

ЗАКЛЮЧЕНИЕ ДИССЕРТАЦИОННОГО СОВЕТА 24.1.037.01,  
созданного на базе Федерального государственного бюджетного учреждения науки  
Института биоорганической химии им. академиков М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова  
Российской академии наук (ИБХ РАН),  
по диссертации на соискание ученой степени кандидата наук

аттестационное дело № \_\_\_\_\_

решение диссертационного совета от 4 октября 2023 № 23

О присуждении **Тимошиной Ольге Юрьевне** ученой степени кандидата биологических наук.

Диссертация «Бактериофаги *Acinetobacter baumannii* семейства *Autographiviridae*: ферментативное взаимодействие с полисахаридами» по специальности 1.5.3. – молекулярная биология принята к защите 30 марта 2023 г. (протокол №8) диссертационным советом 24.1.037.01, созданным на базе Федерального государственного бюджетного учреждения науки Института биоорганической химии им. академиков М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова Российской академии наук (ИБХ РАН), (адрес: ул. Миклухо-Маклая, 16/10, ГСП-7, Москва, 117997), действующим на основании Приказов Минобрнауки России №75/нк от 15.02.2013 г. и № 561 от 03.06.2021 г.

Соискатель Тимошина Ольга Юрьевна, 31 марта 1992 года рождения. В 2014 году соискатель окончила специалитет Московского государственного университета им. М.В. Ломоносова по специальности «биохимия», в 2022 году окончила аспирантуру Федерального государственного бюджетного учреждения науки Института биоорганической химии им. академиков М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова Российской академии наук (ИБХ РАН) по направлению подготовки «биологические науки». В настоящий момент работает в должности младшего научного сотрудника в лаборатории молекулярной биоинженерии отдела молекулярной биологии и биотехнологии растений Федерального государственного бюджетного учреждения науки Института биоорганической химии им. академиков М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова Российской академии наук (ИБХ РАН).

Диссертационная работа выполнена в лаборатории молекулярной биоинженерии отдела молекулярной биологии и биотехнологии растений Федерального государственного бюджетного учреждения науки Института биоорганической химии им. академиков М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова Российской академии наук (ИБХ РАН).

**Научный руководитель:** Мирошников Константин Анатольевич, член-корреспондент РАН, доктор химических наук, главный научный сотрудник, заведующий

лабораторией молекулярной биоинженерии отдела молекулярной биологии и биотехнологии растений Федерального государственного бюджетного учреждения науки Институт биоорганической химии им. академиков М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова Российской академии наук.

Официальные оппоненты:

**Прилипов Алексей Геннадьевич**, доктор биологических наук, руководитель лаборатории молекулярной генетики ФГБУ «Национальный исследовательский центр эпидемиологии и микробиологии им. Н.Ф. Гамалеи» Министерства здравоохранения Российской Федерации, и **Захарова Юлия Александровна**, доктор медицинских наук, заместитель директора Института дезинфектологии ФБУН «Федеральный научный центр гигиены им. Ф.Ф. Эрисмана» Роспотребнадзора, дали *положительные* отзывы на диссертацию.

**Ведущая организация** Федеральное государственное бюджетное учреждение «Национальный медицинский исследовательский центр акушерства, гинекологии и перинатологии имени академика В.И. Кулакова» Министерства здравоохранения Российской Федерации в своем *положительном* отзыве, подписанном директором Института микробиологии, антимикробной терапии и эпидемиологии ФГБУ «НМИЦ АГП им. В.И. Кулакова», членом-корреспондентом РАН, доктором медицинских наук, доцентом Припутневич Татьяной Валерьевной, и утвержденном директором ФГБУ «НМИЦ АГП им. В.И. Кулакова» Минздрава России, академиком РАН, доктором медицинских наук, профессором Сухих Геннадием Тихоновичем, указала, что диссертация Тимошиной Ольги Юрьевны «Бактериофаги *Acinetobacter baumannii* семейства *Autographiviridae*: ферментативное взаимодействие с полисахаридами» соответствует критериям (в том числе п. 9), установленным "Положением о присуждении ученых степеней" (утверждено Постановлением Правительства РФ от 24.09.2013 г. № 842 с изменениями Постановлений Правительства РФ от: 21.04.2016 г. № 335; 02.08.2016 г. № 748; от 29.05.2017 г. № 650; 20.03.2021 г. № 426; 11.09.2021 №1539; 26.09.2022 №1690), а сам диссертант несомненно заслуживает присвоения искомой степени кандидата биологических наук по специальности 1.5.3 - Молекулярная биология.

Соискатель имеет 12 опубликованных работ, в том числе по теме диссертации опубликовано 7 работ объемом 11 печ.л. в рецензируемых научных изданиях из списка, рекомендованного Минобрнауки России для опубликования результатов диссертаций (входят в базы Scopus и Web of Science). В диссертации отсутствуют недостоверные сведения об опубликованных соискателем ученой степени работах.

Научные работы по теме, в которые Тимошина О.Ю. внесла основной либо существенный вклад, включают:

1. Ландышев Н.Н., Воронько Я.Г., **Тимошина О.Ю.**, Суслина С.Н., Акимкин В.Г., Мирошников К.А. Обзор законодательства в области обращения персонализированных препаратов бактериофагов. // Вопросы вирусологии. 2020 – т.65, №5, с. 259–266.
2. Popova A. V., Shneider M. M., Arbatsky N. P., Kasimova A. A., Senchenkova S. N., Shashkov A. S., Dmitrenok A. S., Chizhov A. O., Mikhaylova Y. V., Shagin D. A., Sokolova O. S., **Timoshina O. Y.**, Kozlov R.S., Miroshnikov K. A., Knirel, Y. A. Specific Interaction of Novel Friunavirus Phages Encoding Tailspike Depolymerases with Corresponding *Acinetobacter baumannii* Capsular Types. //Journal of Virology. 2021. – Т. 95. – №. 5. – С. e01714-20.
3. Arbatsky N. P., Shashkov A. S., Chizhov A. O., **Timoshina O. Y.**, Shneider M. M., Knirel Y. A. Structure of the capsular polysaccharide of *Acinetobacter baumannii* MAR 55–66 //Russian Chemical Bulletin. – 2021. – Т. 70. – №. 3. – С. 592–599.
4. **Timoshina O. Y.**, Shneider M. M., Evseev P. V., Shchurova A. S., Shelenkov A. A., Mikhaylova Y. V., Sokolova O. S., Kasimova A. A., Arbatsky N. P., Dmitrenok A. S., Knirel Y. A., Miroshnikov K. A., Popova, A. V. Novel *Acinetobacter baumannii* bacteriophage Aristophanes encoding structural polysaccharide deacetylase //Viruses. – 2021. – Т. 13. – №. 9. – С. 1688.
5. Kasimova A. A., Arbatsky N. P., **Timoshina O. Y.**, Shneider M. M., Shashkov A. S., Chizhov A. O., Popova A. V., Hall R. M., Kenyon J. J., Knirel Y. A. The K26 capsular polysaccharide from *Acinetobacter baumannii* KZ-1098: Structure and cleavage by a specific phage depolymerase //International Journal of Biological Macromolecules. – 2021. – Т. 191. – С. 182-191.
6. **Timoshina O. Y.**, Kasimova A. A., Shneider M. M., Arbatsky N. P., Shashkov A. S., Shelenkov A. A., Mikhaylova Y. V., Popova A. V., Hall R. M., Knirel Y. A., Kenyon J. J. Loss of a Branch Sugar in the *Acinetobacter baumannii* K3-Type Capsular Polysaccharide Due To Frameshifts in the *gtr6* Glycosyltransferase Gene Leads To Susceptibility To Phage APK37.1 //Microbiology Spectrum. – 2023. – С. e03631-22.
7. **Timoshina O. Y.**, Kasimova A. A., Shneider M. M., Matyuta I. O., Nikolaeva A. Y., Evseev P. V., Arbatsky N. P., Shashkov A. S., Chizhov A. O., Shelenkov A. A., Mikhaylova Y. V., Slukin P. V., Volozhantsev N. V., Boyko K. M., Knirel Y. A., Miroshnikov K. A., Popova, A. V. Friunavirus Phage-Encoded Depolymerases Specific to Different Capsular Types of *Acinetobacter baumannii*. // *International Journal of Molecular Sciences*. – 2023. – Т.24.- С. 9100.

На диссертацию и автореферат поступили отзывы:

**Отзыв официального оппонента д.б.н. Прилипова Алексея Геннадьевича.** Отзыв положительный, содержит следующие замечания и вопросы:

1. Выводы работы отражают полученные результаты и не вызывают сомнений в своей достоверности. Автор проводит детальный анализ всех полученных результатов. Претензия лишь к формулировке некоторых выводов, например, п. 1 и 2. Полагаю, что лучше было бы сформулировать таким образом, чтобы это выглядело как получение нового знания, а не отчет о проделанной работе. К примеру, для п. 1 «Девять, ранее не известных литических бактериофагов, специфически инфицирующих штаммы *A. baumannii* капсульных типов K09, K14, K16, K37/K3-v1, K26, K86, K127 и K128 получили

названия в соответствие с номером капсульного типа штамма-хозяина» и для п. 2 «Показано, что бактериофаги АРК09, АРК14, АРК16, АРК37.1, АРК26, АРК86, АРК127v и АРК128 являются представителями рода *Friunavirus*, а фаг *Aristophanes* - первым представителем ранее неопisanного рода вирусов внутри подсемейства *Beijerinckvirinae*».

**Отзыв официального оппонента д.м.н. Захаровой Юлии Александровны.** Отзыв положительный, содержит следующие замечания и вопросы:

1. Глубокая содержательность освещения раздела литературного обзора бесспорна, однако, его изложение на 50-ти страницах из 122 общего объема текста с многочисленными рисунками несколько перегружает рукопись диссертации.
2. В формулировке Положения 2 «*Очищенные рекомбинантные деполимеразы расщепляют O-гликозидные связи капсульных полисахаридов по гидролитическому пути, то есть являются специфическими гликозидазами класса гидролаз*» отсутствует указание на предмет изучения – бактериофаг *A. baumannii* и микроорганизм, содержащий капсульный полисахарид, на который воздействует фаг.
3. Оппонент выражает несогласие с автором, что исследования в области бактериофагов проводились в основном в Советском Союзе. В период их открытия французским ученым Félix d'Hérelle (1917-1919 гг.) и до 30-х годов XX века центр изучения бактериофагов находился в странах Европы и Африки.
4. Какой, по мнению автора, механизм предпочтителен для бактериофагов при их взаимодействии с клеткой грамотрицательных микроорганизмов: классическая деполимеразная активность или деацетилирование экзполисахаридов?
5. Можно ли в будущем использовать выделенные и охарактеризованные по результатам диссертационной работы бактериофаги рода *Friunavirus* с диагностической и эпидемиологической целью при внутривидовом типировании возбудителя?
6. Каковы перспективы использования фага *Aristophanes* - первого представителя, нового рода вирусов внутри подсемейства *Beijerinckvirinae*?

**Отзыв ведущей организации.** Отзыв положительный, содержит следующие замечания и вопросы:

1. На с. 68 диссертации отмечено, что специфичность бактериофагов оценивали на панели из 51 штамма *A. baumannii*, но на с. 72 написано, что панель включала в себя 52 штамма. В таблице 3 приводится 52 штамма. Хотелось бы понять, сколько штаммов было в панели.
2. В тексте диссертации есть небольшое количество грамматических ошибок и опечаток. Например, в таблице 3 вместо «GenBank» написано «GeneBank», на с. 81 вместо «к капсульным типам K2 и K93» написано «к капсульным типам K2 and K93», на с. 82 вместо

«от 40 966 до 42 013 п.н.» указано «от 40,966 до 42,013 п.н.». В диссертации приводится 6 статей, опубликованных по теме диссертации, а в автореферате их уже 7. Страница 93 в печатном варианте диссертации дублируется.

3. Содержание пар GC в геномах фагов APK составляло 39,2-39,4%, что близко к 39% GC для *A. baumannii*. А для фага *Aristophanes* содержание пар GC было заметно выше, составив 42,5%. Есть ли у автора гипотезы или возможные объяснения этого факта?

4. На с. 67 для части штаммов *A. baumannii* указаны сиквенс-типы, а для части (D4, AB5256) - нет. Для этих штаммов нет соответствующих данных или же они просто не указаны? Как считает автор, какая из двух используемых схем типирования более распространена?

**Отзыв на автореферат** доктора медицинских наук, заведующего лабораторией молекулярной микробиологии Федерального государственного автономного образовательного учреждения высшего образования «Российский национальный исследовательский медицинский университет имени Н.И. Пирогова» Министерства здравоохранения Российской Федерации **Чеботаря Игоря Викторовича**. Отзыв **положительный**, не содержит замечаний.

**Отзыв на автореферат** кандидата биологических наук, старшего научного сотрудника лаборатории вирусов микроорганизмов Института микробиологии им. С.Н. Виноградского ФИЦ Биотехнологии РАН **Куликова Евгения Евгеньевича**. Отзыв **положительный**, содержит следующие вопросы и замечания:

Вопросы терапии инфекций, вызванных *A. baumannii*, находятся в центре интереса для широкого круга специалистов - возможно, можно было бы посвятить абзац текста вопросу появления этого относительно нового патогена и превращению его из безобидной почвенной бактерии в значительную угрозу для здравоохранения, о необычно широком разнообразии капсульных типов и пр. Также несколько смущает термин «исчерпывающе охарактеризованный» по отношению к биологическим объектам - уместнее было бы сказать «полно охарактеризованный в связи с задачами исследования». В разделе «Положения, выносимые на защиту» уместно было бы указать тип деацетилируемого ферментами фага капсульного полисахарида. В тексте встречаются жаргонизмы и опечатки (стр. 7 - «деполимеризующей», стр. 10 - «высоко специфичны», стр. 14 - «ранее неопisanного», стр. 17 - «перечень связей» вместо «перечень химических связей» и др.). На странице 9 мысль автора оборвалась - «динамика инфекционного процесса... существенно отличалась», при этом требуются усилия понять, от чего именно она отличалась. На странице 13 автор вводит термин «фриунавирuсы» без предварительной расшифровки. Рисунок 5, возможно, выиграл бы от изменения варианта графического

представления кладограммы. Указанные неточности не снижают научной значимости работы и являются довольно обычными в практике, однако их отсутствие улучшило бы впечатление от автореферата. Они не являются критическими или как-то принципиально изменяющими смысловую часть работы, представляемой к защите.

Выбор официальных оппонентов и ведущей организации обосновывается их научными достижениями в области молекулярной биологии, микробиологии и вирусологии, которые подтверждены их многочисленными публикациями в ведущих российских и международных научных журналах. А.Г. Прилипов – признанный специалист в области геномики вирусов, в том числе и бактериофагов, автор ряда диагностических разработок. Ю.А. Захарова и исследователи НМИЦ АГП им. В.И. Кулакова обладают обширной информацией о медицинском применении бактериофагов, в том числе и для лечения инфекций, вызванных *A. baumannii*. Оппоненты и представители ведущей организации обладают большим опытом исследовательской и экспертной работы и высокой квалификацией, которые позволяют им объективно оценить степень научной новизны результатов диссертационной работы, а также ее теоретическую и практическую значимость.

Диссертационный совет отмечает, что в результате выполненных соискателем исследований были впервые обнаружены 9 ранее неизвестных литических бактериофагов, специфически инфицирующих штаммы *A. baumannii* девяти различных капсульных типов. Для бактериофагов, входящих в сформированную в ходе исследования коллекцию, определены: полная нуклеотидная последовательность и структура геномов; таксономическое положение на основе анализа геномов и данных электронной микроскопии; параметры инфекционного процесса; определены механизмы, лежащие в основе ферментативной активности полисахарид-деполимеризующих ферментов исследуемых бактериофагов. На основе биоинформатического анализа показано, что бактериофаги АРК09, АРК14, АРК16, АРК37.1, АРК26, АРК86, АРК127v и АРК128 являются представителями рода *Friunavirus*, а фаг *Aristophanes* - первым представителем ранее неопisanного рода вирусов внутри подсемейства *Beijerinckvirinae*. Установлен механизм работы взаимодействующих с капсульными полисахаридами ферментов выделенных бактериофагов. Деполимеразы бактериофагов АРК09, АРК14, АРК16, АРК37.1, АРК26, АРК86, АРК127v и АРК128 расщепляют O-гликозидные связи капсульных полисахаридов по гидролитическому пути, то есть являются специфическими гликозидазами класса гидролаз. Показано, что бактериофаг *Aristophanes* – первый и, на сегодняшний день, единственный представитель среди описанных фагов, инфицирующих

*A. baumannii*, в геноме которого закодирована структурная деацетилаза, ответственная за O-деацетилирование одного из остатков сахара капсульного полисахарида K26.

**Теоретическая значимость** исследования заключается в том, что полученные данные по характеристике бактериофагов вносят вклад в формирование общей картины, касающейся классификации, систематизации и изучения геномного разнообразия вирусов, инфицирующих *A. baumannii*.

**Значение** полученных соискателем результатов исследования для практики состоит в том, что вновь обнаруженные в ходе работы бактериофаги рода *Friunavirus* имеют потенциал использования в качестве компонентов персонифицированных коктейлей для фаготерапии ввиду того, что они являются высокоспецифичными, строго литическими, быстро адсорбируются на бактериальных клетках и дают хороший выход фаговых частиц.

**Достоверность** результатов проведенных исследований сомнений не вызывает. Исследования проведены с помощью широкого спектра современных методов и подходов, включающих микробиологические, молекулярные, биоинформатические и биофизические методы исследования. Выводы и научные положения, сформулированные в диссертации, логично вытекают из полученных данных.

**Личный вклад** соискателя состоит в участии на всех этапах исследовательского процесса. Разработка концепции исследования проводилась автором совместно с научным руководителем член-корр. РАН, д.х.н. Мирошниковым К.А. Автором были полностью выполнены следующие этапы исследования: анализ научной литературы по теме исследования; выделение бактериофагов из речной и сточной воды; получение очищенных препаратов бактериофагов; получение очищенных препаратов рекомбинантных фаговых полисахарид-деполимеризующих ферментов; обобщение полученных результатов. В рамках научной коллаборации отдельные разделы работы выполнены совместно с сотрудниками лаборатории молекулярных механизмов антибиотикорезистентности ЦНИИ Эпидемиологии Роспотребнадзора к.б.н. Михайловой Ю.В. и к.ф.-м.н. Шеленковым А.А. (секвенирование геномов бактериофагов); сотрудниками Лаборатории углеводов и биоцидов им. академика Н.К. Кочеткова (№ 21) Института органической химии им. Н. Д. Зелинского РАН Касимовой А.А., к.х.н. Арбатским Н.П. и д.х.н., проф. Книрелем Ю.А. (определение структуры капсульных полисахаридов *A. baumannii* и фрагментов ферментативного расщепления полисахаридов); доцентом Кафедры биоинженерии Биологического факультета МГУ им. М.В. Ломоносова, д.б.н. Соколовой О.С. (электронная микроскопия фагов); сотрудником

отдела молекулярной микробиологии ФБУН ГНЦ ПМБ к.б.н. Поповой А.В. и аспирантом МФТИ Щуровой А. С. (участие в характеристике бактериофагов).

В ходе защиты диссертации были заданы следующие вопросы:

1. Является ли бактериофаг *Aristophanes* литическим бактериофагом, не смотря на наличие у него фермента деацетилазы, а не деполимеразы? Каким образом процесс деацетилирования капсульного полисахарида приводит к литическому действию бактериофага?
2. С учетом наличия большого количества штаммов *A. baumannii* каким способом было бы наиболее рационально применять препараты бактериофагов в клинической практике? Предполагается использование коктейля бактериофагов с определённым составом или персонифицированных препаратов? Насколько быстро проводится подбор бактериофагов для формирования персонифицированных коктейлей? Существует ли юридическая база под осуществление такой персонифицированной терапии?

Соискатель Тимошина Ольга Юрьевна ответила на заданные ей в ходе заседания вопросы и привела собственную аргументацию:

1. Действительно, бактериофаг *Aristophanes* является строго литическим, и на газоне штамма-хозяина образует литические бляшки с ореолом. Возможно, бактериофаг *Aristophanes* может распознавать некие другие эпитопы на поверхности внешней мембраны бактериальной клетки, однако, этот вопрос требует дополнительного изучения.
2. Действительно, важной характеристикой *A. baumannii* как бактерии является наличие у различных штаммов высокого разнообразия капсульных полисахаридов, для расщепления каждого из которых необходим соответствующий бактериофаг со специфически действующим ферментом. Рациональным подходом представляется формирование локальных коллекций бактериофагов, специфичных к как можно большему разнообразию капсульных полисахаридов, и использование бактериофагов из этих коллекций для формирования персонифицированных коктейлей для фаготерапии. Распространённым подходом является использование нескольких последовательных коктейлей бактериофагов для каждого конкретного пациента. Время, затрачиваемое на подбор бактериофагов для персонифицированного коктейля, варьирует от двух дней (в случае наличия локальной коллекции литических бактериофагов) до, приблизительно, недели-двух (в случае поиска бактериофагов и выделения их из образцов сточной воды). На данный момент юридическая база для использования персонифицированных коктейлей бактериофагов не разработана, однако, известно об инициативах Роспотребнадзора в данном направлении.

Исходя из вышеизложенного, диссертационный совет постановил, что диссертация Тимошиной Ольги Юрьевны является законченной научно-квалификационной работой. Работа написана автором самостоятельно и содержит новые и актуальные научные результаты. Таким образом, диссертационная работа Тимошиной О. Ю. «Бактериофаги *Acinetobacter baumannii* семейства *Autographiviridae*: ферментативное взаимодействие с полисахаридами» полностью соответствует всем критериям, установленным "Положением о присуждении ученых степеней", утвержденным Постановлением Правительства РФ от 24.09.2013 г. № 842 с изменениями Постановлений Правительства РФ от: 21.04.2016 г. № 335; 02.08.2016 г. № 748; от 29.05.2017 г. № 650; 20.03.2021 г. № 426; 11.09.2021 №1539; 26.09.2022 №1690.

На заседании 4 октября 2023 г. диссертационный совет постановил: за решение научной задачи по изучению разнообразия бактериофагов *Acinetobacter baumannii*, а также механизмов взаимодействия «бактериофаг»-«хозяин», имеющей важное значение для развития молекулярной биологии, присудить Тимошиной Ольге Юрьевне ученую степень кандидата биологических наук.

При проведении тайного голосования диссертационный совет в количестве 20 человек, из них 5 докторов наук (по научной специальности рассматриваемой диссертации 1.5.3 - Молекулярная биология), участвовавших в заседании, из 30 человек, входящих в состав совета, проголосовали: за – 19, против – 0, недействительных бюллетеней – 1.

Председатель  
диссертационного совета  
академик РАН



Мирошников Анатолий Иванович

Врио ученого секретаря  
диссертационного совета  
д.х.н.

Уткин Юрий Николаевич

05.10.2023 г.