

УТВЕРЖДАЮ

Директор Федерального государственного
бюджетного научного учреждения
«Всероссийский научно-исследовательский
и технологический институт биологической
промышленности»

А. Д. Забережный

« 12 » сентября 2024 г.

ОТЗЫВ

ведущей организации ФГБНУ «Всероссийский научно-исследовательский и технологический институт биологической промышленности» на диссертационную работу Шевченко Максима Александровича «Оптимизированная питательная среда суспензионного культивирования клеток ВНК-21/2-17 и репродукции вируса ящура», представленную к защите на соискание ученой степени кандидата ветеринарных наук по специальности 4.2.3 «Инфекционные болезни и иммунология животных».

Актуальность избранной темы. Ящур считается высоко контагиозным заболеванием домашних (крупного рогатого скота, овец, коз и свиней) и диких парнокопытных животных. Хотя ящур имеет низкий показатель смертности, его высокая заболеваемость и контагиозность могут привести к огромному экономическому ущербу. Главным средством при борьбе с ящуром является вакцинопрофилактика.

В настоящее время противоящурные вакцины производятся с использованием культуры клеток ВНК-21, полученных в виде суспензии. Самым важным и решающим шагом в культивировании клеток ВНК-21 является выбор подходящей среды для выращивания *in vitro*. Среда для культивирования клеток ВНК-21 обычно включает в себя соответствующий источник энергии и питательные вещества, которые регулируют клеточный цикл. Типичная культуральная среда состоит из набора аминокислот, витаминов, неорганических солей, глюкозы и сыворотки в качестве источника факторов роста, гормонов. Помимо питательных веществ, среда также помогает поддерживать pH.

Диссертационная работа автора посвящена актуальному вопросу производства противоящурных вакцин, а именно созданию оптимального варианта питательной среды для культивирования суспензионной культуры клеток ВНК-21/2/17 и репродукции вируса ящура. Выделяя и анализируя содержание наиболее важных компонентов питательной среды для роста культуры клеток, исследователям удалось сравнить, доказать и обеспечить тот вариант питательной среды, при котором процесс культивирования культуры клеток и репродукции вируса стал наиболее эффективным.

Питательная среда поддерживает сохранение, пролиферацию клеток, скорость размножения вируса в культуре клеток, а в итоге эффективность технологии изготовления биопрепаратов и соответствие необходимым требованиям культуры клеток.

Ранее учеными проводились исследования по данному вопросу и с развитием биохимии, биотехнологии внесены много предложений и альтернатив. Однако актуальность данной работы заключается в суммировании всех достижений, в том числе и собственных, комплексном подходе к данной проблеме.

Поиск новых компонентов и их оптимальных сочетаний для питательных сред, используемых в производственных процессах при изготовлении противоящурных вакцин, является актуальным направлением для дальнейших исследований.

Целью исследований диссертанта стала оптимизация питательной среды для суспензионного культивирования клеток ВНК-21/2-17 и репродукции вируса ящура.

Автору необходимо было решить следующие задачи:

- определить оптимальную концентрацию глюкозы в питательной среде для культивирования клеток ВНК-21/2-17;
- оценить возможность использования гидролизата белков крови в качестве основного источника аминокислот в питательной среде для культивирования клеток ВНК-21/2-17;
- определить оптимальную концентрацию сыворотки крови в питательной среде для культивирования клеток ВНК-21/2-17;
- использовать метод проточной цитометрии для оценки состояния популяции клеток ВНК-21/2-17 в процессе культивирования и репродукции вируса ящура;
- адаптировать линию клеток ВНК-21/2-17 к росту в питательной среде с использованием добавки «Sheff-Vax»;
- адаптировать линию клеток ВНК-21/2-17 к росту в бессывороточной среде «Cellvento»;
- сравнить иммуногенную активность вакцин, изготовленных из антигена вируса ящура, репродуцированного в клетках ВНК-21/2-17, выращенных в бессывороточной среде «Cellvento» и в оптимизированной среде.

Научная новизна диссертационной работы Шевченко М.А. состоит в том, что соискателем проведены исследования по изучению: репродукции вируса ящура в клетках ВНК-21/2-17, выращенных в питательных средах с различным содержанием глюкозы; аминокислотного состава гидролизата белков крови; влияния концентрации сыворотки крови в питательной среде на кратность прироста клеток ВНК-21/2-17 и репродукцию вируса ящура, что позволило предложить новый состав питательной среды для культивирования клеток ВНК-21/2-17. В ходе работы удалось внедрить метод проточной цитометрии для контроля клеточной популяции в процессе культивирования. Автор успешно провел работу по адаптации линии клеток ВНК-21/2-

17 к бессывороточной среде Cellvento™ ВНК-200 и к среде с использованием бессывороточной добавки Sheff-Vax, что позволило получить антигены для изготовления противоящурных вакцин и определить их иммуногенную активность.

Научная новизна полученных результатов подтверждена получением патентов на изобретения: № 2650768 «Штамм О №2212/Приморский/2014 вируса ящура *Aphtaepizooticae* типа О для контроля антигенной и иммуногенной активности противоящурных вакцин и для изготовления биопрепаратов для диагностики и специфической профилактики ящура типа О»; № 2751664 «Способ получения иммуногенных компонентов культурального вируса ящура типов А, О, Азия-1 с применением бессывороточной среды «Cellvento™ ВНК-200» для изготовления противоящурных вакцин»; № 2722671 «ВНК-21/SUSP/ARRIAN - перевиваемая суспензионная сублиния клеток почки новорожденного сирийского хомячка, предназначенная для репродукции вирусов ящура, бешенства, парагриппа-3, болезни Ауески при производстве противовирусных вакцин, а также для изготовления диагностических и профилактических ветеринарных биопрепаратов».

Практическая значимость работы В результате проведенных исследований по оптимизации питательной среды для суспензионного культивирования клеток ВНК-21/2-17 и репродукции вируса ящура были разработаны, одобрены ученым советом и утверждены директором ФГБУ «ВНИИЗЖ» три методики: «Методические рекомендации по получению матрового вируса ящура в монослойной клеточной линии из почки новорожденного сирийского хомячка (ВНК-21/2-17)»; «Методические рекомендации по определению биологической активности гидролизата белков крови»; «Методические рекомендации по определению флокулирующих свойств полисепта (полигексаметиленгуанидин гидрохлорида)».

Полученные результаты вошли в СТО 00495527-0065-2023 «Вакцина против ящура культуральная инактивированная эмульсионная «АРРИАХ-ВАК». и СТО 00495527-0143-2023 «Вакцина против ящура сорбированная моно- и поливалентная (из вируса, выращенного в клетках ВНК-21)».

Предложения по использованию результатов исследования. Результаты данной работы могут быть использованы для повышения эффективности питательной среды при выращивании линии клеток ВНК-21 и репродукции вируса ящура для производства противоящурных вакцин.

Объем и структура диссертационной работы и степень ее завершенности. Диссертация изложена на 140 страницах, состоит из разделов: введение, обзор литературы, собственные исследования, результаты собственных исследований, заключение, список сокращений, список литературы и приложения. Диссертация иллюстрирована 11 таблицами и 23 рисунками. Список использованной литературы включает 213 источник, из них 124 иностранных. В приложении представлены копии

титulyных листов документов, подтверждающих достоверность результатов работы, ее научную новизну и практическую значимость.

Введение к диссертации включает в себя все основные структурные элементы: актуальность темы исследования; степень ее разработанности; цели и задачи; научную новизну; теоретическую и практическую значимость работы; методологию и методы исследования; положения, выносимые на защиту; степень достоверности и апробацию результатов.

В разделе «Обзор литературы» автором представлена обстоятельное описание состава, важность оптимизации питательных сред, краткая характеристика отдельных, но важных компонентов. Перечислены требования к питательным средам, сделано описание метода проточной цитометрии. Кроме того, дано полное описание бессывороточным питательным средам и их преимуществу перед сывороточными. Вторая часть раздела посвящена подробному описанию технологического процесса подготовки вирусного сырья от момента взаимодействия клетки с вирусом до вакцины (инактивация, очистка, концентрация, адьюванты и т.д.).

Раздел «Собственные исследования» состоит из двух подразделов: «Материалы и оборудование» и «Методы исследований». Здесь дано описание вирусного материала, животных, клеточных культур, адьювантов, реактивов, питательных сред, оборудования и методов исследований, использованных в экспериментах. В целом данный раздел представлен доступно, грамотно. Проведённые опыты изложены методически корректно.

Результаты собственных исследований представлены объективно. Большой интерес представляют данные, полученные автором по изучению влияния разного количества глюкозы в питательной среде на кратность прироста клеток ВНК 21/2-17, по изучению изменения аминокислотного состава питательных сред в процессе культивирования клеток ВНК-21/2-17 и влияние гидролизата белков крови, полученного в разные месяцы года, на кратность прироста клеточной линии ВНК-21/2-17 и количество 146S компонента вируса ящура. Проведена большая работа по изучению влияния содержания сыворотки крови в питательной среде на репродукцию клеток линии ВНК-21/2-17 и вируса ящура и влияния концентрации клеток ВНК-21/2-17 на количество 146S компонента вируса ящура. Показано применение бессывороточной добавки «Sheff-Vax» в питательных средах для культивирования клеток ВНК-21/2-17 и адаптация клеток. В завершении работы автором были изготовлены эмульсионные потивоящурные вакцины и изучена их иммуногенная активность.

Диссертант описывает полученные результаты и проводит сравнительный анализ с данными других исследователей, опубликованных в цитируемых научных источниках. Предложенные автором диссертации решения аргументированы и оценены по сравнению с другими известными решениями.

В заключении диссертации автор излагает итоги выполненного исследования в виде выводов, даёт практические предложения и перспективы дальнейшей разработки темы.

По материалам диссертации опубликовано 13 научных работ, из них шесть в рецензируемых изданиях, рекомендованных для опубликования основных научных результатов диссертации и три патента РФ на изобретение.

Основные положения диссертационной работы доложены, обсуждены и одобрены на заседаниях методической комиссии и ученого совета ФГБУ «ВНИИЗЖ» и в работе двух международных конференций в период с 2014 по 2023 гг.

Автореферат отражает содержание диссертации.

Представленная работа, безусловно, полезна в научном и практическом плане, и направлена на решение актуальных проблем отрасли, однако, хотелось бы получить разъяснения на следующие вопросы:

1. Автор приводит данные по изучению влияния сезонности на качество сырья для получения ГБК. Может ли оказывать влияние сезон получения сыворотки крови, используемой в качестве компонента питательной среды, на кратность прироста клеток ВНК-21;

2. В результате работы были изготовлены противоящурные вакцины, полученные на оптимизированной и бессывороточной средах с иммуногенной активностью 8,10 и 5,87 ПД50. Используются ли такие вакцины с целью профилактики ящура?

3. Автором подробно описаны материалы и методы, некоторые даже повторяются «Культивирование вируса ящура в суспензии» и «Репродукция вируса». Однако, не во всех описанных методиках даны ссылки на автора или ГОСТ.

4. По тексту диссертации встречаются неудачные выражения, пунктуационные и орфографические ошибки.

Указанные замечания и вопросы не отражаются на общей положительной оценке работы, они связаны с интересом к данной теме и носят дискуссионный характер.

Заключение. На основании анализа представленных материалов можно констатировать, что диссертация Шевченко М.А. на тему «Оптимизированная питательная среда суспензионного культивирования клеток ВНК-21/2-17 и репродукции вируса ящура» выполнена на современном научно-методическом уровне и является самостоятельной, завершённой научно-квалификационной работой. В диссертации предложено решение технологической проблемы, способствующее повышению эффективности противоящурных вакцин, что, безусловно, имеет существенное значение для ветеринарной отрасли.

Диссертация обладает внутренним единством, содержать новые научные результаты и положения, выдвигаемые для публичной защиты, и свидетельствует о личном вкладе автора диссертации в науку. Полученные автором диссертации

результаты послужили доказательным материалом при опубликовании 13 научных работ.

Диссертационная работа Шевченко М.А. по актуальности, объему представленных исследований, теоритической и практической значимости полученных результатов, отвечает требованиям раздела II «Положения о присуждении ученых степеней», утвержденного постановлением Правительства РФ №842 от 29.09.2013 г. с изменениями, а её автор заслуживает присуждения учёной степени кандидата ветеринарных наук по специальности 4.2.3 «Инфекционные болезни и иммунология животных.

Отзыв заслушан, рассмотрен и одобрен на заседании сотрудников информационно-аналитического и координационного центра по биотехнологиям и лаборатории молекулярной биологии и вирусологии (протокол № 4 от 09.09.2024г.)

Главный научный сотрудник информационно-аналитического
и координационного центра по биотехнологиям,
доктор биологических наук,
профессор, Заслуженный деятель науки РФ



В.И. Еремец

Федеральное Государственное бюджетное научное учреждение «Всероссийский научно-исследовательский и технологический институт биологической промышленности» (ФГБНУ ВНИТИБП), +7 (496)-567-32-63 vnitibp@mail.ru
141142, Московская область, городской округ Лосино-Петровский, пос. Биокомбината,
стр. 17, к.1