

ЗАКЛЮЧЕНИЕ ДИССЕРТАЦИОННОГО СОВЕТА 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 ПО ДИССЕРТАЦИИ НА СОИСКАНИЕ УЧЕНОЙ СТЕПЕНИ КАНДИДАТА НАУК

аттестационное дело № _____

решение диссертационного совета от 06 июня 2019 г. № 5.

О присуждении Яковлеву Алексею Константиновичу, гражданину Российской Федерации, ученой степени кандидата биологических наук.

Диссертация «Стандартизация методики определения специфической активности эритропоэтина» по специальности 03.01.06 – биотехнология (в том числе бионанотехнологии) принята к защите 02.04.2019 г., протокол № 4 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.

Соискатель Яковлев Алексей Константинович, 1977 года рождения, в 2001 году окончил Военно-ветеринарный факультет при Московской государственной академии ветеринарной медицины и биотехнологии имени К.И. Скрябина по специальности «Ветеринария». В 2010 г. был принят на должность научного сотрудника лаборатории иммунологии ГИСК им. Л.А. Тарасевича (с 01.04.2011 г. ФГБУ «Научный центр экспертизы средств медицинского применения» Минздрава России). С апреля 2011 г. Алексей Константинович переведен на должность ведущего микробиолога, а с апреля 2018 г. на должность эксперта I категории лаборатории иммунологии Испытательного центра экспертизы качества МИБН ФГБУ «НЦЭСМП» Минздрава России.

Диссертация выполнена в лаборатории иммунологии Федерального государственного бюджетного учреждения «Научный центр экспертизы средств медицинского применения» Министерства здравоохранения Российской Федерации.

Научный руководитель – доктор медицинских наук, профессор (03.01.03 - молекулярная биология), Меркулов Валдим Анатольевич, Федеральное государственное бюджетное учреждение «Научный центр экспертизы средств медицинского применения» Министерства здравоохранения Российской Федерации, заместитель генерального директора по экспертизе лекарственных средств.

Официальные оппоненты: Шмаров Максим Михайлович – доктор биологических наук (14.03.09 – клиническая иммунология и аллергология, 03.01.06 – биотехнология (в том числе бионанотехнологии), Федеральное государственное бюджетное учреждение «Национальный исследовательский центр эпидемиологии и микробиологии имени Н.Ф. Гамалеи» Министерства здравоохранения Российской Федерации, лаборатория молекулярной биотехнологии, заведующий; Мирошников Константин Анатольевич – доктор химических наук (03.01.04 биохимия, 03.01.06 – биотехнология (в том числе

бионанотехнологии), главный научный сотрудник, Федеральное государственное бюджетное учреждение науки институт биоорганической химии им. академиков М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова Российской академии наук, лаборатория молекулярной биоинженерии, заведующий – дали положительные отзывы на диссертацию.

Ведущая организация: Федеральное бюджетное учреждение науки «Государственный научный центр прикладной микробиологии и биотехнологии» Федеральной службы по надзору в сфере защиты прав потребителей и благополучия человека (Московская обл., Серпуховский р-н, пос. Оболенск) в своем положительном заключении, подписанном Храмовым Михаилом Владимировичем, кандидатом медицинских наук, заместитель директора по качеству и развитию, указал, что диссертация является работой, в которой содержится решение актуальной научно-практической задачи – стандартизации методики определения специфической активности эритропоэтина путем разработки технологии изготовления отечественного стандартного образца, совершенствования методики и подтверждением ее пригодности (валидацией). Разработанная технология изготовления стандартного образца специфической активности эритропоэтина, обеспечивает получение сублимационно высушенного стандартного образца со сроком годности 5 лет при температуре хранения минус 20 °С. Усовершенствованная методика определения специфической активности эритропоэтина обеспечивает гармонизацию отечественных требований по точности результатов специфической активности с Европейскими.

Соискатель имеет 20 опубликованных работ, в том числе 12 работ по теме диссертации, из них 4 работы опубликованы в рецензируемых научных изданиях, 4 – в других изданиях, одни тезисы – в рецензируемом издании, 3 – в материалах конференций, общим объемом 81 страница и авторским вкладом – 54 страницы. Наиболее значимые работы: 1) Яковлев, А.К. Изучение возможности гармонизации метода определения специфической активности рекомбинантных эритропоэтинов с требованиями Европейской фармакопеи / А.К. Яковлев, Л.А. Гайдерова, В.Н. Подкуйко, Р.А. Волкова, Н.А. Алпатова, Ю.В. Олефир // Стандартные образцы. – 2016. – № 3. – С. 4-11; 2) Яковлев, А.К. Разработка отраслевого стандартного образца специфической активности эритропоэтина / А.К. Яковлев, Р.А. Волкова, Л.В. Симутенко, Е.Л. Постнова, Т.А. Батуашвили, А.А. Воропаев, Н.А. Алпатова, В.А. Томилин, Е.Д. Мыца, В.П. Бондарев, В.А. Меркулов // Химико-фармацевтический журнал. – 2018. – Т. 52. – № 1. – С. 60-64; 3) Яковлев, А.К. Совершенствование методики определения специфической активности эритропоэтина / А.К. Яковлев, А.В. Алешкин, В.А. Меркулов, В.П. Бондарев // Клиническая лабораторная диагностика. – 2018. – Т. 63. – № 7. – С. 422-428.

На диссертацию и автореферат поступило 4 положительных отзыва без замечаний от: 1) д.м.н., профессора Игнатьева Г.М., заместителя руководителя производственного направления Федерального государственного бюджетного научного учреждения «Федеральный научный центр исследований и разработки иммунобиологических препаратов им. М.П. Чумакова РАН»; 2) д.м.н., профессора Михайловой Н.А., главного научного сотрудника Федерального государственного бюджетного научного учреждения «Научно-исследовательский институт вакцин и сывороток им. И.И. Мечникова»; 3) д.м.н., Таран Т.В., заведующей лабораторией подготовки специалистов Федерального казенного учреждения здравоохранения Ставропольский противочумный институт

Роспотребнадзора; 4) к.х.н. Липкина А.В., старшего научного сотрудника Федерального государственного учреждения «Федеральный исследовательский центр «Фундаментальные основы биотехнологии» Российской академии наук». В отзывах отмечено, что в ходе диссертационного исследования разработана технология изготовления стандартного образца подобраны условия лиофильного высушивания и оптимизирован состав защитной среды. Изготовлен стандартный образец, усовершенствована и стандартизована методика определения специфической активности эритропоэтина, проведена ее валидация, на примере которой фактически предложен методический подход к валидации биологических методов *in vivo*.

Выбор официальных оппонентов и ведущей организации обосновывается тематикой научных исследований, компетентностью в вопросах, рассмотренных в диссертации, большим опытом работы в области молекулярной биологии и разработке биотехнологических лекарственных препаратов.

Диссертационный совет отмечает, что на основании выполненных соискателем исследований разработан сублимационно высушенный стандартный образец специфической активности эритропоэтина, со сроком годности 5 лет при температуре хранения минус 20 °С и предложена технология его изготовления и контроля. Доказано что усовершенствованная методика определения специфической активности эритропоэтина имеет повышенную точность: прецизионность не более 1,45 антилогарифма полуширины доверительного интервала и валидационный критерий правильности – смещение от минус 16 до 20 %. Введены в методику международные требования оценки точности (прецизионность) результатов с обязательным вычислением доверительного интервала рассчитанной активности.

Теоретическая значимость исследования обоснована тем, что доказаны необходимость и алгоритм гармонизации отечественной методики определения специфической активности эритропоэтина, а также актуальность использования в качестве меры прецизионности при логнормальном преобразовании первичных данных антилогарифма полуширины доверительного интервала. Применительно к проблематике диссертации при определении чувствительности методики результативно использован алгоритм исследований – испытуемые образцы получали путем серии независимых разведений стандартного образца эритропоэтина, чтобы стандартный и испытуемый образцы имели одинаковую активность (для обнуления разницы и обеспечения возможности пользоваться условно истинным значением, принятым за 100 %). При этом различия между результатами отражают область неизбежных случайных погрешностей, которая соответствует чувствительности метода. Изложены данные о достоверном влиянии линии мышей на результат определения специфической активности эритропоэтина и аналитической точности методики при различных схемах. Раскрыты достигнутые пределы точности усовершенствованной методики при различных способах подсчета ретикулоцитов. Изучена связь между количеством параллельных испытаний и числом уровней доз. Увеличение животных в уровне не уменьшает вариабельность методики, теоретически прогнозируется снижение вариабельности путем увеличения числа уровней при одновременном снижении количества животных. Проведена модернизация методики по результатам обоснованного выбора линии мышей, количества используемых в испытании животных (по 8 мышей линии Balb/C или F1(CBAxC57BL) для каждого

уровня), экспериментального исследования точности на отдельных уровнях определен диапазон применения, обоснованы статистический метод и диапазон специфической активности, границы ее доверительного интервала. Таким образом, на основе обобщенного опыта совершенствования отечественной методики определения специфической активности эритропоэтина обоснован алгоритм гармонизации и апробирован методологический подход валидации и стандартизации биологических методов.

Значение полученных соискателем результатов исследования для практики подтверждается тем, что разработанная автором технология изготовления стандартного образца специфической активности эритропоэтина внедрена в работу Федерального государственного бюджетного учреждения «Научный центр экспертизы средств медицинского применения» Министерства здравоохранения Российской Федерации, (акт внедрения от 03 декабря 2018 г.), изготовленный по данной технологии стандартный образец используется ФГБУ «НЦЭСМП» МЗ РФ при проведении сертификационных испытаний и по заданиям Минздрава, а также отечественным производителем лекарственных препаратов эритропоэтина ООО «Фармапарк» (акт внедрения от 16 января 2019 г.). Определены перспективы использования предложенной методики определения специфической активности эритропоэтина и разработаны подходы к валидации в системе контроля качества лекарственных препаратов. Созданы и обобщены принципы и этапы стандартизации методики определения специфической активности эритропоэтина, которые будут использованы в дальнейших исследованиях в ФГБУ «НЦЭСМП» МЗ РФ при разработке и совершенствовании методик контроля специфической активности лекарственных препаратов. Представлен апробированный алгоритм разработки и аттестации отечественного сухого стандартного образца специфической активности эритропоэтина, гармонизированного в соответствии с международным уровнем оценки качества.

Оценка достоверности результатов исследования выявила, что объем экспериментальных исследований проведенный на лабораторных животных является достаточным, методы статистической обработки подобраны адекватно, эксперименты проведены на высоком научно-методическом уровне с применением физико-химических и биологических методов и использованием современного сертифицированного оборудования, показана воспроизводимость результатов исследования в различных условиях. В ходе выполнения диссертационной работы экспериментальные исследования проведены на линейных Balb/c (n=1312), гибридных B6D2F1 (n=336), F1 (CBA*C57BL) (n=384) и беспородных мышях (n=96). Теория и алгоритм исследования построены на известных данных и согласуется с опубликованными экспериментальными данными по разработке и аттестации стандартных образцов. Идея базируется на отечественных и мировых данных о структуре, свойствах и механизме действия эритропоэтина и требованиях международных методических рекомендациях. Использовано сравнение авторских данных и данных, полученных ранее по разработке и аттестации стандартных образцов и проведению валидации. Установлено, что большинство результатов исследования по валидационным характеристикам усовершенствованной и стандартизированной методики определения специфической активности эритропоэтина согласуется с результатами других авторов, представленных в независимых источниках. Результаты полученные при апробации стандартного образца коррелируют с паспортными

данными. Используются современные методики подсчета ретикулоцитов с помощью проточного цитофлуориметра и световой микроскопии с возможностью визуализации изображения на экран и его фотоснимка. Первичные результаты обработаны сертифицированной статистической прикладной компьютерной программой (PLA, версия 2.0, фирма «Stegmann Syst», Германия).

Личное участие соискателя заключалось в выполнении всех экспериментальных исследований, анализе и интерпретации полученных экспериментальных данных, их систематизации, статистической обработке с описанием полученных результатов. Автором обоснован выбор исходного материала и экспериментально подтверждена возможность его применения при производстве стандартного образца специфической активности эритропоэтина; экспериментально доказана возможность включения критерия приемлемости результатов испытания – доверительного интервала рассчитанной активности; проведено совершенствование методики. Оценка качества материала для кандидата в стандартный образец и характеристика разработанного стандартного образца специфической активности эритропоэтина по физико-химическим показателям проведена совместно с сотрудниками лаборатории молекулярно-биологических и генетических методов испытаний ИЦЭК МИБП ФГБУ «НЦЭСМП» Минздрава России д.б.н. Волковой Р.А., к.б.н. Томилиным А.В. Лиофилизация материала для кандидата в стандартный образец проведена совместно с сотрудником лаборатории бактериофагов и препаратов нормофлоры с коллекцией микроорганизмов ИЦЭК МИБП Воропаевым А.А. Валидация методики и аттестация разработанного стандартного образца специфической активности эритропоэтина выполнена совместно с сотрудником лаборатории вирусных вакцин ИЦЭК МИБП ФГБУ «НЦЭСМП» Минздрава России к.б.н. Постновой Е.Л. и сотрудниками лаборатории фармакологии ИЦЭК ЛС ФГБУ «НЦЭСМП» Минздрава России к.б.н. Батуашвили Т.А. и к.б.н. Симутенко Л.В. Аprobация разработанного стандартного образца специфической активности эритропоэтина ОСО 42-28-437-2017 проведена в исследованиях по оценке специфической активности зарегистрированных лекарственных препаратов в ФГБУ «НЦЭСМП» МЗ РФ и на базе отечественного производителя лекарственных препаратов эритропоэтина ООО «Фармапарк».

На заседании 06 июня 2019 года диссертационный совет принял решение присудить Яковлеву Алексею Константиновичу ученую степень кандидата биологических наук.


При проведении тайного голосования диссертационный совет в количестве 17 человек, из них 6 докторов наук по специальности 03.01.06 – биотехнология (в том числе бионанотехнологии), участвовавших в заседании, из 25 человек, входящих в состав совета, проголосовали: за – 17, против – нет, недействительных бюллетеней – нет.

Председатель диссертационного совета,
доктор биологических наук, профессор,

Ученый секретарь диссертационного совета,
доктор медицинских наук, доцент

06.06.2019 г.




Алёшкин Владимир Андрианович


Борисова Ольга Юрьевна