

## Отзыв

официального оппонента на диссертационную работу Чуриной Зои Геннадьевны на тему: «Антимикробная активность и ростстимулирующее действие апифитопрепарата на культуры клеток животных», представленную в диссертационный совет Д 220.034.01 на базе ФГБОУ ВО «Казанская государственная академия ветеринарной медицины имени Н.Э.Баумана» к публичной защите на соискание ученой степени кандидата ветеринарных наук по специальности 06. 02. 02 - ветеринарная микробиология, вирусология, эпизоотология, микология с микотоксикологией и иммунология.

**Актуальность темы.** Несмотря на развитие рынка биотехнологической продукции, получаемой с помощью перевиваемых клеточных линий, с использованием питательных сред на основе продуктов животного и растительного происхождения появилась реальная опасность инфицирования их прионами. Как отмечает диссертант, государственные организации, ведущие контроль за производством лечебно-профилактических препаратов требуют ограничения применения в производстве вакцинных препаратов субстанций животного происхождения. В связи с этим перспективным направлением в области биотехнологии, клеточной и генной инженерии является применение высокомолекулярных соединений (ВМС) – биополимеров. При этом по мнению автора диссертационной работы наиболее высокой биологической активностью обладают природные биополимеры – хитин и хитозан, полученные из ракообразных и насекомых (пчел). Белки, углеводы, аминокислоты, микро- и макроэлементы входящие в состав хитина и хитозана обладают метаболizmстимулирующей, ростстимулирующей и бактерицидной активностью. Установлено, что внесение в ростовые (питательные) среды биополимеров значительно усиливало пролиферацию культивируемых клеток животных (лимфоцитов и спленоцитов) – в условиях *in vitro*.

Сотрудниками ФГБНУ «ФЦТРБ-ВНИВИ» была разработана хитинсодержащая натуральная композиция «Вита-Форце» (Патент РФ №2324361 С1А23К), которая является уникальной как по составу (более 400 химических соединений), так и биологическому действию (метаболизм-, рост иммуностимулирующее, детоксицирующее, адаптогенное, антиоксидантное) в условиях *in vivo*. Вследствие этого диссертант указывает, что есть полное основание предположить, что указанный апифитопрепарат может быть использован в качестве активатора метаболизма при культивировании клеток животных в искусственных условиях (*in vitro*) для репродукции вирусов при изготовлении вакцинных препаратов. Однако как считает диссертант исследования по использованию апифитопрепаратов в качестве активаторов роста клеток *in vitro* единичны и не дают полного представления о роли апипродуктов в клеточной биотехнологии. При этом следует подчеркнуть, что активация клеточного метаболизма представляет одну из актуальных задач биотехнологии в том числе с применением апифитопродук-

тов в искусственных условиях культивирования особенно для вирусологических исследований. Вследствие вышеотмеченного можно заключить, что тема диссертационного исследования Чуриной З.Г. является весьма актуальной и своевременной, необходимой в интересах народного хозяйства и направленной на решение вопросов культивирования клеток и производства вакцин.

Таким образом, актуальность выбранной проблемы определяется большой значимостью культуры клеток в общебиологическом плане используемых производства биопрепаратов и во вторых антимикробной активностью и ростстимулирующим действием апифитопрепарата на биологические объекты, которые должны быть безопасны потребителю.

**Научная новизна.** Диссертантом на основании анализа биохимического состава и механизма действия хитина, хитозана и хитинсодержащих биологически активных продуктов пчеловодства, обоснована возможность применения этих соединений в качестве активаторов метаболизма культивируемых клеток животных. Впервые экспериментально подтверждена возможность получения апифитоэкстракта из БАПП, с целью использования его в качестве ростстимулирующего фактора – биодобавки в питательные среды для культивирования клеток *in vitro*. Впервые методом этанолового экстрагирования БАПП получен апифитоэкстракт (АФЭ), содержащий 160 мг % сухих экстрактивных веществ и оптимизированы условия монослойного выращивания перевиваемых линий клеток MDBK в питательной среде Игла MEM, содержащей 0,9 – 1,1 г/л АФЭ, обеспечивающая через 48 ч культивирования накопление клеток со степенью размножения  $\mu t=3,32$  и индексом пролиферации ИП=5,3; впервые установлена возможность профилактики бактериальной контаминации различных линий клеток при культивировании их в АФЭ – содержащей питательной среде, исключая тем самым, из технологического цикла применение антибиотиков в качестве антибактериальных субстанций; впервые проведена оценка репродукции вирусов ИРТ и ПГ-3 крупного рогатого скота на перевиваемых культурах клеток линий MDBK, LEK и VERO, с добавлением в ростовую среду апифитоэкстракта из БАПП.

Получено положительное решение ФИПС о выдаче патента на изобретение по заявке № 2016150760/20 9081424 от 01.02.18г. «Способ получения природного биополимера – апизана для активации культур клеток и способ активации культур клеток *in vitro* при репродукции вирусов» Чурина З.Г. и др.

**Теоретическая и практическая значимость.** Диссертантом обобщены теоретические данные и факторы влияющие на культивирование клеток используемых в производстве вакцин. В практическом плане по результатам проведенных исследований автором разработана технология получения апифитопрепарата из биологически активных продуктов пчеловодства (БАПП), а также произведено моделирование питательных сред на

его основе, пригодных для культивирования клеток MDBK, LEK и VERO, обеспечивающие высокую ростовую активность клеток *in vitro* и репродукцию на них вирусов.

**Степень обоснованности научных положений, выводов и рекомендаций, сформулированных в диссертации.**

Диссертационная работа выполнена на высоком научно-методическом уровне, с использованием современного оборудования и статистической обработкой экспериментального материала. Материал изложен на 136 страницах компьютерно набранного текста, содержит 10 таблиц, иллюстрирована 7 рисунками. Диссертация состоит из введения, обзора литературы, материала и методов исследований, результатов собственных исследований и заключения, выводов, практических предложений и библиографического списка, который включает 263 источника, из них 38 на иностранных языках.

По результатам исследований автором опубликовано 5 научных работ, 3 из них в рекомендованных ВАК РФ изданиях.

Все разделы диссертационной работы написаны грамотно и отражают сущность выполненных исследований. Так, во введении дана актуальность предпринятой работы, теоретическая, практическая значимость и основные положения диссертации, вынесенные на защиту.

При изложении обзора литературы автор проявила большую любознательность не только по вопросам состава питательных сред применяемых для роста и пролиферации культур клеток животного происхождения, но и рассмотрела современные проблемы использования биологически активных веществ в качестве альтернативных стимуляторов роста клеток в культуральных средах. Также диссертант обратила внимание на использование высокомолекулярных соединений как потенциальных активаторов клеточного метаболизма *in vivo* и *in vitro*. Таким образом, с учетом представленных фактов автором, можно отметить, что хитин, хитозан и хитинсодержащие биологически активных продукты пчеловодства, могут являться потенциальными активаторами метаболизма культивируемых клеток животных. Основным этапом в данном направлении работ является получение апифитоэкстракта из БАПП, с целью использования его в качестве ростстимулирующего фактора – биодобавки в питательные среды для культивирования клеток *in vitro*.

Раздел "материал и методы" в научно-методическом отношении адекватен поставленной цели и задачам исследований.

Раздел «Результаты собственных исследований» изложен последовательно в соответствии с целью и задачами исследований. В каждом разделе имеется достаточно подробное описание экспериментального материала. В конце каждого раздела диссертант делает краткое заключение по результатам исследований. Данный раздел занимает более 70% объема диссертационной

работы. Характеризуя его, можно указать, что она написана грамотно и лаконично, каждый подраздел завершается соответствующим обобщением.

К достоинству диссертационной работы относится то, что с позиций биотехнологий культивирования клеток животных представлены:

- технология получения АФЭ из БАПП;
- культуральные, цитоморфологические, кариологические и вирус-продуцирующие характеристики стационарной перевиваемой линии клеток, выращенных на средах, содержащих апифитоэкстракт из БАПП;
- стабильность биологических свойств перевиваемых линий клеток MDBK, LEK и VERO, выращенных на средах, содержащих апифитоэкстракт из БАПП, в процессе монослойного стационарного культивирования;
- возможность исключения из технологического процесса применения антибиотиков и замены их биополимерами на основе хитин- хитозан содержащих субстанций;
- усиление репродукции вирусов на культуре клеток с использованием апифитоэкстракта.

В каждом разделе главы результатов собственных исследований автор анализирует полученные экспериментальные данные, умело использует их в качестве обобщения, проводит сравнения, указывает на различия и делает обобщающее заключение. В конце данной главы диссертант представляет заключение по диссертационной работе и приводит лаконичные выводы, вытекающие из результатов собственных исследований, и дает практические предложения производству.

#### **Рекомендации по использованию результатов исследований диссертационной работы.**

В биокомбинатах и научных учреждениях по производству вакцин, ветеринарных лабораториях при культивировании клеток рекомендуется:

1. Для стимуляции пролиферативной активности клеток и репродукции вирусов на них, в качестве активатора клеточного метаболизма использовать – АФЭ, полученный из биологически активной композиции «Вита-Форце».

2. Применение АФЭ осуществлять путем внесения его в ростовые (питательные) среды из расчета 1 г/л (1000 мг/л), что обеспечивает высокий уровень пролиферации клеток линий MDBK, LEK и VERO, повышает конечную плотность клеток в 2,1 раза и индекс пролиферации в 1,64 раза по сравнению с контролем.

3. Получение и применение АФЭ осуществлять на основе разработанных авторами «Методические рекомендации по получению и применению апифитоэкстракта из биологически активной композиции «Вита-Форце» для культивирования клеток и репродукции на них вирусов», утв. директором ФГБНУ «ФЦТРБ-ВНИВИ» А.И. Никитиным, 2016 г.

Отрадно отметить, что полученный апифитоэкстракт уже используется в лабораториях ФГБНУ «ФЦТРБ-ВНИВИ» для наращивания вирусной

биомассы с целью получения вакцинных препаратов для профилактики вирусных болезней животных.

4. Полученные экспериментальные данные рекомендуются к использованию при подготовке научно-педагогических кадров.

При высокой положительной оценке, в целом диссертационной работы необходимо отметить следующие замечания:

1. Не все авторы исследовавшие действие биологически активных продуктов пчеловодства на микробный пейзаж кишечника и культуры клеток в особенности за 1991 год представлены в литературном обзоре (см. Сборник «Апитерапия и пчеловодство». Вып. 2. Гадяч, 1991. В частности на стр. 77-79 представлен материал «Влияние препаратов прополиса на культуру клеток при парагриппозной инфекции».

2. Автор делает вывод, что при внесении в питательные (ростовые) среды апифитоэкстракта из расчета  $1 \times 10^3$  мг/л повышалась плотность клеток в 2,1 раза, а индекс пролиферации (ИП) в 1,64 раза по сравнению с контролем. Добавление в ростовые среды апифитоэкстракта в концентрации 1 г/л (1000мг/л) обеспечивало деконтаминацию сред от аспорогенных и спорогенных контаминантов, что позволяет исключить из технологического процесса традиционных антибактериальных субстанции - антибиотиков. Однако автор не приводит и не указывает, что же является действующим началом, обеспечивающим деконтаминацию сред от аспорогенных и спорогенных контаминантов.

3. Диссертант, проводя пассирование линий клеток в среде с АФЭ осуществляла не более 10 пассажей. При этом наряду с культурой эпителиальных клеток почки быка, на наш взгляд следовало бы использовать и СПЭВ?

4. В диссертационном исследовании автор в 7 выводе указывает, что культивированные вирусы ИРТ и ПГ-3 на питательных средах, содержащих апифитоэкстракт в количестве 1 г/л (1000мг/л), обеспечивало повышение репродукции вирусов, увеличивая титр вируса ИРТ в 1,13 раза (на 13%) и вируса ПГ-3 в 1,10 раза (10%) по сравнению с контролем. На наш взгляд следовало бы описать характер ЦПД вирусов на культурах клеток.

5. На стр. 79 и 81 представлены таблицы 5 и 6 соответственно. После названия таблиц с отступом указывается  $n=5$ . Уместен вопрос, что это означает?

6. Несмотря на цельность изложения, солидный объем диссертации, в работе встречаются некоторые технические опечатки и стилистические погрешности в предложениях (отмечены на полях работы), в библиографическом списке есть некоторые несущественные отступления в оформлении цитированных источников.

Вышеотмеченные замечания и вопросы не являются принципиальными они носят, прежде всего, дискуссионный характер и не влияют на общую положительную оценку диссертационной работы.

**Заключение о соответствии диссертации критериям, установленным Положением о присуждении ученых степеней.**

Диссертация Чуриной З.Г. представляется как самостоятельное завершённое научное исследование, в которой на основании выполненных автором исследований содержится решение научной проблемы по изучению антимикробной активности (п.п. 1, 2, 3, 4) и ростстимулирующего действия апифитопрепарата (п.п. 3, 4, 6, 9) на культуры клеток животных (п.п. 3,4,5,9,14). На результаты исследований получено положительное решение ФИПС о выдаче патента на изобретение по заявке № 2016150760/20 9081424 от 01.02.18г. «Способ получения природного биополимера – аписана для активации культур клеток и способ активации культур клеток *in vitro* при репродукции вирусов» Чурина З.Г. и др.(п.п. 3,4,5,8,9,14).

Вышеуказанное подтверждает важное народнохозяйственное значение выполненной диссертационной работы (п.п. 8,9,14,15).

Опубликованные работы и автореферат отражают основное содержание диссертации. По научному содержанию, стилю изложения диссертация и автореферат диссертации Чуриной З.Г. отвечают требованиям ВАК к кандидатским диссертациям.

Представленная диссертация является научной квалификационной работой, по актуальности, новизне и научно-практической значимости соответствует критериям, установленным Положением о присуждении ученых степеней, утвержденным Постановлением Правительства Российской Федерации от 24.09.2013 г. № 842. Считаю, что ее автор заслуживает присуждения ученой степени кандидата ветеринарных наук по специальности 06.02.02 - ветеринарная микробиология, вирусология, эпизоотология, микология с микотоксикологией и иммунология.

**Официальный оппонент:**

доктор биологических наук, профессор,  
заведующий кафедрой аквакультуры и  
пчеловодства РГАУ-МСХА  
имени К.А.Тимирязева  
127550 г. Москва, Тимирязевская улица,  
дом 49, тел.: 8(499) 976-33-67  
E-mail: mannarov\_54@mail.ru  
04.06.2018

*Маннапов*

Маннапов Альфир Габдуллович

