

ЗАКЛЮЧЕНИЕ ДИССЕРТАЦИОННОГО СОВЕТА Д 350.002.01,
СОЗДАННОГО НА БАЗЕ ФЕДЕРАЛЬНОГО БЮДЖЕТНОГО УЧРЕЖДЕНИЯ
НАУКИ «ГОСУДАРСТВЕННЫЙ НАУЧНЫЙ ЦЕНТР ПРИКЛАДНОЙ
МИКРОБИОЛОГИИ И БИОТЕХНОЛОГИИ» ФЕДЕРАЛЬНОЙ СЛУЖБЫ ПО
НАДЗОРУ В СФЕРЕ ЗАЩИТЫ ПРАВ ПОТРЕБИТЕЛЕЙ И БЛАГОПОЛУЧИЯ
ЧЕЛОВЕКА РОССИЙСКОЙ ФЕДЕРАЦИИ ПО ДИССЕРТАЦИИ НА
СОИСКАНИЕ УЧЕНОЙ СТЕПЕНИ КАНДИДАТА НАУК

Аттестационное дело № _____

Решение диссертационного совета от 22.09.2023 г. № 20
о присуждении Дураковой Оксане Сергеевне, гражданину РФ, ученой степени
кандидата биологических наук.

Диссертация «Совершенствование методических подходов для оценки специфической активности антигенов холерной химической вакцины» по специальностям 1.5.11. Микробиология и 1.5.6. Биотехнология принята к защите 19.07.2023 г., протокол № 14 диссертационным советом 64.1.002.01, созданного на базе Федерального бюджетного учреждения науки «Государственный научный центр прикладной микробиологии и биотехнологии» Федеральной службы по надзору в сфере защиты прав потребителей и благополучия человека Российской Федерации, 142279, Московская обл., г.о. Серпухов, п. Оболенск, Территория «КварталА», д. 24, приказ о создании № 714/нк от 02.11.2012 г.

Соискатель Дуракова Оксана Сергеевна, 1992 г. рождения, в 2015 г. окончила Биологический факультет Федерального государственного бюджетного образовательного учреждения высшего профессионального образования «Саратовский национальный исследовательский государственный университет имени Н.Г. Чернышевского» по специальности «биология», работает научным сотрудником лаборатории холерных вакцин отдела профилактических препаратов в Федеральном казенном учреждении науки «Российский научно-исследовательский противочумный институт «Микроб» Федеральной службы по надзору в сфере защиты прав потребителей и благополучия человека Российской Федерации.

Диссертация выполнена в лаборатории холерных вакцин отдела профилактических препаратов Федерального казенного учреждения науки

«Российский научно-исследовательский противочумный институт «Микроб» Федеральной службы по надзору в сфере защиты прав потребителей и благополучия человека Российской Федерации.

Научные руководители – Громова Ольга Викторовна, кандидат медицинских наук, доцент, Федеральное казенное учреждение науки «Российский научно-исследовательский противочумный институт «Микроб» Федеральной службы по надзору в сфере защиты прав потребителей и благополучия человека Российской Федерации, лаборатория холерных вакцин, старший научный сотрудник; **Волох Оксана Александровна**, кандидат биологических наук, Федеральное казенное учреждение науки «Российский научно-исследовательский противочумный институт «Микроб» Федеральной службы по надзору в сфере защиты прав потребителей и благополучия человека Российской Федерации, отдел профилактических препаратов, заведующая отделом

Официальные оппоненты:

Саяпина Лидия Васильевна, доктор медицинских наук, старший научный сотрудник, Федеральное государственное бюджетное учреждение «Научный центр экспертизы средств медицинского применения» Министерства здравоохранения Российской Федерации, Управление экспертизы противобактериальных иммунобиологических препаратов, главный эксперт, г. Москва;

Кафтырева Лидия Алексеевна, доктор медицинских наук, Федеральное бюджетное учреждение науки «Санкт-Петербургский научно-исследовательский институт эпидемиологии и микробиологии им. Пастера» Федеральной службы по надзору в сфере защиты прав потребителей и благополучия человека Российской Федерации, лаборатория кишечных инфекций, заведующая лабораторией, г. Санкт-Петербург,

дали положительные отзывы на диссертацию.

Ведущая организация Федеральное казенное учреждение здравоохранения «Ставропольский научно-исследовательский противочумный институт» Федеральной службы по надзору в сфере защиты прав потребителей и благополучия человека Российской Федерации, г. Ставрополь, в своем

положительном заключении, подписанном доктором медицинских наук Таран Татьяной Викторовной, заведующей лабораторией подготовки специалистов, и кандидатом медицинских наук Русановой Дианой Владимировной, заведующей научно-производственной лабораторией препаратов для диагностики особо опасных и других инфекций, указала, что диссертация Дураковой О.С. выполнена на актуальную тему и является самостоятельной и завершенной научно-квалификационной работой, в которой содержится комплексное решение задачи совершенствования контроля качества холерной химической вакцины, соответствующим требованиям международных стандартов производства вакцинных препаратов, отвечает критериям пп. 9-14 «Положения о присуждении ученых степеней», утвержденного постановлением Правительства РФ № 842 от 24.09.2013 г.; в редакции постановлений Правительства РФ 30.07.2014 № 723, от 21.04.2016 № 335, от 02.08.2016 № 748, от 29.05.2017 № 650, от 28.08.2017 № 1024, от 01.10.2018 № 1168, от 20.03.2021 № 426, от 11.09.2021 № 1539, от 26.09.2022 №1690, от 26.01.2023 № 101, от 18.03.2023 № 415, предъявляемым к кандидатским диссертациям, а ее автор Дуракова Оксана Сергеевна заслуживает присуждения ученой степени кандидата биологических наук по специальностям 1.5.11. Микробиология и 1.5.6. Биотехнология.

Соискатель имеет **35** опубликованных работ, в том числе по теме диссертации опубликовано **26** работ, из них в рецензируемых научных изданиях опубликовано **9** работ и 1 патент РФ. Общий объем работ – 14,3 п. л.

Наиболее значимые научные работы по теме диссертации:

1. Гаева, А.В. Современные подходы к контролю активных компонентов холерной химической вакцины/ А.В. Гаева, О.В. Громова, **О.С. Дуракова**, С.В. Генералов, О.А. Волох // Разработ. Регистр. Лекарств. Средств. – 2018. – №1 (22). – С. 30-35. CAS, ИФ РИНЦ = 0,446, Цит = 6.

2. Воробьева, С.А. Возможность определения специфической активности О-Аг в производстве холерной химической вакцины с помощью дот-анализа / С.А. Воробьева, **О.С. Дуракова**, О.А. Волох, О.В. Громова // Изв. Саратовск. Универ. Нов. серия. Сер. Хим. Биол. Экол. – 2018. – Т. 18, Вып. 3. – С. 318-319. CAS, ИФ РИНЦ = 0,273, Цит = 6.

3. **Дуракова, О.С.** Применение дот-иммуноанализа для определения специфической активности антигенов в производстве холерной вакцины / **О.С. Дуракова**, О.В. Громова, М.Н. Киреев, С.А. Воробьева, О.Д. Клокова, Л.Ф. Ливанова, Н.И. Белякова, О.А. Волох // Вестн. Биотехнол. Физ.-Хим. Биол. Овчинникова. – 2018. – Т. 14, №4. – С. 10-13. CAS, ИФ РИНЦ = 0,108, Цит = 5.
4. Белякова, Н.И. Использование питательной среды на основе сухого гидролизата казеина в производстве бивалентной химической вакцины / Н.И. Белякова, Л.Ф. Ливанова, О.В. Громова, **О.С. Дуракова**, О.Д. Клокова, К. И. Холматов, М.В. Антонычева, З.Л. Девдариани, О.А. Волох // Пробл. Особо Опасн. Инф. – 2019. – №4. – С. 26-30. CAS, ИФ РИНЦ = 1,29, Цит = 0.
5. **Дуракова, О.С.** Экспериментальное обоснование возможности использования перевиваемой линии клеток СНО-К1 для определения специфической активности компонентов холерной химической вакцины / **О.С. Дуракова**, О.В. Громова, А.В. Гаева, С.В. Генералов, Л.Ф. Ливанова, О.Д. Клокова, О.А. Волох // Пробл. Особо Опасн. Инф. – 2019. – № 4. – С. 113-116. CAS, ИФ РИНЦ = 1,29, Цит = 4.
6. Гаева, А.В. Определение специфической активности компонентов холерной химической вакцины с использованием культуры клеток / А.В. Гаева О.В. Громова, **О.С. Дуракова**, С.В. Генералов, Л.Ф. Ливанова, О.А. Волох // Биотехнология. – 2020. – Т. 36. – №3. – С. 82-89. CAS, ИФ РИНЦ=0,506, Цит=3.
7. Киреев, М.Н. Изучение свойств холерного токсина и его дериватов в системе разработки новых вакцинных препаратов / М.Н. Киреев, О.В. Громова, **О.С. Дуракова**, С.А. Воробьева, Л.Ф. Ливанова, О.А. Волох // Вестн. Биотехнол. Физ.-Хим. Биол. Овчинникова. – 2022. – Т. 18, № 1. – С. 33-37. CAS, ИФ РИНЦ = 0,108, Цит = 0.
8. **Дуракова, О.С.** Изучение стабильности свойств штаммов *Vibrio cholerae* – продуцентов активных компонентов холерной химической вакцины / **О.С. Дуракова**, С.А. Воробьева, А.В. Гаева, Я.М. Краснов, О.С. Кузнецов, П.С. Ерохин, О.В. Громова, О.А. Волох // Пробл. Особо Опасн. Инф. – 2022. – № 2. – С. 70-74. CAS, ИФ РИНЦ = 1,29, Цит = 0.
9. Воробьева, С.А. Антигенные компоненты холерной бивалентной химической вакцины, методы их выделения и контроля / С.А. Воробьева, **О.С.**

Дуракова, О.В Громова, О.А. Волох, О.Д. Клокова, А.К. Никифоров // Пробл. Особо Опасн. Инф. – 2022. – № 2. – С. 12-19. CAS, ИФ РИНЦ = 1,29, Цит = 1.

10. Патент на изобретение № 2799574 Российская Федерация. Способ получения холерного токсина для контроля производства холерной химической вакцины / О.В Громова, М.Н. Киреев, О.С. Дуракова, Л.Ф. Ливанова, А.В. Гаева, С.А. Воробьева, О.А. Волох. Заявитель и правообладатель ФКУН Российский противочумный институт «Микроб» Роспотребнадзора. Опубл. 06.07.2023 г. Бюл. № 19

На диссертацию и автореферат поступило **5** положительных отзывов без замечаний от: **(1)** канд. мед. наук, доцента **Тихонова Сергея Николаевича**, директора Федерального государственного казенного учреждения здравоохранения «Противочумная станция Республики Крым» Роспотребнадзора, г. Симферополь; **(2)** канд. мед. наук **Гаевской Натальи Евгеньевны**, ведущего научного сотрудника лаборатории бактериофагов, и.о. начальника отдела диагностических препаратов Федерального казенного учреждения здравоохранения «Ростовский-на-Дону противочумный институт» Роспотребнадзора, г. Ростов-на-Дону; **(3)** д-ра биол. наук, профессора **Карпуниной Лидии Владимировны**, профессора кафедры микробиологии и биотехнологии Федерального государственного бюджетного образовательного учреждения высшего образования «Саратовский государственный университет генетики, биотехнологии и инженерии имени Н.И. Вавилова», г. Саратов; **(4)** д-ра биол. наук, доцента **Уткина Дениса Валерьевича**, профессора кафедры микробиологии и физиологии растений Биологического факультета Федерального государственного бюджетного образовательного учреждения высшего образования «Саратовский национальный исследовательский государственный университет им. Н.Г. Чернышевского» Минобрнауки, г. Саратов; **(5)** д-ра мед. наук **Мироновой Лилии Валерьевны**, заместителя директора по научной и лабораторно-диагностической работе Иркутского ордена Трудового Красного Знамени научно-исследовательского противочумного института Роспотребнадзора, г. Иркутск.

Выбор официальных оппонентов обосновывается тем, что доктор медицинских наук, с.н.с. **Саяпина Лидия Васильевна** является

высококвалифицированным специалистом в области разработки и внедрения лечебных и диагностических препаратов против особо опасных инфекционных заболеваний, имеет научные публикации в сфере исследований, соответствующей кандидатской диссертации Дураковой О.С. (**Пробл. Особо Опасн. Инф.** – 2022. – Т. 3. – С. 137-144; 2020. – № 1. – С. 69-75; 2020. – № 2. – С. 91-97; 2019. – № 3. – С. 87-93; 2018. – № 1. – С. 98-102; 2018. – № 3. – С. 40-45; **Биопреп. Профил. Диагн. Лечение.** – 2021. – Т. 21, № 4. – С. 234-243; 2018. – Т. 18, № 1 (65). – С. 42-49; **Vaccines.** – 2019. – Т. 7. – № 2. – С. 36; **Иммунология.** – 2018. – Т. 39, № 5-6. – С. 299-304);

доктор медицинских наук **Кафтырева Лидия Алексеевна** является высококвалифицированным специалистом-микробиологом по диагностике и профилактике кишечных инфекций и имеет научные публикации в сфере исследований, соответствующей кандидатской диссертации Дураковой О.С. (**Пробл. Мед. Микол.** – 2020. – Т. 22. № 4. – С. 54-59; – 2020. – Т. 22. № 3. – С. 101; 2020. – Т. 22, № 3. – С. 85; **Клин. Лаб. Диагн.** – 2020. – Т. 65. № 9. – С. 557-561; 2020. – Т. 65. № 5. – С. 308-315; 2020. – Т. 65. № 4. – С. 251-257; 2019. – Т. 64. № 10. – С. 620-626; 2019. – Т. 64. № 6. – С. 368-375; **Инф. Иммуно.** – 2020. – Т. 10. № 3. – С. 565-569; 2020. – Т. 10. № 1. – С. 99-110; 2018. – Т. 8. № 1. – С. 61-70; 2018. – Т. 8, № 3. – С. 349-354; **Front. Microbiol.** – 2019. – Vol. 10. – Article 2465; 2019. – Vol. 10. – Article 1755).

Назначение ведущей организации Федерального казенного учреждения здравоохранения «Ставропольский научно-исследовательского противочумный институт» Федеральной службы по надзору в сфере защиты прав потребителей и благополучия человека обосновано широкой известностью ее достижений в области научного обеспечения эпидемиологического надзора за опасными инфекционными болезнями бактериальной и вирусной этиологии, проведением разработки, усовершенствования и реализации научно-обоснованных мер и средств профилактики, диагностики и борьбы с этими болезнями, наличием публикаций в сфере исследований, соответствующей кандидатской диссертации Дураковой О.С. (**Пробл. Особо Опасн. Инф.** – 2021. – № 2. – С. 148-151; 2020. – № 3. – С. 83-88; 2018. – № 1. – С. 36-49; 2018. – № 3. – С. 46-49; 2018. – № 4. – С. 54-57; **Вестн. Биотехнол. Физ.-Хим. Био. Овчинникова.** – 2020. – Т. 16, № 3. –

С. 5-9; **Эпидемиол. Вакцинопроф.** – 2019. № 1. – С. 50-54; **Науч. Альманах.** – 201. № 3-2 (41). – С. 187-189), а также наличием ученых, являющихся безусловными специалистами по теме диссертации Дураковой О.С.

Диссертационный совет отмечает, что, на основании выполненных соискателем исследований:

разработан универсальный методический подход, позволяющий определять специфическую активность антигенов в компонентах и готовой лекарственной форме холерной химической вакцины на основе непрямого дот-иммуноанализа с использованием конъюгата, содержащего стафилококковый белок А, меченный коллоидным золотом, а также разработана оригинальная методика последовательного применения методов ультрафильтрации, ЛПС-адсорбции и гель-хроматографии, которая позволяет получать препарат холерного токсина (ХТ), соответствующий требованиям к СОП «Тест-токсин холерный»;

предложен алгоритм определения иммунохимической и биологической активности холерного токсина и холерогена-анатоксина, позволяющий на этапах производства холерной химической вакцины получать необходимые значения параметров промышленного регламента, на основе применения методов полимеразной цепной реакции (ПЦР), радиального пассивного иммунного гемолиза (РПИГ), иммуноферментного анализа с использованием GM₁-ганглиозидов (GM₁-ELISA), дот-иммуноанализа на основе конъюгата стафилококкового белка А, меченного коллоидным золотом (ДИА ЗНЧ) и тестов на клетках СНО-К1;

доказано, что стабильность культурально-морфологических свойств штаммов *Vibrio cholerae* 569В и М-41 в производственных условиях возможно определить при использовании перевиваемой клеточной линии СНО-К1, а также применении методов атомно-силовой (АСМ) и трансмиссионной электронной микроскопии (ТЭМ);

введены новые методы контроля основных специфических антигенов, входящих в состав холерной химической вакцины.

Теоретическая значимость исследования обоснована тем, что:

доказана целесообразность использования в производстве холерной химической вакцины новых методических подходов контроля качества (РПИГ, ПЦР, ДИА ЗНЧ, тест на клетках CHO-K1, GM₁-ELISA), имеющих целью замену методов *in vivo*, применяемых в технологии приготовления названного иммунобиологического лекарственного препарата. Результаты работы служат основой для исследований в сфере развития методических приемов оценки свойств специфических компонентов и готовой лекарственной формы вакцин.

Применительно к проблематике диссертации результативно использован комплекс существующих базовых методов исследования: микробиологических (бактериоскопический контроль чистоты бактериальной культуры в мазках с окраской по Граму; изучение морфологических свойств клеток с помощью методов АСМ и ТЭМ; цитологическое окрашивание культуры клеток по методу Романовского-Гимза; определение концентрации клеток); биотехнологических (культивирование бактерий; получение антигенов); биологических (определение активности ХТ методом кожной пробы по Крейгу; определения безопасности производственных штаммов-продуцентов; определение специфической активности ХА методом анатоксиносвязывания; определение специфической безопасности ХА; контроль остаточной холерогенности ХА; приготовление монослоя клеточной культуры); биохимических (выделение белков; денатурирующий электрофорез; концентрация белка; измерение рН), иммунохимических (иммуноблоттинг; иммуноферментный анализ; РДП; РПИГ; получение конъюгата ЗНЧ), молекулярно-генетических (полногеномное секвенирование; ПЦР), а также статистической обработки результатов.

изложены методические подходы к разработке и применению методов *in vitro* (РПИГ, ПЦР, ДИА ЗНЧ, тест на клетках CHO-K1, GM₁-ELISA), позволяющие производить контроль специфической активности основных антигенов холерной химической вакцины;

раскрыты принципы применения методов *in vitro*, которые позволяют одновременно определить иммунохимическую и биологическую активность специфических антигенов, что обеспечивает контроль качества антигенов на всех этапах производства холерной химической вакцины;

изучены свойства и морфометрические параметры (морфология, активность антигенов, вирулентность и токсигенность) производственных штаммов-продуцентов *Vibrio cholerae* 569В и М-41 с помощью новых методов (РПИГ, ПЦР, ДИА ЗНЧ, АСМ и ТЭМ, полногеномное секвенирование);

проведен ретроспективный анализ эффективности питательной среды для глубинного культивирования производственных штаммов холерного вибриона и оценена стабильность показателей количества биомассы не менее $(50 \pm 15) \times 10^9$ м.к./мл и выхода специфических антигенов на уровне показателей нормативной документации.

Значение полученных соискателем результатов исследования для практики подтверждается тем, что:

разработаны и внедрены Методические рекомендации «Применение ДОТ-иммуноанализа для определения специфической активности антигенов в производстве холерной вакцины», «Использование культуры клеток для анализа активности холерного токсина на этапах производства компонентов холерной химической вакцины» и «Определение специфической активности компонентов холерной вакцины с использованием культуры клеток» (акт внедрения от 14.06.2023 г.) – учрежденческий уровень внедрения;

определены условия максимальной продукции (200 ± 20 мг/л) холерного токсина штаммами *Vibrio cholerae* при культивировании в условиях биореактора (штамм-продуцент *Vibrio cholerae* КМ68, среда культивирования на основе ферментативного гидролизата фибрина);

создан комплекс методов *in vitro* (включающий РПИГ, ПЦР, ДИА ЗНЧ, тест на клетках CHO-K1, GM₁-ELISA) для практического использования при разработке, производстве и контроле качества холерных вакцин;

представлен новый методический подход, включающий в себя тесты на клетках CHO-K1, РПИГ, ПЦР, ДИА ЗНЧ и GM₁-ELISA, для определения специфической активности основных активных компонентов вакцины (холероген-анатоксин и О-антиген) и стабильного сохранения исходных параметров (морфология клеток, активность антигенов, вирулентность и токсигенность) штаммами-продуцентами при производстве «Вакцины холерной бивалентной, таблеток, покрытых кишечнорастворимой оболочкой», который

позволил сократить время процесса производства с 4 сут до 18 ч и уменьшить материальные затраты в 4 раза, по сравнению с таковыми при использовании методов *in vivo*.

Оценка достоверности результатов исследования выявила, что:

результаты получены на сертифицированном оборудовании, воспроизводимость результатов проверена в различных условиях с необходимым количеством повторов;

идея диссертационного исследования о замене методов определения специфической активности антигенов с использованием лабораторных животных на высокочувствительные, воспроизводимые методы *in vitro*, такие как РПИГ, ПЦР, ДИА ЗНЧ, тест на клетках CHO-K1, GM₁-ELISA, и разработка способов контроля стабильности штаммов-продуцентов (ПЦР, полногеномное секвенирование, АСМ и ТЭМ) опирается на анализ имеющихся в научной литературе экспериментальных и теоретических данных, обобщении опыта ведущих исследовательских групп по применению и изучению вопроса о необходимости разработки новых методов контроля специфической активности антигенов и стабильности штаммов-продуцентов;

установлена высокая корреляция полученных автором результатов определения специфической активности антигенов с использованием разработанных методических подходов с применением РПИГ, тест на клетках CHO-K1, ПЦР, ДИА ЗНЧ и GM₁-ELISA с результатами при использовании стандартных методов (кожная проба по Крейгу, холерогенность, РДП, реакция анатоксиносвязывания и остаточная холерогенность);

использованы современные методы получения и обработки информации в рамках систем сбора, обработки и визуализации данных: программы Microsoft Office Excel; определение грубых ошибок, при расчете среднего арифметического значения (M), среднего квадратичного отклонения (sx) и стандартной ошибки среднего (mM).

Личный вклад соискателя состоит в:

проведении автором лично следующих этапов работы: определение цели и задач работы, нахождение эффективных решений поставленных задач,

планирование с последующей постановкой экспериментов и интерпретацией результатов, оформление научных статей, разработка методических документов.

На заседании 22.09.2023 г. диссертационный совет принял решение присудить Дураковой О.С. за решение задачи совершенствования контроля качества холерной химической вакцины, соответствующего требованиям международных стандартов при производстве вакцинных препаратов, ученую степень кандидата биологических наук.

При проведении тайного голосования диссертационный совет в количестве **19** человек, из них **9** докторов наук по специальности 1.5.11. Микробиология и **9** докторов наук по специальности 1.5.6. Биотехнология, участвовавших в заседании, из **23** человек, входящих в состав совета, проголосовали: за **19**, против **0**, недействительных бюллетеней **нет**.

Председатель
диссертационного совета
академик РАН, д.м.н., профессор



(Дятлов Иван Алексеевич)

Ученый секретарь
диссертационного совета
к.б.н.

(Фурсова Надежда Константиновна)

Дата оформления Заключения – 22.09.2023 г.

Печать организации, на базе которой создан диссертационный совет.