

## ОТЗЫВ

официального оппонента на диссертацию Гостищевой Светланы Евгеньевны на тему «Совершенствование биотехнологии производства и оценка качества вакцины чумной живой», представленной на соискание ученой степени кандидата биологических наук по специальности 03.01.06 – биотехнология (в том числе бионанотехнологии)

### **Актуальность темы исследования**

Чума, одно из самых опасных природно-очаговых инфекционных заболеваний, известное человечеству с давних времен (551-580 гг.). Прошлые пандемии «черная смерть», как называли чуму, приводили к многомиллионным человеческим жертвам и наносили большой экономический ущерб.

В комплексе мер профилактики и борьбы с чумой решающая роль принадлежит своевременному проведению профилактических мероприятий, в том числе вакцинации. В России для профилактики чумы применяется живая вакцина на основе штамма *Yersinia pestis* EV линии НИИЭГ (далее *Y. pestis* EV). Вакцинация населения против чумы проводится в соответствии с Календарем профилактических прививок по эпидемическим показаниям (эпизоотия чумы среди грызунов в регионе, возможность завоза инфекции больным человеком).

Несмотря на то, что технологический процесс производства чумной живой вакцины достаточно хорошо отлажен, актуальной задачей продолжает оставаться совершенствование производственного процесса на этапах оптимизации условий культивирования штамма *Y. pestis* EV для получения микробной биомассы с целью улучшения качества специфической активности препарата.

В связи с этим работа Гостищевой Светланы Евгеньевны, посвященная совершенствованию биотехнологии производства чумной живой вакцины, является актуальной.

### **Достоверность и новизна исследования и полученных результатов**

Диссертационная работа С.Е. Гостищевой представляет собой завершенное исследование, выполненное на высоком методическом уровне. Обоснованность научных положений, выносимых на защиту, выводов и рекомендаций подтверждаются корректно проанализированными объективными экспериментальными данными.

Значительный объем исследований, проведенных при использовании комплекса адекватных современных методов, позволил последовательно решить стоявшие перед автором задачи, достичь поставленной цели, обосновать все положения, выводы и рекомендации. Новизна достигнутых результатов и выводов не противоречит основным сведениям, полученным ранее другими авторами.

Степень достоверности полученных данных основана на использовании большого фактического материала, с использованием современных методов. Достоверность результатов, подтвержденная приведенными таблицами, рисунками и статистической обработкой, не вызывает сомнения.

**Степень новизны, обоснованности научных исследований, выводов и рекомендаций, сформулированных в диссертации**

Диссертационная работа Гостищевой С.Е. является законченной научно-квалификационной работой, результатами которой явилось совершенствование технологии производственного процесса чумной живой вакцины. Впервые разработана питательная среда на основе ферментативного гидролизата кукурузного экстракта сгущенного (ГКЭС), обеспечивающая высокий выход биомассы при культивировании штамма *Y. pestis* EV и снижение себестоимости готовой продукции за счет исключения использования питательных сред животного происхождения.

Научной новизне отвечает разработанный автором «метод объединенного смыва» в технологическом процессе производства вакцины чумной живой на этапе приготовления полуфабриката, что приводит к созданию оптимальных условий для повышения жизнеспособности и стабилизации количества живых микробных клеток в готовом препарате.

В ходе проведенных исследований оценена возможность перспективы определения поствакцинального иммунитета у привитых против чумы людей и контроля качества вакцины по показателю «Иммуногенность» методом проточной цитофлуориметрии антигенреактивности Т-лимфоцитов (КАСТ).

Научная новизна подтверждена следующими документами: Патент на изобретение РФ No 2626568 от 28.07.2017 «Питательная среда плотная для культивирования и сбора биомассы чумного микроба вакцинного штамма *Y. pestis* EV»; Патент РФ на изобретение No 2680697 от 25.02.2019 «Способ оценки иммуногенности вакцины чумной живой с использованием антигенспецифических клеточных тестов *in vitro*»; Патент РФ на изобретение No 2725872 от 07.07.2020 «Способ применения комплекса водорастворимых антигенов чумного микроба для оценки уровня противочумного иммунитета».

#### **Значимость для науки и практики выводов и рекомендаций**

Работа, посвященная совершенствованию технологического процесса производства живой чумной вакцины, имеет большое теоретическое и практическое значение. В результате проведенных исследований Светланой Евгеньевной сконструирована питательная среда для культивирования производственного штамма *Y. pestis* EV, регламентирована по биологическим и физико-химическим показателям, оценена возможность ее применения для масштабированного производства чумной вакцины; оптимизирован производственный процесс путем объединения смыва двух микробных взвесей в одну емкость, обеспечивающий увеличение жизнеспособности микробных клеток.

Экспериментально обоснована перспективность возможности применения клеточного антигенспецифического метода *in vitro* у привитых людей и для контроля качества вакцины чумной живой по показателю «Иммуногенность».

В результате проведенных исследований разработаны следующие документы:

1. Изменение № 1 к Промышленному регламенту № 01897080-09-16 на производство вакцины чумной живой, лиофилизат для приготовления суспензии для инъекций, накожного скарификационного нанесения и ингаляций (утверждены директором, протокол № 6 от 20.09.17).

2. Подготовлены материалы о внесении изменений в регистрационное досье № 140279 на вакцину чумную живую для представления в уполномоченный орган (Минздрав России).

3. Промышленный регламент № 01897080-34-17 и Технические условия 9385-50-01897080-2017 на производство Питательного агара для культивирования микроорганизмов (ГКЭС) (утверждены директором, протокол № 6 от 20.09.17).

3. Методические рекомендации «Производство и контроль качества плотной питательной среды на основе ферментативного гидролизата кукурузного экстракта (сгущенного) для культивирования чумного микроба и выращивания биомассы вакцинного штамма *Y. pestis EV*» (утверждены директором института, протокол № 6 от 30.06.16).

4. Методические рекомендации «Лабораторная оценка иммуногенности вакцины чумной живой с использованием антигенспецифических клеточных тестов *in vitro* и проточно-цитометрического анализа» (утверждены директором института, протокол № 6 от 26.12.17).

#### **Структура и содержание диссертации, ее завершенность**

Диссертация состоит из введения, обзора литературы, материалов и методов исследования, трех глав собственных исследований, заключения, выводов и списка литературы, включающего 173 источника, из них 55 – зарубежных. Работа изложена на 123 страницах компьютерного текста, иллюстрирована 15 таблицами, 6 рисунками.

Исследования выполнены в рамках плановых НИР: «Разработка технологии соево-глутеновых питательных сред для применения в производстве вакцины чумной живой» (№ гос. регистрации 115022670069), «Экспериментальное обоснование совершенствования биотехнологии производства вакцины чумной живой, лиофилизата для приготовления суспензии для инъекций, накожного скарификационного нанесения и ингаляций» (№ гос. регистрации АААА-Б18-218091490014-1).

#### **Подтверждение опубликования основных результатов диссертации в научной печати**

Результаты диссертационной работы широко представлены на Всероссийских научно-практических конференциях и съездах с международным участием (Санкт-Петербург, 2015; Москва, 2016, 2018; Сочи, 2016, 2019) Всероссийских научно-практических конференциях (Новосибирск, 2016; Н. Новгород, 2016; Ставрополь, 2017, 2019).

#### **Публикации**

Основное содержание диссертационной работы отражено в 24 опубликованных работах, в том числе 3 в изданиях РИНЦ, Scopus; 6 в изданиях, рекомендованных Высшей аттестационной комиссией при Министерстве образования и науки Российской Федерации.

#### **Содержание диссертации, ее завершенность**

Во введении диссертации обоснована актуальность исследований; приведены научная новизна; практическая значимость; положения, выносимые на защиту; сведения об апробации и публикациях. Четыре поставленные задачи

отражают результаты работы, соответствуют цели и положениям, выносимым на защиту.

В первой главе диссертационной работы (Обзор литературы) проанализированы литературные источники, касающиеся наиболее значимых путей совершенствования процесса производства чумной живой вакцины. Изложены сведения о вносимых и разрабатываемых изменениях в технологических процессах производства, направленных на модернизацию технологии, подбора питательных сред, оптимизации температурных режимов, методов контроля и стандартизацию препарата с учетом условий культивирования, лиофилизации, хранения и транспортирования. Проведенный анализ научных публикаций выявил необходимость проведения исследований, сосредоточенных на самом уязвимом этапе в производстве вакцины - выбор полноценных по питательной потребности чумного микроба питательных сред.

Заслуживает внимание анализ публикаций, посвященный методам оценки специфической активности поствакцинального клеточного иммунитета, позволяющий определять развитие иммунологических реакций по степени напряженности противочумного иммунитета в клеточных реакциях *in vitro*. В целом обзор основан на использовании большого объема научных данных, что позволило Светлане Евгеньевна обосновать необходимость научного подхода для решения поставленных задач.

В разделе «Материалы и методы» изложены методические приемы, с помощью которых были решены поставленные задачи. Автором в своей работе использован широкий спектр методов: микробиологические, физико-химические, биологические, иммунологические, статистические, а также проведены цитофлуориметрические исследования. В работе использовались вакцинный штамм *Y. pestis* EV линии НИИЭГ (ФГБУ «НЦЭСМП» Минздрава России) и вирулентный штамм *Y. pestis* 231 (ФКУЗ СтавНИПЧИ Роспотребнадзора); питательные среды и гидролизаты питательных сред; экспериментальные серии чумной живой вакцины. В экспериментах (иммунизация, заражение, отбор проб крови) использовались аутбредные белые мыши, морские свинки породы «Агути» и кролики обоего пола. Объем фактического материала является достаточным для проведения статистической обработки результатов.

В результате проведенной работы Светлана Евгеньевна, решая поставленные задачи, получила интересные и оригинальные материалы, отвечающие требованиям научной новизны и практической значимости. Результаты собственных исследований изложены с третьей по пятую главам.

В главе 3 «Оценка эффективности применения питательной среды из ферментативного гидролизата кукурузного экстракта сгущенного для культивирования вакцинного штамма чумного микроба» представлены результаты исследования, направленные на разработку питательной среды на основе ферментативного гидролизата кукурузного экстракта сгущенного (ГКЭС) и ростостимулирующих добавок (соль Мора и натрия сернистокислового), являющейся адаптированной по компонентному составу и физико-химическим

свойствам для эффективного культивирования штамма *Y. pestis* EV. Показано, что использование в процессе производства вакцины питательной среды ГКЭС обеспечивает выход биомассы микробной взвеси в среднем  $4,7 \pm 0,3$  млрд. м.к./мл при регламентированной норме не менее 4,0 млрд. м.к./мл и повышает жизнеспособность микробных клеток в готовом препарате до  $43,5 \pm 4,9$  % живых м.к. при норме не менее 25,0 % живых м.к.; характеризуется в 2,9 раза меньшей себестоимостью по сравнению с регламентированными средами (агар Хоттингера и кукурузно-казеиновый агар).

В главе 4 «Оптимизация технологии приготовления полуфабриката микробной взвеси вакцинного штамма с целью повышения жизнеспособности вакцины чумной живой» отражены этапы трех технологических циклов получения пяти экспериментальных серий живой чумной вакцины. Используя предложенный метод объединенного смыва, были созданы оптимальные условия путем объединения двух смывов микробных взвесей и сведения биомассы в один прием, способствующие стабилизации качества чумной вакцины по специфической активности, а именно: увеличения жизнеспособности микробных клеток, и как следствие, повышение иммуногенных свойств препарата. Полученные данные послужили основанием для внедрения модифицированного метода объединенного смыва биомассы в Промышленный регламент производственного процесса вакцины чумной живой.

В главе 5 «Применение антигенспецифических клеточных тестов *in vitro* для оценки качества препарата вакцины чумной живой» представлены результаты, свидетельствующие о том, что при воздействии разработанным Светланой Евгеньевной комплексом антигенов чумного микроба *in vitro* на лимфоциты, иммунизированных против чумы животных, наблюдалось статистически значимое ( $p \leq 0,05$ ) усиление экспрессии маркера ранней активации CD25. При этом показано, что интенсивность антиген-реактивности лимфоцитов четко коррелирует с иммунизирующей дозой. Наивысший уровень экспрессии лимфоцитами маркера активации при антигенной стимуляции регистрировался у животных, иммунизированных дозами  $4 \times 10^3$ ,  $2 \times 10^4$  и  $1 \times 10^5$  живых м.к., на 14 сут.

При анализе динамики интенсивности экспрессии маркеров ранней CD25 и поздней HLA-DR активации лимфоцитов у вакцинированных людей вначале наблюдалось формирование противочумного иммунитета за счет увеличения количества CD25 лимфоцитов (максимум подъема на 21 сут до  $27,92 \pm 1,82$  %, контроль  $12,18 \pm 1,38$  %), а через 6 мес – статистически значимое увеличение ( $p \leq 0,05$ ) количества HLA-DR лимфоцитов ( $23,45 \pm 2,71$  %, контроль –  $16,50 \pm 1,63$  %) что дает возможность оценивать формирование иммунного ответа у людей в различные сроки после вакцинации.

#### **Личный вклад соискателя в разработку научной проблемы**

Основные результаты диссертационной работы получены при личном участии диссертанта, что подтверждено научными публикациями. Личное участие автора заключалось в анализе научной литературы, планировании экспериментов, в выполнении микробиологических, молекулярно-генетических, биохимических,

биологических и статистических исследованиях, анализе результатов, в подготовке материалов для публикаций, в представлении устных и стендовых докладов на конференциях.

### **Соответствие содержания автореферата основным положениям диссертации**

В автореферате диссертационной работы Гостищевой С.Е. представлены положения, выносимые на защиту, выводы, личный вклад автора в проводимое исследование, степень достоверности и апробация работы, научная новизна, теоретическая и практическая значимости, практические рекомендации и перспективы дальнейшей разработки темы.

Диссертационная работа производит положительное впечатление. Принципиальных замечаний по работе нет. Имеющиеся погрешности, касающиеся неточности некоторых выражений, технических опечаток, не оказывают влияние на высокую положительную оценку работы.

### **К Светлане Евгеньевне имеются вопросы:**

1. В процессе применения метода двойного смыва, на ваш взгляд, какой механизм действия увеличение жизнеспособности микробных клеток (за счет увеличения их количества) и что этому способствует?
2. Как изменяется показатель «Количественное определение жизнеспособных клеток» в числовом выражении в результате предложенных Вами изменений в технологический процесс производства живой чумной вакцины?
3. Какие Ваши предложения по совершенствованию технологического процесса производства живой чумной вакцины будут представлены в уполномоченный орган (Минздрав России) для внесения в регистрационное досье?

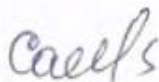
### **Заключение**

Диссертационная работа Гостищевой Светланы Евгеньевны на тему «Совершенствование биотехнологии производства и оценка качества вакцины чумной живой», является законченным научно-квалификационным исследованием, в котором сконструирована питательная среда ГКЭС для культивирования чумного микроба, регламентирована по биологическим и физико-химическим показателям, оценена возможность ее применения для масштабированного производства чумной вакцины; обоснована перспективность применения клеточного антигенспецифического метода *in vitro* у привитых людей и для контроля качества вакцины чумной живой по показателю «Иммуногенность», которые будут иметь важное научно-практическое и теоретическое значение при совершенствовании технологических процессов производства чумной живой вакцины или разработки кандидатов чумных вакцин.

По актуальности, объему, новизне и практической значимости полученных результатов диссертационная работа Гостищевой Светланы Евгеньевны на тему «Совершенствование биотехнологии производства и оценка качества вакцины чумной живой» соответствует требованиям п. 9. Положения «О порядке присуждения ученых степеней», утвержденного Постановлением Правительства

Российской Федерации № 842 от 24 сентября 2013 года (с изменениями в редакции Постановлений Правительства Российской Федерации от 21 апреля 2016 г. № 335, от 02 августа 2016 г. № 748, от 29 мая 2017 г. № 650, от 28 августа 2017 г. № 1024, от 01 октября 2018 г. № 1168), предъявляемым к диссертациям на соискание ученой степени кандидата биологических наук, а ее автор Гостищева Светлана Евгеньевна заслуживает присуждения ученой степени кандидата биологических наук по специальности 03.01.06 – биотехнология (в том числе бионанотехнологии).

Официальный оппонент  
Главный эксперт  
Федерального государственного  
бюджетного учреждения «Научный центр  
экспертизы средств медицинского  
применения»  
Минздрава России  
доктор медицинских наук,  
старший научный сотрудник



Саяпина Лидия Васильевна

Юридический адрес:  
127051, г. Москва,  
Петровский бульвар, д.8, строение 2  
Тел: 499-241-91-47,  
E-mail: Sayapina@expmed.ru

Подпись доктора медицинских наук  
Саяпиной Лидии Васильевны удостоверяю:

Начальник отдела  
подготовки кадров  
Федерального государственного  
бюджетного учреждения «Научный центр  
экспертизы средств медицинского применения»  
Минздрава России

09.09.2021 г.



Макаров Алексей Владимирович