

ОТЗЫВ

официального оппонента, доктора медицинских наук, профессора Царева Виктора Николаевича на диссертационную работу Жеребцова Антона Павловича на тему: «Получение рекомбинантного флагеллина *Pseudomonas aeruginosa* и исследование его иммунобиологических свойств», представленную в диссертационный совет ДСУ 208.001.34 при федеральном государственном автономном учреждении высшего образования Первый московский государственный медицинский университет имени И.М. Сеченова (Сеченовский университет) Министерства здравоохранения Российской Федерации на соискание ученой степени кандидата медицинских наук по специальности 1.5.11. Микробиология (медицинские науки)

Актуальность темы диссертационной работы

Синегнойная палочка (*Pseudomonas aeruginosa*) – один из основных возбудителей очаговых и генерализованных форм гнойно-воспалительных заболеваний у людей, прежде всего, инфекций, связанных с оказанием медицинской деятельности (ИСМП), обусловленных снижением локальных или системных механизмов защиты.

Важным свойством этого возбудителя является лекарственная устойчивость, обусловленная как генетическими механизмами, так и способностью к быстрой генерации биоплёнок в различных биотопах организма человека. Важная роль в патогенезе *P. aeruginosa* отводится жгутиковому аппарату, в частности белку флагеллину, который опосредует ключевые этапы инфекционного процесса - колонизацию поверхностей, инициацию и образование биопленок, что, в свою очередь, обуславливает устойчивость возбудителя к антимикробным препаратам. Флагеллины в свою очередь способны стимулировать иммунные реакции и активировать TLR5 фактор врожденного иммунитета.

Поэтому, синегнойная палочка в документах ВОЗ по праву входит в особую группу ESKAPE патогенов, наряду с мультирезистентными штаммами стафилококков, клебсиелл и некоторых других возбудителей ИСМП.

В лаборатории протективных антигенов ФГБНУ НИИВС им. И.И. Мечникова проведены эксперименты по созданию противосинегнойной вакцины, получен ряд рекомбинантных белков OprF, OprI, делеционный вариант экзотоксина А (aTox), а также слитые конструкции проявляющие защитные свойства от экспериментальной синегнойной инфекции. Для повышения иммуногенности все рекомбинантные белки были сорбированы на гидроксиде алюминия. Дальнейшие исследования, направленные на подбор адъюванта, являются необходимым условием для обеспечения формирования более выраженного и длительного иммунного ответа при вакцинации. Перспективным кандидатом на эту роль может стать рекомбинантный белок флагеллин (FliC) *P. aeruginosa*, который является лигандом для рецептора врожденной иммунной системы, что обосновывает целесообразность его применения в составе экспериментального вакцинного препарата.

Таким образом, исследование штаммов синегнойной палочки, выделяемых при различных инфекциях, представляют собой крайне актуальную проблему современной клинической медицины и медицинской микробиологии, соответственно. Проведённое в рассматриваемой диссертационной работе детальное изучение иммунобиологических свойств рекомбинантного белка флагеллина *P. aeruginosa* позволит определить его иммуногенный потенциал и способность индуцировать протективный иммунитет.

Обоснованность научных положений, выводов и рекомендаций, сформулированных в диссертации

Полученные диссертантом результаты и выводы достоверны, соответствуют поставленным задачам исследования. Научные положения, выдвинутые на защиту логичны и обоснованы в процессе изложения материала диссертации.

При выполнении работы над диссертацией в полном объеме использовано сертифицированное оборудование, современная методология, соответствующая экспериментальная и доказательная база.

Для выделения геномной ДНК и оценки иммунобиологических свойств рекомбинантного флагеллина использовали: *P. aeruginosa* штамм PA-103 (ATCC 29260), *K. pneumoniae* штамм № 204 из музея из коллекции лаборатории протективных антигенов НИИВС им. И.И. Мечникова [номер в других коллекциях: № 50055; № 180103]. При клонировании генно-инженерных конструкций использовали коммерческие штаммы: *E. coli* M15 [pREP4] (nalsstrsrifslac-ara+gal+mtl-F-recA+uvr+lon+[pREP4]) (Qiagen, США), *E. coli* DH5α (Invitrogen, США).

Для экспрессии и клонирования гена *fliC* *P. aeruginosa* использовали рекомбинантную плазмиду pTZ57R (Qiagen, США) и рекомбинантную плазмиду pQE-30 (Fermentas, Литва).

Экспериментальные исследования проведены на белых беспородных мышах одного пола массой 14-16 г и 18-20 г, а также мышах линии BALB/c массой 15-18 г, соответствуют межгосударственному стандарт (ГОСТ 33217-2014), протоколы исследований утверждены ЛЭК ФГБНУ НИИВС им. И. И. Мечникова (выписка из протокола №7 от 9 сентября 2022 г.).

Достоверность и новизна исследования, полученных результатов

Достоверность результатов обеспечена достаточным объемом экспериментальных повторностей и применением адекватных методов статистического анализа, что соответствует требованиям доказательной медицины.

Научная новизна исследования заключается в том, что впервые был 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.

Выявлены защитные свойства полученного рекомбинантного белка FliC на модели экспериментальной синегнойной инфекции у мышей, продемонстрированы адъювантные возможности рекомбинантного белка FliC при сочетанном введении с поверхностным антигеном *K. pneumoniae*.

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*.

Несомненную новизну имеет получение диссертантом 3-х гибридом - продуцентов моноклональных антител, взаимодействующих с одним участком молекулы рекомбинантного белка FliC, и показана перспектива их использования в ИФА, для детекции данного антигена.

Значимость для науки и практики полученных автором результатов

Сконструированный диссертантом штамм-продуцент *E. coli* pQE-30-FliC характеризуется высоким выходом целевого продукта при культивировании, а разработанный оригинальный метод очистки рекомбинантного белка FliC *P. aeruginosa* позволяет получать его со степенью чистоты 97,6 %. Новизна подтверждена патентом Российской Федерации № 2793753 С1 от 05.04.2023.

Диссертантом проведён широкий круг исследований по изучению иммунобиологической активности этого белка, необходимых для разработки кандидатной вакцины. В рамках дальнейших исследований, необходимо оценить перспективы использования и включения рекомбинантного белка FliC *P. aeruginosa* в состав антисинегнойной рекомбинантной вакцины.

Результаты диссертационного исследования внедрены в учебно-методическую и научно-исследовательскую деятельность кафедры фармакологии ФГАОУ ВО «Белгородский государственный национальный исследовательский университет». Акт внедрения № 1 от 21.03.2025.

Соответствие диссертации паспорту специальности

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

Полнота освещения результатов диссертации в печати

По теме диссертационного исследования опубликовано 12 печатных работ, в том числе 2 научные статьи в журналах, входящих в международные базы данных Scopus, Web of Science, Chemical Abstracts, 1 – патент, 9 – публикаций в сборниках материалов международных всероссийских и межрегиональных научных конференций.

Содержание и оформление диссертационной работы

Настоящая диссертационная работа объемом 129 страниц представляет собой законченное научное исследование, выполненное в соответствии с установленными требованиями. Работа содержит все необходимые структурные элементы: введение с обоснованием актуальности исследования, подробный аналитический обзор литературы, описание методологической базы, представление и анализ полученных результатов, заключение с выводами и практическими рекомендациями, а также перспективные направления дальнейших исследований.

Особое внимание уделено справочному аппарату - работа включает перечень сокращений и обширный библиографический список из 193 источников (66 отечественных и 127 зарубежных публикаций), что свидетельствует о глубине проработки темы. Наглядность представления результатов обеспечивают 6 таблицами и 21 рисунком.

Во введении автор последовательно раскрывает теоретическую и практическую значимость исследования, анализирует степень

разработанности проблемы, четко формулирует цели и задачи работы, выделяет элементы научной новизны, определяет положения, выносимые на защиту, а также приводит сведения об апробации результатов и своем личном вкладе в исследование.

Аналитический обзор литературы представляет собой систематизированное изложение современных научных представлений о проблемах, связанных с лечением *P. aeruginosa* и перспективах использования флагеллина в составе кандидатных вакцин. Этот раздел заканчивается убедительным резюме, что демонстрирует глубокое понимание автором исследуемой проблематики. Нельзя не согласиться с диссертантом, что разработка безопасных форм флагеллина и его комбинаций с другими адъювантами, на которых сделан акцент в диссертационной работе, может значительно повысить эффективность и безопасность данной группы вакцин.

Методологический раздел содержит детальное описание методик, которые соответствуют современным научным стандартам.

Диссертантом использованы современные экспериментально-биологические, иммунохимические, молекулярно-биологические и молекулярно-генетические методы исследования, включая традиционное секвенирование по Сэнгеру, амплификацию гена *fliC* в ПЦР, выделение плазмидной ДНК, получения компетентных клеток *E. coli* штамма M15 (Qiagen, США) и последующую трансформацию клеток для получения рекомбинантного белка FliC. Для получения рекомбинантного белка в минипрепаративных количествах проводили культивирование с индукцией экспрессии генов. Оценку чистоты полученной белковой фракции рекомбинантного белка проводили при помощи обработки результатов электрофореза в ПААГ с использованием программного обеспечения Phoretix 1D (Total Lab, Великобритания). Концентрацию эндотоксинов в испытуемом образце рассчитывали с помощью стандартной калибровочной кривой, построенной относительно существующего стандарта эндотоксина.

Результаты собственных исследований автора изложены в логической последовательности и полностью отражают научную новизну и практическую значимость проведённой работы. В этом разделе проведено клонирование нуклеотидных последовательностей, кодирующих рекомбинантный белок флагеллин *P. aeruginosa*, включая все процедуры необходимые по соответствующим отечественным и международным стандартам, а также подробно описаны результаты, полученные при использовании всего комплекса использованных методов.

Опыты по оценке протективного эффекта включали в себя иммунизацию мышей композицией, содержащей рекомбинантный белок FliC и поверхностный антиген *K. pneumoniae*, выбранный в качестве антигенной мишени для оценки адъювантного эффекта. Следует отметить скрупулёзно-добросовестное отношение исследователя к своей работе - для решения поставленных задач в опытах использовано 6 групп мышей по 40 шт. в каждой. Специфичность полученных на гибридах моноклональных антител оценивали путём анализа их иммунохимических свойств, а именно: определения классов и изотипов антител, оценки перекрёстной реактивности и специфического связывания в иммуноблоттинге.

Заключение обобщает полученные результаты и определяет перспективы дальнейшего исследования и практического применения в медицине. Полученный диссертантом штамм-продуцент обеспечивает стабильную экспрессию рекомбинантного белка FliC, что позволит стандартизировать и масштабировать процесс получения антигена с воспроизводимыми характеристиками.

Соответствие содержания автореферата основным положениям и выводам диссертации

Содержание автореферата полностью отражает основные положения и выводы диссертационной работы А.П. Жеребцова. Автореферат написан хорошим литературным языком, раскрывает суть и логику научного исследования, хорошо иллюстрирован 6 таблицами и 6 рисунками.

Замечания и вопросы по содержанию и оформлению диссертации

Диссертация изложена в доступной и логичной форме, хорошо аргументирована. Принципиальных замечаний по представленной работе нет. Имеются единичные, крайне незначительные, стилистические неточности и опечатки, которые никак не влияют на результаты и значимость исследования.

В порядке дискуссии хотелось бы уточнить позицию диссертанта по следующим вопросам:

1. Какие Вы видите перспективы более высокого уровня очистки рекомбинантного белка FliC или этого не требуется?
2. В каких клинических ситуациях Вы планируете применение рекомбинантной антисинегнойной вакцины, когда она будет доведена до финиша?
3. Возможно ли применение такого препарата с профилактической целью в группах риска, например, при муковисцерозе?

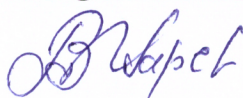
Заключение

Таким образом, диссертационная работа Жеребцова Антона Павловича на тему: «Получение рекомбинантного флагеллина *Pseudomonas aeruginosa* и исследование его иммунобиологических свойств» на соискание ученой степени кандидата медицинских наук, выполненная под руководством доктора медицинских наук, профессора Михайловой Натальи Александровны, является законченной научно-квалификационной работой, в которой содержится решение научной задачи – разработки вакцин для специфической профилактики инфекций, вызываемых устойчивыми патогенами, на основе рекомбинантного флагеллина *Pseudomonas aeruginosa*, имеющей существенное значение для современной микробиологии, что соответствует требованиям п. 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., приказом №1085/Р от 10 июля 2025 г.), предъявляемым к кандидатским диссертациям, а ее автор Жеребцов Антон Павлович заслуживает присуждения искомой ученой степени кандидата медицинских наук по специальности 1.5.11. Микробиология.

Официальный оппонент:

Заслуженный деятель науки России, доктор медицинских наук, профессор, заведующий кафедрой микробиологии, вирусологии, иммунологии, федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение высшего образования «Российский университет медицины» Министерства здравоохранения Российской Федерации
127006, г. Москва, ул. Долгоруковская дом 4
(nikola777@rambler.ru 8(903) 756-12-58)



(подпись)

Царев Виктор Николаевич

10.06.2026г.

Специальность: 1.5.11. Микробиология (03.02.03.)

Согласен на обработку персональных данных.

Подпись доктора медицинских наук, профессора Царева Виктора Николаевича заверяю

Ученый секретарь ФГБОУ ВО «Российский университет медицины» Минздрава России, доктор медицинских наук, доцент

Раснер П.И.

Федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение высшего образования «Российский университет медицины» Министерства здравоохранения Российской Федерации. Адрес: 127006, г. Москва, ул. Долгоруковская дом 4 Тел: +7 (495) 609-67-00, E-mail: info@rosunimed.ru, Сайт: <https://rosunimed.ru/>