

ОТЗЫВ

официального оппонента на диссертационную работу Ждида Гадира
«Изучение новых бактериофагов условно-патогенных бактерий и факторов,
влияющих на их взаимодействие с бактериями»,
представленную на соискание учёной степени кандидата биологических наук
по специальности 1.5.3 – Молекулярная биология

Актуальность исследования

Диссертационная работа Ждида Гадира посвящена одной из наиболее актуальных проблем современной биологии и медицины – поиску альтернативных подходов к лечению бактериальных инфекций в условиях глобального распространения антибиотикорезистентности. Согласно данным Всемирной организации здравоохранения, устойчивость к противомикробным препаратам входит в число десяти основных угроз для человечества, а бактериофаги рассматриваются как один из наиболее перспективных инструментов для борьбы с патогенами, входящими в список приоритетных (в том числе *Enterobacter cloacae*, *Stenotrophomonas maltophilia* и *Aeromonas popoffii*).

Изучение новых фагов, их геномных особенностей, механизмов взаимодействия с бактериями и систем бактериальной защиты имеет как фундаментальное значение для понимания эволюции вирусов и их хозяев, так и практическое – для разработки эффективных фаговых препаратов. Особую актуальность работе придаёт то, что *S. maltophilia* обладает природной устойчивостью к большинству классов антибиотиков, а *A. popoffii* является малоизученным патогеном, для которого фаговая терапия практически не разрабатывалась.

Научная новизна и значимость работы

В работе впервые охарактеризованы четыре новых бактериофага – EC151, EC152, AerP_220 и StM171. Для трёх из них предложены новые таксономические единицы: новый род для бактериофага EC151, новый вид *Nordvirus* для бактериофага StM171, новый род *Yinyavirus* и новое подсемейство *Tolavirinae* для фага AerP_220. Обнаружены уникальные метаболические пути в геномах изученных фагов. У фага EC151 выявлен полный путь модификации 7-деазагуанина (preQ0), защищающий ДНК фага от бактериальных рестриктаз. Это первый описанный фаг *Enterobacter*, содержащий гены этого метаболического пути. У фага EC152 обнаружен полный путь восстановления NAD⁺, редко встречающийся у фагов и позволяющий противостоять бактериальным системам защиты, истощающим NAD⁺. Впервые проведён масштабный пангеномный анализ систем антифаговой защиты *S. maltophilia* на 72 геномах. Идентифицировано 72 системы защиты, 27 островков защиты, из которых четыре содержат 60% всех обнаруженных систем (стр. 127–133). Показано, что некоторые системы (RecBCD, AbiE 4, BREX 1) высококонсервативны, тогда как другие (RM, Gabija) переменны. Разработан и оптимизирован метод количественной ПЦР (qPCR) для высокопроизводительной оценки инфекционной активности фагов в коэволюционных экспериментах, что представляет собой методическую новизну.

Полученные данные расширяют представления о геномном разнообразии фагов, инфицирующих клинически значимые бактерии. Обнаружение путей модификации 7-

деазагуанина и восстановления NAD⁺ у фагов вносит вклад в понимание эволюции фаговых геномов и механизмов противостояния бактериальным защитным системам. Проведённый пангеномный анализ систем защиты *S. maltophilia* создаёт основу для изучения эволюции антифагового иммунитета у этого патогена.

Показано, что слаболитический фаг StM171 может восстанавливать чувствительность *S. maltophilia* к бета-лактамам антибиотикам у штаммов из окружающей среды (группа B), что открывает возможности для комбинированной фаго-антибиотикотерапии. Идентифицированные высококонсервативные системы защиты (RecBCD, AbiE 4, BREX I, стр. 135) могут служить мишенями для конструирования фагов с расширенным спектром действия. Предложенные новые таксономические единицы имеют значение для систематики бактериофагов.

Содержание и оформление диссертации

Диссертация состоит из введения, обзора литературы, экспериментальной части, результатов собственных исследований и их обсуждения, заключения, выводов, списка сокращений и списка литературы. Текст изложен на 174 страницах, содержит 41 рисунок и 8 таблиц, список литературы включает 365 библиографических источников. Структура работы соответствует требованиям, предъявляемым к кандидатским диссертациям.

Во введении обоснована актуальность темы, связанная с ростом антибиотикорезистентности и необходимостью поиска новых терапевтических подходов, в том числе с использованием бактериофагов. Сформулированы цель и четыре задачи исследования, направленные на микробиологическую и генетическую характеристику новых фагов, анализ их геномов, изучение коэволюции с хозяевами и пангеномный анализ систем защиты *S. maltophilia*. Отражены научная новизна, теоретическая и практическая значимость работы, а также положения, выносимые на защиту.

Первая глава (обзор литературы) содержит 365 источников и посвящена современным представлениям о бактериофагах: их геномике, классификации, жизненных циклах. Значительная часть обзора детально разбирает факторы, влияющие на коэволюцию фагов и бактерий. В отдельном разделе кратко охарактеризованы виды бактерий, включённые в исследование: *E. cloacae*, *S. maltophilia* и *A. popoffii*.

Методическая часть описывает использованные реактивы, оборудование, олигонуклеотиды, бактериальные штаммы и фаги. Подробно изложены методы работы с *S. maltophilia*: определение чувствительности к антибиотикам, селекция фагорезистентных мутантов, исследование биоплёнок, индукция профагов, выделение ДНК и секвенирование геномов. Для фагов описаны методы наработки и очистки, анализа биологических свойств (литическая активность, латентный период, спектр хозяев), выделения ДНК, секвенирования и сборки геномов, а также биоинформатического анализа (аннотация, филогенетика, поиск систем защиты). Отдельно представлена оптимизация количественной ПЦР для оценки эффективности фаговой инфекции и описаны четыре сценария коэволюционных экспериментов.

Третья глава (результаты и обсуждение) – основная часть работы, состоящая из четырёх разделов. В разделе 3.1 охарактеризованы четыре новых бактериофага: EC151 (сифовирус, слаболитический, содержит полный путь синтеза *preQ0*, который автор предлагает рассматривать в качестве новый род), EC152 (миовирус, слаболитический, кодирует путь восстановления NAD⁺, род *Seunavirus*), AerP_220 (подовирус,

высоколитический, представленный автором как новый род *Yinyavirus* и новое подсемейство *Tolavirinae*) и StM171 (сифовирус, слаболитический, представлен как новый вид *Nordvirus*). Для каждого приведены морфология, биологические параметры, геномная организация и таксономическое положение.

В разделе 3.2 изучено влияние слаболитического фага StM171 на действие антибиотиков против *S. maltophilia*: показано, что фаг ассоциирован с восстановлением чувствительности к бета-лактамам у штаммов из окружающей среды (группа В), но не у клинических (группа А), и модулирует образование биоплёнок. В разделе 3.3 представлены результаты коэволюционных экспериментов в четырёх сценариях (А – только фаг, В – с наивным хозяином, С – с конкурирующим фагом, D – оба фактора) для фагов EC151, EC152, StM171 и StenM174. Показано на качественном уровне, что адаптация фагов *E. cloacae* улучшается при наличии наивного хозяина и конкурирующего фага, тогда как для *S. maltophilia* эффективнее только наивный хозяин. В разделе 3.4 представлен пангеномный анализ 72 штаммов *S. maltophilia*: выявлены и охарактеризованы 72 системы антифаговой защиты и 27 островков защиты. Идентичные островки защиты обнаружены как у филогенетически родственных, так и у отдалённых штаммов.

Таким образом, диссертационная работа выполнена и оформлена согласно требованиям, предъявляемым к диссертационным работам. Автореферат соответствует тексту диссертации, публикации автора полно отражают основное содержание работы. Основные научные положения и выводы диссертации в целом обоснованы экспериментально и биоинформатически.

Достоверность и обоснованность научных результатов

Достоверность полученных результатов подтверждается: использованием современных и валидированных методов (электронная микроскопия, секвенирование нового поколения, биоинформатические алгоритмы ViPTree, vConTACT2, VIRIDIC, Defense-finder); применением стандартных микробиологических подходов (метод двустороннего агара, метод последовательных разведений, qPCR); депонированием геномных последовательностей в международную базу данных NCBI GenBank (регистрационные номера приведены в тексте).

Материалы диссертационного исследования в необходимом объёме представлены в публикациях. Результаты, полученные в ходе работы, опубликованы в 6 статьях в рецензируемых научных журналах, индексируемых в базах данных Web of Science, Scopus и РИНЦ. Кроме того, основные результаты и положения диссертационного исследования были представлены автором на 13 российских и международных конференциях (Open-Bio, Evergreen, Европейский конгресс клинической микробиологии и инфекционных заболеваний и др.). Полученные результаты соответствуют пунктам 2, 6 и 8 паспорта специальности 1.5.3 – Молекулярная биология.

Общие вопросы и замечания

1. Обоснование выбора конкретных видов и штаммов бактерий и фагов.

В разделе 1.4 даны краткие описания *E. cloacae*, *S. maltophilia* и *A. popoffii* (всего около 1.5 страниц). Однако не объяснено, почему выбраны именно эти три вида, а не другие представители приоритетных патогенов ВОЗ (например, *Pseudomonas aeruginosa*, *Acinetobacter baumannii*). Каковы критерии сравнения этих видов (например,

наличие/отсутствие специфических рецепторов, профиль антибиотикорезистентности, особенности клеточной стенки). Какова общая гипотеза исследования, которая объединяет работу с тремя разными бактериями.

Для *E. cloacae* использован единственный штамм КЭМТК 2064 для изучения двух фагов (EC151, EC152). Почему выбран именно этот штамм из 80 протестированных? Для *S. maltophilia* выбраны пять штаммов (КЭМТК 2142, 2355, 3659, 3664, 3670). Из текста следует лишь, что они «чувствительны к фагу StM171». Не указано, сколько всего штаммов было протестировано и каковы критерии отбора именно этих пяти.

Введение не содержит четкой формулировки проблемы, которую решает работа, и гипотезы, которую проверяет автор. Из текста складывается впечатление, что это исключительно описательное исследование. Однако почему именно эти фаги? Почему их геномные особенности (модификация нуклеотидов, NAD⁺-путь) интересны? Чем эти фаги отличаются от многих уже описанных?

2. Содержание обзора литературы

Большая часть обзора (разделы 1.3.1–1.3.7, стр. 24–53) посвящена факторам, влияющим на коэволюцию фагов и бактерий. Однако в экспериментальной части коэволюции посвящён лишь один раздел (3.3, стр. 115–121), и полученные результаты, вероятно, имеют качественный характер. Обзору литературы недостает описания актуальных для этой работы бактерий-хозяев, особенно учитывая, что у *S. maltophilia* и *E. cloacae* известен широкий спектр систем антифаговой защиты, которые автор впоследствии изучает.

Также не хватает описания пути модификации 7-дезагуанина (preQ0) и пути восстановления NAD⁺, хотя они составляют часть основного научного открытия работы. Также недостает описания белков «измерительной рулетки» (tail tape measure protein), хвостовых белков и других, которые используются в таксономии фагов. Отсутствует четкое описание общепринятых критериев таксономической классификации фагов. Они упомянуты лишь вскользь на стр. 18 без детального обсуждения, хотя выводы о новых таксонах основаны именно на них.

Обзор литературы выиграл бы от включения краткого введения в биологию фагов, описания ключевых геномных особенностей, обзора современных подходов к таксономии фагов. Ввиду того, что существенная часть работы основана на методах биоинформатики, также не лишним было бы общее описание используемых подходов с точки зрения их принципов работы и логики совместного использования описанных инструментов в контексте эволюции бактериофагов.

3. Качество иллюстративного материала

Значительная часть рисунков выполнена с недостаточным разрешением, что затрудняет восприятие и проверку данных, что потребовало обратиться к оригинальным работам для оценки результатов. В частности, графы, которые несут лишь иллюстративную функцию, практически невозможно разглядеть. Размер подписей к рисункам зачастую не позволяет их распознать даже при увеличении.

4. Статистический анализ экспериментальных данных

По тексту диссертации не хватает информации о статистическом анализе и объеме выборок. Во всех случаях необходимо указать размеры выборок непосредственно при

изложении материала. В экспериментах по оценке литической активности не приведены никакие данные статистического анализа. В экспериментах по совместному действию антибиотиков и фага использовали двухфакторный дисперсионный анализ (ANOVA), что не совсем понятно, поскольку факторов более двух (разные антибиотики, наличие/отсутствие фага, разные штаммы). В тексте не указано, какие именно факторы включались в модель и каков их эффект. Также следует обосновать применение параметрического теста при небольшом размере выборки ($n=3$ на группу, если отталкиваться от материалов и методов). Следует пояснить, как удалось провести проверку на соответствие распределения нормальному при таком малом объеме выборки. Или же в этих экспериментах использован иной метод статистического анализа?

Также следует привести результаты апостериорных тестов. В частности, вывод о том, что «Наилучшие результаты по снижению биоупорядочивания были достигнуты разными комбинациями для разных штаммов: для КЭМТК 2142 - гентамицин+фаг» (стр. 110), нельзя считать обоснованным, если между группами гентамицин и гентамицин+фаг нет значимых отличий. В этом случае, фаг не меняет эффективность антибиотика (а именно проверка этого эффекта является задачей эксперимента). Такой вывод можно сделать только после проведения апостериорного теста и выявления значимых различий.

В изложении экспериментов по изменению чувствительности к антибиотикам (Раздел 3.2.2, стр. 111–113) не указан объем выборки для каждого штамма и антибиотика. В разделе 2.5.1 (стр. 61) сказано, что эксперимент проведен в трёх биологических повторах, но неясно, относятся ли эти повторы к каждому антибиотику или к каждому штамму в целом. Не указаны средние/медианные значения и стандартные ошибки/квартили на рисунке 30 (стр. 112). Представлены только единичные данные без мер разброса, что затрудняет оценку достоверности различий. Следует пояснить обоснование такой формы изложения результатов. Также следует обосновать выбор парного t-теста, поскольку выборки не выглядят зависимыми. Отсутствует описание использованной поправки на множественные сравнения.

В экспериментах по коэволюции использовано два повтора. Какие значения приведены на теплокартах? Следует ли считать этот анализ качественным, если не приведена информация о разбросах значений в двух повторах?

5. Описание биоинформатических методов (Раздел 2.5.8, стр. 64)

В разделе 2.5.8 соискатель указывает, что поиск систем защиты проводился с использованием Defense-finder «против базы данных RefSeq DB», а критерий покрытия $\geq 40\%$ «обеспечивает достоверность сходства нуклеотидных последовательностей». Следует пояснить, действительно ли поиск проводился именно для нуклеотидных, а не для аминокислотных последовательностей, и если так, то следует ли считать критерий покрытия $\geq 40\%$ оптимальным? Кроме того, насколько можно понять из описания, этот инструмент производит поиск с использованием встроенных профилей НММ (Hidden Markov Model). Какая база RefSeq DB имеется в виду в описании?

6. Отсутствие в тексте общей логической линии, которая позволила бы связать коэволюционные эксперименты с пангеномным анализом.

Разделы 3.3 и 3.4 выглядят как два независимых исследования, объединённых лишь общим объектом (*S. maltophilia*), но не общей гипотезой. Пангеномный анализ проведён

только для *S. maltophilia*, тогда как коэволюция включала также *E. cloacae*, для которой защитные системы не изучались. Кроме того, для *S. maltophilia* не проведён корреляционный анализ между наличием конкретных систем защиты у штамма КЭМТК 2355 и динамикой адаптации фагов StM171 и StenM174. Также следует пояснить, почему для полногеномного секвенирования выбраны именно штаммы 2142, 2355, 3659, 3664, 3670, а не клоны, полученные в ходе коэволюции.

Представленные замечания и вопросы, касающиеся методологии, статистической обработки и обоснования выбора объектов, не снижают общей высокой научной ценности диссертационной работы Ждида Гадира, но указывают на направления для возможной дискуссии в ходе защиты.

Заключение

Диссертационная работа Ждида Гадира «Изучение новых бактериофагов условно-патогенных бактерий и факторов, влияющих на их взаимодействие с бактериями» представляет собой завершённое научное исследование, выполненное на высоком методическом уровне. Автором получены новые фундаментальные данные о четырёх бактериофагах, предложены новые таксономические единицы, впервые проведён масштабный анализ систем антифаговой защиты *S. maltophilia*. Положительные аспекты работы не вызывают сомнений: научная новизна, практическая значимость, комплексный подход, качественный биоинформатический анализ, большой объём экспериментального материала. Диссертация содержит решение задачи, имеющей значение для развития молекулярной биологии и микробиологии – а именно, расширение представлений о геномном разнообразии и эволюции бактериофагов, а также о системах антифаговой защиты *S. maltophilia*.

По актуальности, научной новизне, методическому уровню, теоретической и практической значимости, обоснованности научных положений и выводов, полноте изложения материалов работы в печатных изданиях диссертационная работа Ждида Гадира соответствует требованиям пп. 2.1–2.5 Положения о присуждении учёных степеней в Институте химической биологии и фундаментальной медицины СО РАН, предъявляемым к кандидатским диссертациям, а её автор заслуживает присуждения искомой степени кандидата биологических наук по специальности 1.5.3 – Молекулярная биология.

Официальный оппонент

Кожевникова Елена Николаевна, к.б.н.

Заведующий лабораторией моделирования патологий человека
ФГБУН Институт молекулярной и клеточной биологии СО РАН

Проспект академика Лаврентьева, 8/2

Телефон: (383) 363-90-42

Адрес электронной почты: kozhevnikova@bionet.nsc.ru

Подпись: _____

Дата: _____

16.06.2026 г.

