

ОТЗЫВ

официального оппонента, члена корреспондента РАН, доктора медицинских наук, профессора Суворова Александра 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 на соискание ученой степени кандидата медицинских наук по специальности 1.5.11. Микробиология.

Актуальность темы диссертационной работы

Pseudomonas aeruginosa условно-патогенная грамотрицательная подвижная неспорообразующая бактерия, имеющая ряд факторов вирулентности, играющих роль в развитии инфекции.

Важная роль в патогенезе *P. aeruginosa* отводится жгутиковому аппарату, который опосредует ключевые этапы инфекционного процесса - колонизацию поверхностей, инициацию и образование биопленок, что, в свою очередь, обуславливает устойчивость возбудителя к антимикробным препаратам. Известно, что жгутики состоят из белка - флагеллина (от *flagellum* – жгутик), а флагеллины в свою очередь способны стимулировать иммунные реакции и активировать TLR5 фактор врожденного иммунитета.

В настоящее время исследования по разработке вакцины против *P. aeruginosa* проводятся в ряде стран мира, включая Российскую Федерацию. Некоторые разработки находятся в различных фазах клинических испытаний, однако коммерческих вакцинных препаратов до сих пор нет на рынке. 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. В настоящее время

особенности иммунного ответа на флагеллин *P. aeruginosa* исследованы слабо, что определяет новизну данного исследования.

Таким образом, выделение белка флагеллина с помощью рекомбинантных технологий и детальное изучение иммунобиологических свойств рекомбинантного белка флагеллина *P. aeruginosa* позволит определить его иммуногенный потенциал и способность индуцировать протективный иммунитет в отношении возбудителя синегнойной палочки.

Обоснованность научных положений, выводов и рекомендаций, сформулированных в диссертации

Полученные результаты достоверны, а выводы и научные положения обоснованы, что подтверждается в описании исследований в соответствующих разделах диссертационной работы.

Достоверность и новизна исследования, полученных результатов

Достоверность результатов обеспечена полученными данными клонирования, секвенирования ДНК, а также достаточным объемом экспериментальных повторностей и применением адекватных методов статистического анализа, что соответствует требованиям доказательной науки.

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 РА-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.

Значимость для науки и практики полученных автором результатов

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.

Полученные результаты по исследованию иммунобиологических свойств рекомбинантного флагеллина *P. aeruginosa* позволяют надеяться, что в рамках дальнейших исследований, полученный рекомбинантный белок сможет быть использован для включения в состав антисинегнойной рекомбинантной вакцины.

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 метагеномный 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 128 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. Диссертация подготовлена согласно сложившейся традиции подготовки диссертационных работ и содержит раздел введения, описания материалов и методов, раздела результатов и заключения.

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 демонстрирует глубокое понимание автором исследуемой проблематики. В целом литературный обзор подготовлен с использованием хорошего языка, практически нет ошибок в изложении, а в самом обзоре приводятся данные

актуальной научной литературы по предмету. Меня несколько удивило, что автор при описании вариантов вакцин против синегнойной палочки описывал лишь отечественные разработки, в то время как существует очень много исследований, проводимых за рубежом (Baker SM, McLachlan JB, Morici LA. Immunological considerations in the development of *Pseudomonas aeruginosa* vaccines. Hum Vaccin Immunother. 2020;16(2):412-418. doi: 10.1080/21645515.2019.1650999 или Merakou C, Schaefers MM, Priebe GP. Progress Toward the Elusive *Pseudomonas aeruginosa* Vaccine. Surg Infect (Larchmt). 2018 Nov/Dec;19(8):757-768. doi: 10.1089/sur.2018.233). В обзоре, на мой взгляд, не следовало представлять структуру жгутиков, которая показывается в каждом учебнике по микробиологии, а если и показывать, то следовало отметить, какой из белков на данной картине является целевым для задач клонирования.

Методологический раздел содержит детальное описание методик, которые соответствуют современным научным стандартам. Описываемые методики в целом понятны и воспроизводимы. Некоторые протоколы представлены даже избыточно. Мне не хватило в разделе методов описания методики получения поверхностных антигенов бактерий *K. pneumoniae*.

Результаты собственных исследований изложены в логической последовательности и полностью отражают научную новизну и практическую значимость проведённой работы. Автор последовательно рассказывает о этапах клонирования, выделения рекомбинантного белка, его биохимический и иммунологический анализ. Приятно, что помимо биотехнологической части работы диссертант сумел получить моноклональные антитела к флагеллину. Выводы по проделанной работе вполне соотносятся с поставленными задачами.

Соответствие содержания автореферата основным положениям и выводам диссертации

Содержание автореферата полностью отражает основные положения и выводы диссертационной работы А.П. Жеребцова.

Замечания по содержанию и оформлению диссертации

Работа, изложенная по обычному плану и является хорошим, умело изложенным описанием работ диссертанта. Некоторые замечания, относящиеся к методам работы и обзорной части работы отмечены мною выше. Считаю, что идеологически в обзоре и введении следовало бы более подробно отразить научную целесообразность клонировать флагеллин из синегнойной палочки и хотелось бы услышать мнение автора, в чем состоит преимущество данного антигена по сравнению с хорошо исследованным флагеллином сальмонелл.

По-моему, автору стоило бы более подробно описать сам белок в сравнении с аналогичным белком сальмонелл указав на участки отличий.

В порядке дискуссии, мне любопытно мнение диссертанта относительно достаточности протективной эффективности сконструированного белка. Хотелось бы знать, как диссертант представляет будущую вакцину против синегнойной палочки: как вакцинный белковый монопрепарат или как комплекс с другими генами патогенности. Не будет ли в случае иммунизации таким белком подавляться нормальная микробиота хозяина, обладающая сходными антигенными характеристиками?

Эти замечания не имеют принципиального характера, а данную квалификационную работу я характеризую исключительно положительно.

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 является законченной научно-квалификационной работой, в которой содержится решение научной задачи – Получение рекомбинантного флагеллина *Pseudomonas aeruginosa* и исследование его иммунобиологических свойств, 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 по специальности 1.5.11. Микробиология.

Официальный оппонент:

член-корреспондент РАН, доктор медицинских наук, профессор
Федеральное государственное бюджетное научное учреждение
«Институт экспериментальной медицины»
197022, Санкт-Петербург, улица Академика Павлова, 12
nativus2@gmail.com, тел : +7 921 934-28-12



(подпись)

Суворов Александр Николаевич

Специальность: 1.5.11. Микробиология (03.02.03.)

Согласен на обработку персональных данных.

5 июля 20 26 г.

Подпись член-корреспондента РАН, доктора медицинских наук, профессора,
Суворова Александра Николаевича заверяю:

Федеральное государственное бюджетное научное учреждение «Институт
экспериментальной медицины»

197022, Санкт-Петербург, улица Академика Павлова, 12

Тел: +7 (812) 234-68-68, email: iem@iemspb.ru, сайт : <https://iemspb.ru>

