

УТВЕРЖДАЮ

Директор Федерального государственного
бюджетного научного учреждения
«Научно-исследовательский институт
вакцин и сывороток им. И.И. Мечникова»,
д.м.н., академик РАН



Свитич О.А. Свитич О.А.

«*17*» *ноября* 2025 г.

ОТЗЫВ ВЕДУЩЕЙ ОРГАНИЗАЦИИ

Федерального государственного бюджетного научного учреждения «Научно-исследовательский институт вакцин и сывороток им. И.И. Мечникова» на диссертационную работу Козлова Евгения Максимовича «Оценка профиля сенсibilизации к молекулярным аллергенам Can f 1, Can f 2, Can f 3, Can f 4, Can f 5, Can f 6 у пациентов с аллергией на собаку», представленную на соискание ученой степени кандидата медицинских наук по специальности 3.2.7. Иммунология в диссертационный совет ДСУ 208.001.34 при ФГАОУ ВО Первый МГМУ им. И. М. Сеченова Минздрава России (Сеченовский Университет)

Актуальность темы диссертационного исследования

Аллергия на собак остаётся одной из наиболее частых форм сенсibilизации к бытовым аллергенам и продолжает представлять серьёзную медико-социальную проблему. Рост числа домашних животных, постоянное присутствие аллергенов собак в быту и общественных пространствах приводят к устойчивому увеличению заболеваемости аллергическим ринитом,

атопическим дерматитом и бронхиальной астмой. При этом симптомы у пациентов существенно варьируют от местных реакций до угрозы жизнеугрожающих осложнений, что делает раннюю и точную диагностику крайне важной.

Стандартная практика диагностики эпидермальной аллергии в России опирается на кожные пробы и определение IgE к экстрактам аллергенов. Однако экстракты представляют собой сложные и гетерогенные смеси, отличаются нестабильным содержанием отдельных белков и нередко вызывают перекрёстные реакции. Такие ограничения снижают специфичность и делают невозможным точное определение сенсibilизации к конкретным молекулярным компонентам аллергенов собаки. В итоге пациенты нередко получают неполную или ошибочную диагностическую информацию, что затрудняет выбор персонализированной терапии и оценку рисков тяжёлых реакций.

Включение подходов молекулярной аллергологии позволяет решать эти проблемы, определяя IgE-антитела к отдельным аллергенным молекулам. Такой подход позволяет дифференцировать истинную сенсibilизацию от перекрёстных реакций, определять клинически значимые аллергены и подбирать оптимальные схемы аллерген-специфической иммунотерапии. Для аллергии на собак это особенно важно, поскольку в патогенезе участвует несколько молекулярных компонентов (Can f 1 – Can f 6), при этом их вклад в развитие симптомов у пациентов различается.

Несмотря на высокий уровень распространённости аллергии на собак, в России исследования профилей сенсibilизации к индивидуальным молекулам практически отсутствуют, а отечественные диагностические панели не учитывают полный набор значимых аллергенов. Разработка и оценка диагностической ценности рекомбинантных аллергенов Can f 1 – Can f 6 позволит повысить точность лабораторной диагностики, определить клинически значимые мишени и сформировать научную основу для будущей персонализированной иммунотерапии.

Таким образом, реализация исследования Козлова Е.М. имеет высокую научную и практическую значимость, соответствует современным направлениям развития иммунологии и направлена на повышение качества ведения пациентов с аллергией на собак в Российской Федерации.

Связь работы с планом соответствующих отраслей науки и народного хозяйства

Направление диссертационного исследования соответствует п. 1 «Фундаментальные исследования, посвященные изучению строения и функционирования иммунной системы, её онто- и филогенеза», п. 2 «Изучение механизмов врожденного и адаптивного иммунитета в норме и при патологии», п. 5 «Изучение патогенеза иммуноопосредованных заболеваний (аллергии, первичные и вторичные иммунодефициты, аутоиммунные болезни)», п. 6 «Разработка и усовершенствование методов диагностики, лечения и профилактики инфекционных, аллергических и других иммунопатологических процессов», п. 7 «Разработка способов воздействия на иммунную систему с помощью фармакологических препаратов и методов иммунобиотерапии» Паспорта специальности 3.2.7. Иммунология (медицинские науки).

Новизна исследования и полученных результатов

Выполненная работа представляет собой первое комплексное исследование, в котором создана и экспериментально охарактеризована полная панель молекулярных аллергенов собаки Can f 1 – Can f 6 в растворимой форме, пригодной для применения в компонентной диагностике. Разработанные технологические подходы позволили получить рекомбинантные белки с подтверждённой нативной структурой и воспроизводимой биологической активностью.

Впервые предложено решение для экспрессии простатического калликрейна Can f 5 в клетках *E. coli* таким образом, чтобы исключить включение перекрёстно-реактивных углеводных детерминант. Это обеспечило получение антигена, распознаваемого специфическими IgE человека с высокой точностью, и устранило основную причину ложноположительных результатов при традиционных методах.

Новым представляется и то, что функциональные свойства всех шести молекул были изучены не только по структуре и IgE-связыванию, но и по способности вызывать дегрануляцию базофилов. Такой подход позволил количественно оценить их аллергенную активность и выделить клинически значимые компоненты — Can f 1, Can f 4 и Can f 5. Результаты показывают их ведущий вклад в сенсibilизацию пациентов и объясняют особенности иммунного ответа при аллергии на собак.

Полученные данные расширяют представления о молекулярных механизмах эпидермальной аллергии, подтверждают целесообразность замены экстрактов собак рекомбинантными аллергенами и создают основу для разработки персонализированных методов алергодиагностики и алерген-специфической иммунотерапии.

Представленные экспериментальные результаты, технологические решения и аналитические выводы не имеют прямых аналогов в отечественной литературе, что подтверждает самостоятельный и научно значимый характер выполненной работы.

Значимость для науки и практика полученных результатов

Работа имеет значительный научный потенциал, поскольку представляет собой первое отечественное исследование, в котором создана и охарактеризована полная панель рекомбинантных аллергенов собаки Can f 1 – Can f 6. Автором получены клоны-продуценты *E. coli*, оптимизированы

условия экспрессии и хроматографической очистки белков в растворимой форме, обеспечивающей корректную пространственную структуру молекул. Нативная структура и стабильность рекомбинантных аллергенов подтверждена данными электрофореза, MALDI-TOF масс-спектрометрии и спектроскопии кругового дихроизма, что является необходимым условием их применения в иммунологической диагностике.

Функциональная активность полученных молекул подтверждена двумя независимыми подходами: определением IgE-реактивности методом ImmunoCAP и анализом дегрануляции базофилов по высвобождению β -гексозаминидазы. Такой дизайн исследования позволил сопоставить структурные и иммунологические характеристики аллергенов и выделить компоненты с наибольшим клиническим значением — Can f 1, Can f 4 и Can f 5. Отдельно показано, что рекомбинантный Can f 5, полученный по авторскому протоколу, не содержит перекрёстно-реактивных углеводных детерминант, что повышает специфичность лабораторных тестов и снижает вероятность ложноположительных результатов.

Практическая значимость исследования заключается в создании отечественной технологической базы для компонентной диагностики аллергии на собак. Применение панели Can f 1 – Can f 6 позволяет определять индивидуальный профиль сенсibilизации, что важно при мультисенсibilизации, перекрёстном реагировании с липокалинами других видов животных и подборе персонализированных схем аллерген-специфической терапии. Показано, что при тестировании клинических образцов у всех пациентов регистрировались IgE-антитела к одному или нескольким молекулярным компонентам, что свидетельствует о высокой диагностической чувствительности компонентного подхода.

Полученные результаты имеют прикладной потенциал для разработки рекомбинантных вакцин и новых форм аллерген-специфической иммунотерапии, основанных на мажорных молекулах Can f 1, Can f 4 и Can f 5. Результаты исследования могут быть использованы при создании

национальных диагностических панелей, снижении зависимости от импортных тест-систем и внедрении персонализированной диагностики в аллергологическую практику.

Таким образом, диссертационная работа соединяет фундаментальный и прикладной уровни исследования: углубляет понимание молекулярных механизмов аллергии на собаку и одновременно формирует реальную основу для совершенствования лабораторной диагностики и терапевтических подходов в Российской Федерации.

Личный вклад автора

Козлов Е.М. принимал непосредственное участие на всех ключевых этапах исследования. Автором сформулированы цель и задачи работы, определена экспериментальная стратегия и последовательность выполнения исследований. Лично разработаны и оптимизированы протоколы экспрессии и хроматографической очистки рекомбинантных аллергенов Can f 1, Can f 2, Can f 4, Can f 5 и Can f 6 в системе *E. coli*, обеспечивающие получение белков в растворимой форме.

Автор выполнил клонирование генетических конструкций, культивирование штаммов-продуцентов, индукцию синтеза белков, а также их аналитическую верификацию с использованием ПААГ-электрофореза, MALDI-TOF масс-спектрометрии и спектроскопии кругового дихроизма. Впервые реализованный протокол получения Can f 5 в растворимой форме был разработан и экспериментально подтверждён самим автором.

Козлов Е.М. провёл функциональную оценку аллергенов на клеточной модели дегрануляции базофилов и участвовал в определении IgE-реактивности пациентов методом ImmunoCAP. Автор осуществил статистическую обработку результатов, интерпретировал полученные данные и сформулировал выводы.

По итогам исследования автором подготовлен основной текст диссертации и публикации, освещающие ключевые результаты работы; также осуществлено участие в оформлении патентных документов.

Конкретные рекомендации по использованию результатов и выводов диссертационного исследования

Полученные рекомбинантные аллергены Can f 1 – Can f 6 могут применяться в составе компонентных тест-систем для точного определения спектра сенсibilизации у пациентов с подозрением на аллергию на собак, в том числе при отрицательных или неопределённых результатах исследования на экстракт.

Определение IgE к Can f 5 целесообразно использовать как дополнительный маркер истинной сенсibilизации к аллергенам собаки, особенно в условиях вероятной перекрёстной реактивности с эпидермальными аллергенами других животных.

Выявленные мажорные компоненты Can f 1, Can f 4 и Can f 5 представляют практический интерес для разработки новых подходов аллерген-специфической иммунотерапии, включая создание рекомбинантных аллерговакцин и гипоаллергенных форм.

Разработанные технологические протоколы экспрессии, очистки и структурной верификации рекомбинантных белков могут быть внедрены в производство отечественных диагностических наборов, что позволит расширить доступность компонентной диагностики в клинической практике.

Полученные сведения о распределении профилей сенсibilизации следует учитывать при выборе тактики ведения пациентов, подборе персонализированных схем лечения и интерпретации случаев мультисенсibilизации.

Количество печатных работ

По результатам исследования автором опубликовано 10 работ, в том числе 2 научные статьи в журналах, включенных в Перечень рецензируемых научных изданий Сеченовского Университета / Перечень ВАК при Минобрнауки России, в которых должны быть опубликованы основные научные результаты диссертаций на соискание ученой степени кандидата наук, 1 статья в изданиях, индексируемых в международных базах Web of Science, Scopus, PubMed, 4 иных публикаций по результатам исследования, 1 патент, 2 публикации в сборниках материалов всероссийских научных конференций.

Структура и содержание диссертации, ее завершенность

Диссертационная работа имеет объём 120 страниц и включает введение, четыре главы (обзор литературы, материалы и методы, результаты исследования, обсуждение), заключение, выводы, практические рекомендации и список литературы. Материал иллюстрирован 26 рисунками и 14 таблицами, что обеспечивает наглядность и достаточный уровень доказательности представленных данных.

Во введении последовательно изложены цель и задачи исследования, обоснована актуальность, обозначена научная новизна, теоретическая и прикладная значимость работы, а также сформулированы основные положения, выносимые на защиту.

Первая глава содержит развёрнутый аналитический обзор литературы, отражающий современное состояние вопроса. Рассмотрены эпидемиологические особенности эпидермальной аллергии, механизмы IgE-опосредованных реакций, аспекты врождённого и адаптивного иммунного ответа, а также данные о структуре и функциях основных аллергенов собак Can f 1 – Can f 6. Приведён анализ современных диагностических подходов, включая компонентную аллергодиагностику. Литературный раздел

свидетельствует о глубокой проработке темы и критическом подходе к оценке источников.

Во второй главе подробно описаны материалы и методы. Представлен дизайн исследования, характеристика выборки, перечень используемых методик и оборудования. Описаны этапы конструирования экспрессионных векторов, экспрессия рекомбинантных белков в системе *E. coli*, методы выделения, очищения и структурной верификации аллергенов, а также подходы к оценке их функциональной активности (дегрануляция базофилов, анализ IgE-реактивности). Изложение выполнено полно и корректно, с указанием ключевых параметров, обеспечивающих воспроизводимость экспериментов.

Третья глава посвящена непосредственным результатам исследования. Автором получены рекомбинантные молекулы Can f 1, Can f 2, Can f 4, Can f 5 и Can f 6 в растворимой форме; проведена их детальная характеристика. В работе представлен оригинальный протокол получения Can f 5 в системе *E. coli* без включения перекрёстно-реактивных углеводных детерминант. Приведены данные о физико-химических свойствах белков, их IgE-реактивности и способности индуцировать дегрануляцию базофилов. Показано, что максимальную аллергенную активность демонстрируют Can f 1, Can f 4 и Can f 5.

В четвёртой главе выполнен анализ и интерпретация полученных данных с сопоставлением с данными литературы. Обосновано значение выявленных профилей сенсibilизации для дифференциальной диагностики истинной аллергии на собак и перекрёстных реакций.

Заключение, выводы и практические рекомендации логично связаны с результатами работы, соответствуют поставленным целям и подтверждают завершённый и самостоятельный характер исследования.

Соответствие содержания автореферата основным положениям и выводам диссертации

Автореферат корректно отражает содержание диссертационной работы: изложены цель, задачи, новизна, методы, основные результаты и выводы. Положения, выносимые на защиту, совпадают с формулировками диссертации и подтверждены приведёнными данными. Выводы и практические рекомендации в автореферате соответствуют материалам диссертации и логически вытекают из результатов исследования.

Достоинства и недостатки в содержании и оформлении диссертации

Диссертация отличается высоким уровнем научной проработки и аккуратным оформлением. К основным достоинствам следует отнести чёткую логическую структуру работы, наличие полного цикла экспериментального исследования — от получения рекомбинантных молекул до анализа их функциональной активности и клинической значимости. Актуальность темы и обоснование выбора направления исследования представлены убедительно. Литературный обзор глубокий, современный и отражает ключевые направления развития молекулярной аллергологии, что свидетельствует о хорошем владении автором теоретической базой.

Экспериментальная часть выполнена корректно, с применением современных методов молекулярной биологии, биохимии и иммунологии. Результаты изложены последовательно, снабжены таблицами, графиками и схемами, что повышает наглядность и облегчает восприятие материала. Выводы логично вытекают из полученных данных и полностью соответствуют сформулированным целям и задачам.

К числу недостатков можно условно отнести отдельные технические недочёты оформления, единичные опечатки и разночтения в обозначениях, не влияющие на восприятие содержания. В некоторых разделах обсуждение результатов могло бы быть расширено дополнительным сопоставлением с данными зарубежных исследований, однако это не снижает научной ценности

работы. В целом выявленные замечания имеют частный характер и не затрагивают основного содержания.

Таким образом, диссертация обладает хорошей структурой, высокой степенью завершённости, внутренней логикой и соответствует требованиям, предъявляемым к кандидатским диссертациям по медицинским наукам.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Диссертационная работа Козлова Евгения Максимовича «Оценка профиля сенсibilизации к молекулярным аллергенам Can f 1, Can f 2, Can f 3, Can f 4, Can f 5, Can f 6 у пациентов с аллергией на собаку» представляет собой завершённое самостоятельное исследование. В работе получено новое научное решение, заключающееся в изучении особенностей сенсibilизации к основным молекулярным аллергенам собак и оценке их клинической значимости для совершенствования диагностики и лечения аллергических заболеваний.

Полученные результаты отличаются достоверностью, обладают научной новизной и имеют теоретическую и прикладную ценность для развития молекулярной аллергологии и клинической иммунологии. Работа выполнена на современном методическом уровне с использованием валидированных экспериментальных подходов. Научные положения, выносимые на защиту, подтверждены достаточным объемом экспериментального материала, результаты хорошо согласуются с данными мировой литературы. Содержание диссертации отличается логичностью изложения, внутренней согласованностью и полнотой представления материала. Сформулированные выводы логично вытекают из результатов исследования и подтверждаются приведёнными данными, что соответствует требованиям. 16 Положения о присуждении ученых степеней в федеральном государственном автономном образовательном учреждении высшего образования Первый Московский государственный медицинский университет

имени И.М. Сеченова Министерства здравоохранения Российской Федерации (Сеченовский Университет), утвержденного приказом ректора № 0692/Р от 06.06.2022 года (с изменениями, утвержденными: приказом №1179/Р от 29.08.2023г., приказом №0787/Р от 24.05.2024г.), предъявляемым к кандидатским диссертациям, а ее автор Козлов Евгений Максимович заслуживает присуждения искомой ученой степени по специальности – 3.2.7. Иммунология (медицинские науки).

Отзыв обсужден и одобрен на заседании конференции отдела Иммунологии и аллергологии Федерального государственного бюджетного научного учреждения «Научно-исследовательский институт вакцин и сывороток им. И.И. Мечникова» (Протокол № 5 от 25 ноября 2025 г.)

Отзыв составил:

Зав.лабораторией по разработке аллергенов,
доктор биологических наук, профессор
(3.2.7.)

Бержец В.М.

Подпись д.б.н., профессора Бержец Валентины Михайловны заверяю
Ученый секретарь ФГБНУ НИИВС
им. И.И. Мечникова



Васильева А.В.

«27» ноября 2025 г.

Федеральное государственное бюджетное научное учреждение «Научно-исследовательский институт вакцин и сывороток им. И.И. Мечникова» (ФГБНУ НИИВС им. И.И. Мечникова).

Адрес: 105064, г. Москва, Малый Казенный переулок, д.5А,

Тел. +7 (495) 917-49-00, e-mail: mech.inst@mail.ru, сайт: <https://instmech.ru>