

ЗАКЛЮЧЕНИЕ ДИССЕРТАЦИОННОГО СОВЕТА 64.1.002.01 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 15.04.2022 г. № 10
о присуждении Гавриловой Юлии Кирилловне, гражданину РФ, ученой
степени кандидата биологических наук.

Диссертация «Разработка метода контроля уровня вируснейтрализующих антител на модели клеточных культур в производстве антирабического иммуноглобулина» по специальности 1.5.6. Биотехнология принята к защите 04.02.2022 г., протокол № 1 диссертационным советом 64.1.002.01 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 «Квартал А», д. 24, приказ о создании № 714/нк от 02.11.2012 г.

Соискатель Гаврилова Юлия Кирилловна, 1993 г. рождения, в 2015 г. окончила Саратовский государственный университет им. Н.Г. Чернышевского по специальности «Биология», работает научным сотрудником в лаборатории профилактических иммуноглобулинов Федерального казенного учреждения здравоохранения «Российский научно-исследовательский противочумный институт «Микроб» Федеральной службы по надзору в сфере защиты прав потребителей и благополучия человека.

Диссертация выполнена в лаборатории профилактических иммуноглобулинов Федерального казенного учреждения здравоохранения «Российский научно-исследовательский противочумный институт «Микроб»

Федеральной службы по надзору в сфере защиты прав потребителей и благополучия человека.

Научный руководитель – кандидат биологических наук (специальность 1.5.6. Биотехнология) Генералов Сергей Вячеславович, Федеральное казенное учреждение здравоохранения «Российский научно-исследовательский противочумный институт «Микроб» Федеральной службы по надзору в сфере защиты прав потребителей и благополучия человека, лаборатория профилактических иммуноглобулинов, ведущий научный сотрудник.

Официальные оппоненты:

Клюкина Валентина Ивановна, доктор биологических наук (специальность 1.5.6. Биотехнология), профессор, Федеральное государственное бюджетное научное учреждение «Всероссийский научно-исследовательский и технологический институт биологической промышленности» Министерства науки и высшего образования Российской Федерации, отдел иммунологии, заведующая отделом, Московская область, Щелковский район, поселок Биокомбината,

Сизикова Татьяна Евгеньевна, кандидат биологических наук (специальность 6.2.10). Поражающее действие специальных видов оружия, средства и способы защиты), Федеральное государственное бюджетное учреждение «48-й Центральный научно-исследовательский институт Министерства обороны Российской Федерации», 1 научно-исследовательский испытательный отдел, научный сотрудник, г. Сергиев Посад,

дали положительные отзывы на диссертацию.

Ведущая организация: Федеральное государственное бюджетное учреждение «Научный центр экспертизы средств медицинского применения» Министерства здравоохранения Российской Федерации, г. Москва, в своем положительном заключении, подписанном доктором мед. наук, профессором Мовсесянцем Арташесом Аваковичем, начальником Испытательного центра экспертизы качества, указала, что диссертационная работа Гавриловой Юлии Кирилловны «Разработка метода контроля уровня вируснейтрализующих антител на модели клеточных культур в производстве антирабического

иммуноглобулина» является законченной и самостоятельной научной работой. В результате проведенных исследований разработан и предложен метод определения уровня вируснейтрализующих антител в антирабических сыворотках и препарате антирабического иммуноглобулина на модели клеточных культур *in vitro*, что следует квалифицировать как решение задачи, имеющей значение для совершенствования контроля качества иммунобиологического лекарственного препарата, предназначенного для постэкспозиционной профилактики бешенства.

Соискатель имеет **24** опубликованные работы, в том числе по теме диссертации опубликовано **16** работ, из них **4** статьи в рецензируемых изданиях, **1** патент на изобретение и **11** работ в других изданиях. Общий объем работ – 5,1 п. л.

Наиболее значимые научные работы по теме диссертации:

1. **Гаврилова, Ю.К.** Экспресс-анализ активности антирабических сывороток и иммуноглобулина в клеточных культурах методом иммунофлуоресценции / **Ю.К. Гаврилова, С.В. Генералов, Е.Г. Абрамова** // **Биотехнология**. – 2018. – Т. 34, № 4. – С. 83–88. Scopus, ИФ РИНЦ = 0,706, Цит. = 8.

2. Генералов, С.В. Биоэтические аспекты совершенствования производства антирабического иммуноглобулина в России / С.В. Генералов, Е.Г. Абрамова, **Ю.К. Гаврилова** // **БИОпрепараты. Профилактика, диагностика, лечение**. – 2020. – Т. 20, № 2. – С. 89–96. CAS, ИФ РИНЦ = 0,544, Цит. = 0.

3. **Гаврилова, Ю.К.** Методы *in vitro* для выявления вируса бешенства и оценка их использования в производстве антирабического иммуноглобулина / **Ю.К. Гаврилова, С.В. Генералов, Е.Г. Абрамова, А.К. Никифоров** // **БИОпрепараты. Профилактика, диагностика, лечение**. – 2021. – Т. 21, № 2. – С. 76–84. CAS, ИФ РИНЦ = 0,544, Цит. = 0.

4. **Пат. РФ № 2673718.** Питательная среда для культивирования перевиваемых клеточных линий млекопитающих / С.В. Генералов, М.В. Антонычева, Е.Г. Абрамова, К.И. Холматов, И.М. Жулидов, А.Д. Белоусов, **Ю.К. Гаврилова, А.К. Никифоров.** Заявитель и патентообладатель ФКУЗ РосНИПЧИ «Микроб». Опубл. 29.11.2018. – Бюл. № 34. – 8 с.

На диссертацию и автореферат поступило **5** положительных отзывов без замечаний от: **(1)** д-ра биол. наук **Мельниковой Ольги Витальевны**, старшего научного сотрудника лаборатории природно-очаговых вирусных инфекций Иркутского противочумного института Роспотребнадзора, г. Иркутск; **(2)** д-ра биол. наук **Жарниковой Ирины Викторовны**, ведущего научного сотрудника научно-производственной лаборатории препаратов для диагностики особо опасных и других инфекций Ставропольского противочумного института Роспотребнадзора, г. Ставрополь; **(3)** д-ра биол. наук, проф. **Григорьевой Галины Ивановны**, главного научного сотрудника отдела научного планирования и информационно-аналитической работы Нижегородского научно-исследовательского института эпидемиологии и микробиологии им. академика И.Н. Блохиной Роспотребнадзора, г. Нижний Новгород; **(4)** д-ра биол. наук, старшего научного сотрудника **Дыкмана Льва Абрамовича**, ведущего научного сотрудника лаборатории иммунохимии Института биохимии и физиологии растений и микроорганизмов – обособленного структурного подразделения Федерального государственного бюджетного учреждения науки Федерального исследовательского центра «Саратовский научный центр Российской академии наук» Минобрнауки Российской Федерации, г. Саратов; **(5)** канд. биол. наук **Кретенчук Оксаны Федоровны**, старшего научного сотрудника отдела научного и учебно-методического обеспечения Ростовского-на-Дону противочумного института Роспотребнадзора, г. Ростов-на-Дону.

Выбор официальных оппонентов обосновывается тем, что доктор биологических наук, профессор Клюкина Валентина Ивановна является признанным специалистом в сфере рабиологии и производства препаратов для профилактики бешенства, имеет научные публикации в сфере исследований, соответствующей кандидатской диссертации Гавриловой Ю.К. (**Вопр. Вирусол.** – **2021.** – Т. 66, № 5. – С. 354–367; **Ветерин. Кормление.** – **2021.** – № 1. – С. 17–19; **2021.** – № 1. – С. 52–56; **2020.** – № 2. – С. 4–8; **2019.** – № 5. – С. 17–18; **2019.** – № 5. – С. 38–40; **2019.** – № 3. – С. 29–31; **2017.** – № 2. – С. 6–9; **Вестн. Биотехнол. Физ.-Хим. Биол. им. Ю.А. Овчинникова.** – **2021.** – Т. 17,

№ 1. – С. 62–75; Пат. RU 2704970 С1, 01.11.2019; **Ветеринария.** – 2017. – № 4. – С. 3–11);

кандидат биологических наук Сизикова Татьяна Евгеньевна является признанным специалистом в сфере вирусологии и профилактики болезней, вызываемых вирусами, имеет научные публикации в сфере исследований, соответствующей кандидатской диссертации Гавриловой Ю.К. (**Иммунол.**– 2020. – Т. 41, № 5. – С. 411–420; **Пробл. Особо Опасн. Инф.** – 2020. – № 4. – С. 41–46; 2019. – № 3. – С. 26–33; 2018. – № 2. – С. 30–36; 2017. – № 2. – С. 50–53; **Биопреп. Профилак. Диагност. Леч.** – 2020. – Т. 20, № 2. – С. 103–106; 2020. – Т. 20, № 4. – С. 216–227; **Терапевт. Архив.** – 2019. – Т. 91, № 11. – С. 98–104; **Вопр. Вирусол.** – 2018. – Т. 63, № 1. – С. 5–10; 2018. – Т. 63, № 6. – С. 245–249; 2017. – Т. 62, № 4. – С. 149–153).

Назначение ведущей организации обосновано широкой известностью ее достижений в сфере экспертизы лекарственных средств и наличием публикаций в сфере исследований, соответствующей кандидатской диссертации Гавриловой Ю.К. (**Эпид. Вакцинопроф.** – 2021. – Т. 20, № 5. – С. 115–122; **Иммунология.** – 2021. – Т. 42, № 4. – С. 403–414; **Биопреп. Профил. Диагнт. Леч.** – 2021. – Т. 21, № 3. – С. 193–199; 2021. – Т. 21, № 1. – С. 20–30; 2020. – Т. 20, № 1. – С. 21–29; 2020. – Т. 20, № 3. – С. 159–173; 2020. – Т. 20, № 4. – С. 245–256; 2019. – Т. 19, № 1. – С. 10–16; **Вопр. Вирусол.** – 2019. – Т. 64, № 6. – С. 298–305; **Хим.-Фармац. Журнал.** – 2019. – Т. 53, № 7. – С. 54–58; 2017. – Т. 51, № 2. – С. 40–45; **Ведом. Науч. Цен. Эксперт. Средств Мед. Прим.** – 2019. – Т. 9, № 1. – С. 49–53; 2017. – Т. 7, № 4. – С. 242–250), а также наличием ученых, являющихся авторитетными специалистами по теме диссертации Гавриловой Ю.К.

Диссертационный совет отмечает, что на основании выполненных соискателем исследований:

разработан метод контроля уровня антител к вирусу бешенства в антирабических сыворотках и иммуноглобулине с применением клеточной культуры, для использования на этапах производства препарата гетерологичного антирабического иммуноглобулина;

предложено применение питательной среды на основе сухого ферментативного гидролизата фибрина, являющегося отходом производства препарата гетерологичного антирабического иммуноглобулина, для

культивирования перевиваемой клеточной линии Vero, инфицированной вирусом бешенства «Москва 3253_{Vero}», с целью получения рибонуклеопротеина вируса бешенства, что позволило увеличить выход рибонуклеопротеина, выделяемого из инфицированной 72-часовой культуры Vero, в $(1,45 \pm 0,05)$ раза, по сравнению с таковым при использовании коммерческих питательных сред 199 и Игла MEM;

предложено применение наночастиц коллоидного золота в качестве адьюванта при иммунизации кроликов рибонуклеопротеином вируса бешенства, обеспечивающее получение сывороток с вдвое большим содержанием антител к рибонуклеопротеину, чем при иммунизации животных с использованием полиоксидония или без применения адьюванта;

доказано существование высокой корреляции и согласованности результатов определения специфической активности антирабических сывороток и иммуноглобулина, полученных разработанным методом *in vitro* и нормативным методом *in vivo*, что указывает на возможность применения аналитической системы, включающей разработанный методический прием и разработанный стандартный образец предприятия специфической активности антирабического иммуноглобулина для применения в реакции нейтрализации вируса на культуре клеток, при проведении контрольных исследований на этапах производства препарата гетерологичного антирабического иммуноглобулина;

введены принципы дальнейшего совершенствования методов проведения контрольных исследований гетерологичного антирабического иммуноглобулина, основанные на использовании клеточных культур.

Теоретическая значимость исследования обоснована тем, что:

доказано, что применение питательной среды на основе сухого ферментативного гидролизата фибрина при культивировании инфицированных вирусом бешенства клеток Vero, позволяет увеличить выход выделяемого из цитоплазмы клеток рибонуклеопротеина в $(1,45 \pm 0,05)$ раза, по сравнению с коммерческими питательными средами 199 и Игла MEM; подтверждена возможность использования на этапах производства препарата гетерологичного

антирабического иммуноглобулина новых методических приемов определения показателя «специфическая активность» с целью сокращения срока исследования и исключения необходимости использования большого количества стандартных лабораторных животных. Изложенные в диссертации результаты служат теоретической основой для исследований, целью которых является совершенствование контроля этапов производства антирабических препаратов;

применительно к проблематике диссертации результативно использован комплекс существующих базовых методов исследования: биотехнологических (культивирование перевиваемых клеточных культур, культивирование вируса бешенства на клеточных культурах); вирусологических (вычисление LD₅₀, определение титра вируса бешенства и показателя специфической активности антирабического иммуноглобулина); биологических (иммунизация животных, забор крови методом тотального обескровливания); биохимических, биофизических, физико-химических и иммунохимических (выделение рибонуклеопротеина вируса бешенства, определение концентрации водородных ионов в растворе, электрофорез в полиакриламидном геле в присутствии додецилсульфата натрия, определение содержания белка, выделение сыворотки крови, дот-иммуноанализ, иммуноферментный анализ, осаждение иммуноглобулинов сульфатом аммония, получение конъюгата антител к рибонуклеопротеину с флуоресцеинизотиоцианатом и Alexa Fluor (532 нм), люминесцентная микроскопия) и статистических (вычисление титра антител и инфицирующих доз (lgLD₅₀ и lg ID₅₀) вируса бешенства методом Рида и Менча; обработка результатов, полученных при разработке стандартного образца предприятия специфической активности антирабического иммуноглобулина, в соответствии с общей фармакопейной статьей «Статистическая обработка результатов определения специфической фармакологической активности лекарственных средств биологическими методами», сравнение результатов исследования активности в тестах *in vitro* и *in vivo* методом Блэнда-Алтмана и методом вычисления коэффициента корреляции Пирсона, вычисления значений

активности антирабических сывороток и иммуноглобулина с применением программы Microsoft Office Excel 2010 и «Программы для расчета результатов реакции нейтрализации вируса бешенства на белых мышах по методу Рида и Менча» (Свидетельство о государственной регистрации № 2016617051 от 23.06.2016) методов;

изложены сведения об увеличении уровня антител к рибонуклеопротеину вируса бешенства в 2 раза при иммунизации кроликов породы «Шиншилла» с применением наночастиц коллоидного золота в качестве адъюванта, по сравнению с результатами иммунизации с применением полиоксидония либо без использования адъюванта;

раскрыты данные об эффективности применения антител к рибонуклеопротеину вируса бешенства штамма «Москва 3253_{Vero}», конъюгированных с флуорохромными красителями флуоресцеинизотиоцианатом либо Alexa Fluor (532 нм), по сравнению с коммерческим флуоресцирующим конъюгатом антирабического иммуноглобулина, при обнаружении вируса бешенства на клеточных культурах;

изучены особенности репродукции вируса бешенства на перевиваемых клеточных линиях в различных условиях и установлены оптимальные параметры проведения реакции нейтрализации вируса бешенства на клеточной культуре, такие как вид клеточной культуры, рабочая доза вируса бешенства, тип фиксирующего вещества и период фиксации клеточного монослоя, период окрашивания образцов экспериментальными и коммерческим флуоресцирующими конъюгатами, время нейтрализации вируса, оптимальное время учета результатов нейтрализации на культуре клеток;

проведена модернизация подхода к определению показателя «специфическая активность» препарата гетерологичного антирабического иммуноглобулина, заключающаяся в разработке метода с применением клеточной культуры, сопоставимого по чувствительности с классическим способом определения «специфической активности» антирабического

иммуноглобулина *in vivo*, позволяющего сократить время проведения анализа с 14 до 3 сут, а также исключить использование лабораторных животных;

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

разработаны и внедрены: питательная среда на основе ферментативного гидролизата фибрина для культивирования клеточных культур млекопитающих, применение которой позволяет снизить финансовые инвестиции на приобретение коммерческих питательных сред при проведении научных работ, связанных с исследованием действия вирусов и токсинов на жизнеспособность клеточных культур, проведением процессов культивирования вируса бешенства и выделением его антигенов, а также развивать малоотходные технологии производства иммунобиологических препаратов с целью снижения экологической нагрузки на окружающую среду (**Пат. РФ № 2673718** от 29.11.2018 г., **Акт внедрения ФКУЗ РосНИПЧИ «Микроб» от 15.11.21**) – учрежденческий уровень внедрения;

методические рекомендации по выделению и очистке рибонуклеопротеина вируса бешенства культурального происхождения с целью дальнейшего использования для количественной оценки вируса бешенства в материале для иммунизации продуцентов («Выделение нуклеопротеина из аттенуированного вируса бешенства» (одобрен Ученым Советом и утверждены директором РосНИПЧИ «Микроб», протокол № 5 от 19.12.2017, **Акт внедрения от 15.11.21**) – учрежденческий уровень внедрения;

методические рекомендации «Определение специфической активности антирабических сывороток и иммуноглобулина методом иммунофлуоресценции на клеточных культурах» (одобрен Ученым Советом и утвержден директором РосНИПЧИ «Микроб». Протокол № 4 от 6.06.2018, **Акт внедрения от 15.11.21**) – учрежденческий уровень внедрения;

стандартный образец предприятия (серия 41-01-20) специфической активности антирабического иммуноглобулина для применения в реакции нейтрализации вируса бешенства на клеточной культуре, предназначенный для исследований, целью которых является внедрение разработанного метода *in*

in vitro в производство препарата антирабического иммуноглобулина; разработанный стандартный образец внесен в реестр стандартных образцов предприятия, допущенных к применению в экспериментально-производственных подразделениях ФКУЗ РосНИПЧИ «Микроб». Разработана и утверждена директором ФКУЗ РосНИПЧИ «Микроб» «Инструкция по применению на стандартный образец предприятия специфической активности иммуноглобулина антирабического для применения в реакции нейтрализации вируса на культуре клеток» от 01.12.2020 (**Акт внедрения от 15.11.21**) - учрежденческий уровень внедрения;

определены перспективы внедрения разработанного методического приема по определению уровня вируснейтрализующих антител *in vitro* в практику производства препарата гетерологичного антирабического иммуноглобулина при определении активности готового иммунобиологического лекарственного средства, а также перспективы использования метода для массового мониторинга индивидуальных показателей активности антирабических сывороток продуцентов;

созданы образцы конъюгатов антител к рибонуклеопротеину вируса бешенства «Москва 3253_{Vero}» с флуоресцентными метками флуоресцеинизотиоцианат и Alexa Fluor (532 нм) для использования в реакции нейтрализации вируса бешенства на клеточной культуре;

представлены рекомендации по внедрению результатов исследования в производство иммунобиологического лекарственного средства «Иммуноглобулин антирабический из сыворотки крови лошади жидкий», для определения его специфической активности *in vitro* при проведении выпускающего контроля качества производителем и подтверждения соответствия требованиям нормативной документации уполномоченными учреждениями Минздрава РФ, с целью ввода в гражданский оборот, а также по использованию полученных данных для оперативного контроля уровня специфических антител в иммунных сыворотках крови лошадей в процессе производственной эксплуатации и индивидуальной оценки напряженности иммунитета каждого продуцента.

Оценка достоверности результатов исследования выявила, что:

результаты исследования получены в экспериментах с использованием аттестованного оборудования, метрологически поверенных контрольно-измерительных приборов, статистических методов обработки данных; воспроизводимость результатов подтверждена экспериментами, проведенными с необходимым количеством повторов, при этом применены современные методы биотехнологии (культивирование клеточных культур и вируса бешенства);

идея диссертационного исследования базируется на анализе имеющихся в литературе данных отечественных и зарубежных исследователей, посвященных вопросам разработки методов определения вируса бешенства и антител к нему и его компонентам, а также иммунизации животных, получения флуоресцирующих конъюгатов антител;

установлена корреляция и согласованность результатов, полученных при определении специфической активности антирабических сывороток и иммуноглобулина с использованием разработанного методического приема с применением культуры клеток и в стандартной реакции нейтрализации вируса на белых мышах;

использованы современные методы обработки информации и визуализации данных, в частности программы Microsoft Office Excel 2010 и «Программа для расчета результатов реакции нейтрализации вируса бешенства на белых мышах по методу Рида и Менча» (ФКУЗ РосНИПЧИ «Микроб», Россия, свидетельство о государственной регистрации № 2016617051 от 23.06.2016).

Личный вклад соискателя состоит в планировании и выполнении экспериментов, нахождении эффективных решений поставленных задач, интерпретации результатов, оформлении научных статей, патента на изобретение, разработке методических документов, написании текстов диссертации и автореферата.

На заседании 15.04.2022 г. диссертационный совет принял решение присудить Гавриловой Ю.К. ученую степень кандидата биологических наук за комплексное решение актуальной задачи по разработке метода *in vitro* для контроля вируснейтрализующих антител в препарате антирабического иммуноглобулина, что имеет существенное значение для сферы производства лекарственных препаратов, предназначенных для постэкспозиционной профилактики бешенства.

При проведении тайного голосования диссертационный совет в количестве 21 человек, из них 9 докторов наук по специальности 1.5.6. Биотехнология, участвовавших в заседании, из 23 человек, входящих в состав совета, проголосовали: за 21, 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 – 15.04.2022 г.

Печать организации, на базе которой создан диссертационный совет.