

МИНОБРНАУКИ РОССИИ

Федеральное государственное бюджетное
учреждение науки

**«Федеральный исследовательский центр
«Пушкинский научный центр биологических
исследований Российской академии наук»
(ФИЦ ПНЦБИ РАН)**

142290, Московская обл., г. Серпухов, г. Пушкино,
проспект Науки, д.3.

Тел./факс: (4967)73-26-36,

e-mail: info@pncbi.ru, <https://www.pbcras.ru>

ОКПО 02699688, ОГРН 1025007768983, ИНН/КПП
5039002841/503901001

«УТВЕРЖДАЮ»

Директор ФИЦ ПНЦБИ РАН

д.ф.-м.н. Грабарник Т.Я.

«12» сентября 2025 г.



12.09.2025 № 191-01-2115/829

На № _____ от _____

ОТЗЫВ ВЕДУЩЕЙ ОРГАНИЗАЦИИ

Федерального государственного бюджетного учреждения науки «Федеральный исследовательский центр «Пушкинский научный центр биологических исследований Российской академии наук» о научно-практической ценности диссертационной работы 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.

Актуальность темы выполненной работы

В последнее десятилетие наблюдается резкий рост инфекционных заболеваний, вызванных антибиотико-резистентными бактериями. По данным за последние несколько лет, количество смертельных случаев, вызванных антибиотико-резистентными бактериями, преодолело отметку 1 миллион случаев в год. В то же время, появление новых антибактериальных соединений происходит с

недостаточной скоростью. Одним из новых антибактериальных средств, имеющих обширный потенциал применения, являются бактериофаги. По данным Всемирной Организации Здравоохранения с каждым годом увеличивается количество средств на основе бактериофагов, проходящих клинические испытания. В России исторически сложилась ситуация широкомасштабного применения терапевтических средств на основе бактериофагов для борьбы с возбудителями бактериальных инфекций, благодаря доступным препаратам АО «НПО Микроген». Однако, терапевтические коктейли против возбудителей холеры на данный момент отсутствуют в линейке крупнейших производителей фагопрепаратов. Антибактериальные препараты на основе бактериофагов против холеры актуальны при нарушении функционирования инфраструктуры систем водоочистки, которая может быть вызвана стихийными бедствиями (наводнения, землетрясения и т.д.) и другими причинами. Таким образом тема работы Тюриной А.В., несомненно, является актуальной.

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

В исследовании Тюриной А.В. впервые была проведена детальная характеристика шести бактериофагов из коллекции-депозитария, ранее выделенных в Ростовской области (5 изолятов) и Индии (один изолят). Для пяти бактериофагов с помощью высокопроизводительного секвенирования были установлены последовательности их геномов. Исходя из определенных в ходе работы свойств фагов два бактериофага: Rostov-M3 и Rostov-13 были выбраны как перспективные кандидаты для использования в составе экспериментального средства для профилактики холеры. Также была оптимизирована технология культивирования этих двух бактериофагов, оценено их действие на организмы мышей и кроликов, позволяющее раскрыть как антибактериальное действие препарата, так и его взаимодействие с иммунной системой модельных животных. Доказана эффективность композиции фагов Rostov-M3 и Rostov-13 против

холерных вибрионов серогруппы O1.

Связь новизны исследования с планами соответствующих отраслей науки

Работа Тюриной А.В. соответствует направлениям научно-технологического развития России в рамках задач, направленных борьбу с болезнетворными антибиотикорезистентными бактериями.

Работа Тюриной А.В. была выполнена в рамках НИР: «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. в которых она являлась исполнителем и ответственным исполнителем.

Значимость для науки и практики данных, полученных автором диссертации

Несмотря на то, что препараты бактериофагов активно применяются для терапии бактериальных инфекций, детальные данные о взаимодействии фагов и организмов мало представлены. В работе представленной Тюриной на моделях мышей и кроликов были проанализированы токсические свойства фагов Rostov-M3 и Rostov-13, проанализирована выработка антител, определена антибактериальная активность по отношению к нескольким штаммам *Vibrio cholerae*. Также были определены последовательности ДНК геномов пяти бактериофагов и проведен анализ наличия в них генов токсинов и генов, отвечающих за лизогенное состояние.

Для практического применения результатов работы, Тюриной А.В. была оптимизирована методика культивирования бактериофагов Rostov-M3 и Rostov-13, позволившая увеличить титр вирионов в несколько раз. Полученный коктейль

бактериофагов может стать основой лекарственного средства, направленного на предотвращение инфекций, вызванных холерными вибрионами серогруппы O1.

Достоверность и апробация результатов исследования, в том числе публикации в рецензируемых изданиях

Достоверность полученных Анной Владимировной Тюриной подтверждается использованием современных классических методов микробиологии, вирусологии, генетики, иммунологии и гистологии. Использованием корректных статистических методов с достаточным количеством воспроизводимых повторов экспериментов.

Диссертантом подготовлено 20 научных работ. Среди них 10 статей в рецензируемых изданиях, таких как «Вестник биотехнологии и физико-химической биологии им. Ю.А. Овчинникова», «Журнал микробиологии, эпидемиологии и иммунологии» и «Проблемы особо опасных инфекций» (включены в соответствующий перечень по состоянию на 19.05.2025). Также материалы представлены в виде 7 тезисов конференций, 1 патента, 1 базы данных и 1 материале в другом издании. Количество опубликованных работ превышает требования ВАК в несколько раз.

Рекомендации по использованию результатов и выводов диссертационной работы

В результате выполнения данной работы Тюриной А.В. был создан препарат бактериофагов, а также показана его эффективность против вибрионов холеры серогруппы O1 на моделях мышей и кроликов. Рекомендуется оценить возможность внедрения данного препарата как средства профилактики заболеваний холеры в районах с неблагоприятной эпидемической ситуацией. Необходимо отметить, что Анна Владимировна является соавтором патента, описывающего способ профилактики холеры с помощью бактериофагов. Рекомендуется ознакомить представителей наиболее известных российских производителей, таких как АО «НПО Микроген» и ООО «Микромир» с материалами автореферата диссертации.

Соответствие специальности

Тема диссертации Анны Владимировны, а также цель, задачи, основные положения и выводы, полностью соответствуют паспорту специальности 1.5.6 – Биотехнология.

Оценка содержания и оформления диссертации

Диссертационная работа А.В. Тюриной изложена на 150 страницах, содержит 23 таблицы и 11 рисунков. Работа состоит из введения, материалов и методов исследований, обзора литературы, результатов и их обсуждения, заключения, выводов, списка используемой литературы (включает 237 наименований). В автореферате указан список опубликованных по теме диссертации (10 статей в рецензируемых научных журналах, рекомендуемых ВАК для защиты кандидатских диссертаций, и 7 публикаций в сборниках тезисов научных конференций), 1 материал в другом издании, 1 патент, 1 база данных. Текст работы легко читается и содержит незначительное количество опечаток.

Автореферат оформлен согласно требованиям ВАК, соответствует структуре и содержанию диссертации.

В разделе введение автор приводит ряд документов, разработанных правительством Российской Федерации и ВОЗ, подчеркивающих актуальность проблемы, освещаемой в диссертации. Материалы и методы изложены как часть раздела введения. В обзоре литературы дается чёткое описание механизма этиологии холеры холерными вибрионами. Указываются функции и роль отдельных генов холерных вибрионов в развитии патогенного процесса. Описываются характерные симптомы заболевания холеры. Помимо вирулентного и лизогенного типов существования фагов, свойственных для хвостатых фагов, автор раскрывает хронический тип, присущий, в частности, фагу СТХф, который играет главенствующую роль в формировании вирулентности патогенных штаммов *V. cholerae*. Также рассмотрены ранее существующие классификации

вирусов, и также приведена современная система, используемая Международным комитетом по вирусной таксономии (ICTV).

Раздел результаты собственных исследований состоит из 6 глав. В главе 2 проводится характеристика 6 бактериофагов по результатам, которой для антибактериального препарата были выбраны три фага. Были изучены спектры чувствительных штаммов, морфотипы вирионов, для 5 фагов проведено полногеномное секвенирование и проведен их филогенетический анализ. Глава 3 посвящена оптимизации метода наработки выбранных фагов. В главе 4 представлены результаты оценки токсичности, апоптогенности и цитотоксичности на моделях белых мышей и взрослых кроликов. Глава 5 посвящена взаимодействию фагов с иммунной системой модельных животных. Определена динамика нарастания титров специфических к фагам антител в сыворотке крови, иммуногенность фагов. Также, с помощью коммерческого набора, определено изменение титров общих секретируемых IgA возникающее при введении коктейля холерных фагов. В главе 6 описана профилактическая эффективность бактериофагов Rostov-M3, Rostov-13, ФБ1 по отношению к вибрионам холеры серогрупп O1 и O139. Доказана эффективность действия против вибрионов серогруппы O1. Глава 7 является продолжением исследований антибактериального действия коктейля фагов Rostov-M3, Rostov-13 на инфекционных моделях животных на вирулентных штаммах *V. cholerae* серогруппы O1. Следует отметить, что экспериментальная часть работ по диссертации была осложнена условиями проведения работ с патогенными бактериями. Все этапы проведенных исследований соответствовали международным этическим нормам обращения с лабораторными животными, требованиями законодательства РФ.

Работа, проведенная Анной Владимировной, представляет собой пример прообраза детальных доклинических исследований антибактериальных препаратов бактериофагов. Диссертация Тюриной А.В. вызывает неподдельный интерес и, как следствие, следующий ряд вопросов уточняющего и дискуссионного характера:

(1) Индивидуальные спектры чувствительности бактериальных штаммов к тестируемым бактериофагам в работе не представлены, по-видимому, из-за масштабности данных (6 фагов были протестированы по отношению к более 110 штаммам). Приводится лишь количество чувствительных штаммов в каждом протестированном виде представителей рода *Vibrio* (таблица 3). Были-ли различия в спектрах активности между близкородственными фагами? Например, Rostov-1 и Rostov 13?

(2) Рисунок 6: по какой причине для фага Rostov-3М использованы три различные последовательности GenBank? Почему они располагаются одновременно на трёх ветвях филограммы, расстояние между которыми сопоставимо с маркерной отметкой 0,01?

(3) В экспериментах по иммуногенности, описанных в главе 5.1 были получены антисыворотки содержащие антитела против каждого фага и коктейля. Возникает вопрос про перекрестную иммуногенность бактериофагов. Приводило-ли длительное введение одного фага к появлению антител, связывающихся к другим фагам, исследованным в этой работе?

(4) При иммунизации коктейлем бактериофагов антитела вырабатывались в равной степени к каждому фагу или вырабатывались избирательно к одному из бактериофагов коктейля?

Также к работе есть несколько замечаний, которые никак не влияют на положительную оценку работы Анны Владимировны, однако, некоторые из них заслуживают уточнения:

- Таблицы 4-7, Таблица 10: не указан диапазон ошибок. Сколько раз повторялись эксперименты? Каков был диапазон отклонений?

- Таблица 17 – Эффективность фаговой смеси при генерализованной форме инфекции у белых мышей, вызванной токсигенными штаммами *V. cholerae* O1, O139 серогрупп.

В тексте указаны что 70 мышей были разделены на 7 групп по 10 мышей. Сколько раз повторялся эксперимент?

Стр. 54-55 и рисунок 5. При упоминании в тексте диаметра негативных колоний указан диапазон значений диаметров колоний, однако на рисунке 5 видно, что размеры колоний в 10 раз больше (например, для фага Rostov-1 не 0,3-0,6 мм, а 3-6 мм.

Рисунок 8. Отсутствует масштабная линейка.

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**, выполненной под руководством **Гаевской Натальи Евгеньевны**, является завершенной научно-квалификационной работой и содержит новое решение актуальной научной проблемы – борьбы с антибиотикорезистентными бактериями, а именно с возбудителями холеры. По актуальности, новизне и практической значимости диссертационная работа **Тюриной Анны Владимировны** отвечает требованиям п. 9-14 «Положения о присуждении ученых степеней», утвержденного Постановлением 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 ученой степени кандидата биологических наук по специальности **1.5.6 – Биотехнология**.

Результаты исследований **Тюриной Анны Владимировны** обсуждены, и отзыв одобрен на семинаре лаборатории биологии вирусов бактерий Института биохимии и физиологии микроорганизмов им. Г.К. Скрыбина Российской академии наук – обособленного подразделения Федерального государственного бюджетного учреждения науки «Федеральный исследовательский центр «Пушкинский научный центр биологических исследований Российской академии наук» (Протокол № 4 от 09 сентября 2025 года).

Отзыв составил:

Ведущий научный сотрудник лаборатории биологии вирусов бактерий Института биохимии и физиологии микроорганизмов им. Г.К. Скрыбина Российской академии наук – обособленного подразделения Федерального государственного бюджетного учреждения науки «Федеральный исследовательский центр «Пушкинский научный центр биологических исследований Российской академии наук» (142290, Московская область, г. Серпухов, г. Пушкино, Проспект науки, д.5, тел.: +7(4967)73-26-36, E-mail: a.shadrin@pbcras.ru

кандидат биологических наук

 Шадрин Андрей Михайлович

Подпись Шадрина Андрея Михайловича заверяю:

Ученый секретарь Федерального государственного бюджетного учреждения науки «Федеральный исследовательский центр «Пушкинский научный центр биологических исследований Российской академии наук» (142290, Московская область, г. Серпухов, г. Пушкино, Проспект науки, д.3, тел.: +7(495)335-01-00, E-mail: info@pbcras.ru)

кандидат биологических наук

 Назарова Галина Николаевна

