

УТВЕРЖДАЮ

Директор
ФГБНУ НИИ вакцин и
сывороток им. И.И. Мечникова,
д.м.н., академик РАН,

 СВИТИЧ О.А.

«30» мая 2025 г.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Федерального государственного бюджетного научного учреждения
«Научно-исследовательский институт вакцин и сывороток
им. И.И. Мечникова»

на основании решения заседания Отдела микробиологии ФГБНУ «Научно-исследовательский институт вакцин и сывороток им. И.И. Мечникова»

Диссертация: «Получение рекомбинантного флагеллина *Pseudomonas aeruginosa* и исследование его иммунобиологических свойств» на соискание ученой степени кандидата медицинских наук выполнена на базе ФГБНУ «Научно-исследовательский институт вакцин и сывороток им. И.И. Мечникова».

Жеребцов Антон Павлович, 1995 года рождения, гражданство РФ, окончил ФГАОУ ВО Первый Московский государственный медицинский университет имени И. М. Сеченова Минздрава России (Сеченовский Университет) в 2018 году по специальности «Врач по общей гигиене, по эпидемиологии».

В 2020 году зачислен в число аспирантов 1-ого курса на очную форму обучения по основной профессиональной образовательной программе высшего образования программе подготовки научно-педагогических кадров в аспирантуре по специальности 1.5.11. Микробиология. Отчислен из аспирантуры в 2024 году в связи с окончанием обучения.

Справка о сдаче кандидатских экзаменов № 7/2024 от 23.09.2024 года выдана в ФГБНУ Научно-исследовательский институт вакцин и сывороток им. И.И. Мечникова.

С 2019 года по 2023 год работал в должности младшего научного сотрудника лаборатории протективных антигенов ФГБНУ «Научно-исследовательский институт вакцин и сывороток им. И.И. Мечникова». С 2024 года работает в должности научного сотрудника лаборатории протективных антигенов ФГБНУ «Научно-исследовательский институт вакцин и сывороток им. И.И. Мечникова» по настоящее время.

Научный руководитель: Михайлова Наталья Александровна, доктор медицинских наук, профессор, руководитель научного направления ФГБНУ «Научно-исследовательский институт вакцин и сывороток им. И.И. Мечникова».

Текст диссертации был проверен в системе «Антиплагиат» и не содержит заимствованного материала без ссылки на авторов.

По итогам обсуждения диссертационного исследования «Получение рекомбинантного флагеллина *Pseudomonas aeruginosa* и исследование его иммунобиологических свойств», представленного на соискание ученой степени кандидата медицинских наук по специальности 1.5.11. Микробиология, принято следующее заключение:

Оценка выполненной соискателем работы

Работа выполнена в традиционном стиле, диссертация изложена на 130 страницах машинописного текста, состоит из введения, глав обзора литературы, материалов и методов, результатов, обсуждения, выводов и списка литературы. Список литературы включает в себя 184 источника (их них – 61 отечественный и 123 зарубежный). В диссертации продемонстрированы результаты проведенных исследований, доказана их новизна и практическая значимость. Научные статьи соискателя, перечисленные ниже, соответствуют теме диссертации. Работа представляет собой законченное, самостоятельное исследование указанной темы.

Актуальность темы диссертационного исследования

Разработка и внедрение в медицинскую практику новых высокоэффективных препаратов на основе рекомбинантного флагеллина *P. aeruginosa* отечественного производства представляет собой актуальную задачу. Флагеллин являясь основным структурным компонентом жгутика бактерии внутриклеточно может распознаваться NLRC4 (NLR family CARD domain-containing protein 4), такое взаимодействие активирует инфламмасому и синтез противовоспалительных цитокинов. Наиболее важным рецептором, распознающим флагеллин, является TLR5 (Toll-like receptor 5), это взаимодействие активирует противовоспалительный фактор транскрипции NF- κ B через адаптерный белок MyD88, который вызывает продукцию цитокинов, хемокинов и антимикробных пептидов. Введение флагеллина в состав вакцины может стимулировать активацию иммунной системы, усиливая реакции как врожденного, так и адаптивного иммунитета.

Штамм-продуцент рекомбинантного белка флагеллина *P. aeruginosa*, полученный в лаборатории протективных антигенов НИИВС им. И.И. Мечникова, обеспечивает высокий выход целевого продукта при культивировании. На модели экспериментальной синегнойной инфекции у мышей показаны защитные свойства данного белка, а также тенденция к проявлению адьювантных при сочетанном введении с поверхностным антигеном *Klebsiella pneumoniae* штамма № 204. Установлено, что сыворотки полученные в результате иммунизации мышей рекомбинантным белком флагеллином подавляют зону роста и биопленкообразование *P. aeruginosa* штамма РА-103 в экспериментах *in vitro*. Полученные результаты обосновывают возможность использования селекционированного штамма-продуцента в качестве платформы для промышленного производства рекомбинантного белка при создании кандидатной вакцины против *P. aeruginosa*.

В рамках дальнейших исследований рекомбинантного белка флагеллина *P. aeruginosa* в качестве кандидатного компонента вакцинных препаратов, необходимо провести дополнительные эксперименты, предусматривающие

анализ различных комбинаций антигенов и модификаций рекомбинантного флагеллина, что позволит определить наиболее эффективную стратегию иммунизации. Исследования должны также охватывать различные схемы введения вакцины, дозировки и режимы вакцинации, чтобы оценить влияние данных факторов на выраженность иммунного ответа.

Таким образом, дальнейшие исследования в этой области могут привести к созданию эффективных препаратов для лечения инфекций, вызываемых *P. aeruginosa*, что имеет важное значение для общественного здоровья, особенно в контексте растущей устойчивости патогенов к традиционным методам лечения.

Личное участие соискателя в получении результатов, изложенных в диссертации

Вклад автора является основополагающим и состоит в непосредственном участии на всех этапах исследовательского процесса: от постановки цели и задач до внедрения результатов в практику. Автору принадлежит ведущая роль в обобщении литературных данных, формулировании темы диссертации, организации и проведении экспериментов. Все представленные в работе научные результаты получены лично автором. В опубликованных совместно с соавторами работах автору принадлежит ведущая роль в проведение исследований, обработке результатов и написания текста статей.

Степень достоверности результатов проведенных исследований

Достоверность и обоснованность результатов диссертационной работы основана на использовании достаточного по объему и качеству материала, современных методах исследования и статистической обработке данных. Статистический анализ данных осуществляли в программе Microsoft Office Excel. Микробиологические эксперименты по оценке количественных показателей проводили не менее трех раз. Для сравнения выраженности показателей в двух несвязных выборках использовали непараметрический статистический критерий Манна-Уитни. Значения $p < 0,05$ считали статистически значимыми.

Научная новизна результатов проведенных исследований

Впервые сконструирован штамм-продуцент *E. coli* pQE-30-FliC рекомбинантного белка флагеллина *P. aeruginosa* с использованием генно-инженерных технологий. Новизна подтверждена патентом Российской Федерации № 2793753 С1 от 05.04.2023.

Разработан оригинальный метод очистки рекомбинантного белка FliC *P. aeruginosa*, включающий последовательные этапы: получение телец включения, удаление примесей с использованием буферных растворов мочевины и гуанидин гидрохлорида, диализ, что обеспечивает получение не токсичного препарата со степенью чистоты 97,6 %.

Выявлены защитные свойства рекомбинантного белка FliC на модели экспериментальной синегнойной инфекции у мышей, продемонстрированы адьювантные возможности рекомбинантного белка FliC при сочетанном введении с поверхностным антигеном *K. pneumoniae*. установлено что сыворотки полученные в результате иммунизации мышей рекомбинантным белком флагеллином *P. aeruginosa* подавляют зону роста и биопленкообразование *P. aeruginosa*.

Установлено, что сыворотки полученные в результате иммунизации мышей рекомбинантным белком флагеллином подавляют зону роста и биопленкообразование *P. aeruginosa* штамма PA-103 в экспериментах *in vitro*.

Получены три гибридомы - продуцента моноклональных антител взаимодействующие с одним участком молекулы рекомбинантного белка FliC и показана перспектива их использования в ИФА, для детекции антигена.

Практическая значимость проведенных исследований

Штамм *E. coli* pQE-30-FliC - продуцент рекомбинантного белка флагеллина депонирован в коллекцию штаммов ФГБНУ НИИВС им И.И. Мечникова и может быть использован в качестве производственного в технологии получения рекомбинантного белка при разработке вакцины против синегнойной инфекции.

Ценность научных работ соискателя ученой степени

Полученные данные о свойствах рекомбинантного флагеллина *P. aeruginosa* расширяют представления о функциональном потенциале исследуемого белка. Результаты проведенных исследований свидетельствуют о том, что данный белок не токсичен и обладает выраженными антигенными свойствами, а также тенденцией к проявлению адьювантных свойств, что делает его перспективным кандидатом для разработки вакцин.

Внедрение результатов диссертационного исследования в практику

Результаты диссертационного исследования внедрены в учебно-методическую и научно-исследовательскую деятельность кафедры фармакологии ФГАОУ ВО «Белгородский государственный национальный исследовательский университет». Акт внедрения б/н от 21.03.2025 г.

Этическая экспертиза научного исследования в Локальном этическом комитете (по медицинским и фармацевтическим наукам)

Проводимое исследование в рамках диссертационной работы «Получение рекомбинантного флагеллина *Pseudomonas aeruginosa* и исследование его иммунобиологических свойств» обосновано и одобрено Локальным советом по этике ФГБНУ «Научно-исследовательский институт вакцин и сывороток им. И.И. Мечникова» выписка из протокола № 7 от 09.09.2022 г.

Научная специальность, которой соответствует диссертация

Диссертация соответствует паспорту научной специальности 1.5.11. Микробиология, областям исследования по п. 4. «Строение микробной клетки», п. 11. «Геномный и метагеномный анализ микроорганизмов и их сообществ», п. 12. «Патогенные микроорганизмы, факторы вирулентности и патогенности», п. 15. «Структурированные сообщества микроорганизмов, в том числе биопленки».

Полнота изложения материалов диссертации в работах, опубликованных соискателем

По результатам исследования автором опубликовано 12 работ, в том числе 2 научные статьи в журналах, входящих в международные базы данных; 1

патент; 9 публикаций в сборниках материалов международных и всероссийских научных конференций.

Оригинальные научные статьи в научных изданиях, включенных в международные, индексируемые базы данных Web of Science, Scopus, PubMed, MathSciNet, zbMATH, Chemical Abstracts, Springer:

1) Жеребцов, А. П. Получение рекомбинантного флагеллина С *Pseudomonas aeruginosa* и изучение его иммунобиологических свойств / А. П. Жеребцов, А. А. Калошин, Н. А. Михайлова // Биопрепараты. Профилактика, диагностика, лечение. – 2024. – Т. 24, – № 1. – С. 91-102. – DOI 10.30895/2221-996X-2024-24-1-91-102 [Chemical Abstracts].

2) Получение моноклональных антител для детекции рекомбинантного флагеллина С *Pseudomonas aeruginosa* / А. П. Жеребцов, И. В. Яковлева, Н. Ф. Гаврилова, Н. А. Михайлова // Инфекция и иммунитет. – 2024. – Т. 14, – № 3. – С. 551-556. – DOI 10.15789/2220-7619-POM-16865 [Scopus, Web of Science].

Патенты:

1) Патент № 2793753 С1 Российская Федерация, МПК С12N 1/21, С12N 15/31, С12N 15/70. Рекомбинантная плазмидная ДНК рРА-FlicC, кодирующая синтез рекомбинантного флагеллина-С *Pseudomonas aeruginosa*, штамм *Escherichia coli* РА-FlicC - продуцент гибридного рекомбинантного белка и способ получения указанного белка: № 2022123813: заявл. 07.09.2022: опубл. 05.04.2023 / Калошин А. А., Жеребцов А. П., Михайлова Н. А.; заявитель Федеральное государственное бюджетное научное учреждение "Научно-исследовательский институт вакцин и сывороток им. И.И. Мечникова".
URL: <https://www.elibrary.ru/item.asp?id=53731035>.

Материалы конференций по теме диссертационного исследования:

1) Жеребцов, А. П. Получение моноклональных антител для выявления рекомбинантного флагеллина-С *Pseudomonas aeruginosa* / А. П. Жеребцов, И. В. Яковлева, Н. Ф. Гаврилова, Н. А. Михайлова // New Approaches in the Field of Microbiology, Virology, Immunology and Epidemiology: Сборник тезисов

молодых ученых в рамках международной конференции, посвященной 300-летию РАН, Москва, 23–24 апреля 2024 года. – Москва: ООО "Издательство «Перо», 2024. – С. 18-19.

2) Жеребцов, А. П. Исследование иммуногенных свойств рекомбинантной формы флагеллина-С *Pseudomonas aeruginosa* / А. П. Жеребцов, Н. А. Михайлова // New Approaches in the Field of Microbiology, Virology, Immunology and Epidemiology: сборник тезисов молодых ученых в рамках международной конференции, посвященной 300-летию РАН, Москва, 20–21 апреля 2023 года / ФГБНУ Научно-исследовательский институт вакцин и сывороток им. И.И. Мечникова. – Москва: Издательство «Перо», 2023. – С. 18.

3) Жеребцов, А. П. Исследование адъювантных свойств рекомбинантной формы флагеллина-с *Pseudomonas aeruginosa* / А. П. Жеребцов, А. А. Калошин, Н. А. Михайлова // Актуальная биотехнология. – 2023. – № 2. – С. 14. – DOI 10.20914/2304-4691-2023-2-14.

4) Жеребцов, А. П. Получение рекомбинантной формы флагеллина-С *Pseudomonas aeruginosa* / А. П. Жеребцов, Н. А. Михайлова, А. А. Калошин // New Approaches in the Field of Microbiology, Virology, Epidemiology and Immunology: Сборник тезисов молодых ученых в рамках международной конференции, посвященной 300-летию РАН, Москва, 03–04 июня 2022 года / Под редакцией В.В. Зверева. – Москва: Издательство «Перо», 2022. – С. 9.

5) Жеребцов, А. П. Получение и исследование рекомбинантной формы флагеллина С *Pseudomonas aeruginosa* / А. П. Жеребцов, А. А. Калошин, Н. А. Михайлова // Актуальная биотехнология. – 2022. – № 1. – С. 86.

6) Жеребцов, А. П. Перспективы использования флагеллина в составе вакцин / А. П. Жеребцов, Н. А. Михайлова // New Approaches in the Field of Microbiology, Virology and Immunology: Сборник тезисов молодых ученых в рамках международной конференции, посвященной 300-летию РАН, Москва, 30–31 марта 2021 года / Под редакцией В.В. Зверева. – Москва: Издательство «Перо», 2021. – С. 14-15.

- 7) Жеребцов, А. П. Получение рекомбинантного флагеллина *Pseudomonas aeruginosa* / А. П. Жеребцов, А. А. Калошин, Н. А. Михайлова // Актуальная биотехнология. – 2021. – № 1. – С. 182.
- 8) Жеребцов, А. П. Конструирование модельной системы для выявления рекомбинантного флагеллина *Pseudomonas aeruginosa* в ИФА / А. П. Жеребцов, Н. Ф. Гаврилова, И. В. Яковлева, Н. А. Михайлова // Актуальная биотехнология. – 2024. - № 4. – С. 6-7. – DOI 10.20914/2304-4691-2024-4-6-7.
- 9) Жеребцов, А. П. Исследование влияния моноклональных антител к рекомбинантному флагеллину на биопленкообразование *Pseudomonas aeruginosa* / А. П. Жеребцов, И. В. Яковлева, Н. А. Михайлова // New Approaches in the Field of Microbiology, Virology, Immunology and Epidemiology: Сборник тезисов молодых ученых в рамках международной конференции, посвященной 80-летию Великой Победы, Москва, 22–23 апреля 2025 года. – Москва: Издательство «Перо», 2025. – С. 14-15.

Основные положения диссертации были доложены и обсуждены на научных конференциях:

- 1) Конференции «Биотехнология: наука и практика» с 20 по 24 сентября 2021 г. в санатории Ай-Петри (пгт. Кореиз, Алушкинское шоссе, 15, Крым);
- 2) Конференции молодых ученых с международным участием «New Approaches in the Field of Microbiology, Virology and Immunology» ФГБНУ НИИВС им И.И. Мечникова (Москва, 30–31 марта 2021 г.);
- 3) X Международной научно-практической конференции «Биотехнология: наука и практика» 12-16 сентября 2022 г. в экоотеле «Алые Паруса» (к.п. Сатера, Алушта, Крым);
- 4) Конференции молодых ученых с международным участием «New Approaches in the Field of Microbiology, Virology and Immunology» ФГБНУ НИИВС им И.И. Мечникова (Москва, 03–04 июня 2022 г.);
- 5) XI международной научно-практической конференции «Биотехнология: наука и практика» (п. Новомихайловский Краснодарский край, Туапсинский район 11-14 Сентября 2023 г.);

6) Конференции молодых ученых с международным участием «New Approaches in the Field of Microbiology, Virology and Immunology» ФГБНУ НИИВС им И.И. Мечникова (20–21 апреля 2023 г.);

7) Конференции молодых ученых с международным участием «New Approaches in the Field of Microbiology, Virology and Immunology», в рамках международной конференции, посвященной 300-летию РАН. ФГБНУ Научно-исследовательский институт вакцин и сывороток им. И.И. Мечникова. (Москва, 2024 г.);

8) V - объединенного иммунологического форума (Пушкинские горы, 29 июня – 5 июля 2024 г.);

9) XII международной научно-практической конференции «Биотехнология: наука и практика» (п. Новомихайловский Краснодарский край, Туапсинский район 9-13 Сентября 2024 г.);

10) Конференции молодых ученых с международным участием «New Approaches in the Field of Microbiology, Virology and Immunology» ФГБНУ НИИВС им И.И. Мечникова (22–23 апреля 2025 г.).

Заключение

Диссертация соответствует требованиям п. 21 Положения о присуждении ученых степеней в ФГАОУ ВО Первый Московский государственный медицинский университет им. И.М. Сеченова Министерства здравоохранения Российской Федерации (Сеченовский Университет), утвержденного приказом от 06.06.2022 г. № 0692/Р, и не содержит заимствованного материала без ссылки на автора(ов).

Первичная документация проверена и соответствует материалам, включенным в диссертацию.

Диссертационная работа Жеребцова Антона Павловича «Получение рекомбинантного флагеллина *Pseudomonas aeruginosa* и исследование его иммунобиологических свойств» рекомендуется к защите на соискание ученой степени кандидата медицинских наук по специальности 1.5.11. Микробиология.

