

ОТЗЫВ

официального оппонента на диссертацию Киселевой Ирины Анатольевны
«Специализированный продукт диетического профилактического питания на основе коктейля
бактериофагов: конструирование, технология производства, оценка безопасности и
эффективности применения»,
представленную на соискание ученой степени кандидата биологических наук
по специальностям: 03.01.06 – биотехнология (в том числе бионанотехнологии),
03.02.03 - микробиология

Актуальность проблемы

Объект рассматриваемой диссертации – профилактический продукт на основе бактериофагов – можно отнести не только к разряду альтернативных антибиотикам или дополнения к ним. Опираясь на практический опыт по получению и применению бактериофагов, прежде всего, в нашей стране и в Восточной Европе, Киселева И.А. и коллеги создали продукт «Фудфаг», предохраняющий от пищевых инфекций и принадлежащий к новому классу препаратов – фагобиотиков, которые уже зарегистрированы в США и Европе. Актуальность изучения фагов сохраняется с момента их открытия в начале XX века, т.е. почти сто лет. Для подтверждения сказанного приведем некоторые литературные сведения, указывающие на правомерность поставленных автором ключевых задач с последующим доказательством безопасности применения выделенных диссертантом фагов, их специфичности, точном мишень-направленном эффективном действии в отношении многих, в т.ч. антибиотикорезистентных возбудителей инфекций.

Среди ученых периодически возникали научные споры и недоверие к результатам применения фагов без контролируемых испытаний. Наиболее убедительными, хотя и требующими продолжения, за рубежом посчитали испытания, проведенные польскими исследователями в 1981-1986 гг на 550 пациентах (Steven Slopek и др.). Испытания проводили в госпиталях и клиниках с инфекциями, обусловленными *Staphylococcus*, *Klebsiella*, *Proteus*, *Escherichia*, *Shigella*, *Salmonella*, *Pseudomonas*. Заметим, что фаги к этим возбудителям (кроме *Pseudomonas*) включены в препарат, созданный Киселевой И.А. с соавторами. Фагами поляки лечили: отиты, менингиты, заболевания респираторного тракта, стоматит, перитонит, абсцесс внутренних органов, инфекции уринарного тракта и вагины, фурункулез, пиогенные инфекции, артриты, ожоговые и постоперационные раны и др. Фаги не выделяли, а брали из коллекции Института Иммунологии и Экспериментальной Терапии, г. Вроцлав. Эффект составлял от 75 до 100% и зависел от возраста пациента, тяжести заболевания. Слабой стороной испытаний

являлось отсутствие количественного контроля бактерий и фагов в организме. Однако удивляет, что за рубежом часто не учитывают многие данные наших исследователей. Так, в строго контролируемом применении *Shigella*-фага у 3310 детей в детском саду г. Ярославля по сравнению с контрольной группой, 3310 ребенка, случаи дизентерии встречались в 2,5 раза меньше (Солодовников И.П. и др. 1970).

Кроме того, при фаготерапии 500 новорожденных с низким весом (Литвинова А.М. и др. 1978 г) фаги *E. coli* и *Proteus*, смешанные с бифидобактериями, дали положительный результат во всех случаях.

В 1989 г. Кочетковой В.А. и др. сообщалось о 82% успеха при лечении 131 пациента с постоперационными, стафилококковыми и другими инфекциями.

Саканделидзе В.В., Майпариани А.Н. (1974 г.) доложили о 92% положительных результатах у 236 пациентов с антибиотикорезистентными возбудителями.

По поводу действия фагов на антибиотикорезистентных микробов между исследователями возникали разногласия. В 1989 г. тбилисские ученые, в отличие от ранее полученных поляками данных, сообщили, что применение фагов совместно с антибактериальными препаратами более эффективно.

Проблему преодоления возможной фаговой резистентности возбудителей грузинские ученые решили путем создания фаговых коктейлей с различной специфичностью рецепторов и для лизиса разных бактерий. Например, «Интести» - фаговые препараты содержат до 23 фагов, лизирующих энтеробактерии.

Эта выборка из литературных сведений, не использованных в диссертации, подтверждает целесообразность выбранного авторского состава фагового коктейля для нового препарата.

Литературный обзор

В литературном обзоре диссертант очень продуманно соединила информацию о глобализации ОКИ и пищевых токсикоинфекциях с сообщениями о мишень-направленном эффективном действии бактериальных вирусов, их безопасности и необходимости разработки диетического профилактического продукта питания на основе смеси фагов, активных в отношении наиболее актуальных «пищевых» патогенов. Следует отметить, что количество цитированных отечественных публикаций по фаготерапии, с учетом существующего в мире массива публикаций, доминировало над зарубежными.

Методы

Успех работы во многом связан с высокой профессиональной подготовкой диссертанта Киселевой И.А. Об этом свидетельствуют многочисленные современные высокотехнологичные методы исследований (молекулярно-генетический и иммуноферментный анализы, аффинная хроматография, масс-спектрометрия, электронная микроскопия и т.д.).

Новизна исследования

Задачи, поставленные по конструированию диетического профилактического фагобиотика были решены с использованием оригинального коктейля бактериофагов. Новизна подтверждена в виде патента. Киселевой И.А. с соавторами разработан комплекс методов по оценке безопасности применения выделенных фагов. Например, с помощью полногеномного секвенирования, молекулярно-генетических методов были показаны оригинальность и отсутствие генов вирулентности у фагов.

Безвредность «Фудфага» тщательно проверялась на животных в опытах острой и хронической токсичности. Изучена также фармакокинетика, специфическая активность и стабильность активности в готовой форме.

Новый способ культивирования, разработанный автором, позволяет увеличить титр бактериофага (до $10^{10} - 10^{12}$ БОЕ/мл), а также снизить количество эндотоксина (по LAL-тесту) и исключить образование экзотоксина (по результатам ИФА).

Практическая и теоретическая значимость

Главное достижение работы – создание продукта «Фудфаг», содержащего 7 очищенных оригинальных литических штаммов бактериофагов: 2-х эшерихиозных, 3-х сальмонеллёзных, 1-го стафилококкового и 1-го листериозного. Продукт диетического питания в установленной для применения форме позволяет снизить риск развития пищевых инфекций благодаря включению указанного состава литических фагов.

Продукт защищен не только патентом, но также имеет нормативно-техническую документацию и прошел регистрацию. Этот препарат открыл в РФ путь для получения новых фагобиотиков.

Важнейшими первоначальными этапами конструирования препарата являлись подбор нетоксичных индикаторных штаммов, а также литических бактериофагов с широким спектром действия внутри вида, устойчивых к физико-химическим факторам, которые в комплексе

обеспечивали высокий выход бактериального вируса. Особое требование к потенциально значимым для производства штаммам бактериофагов было молекулярно-генетическое доказательство отсутствия генов, характерных для умеренных лизогенизирующих фагов (гены репрессоров транскрипции, интеграз и т.д.), а также генов, которые контролируют бактериальные токсины, антибиотикорезистентность и др. По данным биоинформационного анализа через Genbank идентичность ДНК выбранных для препарата фагов по сравнению с эталонами составляла 62 – 93%, т.е. объект оригинален.

Посредством использования оптимальной питательной среды и рациональных условий культивирования с последующей стерилизующей фильтрацией через мембранный фильтр авторы стремились получить препарат, лишенный экзо- и эндотоксинов. После проведения всех контролей составляется рецептура продукта. В него кроме коктейля бактериофагов включены сироп корня солодки, пектин яблочный, глицин – вещества с антибактериальными, пребиотическими и антиоксидантными свойствами. Физико-химические свойства, специфическую активность (БОЕ/мл), пищевую и энергетическую ценность определяли перед фасовкой и упаковкой продукта. Такая классическая технологическая схема потребовала многократной воспроизводимости.

Центральными вопросами практической пригодности «Фудфага» являлись оценка его безопасности на мышах и морских свинках при длительном пероральном приеме фагобиотика с определением микробиоты кишечника, а также оценка уровня специфической активности. Фармакокинетику на животных изучали по количеству частиц фага в фекалиях через определенные промежутки времени. Специфическое антибактериальное действие Киселева И.А. успешно показала на контролируемой модели экспериментальной сальмонеллёзной инфекции у беспородных мышей (при профилактическом введении «Фудфага» выжило 70%, средняя продолжительность жизни была больше, чем в контроле). Но наиболее ценный материал по профилактической специфичности «Фудфага» получен при контролируемом испытании на 45 добровольцах по авторской схеме приема, а также в рамках программы медицинской реабилитации лиц с хроническими заболеваниями органов пищеварения. Контроль – группа пациентов без применения препарата. Так, использование «Фудфага» на 33,3% снизило число пациентов с дисбактериозом кишечника I и III степени, а у 36,7% пациентов наступила полная нормализация микробиоты за счет элиминации патогенных *S. aureus* и *E. coli*. В испытаниях была показана высокая терапевтическая эффективность «Фудфага» в отношении этих возбудителей пищевой токсикоинфекции.

Киселева И.А. представила в своей работе перспективы использования бактериофагов на Международной космической станции (МКС) для нормализации возможного дисбиоза у

космонавтов. Получены первые данные об отсутствии изменения генотипа фагов до и после 1,5- и 3-месячного хранения «Фудфага» на МКС и на Земле.

Степень достоверности и апробация данных

Результаты диссертации, достоверность которых подтверждена статистической обработкой, адекватно отражены в разделе «Выводы», а также достаточно полно представлены в Автореферате. По диссертационным материалам опубликовано 22 работы, 3 из них в журналах, рекомендованных ВАК, а также имеется 2 патента. Обсуждение результатов прошло на многих отечественных и зарубежных конференциях. Целесообразно отметить, что Киселева И.А. представила в своей работе перспективы дальнейшего продолжения тематики, которая предполагает последующий мониторинг новых штаммов бактериофагов с широкой лизирующей активностью и скрининг персистирующих фагочувствительных бактериальных хозяев.

Что касается личного участия, то все основные этапы диссертации выполнены непосредственно Киселевой И.А. Коллеги, оказавшие помощь в работе, названы с указанием Ф.И.О, их статуса и экспериментов.

Существенных замечаний по диссертации не имеется. Отмечены только некоторые технические погрешности, на которые автору указано лично.

Заключение

Диссертация Киселевой Ирины Анатольевны **«Специализированный продукт диетического профилактического питания на основе коктейля бактериофагов: конструирование, технология производства, оценка безопасности и эффективности применения»** является научно-квалификационной работой, выполненной под руководством доктора биологических наук Алешкина Андрея Владимировича и кандидата биологических наук Воложанцева Николая Валентиновича и представленной на соискание степени биологических наук по специальностям 03.01.06 – биотехнология (в т.ч. бионанотехнологии); 03.02.03 – микробиология. По актуальности темы, современному методическому уровню и объему выполненных экспериментов, научной новизне и практической ценности исследований, в которых получены научно обоснованные и статистически достоверные данные по созданию и испытанию первого отечественного фагобиотика «Фудфага», являющегося специализированным диетическим профилактическим продуктом, работа имеет существенное значение для биотехнологии, микробиологии, соответствует п. 9 и другим критериям

«Положения о присуждении ученых степеней», утвержденного Постановлением Правительства РФ от 24 сентября 2013 г. №842, предъявляемым к диссертациям на соискание ученой степени кандидата наук, а ее автор Киселева И.А. заслуживает присуждения ей ученой степени кандидата биологических наук по специальностям 03.01.06 – биотехнология (в т.ч. бионанотехнологии) и специальности 03.02.03 – микробиология.

Официальный оппонент,
 Заведующий лабораторией
 микробиологических питательных сред
 Федерального государственного бюджетного научного
 учреждения «Научно-исследовательский институт
 вакцин и сывороток им. И.И. Мечникова»
 (105064, Москва, Малый Казенный переулок, д.5а,
 тел. +7 (495) 916-11-52, b.larus@mail.ru),
 доктор биологических наук, профессор

Л.П. Блинкова

Подпись д.б.н., проф. Блинковой Л.П. заверяю.

Ученый секретарь
 Федерального государственного бюджетного научного
 учреждения «Научно-исследовательский институт
 вакцин и сывороток им. И.И. Мечникова»
 кандидат биологических наук

19.05.2015г



Н.И. Андропова