

ОТЗЫВ

на автореферат диссертации

Бочкаревой Светланы Сергеевны на тему:

«Конструирование препаратов бактериофагов и клинико-иммунологические аспекты фаготерапии и фагопрофилактики инфекций, связанных с оказанием медицинской помощи»,

представленной на соискание ученой степени доктора биологических наук по специальности 1.5.6. Биотехнология

Я подробно ознакомился с авторефератом С.С. Бочкаревой. Поскольку с некоторыми аспектами исследования мне захотелось ознакомиться более детально, я обратился также к полному тексту диссертации, загруженному с сайта диссертационного совета 20 февраля 2023 г., в котором мной были изучены разделы разделами «Материалы и методы исследования» и «Результаты собственных исследований», поэтому в данном отзыве при рассмотрении упомянутых разделов, мои комментарии относятся к полному тексту работы.

Актуальность проведенного исследования не вызывает сомнений, поскольку проблема повсеместного распространения резистентных к антибиотикам патогенных бактерий носит глобальный характер и является серьезной проблемой здравоохранения во многих регионах мира. На сегодняшний день фаговая терапия (ФТ) является практически единственной альтернативой антибактериальной химиотерапии, которая уже на существующем этапе своего развития может применяться в клинике для борьбы с микроорганизмами, имеющими множественную лекарственную устойчивость.

В виду того, что большинству бактериофагов присущ сравнительно узкий (если оценивать его по активности против штаммов патогенов,

достоверно различающихся по поверхностным структурам клеток, присутствующим антивирусным системам и другим биологическим свойствам) спектр литической активности, приготовление универсальных фаговых препаратов, сопоставимых по широте своего действия с антибиотиками, встречает ряд серьезных технических и экономических затруднений. Кроме того, имеющиеся на рынке РФ фаговые препараты характеризуются нестабильностью состава и активности (причины чего подробно рассмотрены в автореферате С.С. Бочкаревой), что увеличивает число ошибок при их выборе. Все эти факторы позволяют считать, что наиболее эффективным подходом к ФТ является индивидуализированная терапия, при которой используются фаговые препараты, содержащие относительно небольшое количество штаммов бактериофагов, подбираемых в соответствии со свойствами штамма возбудителя, полученного от данного конкретного пациента. Именно в этой парадигме выстроено диссертационное исследование С.С. Бочкаревой.

Не вызывает сомнений и практическая значимость работы. Фактически проведенное исследование является, насколько мне известно, первым в постсоветской России достаточно масштабным опытом применения индивидуализированной ФТ против мультирезистентных возбудителей, рефрактерных к стандартной химиотерапии, методы результаты которого достаточно полно задокументированы. Более того, несомненным достоинством работы является включение в алгоритм индивидуализированной ФТ тестирования статуса антифагового иммунного ответа (антител) как одного из факторов, который целесообразно учитывать при подборе фаговых штаммов для индивидуального коктейля. Интересным решением было также дополнить в рамках исследования анализ исходов фаговой терапии достаточно детальным изучением иммунного статуса пациентов. Очень интересным представляется результат об активации фагоспецифичного Т-клеточного ответа. Очевидно, что детальное исследование механизмов этого эффекта выходит за рамки задач данного

диссертационного исследования, однако автор высказывает логичное предположение, что эта активация может иметь место в качестве некоторого побочного эффекта активации многочисленных цитокиновых путей сигналинга. Это предположение выглядит логично, однако полученный результат открывает новое направление возможных исследований. Так, может, например, оказаться, что часть фага каким-то образом попадает в цитозоль клеток и соответствующие антигены оказываются представлены на молекулах МНС I. Разработка открытого автором явления может оказаться полезной для создания вакцин и иных иммунобиологических препаратов на основе бактериофагов или фагоподобных частиц.

При большом разнообразии использованных методов работу характеризует также огромный объем проведенных исследований, который помимо работы с более, чем 160 пациентами, включает также детальную характеристику использованных бактериофагов, получение и исследование лекарственных форм, а также работу по подготовке различной документации, связанной с проведением исследований в клинике.

Наряду с отмеченными достоинствами, к диссертационной работе С.С. Бочкаревой у меня возник ряд вопросов и замечаний. В тексте довольно много стилистических неточностей, а также, из-за большего объема представленного в таблицах и графиках материала, не везде присутствуют четкие описания использованных в них параметров. Поэтому в ряде случаев требуются существенные усилия, чтобы понять, что именно означают цифры в таблицах и на графиках, и как они были получены. Вся информация, необходимая для понимания непосредственного смысла иллюстраций должна, где это возможно, включаться в легенды таблиц и рисунков.

Полученные автором результаты требуют более подробного теоретического обсуждения и в ряде случаев продолжения начатых экспериментальных исследований для более глубокого осмысления наблюдаемых явлений. Поставив себе задачу разработки алгоритмов

персонализированной ФТ, автор, нацелившись на практическую клиническую составляющую диссертации не везде останавливается на теоретических аспектах проведенного исследования.

В работе в явном виде не приведен размер коллекции бактериофагов, использованных при проведении КИ, в связи с чем возник ряд вопросов, (см. ниже).

Выбранный план клинического исследования является, по-видимому, некоторым компромиссом между желанием продемонстрировать в действии концепцию индивидуализированной ФТ, в которой обычно приходится работать с разнородными случаями, и желанием проанализировать результаты путем сравнения опытной и контрольной групп. В результате не только фаги, но и пути введения и используемые дозы, существенным образом варьировали между пациентами. Было бы целесообразно сделать общественным достоянием все первичные данные этого исследования, поскольку обобщенные цифры не в полной мере позволяют оценить значение полученных результатов. Также предлагаю диссертанту при проведении дальнейших клинических исследований рассмотреть возможность использования в контрольной группе плацебо (а в идеале – контроля с инактивированным фагом или фагом, заведомо не активным против возбудителя, присутствующего у пациента).

Ниже приведены конкретные вопросы к диссертанту, возникшие в процессе ознакомления с авторефератом и полным текстом диссертационного исследования:

1) Почему использованы разные подходы к оценки чувствительности или устойчивости штаммов исходных панелей к выбранным бактериофагам: где-то по наличию пятна лизиса при нанесении концентрированного лизата (этот метод часто приводит к ошибкам), где-то по образованию бляшек или пятна при разведении более 1/100 (т.е. эффективности посева примерно 1/1000 – 1)?

2) Как диссертант интерпретирует результат в Табл. 3.2 диссертации (образование мутных пятен при нанесении концентрированного лизата фага на ряд штаммов без формирования бляшек при раститровке)?

3) Раздел 3.1.5 диссертации. Используемый тест определяет не частоту возникновения фагоустойчивых мутантов, а их долю в исследуемой бактериальной культуре. В классической работе Luria & Delbruck 1943 показано, что их количество может существенно различаться в параллельных культурах. Проводилось ли исследование независимых параллельных культур?

4) Раздел 3.1.6 Определение процента адсорбции фага не имеет большого смысла так как он зависит от плотности культуры бактерий. Рассчитывала ли автор константу адсорбции (если речь идет о характеристике фаговых штаммов)?

5) Стр. 139. Необходимо представить пояснение по соотношению посевных доз фагов и бактерий: в соответствии с описанием к моменту посева фага культуру подращивают 3,5 ч, и количество клеток, образовавшихся к этому моменту, отличается от исходного.

6) Стр. 140, а также раздел 3.5. Поскольку работа направлена на создание более-менее универсальных алгоритмов ФТ, то отказ от стабилизации препарата требует пояснения. Возможно, подробно описанны в работе 8 фагов действительно стабильны в физ. растворе в течение 24 мес, однако так ли это так для более широкого набора фагов? Мне известно достаточно много примеров, когда стабильность фага резко сокращается в физ. растворе по сравнению с исходным лизатом.

7) Раздел 4.4. Очевидно, что у мыши максимальная концентрация в крови была достигнута быстрее, чем за 1 час. Проводились ли эксперименты по исследованию крови на более ранних сроках? Интересно, что по сравнению с другими фагами, фармакокинетика которых исследовалась на мышах, у этого вируса наблюдается исключительно быстрый секвестр в лимфоидных органах. Проводилось ли автором сравнение с аналогичными данными по другим фагам?

Дополнительно хотелось бы уточнить, сопоставлялись ли результаты исследования фармакокинетики и результаты анализа профилактического и лечебного действия фагов?

8) Таблица 4.3. Следовало бы привести доверительные интервалы, с учетом использования 6 мышей на каждую точку?

9) Стр 141. ЛФ для инъекционного введения получали с помощью очистки в градиенте хлористого цезия. Проводился ли диссертантом контроль активности после данной процедуры, так как большинство фагов теряют как минимум 1-2 порядка титра при такой очистке?

10) Стр. 199 Из фразы «Лекарственные препараты назначались перорально, внутривенно, местно, вводились непосредственно в очаг воспаления.» можно предположить, что во всех случаях использовали ЛФ для перорального и местного применения. В таком случае, зачем была изготовлена и как применялась в работе инъекционная форма?

11) На той же странице имеется фраза: «Изучали фармакокинетику лекарственной формы бактериофагов с коктейлем KpV15, KpV811, PA5, PA10, AM24, AP22, SCH1 и SCH111 на ограниченном количестве пациентов после пятидневного курса фаготерапии при пероральном введении, образцы

биологического материала (эндотрахиальный аспират (ЭТА), моча, кал) отбирали через 24 ч после последнего приема препарата (таблица 5.1).», по которой возникли следующие вопросы:

- Почему исследование проводили на пациентах, у которых заведомо присутствовали бактерии, чувствительные к используемым фагам?
- Образцы каждого пациента исследовались на все 8 фагов. Означает ли это, что данные больные получили коктейль, содержащий все эти вирусы независимо от возбудителя инфекции в каждом конкретном случае?
- Как соотносится обнаружение отдельных фагов в образцах (таблица 5.1) с наличием у пациента чувствительных к этим конкретным фагам патогенов в начале терапии?
- Почему образцы отбирали только через 24 часа после 5-дневного приема препарата?
- Зачем используются как минимум два различных способа оценки активности фагов (полуколичественный спот-тест и титрование), что нецелесообразно при исследовании фармакокинетики?
- автор указывает, что «Из результатов, представленных в таблице 5.1 видно, что при пероральном приеме коктейля бактериофагов, все штаммы попадают в кровеносную систему через стенку кишечника, и через 24 ч после последнего приема индивидуальные штаммы бактериофагов обнаруживаются в моче, эндотрахеальном аспирате и кале пациентов». С учетом того, что гипотеза о воспроизводимом и эффективном проникновении фагов этим путем противоречит большей части опубликованных данных (см, например, систематический обзор Dabrowska 2019, PMID: 30887551 и обзор Dabrowska and Abedon 2019 PMID: 31666296) как диссертант может пояснить полученные на исследованной когорте пациентов ОРИТ результаты?

12) Стр. 200. Почему автор считает оптимальным для ФТ подбор дозы фага, исходя из численного отношения количества бактериофагов к титру клеток, (вероятно, имеется в виду не титр, а общее количество клеток), если на

основании существующей теории взаимодействия фаг-бактерии (см. обзор Dabrowska and Abedon 2019 PMID: 31666296) предсказывается важность скорее концентрации фага, нежели соотношения числа фаговых частиц и бактериальных клеток? Дополнительно хотелось бы уточнить, почему автор считает возможным падение титра фага по достижении очага инфекции всего лишь на 2 порядка в сравнении с титром препарата, если данные литературы (см. приведенный выше обзор) указывают на гораздо большее падение за исключением некоторых случаев местного применения?

13) Раздел 5.3. Чем автор может пояснить представленный в исследовании высокий уровень эффективности применения ФТ в сравнении с рядом тщательно задокументированных случаев, описанных в недавней литературе, где требовались гораздо более длительные терапевтические мероприятия относительно применявшихся диссертантом 5-дневных курсов приема *per os* в сочетании с местным применением, или без такового?

14) Как автор может прокомментировать разнородность клинических случаев, включенных в опытную и в контрольную группу и отражается ли это по мнению диссертанта на полученных результатах статистической обработки данных?

15) Планируется ли автором публикация описания всех 160 пациентов в открытой базе данных, например, в качестве Supplementary material в каком-либо журнале?

16) Описание клинического исследования в начале раздела упоминает о включении пациентов только с тремя возбудителями (*P. aeruginosa*, *A. baumannii*, *K. pneumonia*), но не с *S. aureus*. Тем не менее, последний возбудитель присутствует в других разделах работы, где упоминаются

пациенты, и в описании отдельных клинических случаев. Какие возбудители ИСМП рассматривались в клиническом исследовании?

17) Разделы 6.1 и 6.2. В целом полученные данные о формировании антительного ответа представляются логичными и достоверными, при этом есть несколько уточняющих вопросов:

- К каким фагам определялись антитела у каждого конкретного пациента в таблице 6.4. «Штаммоспецифичность IgG-антител к бактериофагам»?

- Заголовки и кодировка таблицы 6. приведенные в ней не понятны. Пожалуйста поясните приведенные .

18) Обнаружена ли по результатам проведенных исследований корреляция между присутствием антифаговых антител и снижением эффективности ФТ?

19) Каким именно бактериофагом в Разделе 6.3.1. автор проводила стимуляцию выделенных моноклеаров?

Заключение

Несмотря на перечисленные выше замечания и заданные вопросы, результаты диссертационной работы Бочкаревой С.С. можно квалифицировать как техническое или технологическое решение, вносящее существенный вклад в развитие страны, что подтверждается тем, что концепция персонализированной фаготерапии легла в основу Методических рекомендации (№105) «Персонализированная фаготерапия пациентов, страдающих инфекциями, связанными с оказанием медицинской помощи (ИСМП)» и патента РФ №2664681 «Способ лечения инфекции, связанной с оказанием медицинской помощи, вызванной возбудителем или возбудителями с МЛУ». Таким образом диссертация Бочкаревой Светланы Сергеевны на тему: «Конструирование препаратов бактериофагов и клинко-иммунологические аспекты фаготерапии и фагопрофилактики инфекций,

связанных с оказанием медицинской помощи», представленная на соискание ученой степени доктора биологических наук по специальности 1.5.6. Биотехнология, по актуальности, новизне, теоретической и практической значимости, объему проведенных исследований соответствует требованиям п.9 «Положения о присуждении ученых степеней», утвержденного постановлением Правительства Российской Федерации № 842 от 24 сентября 2013 года (с изменениями в редакции постановлений Правительства Российской Федерации № 335 от 21.04.2016, №748 от 02.08.2016, №650 от 29.05.2017, №1024 от 28.08.2017, №1168 от 01.10.2018, № 751 от 26.05.2020, №426 от 20.03.2021, № 1539 от 11.09.2021 «О внесении изменений в Положение о присуждении ученых степеней»), предъявляемым к диссертациям на соискание ученой степени доктора биологических наук, а ее автор, Бочкарева Светлана Сергеевна, заслуживает присуждения ученой степени доктора биологических наук по специальности 1.5.6. Биотехнология.

Заведующий лабораторией
вирусов микроорганизмов Института микробиологии им. С.Н. Виноградского
ФИЦ Биотехнологии РАН,
профессор кафедры вирусологии МГУ им. М.В. Ломоносова,
доктор биологических наук,

Летаров Андрей Викторович

Подпись Летарова А.В. заверяю

« 06 » 03

2023 г.

Адрес организации: 119071 Российская Федерация, г. Москва, Ленинский проспект, дом 33, строение 2; Телефон: + 7 (495) 954-52-83; Email: info@fbras.ru

