

«УТВЕРЖДАЮ»

Директор Федерального казенного учреждения
здравоохранения «Ростовский-на-Дону
ордена Трудового Красного Знамени
научно-исследовательский противочумный
институт» Федеральной службы по надзору
в сфере защиты прав потребителей и
благополучия человека

к.м.н. Гасвская Н.Е.
«14» Июня 2025 г.



ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Диссертация Тюриной Анны Владимировны «Основные аспекты разработки экспериментального профилактического препарата на основе холерных бактериофагов» на соискание ученой степени кандидата биологических наук по специальности 1.5.6 - Биотехнология выполнена в Федеральном казенном учреждении здравоохранения «Ростовский-на-Дону ордена Трудового Красного Знамени научно-исследовательский противочумный институт» Федеральной службы по надзору в сфере защиты прав потребителей и благополучия человека.

В период подготовки работы Тюрина Анна Владимировна работала в должности младшего научного сотрудника в лаборатории бактериофагов отдела диагностических препаратов Федерального казенного учреждения здравоохранения «Ростовский-на-Дону ордена Трудового Красного Знамени научно-исследовательский противочумный институт» Федеральной службы по надзору в сфере защиты прав потребителей и благополучия человека.

В 2016 году Тюрина Анна Владимировна окончила Федеральное государственное автономное образовательное учреждение высшего образования «Южный федеральный университет» по специальности «Биология» (диплом специалиста 106104 0010958 Регистрационный № 3/21 от 27.05.2016 г.)

Тюрина Анна Владимировна для завершения диссертационной работы, апробации, получения заключения организации была прикреплена соискателем по специальности 1.5.6 – биотехнология в лабораторию бактериофагов

Федерального казенного учреждения здравоохранения «Ростовский-на-Дону ордена Трудового Красного Знамени научно-исследовательский противочумный институт» Федеральной службы по надзору в сфере защиты прав потребителей и благополучия человека, протокол № 5 от 27.04.2024 г.

Справка о сдаче кандидатских экзаменов № 441 выдана Федеральным бюджетным учреждением науки «Московский научно-исследовательский институт эпидемиологии и микробиологии им Г. Н. Габричевского» Федеральной службы по надзору в сфере защиты прав потребителей и благополучия человека 07.11.2024 г.

Научный руководитель – Гаевская Наталья Евгеньевна, кандидат медицинских наук, Федеральное казенное учреждение здравоохранения «Ростовский-на-Дону ордена Трудового Красного Знамени научно-исследовательский противочумный институт» Федеральной службы по надзору в сфере защиты прав потребителей и благополучия человека, директор.

По итогам обсуждения диссертации «Основные аспекты разработки экспериментального профилактического препарата на основе холерных бактериофагов», представленной на соискание ученой степени кандидата биологических наук по специальности 1.5.6 «Биотехнология», принято следующее заключение:

Диссертация Анны Владимировны Тюриной «Основные аспекты разработки экспериментального профилактического препарата на основе холерных бактериофагов» представляет собой завершённое научно-квалификационное исследование. В ходе работы были выделены два высокоэффективных бактериофага – Rostov-M3 и Rostov-13, которые показали наилучшие результаты в профилактике холеры. Оптимальное соотношение этих фагов (1:1) обеспечивает широкий спектр активности, низкую иммуногенность и пролонгированную персистенцию. Исследования подтвердили безопасность и выраженный профилактический эффект данных бактериофагов в отношении *V. cholerae* O1 серогруппы. На их основе создан экспериментальный препарат, отвечающий всем требованиям, предъявляемым к современным иммунобиологическим средствам.

Актуальность темы диссертационной работы

Сезонные вспышки холеры в эндемичных регионах и стремительное распространение антибиотикорезистентных штаммов *Vibrio cholerae* представляют серьезную угрозу для глобального здравоохранения. Хотя существующие оральные вакцины (такие как Dukoral и Shanchol) доказали свою эффективность, они имеют существенные ограничения, включая возрастные противопоказания, побочные реакции и неполный охват населения, особенно в уязвимых группах.

Современные методы лечения холеры, основанные на регидратационной и антибактериальной терапии, сталкиваются с растущей проблемой антимикробной резистентности, что снижает их эффективность и увеличивает смертность. В этой связи разработка альтернативных подходов приобретает особую актуальность.

Бактериофаги представляют собой перспективное решение благодаря своей способности специфически поражать холерные вибрионы, включая резистентные штаммы. Важными преимуществами фаговой терапии являются: высокая специфичность действия, эффективность против антибиотикоустойчивых штаммов, отсутствие возрастных ограничений и противопоказаний, хорошая переносимость пациентами, возможность комбинации с другими методами лечения. Эти характеристики делают фаговые препараты многообещающим инструментом как для профилактики, так и для лечения холеры, особенно в условиях ограниченных ресурсов и высокой распространенности резистентных штаммов. Разработка и внедрение фаговых препаратов соответствует современным стратегиям борьбы с инфекционными заболеваниями и антимикробной резистентностью.

Связь темы исследования с планом научной работы учреждения

Исследования, представленные в диссертационной работе, проведены в лаборатории бактериофагов отдела диагностических препаратов Федерального казенного учреждения здравоохранения «Ростовский-на-Дону ордена Трудового Красного Знамени научно-исследовательский противочумный институт» Федеральной службы по надзору в сфере защиты прав потребителей и благополучия человека. Работа выполнена в рамках двух государственных

научно-исследовательских проектов, в которых автор выступал в роли исполнителя и ответственного исполнителя: «Экспериментальное обоснование возможных путей преодоления антибиотикоустойчивости у холерных вибрионов» № АААА-А16-116070610104-9 от 06.06.2016 г. и «Создание экспериментального профилактического препарата на основе холерных бактериофагов и изучение иммунного ответа организма на введение холерных фагов» № АААА-А19-119032090077-3 от 20.03.2019 г.

Вклад автора в получении научных результатов

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*) включая наиболее ответственные этапы: разработку экспериментальных протоколов, проведение ключевых опытов, интерпретацию данных и формулирование выводов, статистическую обработку данных современными методами, подготовку публикаций и презентацию результатов. Организация Подтверждает, что диссертация выполнена с личным участием Тюриной Анны Владимировны 92%.

Исследования по безопасности и эффективности экспериментального препарата проведены на базе лаборатории экспериментально-биологических моделей и биологической безопасности (и.о. зав. лабораторией, к.м.н. Д.А. Левченко). Геномный анализ холерных бактериофагов (секвенирование и биоинформатика) выполнен на базе лаборатории молекулярной биологии природно-очаговых и зоонозных инфекций (и.о. зав. лабораторией, к.б.н. Р.В. Писанов). Изучение иммунного ответа у экспериментальных животных проведено на базе лаборатории иммунологии (и.о. зав. лабораторией, к.б.н. И.А. Иванова). Гистологические исследования проведены на базе патологоанатомического отделения Государственного бюджетного учреждения здравоохранения Ростовской области "Областная клиническая больница №2" (зав. отделением Е.А. Синельник).

Степень достоверности результатов исследования

Экспериментальная часть исследования выполнена с использованием сертифицированного современного оборудования и коммерческих

диагностических препаратов, включая тест-системы, срок годности которых соответствовал требованиям на момент проведения работ.

Надежность результатов исследования обоснована достаточным объемом выборки, использованием сертифицированных методов бактериологического, иммунохимического и молекулярно-генетического анализа, обладающих высокой специфичностью и чувствительностью.

Степень новизны полученных результатов

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.

Практическая значимость

Полученные результаты позволяют рассматривать Rostov-M3 и Rostov-13 в качестве перспективной основы для создания эффективных и безопасных профилактических препаратов против холерной инфекции.

Разработаны нормативные документы – Регламент получения и Инструкция по изготовлению и контролю препарата, утвержденные Ученым советом Федерального казенного учреждения здравоохранения «Ростовский-на-Дону ордена Трудового Красного Знамени научно-исследовательский противочумный институт» Федеральной службы по надзору в сфере защиты прав потребителей и благополучия человека (протокол №11 от 31.10.2022 г.).

Научные данные, полученные в ходе работы, включены в монографию

"Холера. Эпидемиология, диагностика, клиника, лечение, профилактика" (2024 г., 718 с., ISBN 978-5-98615-649-1); в Федеральные методические рекомендации МР 4.2.0263-21, регламентирующие работу с бактериофагами микроорганизмов I-IV групп патогенности.

Депонирован в Государственную коллекцию патогенных бактерий Федерального казенного учреждения науки «Российский научно-исследовательский противочумный институт Микроб» Роспотребнадзора штамм *V. cholerae* O1 серогруппы биовара Эль Тор 20554, который может использоваться для размножения холерного бактериофага Rostov-M3 (KM 2157, 11.10.2023 г.).

Определены полногеномные нуклеотидные последовательности трех штаммов *Vibrio phage* (Rostov-1, Rostov-6, Rostov-13), депонированных в Международной базе данных GenBank, номера доступа (MG957431, MN105773, OK169294-OK169295).

Научные результаты диссертации используются сотрудниками Федерального казенного учреждения науки «Российский научно-исследовательский противочумный институт Микроб» Роспотребнадзора при выполнении научной темы № 228-4-24 (акт внедрения от 25.03.2024 г.), а также сотрудниками Федерального казенного учреждения здравоохранения «Иркутский научно-исследовательский институт» Роспотребнадзора при изучении влияния экзометаболитов микробиома кишечника на рост холерного вибриона с целью разработки новых препаратов на основе бактериофагов (акт внедрения от 12.02.2025 г.).

Результаты диссертационного исследования включены в программы повышения квалификации Федерального казенного учреждения здравоохранения «Ростовский-на-Дону ордена Трудового Красного Знамени научно-исследовательский противочумный институт» Федеральной службы по надзору в сфере защиты прав потребителей и благополучия человека (акт внедрения от 10.02.2025 г.).

Соответствие специальности

По комплексу методических подходов и исследованных проблем диссертационная работа Тюриной А.В. «Основные аспекты разработки

экспериментального профилактического препарата на основе холерных бактериофагов» соответствует паспорту специальности 1.5.6 – Биотехнология (биологические науки).

Сведения о полноте опубликованных научных результатов

По теме диссертационного исследования опубликовано 20 печатных работ, в том числе 10 статей в рецензируемых изданиях, 1 – в других изданиях и 7 в материалах конференций (тезисы), 1- патент, 1- база данных.

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, 5 - 7 декабря 2017 г.); XIV Всероссийская научно-практическая конференция молодых ученых и специалистов Роспотребнадзора «Современные проблемы эпидемиологии, микробиологии и гигиены» (Московская обл., ОК «Лужки» 22 - 24 сентября, 2022 г.); Международный молодежный форум «Неделя науки-2022» 28 ноября - 2 декабря, 2022 г.); Международная конференция «Бактериофаги: от фундаментальных исследований к применению» (Новосибирск, 21 – 23 сентября, 2024 г.).

Перечень работ, опубликованных по теме диссертации:

1. Тюрина, А.В. Изучение активности *in vitro* фаговой композиции в отношении штаммов *V. cholerae* O1 и O139 серогрупп для оценки перспективности ее апробации в профилактике холеры / А.В. Тюрина, Н.Е. Гаевская, М.П. Погожова // Научно-практическая конференция «Актуальные вопросы инфекционной патологии Юга России» - Краснодар, 2018. – С. 172-174.

2. Погожова, М.П. Полногеномный сиквенс холерных бактериофагов Rostov-1 и Rostov-6 / М.П. Погожова, Н.Е. Гаевская, Р.В. Писанов, А.С. Водопьянов, Л.В. Романова, С.О. Водопьянов, А.В. Тюрина, А.О. Кочеткова // Современные проблемы эпидемиологии, микробиологии и гигиены: Материалы X Всероссийской научно-практической конференции молодых ученых и специалистов Роспотребнадзора. – М., 2018. – С. 244-248.

3. Тюрина, А.В. Изучение некоторых аспектов фармакокинетики холерного экспериментального профилактического фагового препарата *in vitro* и *in vivo* / А.В.

Тюрина, Н.Е. Гаевская, М.П. Погожова, А.О. Кочеткова // Холера и патогенные для человека вибрионы: сборник статей Проблемной комиссии (48.04) Координационного научного совета по санитарно-эпидемиологической охране территории Российской Федерации. – Саратов: Амирит, 2018. – Вып. № 31. – С. 149-151.

4. Тюрина, А.В. История и перспективы использования холерных бактериофагов в терапии и профилактике холеры / А.В. Тюрина, Н.Е. Гаевская, М.П. Погожова, А.О. Кочеткова // Вестник биотехнологии и физико-химической биологии им. Ю.А. Овчинникова. – М., 2019. – Т. 15. — № 3. – С. 66-71.

5. Аноприенко, А.О. Создание экспериментального профилактического препарата на основе холерных бактериофагов / А.О. Аноприенко, А.В. Тюрина, Н.Е. Гаевская, М.П. Погожова // Вестник биотехнологии и физико-химической биологии им. Ю.А. Овчинникова. — 2020. — Т. 16. – №3. – С. 10-14.

6. Погожова, М.П. Биологические свойства и генетическая характеристика экспериментальных диагностических бактериофагов *Vibrio cholerae* / М.П. Погожова, Н.Е. Гаевская, А.С. Водопьянов, Р.В. Писанов, А.О. Аноприенко, Л.В. Романова, А.В. Тюрина // Журнал микробиологии, эпидемиологии и иммунологии. – 2021. – № 3. – С. 290-297.

7. Тюрина, А.В. Изучение биологических и генетических свойств холерных бактериофагов, входящих в состав экспериментального профилактического препарата / А.В. Тюрина, Н.Е. Гаевская, М.П. Погожова, А.О. Аноприенко // Современные проблемы эпидемиологии, микробиологии и гигиены: Материалы XIII Всероссийской научно-практической конференции молодых ученых и специалистов Роспотребнадзора (г. Екатеринбург, 15-17 сентября 2021 года) / под ред. А. Ю. Поповой. – Екатеринбург: ФБУН ЕМНЦ ПОЗРПП Роспотребнадзора, 2021. – С. 317-319.

8. Тюрина, А.В. Аспекты конструирования экспериментальных профилактических препаратов на основе холерных бактериофагов / А.В. Тюрина, Н.Е. Гаевская, М.П. Погожова, А.О. Аноприенко // Вестник биотехнологии и физико-химической биологии им. Ю.А. Овчинникова. – 2021. – Т. 17. – № 3. – С. 66-68.

9. Тюрина, А.В. Оценка формирования местного гуморального иммунного ответа на введение холерных фагов у экспериментальных животных / А.В. Тюрина, И.А. Иванова, Н.Е. Гаевская, А.В. Филиппенко, А.А. Труфанова, Н.Д. Омельченко, М.П. Погожова, А.О. Аноприенко // Межрегиональная научно-практическая конференция «Актуальные вопросы эпидемиологического надзора за инфекционными и паразитарными заболеваниями на юге России. Ермольевские чтения». — 2022. — С. 321-324.
10. Тюрина, А.В. Оценка гуморального иммунного ответа на введение холерных бактериофагов у экспериментальных животных / А.В. Тюрина, Л.В. Ларионова, А.В. Филиппенко, Н.Д. Омельченко, А.А. Труфанова, Д.И. Симакова, И.А. Иванова, Н.Е. Гаевская, М.П. Погожова, А.О. Аноприенко, Н.И. Пасюкова // Вестник биотехнологии и физико-химической биологии им. Ю.А. Овчинникова. — 2022. — Т. 18. — № 2. — С. 36-41.
11. Гаевская, Н.Е. Использование бактериофагов в терапии и профилактике особо опасных инфекций / Н.Е. Гаевская, А.В. Тюрина, А.А. Труфанова, А.В. Филиппенко, И.А. Иванова, Н.Д. Омельченко, М.П. Погожова, А.О. Аноприенко // Вестник биотехнологии и физико-химической биологии им. Ю.А. Овчинникова. — 2022. — Т. 18. — № 3. — С. 70-78.
12. Погожова, М.П. Создание коллекции фагов патогенных вибрионов и её применение в диагностических и профилактических целях / М.П. Погожова, Н.Е. Гаевская, А.В. Тюрина, А.О. Аноприенко // Вестник биотехнологии и физико-химической биологии им. Ю.А. Овчинникова. — 2023. — Т.19. — №3. — С. 37-45.
13. Тюрина, А.В. Оценка безопасности смеси холерных бактериофагов на модели экспериментальных животных / А.В. Тюрина, Н.Е. Гаевская, Е.А. Синельник, И.А. Иванова, А.В. Филиппенко, Н.Д. Омельченко, А.А. Труфанова, М.П. Погожова, А.О. Аноприенко, Н.И. Пасюкова // Проблемы особо опасных инфекций. — 2023. — № 4. — С. 160-162.
14. Тюрина, А.В. Оценка эффективности использования холерных бактериофагов для профилактики экспериментальной холеры / А.В. Тюрина, Н.Е. Гаевская, И.А. Иванова, А.В. Филиппенко, Н.Д. Омельченко, А.А. Труфанова, М.П. Погожова, А.О. Аноприенко, Ю.В. Сизова, Н.И. Пасюкова // Проблемы особо опасных инфекций. — 2024. — № 2. — С. 193-195.

15. Тюрина, А.В. Микробиологические аспекты разработки экспериментального профилактического препарата на основе холерных бактериофагов / А.В. Тюрина, Н.Е. Гаевская, И.А. Иванова, М.П. Погожова, Ю.В. Сизова // Материалы международной конференции «Бактериофаги: от фундаментальных исследований к применению». Новосибирск, 21–23 сентября 2024 г. – С. 59.

16. Тюрина, А.В. Фармакокинетика и антимикробное действие экспериментального препарата на основе холерных бактериофагов на модели белых мышей / А.В. Тюрина, Н.Е. Гаевская, И.А. Иванова, М.П. Погожова, Ю.В. Сизова, А.В. Филиппенко, Н.Д. Омельченко, А.О. Аноприенко // Вестник биотехнологии и физико-химической биологии им. Ю.А. Овчинникова. – 2024. – 20(3). – С. 28–33.

17. Иванова, И.А. Современное состояние проблемы альтернативных методов профилактики и лечения холеры / И.А. Иванова, А.В. Филиппенко, Н.Д. Омельченко, А.В. Тюрина, Н.Е. Гаевская // Иммунопатология, аллергология, инфектология. – 2024. – 3. – С. 19–28.

18. Тюрина, А.В. Оценка профилактической эффективности на модели белых мышей / А.В. Тюрина, М.П. Погожова, А.В. Филиппенко, Н.Д. Омельченко, И.А. Иванова, Ю.В. Сизова // Актуальные вопросы эпидемиологии, микробиологии, диагностики и профилактики холеры и других инфекционных болезней. Сборник научных трудов Всероссийской научно-практической конференции с международным участием, посвященной 90-летию ФКУЗ Ростовский-на-Дону противочумный институт Роспотребнадзора, 7–8 ноября 2024 года, г. Ростов-на-Дону. – С. 371–375.

19. База данных RU2022620881 Российская Федерация. Коллекция-депозитарий бактериофагов микроорганизмов III-IV группы патогенности / Гаевская Н.Е., Погожова М.П., Аноприенко А.О., Тюрина А.В. правообладатель: ФКУЗ «Ростовский-на-Дону ордена трудового Красного Знамени научно-исследовательский противочумный институт» Федеральной службы по надзору в сфере защиты прав потребителей и благополучия человека (RU). - №2022620059; заявл. 12.01.2022; опубл. 19.04.2022, Бюл. № 4. - 1с.

20. Патент RU2783000C1 Российская Федерация. Способ профилактики холеры с помощью бактериофагов. / Иванова И.А., Гаевская Н.Е., Тюрина А.В., Омельченко Н.Д., Филиппенко А.В., Труфанова А.А. заявитель и патентообладатель: ФКУЗ «Ростовский-на-Дону ордена трудового Красного Знамени научно-исследовательский противочумный институт» Федеральной службы по надзору в сфере защиты прав потребителей и благополучия человека (RU). - №2021137429; заявл. 16.12.21; опубл. 8.11.2022, Бюл. № 31. - 10с.

Диссертация Тюриной А.В. «Основные аспекты разработки экспериментального профилактического препарата на основе холерных бактериофагов» рекомендуется к защите на соискание ученой степени кандидата биологических наук по специальности 1.5.6 Биотехнология (биологические науки).

Заключение принято на заседании Ученого совета. Присутствовало на заседании 55 человек. Результаты голосования: «за» - 18 чел. (из 18 присутствующих членов Ученого совета), «пртив» - 0 чел., «воздержалось» - 0 чел., протокол № 16 от 27.11.2024 г.

Врио заместителя директора по научной и экспериментальной работе Федерального казенного учреждения здравоохранения «Ростовский-на-Дону ордена Трудового Красного Знамени научно-исследовательский противочумный институт» Федеральной службы по надзору в сфере защиты прав потребителей и благополучия человека, кандидат биологических наук  Виктория Владиславовна Агафонова

Ученый секретарь Федерального казенного учреждения здравоохранения «Ростовский-на-Дону ордена Трудового Красного Знамени научно-исследовательский противочумный институт» Федеральной службы по надзору в сфере защиты прав потребителей и благополучия человека (344002, г. Ростов-на-Дону, ул. М. Горького, 167/40, 8 (863) 240-21003, plague@aanet.ru), кандидат биологических наук  Марина Владимировна Полеева

