

ПАВЛОВА ОЛЬГА ВАЛЕРЬЕВНА

**РЕКОМБИНАНТНЫЙ BDNF. ПОЛУЧЕНИЕ МОНОКЛОНАЛЬНЫХ
АНТИТЕЛ, РАЗРАБОТКА ТЕСТ-СИСТЕМЫ
ИММУНОФЕРМЕНТНОГО АНАЛИЗА И КЛИНИКО-
ЛАБОРАТОРНАЯ ДИАГНОСТИКА**

1.5.4. – биохимия

АВТОРЕФЕРАТ

диссертации на соискание ученой степени

кандидата биологических наук

Москва – 2023

Работа 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:

член-корреспондент РАН,
доктор медицинских наук, профессор

Гурина Ольга Ивановна

Официальные оппоненты:

член-корреспондент РАН, доктор химических наук

Смирнов Иван Витальевич

Федеральное государственное бюджетное учреждение науки Институт биоорганической химии им. академиков М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова Российской академии наук, заместитель директора по научной работе, главный научный сотрудник лаборатории химии протеолитических ферментов

член-корреспондент РАН, доктор медицинских наук

Морозов Сергей Георгиевич

Федеральное государственное бюджетное научное учреждение "Научно-исследовательский институт общей патологии и патофизиологии", директор

Ведущая организация:

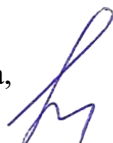
Федеральное государственное бюджетное научное учреждение науки «Научно-исследовательский институт биомедицинской химии имени В.Н. Ореховича»

Защита диссертации состоится «___» _____ 202_ года в _____ часов на заседании Диссертационного совета 21.2.058.07 на базе ФГАОУ ВО РНИМУ им. Н.И. Пирогова Минздрава России по адресу: 117997, г. Москва, ул. Островитянова, д. 1.

С диссертацией можно ознакомиться в Научной библиотеке ФГАОУ ВО РНИМУ им. Н.И. Пирогова Минздрава России по адресу: 117997, г. Москва, ул. Островитянова, д. 1; и на сайте www.rsmu.ru.

Автореферат разослан «___» _____ 202_ г.

Ученый секретарь диссертационного совета,
Доктор медицинских наук, профессор



Кягова Алла Анатольевна

ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

Актуальность исследования. В настоящее время психическое здоровье человека является одной из наиболее серьезных проблем, стоящих перед всеми странами, поскольку те или иные нарушения психики возникают у каждого четвертого человека в мире и, соответственно, количество людей с психическими расстройствами увеличивается из года в год. Более 40% всех хронических заболеваний связаны с психическими расстройствами, при этом значительно возрастает инвалидизация населения, что повышает тяжесть экономического бремени болезней. Депрессивное расстройство является наиболее распространенным психическим заболеванием во всем мире, которое, в основном, характеризуется подавленным настроением, ангедонией, нарушениями сна и аппетита, а также нарушениями когнитивных и двигательных функций, памяти и нейровегетативными симптомами (Dean J., 2017). Кроме того, депрессии приводят к патофизиологическим нарушениям в работе многих систем организма, что повышает риск развития других болезней (Halaris A., 2017; Gothe F., 2012). Также среди людей, страдающих таким расстройством, наблюдается высокий уровень самоубийств (Rihmer Z., 2018). Основными проблемами при диагностике и лечении депрессий являются гетерогенность самого заболевания, низкая частота ремиссии и ограниченная эффективность антидепрессантной терапии с появлением "резистентной к лечению" депрессией в ряде случаев (Otte C., 2016; Malhi G. S., 2018, Kraus C., 2019, Davies P., 2019). Этиология депрессии, как и в случае с другими психическими расстройствами, невероятно сложна. Поэтому в современной психиатрии как никогда остро стоит проблема поиска биологических маркеров для своевременной диагностики, оценки эффективности терапии и определения новых лекарственных мишеней. Необходимыми характеристиками данных биомаркеров должны являться высокая чувствительность и специфичность при диагностике заболевания, а также воспроизводимость, надежность, малая инвазивность метода определения (Redei E. E., 2015). Биологические механизмы, лежащие в основе патогенеза депрессивных расстройств, представляют собой сложный взаимосвязанный комплекс биохимических, генетических и морфологических изменений, с преобладанием какого-либо компонента при разных подтипах этого заболевания (Ушакова В. М., 2020; Иванова С. А., 2018). На молекулярном уровне эти изменения затрагивают системы моноаминергических нейротрансмиттеров, также наблюдаются дисрегуляция в системе гипоталамо-гипофизарно-надпочечниковой оси, снижение выработки нейротрофинов, что влияет на нейропластичность и нейрогенез, метаболическая и митохондриальная дисфункции, нарушение иммунного ответа с усилением воспаления, окислительный стресс. Кроме того, свой вклад в патогенез депрессии вносят генетические и эпигенетические факторы. Потенциальные биомаркеры, по возможности, должны отражать данные изменения – протеомные маркеры, факторы роста, цитокины, маркеры воспаления, метаболиты, маркеры окислительного стресса, гормоны и так далее (Lopresti A. L., 2014; Узбеков М. Г., 2016; Woods A. G., 2021; Malik S., 2021). Одним из ключевых звеньев нейробиологии депрессивных расстройств является снижение нейрогенеза, что сопровождается изменениями структурной и функциональной нейропластичности (Liu W., 2017). Для депрессивных состояний выявлено снижение серого вещества гиппокампа за счет уменьшения количества и

размеров нейронов и глии, и меньший объем гиппокампа связан с более тяжелым течением болезни, а также с не леченными формами депрессии (Tartt A. N., 2022; Trifu S. C., 2020). Потенциальными механизмами, лежащими в основе такого нарушения нейрогенеза, являются повышение уровня циркулирующих глюкокортикоидов, эксайтотоксичность глутамата (т.е. возникающий при гиперактивации NMDA- и AMPA-рецепторов патологический процесс, который приводит к повреждению и гибели нейронов), снижение экспрессии нейротрофических факторов и усиление регуляции проапоптотических путей (Bourin M., 2021). Известно, что нейротрофический фактор мозга (BDNF) способствует росту и развитию многих типов нейронов, а также глиальных клеток, дендритному росту и ветвлению (арборизации), формированию дендритных шипиков, обеспечивает нейротрофическую поддержку, «защищая» нейроны от нейротоксических воздействий в условиях различных видов стресса. Таким образом, снижение уровней BDNF при депрессивных расстройствах могут влиять на нейрогенез и жизнеспособность нейронов некоторых отделов головного мозга (Rana T., 2021). При депрессивных расстройствах также происходят нарушения в нейронных цепях, ответственных за настроение и когнитивные функции (гиппокамп, префронтальная кора, миндалевидное тело). Процессы обучения и памяти обуславливаются механизмами долгосрочной потенциации (LTP) и долгосрочной депрессии (LTD), индукция которых зависит от совместной активности глутаматергических NMDA- и AMPA-рецепторов, приводящее к изменениям синаптической силы (Luscher C., 2012). BDNF является регулятором синаптической пластичности, при этом он непосредственно модулирует NMDA- и AMPA-рецепторы и контролирует глутамат-, серотонин- и ГАМК-ергические медиаторные системы. Снижение уровня BDNF приводит к нарушениям синаптической пластичности и, соответственно, когнитивным и аффективным дисфункциям, нарушениям циркадного ритма при депрессивных расстройствах (Гуляева Н. В., 2017а; Kowianski P., 2018; Morozova A., 2022). Многочисленные исследования показывают, что прием различных классов антидепрессантов увеличивает экспрессию BDNF в гиппокампе и префронтальной коре, способствуя долгосрочным нейропластическим изменениям и приводя к снижению депрессивной симптоматики у пациентов (Duman R.S., 2021; Zanos P., 2018; Bjorkholm C., 2016). Таким образом, BDNF можно рассматривать в качестве биомаркера развития депрессивных расстройств, и прогностического маркера эффективности лекарственной терапии.

Степень разработанности: Для определения уровня BDNF в отдельных областях мозга (гиппокамп, префронтальная кора) исследователи использовали метод Вестерн-иммуноблота или гибридизации *in situ* у экспериментальных животных с различными моделями стресса (Nibuya M., 1995; Rasmusson A. M., 2002). С развитием научных методов изменялись подходы к измерениям, в последующих работах применяли метод иммуноферментного анализа для определения концентрации BDNF как в мозговой ткани, так и в сыворотке крови экспериментальных животных (Blugeot A., 2011). Также проводились посмертные определения уровня BDNF в тканях мозга пациентов, как с помощью Вестерн-иммуноблота, так и иммуноферментного анализа (Karege F., 2005). Дальнейшие исследования были направлены на прижизненное определение уровней белка в

сыворотке или плазме крови пациентов при депрессивных расстройствах, а также при генетических вариациях *bdnf*, TrkB и для оценки эффективности терапии с использованием иммуноферментного анализа (ИФА) (Aydemir C., 2006; Okamoto T., 2008; Huang T.-L., 2007; Ramesh V., 2021). Тест-системы ИФА BDNF были первоначально разработаны в 1990-х годах на основе двух видов поликлональных антител в виде сэндвич-варианта (Nawa H., 1995) и непрямого вида ИФА с использованием моноклональных антител (Kolbeck R., 1999). Также были созданы тест-системы сэндвич-варианта ИФА для определения про-BDNF и mBDNF на основе поли- и моноклональных антител и рекомбинантных белков про- и mBDNF, используемых в качестве стандартных антигенов (Lim Y., 2015). На сегодняшний момент существует большое разнообразие коммерческих наборов иммуноферментного анализа BDNF в сыворотке крови, в основном, представленные зарубежными фирмами США (R&D Systems, Invitrogen, SigmaAldrich, Abcam) и Китая (Cloud-Clone Corp. Wuhan).

Учитывая неоднородность результатов проведенных исследований по определению уровней BDNF в сыворотке крови пациентов с психическими заболеваниями, а также существующую сложность при закупке зарубежных наборов ИФА, необходимо было создать собственную тест-систему иммуноферментного анализа для количественного определения BDNF в сыворотке крови.

Цель исследования: Разработка высокочувствительного метода определения BDNF в сыворотке крови человека и изучение диагностических возможностей тест-системы при психических расстройствах.

Задачи исследования:

1. Разработать простой и эффективный способ получения рекомбинантного препарата BDNF, позволяющего выделять белок, иммунохимически идентичный нативному, необходимый для создания иммуноферментной тест-системы.
2. Получить поликлональные антитела при иммунизации лабораторных животных рекомбинантным BDNF и моноклональные антитела к рекомбинантному белку с помощью гибридной технологии.
3. Создать и апробировать в клинко-лабораторной практике иммуноферментную тест-систему анализа BDNF в сыворотке крови, пригодную для практического здравоохранения.
4. Провести скрининг с использованием тест-системы ИФА BDNF в сыворотке крови пациентов с психическими расстройствами и оценить диагностическую значимость разработанной тест-системы.

Научная новизна.

1. Впервые показано, что рекомбинантный BDNF, являющийся белком слияния и содержащий аминокислотную последовательность зрелого BDNF и тиоредоксина, обладает идентичными нативному белку иммунохимическими свойствами.
2. Разработаны модифицированные протоколы иммунизации, что позволило преодолеть иммунологическую толерантность, обусловленную межвидовой

идентичностью BDNF, и получить антитела, специфически распознающие нативный антиген в иммуноферментном анализе.

3. Впервые создан и стандартизован сэндвич-вариант твердофазного ИФА для определения концентрации BDNF в сыворотках крови человека на основе рекомбинантного препарата BDNF и полученных к нему антител.

Научная и практическая значимость.

1. Разработанная тест-система иммуноферментного анализа BDNF характеризуется высоким уровнем технологичности. Все антительные компоненты системы получены при иммунизации животных рекомбинантным BDNF, что позволяет их стандартизовать и накапливать в необходимых количествах.
2. Данная тест-система позволяет воспроизводимо, специфично и достоверно осуществлять количественный мониторинг уровня BDNF в сыворотке крови при психических заболеваниях.
3. Разработанная тест-система может быть использована в клинко-лабораторной практике:
 - Для определения «скрытых» форм депрессии
 - Для прогнозирования суицидального поведения.

Методология и методы исследования: В работе последовательно проведен анализ источников литературы, обоснована актуальность, сформулированы цель и задачи исследования. Для получения рекомбинантного белка *recBDNF* использовали методы: ПЦР-амплификация, молекулярное клонирование, различные виды электрофореза. После наращивания культур генно-модифицированных клеток *E. coli* чистый белок выделяли с помощью металл-хелатной хроматографии на Ni-NTA-агарозе. Препараты рекомбинантного белка исследовали с помощью аналитического диск-электрофореза и электрофореза с последующим иммуноблотом. Для получения гибридомных клеток, продуцирующих моноклональные антитела к *recBDNF*, использовали общепризнанную схему слияния и культивирования G. Köler и C. Milstein. Моноклональные антитела из асцитической жидкости и культуральной среды выделяли с помощью аффинной хроматографии на протеин А-агарозе. При получении чистого препарата поликлональных антител из полиспецифических антисывороток использовали метод иммуноаффинной хроматографии на CN-Br-сефарозе. Анализ специфичности антител проводили методами электрофореза с последующим иммуноблотом, иммуногисто- и цитохимическими методами, иммуноферментного анализа. При оценке параметров валидации разработанной тест-системы ИФА рассчитывали среднее значение, стандартное отклонение, доверительный интервал, коэффициент вариации. Результаты ИФА с использованием тест-системы при скрининге сывороток крови пациентов и условно здоровых доноров обрабатывали с помощью статистических тестов: непарный t-тест, непараметрический тест Манна-Уитни, непараметрический вариант ANOVA Краскела-Уоллиса с последующим множественным сравнением Данна.

Положения, выносимые на защиту:

1. Клонирование вставки, кодирующей последовательность mBDNF человека, в вектор pET32a и последующая экспрессия в штамме *E. coli* (BL21[DE3]) позволяет выделять рекомбинантный BDNF, иммунохимически идентичный нативному антигену.
2. Тест-система твердофазного сэндвич-варианта ИФА для количественного определения концентрации BDNF в сыворотке крови человека, разработанная на основе рекомбинантного BDNF и антител, полученных к нему, является стандартизированной, специфичной, достоверной и воспроизводимой.
3. Уровни BDNF в сыворотке крови пациентов с психическими заболеваниями снижены по сравнению с контрольной группой условно здоровых доноров. При этом самые низкие показатели BDNF обнаружались в группе пациентов с депрессивными расстройствами с суицидальными попытками в анамнезе, что может служить возможным предиктором склонности к суицидальному поведению.

Степень достоверности и апробация результатов: Работа выполнена на высоком научно-методическом уровне. Используемые методы соответствуют поставленным задачам. Научные положения, сформулированные автором в диссертации, основаны на исследовании достаточного количества образцов исследуемой и контрольной групп. Достоверность полученных в ходе исследования результатов подтверждена иммунохимическими и биохимическими методами, проведенным статистическим анализом. Результаты исследования соответствуют данным, представленным в отечественной и зарубежной литературе. Выводы аргументированы и вытекают из проведенных автором исследований.

Основные материалы и результаты диссертационной работы были представлены на конференциях: VI Междисциплинарная конференция «Современные проблемы системной регуляции физиологических функций», 2022, Москва; Международный конгресс «Биотехнология: состояние и перспективы развития», 2022, Москва.

Апробация результатов исследования проведена на заседании Проблемного совета по фундаментальной и прикладной нейробиологии ФГБУ «НМИЦ ПН им. В.П. Сербского» Минздрава России.

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.

Внедрение полученных результатов исследования: Результаты диссертационной работы по определению концентраций нейротрофического фактора мозга в сыворотке крови пациентов с психическими заболеваниями внедрены в научно-исследовательскую практику на базе кафедры медицинских нанобиотехнологий МБФ РНИМУ им. Н.И. Пирогова и на базе лаборатории биофизики НИТУ МИСИС.

Публикации. По теме диссертации опубликовано 6 печатных работ, в том числе 4 статьи в журналах, входящих в перечень ВАК и индексируемых в Web of Science, Scopus, и 2 тезиса на научно-практических конференциях.

Объем и структура диссертации. Диссертация изложена на 154 страницах машинописного текста, иллюстрирована 34 рисунками и 5 таблицами. Работа состоит из введения, обзора литературы, описания материалов и методов исследования, главы, отражающей результаты собственных исследований, обсуждения результатов, выводов и списка литературы (240 источников из них 10 отечественных и 230 зарубежных авторов). Весь материал, представленный в диссертации, получен, обработан и проанализирован автором лично.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Пациенты: При верификации разработанной тест-системы ИФА были использованы сыворотки крови пациентов с психическими заболеваниями общим количеством 120 образцов. Пациенты были разделены на группы: 1 гр. – с шизофренией (МКБ – F20, средний возраст – 36,8 лет), 2 гр. – с депрессивными расстройствами, имеющих суицидальные попытки в анамнезе (средний возраст – 31,8 лет), 3 гр. – с первым психотическим эпизодом (средний возраст – 26,8 лет). В качестве контрольных образцов были использованы сыворотки крови условно здоровых доноров в количестве 100 образцов, средний возраст составил 35,6 лет. От каждого из включенных в исследование участников было получено информированное добровольное согласие.

Животные: Для получения гибридом и асцитической жидкости использовали половозрелых самок мышей линии Balb/C, в возрасте 6-7 недель. Для получения полиспецифических антисывороток, содержащих поликлональные антитела, использовали половозрелых самок кроликов породы шиншилла, в возрасте 1-1,5 года. Крысы породы Wistar (3-4 мес) были использованы для выделения головного мозга при проведении иммуногистохимического анализа. Условия содержания крыс, мышей, кроликов и все экспериментальные процедуры были одобрены локальным этическим комитетом ФГБУ «НМИЦ ПН им. В.П. Сербского» Минздрава России.

Культуры клеток: Для получения моноклональных антител методом гибридомной технологии использовали культуры клеток миеломы мыши Sp2/0-Ag14. При анализе специфичности полученных поли- и моноклональных антител использовали культуры клеток эмбриональных астроцитов человека, которые были иммунохимически охарактеризованы и любезно предоставлены сотрудниками лаборатории иммунохимии Отдела фундаментальной и прикладной нейробиологии ФГБУ "НМИЦ ПН им. В.П. Сербского" Минздрава России.

Клонирование кДНК mBDNF в вектор pET32a и экспрессия рекомбинантного белка в *E. coli* (штамм DE3-BL21). Фрагмент кДНК mBDNF был амплифицирован с применением ген-специфичных праймеров, комплиментарных последовательности в начале рамки считывания и последовательности в области терминирующего трансляцию кодона. При конструировании экспрессирующей плазмиды использовали полученную в результате ПЦР последовательность и ДНК плазмиды pET32a, которые обрабатывались эндонуклеазами рестрикции по отдельности. Далее проводили электрофорез ДНК в 1% агарозном геле, после чего

осуществляли препаративную очистку продуктов из агарозного геля с последующим лигированием полученных фрагментов. Лигирующую смесь вносили в подготовленные электрокомпетентные клетки штамма *E. coli* BL21[DE3] (Invitrogen, США). Трансформацию осуществляли методом электропорации, после чего клетки культивировали в среде SOC, затем высевали на твердую агаровую среду LB с ампициллином, так как плазмида pET32a имеет ген устойчивости к этому антибиотику. После появления видимых колоний, производили отбор и анализ рекомбинантов на присутствие и правильную ориентацию вставки методом ПЦР с последующей визуализацией продуктов в агарозном геле. Колонии, давшие продукт ожидаемой молекулярной массы при электрофорезе, были использованы для выделения плазмид. Выделенные плазмиды подвергали рестрикционному анализу с применением эндонуклеаз рестрикции. Дополнительно было проведено выявление редких кодонов в нуклеотидной последовательности, которая кодирует mBDNF, с помощью Интернет-ресурса <http://gcua.schoedl.de>.

Для анализа эффективности экспрессии трансформированный штамм культивировали на шейкере в селективной среде до достижения оптической плотности 0,6 при 600 нм. Затем культуру индуцировали добавлением ИПТГ и продолжали инкубацию, отбирая каждый час 0,5 мл суспензии. Бактерии осаждали центрифугированием и хранили на -20°C. Анализ эффективности экспрессии осуществляли методом аналитического диск-электрофореза. Об эффективности судили по увеличению размеров бэнда с ожидаемой молекулярной массой.

Выделение рекомбинантного белка recBDNF. Культивирование штамма-продуцента *E. coli* BL21[DE3] проводили в течение 1,5-2 ч в термошейкере (37°C), к концу этого временного промежутка культура достигала оптической плотности 0,5-0,6 при 600 нм. После индукции ИПТГ продолжали культивирование в течение 2 часов, по завершению клетки осаждали центрифугированием. После удаления супернатанта к осадку добавляли лизирующий буфер, содержащий 8 М мочевины. После инкубации и центрифугирования в лизат добавляли Ni-NTA агарозу. После этого суспензию вносили в колонку. Выделение рекомбинантного белка проводили в денатурирующих условиях. Полученные препараты анализировались с помощью диск-электрофореза в полиакриламидном геле.

При проведении иммуноаффинной хроматографии для выделения чистого препарата поликлональных антител из сывороток кролика необходимо было удалить мочевины из раствора рекомбинантного белка, так как этот реагент снижает способность связываться с активными центрами CN-Br-сефарозы. Поэтому после инкубации лизатов с Ni-NTA агарозой и внесения на колонку, проводили промывку со ступенчатым градиентом фосфатно-солевого буфера (PBS) с 0,01 М имидазолом. Элюция осуществлялась раствором 0,5 М имидазола (pH 4,0), затем с помощью гель-фильтрации проводили замену буфера на связывающий буфер, используемый при иммуноаффинной хроматографии. Результаты проведенных хроматографий оценивали с помощью электрофореза в ПААГ.

Получение поликлональных антител. В связи с тем, что BDNF мышей и кроликов являются практически идентичны BDNF человека нами были модифицированы стандартные протоколы иммунизации. Для этого при первой иммунизации в качестве иммуногенного носителя была использована Ni-NT-агароза, в качестве

антигена – рекомбинантный белок BDNF. Эффективность иммунизации оценивали методом непрямого иммуноферментного анализа. Кровь брали на пике выработки антител из краевой вены уха кролика. Для получения чистых препаратов поликлональных антител из полиспецифических антисывороток использовался метод иммуноаффинной хроматографии на CN-Br-сефарозе с иммобилизованным на ней рекомбинантным BDNF. Результат оценивали измерением концентрации антител на спектрофотометре (NanoVue, GE) и с помощью непрямого ИФА. Биотинилирование поликлональных антител проводили в соответствии с инструкцией производителя с использованием набора для биотинилирования (Biotin-XX Microscale Protein Labeling Kit, Invitrogen). Результат оценивали измерением концентрации антител на спектрофотометре (NanoVue, GE) и с помощью непрямого ИФА.

Получение моноклональных антител. В связи с тем, что BDNF мышей и кроликов являются практически идентичны BDNF человека, нами были модифицированы стандартные протоколы иммунизации. Для этого при первой иммунизации в качестве иммуногенного носителя была использована Ni-NT-агароза, в качестве антигена – рекомбинантный BDNF. После проведения иммунизации анализировали титры антител в сыворотке крови с помощью непрямого ИФА. Затем отбирали животное с наиболее высоким титром антител для последующей процедуры слияния спленоцитов с миеломными клетками культуры Sp2/0-Ag14. Гибридные клетки культивировали в 96-луночных планшетах. Выявление клонов, продуцирующих специфические анти-ресBDNF-антитела, осуществляли дважды непрямым иммуноферментным анализом. Клоны, которые проявляли максимальную секретирующую способность, отбирали для последующего реклонирования, которое проводили 3-4 раза. Скрининг секретирующей способности таких клонов с помощью непрямого ИФА выявлял наиболее стабильно продуцирующие антитела клоны.

Для получения чистого препарата моноклональных антител из супернатантов клеточных культур после 5-7 дней *in vitro* и асцитов, полученных при введении гибридных клеток мышам интраперитонеально, использовали аффинную хроматографию с использованием протеин А-агарозы (Invitrogen, США). После определения класса моноклональных антител методом диск-электрофореза в ПААГ, были проведены исследования по определению константы аффинности данных антител по методу Beatty (Beatty J. D., 1987) с дополнениями Loomans (Loomans E. E., 1995) и изучение кросс-реактивности данных антител с помощью аналитического электрофореза с последующим иммуноблотом.

Иммуногисто- и цитохимический анализы. Для подтверждения взаимодействия моноклональных и поликлональных антител к рекомбинантному ресBDNF с нативным антигеном и специфичности этих антител проводили иммуногисто- и цитохимический анализы на срезах гиппокампа крыс и культурах эмбриональных астроцитов человека.

Разработка тест-системы иммуноферментного анализа для количественного определения BDNF.

Разработанная тест-система представляет собой сэндвич-вариант ИФА (рис. 1), где на дне лунок планшета адсорбированы полученные моноклональные анти-BDNF антитела, вторичными антителами являются биотинилированные поликлональные анти-BDNF антитела, в качестве стандарта для построения калибровочных кривых используется рекомбинантный белок гесBDNF в разведениях от 1500 до 10 пг/мл.

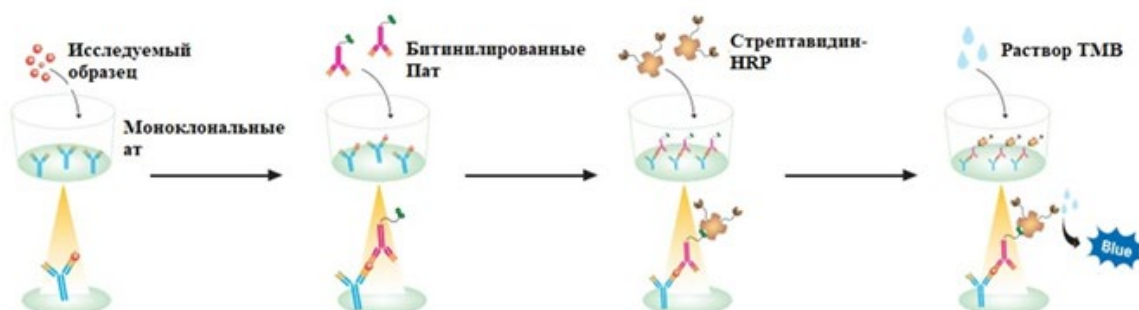


Рисунок 1. Схема разработанной тест-системы ИФА.

При разработке тест-системы были проведены эксперименты по подбору оптимальных условий – определение необходимых разведений поликлональных антител и исследуемых образцов (сывороток крови).

Для успешного использования разработанной тест-системы в практических целях необходимо добиться максимальной воспроизводимости получаемых результатов, а также охарактеризовать ее чувствительность, качество, надежность и специфичность.

Чувствительность тест-системы рассчитывается как минимальная концентрация искомого вещества в пробе, определяемая данным анализом и вычисляется как значение, которое выше среднего значения стандарта минимальной концентрации на 3 стандартных отклонения $\pm$ 2 стандартных отклонения. Для определения точности и воспроизводимости калибровочной кривой иммуноферментного определения BDNF калибровали стандартный антиген в разведениях от 1500 до 10 пг/мл, измеряя оптическую плотность при каждом варианте концентрации 5 раз. Такие исследования проводили в разное время, при постановке ИФА, одним и тем же исследователем в одинаковых условиях: времени инкубации, температура. При оценке параметров валидации разработанной тест-системы ИФА рассчитывали среднее значение, стандартное отклонение, доверительный интервал, прецизионность (характеризовалась коэффициентом вариации в %).

По результатам определения оптической плотности и известным концентрациям антигенов в стандартных пробах строили калибровочные кривые, которые использовали в дальнейшей работе для определения концентраций BDNF в исследуемых образцах сывороток крови. При статистическом анализе результатов количественного ИФА BDNF в сыворотках крови пациентов и контрольной группы использовали следующие статистические тесты: непарный t-тест, непараметрический тест Манна-Уитни, непараметрический вариант ANOVA Краскела-Уоллиса с последующим множественным сравнением Данна.

ОСНОВНЫЕ РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЙ

Получение штамма-продуцента *recBDNF*. При амплификации нуклеотидной последовательности, кодирующей зрелую форму BDNF, из кДНК библиотеки мозга человека, были использованы праймеры, содержащие сайты узнавания для эндонуклеаз рестрикции *Bam*HI и *Xho*I. После лигирования очищенного ампликона BDNF в вектор pET32a, высева на селективную среду и появления колоний было отобрано 10 случайных колоний трансформантов, которые были проверены на наличие вставки. Несколько колоний были отобраны для выделения плазмидной ДНК с целью последующего рестрикционного анализа методом электрофореза в агарозном геле, который выявил образцы, содержавшие вставки ожидаемого размера – 375 п.н. (рис. 2А). При анализе эффективности экспрессии методом диск-электрофореза в ПААГ был выявлен факт активного накопления продукта в первые 3 часа после индукции (рис. 2В). Дальнейшее культивирование не приводило к увеличению выхода рекомбинантного белка *recBDNF*.

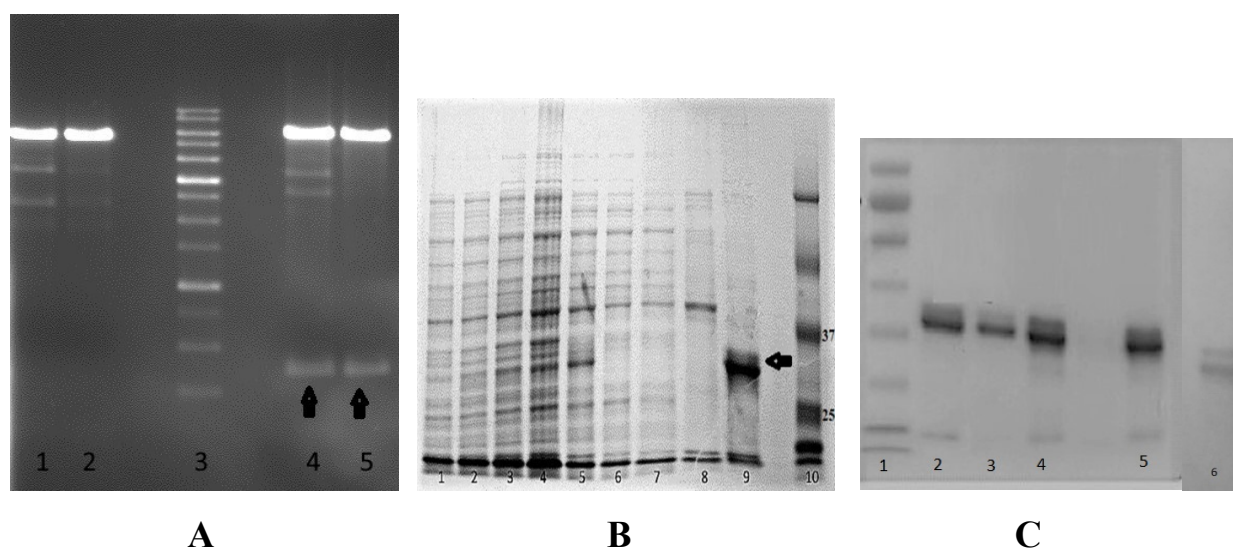


Рис. 2. **А** - Результаты рестрикционного анализа плазмид (pET32a-BDNF). 3 - маркеры мол. масс (GeneRuler DNA Ladder Mix, Thermo Scientific, 1 kb), 1, 2, 4, 5 - плазмидные ДНК из рекомбинантных клонов. Стрелками отмечены вставки с ожидаемой молекулярной массой. **В** - Электрофоретический анализ тотального белка из штамма-продуцента *recBDNF*. Дорожка 10 - маркеры молекулярных масс; дорожка 1 - неиндуцированная культура; дорожки 2-4 - культура после 1, 2 и 3 часов индукции соответственно. 5 - лизат индуцированной культуры, 6 - Проскок с Ni-NTA агарозы, 7 - промывка 1 (pH=8,0), 8 - промывка 2 (pH=6,3), 9 - элюат (стрелкой обозначен *recBDNF*). **С** - Электрофоретический анализ элюатов после проведения металло-хелатной хроматографии с последующим иммуноблотом. 1 – маркеры молекулярной массы (ThermoFisher, США), 2-5 – препараты рекомбинантного белка *recBDNF* после хроматографии. 6 – иммуноблот с анти-BDNF-антителами (Abcam, США)

После металл-хелатной хроматографии на Ni-NTA-агарозе, был проведен электрофоретический анализ элюатов, который выявил бенды с молекулярной массой около 32 кДа, что соответствует ожидаемой массе, так как рекомбинантный

BDNF представляет собой белок слияния, состоящий из аминокислотной последовательности тиоредоксина, сайта распознавания тромбина, сайта распознавания энтерокиназы, последовательности зрелой формы BDNF и гексогистидинового тега на конце. Иммунохимическая идентификация данного белка подтверждена результатами иммуноблота с коммерческими анти-BDNF-антителами (рис. 2С). В нуклеотидной последовательности, которая кодирует mBDNF, были обнаружены 5 видов редких кодонов (таблица 1). Тем не менее экспрессия рекомбинантного белка проходила эффективно и на достаточно высоком уровне, при этом из 1 л индуцированной культуры штамма-продуцента *E. coli* выделяли около 1,5 мг рекомбинантного белка. Полученный препарат ресBDNF был использован для выделения поликлональных антител из антисывороток кролика с помощью иммуноаффинной хроматографии на CN-Br-сефарозе, а также как стандартный антиген при разработке тест-системы ИФА

ccg agg gga gct gag cgt gtg tga cag tat tag tga gtg ggt aac ggc ggc aga caa aaa gac tgc agt gga cat gtc ggg cgg gac ggt cac agt cct tga aaa ggt ccc tgt atc aaa agg cca act gaa gca ata ctt cta cga gac caa gtg caa tcc cat ggg tta cac aaa aga agg ctg cag ggg cat aga caa aag gca ttg gaa ctc cca gtg ccg aac tac cca gtc gta cgt gcg ggc cct tac cat gga tag caa aaa gag aat tgg ctg gcg att cat aag gat aga cac ttc
--

Таблица 1. Нуклеотидная последовательность BDNF (красным выделено редкие кодоны).

Получение поликлональных и моноклональных антител к рекомбинантному BDNF. В связи с тем, что BDNF мышей и кроликов являются практически идентичны BDNF человека, нами были модифицированы стандартные протоколы иммунизации. При первой иммунизации животных в качестве иммуногенного носителя была использована Ni-NT-агароза, в качестве антигена – рекомбинантный белок ресBDNF. Получение полиспецифических антисывороток кролика проводили по стандартной методике. Моноклональные антитела получали с помощью гибридомной технологии. После проведенных аффинных хроматографий были получены чистые препараты поли- и моноклональных антител, поликлональные антитела дополнительно подвергались биотинилированию. В результате иммуногисто- и цитохимического анализов было продемонстрировано специфическое окрашивание на срезах головного мозга крысы (рис. 3А) и в культурах эмбриональных астроцитов человека (рис. 3В), при этом иммунохимическая реакция в контрольных образцах отсутствовала (рис. 3С) (Павлова О.В., Мурашко А.А., 2023).

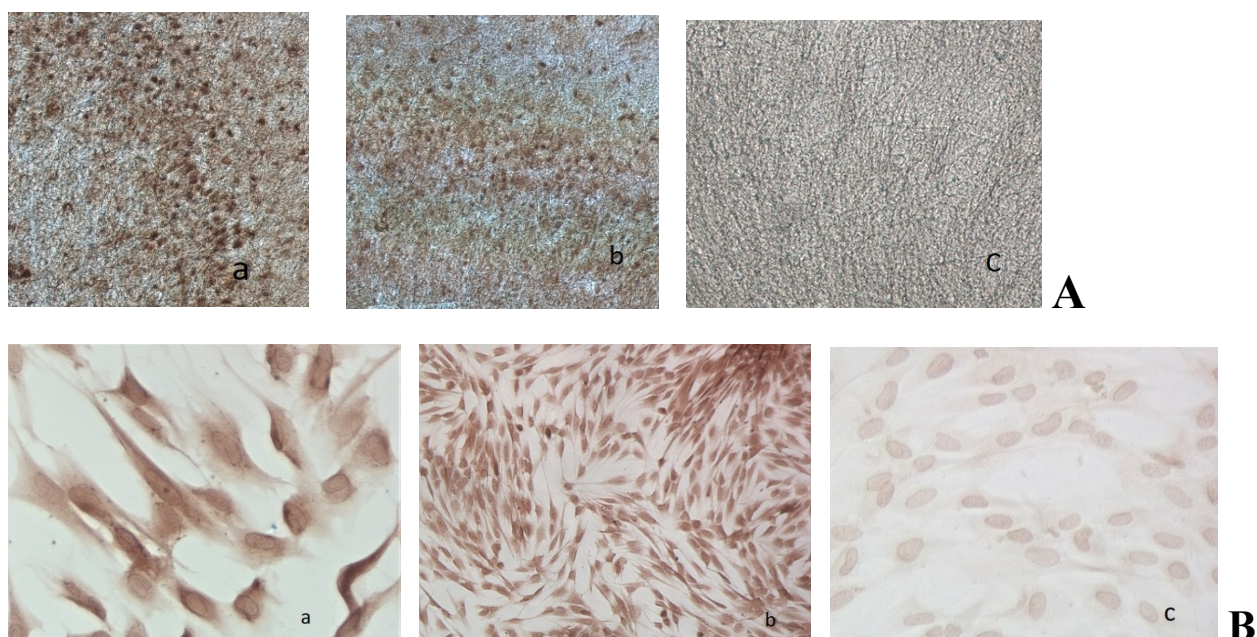


Рис. 3. **А** - иммуногистохимический анализ BDNF на срезах гиппокампа крысы с помощью моноклональных (а) и поликлональных (b) антител, с - отрицательный контроль (без первых антител). **В** - иммуноцитохимический анализ BDNF в культурах эмбриональных астроцитов человека с помощью моноклональных (а) и поликлональных (b) антител, с - отрицательный контроль (без первых антител). Иммунопероксидазный метод.

Моноклональные антитела были отнесены к иммуноглобулинам класса G (рис. 4А). Проведенный аналитический электрофорез в ПААГ с последующим иммуноблотом с recBDNF и коммерческими препаратами NGF и NT-3 не выявил перекрестного реагирования моноклональных антител с другими нейротрофинами (рис. 4В).

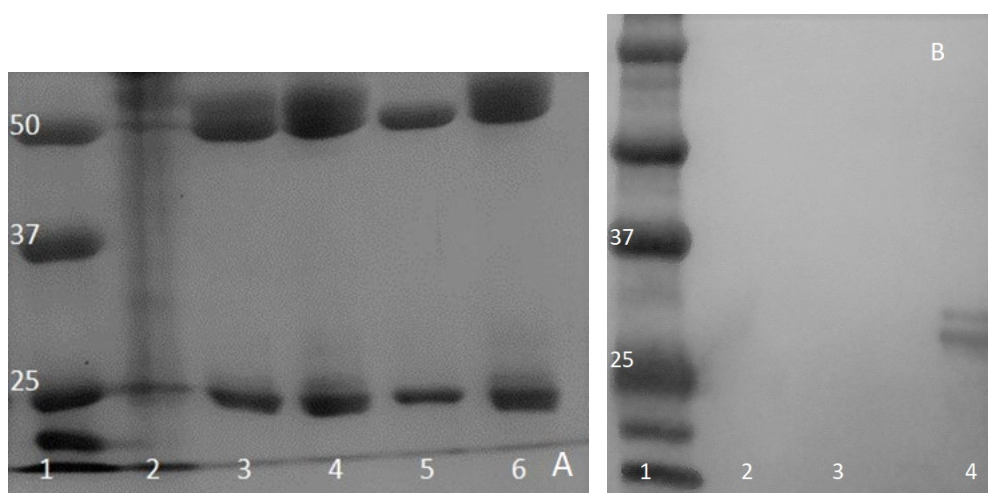


Рис. 4. **А** - электрофореграмма моноклональных антител. 1 – маркеры молекулярных масс, 2-6 – моноклональные антитела (2 – асцит, содержащий моноклональные антитела, 3-6 – чистые препараты моноклональных антител). **В** - результаты иммуноблоттинга с различными видами нейротрофинов. 1-маркеры молекулярных масс, 2-NGF, 3-NT-3, 4-recBDNF.

Средние значения констант аффинности для моноклональных антител превышают значения 10^9 - 10^{11} , следовательно, полученные антитела являются высокоаффинными (табл. 2).

Концентрация recBDNF, нг/мл	OD50	Концентрация mab03, пг/мл	Kaff, $\times 10^{15} \text{ M}^{-1}$	Концентрация recBDNF, нг/мл	OD50	Концентрация mab02, пг/мл	Kaff, $\times 10^{15} \text{ M}^{-1}$
250	1.75	25	0.18	250	1.025	27	0.15
125	1.65	32	0.085	125	1.03	18	0.13
62.5	1.65	25	0.13	62.5	1.03	11	0.1
Среднее значение Kaff= $0,13 \times 10^{15} \text{ M}^{-1}$.				Среднее значение Kaff= $0,127 \times 10^{15} \text{ M}^{-1}$.			

Таблица 2. Определение констант аффинности по результатам ИФА для 2х видов моноклональных антител.

Разработка тест-системы иммуноферментного анализа. При разработке тест-системы ИФА были проведены эксперименты по подбору оптимальных условий проведения данного анализа, в результате которых было определено, что необходимое разведение поликлональных биотинилированных анти-BDNF-антител составляет 1:10000 (т.е. 1 нг/мл), учитывая, что для твердофазного ИФА рекомендуемое максимальное значение оптической плотности (ОП) не должно превышать 2,0 усл. ед., а значения ОП при разведениях от 1:20000 и более приближаются к значениям неспецифического фона (рис. 5А). Оптимальное разведение сывороток крови лежит в диапазоне 1:32 – 1:64, так как при таких разведениях значения ОП максимальные, а абсолютные концентрации BDNF будут превышать концентрации при более меньших разведениях (рис. 5В).

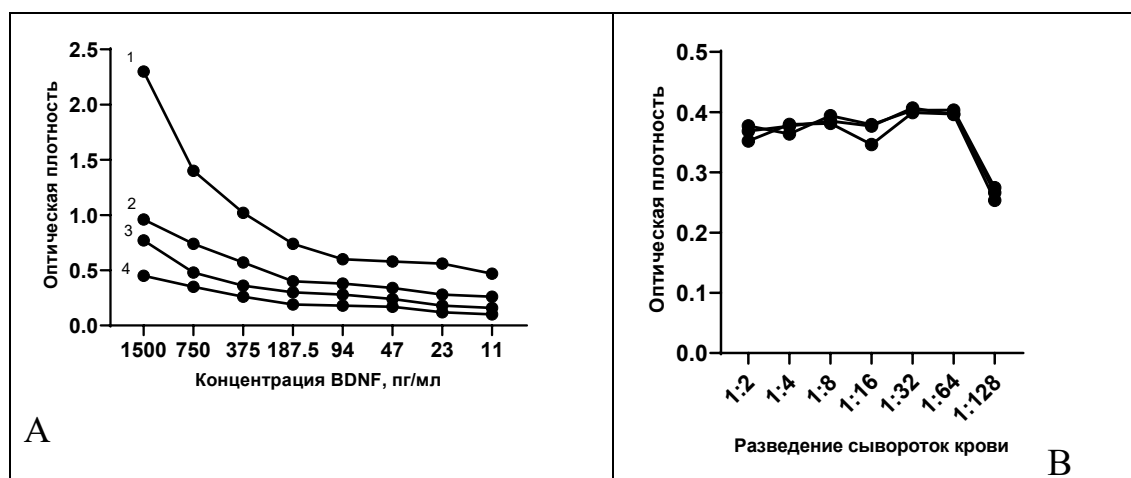


Рис. 5. Графики зависимости оптической плотности А – от концентрации recBDNF в стандартных образцах при различных разведениях поликлональных анти- BDNF антител: 1 – 1:5 000, 2 – 1:10 000, 3 – 1:20 000, 4 – 1:40 000, В – от разведений сывороток крови.

Для тест-системы концентрации калибровочных растворов рекомбинантного белка гесBDNF были взяты в количестве 8 точек последовательного снижения концентраций от 1500 до 10 пг/мл. По результатам определения оптической плотности были построены калибровочные кривые, график одной из них представлен на рис. 6 (Павлова О.В., Мурашко А.А., 2023).

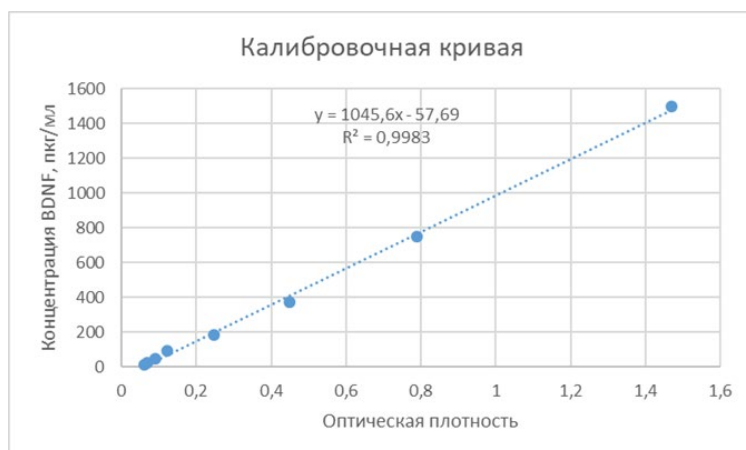


Рис. 6. Калибровочный график зависимости концентраций гесBDNF в стандартных образцах от значений оптической плотности.

Величина достоверности аппроксимации калибровочных кривых составляла не менее 0,98, что позволило адекватно оценивать концентрации BDNF в заданном диапазоне. Были выбраны 5 таких графиков и результатов иммуноферментных анализов, проведенных в разное время, при одних и тех же условиях. На основе этих данных был проведен статистический анализ для валидации разработанной тест-системы. При оценке параметров валидации рассчитывали среднее значение, стандартное отклонение, доверительный интервал и прецизионность, которая характеризовалась коэффициентом вариации и не превышала 10% (табл. 3) (Павлова О.В., Мурашко А.А., 2023). Для разработанной тест-системы была определена чувствительность, которая составила 40 +/- 10 пг.

Концентрации BDNF, пг/мл	Число определений	Среднее значение	Стандартное отклонение	Доверительный интервал	Коэффициент вариации, %
1500	5	1,139	0,014	1,125-1,153	1,2
750	5	0,819	0,0245	0,795-0,844	3
375	5	0,463	0,0093	0,454-0,472	2
187,5	5	0,252	0,0037	0,215-0,289	1,5
93,7	5	0,126	0,0039	0,122-0,130	3
46,8	5	0,096	0,0043	0,092-0,100	4,5
23,4	5	0,073	0,0037	0,069-0,077	5,1
11,7	5	0,065	0,0034	0,062-0,068	5,3

Таблица 3. Точность и воспроизводимость калибровочных кривых иммуноферментного определения гесBDNF, проведенных в разное время при одинаковых условиях.

А также подтверждена специфичность тест-системы результатами иммуногисто- и цитохимических анализов и отсутствием перекрестного реагирования моноклональных антител с другими нейротрофинами. Общее время анализа составляет в среднем около 5 часов, исключая время на иммобилизацию моноклональных антител (12 часов).

Количественный анализ BDNF в сыворотках крови пациентов с помощью разработанной тест-системы ИФА. Для верификации разработанной тест-системы был проведен эксперимент по определению уровней BDNF в сыворотке крови пациентов (общим количеством – 120 человек): 1 группа – с шизофренией (МКБ – F20), 2 группа – с депрессивными расстройствами, имеющих суицидальные попытки в анамнезе, 3 группа – с первым психотическим эпизодом, а также была использована сыворотка крови условно здоровых доноров (контрольная группа, 100 чел.). В результате проведенного иммуноферментного анализа BDNF в сыворотках крови пациентов выявилось, что содержание этого белка в сыворотках крови контрольной группы по сравнению с группой пациентов значимо выше ($p < 0,0001$) (рис. 6) (Павлова О.В., Гурина О.И., 2023).

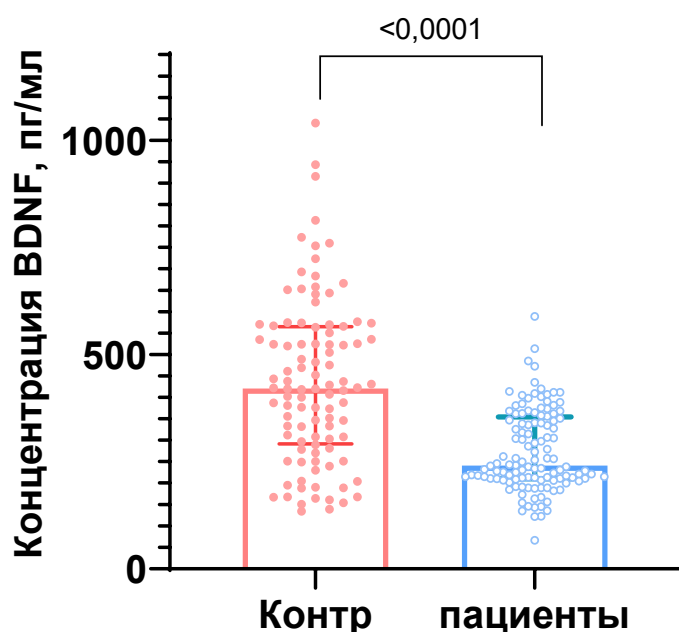


Рис. 6. Результаты ИФА BDNF сывороток крови условно здоровых доноров (контр. группа) и пациентов с психическими заболеваниями (группа пациенты). Результаты представлены как количественные значения BDNF и показаны как медианы и межквартильные интервалы, непараметрический тест (тест Манна-Уитни).

При разделении пациентов на группы значимые отличия по сравнению с контролем выявляются у 3 групп пациентов: с депрессивными расстройствами с суицидальными попытками в анамнезе и с шизофренией с депрессивными проявлениями ($p < 0,0001$), а также у группы пациентов с первым психотическим

эпизодом с маниакальными проявлениями ($p < 0,0076$) (рис. 7) (Павлова О.В., Гурина О.И., 2023).

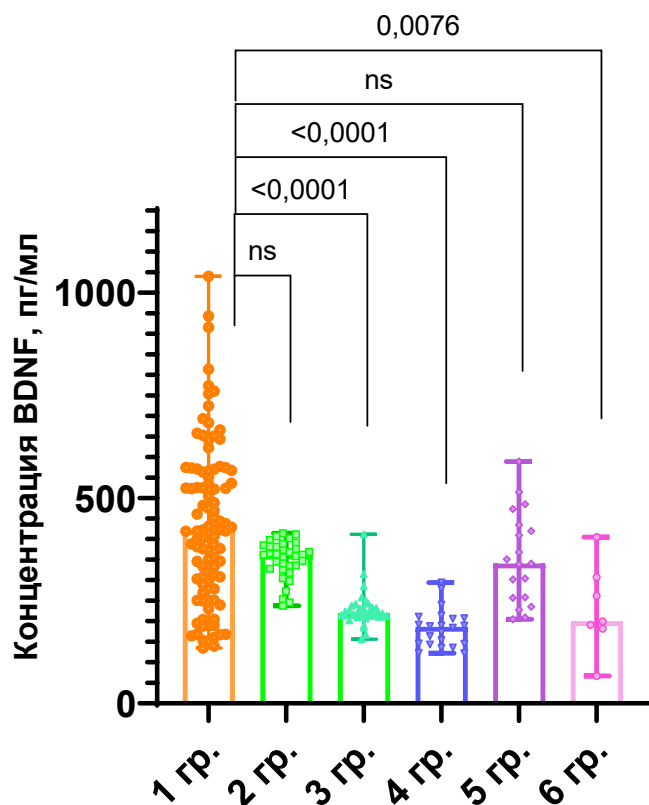


Рис. 7. Результаты ИФА BDNF сывороток крови условно здоровых доноров (1 группа) и пациентов с психическими заболеваниями: 2 гр. – шизофрения без депрессивных проявлений, 3 гр – шизофрения с депрессивными проявлениями, 4 гр. – депрессивные расстройства с суицидальными попытками в анамнезе, 5 гр. – первый психотический эпизод без аффективных нарушений, 6 гр. – первый психотический эпизод с маниакальными проявлениями. Результаты представлены как количественные значения BDNF и показаны как медианы и межквартильные интервалы, непараметрический вариант ANOVA Краскела-Уоллиса с последующим множественным сравнением Данна, ns – $>0,9999$.

В целом результаты проведенных экспериментов по сравнению уровней BDNF у здоровых людей и больных психическими расстройствами согласуются с данными мировых исследований. Дополнительно были выявлены некоторые различия в группах пациентов, что в дальнейшем может применяться для дифференциальной диагностики, а также для прогнозирования суицидального поведения.

ОБСУЖДЕНИЕ

Открытие технологии рекомбинантных ДНК и методов переноса генов из одного организма в другой совершила настоящую революцию в биологии. Благодаря динамично развивающимся системам для трансгенной экспрессии белков, на настоящий момент у исследователя существует целый арсенал инструментов для быстрого клонирования, экспрессии, выделения и очистки интересующего белка.

Основной целью данной работы была разработка тест-системы иммуноферментного анализа BDNF в сыворотке крови с использованием рекомбинантного белка BDNF и антител, полученных при иммунизации этим антигеном, что требует достаточное количество белковых препаратов. Традиционные биохимические процедуры выделения из гомогенатов ткани мозга весьма трудоемки и малопродуктивны из-за небольшого содержания этого белка в мозге и многоступенчатой и сложной очистки. А также возникают сложности при стандартизации такого препарата, необходимой для достижения высоких качественных показателей: специфичности и чувствительности диагностической тест-системы. Впервые BDNF был выделен и очищен из мозга свиньи в 1982 г., при этом из 1,5 кг мозга свиньи получили 1 мкг чистого препарата белка (Barde Y.A., 1982). Но и сегодня получение нативного белка биохимическими методами является трудоемкой и дорогой процедурой, что соответственно отражается на стоимости подобного продукта. Если же биологическая активность белка не является критическим фактором, поскольку для успешного получения моно- и поликлональных антител требуется только правильная аминокислотная последовательность белка, гораздо более продуктивными являются методы получения рекомбинантных белков в *E. coli* (Francis D.M., 2010). В настоящее время подобные генно-инженерные процедуры стали уже рутинными. Создав однократно эффективный бактериальный штамм-продуцент, можно в дальнейшем получать высококачественный белок в неограниченных количествах.

При получении рекомбинантного белка гесBDNF был использован штамм *E. coli* BL2[DE3], содержащий в своем геноме ген РНК-полимеразы фага T7 в составе профага λ , помещенный под контроль lac-промотора. Этот штамм трансформировали плазмидой pET32a, содержащей нуклеотидную последовательность, кодирующую mBDNF, под контролем T7-промотора, который обеспечивает эффективную и высокую экспрессию рекомбинантного белка (Глик Б., 2002). При добавлении в среду ИПТГ происходила индукция гена РНК-полимеразы T7, при этом синтезировалась РНК-полимераза и происходила транскрипция и трансляция клонированной последовательности. Штамм BL2[DE3] с экспрессирующей плазмидой pET32a часто используют для получения разнообразных рекомбинантных белков с высоким выходом целевого белка (Krishnan G., 2019; Gholami M., 2018).

Причиной низкой эффективности экспрессии рекомбинантных белков в прокариотических системах также может быть возникновение стабильной вторичной структуры РНК в области сайта инициации трансляции, затрудняющей связывание малой субъединицы рибосомы с мРНК, кодирующей рекомбинантный белок (Ivanov A.V., 2006; Hatfield G. W., 2007). В данной работе использовалась вставка, которая кодировала последовательность тиоредоксина, что позволило избежать этой проблемы, так как трансляция мРНК, кодирующей рекомбинантный белок, начинается с трансляции последовательности N-терминального белка тиоредоксина и обеспечивает отсутствие образованных РНК вторичных структур в области сайта связывания рибосомы и, следовательно, эффективную инициацию трансляции (LaVallie E. R., 2003). Другой причиной снижения экспрессии в *E. coli* является наличие редких кодонов в эукариотических генах, которые с низкой частотой встречаются в бактериальных геномах. При экспрессии гетерологичных

генов, содержащих редкие кодоны, нарушения при трансляции могут привести к низкому выходу, агрегации и образованию телец включения (Correddu D., 2020). В нуклеотидной последовательности, которая кодирует mBDNF, были обнаружены 5 видов редких кодонов, тем не менее экспрессия проходила эффективно и на достаточно высоком уровне (из 1 л культуры штамма *E. coli*, в среднем, получали 1,5 мг рекомбинантного белка).

Рекомбинантный белок гесBDNF является белком слияния, состоящим из аминокислотной последовательности тиоредоксина, последовательности mBDNF и гексогистидинового тега на конце, что позволяет выделить с помощью металл-хелатной хроматографии достаточное количество рекомбинантного белка для иммунизации животных, получения чистых препаратов поликлональных антител с помощью иммуноаффинной хроматографии и разработки тест-системы иммуноферментного анализа.

Основной проблемой получения антител к BDNF является высокий процент гомологии с BDNF человека (Keifer J., 2021), что значительно снижает, либо сводит на нет эффективность иммунизации животных (кроликов и мышей). С целью получения поли- и моноклональных антител были использованы модифицированные протоколы, что привело к возникновению адекватного иммунного ответа, при этом высокий титр специфических антител наблюдался уже через два цикла иммунизации. Полученные моноклональные антитела были высокоаффинными со средней константой аффинности $0,13 \times 10^{15} \text{ M}^{-1}$, и не проявляли перекрестной иммунореактивности с другими нейротрофинами, несмотря на 50% гомологию аминокислотных последовательностей с BDNF (Bothwell M., 2014).

Специфичность поли- и моноклональных антител по связыванию нативного белка BDNF была подтверждена иммуногистохимическим анализом срезов гиппокампа крыс, где было продемонстрировано специфическое окрашивание, и иммуноцитохимическим анализом культуры астроцитов со специфическим окрашиванием данных клеток. Выбор астроцитарной культуры клеток обусловлен тем фактом, что астроциты *in vitro* являются реактивными, что подтверждается высоким уровнем экспрессии GFAP, при этом известно, что реактивные астроциты способны экспрессировать BDNF и другие факторы (Patabendige A., 2021).

Разработанная тест-система представляет собой твердофазный сэндвич-вариант иммуноферментного анализа, где на поверхность твердой фазы прикрепляются моноклональные анти-BDNF-антитела, распознающие один из эпитопов анализируемого антигена. После добавления образца, содержащего антиген, на поверхности «твердой фазы» образуются иммунные комплексы, к которым присоединяются поликлональные анти-BDNF-антитела, направленные к разным эпитопам антигена. В результате образуются тройные комплексы — «сэндвичи», в которых молекула антигена оказывается «зажатой» между молекулой моноклональных антител и молекулой поликлональных антител. Благодаря такому бивалентному взаимодействию антител с молекулами антигена, в сэндвич-методе могут образовываться очень прочные циклические комплексы, и показано, что, будучи энергетически более выгодными, эти циклические структуры формируются даже при низкой концентрации антигена, при этом многократно увеличивается аналитическая чувствительность метода (Ehrlich P.H., 1984).

При валидации тест-системы были определены воспроизводимость получаемых результатов, чувствительность, качество, а также подобраны оптимальные условия проведения данного анализа (разведение сывороток крови – 1:50, концентрация поликлональных биотинилированных анти-BDNF антител – 1 нг/мл). Чувствительность, как самая низкая определяемая концентрация анализируемого вещества, составила 40 +/- 10 пг/мл. Качество иммуноферментной тест-системы было исследовано при построении калибровочных графиков по результатам определения оптической плотности и известным концентрациям антигенов в стандартных пробах, при этом отмечается прямолинейность таких зависимостей на графиках, а также значения коэффициентов детерминации R^2 было не менее 0,98. Воспроизводимость оценивалась по калибровочным графикам иммуноферментного определения BDNF (проведенных в разное время, при одних и тех же условиях), при этом использовали несколько разведений стандартного антигена, измеряя оптическую плотность при каждом варианте концентрации 5 раз. Рассчитанный по результатам измерений коэффициент вариации не превышал 10% при каждом варианте. Таким образом, тест-система твердофазного иммуноферментного анализа с использованием рекомбинантного антигена и антител, полученных при иммунизации антигеном, для количественного определения BDNF в сыворотке крови человека является специфичной, легко воспроизводимой и стандартизированной системой.

Изменения уровней BDNF связаны с этиологией и патогенезом психических заболеваний, кроме того, многие исследователи рассматривают возможность использовать данный белок в качестве потенциального биомаркера при диагностике и оценке эффективности лечения депрессивных расстройств, шизофрении, болезни Альцгеймера (Узбеков М.Г. 2016; Woods A. G., 2019; Peng S., 2018; Gao L., 2022).

Разработанная тест-система сэндвич-варианта ИФА была апробирована в эксперименте по количественному определению BDNF в сыворотках крови пациентов с психическими заболеваниями и контрольной группы условно здоровых доноров. Проведенные исследования показали, что уровни BDNF в группе пациентов значимо ниже, чем в контрольной выборке.

Наименьший уровень BDNF оказался в группе пациентов с депрессивными расстройствами с суицидальными попытками в анамнезе. Такое снижение может служить возможным предиктором склонности к суицидальному поведению, что весьма важно для прогноза развития депрессивных расстройств.

Снижение экспрессии BDNF ранее было описано для группы пациентов, покончивших жизнь самоубийством при сравнении с контрольной группой людей, умерших в результате ДТП (Erbay L. G., 2021). Более ранние исследования, проведенные на пациентах с суицидальными попытками и здоровых людях, также обнаружили значительную связь низких уровней BDNF в сыворотке крови с суицидальным поведением (Deveci A., 2007). С другой стороны, при изучении взаимосвязи между уровнями BDNF в сыворотке крови и недавними попытками самоубийства (в течение последних трех месяцев) в большой клинической выборке с использованием метода случай-контроль, выяснилось, что уровень BDNF не был достоверно связан с попыткой самоубийства (Eisen R. B., 2016). В основе таких неоднозначных результатов могут лежать: разная этиология заболеваний,

неоднородность выборки (пол, возраст и др.) и измерений (плазма, сыворотка). Недавний мета-анализ подтверждает такие выводы – между двумя группами сравнения (психиатрические пациенты с попытками самоубийства в анамнезе и пациенты без попыток) не было обнаружено существенных различий в уровнях периферического BDNF, хотя анализ подгрупп показал, что уровни BDNF были снижены в плазме, но не в сыворотке (Fusar-Poli L., 2021).

У пациентов с шизофренией также было обнаружено снижение BDNF по сравнению с контрольной группой. Такие результаты согласуются с проведенными ранее исследованиями содержания BDNF у пациентов с шизофренией, где показано снижение уровней этого белка в сыворотке крови пациентов по сравнению со здоровыми людьми (Zhu X., 2022; Han D., 2021), при этом у пациентов с депрессивной симптоматикой обнаруживались более низкие показатели BDNF (Manchia M., 2022).

Выявленное снижение уровней BDNF в сыворотке крови пациентов с первым психотическим эпизодом с маниакальными проявлениями описано в литературе, когда у пациентов с биполярным расстройством выявилась значительная положительная корреляция между оценками по шкале мании Янга и снижением уровней BDNF в сыворотке крови по сравнению со здоровыми людьми (Chiou Y.-J., 2019).

Последней группой пациентов, у которых количественно определяли BDNF с помощью разработанной тест-системы, были пациенты с первым психотическим эпизодом (ППЭ) без аффективных нарушений. Эта группа не показала значимых отличий по уровню BDNF в сыворотке крови по сравнению с контрольной выборкой. По данным литературы результаты исследований в этой области несколько неоднородны. С одной стороны, не было обнаружено значимой корреляции между BDNF и баллами по шкале оценки позитивных и негативных синдромов (PANSS) у пациентов с ППЭ (Hatziagelaki E., 2019), при этом, сравнение проводилось в группе пациентов. С другой стороны, у пациентов с неаффективным ППЭ средние уровни BDNF были снижены по сравнению со здоровыми людьми (Aydin M. S., 2020). Также недавний мета-анализ данных о периферических уровнях BDNF у пациентов с ППЭ показал достоверное снижение BDNF в группе пациентов при сравнении со здоровыми контрольными группами, при этом, учитывая большую гетерогенность исследований, дополнительный сравнительный анализ выявил, что корреляции низкого уровня BDNF были связаны с более молодым возрастом, тяжестью симптомов и отсутствием лечения (Singh S., 2022).

В целом результаты проведенных экспериментов по сравнению уровней BDNF у здоровых людей и больных психическими расстройствами согласуются с данными мировых исследований. Дополнительно были выявлены некоторые различия в группах пациентов, что в дальнейшем может применяться для дифференциальной диагностики, а также для прогнозирования суицидального поведения.

Таким образом, разработанная тест-система количественного определения BDNF в сыворотке крови является диагностически значимой, учитывая выявленные статистически достоверные отличия уровня BDNF у пациентов с психическими заболеваниями по сравнению с контрольной группой, а также у групп пациентов с

депрессивными проявлениями. Важным преимуществом данной тест-системы, созданной на основе рекомбинантного препарата BDNF человека, является возможность стандартизовать все компоненты системы. Трансформированный штамм-продуцент *E. coli* синтезирует один и тот же белок, обладающий одинаковыми физико- и иммунохимическими характеристиками, с другой стороны, антителы являются специфичными, способны выявлять нативный белок в сыворотках крови, что позволяет производить стандартные тест-системы неограниченно долго и, практически, в любых количествах.

Внедрение данной тест-системы в практическое здравоохранение позволит расширить возможности скрининга, мониторинга течения и эффективности проводимой терапии пациентов с психическими заболеваниями.

ВЫВОДЫ

- Клонирование вставки, кодирующей последовательность mBDNF человека, в вектор pET32a с последующей трансформацией штамма *E. coli* (BL21[DE3]) обеспечивает высокую экспрессию рекомбинантного белка, при этом одноэтапная очистка индуцированных бактериальных культур на Ni-NTA агарозе позволяет получать чистые препараты белка, иммунохимически идентичного нативному BDNF, что подтверждается результатами иммуногисто- и цитохимического анализов.
- Полученные путем иммунизации по модифицированным протоколам рекомбинантным препаратом гесBDNF, поликлональные и моноклональные антитела способны специфично распознавать и связываться с нативным BDNF в таких видах иммунохимического анализа как иммуноблот анализ, иммуноцит- и гистохимический анализ, твердофазный иммуноферментный анализ и не проявляют кросс-реактивности с другими нейротрофинами (NGF, NT-3).
- Разработанная тест-система твердофазного иммуноферментного анализа с использованием рекомбинантного антигена и антител, полученных при иммунизации антигеном, для количественного определения BDNF в сыворотке крови человека является специфичной, легко воспроизводимой, стандартизированной системой и характеризуется порогом чувствительности 40 +/- 10 пг/мл.
- При скрининге сывороток крови с использованием разработанной тест-системы ИФА BDNF выявлено достоверное снижение уровня BDNF у пациентов с психическими расстройствами по сравнению с группой условно здоровых доноров. Наименьший уровень BDNF оказался в группе пациентов с депрессивными расстройствами с суицидальными попытками в анамнезе. Такое снижение может служить предиктором склонности к суицидальному поведению, что весьма важно для прогноза развития депрессивных расстройств. Разработанная тест-система обладает высокой диагностической значимостью, учитывая выявленные статистически достоверные отличия уровня BDNF у пациентов с психическими заболеваниями по сравнению с контрольной группой.

СПИСОК РАБОТ, ОПУБЛИКОВАННЫХ ПО ТЕМЕ ДИССЕРТАЦИИ

Статьи в рецензируемых журналах

1. Pavlova O. 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. Pavlova O. 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. Павлова О.В. Разработка количественного иммуноферментного анализа нейротрофического фактора мозга на основе рекомбинантного антигена. / Павлова, О.В., Мурашко, А.А., Андрющенко, 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, включен в базу данных WoS).
4. Павлова О.В. 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, включен в базу данных Scopus).

Тезисы докладов на конференциях

1. Павлова О.В. Тест-система иммуноферментного анализа для количественного определения нейротрофического фактора мозга в сыворотке крови. / Павлова, О.В., Мурашко, А.А., Павлов, К.А., Гурина, О.И. // *Сборник трудов VI Междисциплинарной конференции "Современные проблемы системной регуляции физиологических функций"* Москва – стр. 414-417 – 2022.
2. Павлова О.В. Моноклональные антитела к рекомбинантному нейротрофическому фактору мозга: перспективы использования в клинико-лабораторной диагностике. / Павлова, О.В., Павлов, К.А., Гурина, О.И. // *Материалы международного конгресса Биотехнология: состояние и перспективы развития*, Москва – Выпуск 20, стр. 61-63 – 2022.

СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ И ОБОЗНАЧЕНИЙ

BDNF (brain-derived neurotrophic factor) – нейротрофический фактор мозга.

mBDNF (mature BDNF) – зрелая форма нейротрофического фактора мозга.

PBS (phosphate-buffered saline) – фосфатно-солевой буфер.

recBDNF (recombinant BDNF) – рекомбинантный белок, содержащий аминокислотную последовательность нейротрофического фактора мозга человека.

ИФА – иммуноферментный анализ.

ПААГ – полиакриламидный гель.

Периферический BDNF – BDNF, содержащийся в периферической крови.

Центральный BDNF – BDNF, содержащийся в центральной нервной системе.

ЦНС – центральная нервная система.