

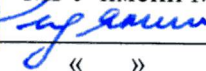
УТВЕРЖДАЮ

Проректор –

начальник Управления научной политики

и организации научных исследований

МГУ имени М.В. Ломоносова

 А.А. Федянин

« ___ » _____ 2014 г.



ОТЗЫВ ВЕДУЩЕЙ ОРГАНИЗАЦИИ

на диссертационную работу КУЛИКОВОЙ Елизаветы Александровны по теме: «Влияние психотропного препарата ТС-2153 на поведение и экспрессию генов серотониновой системы и нейротрофического фактора мозга мышей, генетически предрасположенных к нейропатологии», представленную на соискание ученой степени кандидата биологических наук по специальности 03.03.01 – физиология

Достаточно хорошо известно, что в клинике психических заболеваний человека разные формы депрессии по встречаемости занимают одно из первых мест. Совершенствование терапии этого заболевания (которое зависит не только от успехов психофармакологии, но и от уровня знаний о механизмах формирования этого заболевания) – одна из важнейших задач психиатрии. Накопленный к настоящему времени опыт лечения депрессий разных видов позволяет говорить о существовании многих сложных звеньев механизма развития этой болезни, которую невозможно изучить без использования экспериментов на животных. В исследовании патогенетических механизмов развития депрессии важная роль принадлежит не только поиску и апробации новых антидепрессантов, но и в выявлении характера их влияния на нервную ткань.

Ключевой проблемой при исследовании механизма действия известных и поиска новых антидепрессантов является выбор адекватной экспериментальной модели и, в частности, генетической модели заболевания, поскольку генетические факторы составляют от 40 до 70% риска появления депрессии..

Диссертационная работа Е.А. Куликовой посвящена исследованию эффектов нового психотропного препарата ТС-2153 (8-(трифторметил)-1,2,3,4,5-бензопентатиепина-6-амин гидрохлорида, молекула которого содержит

пятичленное кольцо атомов серы) на поведение и экспрессию ряда генов у мышей уникальных модельных линий, созданных в ИЦтГ СОРАН за последние годы. У этого препарата, синтезированного в Новосибирском Институте Органической Химии СО РАН, анксиолитические и противосудорожные эффекты были уже описаны ранее. Однако было очевидно, что психотропные свойства этого соединения этими эффектами не ограничиваются.

Актуальность работы. В связи с этим можно говорить об *актуальности* данной диссертации, поскольку получение широкой характеристики психотропных свойств этого вещества (синтетического аналога варацина, средства, используемого в ряде традиционных медицинских школ) позволит и уточнить спектр его действия, и оценить его эффективность в сравнении с другими лекарственными средствами этой категории, а также выявить его влияние на определенные нейрогенетические системы мозга.

Связь темы работы с планами в области цитологии и генетики. Эта работа связана с основной тематикой Института цитологии и генетики СО РАН.

Новизна работы. Поскольку синтетический препарат, как биологически активный агент, ТС-2153 еще относительно малоизвестен, проведенные Е.А. Куликовой исследования характеризуются *новизной*. Новым в проведенной работе является и тестирование эффективности этого препарата в батарее тестов на поведение, и исследование его влияния на продукцию BDNF, и использование в работе уникальных линий мышей, проявляющих генетически детерминированные патологические особенности работы мозга. В работе Е.А. Куликовой для характеристики действия выбранного для анализа препарата была использована группа генетических моделей, сходного типа, что также является принципиально *новым подходом* в оценке свойств психотропного препарата.

Практическая значимость. Исследование особенностей поведения лабораторных животных, которые выбраны в качестве модели для анализа проявления того или иного патологического процесса и патологических

проявлений в поведении - это наиболее надежный путь анализа механизмов подобных патологий. Именно этот подход, выбранный в диссертационной работе Е.А. Куликовой, является залогом большой *практической важности* ее работы. Полученные данные лягут в основу более широких исследований механизма действия этого нового препарата, что будет способствовать разработке новых методов лечения психических болезней человека, в частности – депрессии и, возможно, каталептических проявлений. Теоретическое значение работы Е.А. Куликовой заключается в том, что ею получены данные не только об изменениях в поведении, которые происходят под действием ТС-2153, но и о реакции серотониновой системы мозга, а также об изменениях в продукции важнейшего участника регуляторных процессов в ЦНС – BDNF. Такой подход чрезвычайно перспективен, поскольку такие данные позволяют более детально анализировать механизмы действия изучаемого препарата, не ограничиваясь сопоставлением его эффекта с эффектами лекарственных агентов, известных ранее (хотя важность и такого подхода показана в работе).

Целью диссертационного исследования Е.А. Куликовой было, как упоминалось выше, оценка эффектов препарата ТС-2153 (8-(трифторметил)-1,2,3,4,5-бензопентатиэпина-6-амин гидрохлорида) на поведение мышей с предрасположенностью к каталепсии, а также на серотониновую систему мозга (экспрессия ряда генов) и на уровень нейротрофического фактора BDNF. Более конкретно – автору необходимо было выявить - существуют ли у этого препарата эффекты, которые можно было бы описать как снижение выраженности депрессии. Для достижения этой цели были сформулированы несколько конкретных задач. Диссертанту было необходимо исследовать влияние препарата ТС-2153 на поведение мышей в ряде стандартных лабораторных тестов (для выявления возможных изменений в двигательной активности, исследовательском поведении, в уровне тревожности и в проявлении каталепсии). Оценить потенциальные возможности этого препарата для коррекции отклонений в поведении мышей

линий с генетически детерминированной патологией, сравнить эффекты ТС-2153 с веществами, имеющими установленный характер эффектов (антидепрессантами), оценить изменяется ли экспрессия генов основных белков серотонинергической системы, а также провести оценку размеров мозга и его отделов *in vivo* у мышей «каталептических» линий. Важной и перспективной для возможных дальнейших исследований была также задача изучить влияние ТС-2153 на уровень мРНК гена нейротрофического фактора мозга BDNF и гена транскрипционного фактора CREB, который регулирует эффекты BDNF.

Работа Е.А. Куликовой изложена на 82 страницах, включает в себя 16 рисунков, 6 таблиц и список использованной литературы (226 источников). Она построена в соответствии с традиционным планом и включает разделы: введение, обзор литературы, материалы и методы, результат, обсуждение, а также выводы.

В обзоре литературы автор кратко описывает участие серотонинергической системы мозга в развитии депрессии, а также роль одного из наиболее хорошо исследованных нейротрофинов BDNF в процессах развития депрессии.

Очевидно, что существует огромная литература по клинике депрессий. Хорошо ориентируясь в этой литературе, автор кратко и четко излагает основы классификации депрессий человека, после чего переходит к описанию существующих экспериментальных моделей ряда психических заболеваний. Требования, которые были сформулированы для оценки адекватности той или иной экспериментальной модели описаны очень четко и могут служить образцом лаконичного описания столь сложного и разнообразного материала.

Поскольку депрессия человека характеризуется большим разнообразием синдромов, свидетельствующих о гетерогенности этого заболевания, то очевидно предположить, что нельзя предложить какую-то общую, универсальную лабораторную модель этого заболевания. В обзоре литературы автор показывает это очень квалифицированно.

Участие системы мозгового серотонина в развитии психопатологии человека – проблема не новая и тоже насчитывает огромное число литературных источников. Описать ее лаконично, не упустив ни известных основных фактов, ни новых, недавно полученных данных, также было, по-видимому, непросто, и автор с этим успешно справилась. То же самое относится и к общей картине, связанной с разными аспектами роли BDNF в мозге и модуляции его экспрессии.

В разделе обзора под названием «Объединение гипотез» автор четко показывает, что данные по участию систем мозгового серотонина и нейротрофина BDNF в формировании картины депрессии не находятся в противоречии, а описывают эту сложную картину, дополняя друг друга. Эта общая оценка четко демонстрирует необходимость поиска новых фармакологических препаратов, у которых можно было бы выявить влияние и на серотонинергическую систему, и на систему продукции и/или регуляции BDNF. Поскольку препарат ТС-2153, по всей видимости, может быть именно таким фармакологическим агентом, следующий раздел обзора посвящен описанию свойств бензопентатиепинов, как относительно новой группы биологически активных соединений.

К положительным чертам обзора литературы следует отнести понимание автором сложности процессов, которые необходимо было моделировать в работе, а также хорошее знание нейрохимических и молекулярно-биологических данных по мышам тех линий, которые она выбрала для оценки эффектов нового препарата. Подробная характеристика этих линий и истории их создания также представлены в работе.

Можно, однако, сделать замечание по содержанию обзора литературы. Видимо в попытках дать сжатое и четкое изложение известных и важных для работы сведений, автор практически не уделила внимания роли других нейротрансмиттерных систем мозга в генезе тревожности, депрессии и каталепсии. Введение такого небольшого, что «информирующего» раздела сделало бы обзор более насыщенным.

Использованные в работе лабораторные модели и использованные методы описаны в соответствующем разделе диссертации четко и достаточно подробно. Это были методы оценки изменений в поведении (тесты «открытое поле», «принудительное плавание» и приподнятый крестообразный лабиринт), методы оценки различий в экспрессии генов и метод МРТ, который был использован для проведения уникального эксперимента по определению размеров мозга и его отделов у мышей трех линий, которые служили объектами исследования в диссертационной работе.

В разделе «Результаты», который, в свою очередь подразделен на целый ряд параграфов, первыми описаны данные по МРТ определению размеров мозга (и его отделов) у мышей «каталептических» линий и контрольной линии АКР. Эти данные по морфологии мозга не только выявили отличия по размеру отделов мозга у этих мышей, но и показали перспективность подобных измерений. Обнаружено, что размер гипофиза мышей каталептических линий (ASC, CBA и M76C) был достоверно меньше, чем у мышей некаталептической линии АКР, что должно заставить обратить внимание исследователей на нейроэндокринный статус мышей с генетической предрасположенностью к каталепсии. Эти данные, несомненно, нуждаются в подтверждении и углублении с использованием традиционной морфометрии и оценке состава нейронов в этих структурах по их нейрохимическим категориям.

Влияние ТС-2153 на поведение выявляли по показателям ряда упоминавшихся выше тестов в 4 сериях экспериментов (проведенных с использованием разных доз препарата). ТС-2153 дозозависимо снижал и время пребывания в состоянии каталепсии, и долю животных, обнаруживавших это состояние. Эти данные были получены на мышах линии ASC, которая оказалась наиболее перспективной в оценке эффектов этого соединения. Было также показано, что однократное введение ТС-2153 в дозе 10 мг/кг достоверно уменьшало время неподвижности мышей ASC в тесте Порсолта, т.е. этот препарат обнаружил антидепрессантный

эффект. В то же время ТС-2153 не измен, а острое введение большой дозы препарата позволило выявить его анксиогенный эффект (по снижению времени пребывания мыши в центре арены). В то же время хроническое введение ТС-2553 не повлияло на показатели тревожности в тесте приподнятого крестообразного лабиринта.

Интересные результаты дало подробное сопоставление эффектов ТС-2153 и «коммерческих» антидепрессантов при их остром введении. Во-первых, было обнаружено влияние генотипа на чувствительность к этим веществам, причем наиболее высокой чувствительностью к таким воздействиям оказалась конгенная линия M76C. Эти данные представлены в работе четко и показывают различия в эффектах в зависимости от генотипа. Показано, например, что ТС-2153 усилил двигательную активность и снизил проявления тревожности в тесте ПКЛ у контрольной линии AKR, у которой не обнаруживаются аномальных проявлений тревожности, депрессии и каталепсии. Важно отметить, что такое единовременное сравнение эффектов группы препаратов позволило четко удостовериться в том, что у ТС-2153, в отличие от «классических» антидепрессантов, не выявлялось подавления локомоции и исследовательской активности, что является чрезвычайно интересным и важным в практическом отношении наблюдением.

Поскольку классические антидепрессанты влияют либо на уровень активности ферментов деградации серотонина, либо на интенсивность его обратного захвата, следующим логически необходимым этапом работы был анализ его возможного механизма действия на этом уровне.

Участие серотониновой системы мозга в механизме действия препарата ТС-2153 было проанализировано путем оценки возможных изменений в экспрессии генов, кодирующих ключевые белки этой системы. При этом был выявлен важный факт - экспрессия гена триптофангидроксилазы-2 (ключевого фермента синтеза серотонина) в среднем мозге мыши при введении ТС-2153 (10 мг/кг) не

изменяется. В то же время хроническое введение ТС-2153 снизило экспрессию в среднем мозге (но не в новой коре и гиппокампе) гена *Htr1a* (5-HT_{1A}-рецептор). Не изменилась от этого воздействия и экспрессия в среднем мозге *Maoa* (ген моноаминоксидазы А) и *Slc6a4* (5-HT-транспортера). Этот факт важен, поскольку именно в среднем мозге (ядра шва) расположены тела серотониновых нейронов.

Хроническое введение ТС-2153 (10 мг/кг) привело к увеличению экспрессии гена *Bdnf* в гиппокампе, но не во фронтальной коре и среднем мозге, а экспрессия одного из транскрипционных факторов CREB, который может участвовать в регуляции экспрессии этого нейротрофина – не изменилась. Эти новые данные свидетельствуют и о сложности процессов передачи сигналов в серотониновой системе, и о существовании связи между системой регуляции уровня серотонина и BDNF. К сожалению, ни в тексте этих разделов диссертации, ни в подписях к рисункам не указано, мыши каких генотипов были использованы в этих экспериментах.

Оценивая результаты работы в целом, следует отметить, что автор продемонстрировала отличия в размерах гипофиза (а также некоторых других структур мозга) у мышей «каталептических» линий. На линии ASC показан четко выраженный антикаталептический и антидепрессантный эффект препарата ТС-2153 при его остром введении. Антидепрессантный эффект этого вещества продемонстрирован и в условиях его хронического введения на мышах линий AKR, CBA и D13Mit76. Мыши одной из линий, исследованных автором, конгенной линии AKR.CBA-D13Mit76, обнаружили повышенную чувствительность к действию антидепрессантов (и к ТС-2153 в том числе). Эффекты этого препарата проявляются в условиях отсутствия изменений в общем уровне локомоции, исследовательской активности и тревожности. Как упоминалось выше, ТС-2153 снижал в среднем мозге экспрессию 2 из 4 исследованных генов серотониновой системы, и повышал экспрессию BDNF в гиппокампе.

Обсуждение полученных данных хорошо аргументировано и написано квалифицированно. Оно показывает, что автор владеет материалом, хорошо ориентируется в литературе по этим вопросам и обнаруживает общую научную эрудицию.

Полученные Е.А. Куликовой данные могут и должны быть использованы в исследованиях, связанных с оценкой антидепрессантов на генетических и иных моделях депрессии, их следует учитывать при подготовке к дальнейшим испытаниям эффектов ТС-2153, при фармакологическом исследовании механизмов поведения, которые проводятся в коллективах Научных учреждений РАН и РАМН, специализирующихся в области нейробиологии и нейрогенетики, в Московском, Санкт-Петербургском, Нижегородском и др. государственных университетах. Эти данные следует также использовать в лекционных курсах по генетике поведения и нейрогенетике, которые читают студентам не только Новосибирского, но и Московского, Санкт-Петербургского и др. университетов, а также студентам медицинских специальностей.

Результаты данной работы имеют, несомненно, важное значение для понимания роли сопряжения систем секреции нейротрофинов и системы мозгового серотонина, поскольку они достаточно убедительно демонстрируют влияние ТС-2153 на признаки поведения, реализация которых связана со стволовыми структурами мозга, а также с предрасположенностью к «депрессии» и каталепсии. Очевидно, что подобные экспериментальные данные могут помочь в понимании особенностей развития аномалий эмоциональной сферы у человека. Это лишний раз иллюстрирует практическую важность работы Е.А. Куликовой.

Кроме того, четкие данные о существовании антидепрессантного и антикаталептического эффектов ТС-2153 и о его влиянии на экспрессию BDNF могут быть важны для планирования фармакологических экспериментов, в которых используются биологически активные вещества, влияющие на серотонинергическую систему. Иными словами, полученные в диссертации данные могут служить научным

обоснованием выбора объектов исследования в ряде нейробиологических исследований.

Выводы диссертации четко отражают основные результаты, полученные в диссертации.

Несмотря на относительно небольшой объем диссертации число литературных источников, использованных в обзоре литературы и в обсуждении, достаточно велико.

Сказанное позволяет говорить о работе Е.А. Куликовой как о полноценном научном исследовании.

Разумеется, в диссертации имеются и недостатки, о части которых уже упоминалось по ходу ее анализа. Замечанием к экспериментальной части работы может быть следующее. За 2 дня до опытов с поведением животных отсаживали в отдельные клетки, чтобы исключить влияние «группового стресса» на поведение. Во-первых в современном научном языке в области поведения животных нет термина «групповой стресс». Во-вторых, отсаживание мыши из клетки, в которой она содержалась в группе с другими мышами и была адаптирована к жизни в группе, напротив, вызывает у этих животных, как представителей четко «социального» вида состояние дискомфорта, тогда как пребывание в домашней клетке со знакомыми животными позволяет говорить о стабильном состоянии «социальной» сферы его поведения. Очевидно, что такой дискомфорт (видимо не очень интенсивный, поскольку он длился всего 2 дня) мог несколько повлиять на результаты экспериментов. В то же время очевидно, что учет подобного фактора - это элемент поддержания биологически адекватного состояния животного. К недостаткам работы следует отнести также отсутствие упоминания о составе групп, у которых проводили определение экспрессии генов после введения ТС-2153. В тексте имеются явно неудачные в стилистическом отношении выражения, такие как например, «локус, кодирующий 20% наследственной изменчивости по предрасположенности к каталепсии» (локус не может кодировать изменчивость), «депрессивно больные», «депрессивноподобная линия мышей» и ряд других. Разумеется, указанные замечания

не снижают важности и ценности полученных результатов, представленных в диссертационной работе Е.А. Куликовой, и не могут повлиять на ее высокую оценку.

Все сказанное позволяет заключить, что диссертационную работу Е.А. Куликовой следует квалифицировать как современное исследование, в котором содержатся оригинальные экспериментальные данные, эти данные являются новыми, а их значение и актуально, и важно в научно-практическом отношении. Автореферат соответствует содержанию диссертации.

Диссертационная работа на тему: «Влияние психотропного препарата ТС-2153 на поведение и экспрессию генов серотониновой системы и нейротрофического фактора мозга мышей, генетически предрасположенных к нейропатологии», соответствует всем требованиям ВАК предъявляемым к кандидатским диссертациям, в частности, соответствует п. 9 «О порядке присуждения ученых степеней» постановления Правительства Российской Федерации от 24 сентября 2013 г № 842, а её автор, Е.А. Куликова, заслуживает присуждения учёной степени кандидата биологических наук по специальности 03.03.01 –, физиология

Отзыв утвержден на заседании кафедры высшей нервной деятельности 18 ноября 2014 г протокол № 9.

Ведущий научный сотрудник кафедры высшей нервной деятельности, доктор биологических наук, звание – старший научный сотрудник

Полетаева И.И.

Ученый секретарь кафедры, ведущий научный сотрудник, доктор биологических наук, профессор

Данилова Р.А.

И.о. зав. кафедрой высшей нервной деятельности биологического ф-та МГУ, профессор



Латанов А.В.

ПОДПИСЬ РУКИ
ЗАВЕРЯЮ

Полетаевой И.И., Даниловой Р.А., Латанова А.В.

Документовед биологического факультета МГУ