

20.11.23. № 520**УТВЕРЖДАЮ****Зам. директора по научной работе****ФГБНУ «Научно-исследовательский институт
биомедицинской химии имени В.Н. Ореховича»****доктор биологических наук**
Плешакова Т.О.**«20» ноября 2023 г.****Отзыв ведущей организации**

Федерального государственного бюджетного научного учреждения «Научно-исследовательский институт биомедицинской химии имени В.Н. Ореховича» на диссертацию Павловой Ольги Валерьевны на тему «Рекомбинантный BDNF. Получение моноклональных антител, разработка тест-системы иммуноферментного анализа и клинико-лабораторная диагностика», представленную к защите на соискание ученой степени кандидата биологических наук по специальности 1.5.4. – биохимия.

Актуальность темы исследования

Диссертационная работа Павловой О.В. посвящена актуальной проблеме современной медицины и психиатрии – поиску объективных показателей (биомаркеров), необходимых для своевременной диагностики и оценки эффективности применяемой терапии. По данным мировой литературы снижение уровней нейротрофического фактора мозга выявляется при различных психических заболеваниях, включая депрессивные расстройства.

Также были обнаружены достоверные корреляции между содержанием данного белка в центральной нервной системе и в периферической крови при психопатологиях, что подтверждает возможность использования данного фактора в качестве диагностического маркера.

В работе представлена разработка тест-системы иммуноферментного анализа для количественного определения нейротрофического фактора мозга в сыворотке крови человека с последовательным получением всех компонентов – рекомбинантного белка, поли- и моноклональных антител к нему; валидации и верификации данной тест-системы при скрининге образцов крови пациентов с психическими заболеваниями и контрольной группы. Внедрение такого набора ИФА российского производства, позволяющего определять концентрацию нейротрофического фактора мозга в периферической крови человека, в практическое здравоохранение позволит расширить возможности скрининга, мониторинга течения и эффективности проводимой терапии пациентов с психическими заболеваниями. Таким образом, актуальность работы сомнений не вызывает.

Новизна и практическая значимость результатов проведенных исследований

В ходе исследования впервые показано, что рекомбинантный BDNF, являющийся белком слияния и содержащий аминокислотную последовательность зрелого BDNF и тиоредоксина, обладает идентичными нативному белку иммунохимическими свойствами.

Также модифицированные протоколы иммунизации впервые позволили преодолеть иммунологическую толерантность, обусловленную межвидовой идентичностью BDNF, и получить антитела, специфически распознающие нативный антиген в иммуноферментном анализе.

Основной практической значимостью работы является разработанная тест-система ИФА, которая 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.

Степень достоверности результатов

В работе О.В. Павловой использованы современные биохимические и молекулярно-биологические методы. Анализ полученных данных проводился с помощью адекватных статистических подходов и соответствующего программного обеспечения. Достоверность результатов не вызывает сомнений.

О.В. Павловой на защиту вынесено три положения, содержащих конкретные результаты проведенных исследований. Указанные положения полностью, последовательно и аргументированно обоснованы в тексте диссертации, а также в работах автора. Автором опубликовано 4 научные статьи в журналах, рекомендованных ВАК РФ.

Результаты работы представлены автором лично в виде устных и стендовых докладов на двух научных конференциях и конгрессах с международным участием.

Структура и содержание диссертационной работы

Диссертационная работа О.В. Павловой изложена в традиционном стиле: изложена на 154 машинописных страницах; состоит из введения, 4 глав, выводов и библиографического указателя. В основных главах работы приведены данные обзора литературы, характеристика объекта, методов исследования, а также используемого материала, результаты собственных исследований и их обсуждение.

Диссертация иллюстрирована 34 рисунками и 5 таблицами.

Во **введении** сформулированы цель и задачи работы, представлены положения, выносимые на защиту, автор обосновывает актуальность и новизну работы, ее теоретическую и практическую значимость. В этом разделе также кратко описаны методы исследования, информация о степени личного участия автора в получении научных результатов, данные о публикациях по теме диссертационной работы.

Обзор литературы посвящен обсуждению современных аспектов особенностей функционирования нейротрофического фактора мозга в центральной нервной системе, возможных механизмов регуляции его синтеза, его вовлеченности в патогенез депрессивных расстройств и некоторых других психических заболеваний. Дополнительно рассмотрены взаимосвязь данного белка с другими системами, участвующими в патогенезе депрессивных расстройств, генетические и эпигенетические модификации, связанные с депрессиями и возможные корреляции между содержанием нейротрофического фактора мозга в центральной нервной системе и в периферической крови.

Обзор литературы, представленный автором, полностью соответствует основной тематике исследования.

Материалы и методы описаны с высокой степенью детализации, достаточной для воспроизведения. Автор приводит подробные протоколы получения штамма-продуцента нейротрофического фактора мозга человека на основе *E. coli*, препаративного выделения рекомбинантного белка, модифицированные протоколы иммунизации данным белком экспериментальных животных для получения поли- и моноклональных антител, схемы получения препаратов данных антител. Отдельно описана разработка тест-системы иммуноферментного анализа количественного определения нейротрофического фактора мозга в сыворотке крови человека, корректно даны методы ее валидации.

Весь спектр методов, применяемый автором, можно признать вполне адекватным для решения поставленных задач и получения научных

результатов, сформулированных в виде выводов диссертационной работы. Автор владеет широким современным методическим арсеналом, среди которого методы культивирования бактерий и эукариотических клеток, молекулярно-биологические, биотехнологические методы, гибридная технология, методы препаративной белковой химии, методы иммунохимического анализа.

Результаты изложены подробно и структурированно с представлением таблиц и наглядных рисунков. Данный раздел разделён на несколько частей в соответствии с поставленными задачами. Каждая часть является законченным полноценным результатом и подкреплена соответствующими выводами.

Автором был получен рекомбинантный белок, по иммунохимическим свойствам идентичный нативному, определены константа аффинности и кросс-реактивность моноклональных антител, подобраны оптимальные условия проведения иммуноферментного анализа с использованием разработанной тест-системы. В этой же главе приводятся результаты иммунопероксидазного анализа нейротрофического фактора мозга на препаратах культуры эмбриональных астроцитов и срезах головного мозга крысы, свидетельствующие о специфичности полученных поли- и моноклональных антител в отношении соответствующего антигена. Также автор описывает результаты иммуноферментного анализа нейротрофического фактора мозга в образцах сыворотки крови больных с психическими заболеваниями и условно здоровых доноров. Выявленные статистически значимые и достоверные отличия в содержании этого белка у больных по сравнению со здоровыми доказывают целесообразность рекомендации иммуноферментного скрининга нейротрофического фактора мозга для широкого использования в клинко-лабораторной практике в качестве дополнительного иммунохимического метода диагностики.

Глава **Обсуждение** посвящена обсуждению полученных результатов, в которой резюмируется материал, приведенный в главе Результаты.

Полученные результаты и сформулированные **Выводы** диссертационной работы О.В. Павловой полностью соответствуют поставленным целям и задачам исследования. Диссертация обладает внутренним единством и носит завершённый характер, ее тематика соответствует заявленной научной специальности.

Рекомендации по использованию результатов и выводов диссертации

Результаты исследования, полученные в ходе выполнения диссертационной работы О.В. Павловой, могут быть использованы в практической деятельности психиатрических больниц и психоневрологических диспансеров для определения уровня нейротрофического фактора мозга в сыворотке крови в качестве дополнительного диагностического критерия и с целью контроля эффективности проводимой терапии у пациентов с психическими заболеваниями. Разработанная тест-система может применяться в лечебных учреждениях соответствующего профиля, например, Центральная клиническая психиатрическая больница им. Ф.А. Усольцева; Психиатрическая клиническая больница №1 им. Н.А. Алексеева Департамента здравоохранения г. Москвы, Психиатрическая клиническая больница №4 им. П.Б. Ганнушкина, а также в других учреждениях соответствующего профиля.

Соответствие автореферата основным положениям диссертации

Автореферат в полной мере отражает содержание диссертационной работы, соответствует основным положениям и выводам, оформлен лаконично на 25 страницах машинописного текста.

Подтверждение опубликованных основных результатов диссертации в научной печати

По теме работы опубликовано 6 научных работ: 4 статьи в журналах, входящих в перечень ВАК РФ (2 – в зарубежных журналах, 2 – в отечественных журналах), 2 тезиса докладов на российских конференциях и конгрессах с международным участием.

Результаты промежуточных этапов исследований обсуждались на научных конференциях. Опубликованные работы отражают содержание диссертации.

Соответствие паспорту научной специальности

Соответствие диссертационной работы, представленной О.В. Павловой, специальности 1.5.4. – «Биохимия» подтверждено получением штамма-продуцента *E. coli* рекомбинантного белка BDNF, который по иммунохимическим свойствам идентичен нативному и в дальнейшем используется в качестве антигена при разработке тест-системы ИФА, а также для иммунизации экспериментальных животных при получении поликлональных антител и моноклональных антител (пункт 17. Физические, химические, технические основы выделения, синтеза и наработки веществ, присущих живым организмам для решения определенных медицинских задач). Также соответствие специальности определяется созданной тест-системой ИФА, которая позволяет воспроизводимо, специфично и достоверно осуществлять количественный мониторинг уровня нейротрофического фактора мозга в сыворотке крови при психических заболеваниях, и может быть использована в практическом здравоохранении для скрининга, оценки течения и эффективности проводимой терапии пациентов с психическими заболеваниями (Пункт 10. Теоретические и прикладные проблемы связей биохимических процессов с жизнедеятельностью организма для решения задач сохранения здоровья человека, выяснения причин различных болезней и изыскания путей их эффективного лечения).

Замечания и вопросы по диссертации

1. В чем преимущество разработанной ИФА тест системы по сравнению с импортными аналогами? В работе сравнение тест-систем отсутствует. Обоснование, что создание тест-системы необходимо из-за неоднородности результатов выглядит весьма странно.
2. Клиническое описание выборки пациентов представлено довольно скудно. Известно множество подтипов психически заболеваний в испытуемых

группах. Уместно ли говорить о статистической достоверности результатов в данном случае?

3. На рисунках 3.17 и 3.18 представлены результаты иммуноморфологического анализа BDNF с помощью полученных антител. В качестве отрицательного контроля уместно использовать препараты другой клеточной линии и другого органа.

4. BDNF имеет тканевую специфичность экспрессии транскриптов (сплайс-вариантов). Возникает вопрос, специфичны ли полученные моноклональные антитела, да и вся тест-система, для индивидуальных транскриптов?

5. В работе получен полноразмерный рекомбинантный белок BDNF. В первую задачу 1 работы входило разработка способа получения рекомбинантного белка идентичного нативному. Так какой-же из множества транскриптов считать нативным?

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

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Диссертационная работа "Рекомбинантный BDNF. Получение моноклональных антител, разработка тест-системы иммуноферментного анализа и клиничко-лабораторная диагностика", 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».

Отзыв обсужден и одобрен на заседании межлабораторного семинара
ФГБНУ «Научно-исследовательский институт биомедицинской химии имени
В.Н. Ореховича» протокол № 7 от 17 ноября 2023 г.

Отзыв составил:

Ведущий научный сотрудник,

заведующий лабораторией медицинской биотехнологии

ФГБНУ «Научно-исследовательский институт биомедицинской
химии имени В.Н. Ореховича»

доктор биологических наук (по специальности 1.5.4. – «Биохимия»),

доцент



Жданов Дмитрий Дмитриевич

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

119121, Москва, ул. Погодинская, д. 10, стр.8.

Тел.: +7 (499) 246-33-80.

Электронная почта: zhdanovdd@mail.ru