

ОТЗЫВ

**официального оппонента, доктора биологических наук, профессора
Пименова Николая Васильевича
на диссертацию Бочкаревой Светланы Сергеевны на тему:
«Конструирование препаратов бактериофагов и клинико-
иммунологические аспекты фаготерапии и фагопрофилактики
инфекций, связанных с оказанием медицинской помощи»,
представленную на соискание ученой степени доктора биологических
наук по специальности 1.5.6. Биотехнология**

Актуальность избранной темы

Глобальная угроза человечеству – распространение антибиотикорезистентности циркулирующих бактериальных патогенов, определяет насущным поиск новых решений для борьбы с инфектом и переориентирования лечебных подходов.

Наиболее остро проблема антибиотикорезистентности стоит для лечения инфекций, связанных с оказанием медицинской помощи (ИСМП): осложнения при интенсивной терапии, после ожогов, травм, на фоне онкологических патологий, при острых вирусных инфекциях респираторного и пищеварительного аппаратов, что, несомненно, имеет широкое распространение и большое значение, особенно на фоне формирования «госпитальных штаммов». Такие микроорганизмы приобретают измененные биологические свойства – более высокую вирулентность, устойчивость к факторам внешней среды и антибиотикам.

В приведенных аспектах тема диссертационного исследования С.С. Бочкаревой, целью которого являлась разработка алгоритма применения бактериофагов против патогенов ИСМП как альтернативного решения антибиотикам, оценка эффективности фаготерапии и иммунореактивности на фоне применения бактериофагов, является несомненно актуальной.

Степень обоснованности научных положений, выводов и рекомендаций, сформулированных в диссертации

Научные положения, выносимые на защиту, сделанные выводы и рекомендации по развитию представленных исследований Бочкаревой С.С. базируются на организованной методологической основе и структурированной концепции, разработанной на основе широкого анализа (в т.ч. ретроспектив-

ного) и синтеза зарубежных и отечественных исследовательских данных с учётом современных принципов научного познания, фундаментальных и поисковых научных подходов.

Обоснованность научных положений и выводов не вызывает сомнения, т.к. обеспечена контролируемостью и воспроизводимостью результатов, достаточным объёмом референсных групп, грамотно выстроенной последовательностью реализуемых задач и подбором методов исследования: как классических, так и современных. Методология исследования организована адекватно поставленной цели. Полученные данные, представленные в диссертационной работе, определяют характер выводов и позволяют судить об их обоснованности.

При выполнении научной работы соискателем подготовлен лабораторный регламент, описывающий технологию производства препаратов, содержащих различные варианты коктейлей бактериофагов. Обоснованность выводов и рекомендаций также подтверждается тем, что разработанная технология прошла успешную апробацию при выпуске валидационных серий, обеспеченную соответствием показателей качества произведенных готовых лекарственных форм нормативной документации, при этом технологические характеристики экспериментальных образцов изучали согласно требованиям мировых фармакопей.

Достоверность и новизна исследования, полученных результатов, выводов и рекомендаций, сформулированных в диссертации

Достоверность диссертационных исследований С.С. Бочкаревой обеспечена достаточным объемом материала, в том числе экспериментального, адекватно поставленным задачам. Новизна исследований и полученных данных очевидна из системного развития актуальной научной проблемы в процессе решения поставленных задач. Получены новые знания в области биологических свойств бактериофагов, иммунологии при фаготерапии, охарактеризованы и депонированы новые штаммы-кандидаты, раскрыта фармакокинетика препаративных прототипов, оценена их эффективность в доклинических и клинических испытаниях, а также впервые сконструированы и клинически апробированы иммуноферментные тест-системы для определения IgG-антител к изучаемым бактериофагам.

В исследовании использованы системный подход и специальные сертифицированные методы, включающие ретроспективный анализ, микробиологические, молекулярно-генетические, иммунологические, биоинформационные, химиофармацевтические и статистические методы, что, вместе с объемом выборки, обеспечило достоверность полученных результатов. Материалы диссертационной работы Бочкаревой С.С. прошли широкую апробацию и экспертную оценку.

Личный вклад автора на основании представленных данных в полной мере соответствует требованиям обозначенному статусу соискателя научной степени доктора наук. Материалы работы отражают авторскую концепцию, непосредственное участие Светланы Сергеевны Бочкаревой в разработке лекарственных форм бактериофагов и их изучении, в разработке иммуноферментных тест-систем, в изучении гуморального и клеточного иммунитета больных на фоне фаготерапии. Документация для проведения инициативного научного исследования (протокол инициативного научного исследования, индивидуальная регистрационная карта, информация для пациента и форма информированного согласия), утвержденная Этическим комитетом, подтверждает личный вклад автора.

Значимость для науки и практики полученных автором результатов

Результаты диссертационной работы Бочкаревой С.С. имеют существенное значение для науки и практики, поскольку не только расширяют представления о биологических свойствах микроорганизмов, но и позволяют определить приоритеты в терапевтической тактике при ИСМП. Научное обоснование концепции индивидуализированного подбора бактериофагов для эффективной терапии инфекций, вызванных убиквитарными патогенами-оппортунистами, с учётом многофакторности взаимодействия «фаг-бактерия», «фаг-макроорганизм» определяет теоретическую и практическую значимость представленной работы.

Автором заложены основа совершенствования оказания медицинской помощи при ИСМП и конкретное её воплощение в виде лекарственных препаратов на основе вирулентных бактериофагов, выделенных и изученных соискателем. Принципиально новым подходом является формирование универ-

сальных лекарственных средств на основе фаговых коктейлей для разных способов приёма. Разработаны спецификации на лекарственные формы и лабораторные регламенты.

Кроме того, полученные новые знания в области иммунотропных реакций при фаготерапии, позволяют персонифицированно оценивать её эффективность, а сконструированные иммуноферментные тест-системы – внедрять в практику.

Содержание диссертации, ее завершенность

Диссертационная работа Светланы Сергеевны Бочкаревой построена по традиционному плану и состоит из введения, обзора литературы, материалов и методов исследования, результатов собственных исследований, выводов, перспектив дальнейшей разработки темы и рекомендаций по использованию результатов диссертационного исследования, списка сокращений, списка литературы, благодарностей. Цифровые и иллюстративные данные подробно представлены в 69 таблицах и на 71 рисунке. Их достоверность подтверждается статистическими расчётами с применением адекватных задачам методов.

Содержание диссертации позволяет получить полное представление о современном состоянии изучаемой проблемы, о целях и задачах исследования. Введение и обзор литературы ориентируют в основных проблемных вопросах поднятой темы. В литературном обзоре, построенном на достаточном количестве источников (51 отечественных и 189 иностранных), представлены данные по ИСМП и бактериофагам как средствам лечения, которые полноценно отражают состояние изученности вопроса и обосновывают необходимость исследований.

Описание объектов исследования, материалов и методов, применяемых при выполнении диссертационной работы, представлено в полном объеме, выполнено методически грамотно. Результаты исследований отражены в трех главах работы. Первая из них касается наработки коллекции производственно-перспективных штаммов бактериофагов, активных в отношении *Staphylococcus aureus*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Klebsiella pneumoniae* и *Acinetobacter baumannii*, их молекулярно-генетической

характеристике и, собственно, разработке состава и технологии лекарственных средств на их основе.

Следующие главы посвящены доклиническим исследованиям лекарственных форм бактериофагов и разработке персонализированной фаготерапии пациентов, страдающих ИСМП. Представление результатов собственных исследований включает глава, посвященная изучению иммунологических аспектов персонализированной фаготерапии пациентов, страдающих ИСМП. Каждый раздел собственных исследований содержит элементы обсуждения полученных результатов и завершается кратким заключением по разделу. Общее заключение по работе представляет предметный анализ и подводит к сделанным выводам. Анализируя представленные результаты, следует отметить, что объем выполненных исследований – достаточен для решения поставленных задач.

Диссертация носит завершённый характер. Изложение материала – грамотное, оформление работы – качественное. Автореферат отражает основные материалы диссертации, однако в нём следовало бы привести рекомендации по использованию результатов диссертационного исследования.

Вопросы и замечания.

Положительно оценивая работу в целом, подчеркивая ее новизну и значимость для науки и практики, хотелось бы в дискуссионном порядке получить ответы диссертанта на следующие вопросы уточняющего характера:

1. Как автор объясняет невысокую урожайность клебсиеллезных фагов, и как это учитывается в технологии прототипа комбинированного средства?

2. Уточните, пожалуйста, принципиальную необходимость для инъекционных форм препаратов технологического этапа на основе ультрацентрифугирования с хлоридом цезия. Насколько этапы ТП 4.8. и 4.9. в технологической схеме получения инъекционных средств (диализ и последующая стерилизующая фильтрация) освобождают целевую форму от остаточных количеств хлорида цезия? Возможно ли здесь использовать ультрацентрифугирование в градиенте плотности, например, сахарозы (менее токсичных компонентов)?

3. Насколько полученные данные по фармакокинетике клебсиеллезного бактериофага KPV15 могут быть интерполированы по отношению к другим

бактериофагам, в том числе других семейств и морфотипов?

4. При изучении профилактической и лечебной эффективности бактериофагов использована агаровая культура *K. pneumoniae* В 2580 в дозе $\sim 1 \times 10^4$ м.к. (~ 660 ЛД₅₀) в объеме 0,5 мл (стр. 76, п.2.2.3.7-9). Уточните, пожалуйста, правильно ли я понял, что ЛД₅₀ для данного штамма при подкожном инфицировании мышей составляет 15 м.к.? Уточните происхождение штамма клебсиелл с такой высокой вирулентностью.

5. Как соискатель считает, в чём причина распространения бактериальных осложнений в приведённых случаях оказания медицинской помощи такими агрессивными и резистентными микроорганизмами: недостаточная дезинфекция в стационарах, устойчивость убиквитарных патогенов к антисептикам, нарушения режимов санитарной обработки?

6. В п.6.3.2., говоря о перераспределении лейкоцитов между респираторной системой и кровотоком, автор объединяет анализ всех ранее перечисленных случаев фаготерапии или только случаев, связанных с патологией респираторного аппарата? Отмечено ли визуальное изменение катионных белков нейтрофильных гранулоцитов в динамике развития процесса и фаготерапии?

Отмечены также некоторые погрешности в тексте работы и подписях рисунков (опечатки: 115, 150, 186, 196, 198, 210, 265 стр., на рисунке 3.5. не подписана электрофореграмма 8).

Заключение

Диссертационная работа Бочкаревой Светланы Сергеевны на тему: «Конструирование препаратов бактериофагов и клинико-иммунологические аспекты фаготерапии и фагопрофилактики инфекций, связанных с оказанием медицинской помощи» является научно-квалификационной работой, в которой, на основании выполненных исследований, решена научная проблема, имеющая существенное значение для биотехнологии и медицины. Данная работа характеризуется актуальностью, научной новизной, теоретической и практической значимостью и соответствует критериям, установленным «Положением о присуждении ученых степеней», утвержденным постановлением Правительства Российской Федерации от 24.09.2013 г. № 842, с изменениями, опубликованными в Постановлениях Правительства РФ от 24.04.2016 г. № 335, от 02.06.2016 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. Автор диссертации, Бочкарева Светлана Сергеевна, заслуживает присуждения искомой степени доктора биологических наук по научной специальности 1.5.6. Биотехнология.

Официальный оппонент:

доктор биологических наук, профессор,
заведующий кафедрой иммунологии и биотехнологии федерального государственного бюджетного образовательного учреждения высшего образования «Московская государственная академия ветеринарной медицины и биотехнологии – МВА имени К.И. Скрябина» (ФГБОУ ВО МГАВМиБ – МВА имени К.И. Скрябина),
почетный работник АПК РФ, профессор РАН

Николай Васильевич Пименов

109472, г. Москва, ул. Академика Скрябина, д. 23
ФГБОУ ВО МГАВМиБ – МВА имени К.И. Скрябина
Тел. 8 (495)377-38-73, e-mail: pimenov-nikolai@yandex.ru

Подпись профессора Н.В. Пименова заверяю:

Ученый секретарь ФГБОУ ВО МГАВМиБ – МВА имени К.И. Скрябина, кандидат сельскохозяйственных наук,
доцент



Сергей Сергеевич Маркин

16 апреля 2023 г.