

ОТЗЫВ

официального оппонента Сизиковой Татьяны Евгеньевны на диссертацию Гавриловой Юлии Кирилловны на тему: «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»

Бешенство представляет собой природно-очаговое особо опасное инфекционное заболевание. Возбудителем бешенства у человека и теплокровных животных является нейротропный вирус, который согласно классификации, предложенной Международным Комитетом по таксономии вирусов, относится к роду *Lyssavirus*, семейству *Rhabdoviridae*, порядку *Mononegavirales*.

По данным ВОЗ, от бешенства в мире ежегодно погибает около 60 тыс. человек. В Российской Федерации (РФ) сохраняется напряженная эпидемиологическая и эпизоотологическая обстановка по бешенству. По данным Роспотребнадзора, ежегодно в лечебные учреждения России на предмет возможного инфицирования вирусом бешенства обращается около 450 тыс. человек и, при этом более половины из них впоследствии получает антирабическое лечение.

Предупреждение случаев заболевания бешенством во многом зависит от оказания своевременной и качественной антирабической помощи. В связи с этим особого внимания требует процесс производства и контроля качества препаратов для профилактики бешенства, одним из которых является гетерологичный антирабический иммуноглобулин из сыворотки крови лошади.

Совершенствованию этапов производства препарата может способствовать применение современных методов исследования, характеризующихся высоким уровнем чувствительности, специфичности, скоростью постановки, автоматизацией процесса учета результатов анализа, возможностью одновременного исследования большого числа проб. Среди

современных методов исследования материала на наличие вируса бешенства или антител к нему, одним из наиболее перспективных, является метод нейтрализации вируса бешенства на клеточной культуре, позволяющий сократить срок проведения анализа, исключить работы с лабораторными животными, увеличить количество одновременно исследуемых образцов при сохранении высокой чувствительности и специфичности.

Изложенное определяет актуальность представленной диссертационной работы, целью которой является разработка метода *in vitro* с использованием клеточных культур, перспективного для контрольных исследований специфической активности антирабических сывороток и иммуноглобулина.

Диссертация Гавриловой Ю.К. представлена на 132 страницах текста, отпечатанного с помощью компьютерного принтера. Работа иллюстрирована 5-ю таблицами и 17-ю рисунками. Список литературы содержит библиографические данные о 226 работах отечественных и зарубежных авторов.

Во введении работы содержится информация об актуальности темы исследования и степени ее разработанности, сформулированы цель и задачи проводимых исследований, научная новизна, теоретическая и практическая значимость работы, методология и методы исследования, научные положения, выносимые на защиту: степень достоверности полученных экспериментальных данных. В данном разделе представлены также сведения об апробации работы, личном вкладе автора, сведения о публикации результатов исследования.

В обзоре литературы, состоящем из трех глав, представлены сведения о вирусе бешенства и его антигенной структуре, рассмотрены методы выявления вируса бешенства и антител к нему и их актуальность для производства антирабических препаратов, применение стандартных образцов в производстве антирабического иммуноглобулина. Содержание обзора литературы хорошо согласуется с направлением собственных исследований

автора, в которых содержатся данные о получении антител к рибонуклеопротеину вируса бешенства штамма «Москва 3253_{Vero}» и конструирование на их основе флуоресцирующих конъюгатов, экспериментальное обоснование условий выявления антигена вируса бешенства и антирабических антител на клеточной культуре методом иммунофлуоресценции, оценка эффективности метода иммунофлуоресценции при определении специфической активности антирабических сывороток и иммуноглобулина.

По результатам проведенной работы предложен и экспериментально обоснован комплекс биотехнологических решений по разработке метода определения специфической активности антирабического иммуноглобулина на культуре клеток, включающий применение питательной среды на основе ферментативного гидролизата фибрина при культивировании инфицированной вирусом бешенства клеточной культуры, получение флуоресцентного диагностикума, разработку стандартного образца предприятия специфической активности антирабического иммуноглобулина для применения в реакции нейтрализации вируса на культуре клеток. Экспериментальная оценка аналитической системы, включающей предложенный автором работы методический прием и стандартный образец предприятия специфической активности антирабического иммуноглобулина для применения в реакции нейтрализации вируса на культуре клеток, подтверждает возможность ее применения для контроля специфической активности антирабических сывороток и иммуноглобулина в производственном процессе.

Научная новизна проведенных исследований подтверждена, в частности, патентом РФ на изобретение.

Научные положения и выводы диссертационной работы подтверждены представленными в ней экспериментальными данными.

Содержание диссертации соответствует специальности, по которой она представлена к защите.

Содержание автореферата диссертации соответствует ее основному содержанию.

Положительно оценивая представленную диссертационную работу, необходимо, вместе с тем, высказать отдельные замечания.

1 Текст диссертация оформлен с отклонениями от требований ГОСТ Р 7.0.11-2011.

По тексту работы встречаются отдельные недостатки. Так, фраза «РНК вируса бешенства, локализованная на 3'-конце генома, отвечает за процессы транскрипции и трансляции с последующим формированием белков вируса» (стр. 20) в известной степени противоречит содержащейся на следующей странице фразе «РНК-зависимая РНК-полимераза (L-белок) – полипептид, содержащий 2142 а.о., участвующий в инициации первичной транскрипции геномной РНК...» поскольку ген L-белка расположен в 5'-концевой части генома. Допущены неточности при описании процесса бляшкообразования (стр. 35) и сути реакции нейтрализации вируса бешенства *in vivo* (стр. 37). Во фразе, «контроль уровня вируснейтрализующих антител в антирабических сыворотках и иммуноглобулине на модели культуры клеток осуществляли с использованием штамма вируса бешенства «Москва 3253_{vero}» (активность составляет от 4,0 до 8,0 ID₅₀/мл), неточным является термин «активность» (стр. 45). Аналогичная неточность допущена и в следующей фразе (показатель активности не менее 10^{-4,8}/мл). Активность можно выразить одним из трех способов: 1·10^{4,8} ID₅₀/мл; 6,3·10⁴ ID₅₀/мл; 4,8 lg ID₅₀/мл, но не 10^{-4,8}/мл – последний показатель представляет собой величину ID₅₀. На стр. 47-48 вместе с правильным выражением «кроликов (*Oryctolagus cuniculus*) породы «Шиншилла» **массой** 1,5-2,5 кг встречается неточное – «Лошадей рысистой породы (*Equus ferus caballus*) **весом** более 400 кг ...». При указании буферного раствора необходимо указывать величину pH (стр. 57). Фраза «из клеточной культуры, взятой в исходной концентрации 10⁶» (стр. 60), не позволяет получить точную информацию о концентрации клеток, используемой при проведении эксперимента. По тексту диссертации

встречаются сокращения и условные обозначения, отсутствующие в разделе «Список сокращений и условных обозначений».

Однако отмеченные недостатки не оказывают влияния на общую положительную оценку представленной работы.

Вывод: Диссертация Гавриловой Юлии Кирилловны на соискание ученой степени кандидата биологических наук по специальности 1.5.6. «Биотехнология» является научно-квалификационной работой, соответствует одному из признаков п.9, а также п.п. 10, 11, 13 и 14 «Положения о порядке присуждения ученых степеней», утвержденного постановлением Правительства Российской Федерации от 24 сентября 2013 г. № 842 (ред. от 11.09.2021 г.). Соискатель заслуживает присуждения искомой ученой степени.

Научный сотрудник отдела
ФГБУ «48 ЦНИИ» Минобороны России
кандидат биологических наук

 Сизикова Татьяна Евгеньевна

Подпись Сизиковой Т.Е. заверяю
Ученый секретарь научно-технического совета
ФГБУ «48 ЦНИИ» Минобороны России
кандидат медицинских наук,
старший научный сотрудник



 Краснянский В.П.

«24» февраля 2022 г.