ФЕДЕРАЛЬНОЕ
ГОСУДАРСТВЕННОЕ
БЮДЖЕТНОЕ ОБРАЗОВАТЕЛЬНОЕ УЧРЕЖДЕНИЕ ВЫСШЕГО ОБРАЗОВАНИЯ "КЕМЕРОВСКИЙ ГОСУДАРСТВЕННЫЙ МЕДИЦИНСКИЙ УНИВЕРСИТЕТ" МИНИСТЕРСТВА ЗДРАВООХРАНЕНИЯ РОССИЙСКОЙ ФЕДЕРАЦИИ
ИНН 4206007720/КПП 420501001
ОГРН 1024200713514
ОКПО 01963077 ОКТМО 32701000001
650056, Кемеровская Область - Кузбасс область, город Кемерово, улица Ворошилова, 22 а
тел. 8 (3842) 73-48-56, факс 8 (3842) 73-48-56
E-mail: kemsma@kemsma.ru
_____№ _____

_____от_____

ОТЗЫВ

официального оппонента д.м.н., профессора, члена-корреспондента РАН **Брусиной Елены Борисовны,** заведующей кафедрой эпидемиологии, инфекционных болезней и дерматовенерологии ФГБОУ ВО «Кемеровский государственный медицинский университет» Министерства здравоохранения Российской Федерации о 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

Актуальность темы диссертационного исследования

Инфекции, связанные с оказанием медицинской помощи (ИСМП), в силу широкого распространения, негативных последствий для здоровья пациентов, персонала и экономики государства представляют собой мультидисциплинарную проблему, актуальность которой не снижается на протяжении десятилетий. Ни один тип медицинских учреждений ни в одной стране не может претендовать на то, чтобы быть свободным от риска возникновения ИСМП. В зависимости от типа

отделений, исходной тяжести состояния пациентов, уровня агрессии применяемых медицинских технологий и степени внедрения эффективных эпидемиологических мер частота ИСМП колеблется от 0,1 до 290 на 1000 пациентов. На пути преодоления проблемы ИСМП к настоящему времени достигнуты определенные успехи. Однако особую сложность представляют ИСМП, обусловленные формированием госпитального клона (штамма) в результате адаптации определенного микроорганизма к конкретным госпитальным условиям, в процессе которой он приобретает свойства, значительно повышающие его конкурентные преимущества. Характер приобретаемых микроорганизмом свойств определяется межмикробными взаимодействиями, применяемыми антимикробными препаратами, особенностями популяции пациентов, медицинского персонала, комплексом профилактических и противоэпидемических мер, и может существенно варьировать. Госпитальные клоны часто характеризуются множественной резистентностью к антимикробным средствам, что определяет трудности лечения и нежелательные исходы болезни. Одним из перспективных направлений в борьбе с ИСМП являются бактериофаги. Несмотря на убедительно обоснованную эффективность применения бактериофагов рядом исследователей, остается неизученным влияние гуморального и клеточного иммунного ответа на эффективность фаготерапии, безопасность коктейлей бактериофагов, целый ряд аспектов разработка технологии получения универсального состава лекарственной формы, включающего необходимый набор вспомогательных компонентов, для конструирования препаратов на основе коктейлей бактериофагов различного штаммового состава. С этих позиций диссертационное исследование Бочкаревой Светланы Сергеевны является безусловно актуальным и своевременным.

Степень обоснованности научных положений, выводов и рекомендаций

В ходе выполнения работы был применен комплекс современных и

оригинальных методов и способов сбора, описания и анализа данных. При проведении экспериментальной работы использовано сертифицированное современное оборудование и сертифицированные методики исследований. Степень достоверности полученных результатов обусловлена системным подходом с применением современных бактериологических, иммунохимических, молекулярно-генетических и статистических методов, обширностью и разнообразием репрезентативного материала, включающего экспериментальные доклинические исследования на животных и клиническое открытое рандомизированное контролируемое исследование в параллельных группах с участием 160 взрослых пациентов. Сформулированные в диссертации положения, выносимые на защиту, выводы и рекомендации аргументированы, логически вытекают из системного анализа значительного объема материала и результатов выполненных разноплановых исследований и подтверждены фактическим материалом, широким обсуждением результатов и положений на различных научных форумах и публикациями в рецензируемых журналах.

Научная новизна

Автором впервые получены индивидуальные фармакокинетические и иммунологические характеристики бактериофагов: KpV15, KpV811, PA5, PA10, AM24, AP22, SCH1 и SCH111, депонированные в Государственную коллекцию патогенных микроорганизмов и клеточных культур «ГКПМ-Оболенск». Для бактериофагов были проведены молекулярно-генетические исследования с определением полной нуклеотидной последовательности геномов бактериофагов и последующим биоинфарматическим анализом. Разработаны универсальные составы лекарственных форм на основе коктейля бактериофагов для различных путей введения, включающие необходимый набор вспомогательных компонентов, и технология их пилотного производства. Изучена фармакокинетика бактериофагов, а также терапевтическая эффективность разработанных препаратов на примере клебсиеллёзного бактериофага KpV15.

Впервые сконструированы и клинически апробированы иммуноферментные тест-системы для определения IgG-антител к изучаемым бактериофагам. Изучены параметры гуморального и клеточного иммунитета больных на фоне фаготерапии; исследованы уровни IgG-антител к изучаемым бактериофагам и оценено их влияние на эффективность фаготерапии. Показана высокая микробиологическая эффективность использования разработанного алгоритма персонализированного подбора бактериофагов для лечения пациентов, страдающих ИСМП.

Теоретическая и практическая значимость

Теоретическая и практическая значимость определяется тем, что автором создана обоснованная концепция индивидуализированного подбора на примере 8 бактериофагов для эффективной терапии постоянно рецидивирующих, вызванных условно-патогенными микроорганизмами, инфекций, связанных с оказанием медицинской помощи, особенно вызванных возбудителями с множественной лекарственной устойчивостью. Концепция учитывает многофакторные аспекты взаимодействия фага как с бактерией-мишенью, так и с макроорганизмом. Получены лекарственные препараты на основе оригинальных вирулентных бактериофагов, эффективных в отношении ведущих возбудителей инфекций (*Pseudomonas aeruginosa, Klebsiella pneumoniae, Staphylococcus aureus и Acinetobacter baumannii*), связанных с оказанием медицинской помощи. В результате проведенных исследований разработаны универсальные составы лекарственных форм на основе коктейлей бактериофагов, включающие необходимый набор вспомогательных компонентов для конструирования фаговых препаратов различного штаммового состава. Разработаны спецификации на лекарственные формы и лабораторные регламенты. Сконструирована линейка иммуноферментных тест-систем, предназначенных для определения в образцах сыворотки крови пациентов IgG антител к полученным и использованным в ходе работы бактериофагам. Сформулированы основные принципы оценки

эффективности фаготерапии пациентов, страдающих ИСМП, с учетом гуморального иммунного ответа на бактериофаг.

Оценка содержания диссертации, ее завершенности, подтверждение публикаций автора

Текст диссертации написан в классическом стиле, изложен на 350 страницах, иллюстрирован 71 рисунком и 69 таблицами, состоит из введения, шести глав, выводов, списка литературы и приложений. Список литературы включает 240 источников, в том числе 51 отечественных и 189 иностранных. Автором диссертации процитированы все ключевые исследования по биотехнологии и применению бактериофагов для лечебных целей. Работа изложена последовательно, логично, написана хорошим научным языком.

В **первой главе** содержится исчерпывающий анализ отечественной и зарубежной литературы, отражающий современное состояние проблемы инфекций, связанных с оказанием медицинской помощи, клинические и эпидемиологические особенности этой группы инфекций и концептуальные подходы к профилактике и лечению ИСМП. Представлена подробная характеристика бактериофагов, как лекарственных средств. Автор приводит данные динамики количества публикаций, посвященных применению бактериофагов для терапии инфекционных заболеваний, свидетельствующие о возрастающем интересе к перспективам их применения, рассматривает как исторические, так и современные аспекты проблемы. Отдельные разделы посвящены анализу современных разработок в области создания лекарственных форм бактериофагов, нормированию, методам получения и оценки качества препаратов бактериофагов, клиническим и иммунологическим аспектам. Критический обзор опубликованных результатов исследований завершается заключением о перспективности персонализированного подхода к лечению инфекционных заболеваний бактериофагами и обоснованием необходимости разработки принципов и методологии персонализированной фаготерапии,

изучения иммунологических аспектов применения бактериофагов в клинической практике.

Во **второй главе** «Материалы и методы» подробно описана методология исследований и материалы, использованные автором для решения поставленных в исследовании задач. Несомненным достоинством является скрупулезное, исчерпывающее описание методов получения и изучения бактериофагов , в том числе методов выделения бактериофагов из клинического материала, оценки спектра литической активности бактериофагов, выявления лизогенных штаммов бактерий, определения частоты возникновения фагорезистентных бактериальных мутантов, подготовки штаммов бактериофагов и бактериальных культур к лиофильному высушиванию, получения бактериофагов для производства экспериментальных серий лекарственных форм, выделения и рестрикционного анализа ДНК бактериофагов, секвенирования ДНК бактериофагов, подготовки геномных библиотек и др. Не менее подробно описаны методы контроля качества лекарственных препаратов бактериофагов и методы доклинических исследований на животных, методы клинических и иммунологических исследований, статистическая обработка данных, в полном объеме освещены этические аспекты проведения исследований. Вместе с тем, было бы правильно привести более подробную характеристику пациентов, участвующих в клиническом исследовании.

В **третьей** главе «Разработка ЛФ бактериофагов» изложена технология получения бактериофагов, создание коллекции производственно-перспективных штаммов бактериофагов, активных в отношении *Staphylococcus aureus, Pseudomonas aeruginosa, Klebsiella pneumoniae и Acinetobacter baumannii*. Автором наработано восемь бактериофагов: KpV15, KpV811, PA5, PA10, AM24, AP22, SCH1 и SCH111, активных в отношении бактерий, вызывающих ИСМП и обладающих множественной лекарственной устойчивостью. Показано, что данные бактериофаги являются производственно перспективными штаммами, так как имеют широкий спектр литической активности в отношении гомологичных бактериальных штаммов, высокую урожайность, устойчивы к температурным

воздействиям и действию хлороформа. На основе изучения молекулярно-генетических свойств бактериофагов автор доказательно обосновывает, что бактериофаги KpV15, KpV811, PA5, PA10, AM24, AP22, SCH1 и SCH111 – вирулентны, оригинальны и генетически безопасны, их ДНК не содержат нежелательных генов. В главе подробно описана технология получения лекарственных форм для включения в их состав коктейлей бактериофагов различного штаммового состава, в том числе раствор для приема внутрь и местного применения и инъекционный раствор. Разработаны спецификации на лекарственные формы, нормативные документы и лабораторные регламенты, подтверждена стабильность полученных препаратов. Все это отражает фундаментальность выполненного исследования и ее большое практическое значение.

В **четвертой главе** «Доклинические исследования ЛФ бактериофагов» приведены результаты оценки острой и хронической токсичности лекарственных препаратов бактериофагов, местного действия, изучение фармакокинетики, профилактической и лечебной эффективности на модели летальной клебсиеллёзной инфекции у белых беспородных мышей. Все экспериментальные исследования соответствуют требованиям, предъявляемым к изучению лекарственных форм, убедительно аргументированы и подтверждены фактическими данными.

В **пятой главе** «Разработка персонализированной фаготерапии пациентов, страдающих ИСМП», автор подробно обсуждает принципы и алгоритм проведения персонализированной фаготерапии, оценивает ее эффективность у пациентов. В главе имеются некоторые неточности, так, на стр. 207 указано: «применение бактериофагов эффективно в борьбе с патогенной микрофлорой у пациентов ОРИТ», что не совсем корректно, так как изучаемые микроорганизмы относятся к условно-патогенным.

В **шестой главе** «Изучение иммунологических аспектов персонализированной фаготерапии пациентов, страдающих ИСМП» рассмотрено конструирование иммуноферментных тест-систем для определения IgG-антител,

специфичных в отношении штаммов изучаемых бактериофагов, определение антифагового иммунного ответа у больных на фоне фаготерапии, изучаются параметры клеточного иммунитета больных на фоне фаготерапии. Автор убедительно обосновывает ответ на ключевой вопрос эффективности фаготерапии и приходит к важнейшему заключению о том, что первичная фаготерапия характеризуется выраженным клиническим эффектом у обследуемого контингента больных и санации исходно инфицированных возбудителями ИСМП локусов. Однако повторный курс терапии тем же штаммом фага уже не дает удовлетворительного эффекта, в этот период в крови больных обязательно присутствуют соответствующие антитела, что подтверждает необходимость детекции соответствующих антител в крови больных для коррекции штаммового состава препаратов при проведении повторных курсов фаготерапии.

В заключении обсуждены результаты, выводы, практические рекомендации и перспективы дальнейшей разработки темы исследования.

Сформулированные в диссертации положения, выводы и практические рекомендации логически вытекают из анализа значительного объёма представленного материала и результатов выполненных разноплановых исследований, полностью отражают основные результаты проведенного исследования и соответствуют поставленным задачам. По изложенному в диссертации материалу, она соответствует п.п. 1, 8 паспорта научной специальности 1.5.6. Биотехнология.

По материалам диссертационного исследования опубликовано 45 научных работ, 12 из которых в изданиях, рекомендованных ВАК РФ, в том числе 10 – в журналах, индексируемых международными базами данных, 10 статей в других изданиях, 1 – глава в монографии, 20 – в материалах конференций и конгрессов, 1 – методические указания, 1 – патент. Автореферат и публикационные работы в полной мере отражают содержание диссертации.

Замечания по работе

Принципиальных замечаний по диссертации Светланы Сергеевны Бочкаревой нет, однако необходимо уточнить следующие вопросы:

1. Смена возбудителя при фаготерапии – свидетельство ее эффективности или негативное следствие, выражающееся в создании условий для инфицирования другим возбудителем?
2. В чем автор видит возможные проблемы, негативные стороны изложенного в диссертации подхода и каковы пути их преодоления?
3. Были ли у пациентов инфекции, вызванные гипервирулентными клебсиеллами, и если да, то какова эффективность их фаготерапии, в сравнении с клебсиеллезными инфекциями без признаков гипервирулентности?

Заключение

Диссертация Бочкаревой Светланы Сергеевны на тему: «Конструирование препаратов бактериофагов и клинико-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, является научно-квалификационной работой, в которой, на основании выполненных автором исследований, разработаны теоретические положения концепции индивидуализированного подбора бактериофагов для эффективной терапии постоянно рецидивирующих, вызванных условно-патогенными микроорганизмами, инфекций, связанных с оказанием медицинской помощи, совокупность которых можно квалифицировать как решение крупной научной проблемы разработки лекарственных средств лечения тяжелых инфекций, имеющей важное значение для биотехнологии и медицины.

Диссертация полностью соответствует требованиям «Положения о присуждении ученых степеней», утвержденного постановлением Правительства

Российской Федерации от 24 сентября 2013 г. N 842 (в редакции постановлений Правительства РФ от 30.07.2014 г. № 723, от 21.04.2016 г. № 335, от 02.08.2016 г. № 748, от 29.05.2017 г. № 650, от 28.08.2017 г. № 1024, от 01.10.2018 г. № 1168, от 20.03.2021 г. № 426, от 11.09.2021 г. № 1539), предъявляемым к диссертациям на соискание ученой степени доктора наук, а сама автор, Бочкарева Светлана Сергеевна, по совокупности представленных ею материалов, актуальности темы выполненной диссертации, научно-практической значимости, ценности полученных результатов и личному вкладу, достойна присуждения ученой степени доктора биологических наук по специальности 1.5.6. Биотехнология.

Официальный оппонент:
член-корреспондент РАН, доктор медицинских наук, профессор, заведующий кафедрой кафедра эпидемиологии, инфекционных болезней и дерматовенерологии федерального государственного бюджетного образовательного учреждения высшего образования «Кемеровский государственный медицинский университет»» Министерства здравоохранения Российской Федерации (3.2.2. Эпидемиология) Брусина Елена Борисовна

«21» февраля 2023 года

Подпись члена-корреспондента РАН,
д.м.н., профессора Е.Б. Брусиной заверяю:
Ученый секретарь Ученого совета
ФГБОУ ВО КемГМУ
Минздрава России,
доктор медицинских наук, доцент Кувшинов Дмитрий Юрьевич

650056, Кемеровская область, город Кемерово, улица Ворошилова, 22 а,
Тел.+7(3842)73-48-56,
E-mail: brusina@mail.ru