

ОТЗЫВ

Официального оппонента на диссертацию Сизоненко Марины Николаевны «Эффективность использования новых стимуляторов роста листерий при изготовлении вакцины против листериоза сельскохозяйственных животных», представленную на соискание ученой степени кандидата биологических наук по специальностям: 06.02.02 – Ветеринарная микробиология, вирусология, эпизоотология, микология с микотоксикологией и иммунология и 03.01.06 – Биотехнология (в том числе бионанотехнологии) в диссертационный совет Д 006.033.02 на базе ФГБНУ «Федеральный научный центр - Всероссийский научно-исследовательский институт экспериментальной ветеринарии имени К. И. Скрябина и Я. Р. Коваленко Российской академии наук»
(ФГБНУ ФНЦ ВИЭВ РАН)

Актуальность темы диссертационной работы

Диссертация М. Н. Сизоненко посвящена совершенствованию технологии изготовления «Вакцины живой, сухой, против листериоза сельскохозяйственных животных из штамма «АУФ»», которую производят на Ставропольской биофабрике в соответствии с технологическим регламентом биофабрики. Вакцина против листериоза предназначена для профилактики распространения эпизоотии заболевания. Листерии вызывают заболевания человека и животных с тяжелым клиническим течением и частым летальным исходом. В 2010-2017 гг. на территории РФ зарегистрированы 58 неблагополучных пунктов по заболеваемости листериозом сельскохозяйственных животных, в том числе птицы. Специфическая профилактика листериоза, как и других инфекционных заболеваний, заключается в вакцинировании животных с использованием живой или инактивированной вакцины. Изготовление сухой живой вакцины против листериоза содержит два фундаментальных технологических этапа: культивирование ослабленного иммуногенного штамма с целью получения бактериальной массы в качестве антигена и лиофильную сушку полученного продукта. Оба этапа для этого микроорганизма связаны с определенными трудностями и ограничениями. Листерии – грамположительные микроорганизмы, в отличие от грамотрицательных бактерий, в обычных питательных средах имеют очень слабый рост (менее 1 млрд/мл), что осложняет процесс получения бактериальной массы. Второй этап – лиофильная сушка – также сопряжен со своими проблемами: бактерии чувствительны к обработке, в результате чего 1/3 живых клеток отмирает, а в процессе срока хранения высушенной вакцины происходит дальнейшее снижение жизнеспособности листерий.

Вх. № 17
13 апреля 2018 г.

В связи с этим, диссертант поставила перед собой цель: разработать стимуляторы роста для оптимизации культивирования этого микроорганизма в питательной среде и их использования в качестве защитных компонентов в среде высушивания при дальнейшей лиофилизации бактериальной массы.

Исследования в указанном направлении вызваны производственной необходимостью, актуальны и имеют выраженную практическую потребность.

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

В литературном обзоре рассмотрены данные отечественных и зарубежных авторов, полученные ранее по изучаемым вопросам. Диссертантом освоены методы культивирования листерий на жидких и плотных питательных средах, изучения их культурально-морфологических свойств, разные методы гидролиза природного сырья, современные методики исследований с использованием отечественного и зарубежного оборудования, последних достижений науки и техники. Научные положения, предложения и выводы, представленные в настоящей работе, подтверждены фактическими результатами собственных исследований автора и полностью соответствуют поставленной цели и вытекающим из нее задачам.

Достоверность и новизна научных положений, выводов и рекомендаций

Исследования выполнены на современном научно-методическом уровне. В процессе подготовки диссертации использованы методы сравнительного исследования, повторяемости экспериментов, их математической и статистической обработки с использованием эффективной программы (Primer of Biostatistic), определяющие достоверность полученных исследований, обоснованность выводов и предлагаемых рекомендаций. Автором получены 2 патента по темам исследования, что подтверждает новизну и приоритетность выполненных работ.

Личный вклад соискателя в разработку научной проблемы

Диссертационная работа является результатом научных исследований соискателя. Сбор и анализ литературы, планирование, организация и проведение исследований, а также статистическая обработка результатов выполнялись автором лично. Доля участия соискателя при выполнении работы составляет 85%.

Оценка содержания диссертации

Диссертация М. Н. Сизоненко имеет классическое построение со всеми принятыми разделами. Текст изложен на 158 страницах компьютерного набора, состоит из введения, обзора литературы, собственных исследований, в том числе материалов и методов исследований и результатов исследований, заключения, выводов и практических предложений. Список литературы содержит 288 источников: 66 иностранных и 222 – отечественных, из них – 25 с участием диссертантки по теме представленной работы. Текст иллюстрирован 18 таблицами, 22 рисунками – 3 графиками и 19 фотографиями, в том числе 7 микрофотографиями органов и мазков культур. В приложениях представлены титульные листы двух патентов на изобретения; первые листы двух актов внедрения результатов научно-исследовательской работы на Ставропольской биофабрике от 10.2012 и 03.2015; диплом о награждении медалью XIII международной выставки «Мир биотехнологии» 2015.

Во введении к диссертации обоснована актуальность темы, степень ее разработанности, сформулированы цель и задачи исследований, научная новизна, теоретическая и практическая значимость работы, методология и методы исследования, положения, выносимые на защиту. Показана степень достоверности, даны сведения об апробации работы и публикациях, личном вкладе диссертанта, а также объеме и структуре диссертации.

В главе Литературный обзор представлены данные литературы по современным проблемам производства вакцин; питательным потребностям и особенностям культивирования листерий; стимуляторам роста микроорганизмов и способам их изготовления.

В главе собственных исследований «Материалы и методы», которая занимает 10 страниц компьютерного текста, представлены этапы экспериментальных работ, а именно испытание стимулирующего действия препаратов на основе разных субстанций; разработка конечного препарата СРМП; изучение его действия в процессе приготовления и в составе опытных серий вакцин.

Приводится методика изготовления ферментативных гидролизатов испытуемого сырья и методы оценки их качества; методика изготовления СРМП и методы оценки его качества, в том числе стерильности, безвредности для животных, сохранения стабильности бактериальной

культуры. Дается описание использования СРМП при изготовлении вакцины против листериоза и контроль ее качества.

В главе «Результаты исследований» приводится описание собственных исследований, которые сводятся к разработке биологически активных добавок – стимуляторов роста микроорганизмов. Диссертант остановилась на материалах природного происхождения: растительных – зербина повислая и яблоки, а также животных тканях – эмбрионально- яичной массе перепелов. Сравнительная оценка предполагаемых стимуляторов показала, что более выраженным стимулирующим действием обладает препарат на основе эмбрионально-яичной массы перепелов. В связи с полученными результатами основное внимание в дальнейших исследованиях было уделено разработке этого последнего препарата. Проведена многоэтапная скрупулезная работа по его созданию. Большое внимание уделялось безопасности и возможной контаминации: получению препарата от здоровых яиц из благополучного по инфекционным заболеваниям хозяйства и манипуляциям на обеспечение стерильности сырья. С этой целью в течение всего срока инкубации яиц проводили их пятикратную обработку озоном (доза предварительно отработана) и обрабатывали скорлупу спиртовым раствором йода.

С целью повышения уровня биогенных стимуляторов в будущем препарате яйца выдерживали в холодной камере по Филатову. Эмбриональные и внеэмбриональные ткани гомогенизировали, в т. ч. методом под высоким давлением и, наконец, подвергали кислотному гидролизу, а гидролизат – очистке центрифугированием и фильтрацией. Конечный продукт расфасовывали и стерилизовали.

На всех уровнях изготовления препарата проводились исследования – по отработке каждого процесса: определение бактерицидного действия каждой обработки яиц озоном; влияние озонирования на развитие эмбрионов, на увеличение процента выживаемости, на метаболизм и на морфометрические показатели эмбрионов; действие озонирования на биохимический состав гомогенатов; определение уровня биогенных стимуляторов после обработки по Филатову. Особенно тщательное исследование проводили готового препарата: помимо определения биохимического состава, препарат контролировали на стерильность, безвредность, а также на эффективность в процессе культивирования микроорганизмов и в составе защитной питательной среды.

В главе Заключение дается анализ собственных исследований в сравнении с данными других авторов, подводятся итоги проделанной работы, на основании чего делаются выводы и практические предложения.

Показано, что в результате проведенной работы разработан стимулирующий препарат, имеющий эффективность на всех этапах культивирования листерий и на сохранность микробов в процессе лиофилизации и хранения сухой вакцины.

Подтверждение опубликованных основных результатов диссертации в научной печати

По материалам диссертации опубликовано 25 печатных работ, в том числе 5 из них – в периодических изданиях из перечня ведущих рецензируемых научных журналов, утвержденных ВАК Министерства образования и науки Российской Федерации, 2 патента по теме диссертации на изобретение РФ и монография. Материалы были доложены на 15 Всероссийских и международных конференциях, представлены на специализированной выставке «Мир биотехнологии», где награждены дипломом и золотой медалью.

Соответствие публикаций и автореферата основным положениям диссертации

Публикации М. Н. Сизоненко соответствуют теме диссертационных исследований.

Автореферат отражает содержание диссертации.

Реализация результатов исследований

Рекомендации и материалы диссертационной работы используются в процессе научной и производственной деятельности, внедрены в следующих организациях: ФГУП «Ставропольская биофабрика», о чем имеются соответствующие акты, проблемная научно-исследовательская лаборатория экспериментальной иммуноморфологии, иммунопатологии и иммунобиотехнологии НИИ прикладных биотехнологий Института живых систем Северо-Кавказского федерального университета, ООО НПО «СайТЭК», бактериологический отдел клинико-диагностической лаборатории ГБУЗ СК «ГДП №3».

Результаты исследований внедрены и используются в учебном процессе Северо-Кавказского федерального университета кафедры ботаники, зоологии и общей биологии при проведении лабораторных занятий по дисциплине «Микробиология», Ставропольского государственного аграрного университета при чтении лекций и проведении лабораторно-практических занятий на кафедре эпизоотологии и микробиологии, Чеченского государственного университета при чтении лекций и проведении лабораторных занятий по дисциплинам: «Частная микробиология», «Медицинская микробиология», «Промышленная микробиология», «Физиология роста микроорганизмов», «Основы биотехнологии», Чеченского государственного педагогического университета - по дисциплинам «Микробиология», «Основы биотехнологии», «Экология микроорганизмов».

Замечания, вопросы и пожелания

Оценивая диссертационную работу в целом положительно, хотелось бы высказать несколько собственных замечаний:

1. В Главе «Питательные потребности листерий» много внимания уделяется питательным потребностям микроорганизмов вообще. Даются общие представления о питательных веществах. Однако известно, что микроорганизмы отличаются необыкновенной пестротой потребностей. Даже сама диссертант указывает, что требуются представления о специфических потребностях изучаемого микроорганизма. Однако конкретно о потребностях листерий приведено мало сведений.

2. Считаю, что излишнее внимание уделено разграничению понятий «факторы роста» и «стимуляторы роста» или рост-стимулирующие вещества, которые, с моей точки зрения, можно употреблять как синонимы.

3. Для культивирования листерий и изготовления вакцины против листериоза авторами разработан препарат СРМП, богатый химическими веществами и элементами. Препарат изучен лишь частично, что неудивительно. Авторы используют метод Филатова для выработки биогенных стимуляторов. Метод дает положительный выход, но химическая природа стимуляторов нигде, никогда и самим автором не указывалась. Также нельзя однозначно сводить роль биологически активных веществ в препарате только к аминокислотам, тем более что исходная среда (бульон Хоттингера) богата аминокислотами; пептидам, нуклеиновым кислотам и микроэлементам. Возможно большое количество других соединений –

например, аминсахара, гликозиды, алкалоиды, органические кислоты, фосфолипиды, флавоноиды, коэнзимы и другие. Заключение автора о биологическом действии отдельных составляющих основано на литературных данных и возможно лишь гипотетически.

Заключение

В целом можно резюмировать, что высказанные замечания не отражаются на общей положительной оценке работы.

Диссертационная работа отвечает требованиям п. 9 «Положения о присуждении ученых степеней», утвержденного постановлением Правительства Российской Федерации от 24.09.2013 г. №842, предъявляемым к кандидатским диссертациям, а ее автор Сизоненко Марина Николаевна заслуживает присуждения искомой степени по специальностям 06.02.02 и 03.01.06.

Дата 13.04.2018

Официальный оппонент:

ведущий научный сотрудник отдела безопасности кормов и кормовых добавок ФГБУ «Всероссийский государственный Центр качества и стандартизации лекарственных средств для животных и кормов», доктор биологических наук, старший научный сотрудник

Телишевская
Любовь Яковлевна

Подпись в.н.с. ФГБУ «ВГНКИ» д.б.н. Телишевской Л. Я. заверяю

Ученый секретарь ФГБУ «ВГНКИ»

д.б.н., профессор



Букова Наталия
Константиновна

13.04.2018

123022, г. Москва, Звенигородское шоссе, 5,

+7(495) 982-50-84, kanc@vgnki.ru; telishevskaya@vgnki.ru