

## ОТЗЫВ

официального оппонента на диссертационную работу  
Гостищевой Светланы Евгеньевны

«Совершенствование биотехнологии производства и оценки качества  
вакцины чумной живой»

представленную на соискание ученой степени кандидата биологических наук  
по специальности 03.01.06 – биотехнология (в том числе бионанотехнологии)

### **Актуальность темы.**

Чума – зоонозная природно-очаговая инфекция, относящаяся к особо опасным инфекционным болезням и обладающая потенциалом для возникновения вспышек и эпидемий. Наличие на территории России и сопредельных стран природных очагов чумы определяет необходимость профилактики данного заболевания. Общеизвестно, что наиболее эффективным способом борьбы с инфекционными заболеваниями, в том числе с чумой, является специфическая профилактика. Для реализации этой цели в России производится вакцина чумная живая сухая в форме таблеток для рассасывания (ФГБУ 48 ЦНИИ Минобороны) и лиофилизата для приготовления суспензии для инъекций, кожного скарификационного нанесения и ингаляций (ФКУЗ Ставропольский противочумный институт Роспотребнадзора).

Соискатель совершенно справедливо отмечает, что, несмотря на то, что за многие годы выпуска вакцины в ФКУЗ Ставропольский противочумный институт Роспотребнадзора (препарат производится с 1958 г.) технология ее изготовления хорошо отработана, актуальными задачами являются оптимизация условий выращивания штамма *Y. pestis EV* и совершенствование биотехнологии производства для улучшения качества биопрепарата по показателю жизнеспособности. Не менее важной задачей также является модернизация методов контроля препарата и способов оценки напряженности поствакцинального иммунитета с применением современных методов.

По моему мнению, именно к таким исследованиям относится диссертационная работа Гостищевой С.Е., посвященная совершенствованию биотехнологии производства и оценки качества вакцины чумной живой.

Работа выполнена в ФКУЗ Ставропольский противочумный институт Роспотребнадзора в рамках двух НИР.

Цель диссертации определена ясно и направлена на совершенствование технологических процедур получения биомассы при производстве вакцины чумной живой и методики оценки качества препарата по показателю специфической активности (иммуногенности).

Задачи, сформулированные для решения поставленной цели, являются четкими, понятными и обеспечивают решение поставленной цели.

**Научная новизна** представленной для оппонирования работы состоит в:

разработке питательной среды на основе ферментативного гидролизата кукурузного экстракта сгущенного, обеспечивающий высокий выход биомассы вакцинного штамма чумного микроба, позволяющей повысить показатель жизнеспособности готового продукта и снизить себестоимость конечной продукции при сохранении ее качества. Приоритетность исследований подтверждена патентом РФ № 2626568 «Питательная среда плотная для культивирования и сбора биомассы чумного микроба вакцинного штамма *Y. pestis* EV»;

успешном апробировании «метода объединенного смыва» в производстве вакцины чумной живой на этапе приготовления полуфабриката, позволяющим создавать идентичные условия в процессе синхронизации всех клеток взвеси, и соответственно способствующем повышению качества препарата по показателю жизнеспособности в 1,3 раза в сравнении с существующей технологией;

в экспериментальном обосновании эффективности применения клеточного антигенспецифического теста *in vitro* для определения количественных показателей напряженности противочумного иммунитета, возможности его использования для оценки качества чумной вакцины. При этом на биомоделях показано увеличение экспрессии маркера ранней активации CD25 под действием специфического антигена *Y. pestis* EV на поверхности Т-лимфоцитов, что свидетельствует о формировании клеточного иммунного ответа. Приоритетность данных исследований подтверждена патентами РФ на изобретение № 2680697 «Способ оценки иммуногенности вакцины чумной живой с использованием антигенспецифических клеточных тестов *in vitro*» и № 2725872 «Способ применения комплекса водорастворимых антигенов чумного микроба для оценки уровня противочумного иммунитета».

**Практическая значимость** проведенных исследований подтверждается разработкой и внедрением в практику производства в ФКУЗ Ставропольский противочумный институт Роспотребнадзора чумной вакцины документов как учрежденческого уровня внедрения (методические рекомендации, технические условия 9385-50-01897080-2017, промышленный регламент № 01897080-34-17, изменения № 1 к промышленному регламенту № 01897080-09-16), так и федерального (изменения в регистрационное досье № 141757).

**Диссертационная работа** изложена на 123 страницах машинописного текста, построена по традиционному плану: состоит из введения, обзора литературы (глава 1), материалов и методов (глава 2) и 3 глав экспериментальных исследований; заключения; выводов; списка сокращений; списка использованной литературы, списка научных работ,

опубликованных по теме диссертации и приложений. Работа иллюстрирована 15 таблицами и 6 рисунками. Список литературы содержит 173 источника, из них 54 зарубежных.

Во **введении** автор представил актуальность темы исследования и степень ее разработанности, сформулировал цель и задачи диссертации, представил научную новизну, а также теоретическую и практическую значимость диссертации, изложил положения выносимые на защиту. Также представлены данные по степени достоверности и апробации результатов работы, методологии и методам исследования, сведения о личном участии автора, публикациям по теме работы, структуре и объеме диссертации.

**Обзор литературы** (Глава 1), состоит из 2 подглав. В первой подглаве Гостищевой С.Е. приведены данные о путях совершенствования биотехнологии производства вакцины чумной живой. Автором выявлено, что основными путями являются: разработка высокопродуктивных питательных сред и оптимизация их качества; стабилизация чумной вакцины в процессе хранения; оптимизация режимов культивирования бактериальной массы; усовершенствование этапов технологического процесса производства вакцины; поиск инновационных подходов, направленных на автоматизацию производства препарата и регулирование процессов. Во второй подглаве диссертантом, исходя из цели работы, рассмотрены вопросы о формировании иммунного ответа на вакцинацию против чумы, а также методы определения противочумного иммунитета. При этом показано какие методы использовались, используются и являются перспективными для оценки иммунитета у привитых чумной вакциной.

Обзор литературы занимает примерно 10 % объема диссертации и позволяет получить достаточно полное представление о современном состоянии изучаемого вопроса. К несомненным достоинствам обзора литературы следует отнести использование данных из «свежих» источников (из 173 наименований только 30 датированы до 2000 года).

В главе 2 «**Материалы и методы**» описаны основные материалы и условия проведения экспериментальных исследований. Использованные методические приемы соответствуют современному методическому уровню, являются широко апробированными, легко воспроизводимыми и надежными. Объем наблюдений, планирование и проведение экспериментов адекватны поставленным задачам, достаточны для доказательного статистического анализа.

**Результаты исследований** обобщены в 3 главах. В **главе 3** представлены результаты экспериментов по разработке питательной среды на основе кукурузного экстракта сгущенного, сравнительному изучению характеристик вакцинного препарата, полученного на питательных средах из различного сырья, а также апробации разработанной питательной среды для масштабированного производства вакцины чумной живой. Гостищевой

С.Е. был изучен физико-химический состав кукурузного экстракта сгущенный, с целью получены основы питательной среды разработана технология его ферментативного гидролиза, методические приемы приготовления питательной среды. Определен качественно-количественный состав ростостимулирующих добавок (соли Мора и натрия сернистокислого) и проведен биологический контроль качества питательной среды согласно МУ 3.3.2.2124-06. Результаты проведенных исследований показали, что по физико-химическим и биологическим свойствам разработанная питательная среда полноценна по компонентному составу и эффективна при культивировании вакцинного штамма *Y. pestis* EV.

Сравнительная характеристика вакцинного препарата, полученного на питательных средах из различного сырья (разработанная на основе гидролизата кукурузного экстракта сгущенного, а также две регламентированные – из гидролизата говяжьего мяса по Хоттингеру и кукурузно-казеинового агара) выявила, что показатель жизнеспособности серий вакцины, приготовленной с применением новой питательной среды, в 1,3 раза выше, чем у серий, полученных на регламентированных питательных средах. Также показано, что стоимость разработанной питательной среды меньше в 2,3-3,5 раза.

При апробации разработанной питательной среды для масштабированного производства вакцины чумной живой выявлено, что данная питательная среда обеспечивает высокий уровень роста биомассы вакцинного штамма чумного микроба при среднем проценте жизнеспособных клеток равным  $61,6 \pm 5,7$ , а также готовая лекарственная формы вакцины соответствовала требованиям нормативной документации.

**Глава 4** посвящена совершенствованию этапа приготовления вакцинной взвеси путем использования «метода объединенного смыва», анализу показателей качества полученного препарата при использовании данного метода, а также исследованию стабильности полученных экспериментальных серий вакцины чумной живой в течении нормируемого срока годности. Проведенные исследования показали, что совершенствование биотехнологии приготовления микробной взвеси вакцинного штамма путем совмещения смыва и сведения бактериальной массы в один прием («метод объединенного смыва») позволяет увеличить жизнеспособность в сравнении с применяемым традиционно двухстадийным этапом с  $(34,6 \pm 4,3)$  % до  $(45,9 \pm 3,6)$  %. Также выявлено, что готовая лекарственная форма вакцины чумной живой, полученный «методом объединенного смыва», сохраняет стабильность регламентированных показателей в течение всего срока годности (3 года), что подтверждает целесообразность использования данной методики в промышленном производстве препарата.

**Глава 5** посвящена исследованиям по оценке клеточного звена иммунитета у лабораторных животных вакцинированных чумной вакциной с использованием метода антигенспецифических клеточных тестов *in vitro* и изучению возможности использования данного метода для оценки формирования поствакцинального противочумного иммунитета у людей. Основные результаты проведения исследований были следующими:

в экспериментах на биомоделях продемонстрирована возможность применения клеточного антиген-специфического теста *in vitro* с детекцией CD25 на активированных лимфоцитах для оценки формирования иммунного ответа при вакцинации против чумы, при этом выявлена высокая степень прямой связи (коэффициент корреляции Спирмена  $r=1,000$ ) количества выживших животных с увеличением уровня лимфоцитов, экспрессирующих маркеры ранней активации;

исследование образцов крови людей (210 образцов), иммунизированных против чумы по эпидемическим показаниям показало, что формирование иммунитета на введение вакцины первоначально обусловлено повышением количества лимфоцитов, экспрессирующих маркеры ранней активации CD25, при этом максимум подъема приходится на 21 сут – пик иммуногенеза. Через 3 мес наблюдалось повышение количества клеток HLA-DR (поздняя активация) при одновременном снижении CD25, что свидетельствует о дальнейшем этапе формирования адаптивного иммунного ответа;

анализ стимулирующего потенциала комплекса водорастворимых антигенов *Y. pestis* EV относительно активации сенсibilизированных лимфоцитов в условиях *in vitro* показал, что коэффициент стимуляции относительного содержания лимфоцитов, экспрессирующих маркеры CD25, во все сроки наблюдения был положительный, при этом наибольшего значения он достигал на 21 сут (56,37 %) после иммунизации. При выявлении HLA-DR клеток отмечается резкое повышение коэффициента стимуляции через 6 и 9 мес, что отражает активированное состояние иммунной системы.

В **Заключении** диссертации последовательно и аргументировано сформулированы итоги исследований. Автор также обоснованно делает заключение о перспективах проведенных исследований, в частности, по внедрению метода клеточного антиген-специфического теста *in vitro* в качестве дополнительного контрольного теста при изучении степени иммуногенности новых (кандидатных) вакцин против чумы в сравнении с зарегистрированными препаратами, а также в качестве нового (дополнительного) метода количественной оценки иммунологической эффективности вакцинации против чумы. **Выводы** соответствуют поставленным задачам и отражают сущность работы.

**Список научных работ, опубликованных по теме диссертации**, соответствует таковому в автореферате диссертации.

В материалах **приложений** приведены документы (патенты на изобретения), показывающие приоритетность результатов выполненной работы.

**Обоснованность научных положений, выводов и рекомендаций, сформулированных в диссертации, их достоверность** обеспечивается значительным объемом полученных экспериментальных данных, их соответствием теоретическим положениям, статистической обработкой данных экспериментов. Выводы из проведенных исследований теоретически и экспериментально обоснованы и отражают цель и задачи диссертации.

**Диссертация написана четким и ясным языком**, с использованием принятой терминологии, оформление диссертации существенных замечаний не вызывает.

**Содержание диссертации** в достаточной степени отражено в публикациях автора (в том числе в 3 статьях в журналах из перечня рецензируемых научных изданий, в которых должны быть опубликованы основные научные результаты диссертаций на соискание ученой степени кандидата наук, на соискание ученой степени доктора наук по научной специальности 03.01.06 – биотехнология (в том числе бионанотехнологии)), 3 патентах РФ на изобретение, материал доложен на научных конференциях и известен научной общественности, а ее основные положения обстоятельно изложены в автореферате.

**Автореферат диссертации**, изложенный на 24 страницах, соответствует содержанию и основным итогам диссертации.

По содержанию диссертации имеются следующие **замечания**:

1. Во введении диссертации нет четкого разграничения в чем состоит теоретическая, а в чем практическая значимость работы.

2. Вызывает сомнение правильность формулировки вывода 3, в части касающейся увеличения тенденция к стабильности (жизнеспособности) препарата в течение срока годности. Жизнеспособность чумного микроба при его хранении должна как максимум оставаться на прежнем уровне, при этом практика показывает, что с течением времени она уменьшается. Кстати это обстоятельство подтверждено автором в ходе исследований в рамках главы 3.

3. К сожалению, в диссертации присутствуют отдельные неточности и пропуски. Так на странице 53 автором не указано на какую таблицу он ссылается, словосочетание «метод объединенного смыва» где-то заключен в кавычки, где-то нет, в тексте нет ссылки на источники литературы под номером 7, 35, 84, 92, лишние закрывающие скобки (страница 66), не везде значения величин с разбросом взяты в скобки (например, страница 67  $4,33 \pm 0,51$  % и  $3,82 \pm 0,38$  %).

Необходимо отметить, что сделанные замечания не влияют на общую положительную оценку работы.

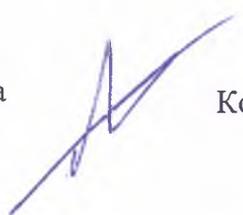
## Заключение

Представленная диссертация является законченной научно-квалификационной работой, в которой, в результате проведенных исследований содержится решение научной задачи по совершенствованию биотехнологии производства и оценки качества вакцины чумной живой, имеющей существенное значение для обеспечения специфической профилактики чумы в России.

Полученные автором результаты достоверны, выводы являются четкими, аргументированными и обоснованными. Работа базируется на достаточном числе исходных данных. Она написана доходчиво, грамотно и аккуратно оформлена. Диссертационная работа «Совершенствование биотехнологии производства и оценки качества вакцины чумной живой» отвечает критериям п. 9, 10, 11, 13, 14 «Положения о присуждении ученых степеней», утвержденного постановлением Правительства РФ № 842 от 24.09.2013 г., в редакции постановлений Правительства РФ № 335 от 21.04.2016 г., № 748 от 02.08.2016 г., № 650 от 29.05.2017 г., № 1024 от 28.08.2017 г. и № 1168 от 01.10.2018 г., предъявляемым к кандидатским диссертациям, а ее автор Гостищева Светлана Евгеньевна заслуживает присуждения ученой степени кандидата биологических наук по специальности 03.01.06 – биотехнология (в том числе бионанотехнологии).

Главный научный сотрудник отдела экспериментальных фармацевтических форм Федерального казенного учреждения здравоохранения «Российский научно-исследовательский противочумный институт «Микроб» Федеральной службы по надзору в сфере защиты прав потребителей и благополучия человека (ФКУЗ РосНИПЧИ «Микроб» Роспотребнадзора), доктор биологических наук, профессор  
Адрес организации

410005, г. Саратов, ул. Университетская, д.46  
Тел.: (8452) 26-21-31  
e-mail: [rusrapl@microbe.ru](mailto:rusrapl@microbe.ru)



Комиссаров Александр  
Владимирович

Начальник отдела кадров  
ФКУЗ РосНИПЧИ «Микроб» Роспотребнадзора  
«21» 06 2021 г.



О.В. Шумигай