

ОТЗЫВ

официального оппонента, доктора биологических наук, профессора, заведующей лабораторией молекулярной биологии и вирусологии Федерального государственного бюджетного научного учреждения «Всероссийский научно-исследовательский и технологический институт биологической промышленности» Министерства сельского хозяйства РФ Матвеевой Ирины Николаевны 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

Холера продолжает оставаться глобальной угрозой общественному здоровью, особенно в регионах с неблагоприятными санитарно-гигиеническими условиями. По данным ВОЗ, ежегодно регистрируется от 1,3 до 4 миллионов случаев заболевания холерой, при этом количество летальных исходов может достигать 21-143 тыс. Особую тревогу вызывает постоянное расширение ареала холерных вибрионов, связанное с процессами глобализации, миграции населения и изменениями климата. В условиях современной эпидемиологической ситуации сохраняется реальная угроза завоза холеры на территорию Российской Федерации, что требует постоянной готовности системы здравоохранения к оперативному реагированию.

Современные вакцинные препараты, несмотря на доказанную эффективность, имеют ряд существенных ограничений. К ним относятся возрастные противопоказания (невозможность применения у детей младше 2 лет), временные ограничения (беременность, период лактации), а также противопоказания для лиц с хроническими заболеваниями в стадии декомпенсации. Кроме того, существующие вакцины демонстрируют ограниченную эффективность в отношении новых эпидемических штаммов *Vibrio cholerae*, что требует постоянного мониторинга и обновления вакцинных препаратов.

Особую актуальность проблеме придает стремительный рост антибиотикорезистентности среди холерных вибрионов. По данным международных исследований, более 60 % клинических изолятов *V. cholerae* демонстрируют устойчивость к традиционно применяемым антибиотикам (тетрациклинам, фторхинолонам, макролидам). Эта тенденция особенно опасна в условиях возможных эпидемических вспышек, когда эффективность стандартных схем этиотропной терапии может быть существенно снижена.

В сложившейся ситуации разработка альтернативных подходов к профилактике холеры приобретает стратегическое значение. Препараты на основе бактериофагов обладают рядом принципиальных преимуществ:

1. высокая специфичность действия без нарушения нормальной микрофлоры;
2. способность эволюционировать вместе с бактериальными патогенами;
3. минимальное количество противопоказаний и побочных эффектов;
4. возможность применения у пациентов различных возрастных групп.

Исследование Тюриной А.В. направлено на решение этих актуальных проблем путем создания инновационного профилактического препарата на основе строго специфичных холерных бактериофагов. Работа имеет важное значение для реализации стратегии биологической безопасности Российской Федерации и соответствует приоритетным направлениям развития биотехнологий в области создания новых лекарственных средств. Разрабатываемый подход может стать важным элементом системы профилактики особо опасных инфекций, особенно в условиях нарастающей антибиотикорезистентности.

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

Впервые проведена биологическая и генетическая характеристика холерных бактериофагов из коллекции-депозитария. Были отобраны вирулентные фаги с высокой литической активностью, полученные из объектов окружающей среды и лизогенных штаммов микроорганизмов (свидетельство о регистрации базы данных «Коллекция-депозитарий бактериофагов микроорганизмов III-IV групп патогенности» № 2022620881 от 19.04.2022 г.).

Разработан метод получения очищенной биомассы холерных бактериофагов Rostov-M3 и Rostov-13, обеспечивающий наибольший выход вирусных частиц при соблюдении норм биологической безопасности. Очищенные фаголизаты включены в состав экспериментального профилактического препарата и соответствуют всем требованиям для проведения исследований *in vivo*.

Экспериментальные исследования фармакокинетики продемонстрировали, 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 (отсутствие негативного влияния на: паренхиматозные органы (печень, почки, селезенку), гистологическую структуру тканей (сохранение нормальной морфологии), функциональную активность иммунокомпетентных клеток (отсутствие иммуносупрессии)).

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 (как в виде монопрепаратов, так и в составе комбинированного средства) обеспечивает высокоэффективную защиту взрослых кроликов от заражения холерным вибрионом (Патент на изобретение РФ № RU2783000C1).

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.

Степень достоверности и обоснованности научных положений, выводов и рекомендаций

Представленные в диссертационной работе научные положения обоснованы и согласуются с общепринятыми в этой области знаниями, описанными в рецензируемых изданиях. Экспериментальные данные, выводы, рекомендации основаны на общепринятых теоретических закономерностях, не противоречат и согласуются с известными концепциями в данной области исследований.

Достоверность и обоснованность научных результатов и выводов, полученных диссертантом, основываются на согласованности данных эксперимента и научных выводов. Диссертационная работа выполнена с использованием современных методов молекулярно-генетического, микробиологического и иммунологического анализа. Достоверность результатов подтверждена большим объемом экспериментальных данных, статистической обработкой и повторяемостью опытов. Исследования проведены в соответствии с международными биоэтическими нормами и регламентами РФ.

Работа выполнена в рамках государственных научных тем, что подчеркивает ее значимость для практического здравоохранения.

Теоретическая и практическая значимость диссертационной работы

Теоретическая значимость заключается в расширении знаний о взаимодействии бактериофагов с макроорганизмом, включая особенности их

персистенции и иммунного ответа. Практическая ценность работы подтверждена:

- Разработкой нормативных документов (Регламент получения и Инструкция по изготовлению препарата).
- Внедрением результатов в деятельность противочумных институтов (акты внедрения от 25.03.2024 и 12.02.2025).
- Публикацией данных в монографиях и методических рекомендациях.
- Депонированием штаммов и геномных последовательностей в международные базы данных (GenBank).

Автором впервые проведена комплексная биологическая и генетическая характеристика холерных бактериофагов из коллекции-депозитария, что позволило отобрать наиболее перспективные штаммы (Rostov-M3 и Rostov-13) с высокой литической активностью и отсутствием генов токсинов, интеграз и антибиотикорезистентности.

Апробация результатов исследования

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

Результаты диссертационной работы были доложены 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 работ, в том числе 10 статей в рецензируемых изданиях, 1 – в другом издании и 7 в

материалах конференции (тезисы), 1 патент на изобретение Российской Федерации и 1 база данных.

Оценка содержания, завершенности и оформления диссертации

Диссертационная работа является законченной научно-квалификационной работой, изложена на 150 страницах, содержит 23 таблицы и 11 рисунков, имеет общепринятую структуру. Список литературы состоит из 237 источников, в том числе 113 отечественных и 124 зарубежных. Во введении освещена актуальность, степень разработанности, теоретическая и практическая значимость темы исследований. Автору принадлежит основная роль в постановке задач исследования, определении основных объектов исследования, планировании и проведении теоретических и экспериментальных исследований, обобщении полученных данных и их статистической обработке. Задачи четко сформулированы и согласуются с целью исследования.

Литературный обзор отражает современные достижения в области фаговой терапии. Первая глава, включающая литературный обзор, сделанный со знанием изучаемой темы с соблюдением логики рассуждений. Ссылки на источники достоверны, научная информация по изучаемой теме представлена современными данными, отражающими характеристику возбудителя *V. cholerae* на современном этапе развития VII пандемии холеры, проблему антибиотикорезистентности холерных вибрионов, а также бактериофаги холерных вибрионов и основные направления их использования, принципы конструирования препаратов на основе холерных бактериофагов. Приведённый обзор отражает настоящее состояние вопроса, автор анализирует материал литературы и обосновывает необходимость проведения настоящей работы.

Вторая глава посвящена характеристике генетических и биологических свойств холерных бактериофагов и отбору наиболее перспективных из них и оценке фармакокинетики смеси холерных бактериофагов (Rostov-M3 + Rostov-13 + ФБ1) на модели *in vivo*.

Третья глава содержит данные по разработке метода получения экспериментального профилактического препарата на основе холерных

бактериофагов.

В четвертой главе обсуждаются результаты оценки безопасности экспериментального фагового коктейля на моделях белых мышей и кроликов, а также представлена оценка апоптогенного и цитотоксического влияния холерных бактериофагов на иммунокомпетентные клетки крови.

В пятой главе описаны новые данные по формированию гуморального и клеточного ответа к холерным фагам и их смеси на модели экспериментальных животных.

В шестой главе автор оценил профилактическую эффективность холерных бактериофагов и их смеси в отношении вирулентных холерных вибрионов O1 и O139 серогрупп на модели генерализованной инфекции у белых мышей и в отношении токсигенных штаммов *V. cholerae* O1 и O139 серогрупп на модели изолированной петли тонкого кишечника взрослого кролика.

В седьмой главе представлена оценка фармакокинетики и профилактической эффективности препарата в отношении холерных вибрионов O1.

В заключении подчеркнута актуальность темы исследования, выделены ключевые моменты исследований, сделано обобщение полученных результатов. Выводы научно обоснованы и являются логичным завершением диссертационного исследования, соответствуют поставленным целям и задачам. Личный вклад автора составляет 92%, что подтверждает самостоятельность исследований.

Принципиальных замечаний к содержанию и оформлению работы нет. В процессе ознакомления с работой возник вопрос – в чем и как видит автор перспективы коммерциализации препарата и масштабирования производства для клинического применения.

Соответствие специальности

Работа соответствует специальности 1.5.6. – Биотехнология (пункты 2, 9, 12), так как направлена на создание биопрепарата для медицинского применения с использованием современных биотехнологических методов, 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 экспериментального профилактического препарата на основе холерных бактериофагов», представленная на соискание ученой степени кандидата биологических наук по специальности 1.5.6. Биотехнология (биологические науки), выполненной под руководством Гаевской Натальи Евгеньевны, является завершенной научно-квалификационной работой и содержит новое решение такой актуальной научной задачи как создание препарата на основе холерных бактериофагов, его характеристики, оценки безопасности и профилактической активности в отношении холерных вибрионов O1 серогруппы.

Диссертационная работа обладает внутренним единством, содержит новые научные результаты и положения, выдвигаемые для публичной защиты, обоснованные выводы, свидетельствует о личном вкладе автора диссертации в науку и характеризуется существенной практической значимостью.

По актуальности, новизне и практической значимости диссертационная работа Тюриной Анны Владимировны отвечает требованиям п. 9-14 «Положения о присуждении ученых степеней» утвержденного Постановлениями Правительства Российской Федерации № 842 от 24 сентября 2013 года (с изменениями в соответствии с Постановлениями Правительства Российской Федерации 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»), предъявляемым к диссертациям на соискание ученой степени кандидата биологических наук, а ее автор, Тюрина Анна Владимировна заслуживает присуждения степени кандидата биологических наук по специальности 1.5.6. – Биотехнология (биологические науки).

Официальный оппонент:

Заведующая лабораторией молекулярной биологии и вирусологии
Федерального государственного бюджетного научного учреждения
«Всероссийский научно-исследовательский и технологический институт
биологической промышленности» Министерства сельского хозяйства РФ
Адрес: 141142, Московская обл., г.о. Лосино-Петровский, пгт. Биокомбината,
стр. № 17, корп. 1.
Тел.(факс): 8(496) 56-7-32-63,
e-mail: vnitibp@mail.ru

Доктор биологических наук, профессор

Ирина Николаевна Матвеева

23.09.2025

Подпись Ирины Николаевны Матвеевой заверяю:

Учёный секретарь Федерального государственного бюджетного научного учреждения «Всероссийский научно-исследовательский и технологический институт биологической промышленности» Министерства сельского хозяйства РФ (141142, Московская обл., г.о. Лосино-Петровский, пгт. Биокомбината, стр. № 17, корп. 1. Тел.(факс): 8(496) 56-7-32-63, e-mail: vnitibp@mail.ru)

Кандидат сельскохозяйственных наук

Евгения Владимировна Маркова

