

УДК 577.25

РАЗРАБОТКА КОЛИЧЕСТВЕННОГО ИММУНОФЕРМЕНТНОГО АНАЛИЗА НЕЙРОТРОФИЧЕСКОГО ФАКТОРА МОЗГА НА ОСНОВЕ РЕКОМБИНАНТНОГО АНТИГЕНА

© 2023 г. О. В. Павлова¹, *, А. А. Мурашко², Н. В. Андрющенко¹, О. И. Гурина¹, К. А. Павлов¹

¹Федеральное государственное бюджетное учреждение “Национальный медицинский исследовательский центр психиатрии и наркологии им. В.П. Сербского” Минздрава России, Москва, Россия

²Московский Научно-исследовательский институт психиатрии — филиал Федерального государственного бюджетного учреждения “Национальный медицинский исследовательский центр психиатрии и наркологии им. В.П. Сербского” Минздрава России, Москва, Россия

Поступила в редакцию 27.05.2022 г.

После доработки 29.05.2022 г.

Принята к публикации 02.06.2022 г.

Одним из патофизиологических механизмов развития некоторых психических заболеваний, в том числе депрессивных расстройств, является снижение экспрессии нейротрофического фактора мозга (BDNF), в основном, в лимбической области и префронтальной коре головного мозга. Иммунохимический скрининг BDNF в биологических жидкостях показал, что уровни этого белка можно рассматривать как маркер предрасположенности к депрессии и прогностический маркер эффективности проводимой терапии. Использование современных технологий получения рекомбинантных белков позволяет разработать высокостандартизованные тест-системы ИФА для определения данного антигена в биологических жидкостях. В данной работе описан метод создания тест-системы для количественного ИФА нейротрофического фактора мозга на основе рекомбинантного белка BDNF и антител, полученных в результате иммунизации рекомбинантным BDNF.

Ключевые слова: нейротрофический фактор мозга, моноклональные антитела, рекомбинантный белок, иммуноферментный анализ, депрессивные расстройства

DOI: 10.31857/S1027813323010156, **EDN:** EQWZUP

ВВЕДЕНИЕ

Депрессивные расстройства — это гетерогенная группа психических патологий с различной степенью тяжести, которое поражает 1.3–19% населения земного шара [1]. Этиологические факторы разнообразны, среди них можно выделить: генетические, эпигенетические и социальные, которые в совокупности приводят к развитию этого заболевания. В психиатрии существует острая потребность в выявлении различных биологических маркеров, которые позволили бы оценить риск развития расстройства, охарактеризовать динамику терапевтического процесса, спрогнозировать ответ на лечение. Изучение причин развития депрессивных расстройств определило несколько гипотез патогенеза этого заболевания: мономинная, глутаматная, нейроэндокринная с дисфункцией гипоталамо-гипофизарно-надпочечниковой (НРА) оси, нейровоспалительная с изменениями уровней цитокинов [2–4]. Многие исследователи отмечают значимую роль наследственности в развитии депрессивных симптомов [5].

Согласно нейротрофической гипотезе, в основе патогенеза этого заболевания предположительно лежит дисрегуляция синтеза и высвобождения нейротрофинов, в том числе нейротрофического фактора мозга (BDNF), что приводит к изменениям нейро- и синаптической пластичности [6].

НЕЙРОТРОФИЧЕСКИЙ ФАКТОР МОЗГА

BDNF впервые был получен из мозга свиньи в 1982 году [7] и в настоящее время является одним из наиболее изученных белков семейства нейротрофинов. BDNF и его рецепторы TrkB обнаруживаются не только в клетках нервной ткани, но и в эндотелиальных клетках, кардиомиоцитах, сосудистых гладкомышечных клетках, лейкоцитах, мегакариоцитах. Но именно в центральной нервной системе он играет важную роль в обеспечении процессов нейрогенеза, нейро- и синаптической пластичности. Синтез BDNF — это сложный многоступенчатый процесс, в ходе которого образуются несколько изоформ данного белка. Зрелая форма BDNF связывается с высокоаффинным рецептором TrkB, активируя сигнальные каскады, инициирующие разнообразные кратко- и

* Адресат для корреспонденции: 119034, г. Москва, пер. Кропоткинский, д. 23, e-mail: uovnew@mail.ru.

долгосрочные клеточные ответы [8, 9]. Таким образом, ключевую ролью BDNF является поддержание когнитивных функций, связанных с механизмами формирования эмоций, с процессами обучения и консолидации памяти.

Многие доклинические и клинические исследования показали, что снижение экспрессии BDNF, нарушения его синтеза или рецепторов TrkB связаны с патофизиологическими механизмами развития депрессивных симптомов, а усиление экспрессии этого фактора и его рецепторов, а также увеличение высвобождения BDNF, зависящее от активности нейронов, могут лежать в основе действия антидепрессантных препаратов [10–16]. Количественное определение данного маркера в сыворотке крови пациентов может служить важным фактором выявления скрытых депрессий и оценки эффективности проводимой терапии [17].

С другой стороны, исследователи отмечают, что изменения уровня BDNF не специфичны для депрессивных расстройств и обнаруживаются при многих других заболеваниях [18–21].

Поэтому для выявления взаимосвязи концентрации BDNF с депрессивными расстройствами мы разработали твердофазный вариант ИФА на основе рекомбинантного BDNF с использованием полученных моно- и поликлональных антител к этому белку.

МЕТОДИКА ИССЛЕДОВАНИЯ

Нуклеотидная последовательность, кодирующая зрелый BDNF человека, амплифицирована с помощью праймеров, несущих сайты узнавания рестриктаз NcoI и XhoI, (TATCCATGGACTCTGAC-CCTGCCCG и GCCCTCGAGTCTTCCCCTTTTA-ATGGTCAATGTACATACACA) из кДНК библиотеки мозга человека. Данная последовательность была клонирована по сайтам рестрикции NcoI и XhoI в плазмиду pET32a. Штамм-продуцент рекомбинантного mBDNF-TrxA культивировался в среде LB (Lysogeny broth) с добавлением ампициллина (30 мкг/мл) в ротационном шейкере-инкубаторе (37°C, 200 об./мин) до достижения культурой *E. coli* OD(600) = 0.6. Затем осуществлялась индукция экспрессии рекомбинантного белка добавлением изопропил-β-D-1-тиогалактопиранозидом (ИПТГ) до финальной концентрации 1 мМ и продолжалось культивирование при тех же условиях еще 4–6 часов. После окончания инкубации бактериальную суспензию центрифугировали (3500g 30 мин при 4°C). Осадок лизировали в буфере (8 М мочевины, 100 мМ NaH₂PO₄, 10 мМ TrisCl pH 8.0). Полученный лизат центрифугировали (3500g 30 мин при 4°C), и отбирали супернатант.

Супернатант смешивали с Ni-NTA-агарозой и инкубировали при умеренном встряхивании в течение 60 мин при 20°C. Далее суспензию переносили на колонку и промывали 10-кратным объемом буфера (8 М мочевины, 100 мМ NaH₂PO₄, 10 мМ TrisCl pH 6.3). Рекомбинантный mBDNF-TrxA BDNF элюировали 2-кратным объемом колонки

элюирующим буфером (8 М мочевины, 100 мМ NaH₂PO₄, 10 мМ TrisCl pH 4.5) и концентрировали с помощью центрифужных концентраторов с диаметром пор 10 кДа до концентрации 1 мг/мл. Хранение аликвот препарата mBDNF-TrxA осуществляли при –40°C. Чистоту полученного белка оценивали методом диск-электрофореза с Ds-Na в ПААГ, иммунохимическую характеристику проводили методом иммуноблоттинга с применением коммерческих препаратов антител.

Для получения поликлональных антител проводили иммунизацию кроликов породы шиншилла в возрасте 1–1.5 года. Для иммунизации использовали 200 мкг препарата рекомбинантного mBDNF-TrxA в 0.5 мл PBS, эмульгированного с 0.5 мл полного (первая иммунизация) или неполного (последующие иммунизации) адьюванта Фрейнда, и вводили подкожно в область шейных лимфатических узлов. Иммунизацию осуществляли раз в неделю, эффективность иммунизации оценивали методом прямого ИФА. Кровь брали на пике выработки антител из краевой вены уха кролика. Сыворотки крови кролика, содержащие анти-BDNF антитела, хранили при –40°C, рабочие аликвоты при +4°C.

Для получения моноклональных антител проводили иммунизацию самок мышей линии Balb/C в возрасте 3–6 мес. Иммунизацию осуществляли 20 мкг препарата рекомбинантного mBDNF-TrxA в 50 мкл PBS, эмульгированного в полном адьюванте Фрейнда. Препарат вводили подкожно в основание хвоста, в область шейных лимфоузлов, вдоль брюшной цепочки лимфоузлов и в подушечки лап. Иммунизация состояла из трех циклов с перерывами на 4 недели и заключительное бустерное введение препарата. Через 5–7 сут после бустерной иммунизации сыворотку крови животных оценивали методом прямого ИФА для подтверждения иммунного ответа. Для процедуры слияния селезенку иммунизированного животного гомогенизировали, затем спленоциты смешивали с клетками миеломной культуры SP2/0-Ag14, дефектными по ферменту гипоксантин-гуанин-фосфорибозилтрансферазе. Процедуру слияния проводили по общепринятой методике Келлера и Милштейна в нашей модификации. В течение 2 нед клетки растили на среде с добавлением гипоксантина, аминоптерина и тимидина, которая является селективной по отношению к гибридным клеткам. После переводили культуры на ростовую среду (RPMI, 10% FBS, GlutaMax, с добавлением антибиотика-антимикотика, Gibco). Скрининг гибридом осуществляли методом непрямого ИФА. Для этого препарат рекомбинантного mBDNF-TrxA иммобилизовали в лунках 96-луночных планшетов (Greiner Bio-one) в концентрации 10 мкг/мл, разводя стокковый (1.5 мг/мл) раствор в бикарбонатном буфере (0.1 М NaHCO₃ pH 9.2). В качестве вторичных использовали кроличьи антитела к мышинным IgG, конъюгированные с пероксидазой (Thermo FS). Реакцию проявляли раствором тетраметилбензидина. По результатам анализа были выбраны несколько гибридом, часть клеток которых вводились

в брюшную полость мышам с целью получения асцитов по стандартной методике, часть переводилась на специальную бессывороточную среду для гибридом (PFHM-II с добавлением антибиотика-антимикотика, Gibco) и культивировалась в суспензии (60 мм × 15 мм Cell culture dishes, Eppendorf, 5 мл среды).

Из супернатантов клеточных культур после 5–7 дней *in vitro* и асцитов получали чистые препараты антител с помощью аффинной хроматографии на протеин А-агарозе, рабочим буфером был PBS, элюирующим буфером — цитратный (100 мМ цитрата Na, pH 3.0). Элюат концентрировали с помощью центрифужных концентраторов с диаметром пор 100 кДа. Препараты антител были исследованы с помощью непрямого ИФА, где в качестве антигена использовали рекомбинантный mBDNF-TrxA.

Для подтверждения взаимодействия моноклональных антител к рекомбинантному mBDNF-TrxA с нативным антигеном проводили иммуногистохимический анализ фиксированных (10% параформальдегид) срезов гиппокампа крысы (2 мес., Wistar). Для этого срезы инкубировали с моноклональными антителами в разведении 1 : 200 в буфере (PBS, 1% БСА pH 7.4) 12 ч при 4°C с предварительным блокированием эндогенной пероксидазной активности (3% H₂O₂, 10 мин) и неспецифического связывания (PBS, 3% БСА, pH 7.4, 1 ч), в качестве отрицательного контроля добавляли буфер без антител. Затем промывали трижды промывочным буфером (PBS, 0.05% Твин-20 pH 7.4) и инкубировали с кроличьими антителами к мышиным IgG, конъюгированными с пероксидазой в течение 1 ч, которые проявляли раствором диаминобензидина с перекисью водорода в субстратном буфере, следуя рекомендациям производителя (Vector Labs, DAB Peroxidase Substrate).

Кроме этого, проводили ИФА смеси белков, выделенных из тромбоцитов человека, так как известно, что BDNF в тромбоцитах содержится в α-гранулах и в цитоплазме, а синтезируется в мегакариоцитах. Для получения такого препарата использовали следующую методику: кровь собирали в пробирки с ЭДТА, центрифугировали при 400 g 30 мин (4°C). Собирали супернатант и разводили его в соотношении 1 : 1 с HEP буфером (140 мМ NaCl, 2.7 мМ KCl, 3.8 мМ HEPES, 5 мМ ЭДТА, pH 7.4), перемешивали и центрифугировали при 100 g 15–20 мин (4°C). Собирали супернатант и центрифугировали при 800 g 15–20 мин (4°C). Затем к осадку добавляли 200 мкл лизирующего буфера (2% Тритон-100, 50 мМ Tris, 150 мМ NaCl, pH 8.5) и 1 мМ раствор ингибиторов протеаз (PMSF, VWR International LLC), инкубировали 20 мин при 4°C. Затем центрифугировали при 12700 g 5 мин. В полученном супернатанте измеряли концентрацию белка на спектрофотометре NP80 (Implen nanophotometer) и исследовали методом ИФА с использованием полученных моноклональных антител к рекомбинантному mBDNF-TrxA.

Для определения концентрации BDNF в сыворотке крови человека нами был разработан сэндвич-вариант ИФА. Препараты моноклональных антител разводили бикарбонатным буфером (0.1 М NaHCO₃, pH 9.2) до конечной концентрации 10 мкг/мл и иммобилизовали в лунках 96-луночного планшета (Greiner) в 100 мкл на лунку, инкубировали не менее 12 ч при 4°C во влажной камере. Далее лунки дважды промывали промывочным буфером (PBS, 0.05% Твин-20 pH 7.4). Здесь и далее промывку осуществляли на автоматическом вошере PW-40 (Bio-Rad). Для блокирования свободных сайтов связывания на планшете в лунки вносили по 100 мкл блокирующего буфера (PBS, 3% БСА pH 7.4) и инкубировали в течение 1 ч при 20°C на ротационном шейкере (500 об./мин). Затем лунки трижды промывали промывочным буфером.

На следующем этапе с использованием буфера для антигена (PBS, 1% БСА pH 7.4) готовили серию разведений препарата mBDNF-TrxA от 1500 до 11.7 пг/мл и вносили раствор BDNF по 100 мкл в лунку, инкубировали в течение 2 ч при 20°C на ротационном шейкере (500 об./мин). В 2 лунки вносили буфер без белка (контроль). В оставшиеся лунки вносили исследуемые образцы (сыворотка крови) по 100 мкл в разведение 1 : 2 в буфере для антигена. После окончания инкубации лунки трижды промывали промывочным буфером.

Затем во все лунки планшета вносили по 100 мкл препарата поликлональных анти-BDNF антител кролика (5 мкг/мл) и инкубировали 1 ч на ротационном шейкере (500 об./мин). После окончания инкубации лунки трижды промывали промывочным буфером, вносили козы антитела к кроличьим IgG, конъюгированные с пероксидазой (Thermo FS) и инкубировали 1 ч при 20°C на ротационном шейкере (500 об./мин). После 3-х кратной процедуры отмывки реакцию проявляли раствором тетраметилбензидина, затем добавляли по 100 мкл 1 М H₂SO₄. Результаты детектировали на фотометре i-Mark (Bio-Rad Laboratories) при λ = 450 нм.

Для определения точности и воспроизводимости калибровочной кривой иммуноферментного определения BDNF калибровали стандартный антиген, измеряя оптическую плотность при каждом варианте концентрации 5 раз. Доверительный интервал и стандартное отклонение анализировали в Excel.

Для верификации разработанной тест-системы был проведен пилотный эксперимент по определению уровней BDNF в сыворотке крови пациентов с первым психотическим эпизодом (1 группа), с депрессивными расстройствами, имеющих суицидальные попытки в анамнезе (2 группа), а также была использована сыворотка крови условно здоровых доноров (контрольная группа, 14 чел.). Данные образцы были представлены ПКБ № 4 им. П.Б. Ганнушкина.

В 1 группе было 30 пациентов, средний возраст 26.8 лет. Эта группа была обследована с помощью психиатрических методов и шкал (PANSS, шкала



mBDNF v pet32a protein

Рис. 1. Схема полученного рекомбинантного белка mBDNF-TrxA (SnapGene).

депрессии Калгари, шкала мании Янга) и разделена на 3 подгруппы — пациенты с депрессивными проявлениями (4 чел.), пациенты с маниями (7 чел.) и остальные пациенты с психозом без аффективных нарушений (19 чел.).

Во 2 группе было 22 пациента, средний возраст 31.8 лет.

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЙ

Электрофоретический анализ элюата, полученного после металлохелатной хроматографии на Ni-NTA-агарозе, выявил бенд с молекулярной массой ~32 кДа (т.к. рекомбинантный BDNF является белком слияния) (рис. 1), иммунохимически визуализирующийся с помощью коммерческих анти-BDNF антител (рис. 2). Чистота полученного препарата составила более 95%. Этот препарат был использован для иммунизации животных для получения поли- и моноклональных антител.

В результате двух последовательных этапов клонирования с оценкой продукции антител к BDNF на каждом этапе получено несколько клонов, стабильно продуцирующих специфические моноклональные антитела. Для наработки антител использовали стандартные методы получения асцитов у мышей, а также метод культивирования в суспензии в бессывороточной среде для гибридом. После очистки на протеин-A-агарозе и концентрирования до 3–2.5 мг/мл моноклональные антитела тестировали с помощью иммуноферментного анализа и иммуногистохимического анализа на срезах гиппокампа крыс.

При иммуногистохимическом исследовании срезов гиппокампа крыс с помощью моноклональных антител к mBDNF-TrxA было обнаружено спе-

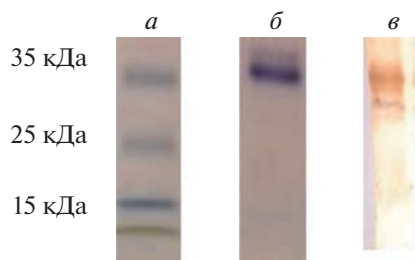


Рис. 2. Иммуноблоттинг рекомбинантного mBDNF-TrxA с помощью коммерческих антител. а — Маркеры молекулярной массы (Thermo FS), б — диск-электрофореграмма mBDNF-TrxA после металлохелатной хроматографии, в — иммуноблоттинг рекомбинантного BDNF с помощью антител (Abcam).

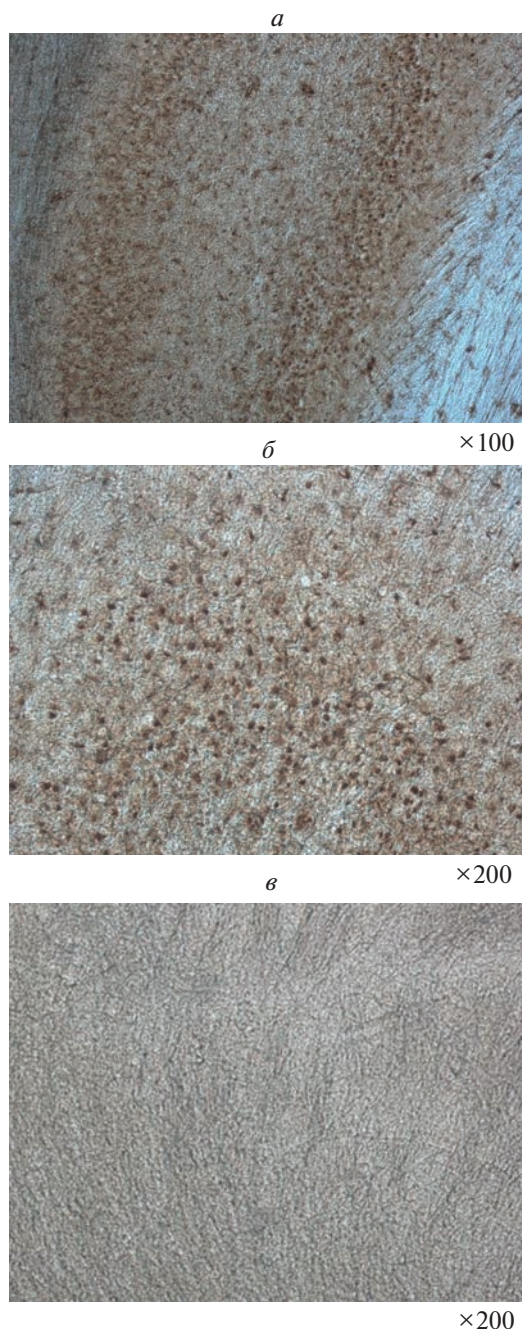


Рис. 3. Иммуногистохимическое проявление BDNF на срезах гиппокампа крысы с помощью полученных моноклональных антител (а, б). Иммунопероксидазный метод. в — Отрицательный контроль (без первых антител). ×100 — 100-кратное увеличение, ×200 — 200-кратное увеличение.

Таблица 1. Точность и воспроизводимость калибровочной кривой иммуноферментного определения BDNF

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

цифическое окрашивание тел пирамидальных нейронов, при этом иммунохимическая реакция в контрольных образцах отсутствовала (рис. 3).

Определение концентрации BDNF в сыворотке крови осуществляли с помощью калибровочной кривой. В качестве стандарта использовали рекомбинантный mBDNF-TrxA в концентрациях от 1500 до 11.7 пг/мл. Точность и воспроизводимость калибровки подтверждается результатами анализа доверительного интервала и коэффициента вариации (табл. 1).

Иммуноферментный анализ препарата BDNF, выделенного из тромбоцитов, подтвердил связывание моноклональных антител с нативным антигеном, при этом его концентрация составила 1215 пг/мл.

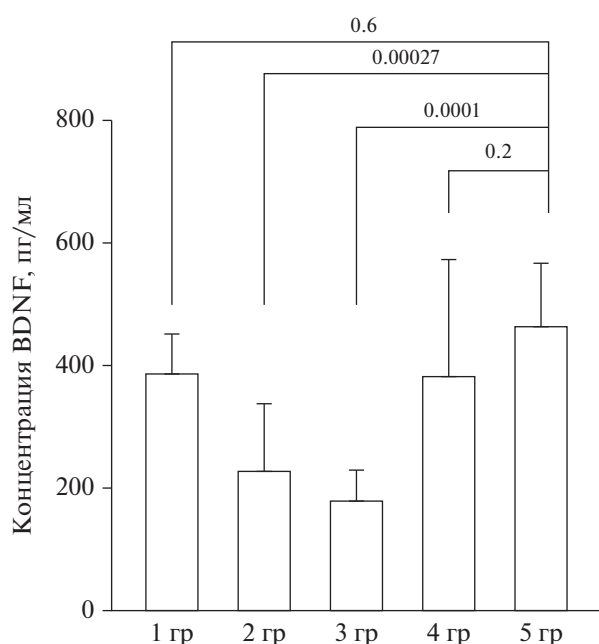


Рис. 4. Результаты иммуноферментного анализа сывороток пациентов. 1 гр. — психоз с депрессивными проявлениями, 2 гр. — психоз с маниями, 3 гр. — депрессивные расстройства с суицидальными попытками в анамнезе, 4 гр. — психоз без аффективных проявлений, 5 гр. — условно здоровые доноры.

В результате проведения ИФА BDNF в сыворотках крови пациентов выявилось, что при маниакальных состояниях (2 подгруппа) концентрация BDNF ниже, чем у остальных пациентов (1 группа) и здоровых людей, еще более низкие концентрации BDNF у пациентов с депрессивными расстройствами, имеющих суицидальные попытки в анамнезе (2 группа) (рис. 4). Пункты шкалы PANSS, с которыми есть корреляции, в основном связаны с маниакальными и депрессивными симптомами. Связей с возрастом, длительностью продромального периода заболевания, длительностью курения, стажем работы и обучения нет.

Представленные иммуногистохимические исследования срезов гиппокампа крысы и результаты ИФА рекомбинантного белка и BDNF, выделенного из тромбоцитов, показывают, что полученные моноклональные антитела являются аффинными как к рекомбинантному, так и к нативному BDNF.

В результате проведенной работы был разработан количественный твердофазный вариант иммуноферментного определения BDNF в сыворотке крови человека. В качестве стандарта использовали рекомбинантный BDNF, в качестве первичных и вторичных антител — моно- и поликлональные антитела, полученные при иммунизации рекомбинантным белком. Рабочий диапазон для оптимального определения локализуется в интервале концентраций антигена 1500–11.7 пг/мл. Анализ результатов, представленных в табл. 1, позволяют классифицировать данную тест-систему как специфичную, точную, надежную и воспроизводимую.

ИСТОЧНИК ФИНАНСИРОВАНИЯ

Внешнее финансирование отсутствует.

СОБЛЮДЕНИЕ ЭТИЧЕСКИХ НОРМ

Конфликт интересов. Авторы заявляют, что у них нет конфликта интересов.

Этическое одобрение. Все применимые международные, национальные и/или институциональные принципы ухода и использования животных были соблюдены. Все процедуры, выполненные в исследовании с участием людей, соответствуют этическим стандартам институционального и/или национального комитета

по исследовательской этике и Хельсинкской декларации 1964 года и ее последующим изменениям или сопоставимым нормам этики.

Информированное согласие. От каждого из включенных в исследование участников было получено информированное добровольное согласие.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Kessler R.C., Bromet E.J. // *Annu. Rev. Public. Health.* 2013. V. 34. P. 113–138.
<https://doi.org/10.1146/annurev-publhealth-031912-114409>
2. Stetler C., Miller G.E. // *Psychosom. Med.* 2011. V. 73. № 2. P. 114–126.
<https://doi.org/10.1097/PSY.0b013e31820ad12b>
3. Irwin M.R., Miller A.H. // *Brain Behav. Immun.* 2007. V. 21. № 4. P. 374–383.
<https://doi.org/10.1016/j.bbi.2007.01.010>
4. Григорьян Г.А., Дыгало Н.Н., Гехт А.Б., Степаничев М.Ю., Гуляева Н.В. // *Усп. физиол. наук.* 2014. Т. 43. № 2. С. 3–19.
5. Sullivan P.F., Agrawal A., Bulik C.M., Andreassen O.A., Borglum A.D., Breen G., Cichon S., Edenberg H.J., Faraone S.V., Gelernter J., Mathews C.A., Nievergelt C.M., Smoller J.W., O'Donovan M.C. // *Am. J. Psychiatry.* 2018. V. 175. № 1. P. 15–27.
<https://doi.org/10.1176/appi.ajp.2017.17030283>
6. Yang T., Nie Z., Shu H., Kuang Y., Chen X., Cheng J., Yu S., Liu H. // *Front. Cell Neurosci.* 2020. V. 14. P. 82.
<https://doi.org/10.3389/fncel.2020.00082.eCollection2020>
7. Barde Y.A., Edgar D., Thoenen H. // *EMBO J.* 1982. V. 1. № 5. P. 549–53.
8. Kowianski P., Lietzau G., Czuba E., Waskow M., Steliga A., Morys J. // *Cell Mol. Neurobiol.* 2018. V. 38. P. 579–593.
<https://doi.org/10.1007/s10571-017-0510-4>
9. Гуляева Н.В. // *Биохимия.* 2017. Т. 82. Вып. 3. С. 441–448.
10. Taliaz D., Stall N., Dar D.E., Zangen A. // *Mol. Psychiatry.* 2010. V. 15. № 1. P. 80–92.
<https://doi.org/10.1038/mp.2009.67>
11. Filho C.B., Jesse C.R., Donato F., Giacomeli R., Del Fabro L., da Silva Antunes M., de Gomes M.G., Goes A.T., Boeira S.P., Prigol M., Souza L.C. // *Neuroscience.* 2015. V. 289. P. 367–380.
<https://doi.org/10.1016/j.neuroscience.2014.12.048>
12. Yoshida T., Ishikawa M., Niitsu T., Nakazato M., Watanabe H., Shiraishi T., Shiina A., Hashimoto T., Kanahara N., Hasegawa T., Enohara M., Kimura A., Iyo M., Hashimoto K. // *PLoS One.* 2012. V. 7. № 8. e42676.
<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0042676>
13. Duman R.S., Aghajanian G.K., Sanacora G., Krystal J.H. // *Nat. Med.* 2016. V. 23. № 3. P. 238–249.
<https://doi.org/10.1038/nm.4050>
14. Duman R.S., Deyama S., Fogaça M.V. // *Eur. J. Neurosci.* 2021. V. 53. № 1. P. 126–139.
<https://doi.org/10.1111/ejn.14630>
15. Mondal A.C., Fatima M. // *Int. J. Neurosci.* 2019. V. 129. № 3. P. 283–296.
<https://doi.org/10.1080/00207454.2018.1527328>
16. Castren E., Kojima M. // *Neurobiol. Dis.* 2017. V. 97. P. 119–126.
<https://doi.org/10.1016/j.nbd.2016.07.010>
17. Nobis A., Zalewski D., Waszkiewicz N. // *J. Clin. Med.* 2020. V. 9. 3793.
<https://doi.org/10.3390/jcm9123793>
18. Islam F., Mulsant B.H., Voineskos A.N., Rajji T.K. // *Curr. Psychiatry Rep.* 2017. V. 19. № 7. P. 36.
<https://doi.org/10.1007/s11920-017-0794-6>
19. Song J.H., Yu J.T., Tan L. // *Mol. Neurobiol.* 2015. V. 52. № 3. P. 1477–1493.
<https://doi.org/10.1007/s12035-014-8958-4>
20. Nuernberg G.L., Aguiar B., Bristot G., Fleck M.P., Rocha N.S. // *Transl. Psychiatry.* 2016. V. 6. № 12. e985.
<https://doi.org/10.1038/tp.2016.227>
21. Jin W. // *J. Clin. Med.* 2020. V. 9. № 1. P. 257.
<https://doi.org/10.3390/jcm9010257>

Development of Quantitative Enzyme Immunoassay of Brain-Derived Neurotrophic Factor on the Basis of Recombinant Antigen

O. V. Pavlova^a, A. A. Murashko^b, N. V. Andriushchenko^a, O. I. Gurina^a, and K. A. Pavlov^a

^aSerbsky National Medical Research Centre for Psychiatry and Narcology, Moscow, Russia

^bMoscow Research Institute of Psychiatry – the Branch of Serbsky National Medical Research Centre for Psychiatry and Narcology, Moscow, Russia

One of the pathophysiological mechanisms of the development of some mental diseases, including depressive disorders, is a decrease in the expression of brain-derived neurotrophic factor (BDNF), mainly in the limbic region and prefrontal cortex of the brain. Immunochemical screening of BDNF in biological fluids showed that the levels of this protein can be considered as a marker of predisposition to depression and a prognostic marker of the effectiveness of therapy. The use of modern technologies for the production of recombinant proteins makes it possible to develop highly standardized ELISA systems for the determination of this antigen in biological fluids. This paper describes a method for creating a test system for quantitative ELISA of brain-derived neurotrophic factor on the basis of recombinant protein BDNF and antibodies obtained as a result of immunization with recombinant BDNF.

Keywords: brain-derived neurotrophic factor, monoclonal antibodies, recombinant protein, ELISA, depressive disorders