

ЗАКЛЮЧЕНИЕ ДИССЕРТАЦИОННОГО СОВЕТА 21.2.058.07 НА БАЗЕ
ФЕДЕРАЛЬНОГО ГОСУДАРСТВЕННОГО АВТОНОМНОГО
ОБРАЗОВАТЕЛЬНОГО УЧРЕЖДЕНИЯ ВЫСШЕГО ОБРАЗОВАНИЯ
«РОССИЙСКИЙ НАЦИОНАЛЬНЫЙ ИССЛЕДОВАТЕЛЬСКИЙ
МЕДИЦИНСКИЙ УНИВЕРСИТЕТ ИМЕНИ Н.И. ПИРОГОВА»
МИНИСТЕРСТВА ЗДРАВООХРАНЕНИЯ РОССИЙСКОЙ ФЕДЕРАЦИИ ПО
ДИССЕРТАЦИИ НА СОИСКАНИЕ УЧЕНОЙ СТЕПЕНИ КАНДИДАТА
НАУК

аттестационное дело № _____
решение диссертационного совета от 21.12.2023 № 11

О присуждении Павловой Ольге Валерьевне, гражданке Российской Федерации, ученой степени кандидата биологических наук.

Диссертация на тему: «Рекомбинантный BDNF. Получение моноклональных антител, разработка тест-системы иммуноферментного анализа и клинико-лабораторная диагностика», по специальности 1.5.4. - «Биохимия» принята к защите 19.10.2023 г., протокол № 1 диссертационным советом 21.2.058.07 на базе Федерального государственного автономного образовательного учреждения высшего образования «Российский национальный исследовательский медицинский университет имени Н.И. Пирогова» Министерства здравоохранения Российской Федерации, (приказ № 1135/нк от 23.09.2015г.), почтовый адрес: 117997, Москва, ул. Островитянова, д.1.

Соискатель Павлова Ольга Валерьевна 1982 года рождения, в 2005 г. окончила медико-биологический факультет Российского Государственного Медицинского Университета, защитила на отлично дипломную работу по теме: «Развитие и цитологическая характеристика глиальных клеток обонятельных структур мозга в диссоциированных монослойных культурах». С 2003 г. по 2006 г. работала в должности лаборанта-исследователя лаборатории иммунохимии Отдела фундаментальной и прикладной нейробиологии Государственного научного центра социальной и судебной психиатрии им. В. П. Сербского; с 2006 г. по июнь 2022 г. работала младшим научным

сотрудником лаборатории иммунохимии Отдела фундаментальной и прикладной нейробиологии Федерального государственного бюджетного учреждения «Национальный медицинский исследовательский центр психиатрии и наркологии имени В.П. Сербского» Министерства здравоохранения Российской Федерации; с июня 2022 г. по настоящее время работает научным сотрудником лаборатории экспериментальной нейробиологии Отдела фундаментальной и прикладной нейробиологии Федерального государственного бюджетного учреждения «Национальный медицинский исследовательский центр психиатрии и наркологии имени В.П. Сербского» Министерства здравоохранения Российской Федерации.

Диссертация выполнена в лаборатории иммунохимии Отдела фундаментальной и прикладной нейробиологии Федерального государственного бюджетного учреждения «Национальный медицинский исследовательский центр психиатрии и наркологии имени В.П. Сербского» Министерства здравоохранения Российской Федерации.

Научный руководитель:

Гурина Ольга Ивановна – доктор медицинских наук, профессор, член-корреспондент РАН, главный научный сотрудник Отдела фундаментальной и прикладной нейробиологии Федерального государственного бюджетного учреждения «Национальный медицинский исследовательский центр психиатрии и наркологии имени В.П. Сербского» Министерства здравоохранения Российской Федерации.

Официальные оппоненты:

Морозов Сергей Георгиевич – доктор медицинских наук, член-корреспондент РАН, директор Федерального государственного бюджетного научного учреждения «Научно-исследовательский институт общей патологии и патофизиологии» (ФГБНУ "НИИОПП");

Смирнов Иван Витальевич – доктор химических наук, член-корреспондент РАН, заместитель директора по научной работе, главный научный сотрудник лаборатории химии протеолитических ферментов Федерального государственного бюджетного учреждения науки Институт

биоорганической химии им. академиков М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова
Российской академии наук (ИБХ РАН)

Оппонентами даны положительные отзывы на диссертацию, принципиальных замечаний нет, но возникли вопросы уточняющего характера. На них диссертант дал развернутые ответы.

Ведущая организация:

Федеральное государственное бюджетное научное учреждение «Научно-исследовательский институт биомедицинской химии имени В.Н. Ореховича», в своем положительном заключении, утвержденным Плешаковой Татьяной Олеговной – доктором биологических наук, заместителем директора по научной работе Федерального государственного бюджетного научного учреждения «Научно-исследовательский институт биомедицинской химии имени В.Н. Ореховича» и подписанным Ждановым Дмитрием Дмитриевичем – доктором биологических наук, доцентом, ведущим научным сотрудником, заведующим лабораторией медицинской биотехнологии Федерального государственного бюджетного научного учреждения «Научно-исследовательский институт биомедицинской химии имени В.Н. Ореховича» (протокол № 7 от 17.11.2023 г.) отметила, что диссертация обладает внутренним единством и носит заверченный характер, соискателем впервые показано, что рекомбинантный BDNTF обладает идентичными нативному белку иммунохимическими свойствами, а модифицированные протоколы иммунизации впервые позволили преодолеть иммунологическую толерантность, обусловленную межвидовой идентичностью BDNF, и получить антитела, специфически распознающие нативный антиген в иммуноферментном анализе, разработанная соискателем тест-система ИФА позволяет воспроизводимо, специфично и достоверно осуществлять количественный мониторинг уровня нейротрофического фактора мозга в сыворотке крови при психических заболеваниях и может быть использована в клинко-лабораторной практике для определения «скрытых» форм депрессии и прогнозирования суицидального поведения.

Отзыв положительный, критических замечаний не содержит, но в нем

есть ряд вопросов, на которые диссертант дал развернутые ответы.

В заключении указывается, что диссертационная работа, выполненная Павловой Ольгой Валерьевной, является оригинальной и законченной научно-квалификационной работой, представляющей научно-практический интерес. Представленная работа полностью соответствует требованиям п.9 «Положения о порядке присуждения научных степеней», утверждённого постановлением Правительства Российской Федерации от 24.09.2013 г. №842 (в редакции с актуальными изменениями), предъявляемым к диссертациям на соискание ученой степени кандидата наук, а её автор, заслуживает присуждения искомой ученой степени кандидата биологических наук по специальности 1.5.4. – «Биохимия».

Выбор официальных оппонентов и ведущей организации обосновывается наличием у них публикаций в рецензируемых отечественных и международных журналах по тематике, представленной к защите диссертации.

Соискатель имеет 6 опубликованных работ, в том числе 4 статьи в рецензируемых профильных научных журналах, входящих в международные базы Web of Science и Scopus, из которых 1 статья опубликована в журнале первого квартиля, 2 тезиса докладов на российских конференциях и конгрессах с международным участием.

Наиболее значимые научные работы по теме диссертации:

1. Associations of genetic polymorphisms and neuroimmune markers with some parameters of frontal lobe dysfunction in schizophrenia. / Morozova A., Zorkina Y., Pavlov K., **Pavlova O.**, Abramova O., Ushakova V., Mudrak A. V., Zozulya S., Otman I., Sarmanova Z., Klyushnik T., Reznik A., Kostyuk G., Chekhonin V. // *Front Psychiatry* - 2021 - 12: 655178. doi: 10.3389/fpsyt.2021.655178. [WoS, I.F = 4,157. Scopus, I.F = 4,8].
2. Neurobiological highlights of cognitive impairment in psychiatric disorders. / Morozova A., Zorkina Y., Abramova O., **Pavlova O.**, Pavlov K., Soloveva K., Volkova M., Alekseeva P., Andryshchenko A., Kostyuk G., Gurina O., Chekhonin V. // *Int J Mol Sci.* - 2022 - 23(3): 1217. doi: 10.3390/ijms23031217. [WoS, I.F. = 5,9. Scopus, I.F. = 6,0].

3. Разработка количественного иммуноферментного анализа нейротрофического фактора мозга на основе рекомбинантного антигена. / **Павлова О.В.**, Мурашко А.А., Андриющенко Н.В., Гурина О.И., Павлов К.А. // Нейрохимия – 2023 - Т. 40 - № 1 - стр. 86-91. doi: 10.31857/S1027813323010156. [РИНЦ, WoS. И.Ф. = 0,864].
4. Нейротрофический фактор мозга как потенциальный диагностический биомаркер психических расстройств. / **Павлова О.В.**, Гурина О.И., Шпорт С.В., Павлов К.А. // Российский психиатрический журнал – 2023 - №2 - стр. 76-85. [РИНЦ, Scopus. И.Ф. = 0,836].

На автореферат поступили отзывы от:

Баклаушева Владимира Павловича, доктора медицинских наук, доцента, заместителя генерального директора по научной работе Федерального государственного бюджетного учреждения "Федеральный центр мозга и нейротехнологий" Федерального медико-биологического агентства.

В отзыве отмечен современный уровень исследований соискателя, сочетающих молекулярно-биологические и биотехнологические методы получения рекомбинантного белка, культуральные методы, иммуноблоттинг, различные виды электрофореза, хроматографические методы, иммуногисто- и цитохимический, иммуноферментный виды анализа; существенными преимуществами разработанной автором тест-системы ИФА являются возможность стандартизовать все компоненты системы, а также получать их практически в неограниченном количестве; учитывая сложности с приобретением наборов ИФА иностранного производства, существующие перспективы регистрации данной тест-системы и производства в России несомненно будут способствовать развитию биологических наук и иметь прикладное значение.

Отзыв положительный, критических замечаний не содержит.

Клячко Наталья Львовны, доктора химических наук, профессора Федерального государственного бюджетного образовательного учреждения

высшего образования «Московский государственный университет имени М.В. Ломоносова».

В отзыве отмечено, что диссертация Павловой О.В. является важной и актуальной; для достижения поставленной цели и выполнения задач Павловой О.В. использован практически весь спектр подходов, используемых в современной препаративной и аналитической биохимии; проведенные исследования при скрининге образцов крови пациентов и контрольной группы показали достоверное снижение уровня нейротрофического фактора мозга в сыворотке крови пациентов с психическими расстройствами по сравнению с группой условно здоровых доноров, что подтверждает возможность использования уровня нейротрофического фактора мозга в сыворотке крови как диагностического биомаркера развития психических заболеваний; диссертационная работа является актуальным и практически значимым исследованием для фундаментальной биохимии, нейробиологии и практической психиатрии.

Отзыв положительный, но есть небольшой вопрос-замечание, касающийся отсутствия в тексте указания длины волны, при которой проводились измерения поглощения в ИФА, на который диссертант дал развернутый ответ.

Масенко Валерия Павловича, доктора медицинских наук, профессора, главного научного сотрудника, руководителя отдела нейрогуморальных и иммунологических исследований Федерального государственного бюджетного учреждения "Национальный медицинский исследовательский центр кардиологии имени академика Е.И. Чазова" Министерства здравоохранения Российской Федерации.

В отзыве отмечено, что диссертационная работа Павловой О.В. обладает научной новизной и практической значимостью, выявленные достоверные различия в содержании BDNF у пациентов по сравнению с контрольной группой подтверждают возможность использования уровня нейротрофического фактора мозга в сыворотке крови как диагностического биомаркера развития психических заболеваний; разработанная тест-система

ИФА позволит воспроизводимо, специфично и достоверно осуществлять количественный мониторинг уровня нейротрофического фактора мозга в сыворотке крови и может быть внедрена в клинико-лабораторную практику в психиатрических больницах; работа Павловой О.В. является актуальным и практически значимым исследованием для фундаментальной биохимии, нейробиологии и практической психиатрии, выполнена на высоком техническом уровне с использованием современных методов, адекватным статистическим анализом и выводами, соответствующими задачам.

Отзыв положительный, критических замечаний не содержит.

Тюрина-Кузьмина Петра Алексеевича, кандидата биологических наук, доцента кафедры биохимии и регенеративной биомедицины факультета фундаментальной медицины Федерального государственного бюджетного образовательного учреждения высшего образования «Московский государственный университет имени М.В. Ломоносова».

В отзыве отмечается, что при разработке тест-системы ИФА Павловой О.В. последовательно получены рекомбинантный белок BDNF, поли- и моноклональные антитела, проведена их иммунохимическая характеристика, произведен адекватный статистический анализ результатов серий ИФА для расчета константы аффинности моноклональных антител, валидации разработанной тест-системы, подбора оптимальных условий проведения данного вида анализа, оценки и сравнения количественного содержания нейротрофического фактора мозга в сыворотках пациентов с психическими заболеваниями и условно здоровых доноров; работа обладает научной новизной и практической значимостью, полученный соискателем рекомбинантный белок обладает идентичными нативному белку иммунохимическими свойствами, при этом использование модифицированных протоколов иммунизации позволили преодолеть иммунологическую толерантность и получить антитела, специфически распознающие нативный антиген в иммуноферментном анализе. В результате проведенных исследований с использованием разработанной тест-системы выявили различия уровней нейротрофического фактора мозга в

сыворотках крови пациентов с психическими заболеваниями по сравнению с контрольной группой условно здоровых доноров.

Отзыв положительный, критических замечаний нет.

Диссертационный совет отмечает, что на основании выполненных соискателем исследований:

- показано, что рекомбинантный белок нейротрофического фактора мозга человека, являющийся белком слияния и содержащий аминокислотную последовательность тиоредоксина, обладает идентичными нативному белку иммунохимическими свойствами.

- установлено, что полученные путем иммунизации данным рекомбинантным белком по модифицированным протоколам поликлональные и моноклональные антитела способны специфично распознавать и связываться с нативным нейротрофическим фактором мозга в таких видах иммунохимического анализа, как иммуноблот, иммуноцито- и гистохимический анализы, твердофазный иммуноферментный анализ, и не проявляют кросс-реактивности с другими нейротрофинами (NGF, NT-3).

- выявлено, что разработанная тест-система твердофазного иммуноферментного анализа с использованием рекомбинантного антигена и антител, полученных при иммунизации данным антигеном, для количественного определения нейротрофического фактора мозга в сыворотке крови человека является специфичной, легко воспроизводимой, стандартизированной системой и характеризуется порогом чувствительности 40 +/- 10 пг/мл.

- показано, что происходит достоверное снижение уровня нейротрофического фактора мозга у пациентов с психическими расстройствами по сравнению с группой условно здоровых доноров (контрольная группа), при этом наименьший уровень данного белка был выявлен в группе пациентов с депрессивными расстройствами с суицидальными попытками в анамнезе.

- установлено, что разработанная тест-система обладает высокой диагностической значимостью, учитывая обнаруженные отличия уровня нейротрофического фактора мозга у пациентов с психическими заболеваниями по сравнению с контрольной группой.

Теоретическая значимость исследования обоснована тем, что: проведенные исследования развивают представление о возможной ассоциации психических расстройств с определенными изменениями биохимических показателей крови, которые можно использовать как биомаркеры того или иного заболевания и, в перспективе, выполнять диагностику в психиатрии более достоверно и объективно. В работе показаны статистически значимые и достоверные отличия уровней нейротрофического фактора мозга в сыворотке крови пациентов с психическими заболеваниями по сравнению с контрольной группой условно здоровых доноров.

Результаты диссертационной работы были внедрены в научно-исследовательскую практику на базе кафедры медицинских нанобиотехнологий Медико-биологического факультета ФГАОУ ВО РНИМУ им. Н.И. Пирогова Минздрава России и на базе научно-исследовательской лаборатории биофизики Федерального государственного автономного образовательного учреждения высшего образования «Национальный исследовательский технологический университет «МИСИС».

Оценка достоверности результатов исследования выявила: количественную и качественную сопоставимость результатов, полученных автором в ходе исследования, с результатами последних публикаций других авторов, выполненных по схожей тематике; результаты, приведенные соискателем, получены с использованием современных и широко применяемых биохимических и иммунохимических методов исследования и подходов молекулярной биологии; выводы аргументированы, научно обоснованы и являются прямым следствием результатов проведенных автором исследований.

Выводы и положения, выносимые на защиту, основаны на статистически значимых данных. Статистический анализ проводили в PRISM 8.0 и Microsoft Excel 2016. Статистическую оценку различий между исследуемой и

контрольной группами проводили с помощью непарного t-тест, непараметрического теста Манна-Уитни, непараметрического варианта ANOVA Краскела-Уоллиса с последующим множественным сравнением Данна. Высокая степень достоверности результатов достигалась благодаря достаточному количеству образцов исследуемой и контрольной групп, использованию сертифицированного научного оборудования и реагентов, что позволило сопоставлять полученные результаты с результатами других авторов.

Оригинальность работы, согласно системе «Антиплагиат», составляет 83,9%.

Личный вклад соискателя состоит в непосредственном участии в разработке плана исследования и экспериментов, в подборе методов, необходимых для достижения поставленных цели и задач, получении, статистической обработке и интерпретации экспериментальных данных, подготовке и публикации статей в научно-практических журналах, личное участие в апробации результатов исследования, представление результатов на научно-практических конференциях. Основные результаты диссертационной работы были представлены на 2 научно-практических и научных конференциях и конгрессах с международным участием, на заседаниях Проблемного совета по фундаментальной и прикладной нейробиологии ФГБУ «НМИЦ ПН им. В.П. Сербского» Минздрава России. Результаты диссертационного исследования отражены в 6 публикациях, из них: 4 публикации в научных рецензируемых изданиях, входящих в перечень ВАК, индексируемых в Web of Science и Scopus, и 2 публикации в сборниках материалов научных конференций и конгрессов.

Диссертационный совет установил, что диссертация представляет собой научно-квалификационную работу, которая полностью соответствует требованиями п.9 «Положения о порядке присуждения научных степеней», утверждённого постановлением Правительства Российской Федерации от 24.09.2013 г. №842 (с изменениями в редакции постановлений правительства Российской Федерации №335 от 21.04.2016 г., №748 от 02.08.2016 г., № 650 от

При проведении тайного голосования диссертационный совет в количестве 20 человека, из них 5 докторов наук по специальности 1.5.4. Биохимия (биологические науки), участвовавших в заседании, из 29 человека, входящих в состав совета, проголосовали: «за» присуждение ученой степени – 20, «против» присуждения ученой степени – нет, недействительных бюллетеней – нет.

Кузнецов Д.А.

Кягова А.А.

22.12.2023 г.

