

## ВИСНОВОК

Про наукову новизну, теоретичне та практичне значення дисертації  
Семеніхіної Маргарити Олексіївни  
«Роль протеазаактивованих рецепторів першого типу у патогенезі  
поведінкових розладів, спричинених епілептичним статусом»

на здобуття ступеня доктора філософії  
за спеціальністю 091 Біологія

### ВИТЯГ

з протоколу №12  
засідання Сектору Нейронаук  
Інституту фізіології НАН України  
від «12» червня 2020 р.

**Головуючий:** академік НАН України, д.б.н. Кришталь О.О.  
**Секретар:** к.б.н. Соткіс Г.В.

**Присутні: співробітники з сектору:** д.б.н., академік НАН України О.О. Кришталь; д.м.н., проф., член –кор. НАН України Скибо Г.Г.; д.б.н., проф. Лук'янець О.А.; д. б. н., проф. Войтенко Н. В.; д. б. н., проф. Білан П. В.; д.б.н., ст.н.с. Сторожук М.В.; д.б.н. ст.н.с. Кононенко М.І; д.б.н, ст.н.с. Ніконенко О.Г.; к.б.н., ст.н.с. Чижмаков І.В.; к.б.н. Любанова О.П.; к.б.н., ст.н.с. Максимюк О.П.; к.б.н., ст.н.с. Ісаєв Д.С.; к.б.н., ст.н.с. Грищенко О.В.; к.б.н., ст.н.с. Соткіс Г.В.; к.б.н., ст.н.с. Чернінський А.О.; к.б.н., с.н.с. Дужий Д.Ю.; к.б.н. Іванова С.Ю.; к.б.н. Пурнинь О.Е.; к.б.н. Тарасенко О.М.; к.б.н. Шкриль В.М.; к.б.н., ст.н.с. Рибачук О.А.; к.б.н., к.б.н. Савотченко А.В.; Єгорова О.В.; к.б.н., Кулик В.Б., а також співробітники та аспіранти інституту фізіології ім. О.О. Богомольця

**Порядок денний:** обговорення наукової доповіді та гадання рекомендації до захисту дисертаційної роботи Семеніхіної Маргарити Олексіївни «Роль протеазаактивованих рецепторів першого типу у патогенезі поведінкових розладів, спричинених епілептичним статусом», яка представляється на здобуття наукового ступеня доктора філософії 091 - Біологія. Наукові керівники: Ісаєва Олена Валентинівна, доктор біологічних наук, провідний науковий співробітник, Максимюк Олександр Петрович, кандидат біологічних наук, провідний науковий співробітник. Тема дисертаційної роботи затверджена на засіданні Вченої Ради Інституту

фізіології ім. О.О. Богомольця НАН України протокол (№3 від 26 лютого 2019 р.)

**Рецензенти:** д.б.н., ст.н.с. Сторожук М.В., к.б.н., н.с. Рибачук О.А.

**Слухали:** наукову доповідь аспірантки денної форми навчання **Семеніхіної Маргарити Олексіївни** «Роль протеазаактивованих рецепторів першого типу у патогенезі поведінкових розладів, спричинених епілептичним статусом».

**Семеніхіна М.О.** у своїй доповіді навела основні положення дисертаційної роботи: актуальність, наукову новизну, практичну цінність та перспективи використання результатів дисертації.

**Були поставлені такі запитання:**

За якими підставами було обрано саме цей блокатор для блокування ПАР1? Чи використовувалися інші речовини?

Яким чином проводилося статистичне дослідження у тестах на поведінкову збудливість, які групи порівнювалися?

Чому для проведення дослідження були обрані саме протеазаактивовані рецептори 1? Протеазаактивовані рецептори 3 також демонструють спорідненість до тромбіну та експресуються в ЦНС ссавців.

Електрофізіологічні дослідження проводилися лише на гіпокампі, в той час як емоційні реакції, що досліджувалися в поведінкових тестах, опосередковуються роботою мигдалеподібного комплексу, чому було обрано саме цей об'єкт дослідження?

На всі запитання були дані ґрунтовні відповіді.

**Виступили :**

- д. б. н., Сторожук М.В., провідний науковий співробітник відділу фізико-хімічної біології клітинних мембран Інституту фізіології ім. О.О. Богомольця.

- к. б. н., Рибачук О.А., науковий співробітник відділу фізико-хімічної біології клітинних мембран Інституту фізіології ім. О.О. Богомольця.

Було зроблено ряд зауважень. Було наголошено на необхідності систематично виправити термінологію та переформулювати окремі висновки.

Рецензенти оцінили представлену роботу як таку, що виконана із застосуванням сучасних методів на високому науковому рівні та рекомендували дисертаційну роботу Семеніхіної Маргарити Олексіївни

«Роль протеазаактивованих рецепторів першого типу у патогенезі поведінкових розладів, спричинених епілептичним статусом» до офіційного захисту.

**Брали участь в обговоренні:** акад. Кришталь О.О., д.б.н. Войтенко Н.В., д.б.н. Білан П.В., д.б.н. Кононенко М.І., та інші наукові співробітники.

**Постановили:** на підставі заслуханої доповіді, представлених рецензій, відповідей на запитання та проведеного обговорення ухвалити висновок щодо дисертаційної роботи Семеніхіної Маргарити Олексіївни «Роль протеазаактивованих рецепторів першого типу у патогенезі поведінкових розладів, спричинених епілептичним статусом».

Результати відкритого голосування;

Присутні – 29 осіб

«за» - 29 осіб; «проти» - немає; «утримались» - немає.

## **ВИСНОВОК**

щодо дисертаційної роботи **Семеніхіної Маргарити Олексіївни**  
*«Роль протеазаактивованих рецепторів першого типу у патогенезі поведінкових розладів, спричинених епілептичним статусом»*

### **Актуальність теми.**

Дослідження вказують на те, що розвиток багатьох неврологічних захворювань, у тому числі епілепсії та супутніх їй психоневрологічних патологій, пов'язаний з порушенням гемато-енцефалічного бар'єру (ГЕБ). ГЕБ захищає мозок від шкідливих речовин, які циркулюють у кровоносному руслі, та, водночас, забезпечує його необхідними речовинами для функціонування мозкових структур. В уявленнях сучасної нейрофізіології, ГЕБ розглядається більше не як анатомічна структура, а як функціональне поняття, що характеризує певний фізіологічний механізм, який знаходиться під регулюючим впливом нервової та гуморальної систем. Відомо, що порушення ГЕБ навіть саме по собі може сприяти розвитку судом: так, наприклад, класичним проявом внутрішніх крововиливів є розвиток у хворого епілептичних нападів. В той же час, незважаючи на відомості щодо зв'язку між порушенням цілісності ГЕБ та судомами, механізми, що характеризують розвиток епілепсії в умовах дисфункції ГЕБ, залишаються невизначеними.

Серинові протеази, інгібітори серинових протеаз та протеаза-активовані рецептори (ПАР) широко відомі через їх вплив на коагуляцію, гемостаз, запалювальні процеси та заживлення ран. Ці білки ендогенно зустрічаються в ЦНС та беруть участь у нормальних фізіологічних процесах, а також відіграють важливу роль у патофізіологічних процесах, спричинених різними патологіями ЦНС.

Серинові протеази, їх попередники, ендогенні інгібітори та рецептори впливають на синаптичні функції та формування поведінки. Білок сироватки крові тромбін є одним з основних активаторів ПАР. З використанням тварин, нокаутних за геном F2R, що кодує експресію протеазаактивованих рецепторів першого типу (ПАР1), які є найбільш спорідненими до тромбіну, було показано, що ці рецептори відіграють важливу роль у процесах синаптичної пластичності та формуванні емоційно-зумовленої пам'яті та афективної поведінки.

Важлива роль тромбінових рецепторів була встановлена у патогенезі ішемії, внутрішньомозкових крововиливів, травм головного мозку, тощо. Багато експериментальних даних вказують на участь ПАР1 в регуляції процесів розвитку епілептичних нападів та епілепсії. Дослідження останніх років також вказують на те, що тромбін може впливати на загальну збудливість нейронних мереж. Відомо, що підвищення рівня тромбіну у внутрішньомозковому середовищі може спричиняти судомні напади. Але в той же час механізми такого впливу залишаються значною мірою не вивченими.

#### **Зв'язок роботи з науковими програмами, планами, темами.**

Дисертаційна робота виконана в рамках наукової програми відділу фізико-хімічної біології клітинних мембран Інституту фізіології ім. О. О. Богомольця НАН України «Молекулярно-генетичні та фармакологічні засоби впливу на клітинні механізми неврологічних розладів» (№ державної реєстрації 0118U007343); в рамках проекту науково-дослідних робіт для молодих вчених «Механізми розвитку епілептиформної активності та властивості синаптичної пластичності гіпокампа в умовах порушення цілісності гематоенцефалічного бар'єру» (№ державної реєстрації 0119U102351); в рамках проекту НАН України «Вплив протеазаактивованих рецепторів на патогенез поведінкових розладів при епілепсії» (№ державної реєстрації 0117U004960).

#### **Особистий внесок здобувача.**

Опрацювання літературних джерел, постановка експериментів та інтерпретація отриманих результатів. Електрофізіологічні та поведінкові

дослідження, кількісна обробка даних, підготовка наукової роботи до друку та написання всіх розділів дисертації.

### **Обґрунтованість наукових положень та висновків, викладених в дисертації.**

Усі експерименти з тваринами були затвержені і проводились у відповідності з вимогами Клініки піддослідних тварин та Комітету з біомедичної етики Інституту фізіології ім. О.О. Богомольця НАН України (Київ, Україна) згідно протоколу № 2/20 від 26.02.2020. Достовірність наукових положень, висновків та практичних рекомендацій, винесених на захист, обумовлена правильно вибраним комплексом методичних підходів до вирішення поставленої мети, достатнім за обсягом матеріалом, використанням сучасних методів отримання та обробки даних. Зроблені висновки достатньо аргументовані та обґрунтовані і являють собою логічне завершення роботи.

### **Наукова новизна одержаних результатів.**

У роботі вперше продемонстровано, що блокування протеазаактивованих рецепторів першого типу в період епілептогенезу нормалізує рівень тривожності та емоційної-збудливості дослідних тварин у латентній стадії формування епілепсії, не впливаючи на контроль. Пригнічення функції протеазаактивованих рецепторів першого типу у латентній стадії формування епілепсії не впливає на формування умовної реакції страху як в контролі так і після епілептичного статусу. Вперше показано, що блокування протеазаактивованих рецепторів першого типу не впливає на параметри соціальної поведінки в контролі та при епілептичному статусі. Продемонстровано, що фармакологічна блокада протеазаактивованих рецепторів першого типу не змінює здатність молодих тварин до формування просторової пам'яті після епілептичного статусу та у контролі. Встановлено, що блокування протеазаактивованих рецепторів першого типу в період епілептогенезу нормалізує рівень довготривалої синаптичної потенціації в радіальному шарі гіпокампа та рівень короткотривалої синаптичної пластичності в умовах парної симуляції, знижені унаслідок епілептичного статусу, не впливаючи на контроль.

### **Практичне та теоретичне значення одержаних результатів.**

Результати, отримані в роботі, мають, насамперед, фундаментальне значення, оскільки розширюють існуючі уявлення про залучення PAR1 у механізми розвитку супутніх епілепсії неврологічних розладів. Отримані дані щодо впливу пригнічення функції PAR1 після епілептичного статусу на

дефіцити пластичності синаптичних зв'язків в гіпокампі можуть служити підґрунтям для розуміння механізмів дефектності поведінкових феноменів, що спостерігаються при епілепсії.

Різноманітні позитивні ефекти пригнічення ПАР1 після ЕС на різні форми поведінки тварин поряд із відсутністю впливу блокування ПАР1 на поведінкові реакції щурів контрольної групи вказують на те, що ПАР1 може розглядатися як перспективна молекулярна мішень при розробці іновативних фармакологічних підходів у лікуванні епілепсії та супутніх поведінкових розладів .

## **ПЕРЕЛІК ПУБЛІКАЦІЙ ЗА ТЕМОЮ ДИСЕРТАЦІЇ**

### **В яких опубліковані основні результати роботи:**

1. Semenikhina M., Bogovyk R., Fedoriuk M., Nikolaienko O., AlKury L.T., Savotchenko A., Krishtal O., Isaeva E. (2018) Inhibition of protease-activated receptor 1 ameliorates behavioral deficits and restores hippocampal synaptic plasticity in a rat model of status epilepticus. *Neurosci. Lett.* DOI: 10.1016/j.neulet.2018.10.058
2. M.O. Semenikhina, R.I. Bogovyk, M.P. Fedoriuk, O.V. Stasyshyn, A.V. Savotchenko, E.V. Isaeva Protease-activated receptor 1 inhibition does not affect the social behavior after status epilepticus in rat, *Fiziol. Zh.* 2018; 64(6): 17-22. DOI: <https://doi.org/10.15407/fz64.06.017>
3. M. Semenikhina, R. Bogovik, M. Fedoryuk, O. Lunko, A. Savotchenko, E. Isaeva. Pharmacological blockade of protease-activated receptors 1 normalizes behavioral hyperexcitability of rats in the latent stage of the experimental model of temporal lobe epilepsy, *Fiziol. Zh.* 2019; 65(3): 7-11. DOI: <https://doi.org/10.15407/fz65.03.007>

### **Які засвідчують апробацію матеріалів дисертаційного дослідження:**

1. E. Isaeva, M. Semenikhina, R. Bogovyk, M. Fedoriuk, O. Nikolaienko, Lina T. AlKury, A. Savotchenko, O. Krishtal. Protease-activated receptor 1 inhibition rescues impaired synaptic plasticity and anxiety-related behavior but does not affect spatial learning deficit in juvenile rat after status epilepticus. *SfN meeting, Chicago, USA, 2019.*

2. M. Semenikhina, R. Bogovyk, M. Fedoriuk, O. Nikolaienko, A. Savotchenko, E. Isaeva Inhibition of protease-activated receptor 1 restores hippocampal synaptic plasticity and converts behaviour deficits in a model of temporal lobe epilepsy, *35th Ernst Klenk Symposium in Molecular Medicine Rare diseases: From mechanisms to therapy and beyond, Cologne, Germany, 2019.*

3. M. Semenikhina, R. Bogovyk, M. Fedoriuk, O. Nikolaienko, A. Savotchenko, E. Isaeva Inhibition of PAR1 restores hippocampal synaptic plasticity and affects emotionally-modulated behavior in rat at lithium-pilocarpine model of status epilepticus, 20-й з'їзд Українського фізіологічного товариства, Київ, Україна, 2019.

4. Semenikhina M., Bogovyk R., Fedoriuk M., Nikolaienko O., Savotchenko A., Isaeva E. Inhibition of par1 affects on emotionally-modulated behaviour and synaptic plasticity in rat at lithium-pilocarpine model of temporal lobe epilepsy, VII з'їзд Українського біофізичного товариства, Київ, Україна, 2018.

5. Semenikhina M., Bogovyk R., Fedoriuk M., Nikolaienko O., Savotchenko A., Krishtal O., Isaeva E. Inhibition of protease-activated receptor 1 ameliorates behavioral deficits and restores hippocampal synaptic plasticity in a rat model of status epilepticus, Oxford autumn school in neuroscience, Oxford, UK, 2018.

6. M.O. Semenikhina, R.I. Bogovyk, M.P. Fedoriuk, A.V. Savotchenko, E.V. Isaeva Protease-activated receptor 1 inhibition does not affect the social behavior after status epilepticus in rat, International scientific and practical forum "Ukraine of the future", Berdyans'k, Ukraine, 2018.

7. Semenikhina M., Bogovyk R., Lunko O., Fedoriuk M., Isaev D., Krishtal O., Isaeva E. Inhibition of protease-activated receptor 1 affect on the long-term synaptic plasticity following status epilepticus, Smooth Muscle Physiology, Biophysics and Pharmacology, Kyiv, Ukraine, 2018.

8. Marharyta Semenikhina, Alina Savotchenko, Ruslan Bogovyk, Mykhailo Fedoriuk, Elena Isaeva Inhibition of protease-activated receptor 1 affects on the long-term synaptic plasticity following status epilepticus Scientific activity for forming Professional competence of future profession, Sumy – 2017, Sumy, Ukraine, 2017.

9. Marharyta Semenikhina, Alina Savotchenko, Ruslan Bogovyk, Mykhailo Fedoriuk and Elena Isaeva Effects of protease-activated receptor 1 inhibition on the synaptic plasticity following status epilepticus in young adult rat, VII International Congress of Ukrainian Society for Neuroscience, Kyiv, Ukraine, 2017.

На підставі вищевикладеного Наукова Рада сектору Нейронаук Інституту фізіології ім. О.О. Богомольця НАН України в результаті відкритого голосування прийшла до висновку, що дисертаційна робота Семеніхіної Маргарити Олексіївни «Роль протеазаактивованих рецепторів першого типу у патогенезі поведінкових розладів, спричинених епілептичним статусом» є самостійним закінченим науковим дослідженням, яке розкриває роль протеазаактивованих рецепторів 1 у патогенезі поведінкових розладів, що провокуються епілептичним статусом у молодих

тварин. Дисертаційна робота Семеніхіної Маргарити Олексіївни «Роль протеазаактивованих рецепторів першого типу у патогенезі поведінкових розладів, спричинених епілептичним статусом» повністю відповідає пп. 10, 11 «ПОРЯДКУ проведення експерименту з присудження ступеня доктора філософії (PhD)», що затверджений Постановою Кабінету Міністрів України від 6 березня 2019 року № 167, відносно дисертацій на здобуття ступеня доктора філософії за спеціальністю 091 «Біологія», та може бути рекомендована до офіційного захисту на здобуття наукового ступеня доктора філософії за спеціальністю 091 «Біологія» із врахуванням висловлених зауважень.

### **Рекомендація дисертації до захисту.**

Дисертаційна робота Семеніхіної М.О. **«Роль протеазаактивованих рецепторів першого типу у патогенезі поведінкових розладів, спричинених епілептичним статусом»** відповідає вимогам «Порядку проведення експерименту з присудження доктора філософії» (Постанова Кабінету Міністрів України від 06.03.2019р. №167).

Дисертаційна робота Семеніхіної М.О. присвячена впливу пригнічення функції протеазаактивованих рецепторів 1 (ПАР1) на розвиток супутніх епілепсії неврологічних розладів. Дослідження ролі протеазаактивованих рецепторів (ПАР1) в розвитку неврологічних розладів є актуальним, а пригнічення функції ПАР1 в період епілептогенезу можна розглядати як гіпотетичну терапію таких станів та перспективний напрям дослідження.

Численні наукові дані демонструють, що захворювання на епілепсію або епілептичний статус, провокують розвиток різноманітних психоневрологічних розладів, які суттєво впливають на життя хворих. Згідно зі статистичними даними, у близько 75% пацієнтів епілепсія розвивається в дитинстві та молодому віці, що провокує різноманітні психічні, когнітивні та поведінкові розлади у подальшому житті.

Наукова новизна дослідження не викликає сумнівів. У роботі вперше показано вплив пригнічення функції ПАР1 на емоційну поведінку в латентний період епілептогенезу а також проведено електрофізіологічні дослідження структур, які задіяні в обробці таких реакцій.

Отримані результати вказують на те, що ПАР1 можуть стати привабливою мішенню для лікування епілепсії, спричиненій порушенням гемато-енцефалічного бар'єру (ГЕБ), що увиразнює практичну значущість дослідження.

Результати, отримані в роботі, мають здебільшого фундаментальне значення, оскільки розширюють сучасні уявлення про залучення ПАР1 у механізми розвитку супутніх епілепсії неврологічних розладів. Робота доповнює наявну інформацію щодо розвитку коморбідних захворювань, які виникають внаслідок порушення ГЕБ та активації ПАР1 тромбіном.

Висвітлення результатів дослідження у наукових виданнях є достатнім для усіх експериментальних досліджень була проведена біоетична експертиза. За темою дисертації Семеніхіною М.О. опубліковано 12 наукових робіт: 3 статті у міжнародних наукових журналах (одна з яких у журналі, що входить до третього квартилю (Q3) відповідно до класифікації SCImago Journal and Country Rank) та 9 матеріалів апробаційного характеру.

Робота відповідає паспорту спеціальності 091 Біологія.

Вважаємо, що актуальність, наукова новизна, теоретичне та практичне значення результатів, представлених у роботі, свідчать про високий науковий рівень здобувачки, а дисертаційне дослідження Семеніхіної М.О. на тему «Роль протеазаактивованих рецепторів першого типу у патогенезі поведінкових розладів, спричинених епілептичним статусом» відповідає вимогам Порядку проведення експерименту з присудження ступеня доктора філософії (PhD), що затверджений постановою Кабінету Міністрів України від 6 березня 2019 року № 167, і може бути подано до захисту у разову спеціалізовану вчену раду за спеціальністю 091 «Біологія» з присудження наукового ступеня доктора філософії.

Рецензенти:

Доктор біологічних наук,

Сторожук Максим Вікторович



Кандидат біологічних наук,

Рибачук Оксана Андріївна



Голова сектору нейрофізіології,

академік НАНУ,

Кришталь Олег Олександрович

