

МИНИСТЕРСТВО НАУКИ И ВЫСШЕГО ОБРАЗОВАНИЯ
РОССИЙСКОЙ ФЕДЕРАЦИИ

ФЕДЕРАЛЬНОЕ ГОСУДАРСТВЕННОЕ БЮДЖЕТНОЕ
НАУЧНОЕ УЧРЕЖДЕНИЕ

«ФЕДЕРАЛЬНЫЙ
ИССЛЕДОВАТЕЛЬСКИЙ ЦЕНТР
ИНСТИТУТ
ЦИТОЛОГИИ и ГЕНЕТИКИ
СИБИРСКОГО ОТДЕЛЕНИЯ
РОССИЙСКОЙ АКАДЕМИИ НАУК»
(ИЦиГ СО РАН)

Пр-т. Академика Лаврентьева, д. 10, Новосибирск, 630090
Телефон: (383) 363-49-80
Факс (383) 333-12-78
E-mail: icg-adm@bionet.nsc.ru
https://www.icgbio.ru
ИНН 5408100138/КПП 540801001
ОКПО 03533895 ОГРН 1025403657410

от 01.02.2024 № 15345-29-26/29
на № _____ от _____

«УТВЕРЖДАЮ»
и.о. директора ИЦиГ СО РАН
академик РАН

Кочетов А.В.
« 01 » февраля 2024 г.

ОТЗЫВ

ведущей организации на диссертацию Куварзина Савелия Ростиславовича «Исследование рецепторов, ассоциированных со следовыми аминами, в качестве новых мишеней для лечения расстройств центральной нервной системы», представленную на соискание ученой степени кандидата медицинских наук по специальности 3.3.6. Фармакология, клиническая фармакология

Частота психических расстройств в современном индустриальном обществе высока и непрерывно возрастает. Антидепрессанты, анксиолитики и антипсихотики (нейролептики) занимают лидирующие позиции на фармакологическом рынке, уступая только антибиотикам, сердечно-сосудистым и противораковым препаратам. Молекулярными мишенями для большинства клинически эффективных антидепрессантов и антипсихотиков и ряда анксиолитиков являются транспортеры и рецепторы серотонина и дофамина. Однако клиническая эффективность этих препаратов не превышает 60% и многие из них при длительном употреблении вызывают значительные

негативные побочные эффекты, снижающие их эффективность. Поэтому поиск принципиально новых более безопасных и эффективных психотропных соединений является приоритетной задачей современной психофармакологии.

Перспективным направлением является поиск новых молекулярных мишеней и разработка соединений, действующих на эти мишени в качестве новых классов антидепрессантов, нейролептиков и анксиолитиков. Среди таких перспективных мишеней выделяют рецепторы следовых аминов (TAAR). Эти рецепторы первоначально были обнаружены в обонятельном эпителии, где они выполняют ольфакторную функцию. Но в последнее время рецепторы такие как TAAR1, были обнаружены в центральной нервной системе. Несмотря на большой интерес к данным рецепторам (за последние 20 лет опубликовано около 600 статей) их роль в регуляции нервной системы, поведения и в механизмах психопатологий еще не ясна. В настоящее время за рубежом и в нашей стране разработаны несколько агонистов рецепторов следовых аминов, которые предполагают использовать как новый класс антидепрессантов, анксиолитиков и антипсихотиков.

Основной задачей диссертационной работы Куварзина С.Р. является исследование влияния на поведение животных в различных моделях 5 новых агонистов TAAR1, разработанных и созданных в Институте химии Санкт-Петербургского Государственного Университета, LK00764, AP161, AP162, AP163, AP164 и для которых ранее *in vitro* была показана способность взаимодействовать с TAAR1. Эта задача выполнена по современным стандартам психофармакологии. Второй, но не менее важной, задачей было исследование влияния мутации в гене *Taar6* и нокаута по гену *Taar2* на поведение и биогенные амины мозга. Несмотря на то, что вторая задача выполнена в рамках современной нейробиологии и генетики поведения, ее результаты, несомненно, могут рассматриваться как база для последующих психофармакологических исследований. Проведенные исследования, безусловно, новы и оригинальны.

Работа Куварзина С.Р. изложена на 113 страницах, включает 91 рисунок, 3 таблицы и список цитируемой литературы из 166 работ. Структура работы отличается от классической и включает введение, обзор литературы, далее идут 5 глав (3-7) результатов, каждая из которых содержит разделы материалы и методы, собственно результаты и их краткое обсуждение, раздел общее обсуждение результатов, заключение, выводы и список литературы.

Введение построено по классической схеме и дает исчерпывающее представление об актуальности, целях, задачах, новизне и оригинальности исследования. Этот раздел не вызывает вопросов.

В обзоре литературы на 19 страницах представлена информация об различных типах TAAR, их эктопической экспрессии (вне обонятельной системы) и фармакологии TAAR1. Первый раздел (различные типы рецепторов) изложен несколько поверхностно: нет информации о генетико-молекулярных особенностях каждого типа и механизмах их сопряжения с G белками. Поскольку эта информация не имеет прямого отношения к теме работы, автор, по-видимому, посчитал, что читатель может найти все необходимые сведения в прекрасных обзорах. Это нельзя рассматривать как минус работы, но затрудняет чтение диссертации. Два других раздела написаны достаточно подробно, особенно третий, касающийся фармакологии TAAR1 рецептора. Это и не удивительно, поскольку эти два раздела чрезвычайно важны для понимания новизны и оригинальности полученных автором результатов. Последний раздел вместе с результатами автора, представленными в диссертации, может служить основой для оригинальной обзорной статьи. **К сожалению, в обзоре (а также в методах и результатах) очень мало сказано о характеристиках исследуемых соединений (вся информация ограничена рис.1) и ничего не сказано об исследуемой мутации в гене *Taar6* и о нокауте гена *Taar2* (как эти мыши были получены и их генетические характеристики).** Это так же несколько затрудняет чтение и понимание диссертации.

Как уже было сказано выше, в работе нет традиционной главы «Материалы и методы», посвященной описанию животных, экспериментов и методик. Сразу после главы «Обзор литературы» идут 5 глав описания полученных результатов. Каждая из этих глав начинается с краткого описания сути эксперимента, затем идет достаточно подробное описание схемы эксперимента и всех методик, затем следует подробное описание полученных результатов и их краткое обсуждение. Такая структура, несомненно, облегчает чтение и понимание результатов, но приводит к повторному описанию, часто дословному, одних и тех же методов в разных главах.

Все результаты можно разделить на три части: (1) фармакологическое описание эффектов новых агонистов TAAR1, LK00764, AP161, AP162, AP163, AP164, в различных моделях (глава 3) и характеристики поведения и биогенных аминов в мозге у (2) мышей с мутацией в гене Taar6 (главы 4 и 5) и (3) у мышей с нокаутом по гену Taar2 (главы 6 и 7). В целом получен огромный и принципиально новый экспериментальный материал, представленный в 90 оригинальных рисунках. Все используемые модели корректны, поведенческие параметры зарегистрированы и анализированы общепризнанной компьютерной программой EthoVision, их объективность и точность не вызывают сомнения. Содержание биогенных аминов и их метаболитов в мозге исследовано с помощью ВЭЖХ с электрохимическим детектором этот метод является одним из самых чувствительных. **В то же время, непонятно почему автор использовал низкую молярность HClO₄ (0.1 М вместо обычных 0.6 М) и избавлялся от неденатурированного белка посредством фильтрации, которая является более дорогим и трудоемким методом, чем осаждение с помощью больших концентраций перхлората с последующим центрифугированием.** При статистическом анализе результатов автор часто использовал непараметрическую статистику вместо более чувствительного ANOVA и коррекцию Бонферрони при множественных сравнениях. **Такое строгое отношение к статистическому анализу результатов можно приветствовать, но кажется, что в данном исследовании оно избыточное и**

выглядит как педантизм. Создается впечатление, что автор излишне перестраховывается, чтобы полностью исключить ложные позитивы.

Было показано, что LK00764 в дозе 10 мг/кг при остром в/б введении снижает горизонтальную двигательную активность в тестах открытое поле и приподнятый крестообразный лабиринт, вертикальную активность и выраженность амбивалентного поведения (грумминг) в тесте открытое поле, но не влияет на проявления тревожности в данных тестах и депрессивно-подобного поведения в тесте принудительное плавание. Интересно отметить, острое подкожное введение данного соединения в той же дозе не снижает двигательную активность. Далее было показано, что данное соединение при остром в/б введении дозозависимо снижает вызванную стрессом гипертермию. Наконец, автор показал, что острое в/б введение 10 мг/кг LK00764 снижает вызванную блокатором транспортера дофамина (GBR 12909) гиперактивность. **Правда, непонятно, почему автор сравнивал по отдельности эффект GBR 12909 с контролем (Рис.2), а эффект GBR 12909 + LK00764 с GBR 12909 (Рис.3), а не все три группы вместе.** При сравнении результатов этих экспериментов создается четкое впечатление, что LK00764 при остром в/б, но не при подкожном введении оказывает общий седативный эффект.

Далее автор исследовал эффекты хронического (14 дней) подкожного введения LK00764 в дозе 10 мг/кг на поведение мышей и выявил анксиолитическое действие данного соединения в тесте приподнятый крестообразный лабиринт, без какого-либо негативного действия на массу тела, двигательную активность и депрессивно-подобное поведение. Полученный результат, по-видимому, будет иметь медицинское значение и подкожное введение LK00764 можно использовать для снижения тревожности без заметных негативных побочных эффектов.

Автор также исследовал седативный эффект острого введения 4 агонистов TAAR1, AP161-AP164 на модели гиперактивных крыс с нокаутом по гену транспортера дофамина. Был показан дозозависимый седативный эффект в

тесте открытое поле только для AP163, тогда как другие 3 соединения были неэффективные.

Во второй части исследования Куварзин С.Р. исследовал влияние мутации в гене *Taar6*, полученной отечественными исследователями, на поведение и моноамины в коре, гиппокампе, гипоталамусе и стриатуме.

Неясно, почему автор исследовал уровень и метаболизм биогенных аминов и их метаболитов только в окончаниях, а не в телах 5-НТ, DA, NA нейронов (в среднем мозге). Использовалась стандартная батарея тестов и ВЭЖХ. У мутантных мышей было выявлено (1) увеличение вертикальной активности (исследовательское поведение), (2) дефекации в тесте открытое поле, (3) снижение тревожность, (4) увеличение двигательной и исследовательской активностей в тесте приподнятый крестообразный лабиринт, а также выраженность обсессивно-компульсивного поведения в тесте закапывание шариков. Мутация усиливает гипотермический эффект агониста 5-НТ1A/5-НТ7 рецепторов 8-ОН-DPAT. **Однако автор использовал большие дозы данного соединения (5 мг/кг вместо стандартной 1 мг/кг). Неясно, чем было мотивировано использование больших доз 8-ОН-DPAT.** В то же время, мутация не влияла на выраженность депрессивно-подобной неподвижности в тесте принудительное плавание. Мутация увеличила уровни 5-НТ и 5-Н1АА в коре и гиппокампе, уровень НVA, отношение DOPAC/DA и НVA/DA в гипоталамусе, но не повлияла на уровень биогенных аминов и их метаболитов в стриатуме. **К сожалению, в работе отсутствует информация о генетико-молекулярных характеристиках данной мутации и ее воздействию на TAAR6, что затрудняет интерпретацию полученных крайне интересных результатов.**

В третьей части автор исследовал влияние нокаута по гену *Taar2* на поведение и моноамины в коре, гиппокампе, гипоталамусе и стриатуме. Использовалась та же стандартная схема эксперимента, что и для мышей с мутацией гена *Taar6*. Мыши с нокаутом не отличались от мышей дикого типа ни в одном тесте. В то же время, у нокаутных мышей выявлено увеличение

уровня DA в стриатуме, снижение уровня NA в гиппокампе и уровня HVA в гипоталамусе.

Все представленные в главах 3-7 результаты оригинальны.

В разделе «Обсуждение» Куварзин С.Р. обсуждает полученные результаты с позиций имеющихся идей и литературных данных. Следует как положительное отметить чрезвычайную осторожность автора при обсуждении гипотетических механизмов. По каждому случаю спорной интерпретации он предлагает варианты экспериментальной проверки гипотез. В целом, данный раздел действительно выглядит как обсуждение, а не как краткое повторение результатов. Его приятно и полезно читать.

В разделе «Заключения» кратко, всего в двух предложениях, представлен объем исследования. Из-за его краткости вызывает сомнение сама необходимость данного раздела. Но этот вопрос следует отнести к компетенции автора.

Выводы соответствуют результатам. Поражает краткость и схематичность выводов: их всего три. В принципе их число можно было бы расширить до шести за счет уточнения. **Во-втором выводе следовало бы подчеркнуть, что данный агонист проявляет анксиолитические свойства только при хроническом подкожном введении.** Однако это замечание уточняет, но не опровергает вывод.

Список цитируемой литературы оформлен странно: для некоторых источников приводятся имена всех авторов, в других – только первого. Это можно рассматривать как замечание.

Сказанное позволяет говорить о работе Куварзина С.Р. как о полноценном научном исследовании.

Разумеется, в диссертации имеются недостатки. Кроме высказанных в тексте замечаний следует отметить ряд общих замечаний, которые хотя и не так существенны для понимания работы, но тем не менее способны вызвать раздражение. Во-первых, это большое число опечаток, которые иногда могут полностью исказить смысл предложения и идеи. Например, «(5-НТ1В, 106 5-

HT1D, 5-HT2A, 5-HT2B, 5-HT2, 5-HT7, α 2A, α 2B и D2 рецепторы)» (стр.16), «5-HT1A-зависимое привлечение G α _q, G α _i и в меньшей степени G α _s)» (это о чем) (стр.17), два первых абзаца на стр.18, «мышам дикого типа» (что это такое?) (стр.22), «во время проведения экспериментов исследователь был ослеплен» (какой ужас!) (стр.61) и т.д. Во-вторых, это сленг типа «мышинные модели», «в мышинных почках». В-третьих, создается впечатление, что автор мало читает отечественную литературу и плохо знаком с устоявшимися в ней терминами. Например, что-такое «открытые и закрытые лучи» в тесте приподнятый крестообразный лабиринт? Правильный перевод терминов “open and closed arms” будет «открытые и закрытые рукава». Разумеется, указанные замечания не снижают важности и ценности результатов, представленных в диссертационной работе Куварзина С.Р., и не могут повлиять на ее высокую оценку.

Все сказанное позволяет заключить, что диссертационную работу Куварзина С.Р. следует квалифицировать как современное исследование, которое проведено с использованием новых и оригинальных соединений, на новых генетических моделях мышей, с помощью стандартных и проверенных методов, содержит оригинальные экспериментальные данные, эти данные являются новыми, а их значение и актуально, и важно в научно-практическом отношении. Приведенные в диссертационной работе результаты прошли проверку и признаны научным сообществом. Об этом свидетельствуют публикации в реферируемых отечественных и международных изданиях, выступления на многочисленных отечественных и международных конференциях.

По актуальности темы, методическому и научному уровню, новизне и научно-практической значимости полученных результатов, обоснованности научных положений и выводов диссертация соответствует требованиям п. 9 «Положения о присуждении ученых степеней», утвержденного Постановлением Правительства РФ от 24.09.2013 № 842, с изменениями от 18.03.2023 г., предъявляемым к диссертационным работам на соискание ученой

степени кандидата медицинских наук, а ее автор Куварзин Савелий Ростиславович заслуживает присуждения искомой степени кандидата медицинских наук по специальности 3.3.6. Фармакология, клиническая фармакология.

Отзыв заслушан и утвержден на заседании межлабораторного семинара генетики животных Института от 30 января 2024 г, протокол № 1.

Руководитель сектора генетических коллекций
нейропатологий ИЦиГ СО РАН,
доктор биологических наук



Куликов А.В.

Личную подпись д.б.н., Куликова А.В. заверяю
Ученый секретарь ИЦиГ СО РАН, к.б.н.



Орлова Г.В.

Дата: 1 февраля 2024 г.