

ОТЗЫВ

официального оппонента Клюкиной Валентины Ивановны на диссертационную работу Гавриловой Юлии Кирилловны " Разработка метода контроля уровня вируснейтрализующих антител на модели клеточных культур в производстве антирабического иммуноглобулина", представленную на соискание ученой степени кандидата биологических наук по специальности 1.5.6 – биотехнология

Актуальность избранной темы диссертации. По данным Всемирной организации здравоохранения, ежегодно в мире от бешенства погибает около 60 тыс. человек. Иммунизация антирабической вакциной и применение антирабического иммуноглобулина, включенного в перечень жизненно необходимых и важнейших лекарственных препаратов для медицинского применения, является основной мерой постэкспозиционной профилактики и эффективным путем сокращения случаев заражения людей бешенством. В настоящее время ФКУЗ РосНИПЧИ «Микроб» является единственным производителем антирабического иммуноглобулина на территории России.

Эффективность применения антирабического иммуноглобулина напрямую зависит от его «специфической активности»- уровня вируснейтрализующих антител. В этой связи получение высокоактивного препарата антирабического иммуноглобулина и контроль его активности на всех стадиях его технологического производства является чрезвычайно актуальной научно-производственной задачей.

Диссертационная работа Гавриловой Юлии Кирилловны посвящена поиску альтернативных способов определения уровня антирабических антител, заменой реакции нейтрализации на белых мышах на культуральные методы. Актуальность разработки и применения методов *in vitro* для определения специфической активности в производстве антирабического иммуноглобулина, также обоснована рекомендациями экспертов ВОЗ по бешенству (WHO, Technical Report Series 982, 2013; Series

1012, 2018). На основании выше изложенного, диссертационная работа Гавриловой Ю. К., направленная на решение проблемы совершенствования методов оценки активности антирабического иммуноглобулина, обеспечения рынка эффективным отечественным препаратом для постэкспозиционной профилактики бешенства, имеет социальное и народно-хозяйственное значение.

Обоснованность и достоверность научных положений, выводов, рекомендаций, сформулированных в диссертации подтверждена тем, что диссертантом проведена полная и объективная оценка совершенствования технологий производства и перспективы применения культуральных методов оценки активности антирабического иммуноглобулина, дан анализ их достоинств и недостатков, сформулированы цели и задачи исследований и получены важные для науки и практики результаты.

Научная новизна и практическая значимость исследований. В диссертации Гавриловой Ю.А. представлены результаты, представляющие научной новизной и практической значимостью. Разработаны технологии изготовления компонентов культурального теста для количественного определения уровня вируснейтрализующих антител- обосновано применение штамма вируса бешенства «Москва 3253_{Vero}» , перевиваемой клеточной линии Vero, питательной среды, для культивирования инфицированных клеточных культур с целью получения рибонуклеопротеина вируса бешенства на основе ферментативного гидролизата фибрина, конъюгатов антител к рибонуклеопротеину вируса бешенства «Москва 3253_{Vero}» с флуоресцентной меткой, Впервые предложена схема иммунизации кроликов рибонуклеопротеином вируса бешенства штамм «Москва 3253_{Vero}». с наночастицами коллоидного золота в качестве адъюванта. Приоритет исследований подтвержден патентом РФ 2673718 «Питательная среда для культивирования перевиваемых клеточных линий млекопитающих» (опубликован 29.11.2018 г., бюл. № 34).

Обоснованность и достоверность научных положений и выводов.

Обоснованность и достоверность полученных результатов основана на значительном объеме экспериментов и полученных в ходе исследования данных, их статистической обработке, соответствии теоретическим данным, применении современных актуальных методов исследования, соответствующих цели и задачам работы. Эксперименты проведены на аттестованном оборудовании, контрольно-измерительные приборы, задействованные в ходе исследования, прошли метрологическую поверку. Выбором направления исследований, в результате которых сформулированы цель и задачи исследований, обоснованы основные положения, выносимые на защиту, выводы и рекомендации.

Теоретическая и практическая значимость работы. Изложенные в диссертации Гавриловой Ю.К. результаты служат теоретической основой исследований по совершенствованию контроля производства антирабических препаратов. Практически значимым итогом диссертации является разработка метода контроля специфической активности антирабических сывороток и иммуноглобулина с применением клеточной культуры и вируса бешенства «Москва 3253_{vero}». Разработан и аттестован стандартный образец предприятия (серия 41-01-20) специфической активности антирабического иммуноглобулина для применения в реакции нейтрализации вируса бешенства на клеточной культуре. Разработана и утверждена директором ФКУЗ РосНИПЧИ «Микроб» «Инструкция по применению на стандартный образец предприятия специфической активности иммуноглобулина антирабического для применения в реакции нейтрализации вируса на культуре клеток» (1.12.2020).

На основании результатов исследований составлены методические рекомендации учрежденческого уровня: «Выделение нуклеопротеина из аттенуированного вируса бешенства» (одобрены Ученым Советом и утверждены директором РосНИПЧИ «Микроб». Протокол № 5 от

19.12.2017); «Определение специфической активности антирабических сывороток и иммуноглобулина методом иммунофлуоресценции на клеточных культурах» (одобренны Ученым Советом и утверждены директором РосНИПЧИ «Микроб». Протокол № 4 от 6.06.2018).

В целом, научные положения, выводы и рекомендации вытекают из результатов собственных исследований, их достоверность не вызывает сомнений. Текст автореферата адекватно передает содержание диссертационной работы.

Связь работы с научными программами. Диссертационная работа выполнена в ФКУЗ РосНИПЧИ «Микроб» в период 2015 -2021 гг. в рамках отраслевых НИР: 48-2-14 «Разработка и внедрение в производство МИБП новых решений, направленных на повышение качества препаратов и эффективности технологических процессов» (№ госрегистрации 01201457722), 70-2-17 «Разработка и совершенствование биотехнологий промышленного выпуска иммунобиологических средств профилактики и диагностики инфекционных заболеваний бактериальной и вирусной природы» (№ госрегистрации АААА-А16-116112810063-4), 83-2-20 «Совершенствование этапов производства и методов контроля лечебно-профилактических и диагностических препаратов» (номер госрегистрации АААА-А20-120012090035-1) и 89-2-21 «Научно-прикладные аспекты производства и совершенствования препаратов для иммунопрофилактики и диагностики опасных бактериальных и вирусных инфекций» (№ госрегистрации АААА-А21-121012090066-4).

Структура и объем диссертации. Диссертация изложена на 132 страницах компьютерного текста, включает введение, обзор литературы, материалов и методов, 3 глав собственных исследований, заключение, выводы, рекомендаций по использованию результатов диссертационного исследования, список сокращений и условных обозначений и список

литературы, состоящего из 226 источников. Диссертация иллюстрирована 17 рисунками и 5 таблицами

В обзоре литературы (глава 1,2), изложенном на 18 страницах, дана характеристика вируса бешенства и его антигенного состава, рассмотрены штаммы вируса, применяемые в производстве антирабических диагностических и лекарственных препаратов, выпускаемых в России и за рубежом. Особое внимание диссертант уделила актуальным тенденциям развития биотехнологии производства противовирусных иммунобиологических лекарственных средств. Автор показал перспективность применения клеток VERO при культивировании вируса бешенства, раскрыла сущность и достоинство высокочувствительного и специфичного культурального метода для количественного определения вируснейтрализующих антител, а также дала сравнительную характеристику методов очистки и концентрирования вируса бешенства, методов определения специфической активности антирабической сыворотки и иммуноглобулина. Автор подробно остановился на необходимости разработки и применения в производстве стандартных образцов предприятий для контроля качества специфической активности антирабического иммуноглобулина на всех стадиях его производства.

Глубокий анализ данных литературы по изучаемой проблеме, свидетельствует о высоком уровне теоретической подготовки диссертанта, что послужило основанием адекватного выбора цели исследования и методически верного решения поставленных задач.

Основная часть собственных исследований (главы 2-5), изложена на 50 страницах текста диссертации и посвящена описанию материалов и оборудования, методов и результатов исследований. Анализ этого раздела показывает, что диссертант Гаврилова Ю.К. хорошо владеет арсеналом современных вирусологических, иммунохимических, биохимических, физико-химических методов, направленных на совершенствование

технологии приготовления компонентов культурального метода количественного определения вируснейтрализующих антител. Полученные данные обработаны методом вариационной статистики с использованием программы Microsoft Office Excel 2010.

Результаты, представленные в разделе «Собственные исследования», свидетельствуют о высоком профессиональном уровне исследователя. Автором экспериментально обоснована возможность выделения рибонуклеопротеина из цитоплазмы клеточной культуры Vero, инфицированной вирусом бешенства «Москва 3253_{Vero}», выращенной на экспериментальной питательной среде, содержащей от 0,1 до 0,25 % сухого ферментативного гидролизата фибрина. Применение экспериментальной среды в указанных концентрациях позволило в $(1,45 \pm 0,05)$ раза увеличить выход рибонуклеопротеина из инфицированной 72-часовой культуры Vero, по сравнению с коммерческими питательными средами 199 и Игла MEM.

Разработана эффективная схема иммунизации кроликов для получения антител к рибонуклеопротеину вируса бешенства с наночастицами коллоидного золота в качестве адъюванта. Данная схема позволила получить сыворотки с вдвое большей активностью (1:25600), чем при применении схем иммунизации с использованием полиоксидония в качестве адъюванта и без применения адъюванта.

Получены флуоресцирующие конъюгаты на основе антител к рибонуклеопротеину вируса бешенства штамма «Москва 3253_{Vero}». для исследования образцов инфицированных вирусом бешенства клеточных культур методом прямой флуоресценции.

Разработан методический прием для определения специфической активности антирабических сывороток и иммуноглобулина на культуре клеток. Vero; применение в качестве фиксатора 80 % водного раствора ацетона или 4 % раствора формальдегида в течение (15 ± 5) мин; окрашивание образцов коммерческим или экспериментально полученными

диагностическими конъюгатами в течение (60 ± 10) мин; период нейтрализации вируса бешенства антирабическими антителами – не менее 40 мин; учет результатов реакции с применением люминесцентной микроскопии через 72 ч от начала инкубации.

К важным научно-практическим результатам можно отнести разработку и аттестацию стандартного образца предприятия специфической активности антирабического иммуноглобулина для применения в реакции нейтрализации вируса на культуре клеток. Экспериментально подтверждена возможность его использования для определения специфической активности иммуноглобулина *in vitro* при проведении контрольных исследований.

Основные результаты диссертационной работы прошли апробацию на 10 международных научно-технических конференциях, отражены в 16 научных работ, из которых 4 статьи в изданиях, рекомендованных ВАК, 1 патент на изобретение, 11 публикаций в сборниках и материалах конференций и иных изданиях.

Принципиальных замечаний по работе нет. Оценивая в целом диссертационную работу Ю.К.Гавриловой положительно, как научное исследование, демонстрирующее разностороннюю подготовку автора, просим ответить на вопрос :

1. В материалах диссертации отсутствует раздел «Приложения» с актами проведенных исследований, копиями патентов, разработанной документацией и др., наличие которых подтвердило бы достоверность полученных диссертантом результатов.

Заключение. Диссертационная работа Гавриловой Юлии Кирилловны " Разработка метода контроля уровня вируснейтрализующих антител на модели клеточных культур в производстве антирабического иммуноглобулина", является самостоятельной законченной научно-квалификационной работой, выполненной на высоком методическом уровне с использованием современных методов исследований, в которой решена

важная научная проблема, имеющая социально-экономическое и практическое значение, направленное на внедрение в производство антирабического глобулина метод количественной оценки уровня вируснейтрализующих антител.

Диссертационная работа Гавриловой Ю.К. по актуальности, объему экспериментальных исследований, теоритической и практической значимости полученных результатов, полностью соответствует п. 9 «Положения о порядке присуждения ученых степеней», утвержденного постановлением Правительства РФ №842 от 29.09.2013 г., предъявляемым к кандидатским диссертациям, а её автор заслуживает присуждения учёной степени кандидата биологических наук по специальности 1.5.6. «Биотехнология».

Отзыв заслушан, рассмотрен и одобрен на заседании сотрудников отдела иммунологии ФГБНУ «ВНИТИБП» (протокол №9 от 15 марта.2022г.)

Официальный оппонент:

Доктор биологических наук, профессор,
Лауреат премии правительства РФ
в области науки и техники,
заведующая отделом иммунологии

Клюкина Валентина Ивановна

ФГБНУ «Всероссийский научно-исследовательский и технологический институт биологической промышленности», (ФГБНУ «ВНИТИБП»),
141142, Московская обл., Щелковский р.-н, г.о. Лосино-Петровский,
пос. БиокOMBината, строение 17, корпус 1
e-mail: vnitibp@mail.ru , тел.(496) 56-7-32-63

Подпись Клюкиной В.И. удостоверяю:

Учёный секретарь ФГБНУ «ВНИТИБП» Маркова Евгения Владимировна

23 марта 2022 г.