

ОТЗЫВ

официального оппонента профессора, доктора фармацевтических наук
(3.4.2. Фармацевтическая химия, фармакогнозия; 3.3.6 Фармакология, клиническая
фармакология)

Калениковой Елены Игоревны о диссертации Григоревских Екатерины Михайловны на тему: «Экспериментальное изучение нейropsychотропных свойств низкомолекулярных миметиков мозгового нейротрофического фактора», представленной на соискание ученой степени кандидата фармацевтических наук по специальности 3.3.6 Фармакология, клиническая фармакология и 3.4.2. Фармацевтическая химия, фармакогнозия

Актуальность темы диссертационного исследования

В 2006 году Duman R. et al., обобщив представления о функциональной роли нейротрофических факторов в нейрогенезе, предложил нейротрофическую теорию развития тревоги и депрессии, согласно которой эмоциональные расстройства могут быть вызваны аномальной адаптацией нейрональных сетей к изменениям во внешней среде, при этом нейротрофические факторы, включая мозговой нейротрофический фактор (BDNF), могут непосредственно участвовать в возникновении тревоги. При рассмотрении взаимосвязи между нарушением функции BDNF в гиппокампе и повышенной восприимчивостью к эмоционально-стрессовой реакции была выдвинута гипотеза, в соответствии с которой снижение BDNF вызывает нарушение ГАМК-ергической нейропластичности, а введение экзогенного BDNF может препятствовать формированию тревожного поведения, в том числе, обусловленного процессом естественного старения. С другой стороны, изменение потребления алкоголя в условиях повышенной и пониженной экспрессии гена BDNF выявило роль нейротрофина в формировании алкогольной мотивации. Сегодня есть основание полагать, что устойчивость нарушенной BDNF-сигнализации может быть причиной ригидности аддиктивного поведения, то есть продолжительный неограниченный доступ к алкоголю предполагает возможную потерю защитного механизма, а отсутствие индуцированной алкоголем экспрессии

BDNF в стриатуме наряду со снижением BDNF в коре и гиппокампе способствуют усилению алкогольной мотивации.

Несмотря на большое количество доклинических исследований, показавших высокую эффективность BDNF при центральном введении на моделях психических заболеваний, его терапевтическое применение у человека до сих пор не увенчалось успехом из-за фармакокинетических ограничений, таких как плохая проницаемость через гематоэнцефалический барьер (ГЭБ) и малое время жизни в кровотоке. Очевидно, что создание оригинального анксиолитика на основе BDNF, лишённого аддиктивного потенциала и способного ослаблять сформированную алкогольную мотивацию, позволит повысить эффективность и безопасность фармакотерапии тревожных расстройств, в том числе коморбидных с алкогольной зависимостью. Принимая во внимание вышеизложенное, актуальность диссертационной работы Е.М. Григоревских не вызывает сомнений.

Новизна исследования и полученных результатов

Опираясь на оригинальную гипотезу о взаимодействии нейротрофинов с тирозинкиназными Trk-рецепторами посредством экспонированных участков их петлеобразных структур, связанных с реализацией определенных биологических эффектов, были сконструированы и синтезированы низкомолекулярные миметики отдельных петель BDNF, которые в опытах *in vitro* показали взаимодействие с TrkB-рецепторами и выраженные нейропротективные свойства.

В рамках диссертационного исследования при изучении фармакологической активности дипептидных миметиков 1-й, 2-й и 4-й петель BDNF, во-первых, впервые выявлена анксиолитическая активность миметика 2-й петли гексаметилендиамид бис-(-N-гексаноил-L-серил-L-лизина) (соединение ГТС-201) и 4-й петли (соединение ГСБ-106) BDNF в опытах *in vivo*; во-вторых, на двух видах животных (мыши и крысы) с учетом возрастных и половых отличий доказаны противотревожные свойства ГТС-201 в стандартном тесте для оценки тревожного поведения у грызунов; в третьих, с помощью фармакологических анализаторов и метаболомного анализа получены приоритетные данные о возможной причине анксиолитического действия ГТС-201; в-четвертых, экспериментально доказана

фармакологическая безопасность ГТС-201 при его совместном применении с этанолом; в-пятых, впервые показана способность ГТС-201 ослаблять сформированную алкогольную мотивацию у самок крыс при остром и субхроническом системном введении; в-шестых, впервые разработаны и валидированы методики количественного определения ГТС-201 и эндогенных метаболитов в образцах крови и головного мозга крыс, позволившие доказать способность миметика BDNF при парентеральном введении проникать через ГЭБ и накапливаться в тканях мозга.

Научно-практическая значимость полученных результатов

Разработка эффективных и безопасных анксиолитиков с новым механизмом действия, ориентированная на последующее внедрение в клиническую и наркологическую практику, представляет собой социально значимый проект и входит в число ключевых направлений научно-технического развития.

Результаты настоящего исследования, посвященного изучению нейрорепродуктивных свойств и фармакологической безопасности оригинальных низкомолекулярных миметиков BDNF, расширяют понимание роли BDNF в регуляции эмоционально-тревожных состояний, что имеет приоритетное значение для фундаментальных исследований патогенеза тревожных расстройств и нарушений алкогольного поведения. Разработанные и валидированные методы количественного определения ГТС-201 в биологических образцах головного мозга и плазмы крови крыс с использованием ВЭЖХ-МС/МС могут быть использованы для мониторинга эффективности и безопасности новых дипептидных соединений в доклинических испытаниях.

Исследование, выполненное Е.М. Григоревских, позволяет квалифицировать полученные экспериментальные данные как важные для теоретической и прикладной медицины, вносящие существенный вклад в решение актуальной задачи по разработке эффективного и безопасного дипептидного анксиолитика на основе низкомолекулярных миметиков BDNF.

Обоснованность и достоверность основных положений, результатов и выводов диссертации

Сформулированные автором положения, выносимые на защиту, аргументированы результатами проведенной научной работы, что отражено в корректных и логичных выводах, а также практических рекомендациях, которые направлены на достижение поставленной цели – экспериментальное изучение нейропсихотропных свойств низкомолекулярных миметиков BDNF.

Результаты диссертационного исследования внедрены в учебный процесс кафедры фармакологии Института фармации имени А.П. Нелюбина ФГАОУ ВО Первый МГМУ имени И.М. Сеченова (Сеченовский Университет) и используются при изучении дисциплин: «Фармакология», «Основы доклинических исследований», «Фармацевтическое информирование», «Методы экспериментального изучения молекулярных основ действия лекарственных средств».

Степень достоверности и надежность результатов обеспечивается достаточным количеством биологических и технических повторов, а также выбором адекватных методов статистического анализа.

Оценка содержания диссертации

Диссертационная работа Е.М. Григоревских написана в классическом стиле, состоит из введения, обзора литературы, описания материалов и методов исследования, экспериментальной части, включающей 3 главы собственных исследований, обсуждения полученных результатов и заключения, выводов, списка использованной литературы, состоящего из 219 источников, 6 приложений. Работа изложена на 187 страницах машинописного текста, иллюстрирована 28 рисунками и 18 таблицами.

В общем заключении отражены наиболее важные теоретические и практические результаты диссертации. Представленный материал отличается четкостью, ясностью и последовательностью изложения.

Введение диссертации ясно формулирует значимость выбранной темы, исходя из которой определены цель и семь исследовательских задач, которые согласуются с общей целью и способствуют её достижению.

Первая глава работы представляет собой обзор научной литературы, подготовленный автором на основе отечественных и зарубежных публикаций. Обзор посвящен краткому описанию мозгового нейротрофического фактора, его рецепторам и сигнальным путям, участвующим в реализации основных эффектов, включая современные представления о роли нейротрофина в формировании тревожной реакции и аддиктивного поведения. Основное внимание уделено низкомолекулярным миметикам BDNF как потенциальным регуляторам/модуляторам нейropsychотропных функций и изучению их фармакологических особенностей.

Во второй главе подробно описываются материалы и методы научной работы, представлена информация об экспериментальных животных, используемых реактивах и оборудовании. Все методы и дизайн исследования являются современными и отвечают поставленной цели и задачам исследования. Количество животных в экспериментальных группах достаточно для статистической обработки материала.

Третья глава посвящена оценке анксиолитических и антиаддиктивных свойств дипептидных миметиков мозгового нейротрофического фактора, а также фармакологической безопасности соединения-лидера. При изучении анксиолитического действия показано, что пептидные миметики 1-й, 2-й и 4-й петель BDNF, которые по-разному активируют пострецепторные сигнальные пути после взаимодействия с TrkB-рецептором в опытах *in vitro*, при внутрибрюшинном введении неодинаково влияют на поведение мышей CD-1 в тесте «приподнятый крестообразный лабиринт» (ПКЛ), что позволило расположить миметики BDNF по выраженности противотревожной активности в следующей последовательности: ГСБ-106 > ГТС-201 > ГСБ-214. Дальнейшее изучение противотревожных свойств ГТС-201, который, в отличие от ГСБ-106, активирует только MAPK/ERK и PLC γ сигнальные пути при взаимодействии с TrkB-рецептором и лишен антидепрессивной активности, показало, что у мышей-самцов линии BALB/c с генетически детерминированной повышенной тревожной реакцией ГТС-201 в

диапазоне доз 0,5–2 мг/кг вызывал выраженное анксиолитическое действие с максимально эффективной дозой 1 мг/кг, уступая по эффективности диазепаму в дозе 2 мг/кг. Анксиолитическое действие ГТС-201 было доказано на другом виде животных: у беспородных белых крыс (самок и самцов) ГТС-201 в дозе 5 мг/кг при однократном введении увеличивал время пребывания в открытых рукавах ПКЛ, что свидетельствует о снижении эмоционально-стрессовой реакции. Важно отметить, что в диапазоне эффективных доз миметики BDNF не оказывали миорелаксирующего действия, что является несомненным преимуществом по сравнению с препаратами бензодиазепинового ряда.

Учитывая высокую коморбидность эмоционально-стрессовых расстройств с повышенным влечением к алкоголю, изучение у одних и тех же миметиков BDNF анксиолитических и антиаддиктивных свойств представляется крайне важным. У крыс со сформированной алкогольной зависимостью в условиях добровольного потребления 10% раствора этанола только миметик 2-й петли BDNF ГТС-201 в анксиолитической дозе 5 мг/кг при остром парентеральном введении снижал у самок потребление этанола после алкогольной депривации, по выраженности эффекта не уступая налоксону. Впервые экспериментально доказано, что ГТС-201 при субхроническом введении в эффективной дозе сокращал количество потребляемого этанола и предпочтение к нему только у алкоголизированных самок, но не у самцов крыс. Опираясь на полученные данные, высказывается предположение о зависимой от пола способности ГТС-201 снижать подкрепляющее действие этанола у крыс.

Поскольку показатели распространенности потенциальных лекарственных взаимодействий варьируют от 5% до 91%, сегодня они рассматриваются как ключевая причина возникновения нежелательных побочных реакций на фармакологические средства. В связи с этим вполне обосновано одна из задач исследования была сформулирована как оценка возможных побочных эффектов соединения-лидера, включая лекарственное взаимодействие с этанолом. Согласно полученным экспериментальным данным, ГСБ-201 лишен психостимулирующего компонента в спектре фармакологической активности и синергизма с этанолом.

В четвёртой главе представлены результаты фармакокинетических исследований миметика 2-й петли BDNF. Разработанная и валидированная методика позволяет надежно определять концентрации ГТС-201 с высокой точностью и

стабильностью. Фармакокинетические показатели ГТС-201 были рассчитаны в образцах крови и головного мозга крыс после однократного внутрибрюшинного введения в дозе 5 мг/кг. Показано, что ГТС-201 характеризуется быстрым всасыванием и относительно быстрым выведением из плазмы крови, с одновременным проникновением и длительным удерживанием в ткани мозга крыс после в/б введения, что подтверждают способность вещества эффективно проникать через ГЭБ и достигать центральной нервной системы после однократного системного введения.

В пятой главе описаны результаты исследования возможного механизма анксиолитического действия ГТС-201 в опытах *in vivo* с помощью ингибиторного анализа и в опытах *ex vivo* с помощью метаболомного анализа, позволяющего измерять содержание нейромедиаторов и их метаболитов в головном мозге и плазме крови у крыс. Установлено, что после однократного введения ГТС-201 в эффективной дозе 5 мг/кг у интактных крыс наблюдается статистически значимое повышение концентрации серотонина и дофамина в головном мозге, а также снижение уровня кортизола в плазме крови, что позволяет предположить роль модулирующего действия ГТС-201 в отношении дофаминергической и серотонинергической систем в реализации его анксиолитических эффектов.

В заключении приведено обобщение основных результатов выполненного исследования, которое согласуется с целями и задачами работы и определяет перспективы дальнейших научных исследований среди дипептидных миметиков BDNF с учетом половых и возрастных различий в реализации основных фармакологических эффектов.

Формулировки выводов ясные и последовательные, они естественным образом следуют из ключевых теоретических положений автора, отвечают целям и задачам проведенного исследования. Диссертационная работа изложена ясным и грамотным языком. Ее главы последовательно связаны между собой и удачно дополнены наглядными иллюстрациями – графиками и таблицами, облегчающими понимание материала. При статистическом анализе использован комплексный подход. Исследование характеризуется целостностью и законченностью. Автореферат отражает содержание диссертационной работы и раскрывает ее основные положения.

Полнота изложения основных результатов диссертационной работы в научной печати

По теме диссертации опубликовано 12 печатных работ, отражающих основные результаты и подтверждающих достаточный научный уровень проведенного исследования, в том числе 1 научная статья в журнале, включенном в Перечень рецензируемых научных изданий Сеченовского Университета / Перечень ВАК при Минобрнауки России, в которых должны быть опубликованы основные научные результаты диссертаций на соискание ученой степени кандидата наук, 4 научные статьи в изданиях, индексируемых в международной базе Scopus, 1 патент РФ, 5 публикаций в сборниках материалов всероссийских научных конференций.

Соответствие диссертации паспорту специальности

Диссертационная работа «Экспериментальное изучение нейрорепродуктивных свойств низкомолекулярных миметиков мозгового нейротрофического фактора» соответствует паспортам научных специальностей 3.3.6. Фармакология, клиническая фармакология (п. 1, 3, 5, 6) и 3.4.2. Фармацевтическая химия, фармакогнозия (п. 1, 4).

Соответствие содержания автореферата основным положениям диссертации

Автореферат подготовлен согласно стандартам оформления и общепринятой форме, исчерпывающе раскрывает ключевые аспекты проведенного исследования, согласуется с содержанием, идеями основной части диссертации и выводами.

Принципиальных критических замечаний к работе нет. Отдельные замечания и вопросы, возникшие при ознакомлении с диссертацией и не снижающие ее научной и практической ценности, носят дискуссионный характер.

1. В обзоре литературы соискатель описывает рецепторы и сигнальные пути BDNF, реализуемые через TrkB-рецептор и низкоаффинный p75NTR, не освещая другие его лиганд-рецепторные взаимодействия. Так, например,

- воздействием BDNF GABA_A-рецепторы фосфорилируются по $\beta 3$ субъединице, что ведет к снижению ингибиторной синаптической передачи. Эти данные могут позволить предположить возможные механизмы реализации эффектов миметиков BDNF на уровень моноаминов в головном мозге. Так, в 2025 году определен подтип GABA-рецепторов, а именно GABA- ρ рецепторы, отвечающие за подъем уровня внеклеточного допамина, индуцированный этанолом (David Cadaddu et al., 2025).
2. На основе каких данных оценку анксиолитической активности миметиков BDNF в приподнятом крестообразном лабиринте проводили через 30 и 60 мин после их введения?
 3. На рисунке 3.4 данные о времени пребывания в открытом рукаве приподнятого крестообразного лабиринта и влиянии на него ГТС-201 для самок и самцов противоположны приведенным в тексте. Возможно, перепутаны подписи на рисунке.
 4. На рис. 3.4, 3.9, 3.10 и 3.16 представлена (или изложена в тексте для рис. 3.4) достоверность различий по абсолютной величине эффекта ГТС-201 и ГСБ-106 между опытными группами (различные дозы, самцы и самки), каждая из которых имеет свою контрольную группу. При таком дизайне исследования можно лишь выявить наличие эффекта, сравнение между группами проводить некорректно, т.к. не было единой контрольной группы.
 5. Встречаются отдельные помарки и неточности, например, на стр. 52 «13 мм» вместо «13 мМ», на стр. 73 ошибка в комментарии рис. 3.1.

Заключение

Таким образом, диссертационная работа Григоревских Екатерины Михайловны на тему «Экспериментальное изучение нейropsychотропных свойств низкомолекулярных миметиков мозгового нейротрофического фактора» на соискание ученой степени кандидата фармацевтических наук является завершенной научно-квалификационной работой, в которой содержится решение актуальной научной задачи, имеющей большое значение для фармакологии и фармацевтической химии.

Диссертационная работа не содержит недостоверных сведений об опубликованных работах и полностью соответствует требованиям п. 16 «Положения о присуждении ученых степеней в федеральном государственном автономном образовательном учреждении высшего образования Первый Московский государственный медицинский университет имени И.М. Сеченова Министерства здравоохранения Российской Федерации (Сеченовский Университет)» утвержденным приказом ректора от 06.06.2022 г. №0692/Р (с изменениями, утвержденными приказом ректора №1179 от 29.08.2023 г., приказом Сеченовского Университета №0787/Р от 24.05.2024 г.), предъявляемым к кандидатским диссертациям, а ее автор, Григорьевских Е. М. заслуживает присуждения ученой степени кандидата фармацевтических наук по специальностям 3.3.6. Фармакология, клиническая фармакология и 3.4.2. Фармацевтическая химия, фармакогнозия.

Официальный оппонент

Доктор фармацевтических наук (шифр специальности 3.4.2. Фармацевтическая химия, фармакогнозия; 3.3.6 Фармакология, клиническая фармакология) профессор, зав. кафедрой фармацевтической химии и организации фармацевтического дела Медицинского научно-образовательного института ФГБОУ ВО Московский государственный университет имени М.В. Ломоносова

Елена Игоревна Каленикова

03.12.2025г.

Подпись д.ф.н., профессора Е.И. Калениковой подтверждаю:

Декан факультета фундаментальной медицины ФГБОУ ВО Московский государственный университет имени М.В. Ломоносова, академик




Всеволод Арсеньевич Ткачук

Федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение высшего образования «Московский государственный университет имени М.В. Ломоносова»
119991, Российская Федерация, Москва, Ленинские горы, д. 1,
Телефон: +7 (495) 939-10-00
E-mail: info@rector.msu.ru