

**ДОПОЛНИТЕЛЬНОЕ ЗАКЛЮЧЕНИЕ ДИССЕРТАЦИОННОГО СОВЕТА
Д 208.046.01 при ФБУН «Московский научно-исследовательский институт
эпидемиологии и микробиологии им. Г.Н.Габричевского»
Федеральной службы по надзору в сфере защиты прав потребителей и
благополучия человека**

по диссертационной работе Фазлиахметова Равиля Галиахметовича, гражданина РФ Российской Федерации, на ученую степень кандидата биологических наук «Разработка методов деконтаминации питательных сред и ростстимуляции культур клеток на основе ионизирующих излучений» по специальности 03.01.06 - биотехнология (в том числе бионанотехнологии).

Диссертация «Разработка методов деконтаминации питательных сред и ростстимуляции культур клеток на основе ионизирующих излучений» по специальности 03.01.06 – биотехнология (в том числе бионанотехнологии) принята на дополнительное заключение 10.12.2018 г., протокол № 5 диссертационным советом Д 208.046.01 на базе Федерального бюджетного учреждения науки «Московский научно-исследовательский институт эпидемиологии и микробиологии им. Г.Н. Габричевского» Федеральной службы по надзору в сфере защиты прав потребителей и благополучия человека (125212, г. Москва, ул. Адмирала Макарова, д. 10). Диссертационный совет утвержден Приказом Министерства образования и науки РФ № 714 / нк «О советах по защите докторских и кандидатских диссертаций» от 2 ноября 2012 г., приказ № 1577 / нк от 16.12.2016 г. част. изм.

Актуальность темы выполненной работы

Нет четкого обоснования актуальности темы и методологии решения значимых задач. В обосновании актуальности темы автор справедливо отмечает, что растущие масштабы производства диагностических и лечебно-профилактических препаратов требуют совершенствования технологии культивирования клеток, и, в первую очередь, методов деконтаминации питательных сред. Известно, что уровень контаминации сывороток крови КРС и клеточных культур из органов и тканей животных микоплазмами, бактериями и вирусами составляет от 10 до 82%. При этом автор не ссылается на Общую фармакопейную статью ОФС.1.1.0016.15 «Стерилизация» и Четырнадцатое издание ГФ РФ опубликованного 7 ноября 2018 г. В указанных документах Стерилизация рассматривается как валидируемый процесс, используемый при получении стерильных лекарственных форм для освобождения продукта, оборудования, вспомогательных веществ и упаковки от живых микроорганизмов и их спор. Перечисляются рекомендуемые методы стерилизации: *термические методы* – насыщенным водяным паром под давлением (автоклавирование), – горячим воздухом (воздушная стерилизация); *химические методы* – газами, –

растворами антисептиков; *стерилизация фильтрованием* (через фильтры с требуемым размером пор); *радиационный метод* стерилизации; уровень обеспечения стерильности (УОС) – отсутствие или наличие не более одного жизнеспособного микроорганизма. Одним из источников γ -излучения может быть радиоизотопный элемент (например, кобальт-60), при этом дозу поглощения устанавливают от 10 до 50 кГр. Таким образом, использование γ -излучения (кобальт-60), предложенного автором, предусмотрено нормативными документами. Для автора актуальным должна быть конкретизация условий стерилизации для решения конкретной биотехнологической проблемы.

Актуальна проблема поддержания культур клеток для выращивания вирусов. Но она должна решаться с привлечением для оценки качества культур клеток современных молекулярно-генетических методов (в частности, секвенирование), которыми не пользуется автор. При этом автор подчёркивает значимость негативного, так и позитивного последствия индукции радиационно-индуцированной нестабильности генома после γ -облучения клеточных культур. Кариологические исследования проводились общепринятыми старыми методами, не позволяющими оценить выраженность мутаций в геномах культур клеток, а также соотношение молчащих и экспрессирующих генов (транскриптомика).

Работа не содержит принципиально новой, ценной научной информации и полученные данные известны и нашли отражение в нормативных регламентирующих документах. Выдвинутое автором положение, что облучение питательных сред γ -лучами в дозах $(1,0-2,5) \times 10^4$ Гр надёжно инактивирует контаминанты бактериальной, микоплазменной и грибковой природы, укладывается в требования Фармакопеи РФ. Положение, что облучение ростовых сред в дозах $0,1-0,3 \times 10^4$ Гр обеспечивает надёжную деконтаминацию спонтанно и искусственно контаминированных бактериями и вирусами питательных сред, не соответствует действительности. Так ранее установлено, что сывороточные и гамма-глобулиновые препараты деконтаминируются от бактерий и вирусов дозой не менее 20кГр, а при большей дозе начинают рушиться белки и нарушается специфичность антител (Алёшкин В.А., Новикова Л.И., Афанасьев С.С., Борисова И.В., Зueva М.М., Зорик А.В. Способ получения иммуноглобулинового препарата для профилактики и терапии бактериальных и вирусных инфекций, иммуноглобулиновый препарат для профилактики и терапии бактериальных и вирусных инфекций (варианты) и суппозитории на основе иммуноглобулинового препарата. Пат. 2255766; 2005. (Россия)). Доза 20кГр позволяет провести деконтаминацию как от бактерий, так и от вирусов (происходит распад вирусных нуклеиновых кислот). Даже у самого автора в обзоре литературы написано, что обезвреживание γ -лучами применяется и приводятся авторы этих публикаций.

Предложенная для репродукции вирусов в биотехнологическом производстве новая перевиваемая сублиния клеток MDBK-02, обеспечивающая более высокую пролиферативную и вирусрепродуцирующую активность, требует дополнительного всестороннего молекулярно-генетического изучения (секвенирование генома клеток с последующим биоинформационным анализом), которое автором не было использовано для оценки и исключения нежелательных ген-модифицированных осложнений, возникающих в результате деконтаминации с помощью ионизирующего излучения.

Из названия и цели представленной диссертационной работы следует, что автором разработаны методы деконтаминации питательных сред и ростстимуляции культур клеток на основе ионизирующих излучений и предполагалось использование двух источников ионизирующих излучений – «Пума» с радиоизотопом ^{137}Cs и «Исследователь» радиоизотопом ^{60}Co . Однако в полученных результатах не отражены сравнительные данные, полученные при использовании указанных аппаратов, и указаны результаты, полученные на одном источнике ионизирующего излучения – «Исследователь».

В материалах и методах диссертации указано, что используются первично-трипсинизированные клетки почек КРС, клетки перевиваемы линий LEK, VERO, SPEV, MDBK, TR из криобанка ФГБНУ ФЦТРБ-ВНИВИ. Однако в диссертационной работе представленные результаты получены только на культуре клеток MDBK, данные, полученные на других упомянутых культурах клеток – отсутствуют. В материалах исследования указано, что используются несколько вирусов – ИРТ, ПГ-3 и реовирус. Однако в диссертации результаты получены только на одном вирусе – ИРТ, данные, полученные с использованием других упомянутых вирусов – отсутствуют. В диссертационной работе указано, что дозы ионизирующих облучений, использованные для стерилизации искусственно контаминированных жидких питательных сред, апробированы на микроорганизмах бактериальной и вирусной природы, в то время как в табличном материале, подтверждающем эти исследования, приводятся только результаты, полученные на бактериях. Недостаточно понятны условия поддержания культуры клеток MDBK на различных средах (ГЛА и МЕМ).

Количество выводов в два раза превышает количество поставленных задач. Кроме того, в выводах сформулированы результаты, которые не представлены в диссертации и автореферате (вывод 2, 7 и 8).

Недостаточно понятна обоснованность внесения в научную новизну постулата, что «Впервые установлено, что для сохранения ростовых факторов в питательных средах необходимо предварительно выдерживать их в замороженном состоянии». В диссертационной работе не представлены результаты, подтверждающие этот факт. Кроме того, само по себе вызывает сомнения необходимость заморажи-

вания питательных сред.

В диссертационной работе при определении оптимальных стерилизующих доз γ -лучей указан большой список сухих и жидких питательных сред, в то время как результаты представлены по отдельно взятым средам.

В заключении диссертационного совета Д 006.069.01 отмечено, что проведена модернизация технологической линии производства вирус-вакцин, разработаны и внедрены лабораторный регламент и применение технологии производства вирус-вакцин. Однако данные и документы, подтверждающие эти факты, в представленной работе отсутствуют. Также из заключения диссертационного совета следует, что создан лабораторный регламент выращивания культур клеток для изготовления вирус-вакцин, данные о котором отсутствуют в диссертационной работе. Кроме того, в заключении диссертационного совета имеются разночтения в формулировках теоретической значимости, где сначала отмечено, что доказана возможность использования ионизирующих излучений в установленных режимах для повышения эффективности биотехнологических процессов и повышения качества иммунопрепаратов, и ниже – проведена модернизация технологической линии производства вирус-вакцин с использованием облученных сред и культур клеток, а также разработан лабораторный регламент и применение технологии вирус-вакцин с использованием радиодеконтаминированных ростовых сред и радиостимулированных культур клеток, в разделе достоверность результатов исследования – установлена возможность введения в биотехнологический процесс способа деконтаминации питательных сред ионизирующими излучениями.

Представленные в качестве внедрения методические рекомендации являются внедрением местного (учрежденческого) уровня и его положения не распространяются на другие учреждения, занимающиеся разработкой, контролем и выпуском иммунобиологических препаратов. Кроме того, упомянутые методические рекомендации не представлены в приложении, где приводится титульный лист других методических рекомендаций «Методические рекомендации по использованию радиационной биотехнологии для производства противовирусных вакцин» (также учрежденческого уровня внедрения).

Положения, выносимые на защиту, сформулированы формально и не отражают результаты проделанной работы.

Печатные работы. Статья: Плотникова, Э.М. Разработка альтернативных методов оценки токсичности химических соединений на организм с использованием культур клеток / Э.М. Плотникова, Ю.В. Ларина, И.С. Глаголева, Р.Г. Фазлиахметов // Ученые записки Казанской государственной академии ветеринарной медицины им. Н.Э. Баумана. – 2-13. – т. 216. – С. 272-275. - входит в Перечень рецензируемых изданий № 2004 от 30.06.2015 г., но имеет право публикации по специальностям 06.02.00 – ветеринария и зоотехния; 03.03.00 – физиология. Статья: Иванов,

А.В. Влияние γ -лучей на перевиваемую линию клеток MDBK / А.В. Иванов, Э.М. Плотникова, Р.Н. Низамов, Р.Г. Фазлиахметов, И.С. Глаголева, Х.Р. Хазиев // Ветеринария. – 2014. - №1. – С. 61-62. - входит в Перечень рецензируемых изданий № 583 от 30.06.2015 г., но имеет право публикации по специальности 06.02.00 – ветеринария и зоотехника. **Следовательно, нет печатных работ в профильных по специальности журналах.** Указанный в автореферате патент на изобретение № 2549451 от 20.05.2013 г. не по теме диссертационного исследования. Кроме того, трудно судить о полученных в диссертации результатах, так как полнота опубликованных работ в рецензируемых изданиях составляет 5 страниц. На основании опубликованных печатных работ невозможно оценить полученные научные достижения диссертанта. Также имеются разночтения по авторскому вкладу в опубликованные научные работы, так в заключении организации, где выполнялась диссертационная работа указано 90% в то время как в заключении диссертационного совета – 80%.

Отмечается общая небрежность технического оформления диссертации и автореферата, которые не соответствуют требованиям Национального стандарта Российской Федерации ГОСТ Р 7.0.11-2011 «Диссертация и автореферат диссертации. Структура и правила оформления». Имеется небрежность в оформлении титульных листов диссертации и автореферата, и на оборотной стороне обложки автореферата, оформление которых регламентировано Приложениями к Приказу Минобрнауки России от 13 января 2014 г.

Имеются разночтения в названии диссертационной работы. Так, к защите диссертация принималась с названием «Разработка альтернативных методов деконтаминации питательных сред и ростстимуляции культур клеток для производства вирусных биопрепаратов» (Протокол № 6 от 30 марта 2018 г.), такое же название диссертации указано в отзыве научного руководителя Э.М. Плотниковой, однако во всех других документах, в автореферате и диссертации использовано другое название диссертации. Сведений об изменении названия диссертационной работы в установленном порядке не имеется.

В автореферате неправильно дано название ведущего учреждения, шифр диссертационного совета (вместо 006.069.01 указан 066.069.01); не по ГОСТ оформлены выходные данные патентов; не соответствуют выходные данные всех материалов конференций истинным выходным данным этих публикаций (неправильное название конференций, допущены ошибки в названии самих публикаций, неправильно указаны страницы работ); отсутствует раздел «Перспективы дальнейшей разработки темы», имеются орфографические ошибки (не разделены слова, добавление дефисов). Не представлены подтверждения практической значимости работы и не указаны акты внедрения из учреждения, в которых используются материалы диссертационного исследования; не указаны выходные данные методических рекомендаций (№

протокола и дата утверждения). В автореферате в разделе апробация полученных результатов не указана дата и протокол проведения апробации диссертационной работы. Из автореферата следует, что работа представлена на 132 страницах компьютерного текста, в то время как на 130 странице диссертации дан раздел 9. Приложения, в котором еще 7 страниц. Приложения не пронумерованы. Упомянутое в стенограмме (при ответе соискателя на вопрос одного оппонента) Приложение № 2 и страница 132 - отсутствуют в диссертации.

Отзывы на автореферат представлены из аграрных университетов (ФГБОУ ВО «Башкирский государственный аграрный университет», ФГБОУ ВО «Оренбургский государственный аграрный университет», ФГБУН «Омский аграрный научный центр»), сельскохозяйственной академии (два отзыва из одного учреждения - ФГБОУ ВО Самарская государственная сельскохозяйственная академия), и кафедры ветеринарного профиля ФГБОУ ВО Марийского государственного университета. Один отзыв на автореферат получен за сутки до проведения защиты. Однако, не представлено ни одного отзыва на автореферат из профильных биотехнологических учреждений, в том числе НИИ, занимающихся разработками, производством и контролем питательных сред, культур клеток и созданием вирусных вакцин и иммунобиологических препаратов.

Общее впечатление о диссертационной работе Фазлиахметова Р.Г. отрицательное. Тема диссертации, основные положения и выводы, сформулированные автором, не приносят принципиально новых знаний, соответствующих специальности 03.01.06 - биотехнология (в том числе бионанотехнологии), по которой представляется к защите.

Заключение

Диссертационная работа Фазлиахметова Рауля Галиахметовича на тему «Разработка методов деконтаминации питательных сред и ростстимуляции культур клеток на основе ионизирующих излучений», представленная на соискание учёной степени кандидата биологических наук, не соответствует требованиям п. 9 Положения «О порядке присуждения ученых степеней», утвержденного Постановлением Правительства РФ № 842 от 24 сентября 2013 года (с изменениями в соответствии с Постановлением Правительства РФ № 335 от 21 апреля 2016 года, № 748 от 02 августа 2016 года, № 650 от 29 мая 2017 года, № 1024 от 28 августа 2017 года «О внесении изменений в Положение о присуждении ученых степеней»), предъявляемым к кандидатским диссертациям, а её автор Фазлиахметов Р.Г. не заслуживает присуждения ему учёной степени кандидата биологических наук по специальности 03.01.06 - биотехнология (в том числе бионанотехнологии).

На заседании 31.01.2019 г. диссертационный совет принял решение не присуждать Фазлиахметову Равилю Галиахметовичу ученую степень кандидата биологических наук.

При проведении тайного голосования диссертационный совет в количестве 17 человек, из них 6 докторов наук по специальности 01.03.06– «биотехнология (в том числе бионанотехнологии)», участвовавших в заседании, из 25 человек, входящих в состав совета, проголосовали: за присуждение ученой степени - 1, против - 16, недействительных бюллетеней – нет.

Дополнительное заключение принято единогласно.

Председатель диссертационного совета,
доктор биологических наук, профессор

Алешкин Владимир Андрианович

Ученый секретарь диссертационного совета,
доктор медицинских наук, доцент

Борисова Ольга Юрьевна

31.01.2019 г.

