

ОТЗЫВ ОФИЦИАЛЬНОГО ОППОНЕНТА

доктора химических наук, член-корреспондента РАН Смирнова Ивана Витальевича на диссертационную работу Павловой Ольги Валерьевны «Рекомбинантный BDNF. Получение моноклональных антител, разработка тест-системы иммуноферментного анализа и клинико-лабораторная диагностика», представленную на соискание ученой степени кандидата биологических наук по специальности 1.5.4. – Биохимия.

Актуальность работы. Диссертационная работа Павловой Ольги Валерьевны посвящена решению актуальной проблемы современной психиатрии – поиску объективных биомаркеров, изменения которых связаны с этиологией и патогенезом психических заболеваний. Известно, что уровни нейротрофического фактора мозга (BDNF) снижаются при аффективных расстройствах, при этом такие изменения выявляются как в ткани головного мозга, так и в периферической крови. В связи с этим, разработка надежного и малоинвазивного метода, позволяющего достоверно определять концентрацию BDNF в сыворотке крови, представляется актуальным и своевременным исследованием.

Научная новизна заключается в том, что полученный в ходе работы рекомбинантный BDNF, являющийся белком слияния и содержащий аминокислотную последовательность mBDNF (mature BDNF) и тиоредоксина, обладает идентичными нативному белку иммунохимическими свойствами, также были разработаны модифицированные протоколы иммунизации, что позволило преодолеть иммунологическую толерантность, обусловленную межвидовой идентичностью BDNF, и получить антитела, специфически распознающие нативный антиген в иммуноферментном анализе. Кроме того, впервые был 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.

Теоретическая и практическая значимость результатов исследования. Диссертационная работа Павловой О.В. имеет несомненную научную значимость, так как полученные результаты вносят существенный вклад в научные представления о возможности использовать уровни BDNF в сыворотке крови как объективный диагностический маркер развития отдельных психических заболеваний. Практическая значимость заключается в том, что разработанная тест-система иммуноферментного анализа BDNF позволяет воспроизводимо, специфично и достоверно осуществлять количественный мониторинг уровня BDNF в сыворотке крови при психических заболеваниях и может быть использована в клинικο-лабораторной практике.

Обоснованность научных положений и выводов, сформулированных в диссертационной работе Павловой О.В., подтверждается как результатами проведенного собственного исследования, так и данными мировой литературы. Поставленные в работе задачи решены с использованием практически всего спектра подходов, используемых в современной препаративной и аналитической биохимии. Автором получен большой объем данных, математический анализ которых выполнен корректно с помощью современных статистических методов. Достоверность результатов исследования никаких сомнений не вызывает.

Достоверность научных положений и выводов подтверждается иммунохимическими и биохимическими методами, корректно проведенным статистическим анализом. Результаты исследования соответствуют данным, представленным в отечественной и зарубежной литературе. Выводы аргументированы и вытекают из проведенных исследований.

Анализ содержания работы. Диссертационная работа Павловой О.В. написана хорошим литературным языком, изложена на 154 страницах машинописного текста и состоит из введения, обзора литературы, описания методики исследования, полученных результатов и их обсуждения, выводов,

списка сокращений, списка использованной литературы. Список литературы включает 240 источников, из них 230 зарубежных. Диссертационная работа проиллюстрирована 34 рисунками и 5 таблицами.

Во введении автор описывает актуальность имеющейся научной проблемы, формулирует цель, задачи исследования. Первая глава диссертационной работы является Обзором литературы и содержит информацию об имеющихся на сегодняшний день данных по изучаемой проблеме. В частности, достаточно подробно описаны механизмы функционирования BDNF, его вовлеченности в аффективные расстройства и возможные механизмы его регуляции. Текст обзора снабжен рисунками, что в значительной мере облегчает понимание материала. Также в обзоре литературы рассматриваются материалы публикаций, посвященных исследованию корреляций между содержанием BDNF в центральной нервной системе и в периферической крови при различных психических заболеваниях, что необходимо для обоснования постановки цели и задач диссертационного исследования.

Во второй главе («Материалы и методы») автором подробно описаны использованные методы исследования: ПЦР-амплификация, молекулярное клонирование, различные виды электрофореза, хроматографические методы, иммуноблот, иммуноморфологический и иммуноферментный виды анализа. Для статистического анализа при валидации тест-системы и обработке полученных данных после проведения серий ИФА применен пакет программ PRISM 8.0 и Microsoft Excel 2016.

Результаты исследования изложены четко и последовательно, хорошо иллюстрированы и, что важно, отдельные параграфы внутри главы завершаются лаконичными обобщениями. После получения рекомбинантного белка были иммунизированы экспериментальные животные и выделены поликлональные антитела, моноклональные антитела методом гибридомной технологии. На основе данных препаратов после определения их

специфичности и иммунохимических свойств была разработана тест-система иммуноферментного анализа количественного определения BDNF в сыворотке крови. В результате проведенных исследований были выявлены статистически значимые и достоверные отличия в содержании этого белка у пациентов с психическими заболеваниями по сравнению с условно здоровыми донорами.

Результаты исследования подробно обсуждены в главе 4 «Обсуждение». Эта глава представляет собой глубокий и всесторонний анализ всех полученных в ходе исследования научных фактов. В процессе трактовки результатов диссертант опирается на представленные в литературе точки зрения относительно рассматриваемых вопросов.

Диссертационная работа содержит 4 вывода, которые четко сформулированы, резюмируют полученные данные и полностью соответствуют поставленным задачам.

Общая оценка работы и ее соответствие требованиям, предъявляемым к кандидатским диссертациям. Диссертация Павловой О.В. представляет собой важное, интересное и профессионально выполненное исследование, соответствующее статусу научно-квалификационного труда. Диссертация написана понятным языком, используемая автором терминология общепринята, работа построена логично и хорошо структурирована. Автореферат оформлен согласно рекомендациям ВАК, в нем отражены ключевые положения диссертационной работы.

Полученные в ходе исследования результаты опубликованы в 4 статьях в научных рецензируемых изданиях, входящих в перечень ВАК РФ, индексируемых в Web of Science и Scopus и рекомендованных для публикации основных научных результатов диссертаций на соискание ученых степеней доктора и кандидата наук. Материалы диссертации докладывались на 2 научных конференциях и конгрессах с международным участием.

Вопросы и замечания по содержанию диссертации.

1. Обзор литературы, приведенный диссертационной работе, достаточно подробен и, возможно, избыточен. В частности, приведение литературных данных относительно полиморфизмов BDNF несколько выпадает из цельной логики работы.
2. При определении константы аффинности рекомендуется использовать в качестве варианта сравнения другие антитела или IgG.
3. Учитывая вариабельность содержания BDNF между людьми и у одного и того же человека, какие могут быть рекомендации при проведении ИФА?

Указанные замечания не снижают научной значимости данного исследования, а общая оценка диссертационной работы Павловой О.В. остается положительной.

Заключение. Диссертационная работа Павловой О.В. «Рекомбинантный BDNF. Получение моноклональных антител, разработка тест-системы иммуноферментного анализа и клинико-лабораторная диагностика» является законченной научно-квалификационной работой, выполненной под руководством член-корреспондента РАН, доктора медицинских наук, профессора Гуриной Ольги Ивановны, содержащей новое решение актуальной научной задачи – разработка тест-системы ИФА, которая позволяет воспроизводимо, специфично и достоверно осуществлять количественный мониторинг уровня нейротрофического фактора мозга в сыворотке крови при психических заболеваниях, что имеет существенное значение для биохимии, нейробиологии и практической психиатрии.

Диссертация Павловой О.В. полностью соответствует требованиям п.9 Положения о присуждении ученых степеней, утвержденного постановлением Правительства Российской Федерации №842 от 24.09.2013 г. (с изменениями в редакции постановлений правительства Российской Федерации №335 от 21.04.2016 г., №748 от 02.08.2016 г., № 650 от 29.05.2017 г., № 1024 от 28.08.2017 г., № 1168 от 01.10.2018 г., № 426 от 20.03.2021г., № 1539 от

11.09.21г., № 1690 от 26.09.22г., № 101 от 26.01.23г.), а ее автор заслуживает присуждения ученой степени кандидата биологических наук по специальности 1.5.4. – Биохимия.

Официальный оппонент:

доктор химических наук

(03.01.06 — Биотехнология (в том числе бионанотехнологии)),

заместитель директора по научной работе,

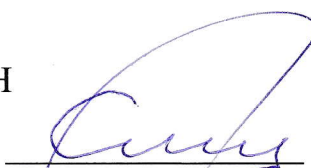
главный научный сотрудник

лаборатории химии протеолитических ферментов

ФГБУ Науки Институт биоорганической химии

им. академиков М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова РАН

член-корреспондент РАН

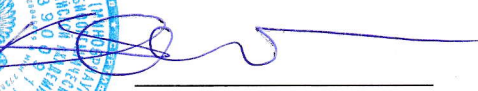

4.12.23г. Смирнов И.В.

Подпись заместителя директора по научной работе, главного научного сотрудника лаборатории химии протеолитических ферментов ФГБУ Науки Институт биоорганической химии им. академиков М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова РАН член-корреспондента РАН, доктора химических наук Смирнова Ивана Витальевича заверяю.

Ученый секретарь ИБХ РАН,

доктор физико-математических наук




Олейников В.А.

Федеральное государственное бюджетное учреждение науки Институт биоорганической химии им. академиков М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова Российской академии наук (ИБХ РАН)

117997, г. Москва, ГСП-7, улица Миклухо-Маклая, дом 16/10.

Тел. +7(926)739-78-65.

Электронная почта: ivansmr@inbox.ru