

ВІДГУК ОФІЦІЙНОГО ОПОНЕНТА

доктора біологічних наук, професора, завідувача кафедри біофізики та
медичної інформатики ННЦ «Інститут біології та медицини»

Київського національного університету імені Тараса Шевченка

ЖОЛОСА ОЛЕКСАНДРА ВІКТОРОВИЧА

на дисертаційну роботу аспірантки

Інституту фізіології ім. О. О. Богомольця НАН України

СЕМЕНІХІНОЇ МАРГАРИТИ ОЛЕКСІЇВНИ

«Роль протеазаактивованих рецепторів першого типу у патогенезі
поведінкових розладів, спричинених епілептичним статусом»

представлену до захисту у спеціалізовану вчену раду ДФ 26.198.001
Інституту фізіології ім. О. О. Богомольця НАН України, утворену наказом
МОН України від 06.07.2020 № 897 для розгляду та проведення разового
захисту дисертації на здобуття ступеня доктора філософії за
спеціальністю 091 Біологія

Актуальність проведених досліджень

Епілепсія зараз все більше розглядається як багатofакторна патологія ЦНС, що включає не лише напади чи судоми у класичному розумінні цього захворювання, а і цілий спектр інших неврологічних розладів. Дійсно, від когнітивних розладів та підвищеної тривожності страждає принаймні половина хворих на епілепсію людей, тоді як саме для цих коморбідних станів наразі не існує ефективних та селективних фармакологічних засобів їх корекції. Більш того, залишаються відкритими питання які з цих неврологічних розладів безпосередньо спричиняються епілептичними нападами, а які можливо розвиваються незалежним чином внаслідок окремих молекулярних та клітинних механізмів. Одним з визначених спільних механізмів є дисфункція глутаматних рецепторів, що

залучені як у регуляції збудливості нейрональних мереж, так і у процесах навчання та формування пам'яті.

Таким чином, дисертаційне дослідження Семеніхіної М.О., метою якого було визначення ролі протеазаактивованих рецепторів першого типу у виникненні поведінкових та когнітивних розладів спричинених епілептичним статусом, відповідає найбільш сучасним трендам у галузі дослідження епілепсії як складного багатфакторного захворювання, а його значимість має як теоретичні, так і практичні складові. Більш того, хоча в темі і меті дослідження не відмічено той факт, що дослідження були проведені на тваринах молодого віку, в самій роботі це неодноразово підкреслюється. Це також є актуальним і важливим, адже вважається, що епілепсія спричиняє негативні наслідки для когнітивних функцій найбільш значним чином саме в цей період.

Наукова новизна отриманих результатів, їх теоретичне та практичне значення

Автором дисертаційного дослідження були отримані цілий ряд нових даних, або таких, що суттєво доповнюють існуючі уявлення щодо негативних наслідків індукованого у молодому віці епілептичного статусу для різних форм поведінкових реакцій. На особливу увагу заслуговують нові дані щодо можливої участі протеазаактивованих рецепторів першого типу як в епілептогенезі, так і у розвитку таких супутніх неврологічних порушень, як рівень тривожності та емоційної збудливості під час латентної стадії виникнення епілепсії.

В останні роки значна увага приділяється також проблемі порушення інтактності гематоенцефалічного бар'єру та ролі тромбіну, що може при цьому потрапляти в ЦНС, в епілептогенезі. Відомо, що тромбін відіграє важливу роль у процесах запалення, ішемії та проліферації клітин. На клітинному рівні ефекти тромбіну опосередковані ПАР

рецепторами, які спряжені з декількома типами G-білків. Дослідження на тваринах показали, що потрапляння тромбіну до головного мозку, наприклад при його травмі та інсульті, спричиняє ушкодження мозку, і у тому числі гострі судоми.

Тому цілком логічним було розширити ці дослідження у напрямку з'ясування ролі тромбіну та PAR рецепторів у неврологічних розладах при епілепсії. В даній роботі було вперше встановлено, що блокатор PAR1 рецепторів нормалізує рівень тривожності та емоційної збудливості дослідних тварин під час латентної стадії розвитку епілепсії. З точки зору практичної значимості отриманих результатів важливо відмітити той факт, що блокування PAR1 рецепторів не спричиняло ніяких змін поведінкових реакцій у здорових щурів, тобто роль PAR1 рецепторів в їх регуляції є досить специфічною для епілепсії. Цікаво також відмітити, що стосовно поведінкових реакцій також спостерігалася певна специфічність. Так, блокування PAR1 рецепторів не впливало на формування умовної реакції страху та на параметри соціальної поведінки, а також формування просторової пам'яті.

Подальше дослідження можливих механізмів залучення PAR1 рецепторів до неврологічних проявів епілепсії показало, що їх блокування нормалізує як рівень короткотривалої синаптичної пластичності, так і рівень довготривалої синаптичної потенціації в гіпокампі. Ця роль PAR1 рецепторів була також специфічною для епілептогенезу і не проявлялась у здорових тварин.

Дане дисертаційне дослідження носить переважно фундаментальний характер і не містить конкретних рекомендацій щодо практичного застосування отриманих результатів. Тим не менш, отримані результати досить однозначно передбачають можливість використання блокаторів PAR1 рецепторів для фармакологічної корекції поведінкових розладів, які супроводжують розвиток епілепсії.

Ступінь обґрунтованості та достовірності наукових положень та висновків дисертаційної роботи

Наукові положення дисертаційної роботи базуються на широкому застосуванні комплексу різних поведінкових тестів, які добре себе зарекомендували і широко використовуються у фізіологічних дослідженнях. Це дозволило всебічно охарактеризувати поведінковий статус дослідних тварин із загальноприйнятою літій-пілокарпіною моделлю епілепсії, провести адекватні порівняння з контрольними тваринами та зробити обґрунтовані висновки щодо специфічних поведінкових змін, які супроводжують епілепсію вже на її ранніх стадіях розвитку.

Ці *in vivo* експерименти дозволили сформувані обґрунтовані гіпотези щодо можливих порушень синаптичної передачі в тих чи інших зонах гіпокампу, які далі були досліджені вже *in situ* на свіжо-ізолюваних зрізах гіпокампу за допомогою стандартних електрофізіологічних методів зовнішньоклітинної реєстрації спонтанної та викликанної електричної активності мозку.

Методи дослідження достатньо деталізовані, що дозволяє іншим дослідникам не тільки відтворити ці результати, а і продовжити дослідження цієї проблематики.

Висновки по кожній серії проведених експериментів базуються на достатній кількості вимірів та їх адекватному статистичному аналізу і обговоренні.

Семеніхіна М.О. показала себе компетентним науковцем. Вона добре обізнана з науковою літературою по досліджуваній нею проблемі, засвоїла технічно складні електрофізіологічні методи дослідження, здатна до фахового та критичного аналізу отриманих результатів.

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

Дисертаційну роботу виконано згідно з планами науково-дослідних робіт Інституту фізіології ім. О.О. Богомольця НАН України в рамках 3-х наукових тем, у тому числі проекту науково-дослідних робіт для молодих вчених «Механізми розвитку епілептиформної активності та властивості синаптичної пластичності гіпокампа в умовах порушення цілісності гематоенцефалічного бар'єру».

Структура і обсяг дисертації, оцінка її завершеності та відповідності встановленим вимогам

Дисертаційна робота Семеніхіної М.О. представлена за загально-прийнятою формою у відповідності до вимог МОН України. Роботу викладено на 141 сторінках, що включає в себе анотацію, список наукових праць по темі дослідження, вступ, огляд літератури, опис матеріалів і методів досліджень, результати власних досліджень, обговорення отриманих результатів, висновки та список цитованої літератури (164 джерел). Отримані результати проілюстровані 21 рисунками, які дають повне уявлення про об'єм та якість проведених досліджень.

У вступі окреслено коло питань стосовно неврологічних розладів, що супроводжують епілепсію, на основі чого обґрунтовано вибір теми дослідження та її актуальність, сформульовано мету та завдання дослідження, пояснено зв'язок роботи з науковими програмами Інституту фізіології ім. О.О. Богомольця НАН України, де вона виконувалася, зазначено наукову новизну, теоретичне та практичне значення отриманих результатів, а також представлені відомості щодо особистого внеску здобувачки, апробації матеріалів дисертаційного дослідження та публікацій по темі дослідження.

В розділі 1 (Огляд літератури) автор висвітлює сучасні концепції стосовно поведінкових розладів при епілепсії, аналізує їх можливі клітинні та молекулярні механізми. Основний акцент при цьому робиться на проблемі синаптичної пластичності гіпокампа та ролі протеазаактивованого рецептору 1, що повністю відповідає основним напрямкам цього дослідження.

В розділі 2 (Матеріали і методи дослідження) пояснено яким чином відбувалась індукція епілептичного статусу у щурів молодого віку, проводились ті чи інші поведінкові тести, електрофізіологічні дослідження та статистичний аналіз даних. Слід окремо відмітити, що цей розділ проілюстровано декількома схемами, таблицями, також деталізовані протоколи експериментів і реєстрацій.

Розділ 3 (Результати досліджень) складається з двох підрозділів, в яких наведені основні результати досліджень. У першому з них проаналізовані наслідки індукованого у молодому віці епілептичного статусу та ефект блокування PAR1 щодо поведінкових реакцій щурів. У другому підрозділі наведені дані щодо ролі PAR1 рецепторів у процесах синаптичної пластичності гіпокампа.

В розділі 4 отримані результати обговорюються у порівнянні з попередніми дослідженнями цієї проблематики, робляться підсумки, а також критично аналізуються певні обмеження дослідження та окреслюються ще не вирішені проблеми та перспективи їх подальшого дослідження.

Висновки роботи сформульовані чітко, вони загалом відповідають поставленим завданням і повністю ґрунтуються на отриманих результатах.

Представлені у дисертаційній роботі результати опубліковані у 12 статтях та тезах конференцій. Вони доповідались на фахових наукових форумах, серед яких варто відмітити з'їзди Українського фізіологічного

товариства ім. П.Г. Костюка, Українського товариства нейронаук, Українського біофізичного товариства, Товариства нейронаук США, а також більш спеціалізовані міжнародні конференції у Німеччині та Великобританії.

Під час рецензування дисертаційної роботи виникли наступні **запитання та зауваження:**

1. Епілепсія – це складне багатофакторне захворювання, що має цілий спектр форм та проявів, від спадкових до набутих, у тому числі як наслідок травми головного мозку, інсульту або пухлини мозку, інфекційних захворювань. До якої з цих форм епілепсії найближчою є використана у роботі літій-пілокарпінова модель епілептичного статусу?
2. У зв'язку з попереднім питанням чи є підстави вважати, що блокування PAR1 може бути однаково ефективним у профілактиці чи лікуванні неврологічних розладів при різних формах епілепсії?
3. Оскільки блокування PAR1 в період епілептогенезу нормалізувало рівень тривожності та емоційної-збудливості дослідних тварин у латентній стадії формування епілепсії, але не впливало на ці поведінкові параметри у контролі, виникає питання щодо можливої причини активації PAR1 саме в ранній період епілептогенезу.
4. Чи було зроблено якийсь незалежний тест ефективності фармакологічної блокади PAR1 рецепторів у поведінкових тестах *in vivo*?
5. Оскільки PAR1 є багатофункціональним рецептором його блокування може мати побічні ефекти, такі як порушення процесів згортання крові та кровотечі. Чи спостерігались такі негативні наслідки фармакологічної блокади PAR1 в експериментах? Наскільки

перспективним є використання блокаторів PAR1 в контексті епілепсії з огляду на такі ймовірні побічні реакції?

6. На рис. 2.8, 2.9 та 3.14 варто було навести калібровки часу та амплітуди ЗПСР.
7. Обговорення результатів було б більш конкретним, якби в роботі була наведена узагальнювальна схема щодо ролі тромбіну та PAR1 рецепторів у поведінкових реакціях при епілепсії.
8. Зауваження щодо термінології та визначень:
 - фасилітація – чому не використати термін «полегшення»?
 - «визволення розчинного фактора некрозу» (с. 52) – більш правильно сказати вивільнення розчинного фактору некрозу;
 - «PAR1 містить внутриклітинну N-кінцеву послідовність» (с. 53) – слід зауважити, що N-кінець білка розташований назовні клітини;
 - «Сім трансмембранних G-білків (GPCR,)» (с. 57) – їх більш правильно визначити як рецептори, що мають сім трансмембранних доменів;
 - «Питоме значення рН» (с. 77) – не зрозуміло що означає питоме у цьому контексті;
 - На рис. 3.4 пропущені позначення «контроль» та «ЕС»;

Висловлені зауваження суттєво не впливають на загалом високу оцінку даної дисертаційної роботи.

Висновок:

Дисертаційна робота Семеніхіної М.О. «Роль протеазаактивованих рецепторів першого типу в патогенезі поведінкових розладів, спричинених епілептичним статусом», яка представлена на здобуття ступеня доктора філософії за спеціальністю 091 «Біологія», є

самостійним, ґрунтовним дослідженням, яке розкриває роль PAR1 рецепторів у патогенезі епілепсії, зокрема в її поведінкових проявах.

Актуальність, наукова новизна, теоретичне та практичне значення результатів, що представлені 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» 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 щодо дисертацій на здобуття ступеня доктора філософії, а здобувачка заслуговує на присудження ступеня доктора філософії за спеціальністю 091 «Біологія».

Офіційний опонент

завідувач кафедри біофізики та медичної інформатики

ННЦ "Інститут біології та медицини"

Київського національного університету

імені Тараса Шевченка,

доктор біологічних наук, професор Жолос О.В.



Жолос О.В.
засвідчує
Заступник
Л. Соколов

