

ОТЗЫВ

официального оппонента, доктора биологических наук, ведущего научного сотрудника научно-производственной лаборатории препаратов для диагностики особо опасных и других инфекций Федерального казенного учреждения здравоохранения «Ставропольский научно-исследовательский противочумный институт» Федеральной службы по надзору в сфере защиты прав потребителей и благополучия человека Жарниковой Ирины Викторовны на диссертационную работу Тюриной Анны Владимировны на тему: «Основные аспекты разработки экспериментального профилактического препарата на основе холерных бактериофагов», представленной на соискание ученой степени кандидата биологических наук по специальности 1.5.6. – Биотехнология (биологические науки)

Актуальность темы исследования

Несмотря на успешное применение бактериофагов для терапии и профилактики различных кишечных инфекций, наблюдается отсутствие коммерчески доступных фаговых препаратов против холеры. В связи с этим разработка специализированных фаговых препаратов и создание инновационных методических подходов к их производству является актуальным направлением.

Разработка эффективных бактериофаговых препаратов против холеры представляет собой сложную биотехнологическую задачу, обусловленную особой патогенностью *V. cholerae*. Ключевыми производственными требованиями являются: соблюдение строгих норм биобезопасности; определение биологических и генетических характеристик маточных бактериофагов; достижение высоких титров фаговых частиц за счет тщательного подбора штаммов-продуцентов и оптимизации условий культивирования; обеспечение максимальной степени очистки от бактериальных токсинов и компонентов питательной среды; многоступенчатый контроль качества и стерильности. Производственный цикл требует одновременного обеспечения: максимального накопления биомассы бактерий-хозяев на этапе предкультивирования, высокой продуктивности фагового лизиса и максимального удаления токсичных

метаболитов. Каждый этап, начиная от подбора штаммов и заканчивая финальной очисткой, требует тщательной оптимизации. Только комплексный подход позволяет создавать эффективные и безопасные препараты, соответствующие фармакопейным требованиям.

Представленные в диссертационной работе Тюриной А.В. исследования направлены на экспериментальное обоснование возможности создания препарата на основе холерных бактериофагов, его характеристику, оценку безопасности и профилактической активности в отношении холерных вибрионов O1 серогруппы.

Новизна исследования, полученных результатов, выводов и рекомендаций, сформулированных в диссертации

Тюриной А.В. впервые проведена биологическая и генетическая характеристика холерных бактериофагов из коллекции-депозитария. Отобраны вирулентные фаги с высокой литической активностью, полученные из объектов окружающей среды и лизогенных штаммов микроорганизмов.

Разработан метод получения очищенной биомассы холерных бактериофагов Rostov-M3 и Rostov-13, обеспечивающий наибольший выход вирусных частиц. Доказано, что профилактический препарат на основе холерных бактериофагов Rostov-M3 и Rostov-13 обладает способностью к длительной персистенции в организме.

Научные данные свидетельствуют, что после курсового введения (5 и 7 дней) фаговая композиция продолжает выделяться с фекалиями лабораторных мышей на протяжении 21 суток после последнего введения, даже при отсутствии гомологичных штаммов *V. cholerae*, данный срок может быть достаточным для реализации ее профилактического потенциала.

Впервые результаты экспериментальных исследований продемонстрировали, что бактериофаги Rostov-M3 и Rostov-13 – как при индивидуальном применении, так и в составе комбинированного препарата –

не оказывают токсического воздействия на ключевые физиологические параметры лабораторных животных, гистологическую структуру тканей, функциональную активность иммунокомпетентных клеток.

Получены данные в отношении системного и местного гуморального иммунного ответа на введение как отдельных холерных бактериофагов, так и их смеси.

Впервые показано, что после первичного курсового приема смеси Rostov-M3 и Rostov-13 в сыворотке крови и кишечнике экспериментальных животных регистрируется наличие специфических антител в невысоких титрах, не влияющих на ее эффективность, при повторном введении коктейля бактериофагов количество антифаговых антител увеличивается, но не препятствует реализации профилактической способности экспериментального препарата. Впервые экспериментально доказано, что пятидневный профилактический курс бактериофагов Rostov-M3 и Rostov-13 обеспечивает высокоэффективную защиту взрослых кроликов от заражения холерным вибрионом.

Впервые разработан экспериментальный профилактический препарат на основе холерных бактериофагов Rostov-M3 и Rostov-13 с учетом его эффективности и безопасного действия в соответствии с требованиями, предъявляемыми к лечебно-профилактическим препаратам.

Приоритетность выполненных исследований подтверждена патентом на изобретение РФ № RU2783000C1. Разработана нормативная документация на препарат.

Степень достоверности и обоснованности научных положений, выводов и рекомендаций, сформулированных в диссертации

Высокая степень достоверности и обоснованности полученных результатов, выводов и рекомендаций диссертации не вызывает сомнений и показывает правильный выбор методических подходов. Степень достоверности полученных результатов основана на использовании

большого фактического материала, полученного на зарегистрированном, прошедшем метрологическую поверку оборудовании с использованием широкого спектра современных научных методов: бактериологического, иммунохимического и молекулярно-генетического анализа, обладающих высокой специфичностью и чувствительностью.

Результаты диссертационной работы получены при выполнении двух государственных научно-исследовательских тем, в которых автор являлся исполнителем и ответственным исполнителем.

Статистическая обработка результатов исследования проводилась в соответствии с общепринятыми методами биостатистики. Для анализа использованы специализированные программные пакеты: Statistica 8.0 (StatSoft Inc., 2007), Microsoft Excel 2010 и StatSoft Statistica Windows 10.01. Доверительные интервалы для среднеарифметических значений (M) рассчитаны с уровнем достоверности 95% ($P = 0,05$).

Для оценки достоверности различий между независимыми выборками применён непараметрический критерий Манна-Уитни, что обусловлено его устойчивостью к отклонениям от нормального распределения данных. Сравнение групп по качественным признакам выполнено с использованием точного критерия Фишера. Статистически значимыми считали различия при уровне $p < 0,05$.

Теоретическая и практическая значимость диссертационной работы

Теоретическая значимость работы заключается в расширении фундаментальных представлений о взаимодействии бактериофагов с макроорганизмом. Установлены закономерности персистенции холерных фагов Rostov-13 и Rostov-M3, включая особенности распределения в организме, устойчивость к факторам иммунной защиты. Полученные данные вносят вклад в развитие фаговой экологии, раскрывая новые аспекты фаговых взаимодействий, и формируют базу для разработки новых подходов к созданию биопрепаратов на основе бактериофагов.

Научные данные включены в монографию по холере, в методические рекомендации федерального уровня. На предложенный способ профилактики холеры имеются акты внедрения. Научные результаты диссертационного исследования включены в программы повышения квалификации ФКУЗ «Ростовский-на-Дону противочумный институт» Роспотребнадзора (акт внедрения от 10.02.2025 г.)

Личный вклад соискателя в разработку научной проблемы

Основные результаты диссертационной работы получены при личном участии диссертанта, что подтверждено научными публикациями. Автор осуществил комплексный вклад в исследование, включающий системный анализ научной литературы и разработку концепции исследования, планирование и проведение экспериментов (отбор фаговых штаммов, оценка их свойств *in vitro* и *in vivo*), статистическую обработку данных современными методами, подготовку публикаций и презентацию результатов. Личное участие автора составило 92% работы, включая наиболее ответственные этапы: разработку экспериментальных протоколов, проведение ключевых опытов, интерпретацию данных и формулирование выводов.

Апробация результатов исследования

Диссертация апробирована на заседании Ученого совета ФКУЗ Ростовский-на-Дону противочумный институт Роспотребнадзора (протокол № 16 от 27.11.2024г.)

Материалы диссертационной работы были представлены и обсуждены на конференциях различного уровня, включая конференции молодых ученых: IX Всероссийская научно-практическая конференция молодых ученых и специалистов Роспотребнадзора «Современные проблемы эпидемиологии, микробиологии и гигиены» (Иркутск, 2017); XIV Всероссийская научно-практическая конференция молодых ученых и специалистов Роспотребнадзора «Современные проблемы эпидемиологии, микробиологии и гигиены»

(Московская обл., ОК «Лужки», 2022); Международный молодежный форум «Неделя науки-2022» (Ставрополь, 2022); Международная конференция «Бактериофаги: от фундаментальных исследований к применению» (Новосибирск, 2024).

По результатам диссертационных исследований опубликовано 20 научных работ, в которых достаточно полно отражено содержание диссертации, из них 10 статей в рецензируемых изданиях, 1 – в другом издании и 7 в материалах конференций (тезисы), 1 патент на изобретение РФ, 1 база данных.

Оценка содержания, завершенности и оформления диссертации

Диссертация написана в традиционной форме, является завершенной работой и состоит из введения, обзора литературы, 6 глав собственных исследований, заключения, выводов, практических рекомендаций, перспектив дальнейшей разработки темы, списка использованной литературы, состоящего из 124 зарубежных источников и 113 отечественных. Диссертация изложена на 150 страницах машинописного текста и иллюстрирована 23 таблицами и 11 рисунками.

В главе 1 (обзор литературы) дана характеристика возбудителя *V. cholerae* на современном этапе развития VII пандемии, рассмотрена проблема антибиотикорезистентности холерных вибрионов, описаны бактериофаги холерных вибрионов и основные направления их использования, а так же принципы конструирования препаратов на основе холерных бактериофагов. Отмечено, что перспективность применения бактериофагов обусловлена их уникальной способностью инфицировать как антибиотикочувствительные, так и полирезистентные штаммы холерного вибриона. Особое значение имеет использование поливалентных "фаговых коктейлей" из штаммов с различными механизмами действия, что снижает риск развития резистентности. Однако разработка таких препаратов сталкивается с технологическими сложностями, включая необходимость

получения высокоочищенных фаговых препаратов, их тщательной оценки на безопасность и эффективность в соответствии с нормативными требованиями, а также преодоления потенциальной иммуногенности фагов. Комплексное решение этих задач позволит реализовать потенциал бактериофагов как эффективного средства профилактики холеры.

В главе 2 представлена характеристика генетических и биологических свойств холерных бактериофагов и отбор наиболее перспективных из них.

Тюриной А.В. исследована литическая активность холерных бактериофагов, проведён анализ их морфологических характеристик, прозрачности формируемых негативных колоний и продуктивности на штаммах-хозяевах *V. cholerae* серогрупп О1 и О139 и доказано, что все изученные фаги (Rostov-1, Rostov-6, Rostov-7, Rostov-M3, Rostov-13 и ФБ1) были признаны перспективными кандидатами для разработки профилактического препарата. Отмечено, что для эффективного использования бактериофагов в терапии или профилактике необходимо получать высокоочищенные фаголизаты с высоким титром вирусных частиц.

В главе 3 представлена разработка метода получения экспериментального профилактического препарата на основе холерных бактериофагов

Тюриной А.В. разработан метод получения биомассы холерных вибрионов с наибольшим выходом вирусных частиц, состоявший из 8 пунктов, который позволил увеличить количество фаговых частиц в очищенных фаголизатах бактериофагов Rostov-M3, Rostov-13 и ФБ1, являющиеся перспективными кандидатами для создания профилактического препарата. Тюриной А.В. использован ИФА-метод с прямым пероксидазным конъюгатом для контроля ЛПС в очищенных формах, полученных фаголизатов. Проведенные исследования показали, что очищенные

фаголизаты Rostov-M3, Rostov-13 и ФБ1 обладают комплексом ценных свойств для профилактического применения.

На следующей стадии исследования проведена комплексная оценка безопасности и профилактической активности разработанного фагового коктейля (Rostov-13, Rostov M3 и ФБ1 в равных пропорциях 1:1:1) на экспериментальных моделях *in vivo*. Данный этап, **представленный в главе 4**, имеет принципиальное значение, так как только доказанная безопасность и высокая профилактическая эффективность могут служить основанием для создания практического средства профилактики холеры. Оценку безопасности разработанного экспериментального профилактического коктейля проводили с использованием лабораторных животных (кролики и белые мыши) в опытах изучения острой и подострой (хронической) токсичности в соответствии с нормативными документами и применением стандартных методов. Результаты комплексного морфологического исследования (макро- и микроскопического) внутренних органов мышей после 20-дневного курса внутрижелудочного введения комбинации холерных бактериофагов (Rostov-M3, Rostov-13 и ФБ1) показали отсутствие патологических изменений в тканях головного мозга, дыхательной, пищеварительной, выделительной и лимфоидной систем. Полученные данные подтверждают, что компоненты, входящие в состав экспериментального профилактического коктейля, являются безопасными и не оказывают негативного влияния на организм животных. Это открывает перспективы для дальнейшего изучения их применения.

Тюриной А.В. исследовано апоптогенное и цитотоксическое влияние холерных бактериофагов на иммунокомпетентные клетки крови взрослых кроликов. Результаты продемонстрировали отсутствие негативного влияния на форменные элементы при семидневном применении. Эти данные свидетельствуют о том, что длительное применение фагового коктейля не

вызывает повреждения клеток крови и не нарушает их функциональную активность.

В главе 5 дана оценка формирования гуморального иммунного ответа к холерным фагам и их смеси на модели экспериментальных животных.

Тюриной А.В. определены специфические иммуноглобулины в сыворотке крови экспериментальных животных, которые оценивали по истечении месяца после проведения курса фагопрофилактики. Исследования выявили, что повторное применение холерных бактериофагов стимулирует гуморальный иммунный ответ у лабораторных животных. Однако важно отметить, что при использовании поливалентной фаговой смеси наблюдались существенно более низкие титры специфических антител по сравнению с контрольными иммунными сыворотками. Это указывает на умеренную иммуногенность фагового коктейля, что может способствовать его успешному применению для профилактики холеры.

Тюриной А.В. установлено, что повторные курсы применения противохолерных бактериофагов, в частности ФБ1 и их смесей, стимулируют повышенную выработку секреторного иммуноглобулина А (sIgA) в тонком кишечнике у экспериментальных животных. Это явление может снижать эффективность профилактического действия фаговых препаратов, поскольку sIgA способен нейтрализовать фаговые частицы, препятствуя их взаимодействию с патогенными бактериями.

Глава 6 посвящена профилактической эффективности холерных бактериофагов Rostov-M3, Rostov-13, ФБ1 и их смеси.

Тюриной А.В. исследована профилактическая эффективность смеси холерных бактериофагов (Rostov M3+Rostov-13+ФБ1) в отношении вирулентных холерных вибрионов O1 и O139 серогрупп на модели генерализованной инфекции у белых мышей. В результате установлено, что профилактическая эффективность экспериментального коктейля

бактериофагов на модели генерализованной инфекции у белых мышей была наивысшая в отношении вибрионов O1, но недостаточная активность против вибрионов O139. В связи с этим Тюрина А.В. продолжила исследования и поиск новых литических бактериофагов, способных эффективно уничтожать вибрионы O139 серогруппы на модели изолированной петли тонкого кишечника взрослого кролика. В результате был разработан профилактический фаговый препарат, содержащий бактериофаги Rostov M3 и Rostov-13 в равном соотношении (1:1) с титром $n \times 10^8 - n \times 10^9$ БОЕ/мл. Препарат продемонстрировал высокую эффективность в предотвращении холерной инфекции, вызванной штаммами O1 серогруппы, что подтверждено в серии контролируемых экспериментов. Следующей 7 главой исследования стало изучение фармакокинетики данного препарата, включая его распределение и выведение из организма, а также оценка его способности оказывать профилактический эффект. Эти данные необходимы для оптимизации дозировок и режимов применения, а также для подтверждения безопасности и эффективности препарата в условиях, приближенных к реальным. Тюриной А.В. дана оценка фармакокинетики смеси холерных бактериофагов Rostov-M3 и Rostov-13 на модели белых мышей. В результате установлено, что при трехдневном курсе фаги полностью выводились из кишечника в течение определенного времени, которое варьировалось в зависимости от индивидуальных особенностей животных. При пяти- и семидневном курсе наблюдалось увеличение времени персистенции фагов, что свидетельствует об их способности накапливаться в кишечнике при длительном применении.

Исследования экспериментального препарата в отношении вирулентных штаммов *V. cholerae* O1 серогруппы при первичных и повторных курсах введения доказали эффективность разработанного фагового препарата (Rostov-13+Rostov-M3) для профилактики холеры, вызываемой *V. cholerae* серогруппы O1. Препарат демонстрирует стабильные

результаты, как при первичном, так и при повторном применении, а также хорошие показатели безопасности.

В заключение представлена актуальность темы исследования, отмечены основные моменты исследований и сделано обобщение полученных результатов.

Выводы научно обоснованы, в достаточной мере аргументированы, отражают содержание диссертации и отвечают цели, задачам и являются логическим завершением диссертационного исследования.

Принципиальных замечаний по работе нет. Среди пожеланий хотелось бы отметить:

1. Материалы и методы желательно было вынести в отдельную главу после главы 1. Обзор литературы.
2. Тюриной А.В. оформлен регламент получения и инструкция по изготовлению и контролю препарата. Вероятно, эти документы оформлялись согласно требованиям Приказа Минздрава России от 15 апреля 1999 г. № 129, но с 4 февраля 2010 он не действует. Сейчас требуются: технические условия, инструкция по применению, пусковой регламент и маркировка.
3. Для увеличения срока годности бактериофагов и возможности их транспортирования при любых температурных режимах желательно препарат лиофилизировать.

Данные пожелания не умаляют достоинств диссертационного исследования, не снижают общей положительной оценки работы диссертанта.

Материал данной работы наукоёмкий с весомым практическим выходом, с четким изложением проблем, путей их решения, логическим выводом по каждой главе, плавным переходом к следующей главе, решая все необходимые задачи для получения качественного препарата. Представленные в диссертационном исследовании основные этапы получения экспериментального профилактического препарата на основе

холерных бактериофагов могут быть полезны при разработке новых иммунобиологических средств для профилактики холеры у людей.

Соответствие специальности

Научные положения диссертации и результаты проведенного исследования соответствуют научной специальности 1.5.6. - Биотехнология (биологические науки), пункты:

2. Генетические, селекционные и иммунологические исследования в прикладной микробиологии, вирусологии и цитологии. Технологии культивирования микроорганизмов-продуцентов, культур тканей и клеток растений и животных.

9. Медицинские биотехнологии. Создание лекарственных форм, комбинированных препаратов и биологически активных препаратов. Технологии производства вакцин. Средства диагностики вирусных, бактериальных и грибных болезней.

12. Биотехнология растительных и животных клеток. Контроль качества и оценка безопасности пищевых, медицинских, ветеринарных и парфюмерно - косметических биопрепаратов.

Заключение

Диссертационная работа Тюриной Анны Владимировны на тему: «Основные аспекты разработки экспериментального профилактического препарата на основе холерных бактериофагов», представленная на соискание ученой степени кандидата биологических наук по специальности 1.5.6. – биотехнология (биологические науки), выполненная под руководством Гаевской Натальи Евгеньевны, является завершенной научно-квалификационной работой, в которой содержится решение задачи по усовершенствованию профилактических мероприятий против холеры за счет разработки экспериментального профилактического препарата, безопасного и активного в отношении холерных вибрионов O1 серогруппы.

По актуальности, научной новизне полученных результатов,

теоретической и практической значимости, методическому и методологическому уровню, содержанию диссертационная работа Тюриной Анны Владимировны отвечает требованиям пунктов 9 – 14 «Положения о присуждении ученых степеней» ВАК РФ, утвержденного Постановлением Правительства РФ № 842 от 24 сентября 2013 г. (с изменениями в соответствии с Постановлением Правительства РФ: от 21.04.2016 № 335, от 02.08.2016 № 748, от 29.05.2017 № 650, от 28.08.2017 № 1024, от 01.10.2018 № 1168, от 26.05.2020 № 751, от 20.03.2021 № 426, от 11.09.2021 № 1539, от 26.09.2022 № 1690, от 26.01.2023 № 101, от 18.03.2023 № 415, от 26.10.2023 № 1786, от 25.01.2024 № 62, от 16.10.2024 № 1382 «О внесении изменений в Положение о присуждении ученых степеней»), предъявляемых к диссертациям на соискание ученой степени кандидата биологических наук, а ее автор, Тюрина Анна Владимировна заслуживает присуждения ученой степени кандидата биологических наук по специальности 1.5.6. – биотехнология (биологические науки).

Официальный оппонент:

Ведущий научный сотрудник научно - производственной лаборатории препаратов для диагностики особо опасных и других инфекций Федерального казённого учреждения здравоохранения «Ставропольский научно-исследовательский противочумный институт» Федеральной службы по надзору в сфере защиты прав потребителей и благополучия человека (355035, г. Ставрополь, ул. Советская, д. 13-15. Тел: (865-2)26-03-12, e-mail: IVJ-biotech@yandex.ru)

Доктор биологических наук

«22» 09 2025г.

Ирина Викторовна Жарникова

Подпись Ирины Викторовны Жарниковой заверяю:

Ученый секретарь Федерального казённого учреждения здравоохранения «Ставропольский научно-исследовательский противочумный институт» Федеральной службы по надзору в сфере защиты прав потребителей и благополучия человека (355035, г. Ставрополь, ул. Советская, д. 13-15. Тел: (865-2)26-03-12, e-mail: stavnpchi@mail.ru)

Кандидат биологических наук

«22» 09 2025г.



Татьяна Леонидовна Красовская