

«УТВЕРЖДАЮ»

Проректор по научной работе  
Федерального государственного  
бюджетного образовательного учреждения высшего образования  
«Российский национальный исследовательский  
медицинский университет имени Н.И. Пирогова»  
Министерства здравоохранения  
Российской Федерации



Д.В.Ребриков

« 22 » 02. 2018 2018 г.

### Отзыв ведущей организации

Федерального государственного бюджетного образовательного учреждения высшего образования «Российский национальный исследовательский медицинский университет имени Н.И. Пирогова» Министерства здравоохранения Российской Федерации на диссертационную работу **Кашириной Елены Игоревны** по теме: «Разработка системы гипоаллергенной упаковки белков в полимерный матрикс», представленную на соискание ученой степени кандидата химических наук по специальности 03.01.06 - Биотехнология (в том числе бионанотехнологии)

### Актуальность темы выполненной работы

Диссертационная работа Кашириной Е.И. посвящена актуальной тематике - разработке безопасных и эффективных препаратов для специфической иммунотерапии аллергии I типа, опосредованной формированием антител класса E на безвредные белки, на основе капсулированных аллергенов различного происхождения. Несмотря на долгую историю создания и применения препаратов для аллерген-специфической иммунотерапии (АСИТ), на рынке отсутствуют стандартизированные формы; терапия проводится длительно; существует риск побочных реакций вплоть до анафилактического шока; требуется проведение лечения в амбулаторных условиях. Все эти особенности терапии наряду с относительно низкой эффективностью делают АСИТ малопривлекательной для больных со слабыми и умеренными формами аллергии. В то же время, отсутствие своевременной терапии приводит к



постепенному утяжелению течения болезни вплоть до астмы. Аллергия I типа может возникать уже на первом году жизни и продолжаться всю жизнь с постепенным утяжелением формы заболевания (атопический марш). Дети с аллергическими заболеваниями чаще болеют, отводятся от вакцинации, хуже развиваются и социализируются в детском возрасте и хуже учатся в школе и институтах. Таким образом, решение проблемы аллергии I типа является актуальной проблемой здравоохранения.

### **Оценка содержания и оформления работы**

В основе аллергической реакции I типа лежит связывание поступающего из внешней среды аллергена с иммобилизованными на поверхности тучных клеток IgE, что приводит к дегрануляции тучных клеток и развитию воспалительной реакции. При традиционной АСИТ используют подкожное введение подпороговых доз экстрактов целевых аллергенов с целью вызвать формирования протективного ответа, но предупредить значительную дегрануляцию тучных клеток. Балансирование между терапевтическим эффектом и побочными эффектами приводит к необходимости медленного увеличения дозы вводимого аллергена, что может длиться курсами до 3-5 лет. В данной работе предлагается решение по предупреждению дегрануляции тучных клеток при проведении АСИТ за счет покрытия аллергена полимерной оболочкой, что предупреждает взаимодействие аллергена с IgE антителами. Данный подход позволит сократить количество введений аллергенов при АСИТ, увеличить разовую дозу вводимого аллергена, предупредить развитие побочных реакций, и, в идеале, быстро достичь терапевтического эффекта.

В данной работе рекомбинантные белки аллергенов клещей домашней пыли *D. farinae* и гриба *A. fumigatus* были капсулированы в полимерную оболочку из биосовместимых полимеров хитозана и альгината. Автором получены и охарактеризованы микрочастицы с включенными аллергенами, проведен анализ связывания аллергенов с IgE *in vitro* и *in vivo*, показана индукция высоких титров IgG антител.



В целом, рассматриваемая диссертационная работа построена традиционно, изложена на 149 страницах и содержит следующие разделы: «Введение», «Обзор литературы», «Материалы и методы исследования», «Результаты и их обсуждение», «Выводы», «Список цитируемой литературы», включающий 245 ссылок на источники. Работа содержит 41 рисунок и 7 таблиц.

В обзоре литературы кратко описаны механизмы аллергической реакции I типа, методы лечения аллергии и разновидности АСИТ. Значительная часть обзора посвящена собственно биотехнологической части, а именно описанию полимеров, их свойств, методам получения нано- и микрочастиц, в том числе композитных, полученных из двух полимеров. Автор также описывает адъювантные свойства хитозана и наночастиц на его основе, что может быть использовано для разработки вакцин.

В целом, литературный обзор написан хорошим научным языком и дает полное представление о теме исследования.

В разделе «Материалы и методы» детально описан широкий спектр методов исследования, включающий химическую модификацию хитозана, получение и очистку рекомбинантных белков, биохимические методы анализа белков, два метода получения микрочастиц капсулированных белков, анализ размера и заряда микрочастиц. Иммунологические методы включили иммуно-ферментный анализ с использованием сывороток больных с аллергией и сывороток иммунизированных мышей; анализ взаимодействия *in vitro* микрочастиц с эпителиальными и макрофагальными клетками, а также большой раздел посвящен анализу *in vivo* гуморального ответа мышей на введение капсулированных белков. Подтверждением эффективности и безопасности терапии являлось появление высоких титров IgG антител и отсутствие побочных эффектов при интраназальной провокации, что подтверждено гистологическими исследованиями.

Автор использовал для капсулирования аллергены из клещей домашней пыли (Der f 1 и Der f 2) или гриба *A. fumigatus* (Asp f 2 и Asp f 3) показал, что эффект АСИТ капсулированными аллергенами не зависит от



типа аллергена, что позволяет использовать данный подход для разработки препаратов для терапии разных форм аллергии. Автором изучены возможные пути введения капсулированных аллергенов и показана возможность транэпидермальной доставки.

Следует отметить, что использованные физико-химические, биохимические и иммунологические методы анализа говорят о высоком уровне методической подготовки диссертанта.

Раздел «Результаты и их обсуждение» состоит из трех глав.

Первая глава посвящена получению и характеристике производных хитозана с заданными свойствами, методам получения на их основе нано- и микрочастиц, капсулированию модельных белков в микрочастицы. В результате проведенной работы были получены производные хитозана, на основе которых формировались стабильные частицы методом самосборки, что позволяет исключить использование агрессивных компонентов реакции. Как альтернатива и способ промышленного получения микрочастиц автором был оптимизирован метод электроспрея, что было сделано впервые с использованием производных хитозана. Данные методы позволили получить ряд частиц, обладающих различными характеристиками, что достигалось использованием полимеров с разными функциональными группами. В данном разделе рассмотрены также факторы, влияющие на процесс формирования частиц, содержащих белки, что может быть использовано в дальнейшем при разработке прототипов вакцин на основе полисахаридов. В работе диссертанта особое внимание уделено характеристике полученных микрочастиц, для этой цели был использован ряд различных физико-химических методов. Отобранные производные были использованы для формирования частиц, содержащих аллергены. В результате проведенной работы автор получила двойные микрочастицы типа ядро-оболочка, внутри которых были включены белки Der f 1/Der f 2 или Asp f 2/Asp f 3 в хитозановый матрикс, сверху покрытый оболочкой альгината.

Во второй главе диссертантом проведены исследования *in vitro*. Для анализа связывания капсулированных аллергенов с IgE использовали



сыворотки крови, полученные от больных с установленной аллергией на клещей домашней пыли. Показано, что включение аллергенов в хитозановый матрикс не полностью закрывает IgE эпитопы. Дополнительная оболочка из альгината полностью перекрывает связывание аллергенов с IgE, что показывает безопасность полученных вакцин при лечении аллергии. Проведено исследование взаимодействия капсулированных аллергенов с макрофагами и показан эффективный фагоцитоз микрочастиц, что необходимо для индукции протективного IgG опосредованного гуморального ответа.

Последняя глава раздела «Результаты и их обсуждение» посвящена изучению иммунного ответа на разработанные антигенсодержащие частицы. Выявлено достоверное повышение титров антител классов IgG1 и IgG2a уже после одной иммунизации и значительное повышение после 3-х иммунизаций.

Следует отметить общий высокий уровень диссертационной работы Кашириной Е.И. и хорошее представление полученных результатов в диссертации и автореферате. Работа отличается четкостью постановки задачи и оптимальными методами ее решения.

### **Степень обоснованности и достоверность научных положений, выводов и рекомендаций, сформулированных в диссертации**

Работа проведена с использованием методов статистической обработки результатов. Выводы, полученные при анализе результатов исследований, логичны и обоснованы и соответствуют содержанию диссертации. Работа выполнена с использованием ряда современных методов исследований, достоверность полученных результатов не вызывает сомнений. Автореферат полностью отражает содержание диссертации.

### **Научная новизна исследований и значимость полученных результатов**

В работе впервые получены капсулированные аллергены и доказано, что такая форма предотвращает связывание IgE с аллергенами, что имеет большую практическую значимость для здравоохранения. На примере аллергенов из двух источников впервые показано, что капсулированную



форму можно разработать для любых аллергенов. На примере двух белков из каждого источника впервые показано, что при иммунизации распознается каждый из капсулированных белков, что позволяет создать мультивалентные вакцины, что позволяет проводить АСИТ против нескольких аллергенов одновременно. Впервые показано, что капсулированные аллергены вызывают после 1-3-х иммунизаций значительный IgG опосредованный гуморальный ответ без введения дополнительных адъювантов, что имеет значение для разработки вакцин, в которые не требуется дополнительно включать адъюванты. Впервые получены капсулированные в хитозан аллергены методом электроспрея.

#### **Полнота изложения основных результатов диссертации в рецензируемых научных изданиях и их апробация**

Основные результаты работы опубликованы в 7 статьях в научных журналах, входящих в перечень научных изданий, рекомендованных Минобрнауки России для опубликования результатов диссертаций. Кроме того, результаты проведенных диссертационных исследований доложены на 12 международных и российских симпозиумах и научно-практических конференциях. Опубликованные работы полностью отражают содержание диссертации.

#### **Рекомендации по использованию результатов и выводов диссертации**

Разработанный методический подход рекомендован для получения препаратов для АСИТ и создания вакцин, направленных на индукцию гуморального ответа.

#### **Недостатки диссертации**

Оценивая работу в целом, следует подчеркнуть, что диссертантом выполнена большая аналитическая и экспериментальная работа на хорошем методическом уровне. Широкое и рациональное использование современных инструментальных методов и методических подходов в исследовании обеспечивают достоверность результатов исследования и придают данной работе высокую научную и прикладную значимость.



Наряду с общей высокой положительной оценкой работы, к ней имеется несколько замечаний, пожеланий и вопрос:

1. В первой главе раздела «Результаты и их обсуждение» следовало бы сначала изложить данные по получению микрочастиц двумя методами (самосборкой и электроспреем), а затем поместить данные по включению модельных белков, что облегчило бы восприятие работы;
2. В подписях к рисункам встречаются сокращения, что затрудняет восприятие материала.
3. В списке литературы встречается мало отечественных литературных источников, хотелось бы, чтобы отечественные работы были лучше освещены.
4. Не хватает обоснования факта проникновения отрицательно заряженных нано- или микрочастиц производных хитозана в клетку. Традиционно считается, что положительно заряженные молекулы легко взаимодействуют с отрицательно заряженной мембраной клеток и легче проникают в клетку.

Отмеченные недостатки не снижают достоинств выполненной Кашириной Е.И. диссертационной работы и не носят принципиального характера. В целом считаю, что рецензируемая диссертация представляет собой актуальное, законченное исследование, выполненное на высоком научном уровне и имеющее практическое значение.

### **Заключение**

Диссертационная работа Е.И. Кашириной, представленная на соискание ученой степени кандидата химических наук является законченной квалификационной научно-исследовательской работой, в которой решена актуальная научная задача создания новых биополимерных конструкций, безопасных и эффективных для аллергенспецифической терапии, имеющая значение для биотехнологии и медицины.

Диссертационная работа Е.И. Кашириной соответствует паспорту специальности 03.01.06 - Биотехнология (в том числе бионанотехнологии) в части формулы специальности и области исследований.



Диссертационная работа Кашириной Елены Игоревны **соответствует** требованиям п.9 Положения о присуждении ученых степеней, утвержденного Постановлением Правительства РФ от 24.09.2013 г. № 842 (в редакции Постановления Правительства РФ от 21.04.2016 г. № 335, от 02.08.2016г. № 748), в диссертации отсутствуют недостоверные сведения об опубликованных соискателем ученой степени работах, в которых изложены основные научные результаты диссертации. Автор диссертации заслуживает присуждения учёной степени кандидата химических наук по специальности 03.01.06 - Биотехнология (в том числе бионанотехнологии)

Отзыв на диссертацию обсуждён и одобрен на заседании кафедры иммунологии медико-биологического факультета ФГБОУ ВО РНИМУ Н.И. Пирогова Минздрава России (протокол № 137 от «18» января 2018г.).

Профессор кафедры иммунологии медико-биологического факультета  
ФГБОУ ВО РНИМУ Н.И. Пирогова  
Минздрава России  
доктор медицинских наук

**М.А. Стенина**

Подпись профессора Стениной М.А. «удостоверяю»

Ученый секретарь  
ФГБОУ ВО РНИМУ им Н.И. Пирогова  
Минздрава России, д.м.н., доцент



Ольга Юрьевна Милушкина

Федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение высшего образования «Российский национальный исследовательский медицинский университет имени Н.И. Пирогова» Министерства здравоохранения Российской Федерации  
117997, г. Москва, ул. Островитянова, д. 1  
Тел.: (495) 434-14-22

e-mail: [rsmu@rsmu.ru](mailto:rsmu@rsmu.ru)