

ОТЗЫВ
официального оппонента Крупинной Наталии Александровны
на диссертацию Межлумяна Армена Гариковича
«Исследование антидепрессивных свойств дипептидных миметиков нейротрофинов
NGF и BDNF»,
представленную на соискание ученой степени кандидата биологических наук
по специальности 3.3.6 – фармакология, клиническая фармакология

Актуальность темы исследования.

Диссертационное исследование А.Г. Межлумяна выполнено в рамках фундаментальной проблемы поиска новых подходов к терапии депрессии, которая является изнурительным рецидивирующим психическим заболеванием. По показателю глобального бремени болезни распространенность депрессии среди детей и подростков в возрасте от 5 до 17 лет по данным последних лет составляет 6.6%, причем в отдельных странах с высоким доходом цифры достигают 49 %. Среди пожилых людей распространенность депрессии достигает 13%, а в некоторых странах превышает 20%. Депрессия является одной из лидирующих причин инвалидизации. Несмотря на то, что современная фармакотерапия депрессии достаточно эффективна, для многих пациентов проблемой остается высокая частота лишь частичного ответа или даже отсутствие ответа на терапию. Отсроченное начало действия многих антидепрессантов и частое отсутствие лечения, отвечающего минимальным стандартам, создают дополнительные проблемы в своевременном получении больными адекватной терапии. По данным Всемирной организации здравоохранения в конце 2021 года доля больных депрессией, получавших медицинскую помощь, в среднем составляла 40%. Растет доля стран, в которых лечение пациентов с депрессией включено в национальные схемы медицинского страхования, что увеличивает нагрузку систем здравоохранения на содержание таких больных.

Разработка новых эффективных антидепрессантов является важнейшей медико-социальной задачей, для решения которой необходимо изучение нейробиологических и патофизиологических механизмов заболевания, которые до настоящего времени изучены недостаточно. В последние годы накоплено много убедительных данных о роли нейротрофических факторов в механизмах депрессий, что определило интерес исследователей к поиску потенциальных антидепрессантов на основе нейротрофинов. В диссертационном исследовании А.Г. Межлумяна был применен новый оригинальный подход к решению этой задачи, основанный на оценке антидепрессантоподобных свойств дипептидных миметиков двух нейротрофинов – нейротрофического фактора мозгового происхождения BDNF и фактора роста нервов NGF, а также на получении доказательств участия TrkB-зависимых сигнальных путей в механизмах действия наиболее активного соединения. Работа А.Г. Межлумяна открывает новые терапевтические подходы к поиску антидепрессантов на основе ключевых нейротрофинов и, по совокупности сказанного, безусловно, является актуальной.

Научная новизна

В диссертационной работе А.Г. Межлумяна получены приоритетные данные о наличии антидепрессантоподобной активности у нескольких миметиков отдельных петель нейротрофинов – нейротрофического фактора мозгового происхождения BDNF и фактора

роста нервов NGF – в условиях их субхронического применения. Эффект обнаружен только у миметиков, которые *in vitro* активируют PI3K/AKT сигнальные пути.

Выявлено соединение-лидер – ГСБ-106, миметик 4-ой петли BDNF, который при однократном системном введении мышам в дозах 0.1 и 1.0 мг/кг подавлял депрессивноподобное поведение по типу «поведенческого отчаяния» в тесте вынужденного плавания, в дозе 0.1 мг/кг устранял признаки ангедонии в тесте предпочтения сахарозы на модели 10-дневного социального стресса на фоне тенденции к повышению сниженного стрессом уровня синаптофизина в гиппокампе, а в дозе 0.5 мг/кг устранял признаки ангедонии на модели депрессивноподобного поведения, индуцированного индуктором воспаления липополисахаридом. На модели более продолжительного 28-дневного стресса социального поражения ГСБ-106 в дозе 0.1 мг/кг устранял признаки депрессивноподобного поведения только в условиях хронического системного введения. Одновременно с развитием ангедонии и снижением двигательной активности продолжительный социальный стресс вызывал снижение экспрессии белков, вовлеченных в процессы нейро- и синаптической пластичности – синаптофизина, BDNF, CREB и pCREB в гиппокампе, а ГСБ-106 нормализовал их уровень. Таким образом, в работе получены не только оригинальные данные о соединениях, которые можно рассматривать в качестве потенциальных антидепрессантов новой группы, но и новые свидетельства вовлеченности белков-маркеров нейропластичности и синаптогенеза в механизмы депрессивноподобного поведения у мышей на модели продолжительного стресса социального поражения.

Проведенный в работе фармакологический ингибиторный анализ позволил установить механизмы антидепрессантоподобного действия перспективного соединения ГСБ-106, обусловленные активацией TrkB-рецептора и ассоциированных с ним сигнальных путей – PI3K/AKT, MAPK/ERK и PLC γ .

Диссертант выявил не только сходство, но и различия в молекулярных механизмах антидепрессивного действия перспективного соединения ГСБ-106 и препарата сравнения amitriptилина: показано, что активация сигнальных каскадов PI3K/AKT и MAPK/ERK не играет ключевой роли в механизмах действия amitriptилина, в отличие от ГСБ-106.

Научно-практическая значимость

Наличие антидепрессантоподобной активности у всех дипептидных миметиков 1-й и 4-й петли нейротрофинов BDNF и NGF при их субхроническом введении и обязательная активация сигнального пути PI3K/AKT для проявления этой активности определяют ключевые направления поиска новых соединений с антидепрессантоподобным действием среди дипептидных миметиков нейротрофинов.

Выделенное в работе соединение-лидер ГСБ-106 обладает антидепрессантоподобной активностью при разных способах введения на разных моделях, а фармакологический ингибиторный анализ свидетельствует о сходстве механизмов его действия с действием BDNF, что в совокупности позволяет говорить о целесообразности дальнейшего изучения данного соединения с перспективой его регистрации в качестве лекарственного средства для терапии психоневрологических расстройств, сопровождающихся депрессивной симптоматикой.

Заслуживает внимания эффективность соединения ГСБ-106 в условиях его хронического применения на моделях длительного социального стресса, в частности,

стресса социального поражения. Последствия такого стресса не ограничиваются развитием депрессивноподобных состояний. Поскольку ГСБ-106 восстанавливал сниженную трехнедельным стрессом экспрессию белков-маркеров синапто- и нейрогенеза в гиппокампе, участвующих в реализации когнитивных нарушений и тревожности, представляет интерес проверить эффективность ГСБ-106 в предотвращении развития этих расстройств на разных моделях стресса.

Степень достоверности и обоснованности научных положений, выводов и рекомендаций, сформулированных в диссертации

Большой объем исследований - работа выполнена с использованием почти 700 животных, - четкий план, применение хорошо разработанных экспериментальных моделей депрессивноподобных состояний и продуманный дизайн работы на разных её этапах обеспечили получение надежных результатов. Статистическая обработка данных выполнена с применением современных методов биометрики, адекватных поставленным задачам. Итоги работы сомнений не вызывают, что позволяет говорить о высокой степени достоверности выводов.

Общая характеристика диссертации, её завершенность

Диссертация построена по традиционному плану и включает следующие разделы: введение, обзор литературы, материалы и методы исследования, результаты и обсуждение, заключение, выводы, практические рекомендации, список сокращений и список литературы. Работа изложена на 144 страницах, включая список литературы, содержит 24 рисунка и 18 таблиц. Список литературы содержит 238 источников, включая 33 работы, опубликованные в отечественных журналах.

Во введении убедительно обоснована необходимость и актуальность изучения вклада нейтрофинов в действие антидепрессантов, показана перспектива изучения низкомолекулярных миметиков нейротрофинов в решении проблемы фармакокинетических ограничений полноразмерных нейротрофинов, сформулированы цель и 6 задач исследования, решение которых полностью отражено в структуре работы, описаны научная новизна, теоретическая и практическая значимость работы, приведено 5 основных положений, выносимых на защиту, указаны научные мероприятия, на которых были представлены основные результаты исследования, отмечен личный вклад автора.

Обзор литературы занимает 36 страниц. В нем диссертант привел современные представления о клинической картине депрессий и рассмотрел основные гипотезы их патогенеза, включая моноаминовую, воспалительную и нейротрофиновую гипотезы. В соответствии с поставленной целью основное внимание в обзоре уделено нейротрофиновой гипотезе генеза депрессивных состояний. Автор подробно рассмотрел вклад нейро- и синаптической пластичности в эти процессы, описал структурные особенности мозгового нейротрофического фактора и фактора роста нервов и молекулярные основы их сигналинга, опосредованные активацией TrkA и TrkB-рецепторных каскадов. Этот раздел, на мой взгляд, ключевой для понимания механизмов действия выявленного в исследовании наиболее эффективного миметика 4-й петли BDNF ГСБ-106. Уделено внимание взаимосвязи ведущих гипотез генеза депрессий. Хорошо представлен большой раздел о современных лекарственных средствах терапии депрессий с характеристикой основных групп антидепрессантов и выделением перспективных

препаратов с немоноаминергическим типом действия, в том числе низкомолекулярных агонистов Trk-рецепторов. Все это логически подводит к необходимости изучения низкомолекулярных дипептидных миметиков нейротрофинов с различной картиной пострецепторного сигналинга как веществ с потенциальной антидепрессантоподобной активностью. Обзор достаточно полно отражает современное состояние затронутой проблемы и соответствует поставленным в работе задачам. Качество изложения и анализ материала свидетельствуют о серьезной научно-теоретической подготовке диссертанта.

В главе «Материалы и методы» приведена физико-химическая характеристика исследованных в работе миметиков нейротрофинов BDNF и NGF. Подробно описаны методы оценки поведения (тесты вынужденного плавания, предпочтения сахарозы, двигательной активности), использованные модели депрессивноподобного состояния, индуцированного стрессом социального поражения или введением индуктора воспаления липополисахарида, и метод проведения Вестерн-блот анализа. Это свидетельствует о широкой научно-квалификационной подготовке диссертанта.

Результаты исследования приводятся вместе с обсуждением после каждого раздела. Такое представление данных, а также приведение в четырех больших разделах 10 рисунков с дизайном этапов экспериментального исследования целесообразно для представления многоплановых данных. По результатам скринингового исследования при однократном и 5-дневном субхроническом введении мышам двух дипептидных миметиков NGF и трех миметиков BDNF в нескольких дозах в тесте вынужденного плавания была показана наибольшая эффективность миметика BDNF соединения ГСБ-106 как антидепрессанта. Выявлено действие этого соединения на модели социального стресса разной длительности при однократном и 21-дневном хроническом пероральном введении, а также при однократном введении на модели липополисахарид-индуцированного депрессивноподобного состояния. Очень интересен раздел диссертации, посвященный изучению возможных механизмов антидепрессантоподобного действия ГСБ-106 с использованием метода фармакологического ингибиторного анализа. В экспериментах с избирательным блокатором тропомиозинового тирозинкиназного рецептора (соединение K252A) и избирательным ингибитором фосфолипазы С гамма (соединение U73122) А.Г. Межлумяну удалось показать критическую роль активации TrkВ и PLC γ сигнального пути в антидепрессантоподобном действии ГСБ-106 и амитриптилина. В экспериментах с избирательным ингибитором фосфатидилинозитол-3-киназы (соединение LY294002) и с ингибитором сигнального пути митоген-активируемой протеинкиназы (соединение PD98059) была показана необходимость активации сигнальных путей PI3K/AKT и MAPK/ERK для реализации антидепрессантоподобного действия соединения ГСБ-106, но не для препарата сравнения антидепрессанта амитриптилина. Обсуждение проведено в полном соответствии с поставленными задачами и полученными результатами, для анализа данных привлечено достаточное количество данных современной научной литературы.

Выводы обоснованы, отражают основное содержание работы и соответствуют поставленным задачам. Практические рекомендации конкретны, лаконичны и подкреплены полученными в исследовании результатами.

Автореферат дает полное представление о структуре, объеме и содержании диссертационной работы, отражает положения диссертации и оформлен в соответствии с существующими требованиями.

Результаты исследования полно отражены в 5 статьях, опубликованных в рецензируемых журналах, рекомендованных ВАК Минобрнауки РФ, из них 3 статьи в отечественных журналах, которые индексируются в международных базах данных, 1 статья в зарубежном журнале с высоким импакт-фактором, 1 статья в отечественном журнале, который входит в Перечень рецензируемых научных изданий, в которых должны быть опубликованы основные научные результаты диссертаций на соискание ученой степени кандидата наук. Кроме того, А.Г. Межлумян является соавтором статьи в журнале, входящем в базу данных РИНЦ, и главы в коллективной монографии, изданной зарубежом. Совсем недавно, в феврале 2022 года, по материалам диссертации опубликована еще одна статья в зарубежном журнале с импакт-фактором более 5, в которой А.Г. Межлумян является первым автором. Результаты диссертационного исследования были представлены на профильной научной конференции и научном форуме, что нашло отражение в 4 опубликованных тезисах.

Замечания и вопросы по диссертации

Принципиальных возражений по диссертационному исследованию нет, однако в тексте встречаются опечатки и неточности.

При приведении результатов статистической обработки данных с помощью дисперсионного анализа не названы факторы, влияние которых оценивали, и не указаны их градации, результаты не приведены в общепринятой форме с указанием рассчитанного значения F и числа степеней свободы, не сказано, было ли взаимодействие факторов в случае двухфакторного дисперсионного анализа. При представлении результатов скрининга соединений не приведены данные об объемах выборок.

При ознакомлении с работой возникли следующие вопросы:

- 1) На модели депрессивно-подобного поведения, индуцированного ЛПС, ГСБ-106 устранял признаки ангедонии при однократном введении в дозе 0,5 мг/кг, но не в дозах 1,0 и 5,0 мг/кг. При этом на модели «поведенческого отчаяния» в тесте вынужденного плавания ГСБ-106 в условиях однократного введения был эффективен в дозах 0,1 и 1,0 мг/кг, а на модели 10-дневного социального стресса – в дозе 0,1 мг/кг. Почему, по мнению диссертанта, не были эффективны более высокие дозы ГСБ-106 на модели депрессивноподобного состояния, вызванного индуктором воспаления? Почему в одной и той же дозе 0,1 мг/кг ГСБ-106 был активен как при внутрибрюшинном, так и при пероральном введении, хотя для препаратов пептидной природы при переходе от внутрибрюшинного введения к пероральному доза увеличивается, как правило, на порядок?
- 2) Результаты исследования показывают, что при сформированном депрессивноподобном состоянии, индуцированном 28-дневным стрессом социального поражения, действие эффективного дипептидного миметика ГСБ-106 проявляется только в условиях хронического введения, что сближает его с эффектами классических трициклических антидепрессантов. Какие преимущества, на взгляд диссертанта, есть у дипептидных миметиков нейротрофинов на примере ГСБ-106 по сравнению с традиционными антидепрессантами?
- 3) Известно, что склонность к развитию депрессивных состояний зависит от пола. Накоплены многочисленные свидетельства половых различий в эффективности действия антидепрессантов. Есть ли какие-либо, возможно, предварительные данные

о различиях в эффектах действия дипептидных миметиков отдельных петель нейротрофинов у особей разного пола?

Сделанные замечания не влияют на общую положительную оценку диссертационного исследования.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Диссертационная работа Межлумяна Армена Гариковича «Исследование антидепрессивных свойств дипептидных миметиков нейротрофинов NGF и BDNF» является самостоятельной завершенной научно-квалификационной работой, содержащей решение актуальной научной задачи поиска новых эффективных антидепрессантов путем сравнительного изучения антидепрессантоподобных свойств дипептидных миметиков двух нейротрофинов – нейротрофического фактора мозгового происхождения и фактора роста нервов с выяснением роли TgkV-зависимых сигнальных путей в механизмах их действия, что имеет большое значение для фармакологии и клинической фармакологии. По актуальности темы, объему выполненных автором исследований, новизне полученных данных и их научно-практической значимости, опубликованным результатам диссертационная работа полностью соответствует требованиям п.п. 9-14 «Положения о присуждении ученых степеней», утвержденного постановлением Правительства РФ № 842 от 24.09.2013 г. в действующей редакции, предъявляемым к кандидатским диссертациям, а ее автор заслуживает присуждения ученой степени кандидата биологических наук по специальности 3.3.6 — фармакология, клиническая фармакология.

Официальный оппонент

Доктор биологических наук

Главный научный сотрудник лаборатории общей патологии нервной системы

Федерального государственного бюджетного научного учреждения

«Научно-исследовательский институт общей патологии и патофизиологии»

«23» марта 2022 г.

Крупина Наталия Александровна

Контактные данные: Тел.: +7(917)550-21-55 e-mail: krupina-na@yandex.ru

Адрес места работы: 125315, Москва, ул. Балтийская, 8

Тел. рабочий: +7 499 151-1756

e-mail рабочий: niiorp@mail.ru

Подпись д.б.н. Н.А. Крупиной заверяю

Директор

Федерального государственного бюджетного научного учреждения

«Научно-исследовательский институт общей патологии и патофизиологии»

член-корреспондент РАН, доктор медицинских наук, профессор



Морозов Сергей Георгиевич