не детектувався в разі відсутності попередньої обробки нейронів налоксом. Цікаво, чи буде спостерігатись аналогічний ефект в разі одночасного додавання ЛЕК з налоксом.

Таким чином отримано дуже цікаві дані, стосовно того, що в залежності від активності рецептора інгібітор опіоїдів (в даному випадку налоксон) може як інгібувати, так і активувати опіоїдні рецептори. Цей ефект дисертант пов'язує зі специфічним впливом налоксону на G-білки опіоїдних рецепторів.

В наступному підрозділі представлено експериментальні дані які вказують, що антагоністи опіоїдних рецепторів не лише відновлюють P2X3-опосередковані струми заблоковані дією опіоїдів, але у високих дозах навіть суттєво їх стимулюють. Цей ефект дисертант пояснює тим, що μ -опіоїдні рецептори, як і багато інших G-білок-спряжених рецепторів, здатні набувати декількох активних конформаційних станів залежно від зв'язку з певними типами G-білків. Відповідно подвійний ефект опіоїдіндукованої стимуляції/інгібування P2X3-рецепторів можна пояснити різними внутрішньоклітинними шляхами, котрі активуються G-білками певних типів, а обмін агоніста опіоїдних рецепторів на антагоніст у високій концентрації дозволив викрити замаскований стимулюючий ефект опіоїдів.

Для більш детального аналізу припущення, щодо ролі G-білків в регуляції P2X3-опосередкованих струмів за участі опіоїдних рецепторів, дисертантом було досліджено вплив інгібітора інгібуючих G-білків (G_i/o) токсина кашлюку (РТХ) на дію опіоїдів. Встановлено, що застосування ЛЕК за умови попередньої обробки РТХ призводить до протилежного ефекту, а саме виключно до потенціації P2X3-струму. Цікаво, що потенціація P2X3-струму повністю пригнічувалася налоксоном.

Таким чином, ґрунтуючись на отриманих експериментальних даних дисертантом зроблено абсолютно логічний висновок, а саме, що активація μ -опіоїдних рецепторів може зумовлювати як інгібуючу, так і стимулюючу дію на P2X3-опосередковані струми і така амбівалентна взаємодія опіоїдних рецепторів з P2X-рецепторами пов'язана з активністю G-білків різних типів та різних молекулярних шляхів, які вони запускають.

Надалі було детальніше досліджено молекулярно-біологічні основи такого феномену. З огляду на те, що опіоїдіндукована активація PLC і, в свою чергу, гідроліз PIP_2 можуть лежати в основі інгібування P2X3-струмів було застосовано інгібітор PLC - U-73122. Встановлено, що прикладання U-73122 призводило до відновлення амплітуд P2X3-струмів інгібованих

опіоїдами, однак лише до контрольних показників. Абсолютно правомірним є зроблене припущення, що викликані опіоїдом інгібування та стимулювання P2X3-струмів можуть опосередковуватись дією PLC.

Для перевірки цього припущення було досліджено вплив інгібітора PLC - U-73122 на PTH-залежну потенціацію ЛЕК-індукованих P2X3-струмів. Як і очікувалося, прикладання U-73122 після стимулюючого впливу ендogenousного опіоїда ЛЕК на P2X3-струми викликало відновлення амплітуд порівняно з контролем. Крім того, застосування активатора PLC аналогічно з інгібітором РІК вортманіном призводило до пригнічення P2X3-струмів вказуючи на важливу роль мембранних PIR_2 .

Таким чином, отримані дані свідчать на користь можливої участі PLC як в стимулюючому, так і в інгібуючому впливі опіоїдів на P2X3-струми.

Згідно даних літератури зумовлена активацією G-білків модуляція P2X-опосередкованих відповідей може відтворюватися шляхом прикладання форболового ефіру та блокуватися інгібіторами кіназ, в тому числі і РКС. Саме тому цілком виправданими є дослідження можливої ролі РКС в стимулюючому впливі ЛЕК на P2X3-струми з застосуванням інгібітора РКС стауроспорину. З'ясувалося, що застосування інгібітору РКС стауроспорину повністю усувало стимулюючий вплив ЛЕК на P2X3-опосередковані струми. Ці дані дійсно вказують на участь РКС в стимуляції P2X3-струмів, викликаній активацією опіоїдних рецепторів ЛЕК.

З огляду на те, що активація опіоїдних рецепторів впливає на кальцієві канали та іонні струми опосередковані ними, дисертантом було з'ясовано роль $G_{i/o}$ - та G_q -білків μ -опіоїдних рецепторів у змінах кальцієвої сигналізації, викликаній прикладанням ЛЕК до нейронів СГ. Було встановлено, що викликане ЛЕК вивільнення іонів Ca^{2+} з ендоплазматичного ретикулума опосередковується активацією як $G_{i/o}$ -, так і G_q білками опіоїдних рецепторів. Відповідно, було висунуто припущення, що MOR-опосередкована сигналізація спрямовується на P2X3-рецептори

шляхом активації як чутливих до РТХ (Gi/o)-білків, так і нечутливих - Gq-білків MOR. Саме ці два типи G-білків можуть виконувати роль посередників протилежних ефектів впливу ЛЕК на P2X3-рецептори.

У розділі “Обговорення результатів”, що складається з трьох підрозділів, дисертантом проведено ґрунтовний аналіз та узагальнення власних результатів з урахуванням даних літератури. Важливо, що зроблено акцент на дані, що є суперечливими згідно даних інших авторів чи навіть відрізняються від очікуваних. Заме з’ясування таких ключових моментів є надзвичайно важливим для формування повного уявлення про роль опіоїдних рецепторів в регуляції P2X3 рецепторів.

В цілому ж висновки і основні положення дисертаційної роботи Кулика Вячеслава Борисовича відповідають меті та поставленим завданням дослідження, повністю базуються на власних результатах досліджень. Результати експериментів статистично оброблені, а їх достовірність не викликає сумніву. Автореферат дисертації повністю відображає зміст дисертаційної роботи.

Результати дисертаційної роботи Кулика Вячеслава Борисовича у повному об’ємі опубліковані в провідних фахових виданнях, рекомендованих для захисту кандидатських дисертацій та пройшли всебічну апробацію на вітчизняних та міжнародних форумах. В цілому по темі дисертації опубліковано 5 статей, в тому числі і в закордонних наукових виданнях та 7 тез доповідей на конференціях.

До роботи є деякі запитання.

1. Чи перевіряли вплив інгібітору РКС стауроспорину на інгібіторну дію опіоїдів (ЛЕК) на P2X-опосередковані струми і чи вона є аналогічною з інгібітором PLC?

2. Клінічні спостереження вказують на те, що введення хворим налоксону перед застосуванням опіоїдних препаратів, покращує знеболюючий ефект. Поясніть з чим це пов'язано?

3. У літературі існують дані, що опіоїдна терапія, яка застосовується при онкопатологіях може викликати ефект гіпералгезії. Які процеси можуть лежати в основі такого ефекту?

4. Чому в своїх дослідженнях Ви не використовували активаторів аденілатциклази? Адже існує велика кількість робіт, які вказують на те, що агоністи опіоїдних рецепторів можуть модулювати активність аденілатциклази.

Однак висловлені зауваження ніяким чином не впливають на загальне позитивне враження від представленої роботи.

Вважаю, що дисертація Кулика Вячеслава Борисовича за своєю актуальністю, об'ємом, науково-практичною значимістю, новизною отриманих результатів та всебічним аналізом відповідає вимогам п.п. 11, 12, 13 "Порядку присудження наукових ступенів і присвоєння вченого звання старшого наукового співробітника", затвердженого постановою Кабінету Міністрів України від 24.07.2013, № 567, а її автор Кулик Вячеслав Борисович заслуговує на присудження наукового ступеня кандидата біологічних наук за спеціальністю 03.00.13 – фізіологія людини і тварин

Офіційний опонент:

Завідувач відділу сигнальних систем клітини

Інституту молекулярної біології і генетики

ІАН України, доктор біологічних наук,



В.В.Філоненко.

Підпис *Філоненко В.В.*
посвідчується
Зав. п.м.м. І.М. Клейн