

## ОТЗЫВ ОФИЦИАЛЬНОГО ОППОНЕНТА

доктора медицинских наук, доцента, заместителя директора Института дезинфектологии  
ФБУН «Федеральный научный центр гигиены им. Ф.Ф. Эрисмана» Роспотребнадзора

**Захаровой Юлии Александровны**

на диссертационную работу **Тимошиной Ольги Юрьевны**

**«Бактериофаги *Acinetobacter baumannii* семейства *Autographiviridae*:**

**ферментативное взаимодействие с полисахаридами»,**

представленную на соискание ученой степени кандидата биологических наук  
по специальности 1.5.3 - «Молекулярная биология»

### **Актуальность темы диссертационного исследования**

27 февраля 2017 г. Всемирная организация здравоохранения (ВОЗ) опубликовала список из 12 патогенов, которые представляют наибольшую угрозу для здоровья человека. В качестве «критических» значится устойчивый к антибиотикам *Acinetobacter baumannii*, основная причина внутрибольничных инфекций в отделениях реанимации и интенсивной терапии. К важным биологическим особенностям возбудителя относят широкую распространенность, наличие полисахаридной капсулы (защитного механизма от фагоцитоза), высокий уровень резистентности к различным классам антибиотиков, включая устойчивость к карбапенемам. В связи с этим клиницисты все чаще прибегают к альтернативным препаратам - полимиксину В, полимиксину Е (колистин) и тигециклину. Однако применение полимиксинов ограничено высоким профилем токсичности, а тигециклин имеет низкую эффективность при клиническом применении *in vivo*. В 2017 году постановлением Правительства РФ принята Стратегия предупреждения распространения антимикробной резистентности в Российской Федерации на период до 2030 года. Современные литературные источники указывают на возможность широкого использования препаратов на основе бактериофагов. Применение этих уникальных лечебно-профилактических средств имеет многолетнюю историю. Вместе с тем, после 40-х годов XX века фаготерапия не нашла дальнейшего широкого развития не только из-за успехов антибиотикотерапии, но и в связи с отсутствием теоретических знаний о механизме действия бактериофагов, что в то время не позволяло объяснить некоторые неудачи при их клиническом применении.

Интерес к бактериофагам, поражающим бактерии рода *Acinetobacter* вырос в последние годы. С 1966 года детально описаны и систематизированы более 130 бактериофагов, специфичных для *Acinetobacter* sp.

В последнее десятилетие научные исследования смещаются в область изучения фаговых ферментов – эндолизинов и деполимераз. Известно, что литические ферменты бактериофагов

эффективно разрушают клеточную стенку соответствующих бактерий и не оказывают существенного влияния на жизнедеятельность симбиотической микрофлоры. Установлено, что препараты на основе рекомбинантных полисахарид-деградирующих ферментов бактериофагов, обладая бактериостатическим эффектом, не будут полностью разрушать клетку, однако будут снижать патогенный потенциал грамотрицательных бактерий за счет разрушения поверхностных (в том числе капсульного) полисахаридов, что может повлиять на вирулентность и биопленкообразующую способность бактерий.

В этой связи, актуальность сформулированной автором цели диссертационного исследования, посвященного изучению бактериофагов семейства *Autographiviridae*, лизирующих различные капсульные типы *A. baumannii*, не вызывает сомнений.

Диссертантом были поставлены и решены задачи по выделению из объектов внешней среды бактериофагов *A. baumannii* с максимально полной характеристикой их биологических свойств, определением таксономического положения вирусов, детекцией генов, кодирующих белок хвостового шипа, получением рекомбинантных полисахарид-деполимеризующих ферментов, оценкой их субстратной специфичности и механизма действия.

#### **Достоверность полученных результатов и обоснованность научных положений, выводов и рекомендаций, сформулированных в диссертации**

Достоверность и доказательность полученных диссертантом результатов исследования, обоснованность выводов подтверждена значительным объемом фактических данных, использованных для решения поставленных задач, использованием современных лабораторных методов: микробиологических, молекулярно-генетических, биофизических, биоинформационного анализа.

Сформулированные в диссертации положения, выводы и рекомендации основаны на корректных данных, полученных соискателем, не вызывают сомнений, являются их логическим обобщением и соответствуют поставленным задачам.

#### **Новизна и теоретическая значимость научных результатов**

Автором впервые охарактеризованы 9 новых, не описанных ранее в научной литературе литических бактериофагов семейства *Autographiviridae*, лизирующих капсульные штаммы *A. baumannii* K09, K14, K16, K37/K3-v1, K26, K86, K127 и K128. Бактериофаги АРК09, АРК14, АРК16, АРК37.1, АРК26, АРК86, АРК127v и АРК128 отнесены к типичным представителям рода *Friunavirus*, а фаг *Aristophanes* – описан впервые и является первым представителем рода вирусов внутри подсемейства *Beijerinckvirinae*.

Определены полная нуклеотидная последовательность и структура геномов выделенных бактериофагов; их таксономическое положение; параметры развития инфекционного процесса; механизмы, лежащие в основе ферментативной активности

полисахарид-деполимеризующих ферментов. Полученные новые научные знания, несомненно, вносят существенный вклад в систематизацию бактериофагов, инфицирующих *A. baumannii*, в изучение их геномного разнообразия.

Автором впервые установлено, что очищенные рекомбинантные деполимеразы бактериофагов *A. baumannii* расщепляют O-гликозидные связи капсульных полисахаридов патогена по гидролитическому пути, то есть являются специфическими гликозидазами класса гидролаз. На примере бактериофага *Aristophanes* описан механизм O-деацетилирования капсульного полисахарида. Ранее данный механизм был изучен только для бактериофагов, инфицирующих энтеробактерии.

Представленные в диссертационной работе результаты безусловно имеют фундаментальный характер, поскольку посвящены современной классификации, систематизации и изучению генома уникальных вирусов - бактериофагов *A. baumannii*. Теоретическая значимость работы определяется глубоким пониманием молекулярных основ биологического процесса взаимоотношения «хозяин – паразит» через рецепторный аппарат поверхностных полисахаридов бактериальной клетки с одной стороны и ферментов бактериофага, способных специфически распознавать и расщеплять различные связи в структуре капсульных полисахаридов, с другой.

#### **Практическая значимость полученных результатов**

Создание локальных коллекций литических бактериофагов, специфичных к штаммам различных капсульных типов *A. baumannii*, значительно оптимизирует выбор отдельных компонентов в составе комплексного препарата для персонализированной фаготерапии, включая инфекции, обусловленные резистентными и панрезистентными штаммами одного из самых актуальных возбудителей – *A. baumannii*, что несомненно имеет практическую значимость.

Аннотированные геномы бактериофагов *A. baumannii* размещены в международной базе данных NCBI GenBank под номерами: *Aristophanes* - MT783706, APK9 - MZ868724, APK14 - MK089780, APK16 - MZ868725, APK26 - MW345241, APK37.1 - MZ967493, APK86 - MZ936314, APK127v - ON210142, APK128 - MW459163.

#### **Личный вклад автора в разработку научной проблемы**

Автор лично принимал участие в научном исследовании на всех его этапах. Совместно с руководителем сформулированы цель и задачи, разработан дизайн. Самостоятельно проведена значительная часть лабораторных исследований, выполнена обработка результатов.

#### **Оценка содержания диссертации, ее завершенности, подтверждение публикаций автора**

Работа изложена на 122 листах текста, состоит из списка сокращений, введения, обзора литературы, главы материалы и методы исследования, главы собственных исследований,

заклучения, выводов, списка сокращений, списка использованной научной литературы (197 источников). Диссертация иллюстрирована 33 рисунками и 6 таблицами.

Введение посвящено актуальности изучаемой проблемы, где автор излагает цель и задачи, формулирует научную новизну, определяет практическую значимость, методологию и методы исследования, представляет основные положения, выносимые на защиту, констатирует апробацию результатов и степень их достоверности, указывает сведения об объеме и структуре выполненной работы.

В главе 1 (обзор литературы) обобщены и систематизированы мировые научные знания, накопленные в области фенотипических и генотипических свойств бактерий рода *Acinetobacter*, включая факторы защиты, иммуногенные компоненты клеточной стенки (капсульные полисахариды), их антибиотикочувствительность, а также распространенность инфекций с их участием. Вторая часть обзора посвящена характеристике бактериофагов *Acinetobacter baumannii*.

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.

В главе 2 (материалы и методы) подробно представлены используемые объекты исследования и методы их изучения. Работа носит комплексный и многоэтапный характер, в ней имеют место общенаучные подходы и современные лабораторные методы исследования: (микробиологические, молекулярно-генетические, биофизические, биоинформационный анализ). Методы адекватны для выбранной цели и информативны.

В 3 главе (собственные исследования), состоящей из 6 частей, содержатся основные результаты работы. Приведены данные о морфологии негативных колоний, формируемых впервые выделенными бактериофагами, характеристики наблюдаемого инфекционного процесса. Проведено сравнение геномов обнаруженных бактериофагов, определено их таксономическое положение. В заключительной части главы приведены данные о характере ферментативного взаимодействия рекомбинантных ферментов бактериофагов с капсульными полисахаридами соответствующих штаммов *A. baumannii*.

В заклучении автор излагает полученные оригинальные результаты общепринятым при оформлении данного раздела работы способом.

Выводы, сформулированные в диссертации обоснованы, в целом логично вытекают из содержания, соответствуют ему и поставленным задачам и позволяют считать основную цель работы достигнутой.

Диссертация О.Ю. Тимошиной представляет собой самостоятельно выполненную научно-квалификационную работу, содержит новые научные положения, решение которых,

бесспорно имеет теоретическую и практическую значимость. Ее основные результаты опубликованы в 7 научных работах. При проверке работ, их наличие подтверждается в указанных источниках. Основные положения диссертации были представлены автором на 2-х научных мероприятиях международного уровня.

Автореферат оформлен в соответствии с требованиями, отражает основное содержание работы и научных публикаций, раскрывает основные положения, выносимые на защиту. Оформление диссертации и автореферата логично, понятно, соответствует требованиям, предъявляемым к подготовке данных видов научно-квалификационных работ.

Вместе с тем, в варианте рукописи диссертации и автореферате, имеются некоторые неточности, в их числе:

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.

Не соглашусь 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.

В целом перечисленные недочеты не искажают представление материала. Диссертация О.Ю. Тимошиной написана в классическом стиле, хорошим литературным языком, не вызвала принципиальных замечаний. Хотелось бы получить ответы на три вопроса:

1. Какой на Ваш взгляд механизм предпочтителен для бактериофагов при их взаимодействии с клеткой грамотрицательных микроорганизмов: классическая деполимеразная активность или деацетилирование экзполисахаридов.
2. Можно ли в будущем использовать выделенные и охарактеризованные Вами бактериофаги рода *Friunavirus* с диагностической и эпидемиологической целью при внутривидовом типировании возбудителя.
3. Перспективы использования фага *Aristophanes* - первого представителя, описанного Вами рода вирусов внутри подсемейства *Beijerinckvirinae*.

### Заключение

Диссертационная работа Тимошиной Ольги Юрьевны «Бактериофаги *Acinetobacter baumannii* семейства *Autographiviridae*: ферментативное взаимодействие с полисахаридами», представленная на соискание ученой степени кандидата биологических наук по специальности 1.5.3 – Молекулярная биология, является завершенной научно-

квалификационной работой, в которой содержится решение актуальной научной задачи – полная характеристика впервые выделенных бактериофагов *A. baumannii* с определением таксономического положения, получением и оценкой механизма действия их рекомбинантных полисахарид-деполимеризующих ферментов. По своей актуальности, научно-практической значимости, объему выполненных исследований, новизне и ценности полученных результатов и научных положений представленная работа полностью соответствует всем 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 заслуживает присвоения искомой степени кандидата биологических наук по специальности 1.5.3 - Молекулярная биология.

**Официальный оппонент:**

доктор медицинских наук, доцент,  
заместитель директора Института дезинфектологии  
Федерального бюджетного учреждения науки  
«Федеральный научный центр гигиены им. Ф.Ф. Эрисмана»  
Федеральной службы по надзору в сфере  
защиты прав потребителей и благополучия человека

Захарова Юлия Александровна  
«18» сентября 2023 г.

Адрес: Российская Федерация, 141014, Московская область, город Мытищи, улица Семашко, дом 2, Телефон: +7 912 643 50 60,  
Адрес эл. почты: [zakharova.y.a@fferisman.ru](mailto:zakharova.y.a@fferisman.ru); [z.y.alexandrovna@mail.ru](mailto:z.y.alexandrovna@mail.ru).

Подпись Захаровой Юлии Александровны  
«Удостоверяю»:

Ученый секретарь Федерального бюджетного учреждения науки  
«Федеральный научный центр гигиены им. Ф.Ф. Эрисмана» Федеральной службы по надзору  
в сфере защиты прав потребителей и благополучия человека (Российская Федерация, 141014,  
Московская область, город Мытищи, улица Семашко, дом 2, Телефон: +7 (495) 586-11-44,  
Адрес электронной почты: [zhukova@fferisman.ru](mailto:zhukova@fferisman.ru).  
доктор медицинских наук, профессор

Жукова Валентина Владимировна

ПОДПИСЬ  
УЧЁНЫЙ СЕКРЕТАРЬ  
ФБУН ФНЦГ ИМ. ЭРИСМАНА  
ДМН ПРОФЕССОР

ЗАВЕРЯЮ

В В ЖУКОВА

