

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 08.10.2021 г. №27  
о присуждении Гостищевой Светлане Евгеньевне, гражданке РФ, ученой  
степени кандидата биологических наук.

**Диссертация** «Совершенствование биотехнологии производства и  
оценки качества вакцины чумной живой» по специальности 03.01.06 –  
биотехнология (в том числе бионанотехнологии) принята к защите  
10.06.2021 г., протокол № 13 диссертационным советом Д 350.002.01,  
созданным 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** Гостищева Светлана Евгеньевна, 1981 г. рождения, в 2003 г.  
окончила Биологический факультет Ставропольского государственного  
университета по специальности «Биология». С 2004 г. работает биологом  
научно-производственной лаборатории чумных вакцин в Федеральном  
казенном учреждении здравоохранения «Ставропольский научно-  
исследовательский противочумный институт» Федеральной службы по надзору  
в сфере защиты прав потребителей и благополучия человека.

**Диссертация** выполнена в научно-производственной лаборатории  
чумных вакцин в Федеральном казенном учреждении здравоохранения  
«Ставропольский научно-исследовательский противочумный институт»

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

**Научный руководитель** – доктор медицинских наук (специальность 03.02.03 – микробиология) Куличенко Александр Николаевич, член-корреспондент Российской академии наук, профессор, директор Федерального казенного учреждения здравоохранения «Ставропольский научно-исследовательский противочумный институт» Федеральной службы по надзору в сфере защиты прав потребителей и благополучия человека.

**Официальные оппоненты:**

Комиссаров Александр Владимирович, доктор биологических наук (специальность 03.01.06 - биотехнология (в том числе бионанотехнологии), профессор, Федеральное казенное учреждение здравоохранения «Российский научно-исследовательский противочумный институт «Микроб» Федеральной службы по надзору в сфере защиты прав потребителей и благополучия человека, главный научный сотрудник;

Саяпина Лидия Васильевна, доктор медицинских наук (специальность 03.02.03 – микробиология), старший научный сотрудник, Федеральное государственное бюджетное учреждение «Научный центр экспертизы средств медицинского применения» Министерства здравоохранения Российской Федерации, Управление экспертизы противобактериальных медицинских иммунобиологических препаратов, главный эксперт,

дали положительные отзывы на диссертацию.

**Ведущая организация**

Федеральное государственное бюджетное научное учреждение «Научно-исследовательский институт вакцин и сывороток им. И.И. Мечникова» Федерального агентства научных организаций, г. Москва, в своем положительном заключении, подписанном Михайловой Натальей Александровной, доктором биологических наук, профессором, руководителем научного направления по иммунобиотехнологии, указала, что диссертационная работа представляет собой самостоятельную законченную квалификационную работу, в которой на основании проведенного исследования решена актуальная научная задача по совершенствованию биотехнологии производства и оценки

качества чумной вакцины, в том числе: разработана и апробирована для промышленного производства чумной вакцины питательная среда на основе ферментативного гидролизата «кукурузного экстракта сгущенного»; оптимизирована технология производственного процесса; обоснована возможность применения метода клеточного антиген-стимулированного теста (КАСТ) для контроля качества вакцины чумной по показателю иммуногенности. Это представляет научную и практическую значимость для совершенствования биотехнологии производства и оценки качества чумной вакцины. Диссертация и автореферат полностью соответствуют требованиям пункта 9 «Положения о порядке присуждения учёных степеней», утвержденного постановлением Правительства РФ от 24.09.2013 № 842 (в редакции Постановления РФ от 01.10.2018, с изм. от 26.05.2020), предъявляемым к кандидатским диссертациям, а диссертант заслуживает присвоения ученой степени кандидата биологических наук по специальности 03.01.06 – биотехнология (в том числе бионанотехнологии).

Соискатель имеет **64** опубликованные работы, в том числе по теме диссертации опубликовано **24** работы, из них в рецензируемых научных изданиях опубликовано **3** работы, **3 патента** на изобретение. Общий объем работ – 3,2 п. л.

Наиболее значимые научные работы по теме диссертации:

1. Куличенко, А.Н. Использование антигенспецифических клеточных тестов *in vitro* для оценки формирования поствакцинального противочумного иммунитета / А.Н. Куличенко, Н.В. Абзаева, **С.Е. Гостищева**, Е.Л. Ракитина, Д.Г. Пономаренко, М.В. Костюченко // **Инфекция и иммунитет.** – **2017.** – Т. 7, № 2. – С. 203-208. РИНЦ, Scopus, IF= 0,751. Количество цитирований: 11

2. **Гостищева, С.Е.** Оптимизация метода получения пестина ПП и изучение его специфической активности *in vitro* / **С.Е. Гостищева**, Н.В. Абзаева, Д.А. Ковалев, Д.Г. Пономаренко, Ю.В. Сирица, Е.Л. Ракитина, Е.Н. Афанасьев, М.В. Костюченко // **Инфекция и иммунитет.** – **2018.** – Т. 8, № 1. – С. 85-90. РИНЦ, Scopus, IF= 0,751. Количество цитирований: 1

3. **Гостищева, С.Е.** Мониторинг стабильности вакцины чумной живой, приготовленной с использованием питательной среды на основе

гидролизата кукурузного экстракта сгущенного / **С.Е. Гостищева**, Н.В. Абзаева, Г.Ф. Иванова, Л.С. Катунина, Д.В. Ростовцева, А.В. Костроминов // **Проблемы особо опасных инфекций.** – 2019. – № 4. – С. 37-40. РИНЦ, Scopus, IF= 0, 617.

4. **Патент RU № 2626568** Российская Федерация. Питательная среда плотная для культивирования и сбора биомассы чумного микроба вакцинного штамма *Y. pestis* EV / Катунина Л.С., Куличенко А.Н., Курилова А.А., Будыка Д.А., Абзаева Н.В., **Гостищева С.Е.**, Ковтун Ю.С., Коготкова О.И. (RU); опуб. 28.07.2017. – Бюл. № 22. – 8 с.

5. **Патент RU № 2680697** Российская Федерация. Способ оценки иммуногенности вакцины чумной живой с использованием антигенспецифических клеточных тестов *in vitro* / Абзаева Н.В., **Гостищева С.Е.**, Пономаренко Д.Г., Ракитина Е.Л., Костюченко М.В., Логвиненко О.В., Катунина Л.С., Тюменцева И.С., Афанасьев Е.Н., Курчева С.А., Куличенко А.Н. (RU); опуб. 19.02.2019. – Бюл. № 6. – 8 с.

6. **Патент RU № 2725872** Российская Федерация. Способ применения комплекса водорастворимых антигенов чумного микроба для оценки уровня противочумного иммунитета / Абзаева Н.В., **Гостищева С.Е.**, Ракитина Е.Л., Костюченко М.В., Логвиненко О.В., Пономаренко Д.Г., Катунина Л.С., Тюменцева И.С., Афанасьев Е.Н., Курчева С.А., Куличенко А.Н. (RU); опуб. 07.07.2020. – Бюл. № 19. – 6 с.

На диссертацию и автореферат поступило **8** положительных отзывов без замечаний от: **(1)** канд. мед. наук **Витязевой Светланы Александровны**, заведующей отделом микробиологии чумы Иркутского научно-исследовательского противочумного института Роспотребнадзора, г. Иркутск; **(2)** канд. биол. наук **Лобовиковой Оксаны Анатольевны**, заведующей отделом биологического и технологического контроля Российского научно-исследовательского противочумного института «Микроб» Роспотребнадзора, г. Саратов; **(3)** канд. биол. наук **Молчановой Елены Владимировны**, старшего научного сотрудника лаборатории арбовирусных инфекций Волгоградского научно-исследовательского противочумного института Роспотребнадзора, г. Волгоград; **(4)** канд. мед. наук **Левченко Дарьи Александровны**, старшего

научного сотрудника отдела микробиологии холеры и других острых кишечных инфекций Ростовского-на-Дону противочумного института Роспотребнадзора, г. Ростов-на-Дону; **(5)** канд. биол. наук **Носова Никиты Юрьевича**, заместителя начальника моделирования биологических угроз Центра стратегического планирования и управления медико-биологическими рисками здоровью Федерального медико-биологического агентства России, г. Москва; **(6)** канд. биол. наук **Мелиховой Александры Вадимовны**, старшего научного сотрудника лаборатории иммунобиологических препаратов Московского научно-исследовательского института эпидемиологии и микробиологии им. Г.Н. Габричевского, г. Москва; **(7)** канд. биол. наук **Охлопковой Олеси Викторовны**, старшего научного сотрудника отдела биофизики и экологических исследований Государственного научного центра вирусологии и биотехнологии «Вектор» Роспотребнадзора, р.п. Кольцово Новосибирской обл.; **(8)** канд. биол. наук **Чуриловой Татьяны Михайловны**, доцента кафедры биотехнологии Ставропольского государственного медицинского университета Минздрава России, г. Ставрополь.

Выбор официальных оппонентов обосновывается тем, что доктор биологических наук, профессор **Комиссаров Александр Владимирович** является признанным специалистом в области нанотехнологии и биотехнологии, имеет научные публикации в сфере исследований, соответствующей кандидатской диссертации Гостищевой С.Е. (**Пробл. Особо Опасн. Инф.** – 2020. – № 4. – С. 6-15; 2020. – № 3. – С. 50-55; 2016. – № 3. – С. 81-84; **Биофарм. Журн.** – 2020. – Т. 12. – № 6. – С. 15-23; **Изв. Вузов. Прикл. Хим. Биотех.** – 2020. – Т. 10. – № 3 – № 34 – С. 506-514; **Вестн. Биотех. Физ.-Хим. Биол. Овчинникова.** – 2019. – Т. 15. – № 4. – С. 32-40; 2018. – Т. 14. – № 3. – С. 56-73; 2017. – Т. 13. – № 3. – С. 65-70; **Биофарм. Журн.** – 2020. – Т. 12. – № 2. – С. 13-31; 2017. – Т. 9. – № 4. – С. 3-6; **Разраб. Регистр. Лек. Средств.** – 2020. – Т. 9. – № 1. – С. 109-114; **Proc. Univ. Appl. Chem. Biotech.** – 2019. – V. 9. – № 30 – P. 403-419; **Инф. Иммуно.** - 2018. – Т. 8. – № 3. – С. 388-392; 2017. – № 5. – С. 244);

доктор медицинских наук **Саяпина Лидия Васильевна** является признанным специалистом в сфере микробиологии особо опасных инфекций и

имеет научные публикации в сфере исследований, соответствующей кандидатской диссертации Гостищевой С.Е. (**Пробл. Особо Опасн. Инф.** – 2020. – № 2. – С. 91-97; 2019. – № 3. – С. 87-93; 2016. – № 2. – С. 107-110; **Vaccines.** – 2019. – V. 7. – № 2. – P. 36; **Иммун.** – 2018. – Т. 39. – № 5-6. – С. 299-304; **PLoS Negl. Trop. Dis.** – 2018. – V. 12. – № 6. P. e0006511; **Инф. Иммун.** – 2017. – № 5. – С. 963; **Биопреп. Проф. Диагн. Леч.** – 2018. – Т. 18. – № 1 (65). – С. 42-49; 2017. – Т. 17. – № 1 (61). – С. 41-47; **Methods Mol. Boil. (Clifton, N.J.)**. – 2016. – V. 1403. – P. 487-498).

Назначение ведущей организации обосновано широкой известностью ее достижений в области медицинской биотехнологии, наличием публикаций в сфере исследований, соответствующей кандидатской диссертации Гостищевой С.Е. (**Разраб. Регист. Лек. Средств.** – 2021. – Т. 10. – № 1. – С. 114-119; **Bull. Exр. Biol. Med.** – 2020. – V. 168. – № 4. P. 485-487; **Журн. Микробиол. Эпидемиол. Иммунобиол.** – 2020. – № 2. – С. 134-139; 2019. – № 1. – С. 43-49; 2019. – № 1. – С. 74-80; 2019. – № 4. – С. 98-105; 2019. – № 5. – С. 72-83; 2017. – № 4. – С. 23-30; **Эпидем. Вакцинопроф.** – 2020. – Т. 19. – № 1. – С. 35-42; **Биопреп. Профил. Диагн. Леч.** – 2020. – Т. 20. – № 2. – С. 107-115; **Иммунол.** – 2019. – Т. 40. № 4. – С. 23-28; **Бюлл. Экспер. Биол. Мед.** – 2019. – Т. 168. – № 10. – С. 471-473; **Биотехнол.** – 2018. – Т. 34. – № 3. С. 33-41), а также наличием ученых, являющихся безусловными специалистами по теме диссертации Гостищевой С.Е.

Диссертационный совет отмечает, что на основании выполненных соискателем исследований:

**разработана** технология приготовления питательной среды на основе гидролизата кукурузного экстракта сгущенного (ГКЭС) для культивирования чумного микроба (**Патент RU № 2626568** опуб. 28.07.2017. – Бюл. № 22. – 8 с.);

**предложено** усовершенствование технологии приготовления полуфабриката микробной взвеси вакцинного штамма путем совмещения этапов смыва и сведения бактериальной массы в один прием («метод объединенного смыва»), что способствует повышению количества живых микробных клеток в готовом препарате до  $45,9 \pm 3,6$  %, при нормируемом показателе не менее 25 %;

**доказана** возможность применения клеточного антиген-стимулированного теста (КАСТ) *in vitro* и технологии цитометрического анализа для контроля качества противочумных вакцин по показателю иммуногенности (**Патент RU № 2680697** опуб. 19.02.2019. – Бюл. № 6. – 8 с.);

**введено** представление о том, что метод КАСТ позволяет оценить динамику интенсивности экспрессии маркеров ранней (CD25) и поздней (HLA-DR) активации лимфоцитов при стимуляции водорастворимым антигеном у людей в различные сроки после вакцинации против чумы (**Патент RU № 2725872** опуб. 07.07.2020. – Бюл. № 19. – 6 с.).

Теоретическая значимость исследования обоснована тем, что:

**доказано**, что, с учетом ключевой роли клеточного иммунитета при чуме, использование клеточного антиген-специфического теста *in vitro* и технологии цитометрического анализа открывает возможность количественно определять поствакцинальную антигенреактивность лимфоцитов, и в перспективе предложенный метод КАСТ может быть использован в качестве дополнительного контрольного теста при изучении потенциальной степени иммуногенности новых (кандидатных) вакцин против чумы, в сравнении с зарегистрированными препаратами;

**применительно к проблематике диссертации результативно использован комплекс существующих базовых методов исследования:** микробиологических (культивирование бактерий, определение их культурально-морфологических и биохимических свойств), биологических (иммунизация животных, заражение животных вирулентным штаммом), микроскопических (световая и электронная микроскопия), иммуноцитометрических (проточная цитометрия), статистических (с применением пакета программ Microsoft Excel);

**изложены** научно обоснованные рекомендации по определению количественных показателей противочумного иммунитета и возможности использования этого подхода для оценки качества чумной вакцины; в эксперименте на биомоделях показано увеличение экспрессии маркера ранней активации CD25 под действием специфического антигена на поверхности Т-

лимфоцитов, что свидетельствует о формировании клеточного иммунного ответа;

**раскрыта** эффективность оценки поствакцинального иммунитета методом проточной цитофлуориметрии у вакцинированных против чумы по показателям антигенреактивности Т-лимфоцитов при их стимуляции комплексом водорастворимых антигенов штамма *Y. pestis* EV: формирование противочумного иммунитета первоначально обусловлено повышением количества лимфоцитов, экспрессирующих маркеры ранней активации CD25, при этом максимум подъема приходится на 21 сут – до  $27,92 \pm 1,82$  % (контроль  $12,18 \pm 1,38$  %), а через 6 мес. наблюдается повышение количества клеток HLA-DR –  $23,45 \pm 2,71$  % (контроль –  $16,50 \pm 1,63$ %) ( $p \leq 0,05$ ), что дает возможность судить о формировании иммунного ответа в различные сроки после вакцинации против чумы.

**изучена** возможность применения питательной среды на основе гидролизата кукурузного экстракта сгущенного при масштабированном производстве вакцины чумной живой;

**проведена модернизация** биотехнологического процесса на этапе приготовления полуфабриката, заключающаяся в унификации условий синхронизации (выдерживание при температуре  $(4 \pm 2)$  °C в течение 48 ч), путем объединения двух микробных взвесей в одну непосредственно после смыва, позволяющая получить препарат, стабильный при длительных сроках хранения.

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

**разработаны и внедрены** в действующий Промышленный регламент на производство вакцины чумной живой (ПР 01897080-09-16) питательная среда на основе гидролизата кукурузного экстракта сгущенного для культивирования чумного микроба, позволяющая повысить качество и снизить себестоимость препарата, и «метод объединенного смыва» на этапе синхронизации биомассы, позволяющий получить препарат с увеличенным показателем жизнеспособности клеток чумного микроба (Справка № 26-30-08/12-1713-2021 от 23.09.2021 г.) – учрежденческий уровень внедрения;



**определены** перспективы оптимизации биотехнологии производства препарата вакцины чумной живой при использовании «метода объединенного смыва», заключающиеся в создании идентичных условий в процессе синхронизации микробных клеток биомассы с целью стабилизации конечных показателей качества вакцины чумной живой;

**создан** методический подход лабораторной оценки иммуногенности вакцины чумной живой с использованием клеточного теста *in vitro* с детекцией рецепторов CD25 на активированных лимфоцитах;

**представлены** методические рекомендации по производству и контролю качества плотной питательной среды на основе ферментативного гидролизата кукурузного экстракта (сгущенного) для культивирования чумного микроба и выращивания биомассы вакцинного штамма *Y. pestis* EV; по лабораторной оценке иммуногенности вакцины чумной живой на основе штамма *Y. pestis* EV с использованием антигенспецифических клеточных тестов *in vitro* и проточно-цитометрического анализа (утверждены директором ФКУЗ Ставропольский противочумный институт от 26.12.17) - учрежденческий уровень внедрения.

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 совершенствовании биотехнологии производства и оценки качества вакцины чумной живой опирается на анализ имеющихся в научной литературе экспериментальных и теоретических данных, обобщение опыта ведущих исследовательских групп по изучению оптимизации технологических этапов производственного цикла и оценке качества препарата по показателю специфической активности (иммуногенности);

**установлена** частичная корреляция полученных автором результатов с опубликованными ранее в научной литературе данными независимых зарубежных авторов, в части – по изучению иммунологических маркеров, указывающих на наличие и степень напряженности противочумного иммунитета в клеточных реакциях *in vitro*;

**использованы** современные методы получения и обработки информации в рамках систем сбора, обработки данных - с помощью программных пакетов языка программирования «R» и Microsoft Excel.

Личный вклад соискателя состоит в:

проведении автором лично следующих этапов работы: анализ научной литературы; разработка технологии получения питательной среды на основе ферментативного гидролизата кукурузного экстракта сгущенного (ГКЭС); оценка возможности применения питательной среды ГКЭС для масштабированного производства вакцины чумной живой; оптимизация производственного процесса путем совмещения этапов смыва и сведения биомассы в один прием; изучении регламентированных показателей качества полученных экспериментальных серий; изучение возможности применения антигенспецифического клеточного теста *in vitro* с использованием технологии проточно-цитометрического анализа для контроля качества противочумных вакцин и оценки формирования противочумного иммунитета; личное участие в апробации, обработке, оформлении и публикации результатов исследования.

На заседании 08.10.2021 г. диссертационный совет принял решение присудить Гостищевой С.Е. ученую степень кандидата биологических наук.

При проведении тайного голосования диссертационный совет в количестве **19** человек, из них **9** докторов наук по специальности 03.01.06 – биотехнология (в том числе бионанотехнологии), участвовавших в заседании, из **23** человек, входящих в состав совета, проголосовали: за **18**, против **0**, недействительных бюллетеней **1**.

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 – 08.10.2021 г.

Печать организации, на базе которой создан диссертационный совет.