

**НАЦІОНАЛЬНА АКАДЕМІЯ НАУК УКРАЇНИ
ІНСТИТУТ ПРОБЛЕМ КРІОБІОЛОГІЇ І КРІОМЕДИЦИНИ**

ВАРЯНИЦЯ ВІКТОРІЯ ВАЛЕРІЇВНА

УДК: 57.086.13:602:578.824.11:615.371

**ЗБЕРЕЖЕНІСТЬ ПРОМИСЛОВИХ ШТАМІВ ВІРУСУ СКАЗУ ПРИ
НИЗЬКИХ ТЕМПЕРАТУРАХ**

03.00.19 – кріобіологія

АВТОРЕФЕРАТ
дисертації на здобуття наукового ступеня
кандидата біологічних наук

Харків – 2021

Дисертацією є рукопис.

Робота виконана в Інституті проблем кріобіології і кріомедицини НАН України.

Науковий керівник: кандидат медичних наук, старший науковий співробітник
Висеканцев Ігор Павлович,
Інститут проблем кріобіології і кріомедицини
НАН України, м. Харків
завідувач відділу кріомікробіології.

Офіційні опоненти: доктор біологічних наук, професор
Жегунов Геннадій Федорович,
Харківська державна зооветеринарна академія
МОН України, м. Харків
завідувач кафедри хімії та біохімії імені професора
О.В. Чечоткіна;

кандидат біологічних наук, доцент
Стегній Марина Юріївна,
Національний науковий центр «Інститут
експериментальної і клінічної ветеринарної
медицини», м. Харків
завідувач лабораторії біотехнології.

Захист відбудеться «20» квітня 2021 р. о 13³⁰ годині на засіданні спеціалізованої вченої ради Д 64.242.01 в Інституті проблем кріобіології і кріомедицини НАН України за адресою: 61016, м. Харків, вул. Переяславська, 23.

З дисертацією можна ознайомитись у бібліотеці Інституту проблем кріобіології і кріомедицини НАН України за адресою: 61016, м. Харків, вул. Переяславська, 23.

Автореферат розісланий «18» березня 2021 р.

Вчений секретар
спеціалізованої вченої ради Д 64.242.01

О. В. Фалько

ЗАГАЛЬНА ХАРАКТЕРИСТИКА РОБОТИ

Обґрунтування вибору теми дослідження. Сказ – зоонозне інфекційне захворювання, збудником якого є вірус сказу (ВС) (Orciari L.A. et al., 2015; Hooper D.C., 2016; WHO, 2017, 2018; El-Sayed A., 2018; Fisher C.R. et al., 2018; OIE, 2019). Україна посідає третє місце в Європі за поширенням сказу серед диких і домашніх тварин. Кожного року реєструють випадки підозри на інфікування або захворювання сказом людей. Для профілактики та контролю сказу проводять пероральну імунізацію диких і парентеральну імунізацію домашніх тварин. Людям із підозрою на інфікування проводять постекспозиційну профілактику сказу за допомогою специфічних імуноглобулінів та антирабічних вакцин. Також здійснюють вакцинацію людей із великим ризиком інфікування в умовах виконання професійних обов'язків (Milligan G.N., Barrett A.D.T., 2015; WHO, 2018; Makovska I.F. et al., 2020).

Сучасне серійне виробництво антирабічних препаратів потребує тривалого зберігання великих об'ємів очищених і стандартизованих суспензій промислових штамів ВС та меншою мірою – їх ліофілізатів. Для цього в технологічні схеми виробництва введено систему головного та робочого банків вірусу (WHO, 2007; Frazatti-Gallina N.M., 2015; Kulkarni P.S. et al., 2017). Стабільність вірусних суспензій у ході їх зберігання має важливе значення для безперебійного забезпечення виробництва посівним матеріалом, проведення контролю якості антирабічних вакцин та імуноглобулінів, гарантії надійності серелогічних методів діагностики (Gupta S.K. et al., 1996; Hansen L.J.J. et al., 2015; Cardoso F.M.C. et al., 2017). Ліофілізовані зразки призначені для депонування промислових штамів вірусу сказу та їх дублювання у головному банку виробництва (АТСС, 2016). У зв'язку із вищевикладеним набула актуальності проблема розробки ефективних методів довгострокового зберігання суспензій і ліофілізатів промислових штамів вірусу сказу в умовах виробництва антирабічних препаратів.

Головними методами зберігання більшості вірусів у дослідницьких і виробничих цілях є ліофілізація та заморожування за помірно низьких і низьких температур (Liu B., Zhou X., 2015; Alonso S., 2016; АТСС, 2016). Для уникнення пошкоджувальної дії на віруси фізико-хімічних факторів, пов'язаних із процесами кристалізації-рекристалізації та сублімації води, під час кріоконсервування та ліофілізації вірусу використовують захисні середовища. Зазвичай ці середовища складаються з буферних розчинів для підтримання рН і білків для стабілізації нуклеокапсидів. Часто до них додають інші речовини, які підтримують оптимальну осмолярність та рН у межах від 7,0 до 8,0 або на яких віруси можуть адсорбуватися (Gould E.A., 1999; Hubálek Z., 2003; Cardoso F.M.C. et al., 2017).

На сьогодні дослідження щодо зберігання за різних низьких температур та з ліофілізації ВС мають фрагментарний характер. Більшість із них присвячено короткостроковому зберіганню вірусу. Відсутні порівняльні дані про вплив температурних режимів, складу середовищ консервування та довгострокового зберігання на інфекційну активність ВС. У зв'язку з вищевикладеним дослідження впливу вказаних факторів на ВС дозволило розробити технології довгострокового зберігання промислових штамів ВС за різних низьких температур і після ліофілізації в умовах виробництва антирабічних препаратів. Водночас результати проведеного

дослідження доповнюють концепції щодо особливостей механізмів кріопошкоджень і кріозахисту складних вірусів.

Зв'язок роботи з науковими програмами, планами, темами, грантами.

Робота була виконана в рамках відомчих науково-дослідних робіт відділу кріомікробіології Інституту проблем кріобіології і кріомедицини НАН України: «Дослідження механізмів кріоушкоджень і кріозахисту іммобілізованих клітин з метою підвищення їх збереженості при кріоконсервуванні та ліофілізації» (№ державної реєстрації 0110U000404), «Розробка технологій низькотемпературного консервування іммобілізованих клітин та біологічно активних сполук» (№ державної реєстрації 0115U000094), «Вивчення механізмів кріопошкоджень мікроорганізмів, іммобілізованих в гелевих носіях з різними фізико-хімічними властивостями, під час низькотемпературного зберігання та ліофілізації» (№ державної реєстрації 0118U001187).

Мета і завдання дослідження. Мета роботи – дослідження впливу складу захисних середовищ, температурних режимів і термінів зберігання за низьких температур і після ліофілізації на інфекційну активність промислових штамів вірусу сказу.

Для досягнення поставленої мети передбачалося вирішити такі завдання:

1. Довести відсутність інактивуєчої дії різних кріопротекторних речовин на вірус сказу.

2. Провести порівняльне дослідження збереженості інфекційної активності вірусу сказу після заморожування в захисних середовищах із додаванням кріопротекторних речовин, які мають різні механізми захисної дії.

3. Дослідити збереженість інфекційної активності промислових штамів вірусу сказу після зберігання за низьких температур у захисних середовищах із додаванням різних кріопротекторних речовин. Відібрати з урахуванням отриманих результатів і технологічних регламентів кріопротекторні домішки до середовищ консервування вірусу сказу в умовах виробництва антирабічних препаратів.

4. Вивчити вплив складу захисних середовищ, температурних режимів і термінів довгострокового зберігання на збереженість інфекційної активності промислових штамів вірусу сказу.

5. Дослідити вплив складу захисних середовищ на збереженість і технологічні показники зразків вакцинного штаму вірусу сказу L. Pasteur після ліофілізації та подальшого зберігання в умовах гіпотермії та за низьких температур.

Об'єкт дослідження – вплив зберігання за різних низьких температур, ліофілізації та складу захисних середовищ на інфекційну активність промислових штамів вірусу сказу.

Предмет дослідження – інфекційна активність вірусу сказу штамів CVS і L. Pasteur після ліофілізації або заморожування у різних захисних середовищах та подальшого зберігання за різних температур.

Методи дослідження. У роботі було використано наступні методи досліджень: кріобіологічні – ліофілізація та заморожування вірусу з подальшим зберіганням за різних температур, розморожування суспензії вірусу сказу;

культуральні – культивування клітин ВНК-21 clone 13 та Vero; вірусологічні – отримання вірусу в культурах клітин, титрація вірусу в культурі клітин і визначення його інфекційної активності методом прямої флуоресценції (реакція взаємодії антигену ВС в інфікованих клітинах зі специфічними антитілами, міченими ізотіоціанатом флуоресцеїну); методи математичної статистики.

Наукова новизна отриманих результатів. У дисертаційній роботі вперше показано, що на відміну від механізмів кріопшкоджень клітин пошкоджувальними факторами для ВС є «ефект розчинів», агрегація, контакт віріонів із кристалами льоду. Вперше виявлено відмінності у чутливості штамів CVS та L. Pasteur, які мають спільне походження, до пошкоджувальної дії заморожування та умов зберігання за низьких температур. Показано захисну дію різних кріопротекторних речовин (сахарози, мальтози, гліцерину, ДМСО, желатину) на етапах заморожування до -20 , -80°C та зберігання ВС за цих температур. Встановлено, що вираженість захисної дії вказаних кріопротекторних речовин відносно ВС різна на етапах заморожування і змінюється під час зберігання за температур -20 , -80 та -196°C . Експериментально обґрунтовано склад захисних середовищ для довгострокового зберігання штамів вірусу сказу CVS та L. Pasteur за температур -80 та -196°C і для зберігання цих штамів до 6-ти місяців за температури -20°C . Для довгострокового зберігання за температур -80 та -196°C доцільно використовувати ростове середовище на основі DMEM із додаванням 5% сахарози, 5% гліцерину та їх суміші, для короткострокового зберігання при -20°C – ростове середовище з додаванням 2,5–10% сахарози або гліцерину.

Вперше встановлено, що ступінь впливу температур зберігання та складу захисних середовищ на інфекційну активність ліофілизованого вірусу сказу змінюється залежно від термінів зберігання. Експериментально обґрунтовано склад захисного середовища для ліофілізації та подальшого зберігання ВС за температур 5, -20 , -80°C : ростове середовище на основі DMEM із додаванням суміші 1% желатину та 5% сахарози. Під час зберігання ліофілизованого вірусу протягом 24-х місяців (термін спостереження) за температур 5, -20 , -80°C через 6 місяців відмічався більший вплив складу захисних середовищ, через 12 місяців вплив обох чинників був однаковим, через 18–24 місяці визначальним чинником була температура зберігання.

Практичне значення отриманих результатів. Розроблені протоколи довго- та короткострокового зберігання суспензій і ліофілізатів промислових штамів ВС дозволяють забезпечити на сучасних виробництвах стабільність виробничих процесів та якість антирабічних препаратів. Зокрема, в АТ «БІОЛІК» (Харків, Україна) із використанням отриманих результатів створена і підтримується система головного та робочого банків промислових штамів ВС; у технологічні процеси виробництва антирабічних вакцин впроваджено методи зберігання ВС перед інактивацією; розроблено ветеринарний препарат «Антиген вірусу сказу для імунізації коней-продуцентів»; проведено валідацію та впроваджено у систему контролю методики визначення специфічної активності препарату «Імуноглобулін антирабічний (кінський)».

Особистий внесок здобувача. Дисертаційна робота є самостійним і оригінальним науковим дослідженням. Експериментальні дослідження виконані здобувачем особисто на базі АТ «БІОЛІК» та Інституту проблем кріобіології і кріомедицини НАН України. Автором проаналізована сучасна вітчизняна та зарубіжна наукова література з проблеми, що досліджувалась, обґрунтовано вибір теми, проведено статистичний аналіз отриманих даних. Спільно з науковим керівником сформульовано мету і завдання дослідження, визначено методи їх вирішення, здійснено інтерпретацію, обговорення та узагальнення отриманих результатів, сформульовано висновки. Опубліковані в співавторстві наукові статті відображають концепцію роботи, підтверджують ідеї та вирішення поставлених дисертантом завдань. Допомога співавторів була спрямована на виконання окремих методичних завдань.

В опублікованих зі співавторами роботах особистий внесок здобувача полягає:

- у роботі [7] – в узагальненні наукової літератури щодо методів зберігання різних вірусів і підготовці матеріалів до друку;
- у роботах [14, 18] – у плануванні експериментів із отримання ВС у культурі клітин та тривалості його інактивзації, статистичному аналізі й інтерпретації отриманих результатів;
- у роботах [1–3, 5, 6, 13, 15–17, 19, 21, 22] – у плануванні та постановці експериментів, статистичному аналізі, обговоренні та узагальненні отриманих результатів, формулюванні висновків, підготовці матеріалів до друку;
- у роботах [4, 8, 9, 12] – у постановці експериментів, статистичному аналізі та інтерпретації отриманих результатів, підготовці матеріалів до друку;
- у роботах [10, 11] – у плануванні експериментів, статистичному аналізі та інтерпретації отриманих результатів, підготовці матеріалів до друку;
- у роботі [20] – у плануванні експерименту, постановці реакцій нейтралізації ВС на моделі культури клітин та урахуванні результатів із визначення титру антитіл до ВС у препараті «Імуноглобулін антирабічний (кінський)»;
- у роботі [23] – у розробці та оформленні заявки на отримання патенту на спосіб кількісного визначення антирабічного антигену *in vitro* в інактивованих антирабічних вакцинах.

Апробація результатів дисертації. Матеріали дисертаційної роботи доповідалися і обговорювалися на наукових форумах: VIII Міжнародній науковій конференції студентів і аспірантів, приуроченої до 150-річчя від дня народження академіка В. Вернадського «Молодь і поступ біології» (Львів, 2013); 38-, 39-, 40-, 41- та 42-й щорічній конференції молодих вчених ІПКіК НАН України «Холод в биологии и медицине. Актуальные вопросы криобиологии, трансплантологии и биотехнологии» (Харків, 2014–2018 рр.); 19-й Міжнародній Пуцинській школі-конференції молодих вчених «Биология – наука XXI века» (Росія, Пушино, 2015); I Міжнародній конференції молодих вчених «CYS-2015» (Київ, 2015); XXIV науково-практичній конференції молодих вчених і студентів «Актуальні питання створення нових лікарських засобів» (Харків, 2017); 2-й Міжнародній конференції «Smart Bio» (Литва, Каунас, 2018); VII науково-практичній дистанційній конференції з міжнародною участю «Сучасні досягнення фармацевтичної технології

та біотехнології» (Харків, 2018); 43-й щорічній конференції молодих вчених ІПКіК НАН України «Холод в біології та медицині – 2019» (Харків, 2019); 6-у з'їзді Українського товариства клітинної біології з міжнародним представництвом (Яремче, 2019); Міжнародній науково-практичній конференції «Медична наука та практика: виклики і сьогодення» (Львів, 2019); 44-й щорічній конференції молодих вчених ІПКіК НАН України «Холод в біології та медицині – 2020» (Харків, 2020).

Публікація матеріалів. Основні положення дисертації викладені у 22-х наукових роботах: 3 – у фахових наукових виданнях України (2 – входять до міжнародної наукометричної бази даних Scopus); 3 – у закордонних наукових періодичних виданнях; 1 оглядова стаття – у журналі, який входить до наукометричної бази даних Scopus, опубліковано 15 тез доповідей. Отримано патент України на корисну модель.

Об'єм і структура дисертації. Дисертаційна робота викладена на 190 сторінках і складається з анотації, переліку умовних позначень, вступу, огляду літератури, опису матеріалів і методів дослідження, 3-х розділів власних досліджень, узагальнення та обговорення, висновків, списку використаних джерел та 3-х додатків. Список використаних джерел містить 249 найменувань, розміщених на 26 сторінках тексту. Робота проілюстрована 39 рисунками та 5 таблицями.

ОСНОВНИЙ ЗМІСТ РОБОТИ

Огляд літератури. У розділі представлено аналіз статистичних, експериментальних і теоретичних даних літератури, у якому описано світову епізоотичну ситуацію щодо захворювання на сказ та важливість застосування антирабічних препаратів для профілактики цього захворювання. Розглянуто та проаналізовано сучасні технології виготовлення антирабічних препаратів, з урахуванням необхідності довгострокового зберігання суспензії ВС. На підставі аналізу наукових публікацій доведено актуальність і перспективність застосування ліофілізації та заморожування промислових штамів ВС із подальшим зберіганням за помірно низьких і низьких температур.

Матеріали й методи дослідження. У дослідженні використовували вакцинний штам вірусу сказу L. Pasteur та стандартний штам CVS. Штами надані Інститутом Пастера (Нові-Сад, Сербія) та Державним НДІ стандартизації та контролю медичних біологічних препаратів ім. Л.О. Тарасевича (Москва, Росія). Для культивування ВС використовували клітинні культури ВНК-21 clone 13 та Vero (надані «ЕСАСС», Портон Даун, Велика Британія). Культивували штами ВС у ростовому середовищі (РС) на основі DMEM («Biowest», Франція) з додаванням ростових факторів: фетальної сироватки і сироваткового альбуміну великої рогатої худоби, сироваткового альбуміну людини («Sigma-Aldrich», США).

Збереженість вірусу оцінювали за його інфекційною активністю, яку визначали методом титрації у клітинній культурі ВНК-21 clone 13. Інфіковані клітини реєстрували методом прямої імуофлуоресцентної мікроскопії з використанням моноклональних антитіл до ВС, мічених ізотіоціанатом флуоресцеїну («Fujirebio», США) та мікроскопа з модулем флуоресценції («Leica

DM2000», Німеччина) (рис. 1) (Smith J.S., 1996; Cliquet F., Wasniewski M., 2015; OIE, 2019; Moreira V.L.C. et al., 2020). Інфекційну активність вірусу розраховували методом Спірмена-Кербера і виражали у десятковому логарифмі 50%-ої інфекційної дози для культури клітин ($Ig\ CCID_{50}$) (Aubert M.F.A., 1996; Rupprecht C.E. et al., 2018).

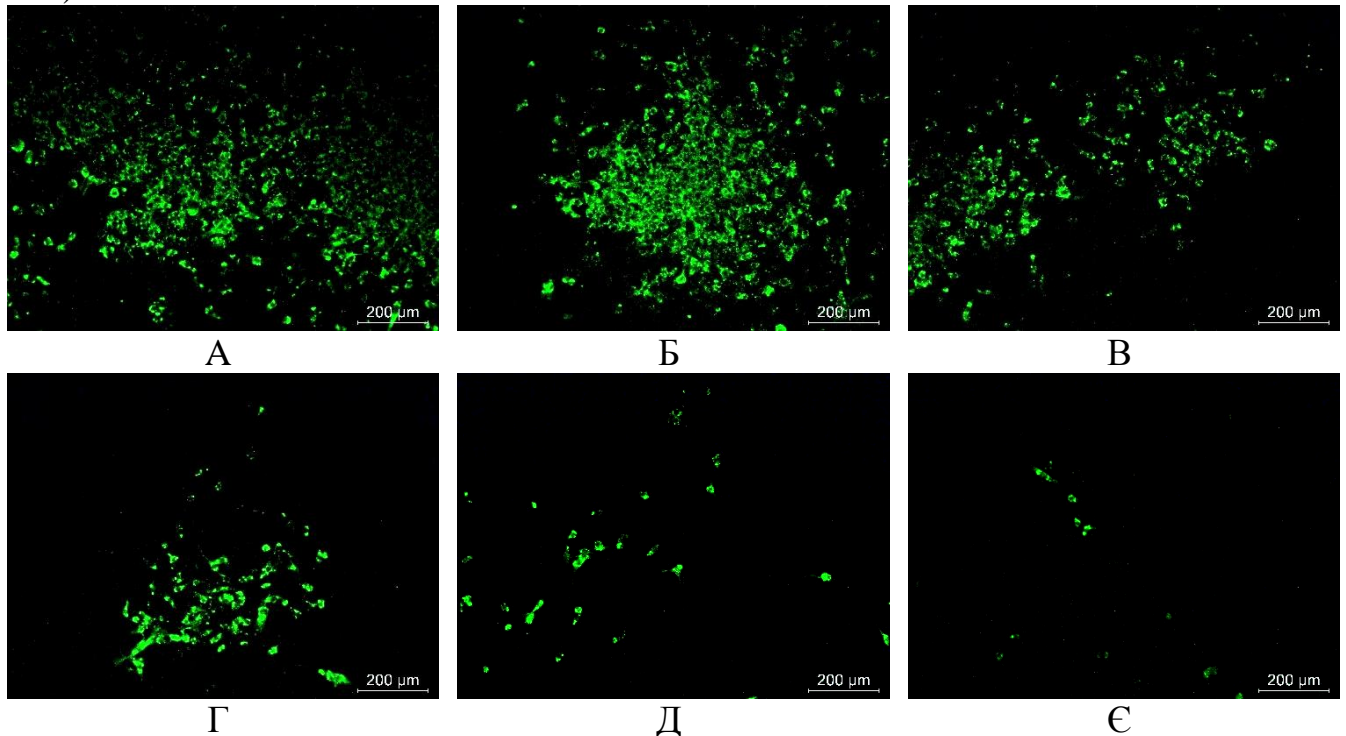


Рис. 1. Моношар культури клітин ВНК-21 clone 13, інфікованої вірусом сказу штаму L. Pasteur у різних розведеннях: (А) – 1:125, (Б) – 1:625, (В) – 1:3125, (Г) – 1:15625, (Д) – 1:78125, (Є) – 1:390625

Примітка: забарвлення специфічними моноклональними антитілами до вірусу сказу, міченими ізотіоціанатом флуоресцеїну, $\times 100$.

Склад середовищ в експериментах зі зберігання ВС протягом 12-ти місяців за температур $-20, -80^{\circ}\text{C}$: 1 – РС, 2/1 – РС + 2,5% сахарози, 2/2 – РС + 5% сахарози, 2/3 – РС + 7,5% сахарози, 2/4 – РС + 10% сахарози; 3/1 – РС + 2,5% гліцерину, 3/2 – РС + 5% гліцерину, 3/3 – РС + 7,5% гліцерину, 3/4 – РС + 10% гліцерину; 4/1 – РС + 2,5% ДМСО, 4/2 – РС + 5% ДМСО, 4/3 – РС + 7,5% ДМСО, 4/4 – РС + 10% ДМСО; 5/1 – РС + 1% желатину, 5/2 – РС + 3% желатину; 6/1 – РС + 1% альгілату натрію, 6/2 – РС + 2% альгілату натрію, 6/3 – РС + 3% альгілату натрію; 7/1 – РС + 2,5% пептону, 7/2 – РС + 5% пептону, 7/3 – РС + 7,5% пептону, 7/4 – РС + 10% пептону. Склад середовищ у експериментах зі зберігання ВС протягом 24-х місяців за різних температур: 1 – РС; 2 – РС + 5% сахарози; 3 – РС + 5% гліцерину; 4 – РС + 5% сахарози та 5% гліцерину; 5 – РС + 5% мальтози. Склад середовищ у експериментах з ліофілізації ВС: 1 – РС + 5% сахарози; 2 – РС + 3% желатину + 5% сахарози; 3 – РС + 1% желатину + 5% сахарози; 4 – РС + 10% сахарози. Хімічні речовини: сахароза, гліцерин, ДМСО («AppliChem», Німеччина), альгілат натрію, мальтоза («Sigma-Aldrich», США), желатин («Генезіс», Україна) і пептон («HiMedia Laboratories Pvt. Limited», Індія). Для зберігання вірусних суспензій за різних температур використовували кріопробірки («Nunc», США) з робочим об'ємом

1,8 мл. Зразки заморожували в кріопробірках, які розміщували на полиці морозильних камер або занурювали у рідкий азот. Відігрівали заморожені зразки на водяній бані за температури $(20\pm 2)^{\circ}\text{C}$. Зразки зберігали наступним чином: у термостаті («Binder», Німеччина) за температури $(37\pm 2)^{\circ}\text{C}$, холодильній камері («National Lab», «Liebherr», Німеччина) за температури $(5\pm 1)^{\circ}\text{C}$, морозильних камерах («National Lab») за температур $(-20\pm 2)^{\circ}\text{C}$ та $(-80\pm 5)^{\circ}\text{C}$, посудинах Дьюара з рідким азотом («ХЗТО», Україна) при -196°C .

Ліофілізували зразки в ліофільній установці («VirTis», США) за розробленим в АТ «БІОЛІК» технологічним регламентом. Зразки заморожували до -49°C , сублімацію починали при -32°C та значеннях вакууму 209 Тор. Термін сублімації складав 16 годин, термін досушування – 5 годин. Залишкова вологість зразків була 2–3%. Скляні флакони з ліофілізованими зразками герметизували в повітряному середовищі. Зберігали зразки за температур (5 ± 1) , (-20 ± 2) та $(-80\pm 5)^{\circ}\text{C}$. Регідrataцію ліофілізованих зразків проводили внесенням у флакон 1 мл середовища DMEM кімнатної температури.

Статистичний аналіз результатів проводили за допомогою комп'ютерної програми «Statistica 10» («StatSoft», США).

РЕЗУЛЬТАТИ ВЛАСНИХ ДОСЛІДЖЕНЬ ТА ЇХ ОБГОВОРЕННЯ

Інфекційна активність ВС після інкубації з кріопротекторними домішками. Для дослідження можливої інактивуючої дії кріопротекторних домішок вивчено збереженість інфекційної активності ВС після двогодинної інкубації за кімнатної температури у розчинах цих домішок у РС. Встановлено, що інкубація з 10%-ми розчинами сахарози, гліцерину, ДМСО, пептону, 5%-м розчином мальтози та 3%-ми розчинами желатину і альгінату натрію не впливає на інфекційну активність штамів вірусу сказу CVS та L. Pasteur.

Вплив кріопротекторних домішок із різними механізмами захисної дії на інфекційну активність ВС у процесі заморожування та зберігання за температур -20 та -80°C . Метою цього розділу досліджень було вивчення вираженості захисної дії кріопротекторних домішок для вибору складу середовищ консервування промислових штамів ВС.

Після заморожування штаму CVS до -20°C у РС без домішок (середовище 1) збереглося 85% інфекційної активності вихідного контролю $(6,01\pm 0,16)$ Ig CCID₅₀. У середовищах консервування 2/2–2/4, 3/1–3/3, 4/1–4/4, 5/1, 5/2, 6/2, 6/3 показники збереженості вірусу були вищими, ніж у середовищі 1. Найвищі показники збереженості вірусу забезпечували середовища 2/1, 2/2 із додаванням 2,5 та 5% сахарози й середовищ 5/1, 5/2 із додаванням 1 та 3% желатину. У зразках із цими середовищами збереженість вірусу складала 95–96%. Після зберігання протягом 12-ти місяців за температури -20°C максимальні показники збереженості вірусу (69–74%) були у середовищах 2/2–2/4 із додаванням 5–10% сахарози, середовищах 3/2, 3/3 із додаванням 5 та 7,5% гліцерину та у середовищі 5/2 із додаванням 3% желатину (рис. 2). У середовищі 1 збереглося 66% активності вірусу. В інших середовищах показники збереженості були нижчими. Після заморожування штаму CVS до -80°C показники інфекційної активності вірусу у середовищах 5/1, 5/2

(з додаванням 1 та 3% желтину) не відрізнялися від вихідного контролю. У середовищах 1, 2/1–2/3, 4/2, 5/1–5/4, 6/2, 7/1 збереженість вірусу складала 94–96%. У інших середовищах даний показник був нижчим. Після зберігання протягом 12-ти місяців за температури -80°C максимальні показники збереженості вірусу (82–86%) були в середовищах 2/2–2/4 із додаванням 5–10% сахарози та в середовищі 5/2 із додаванням 3% желатину.

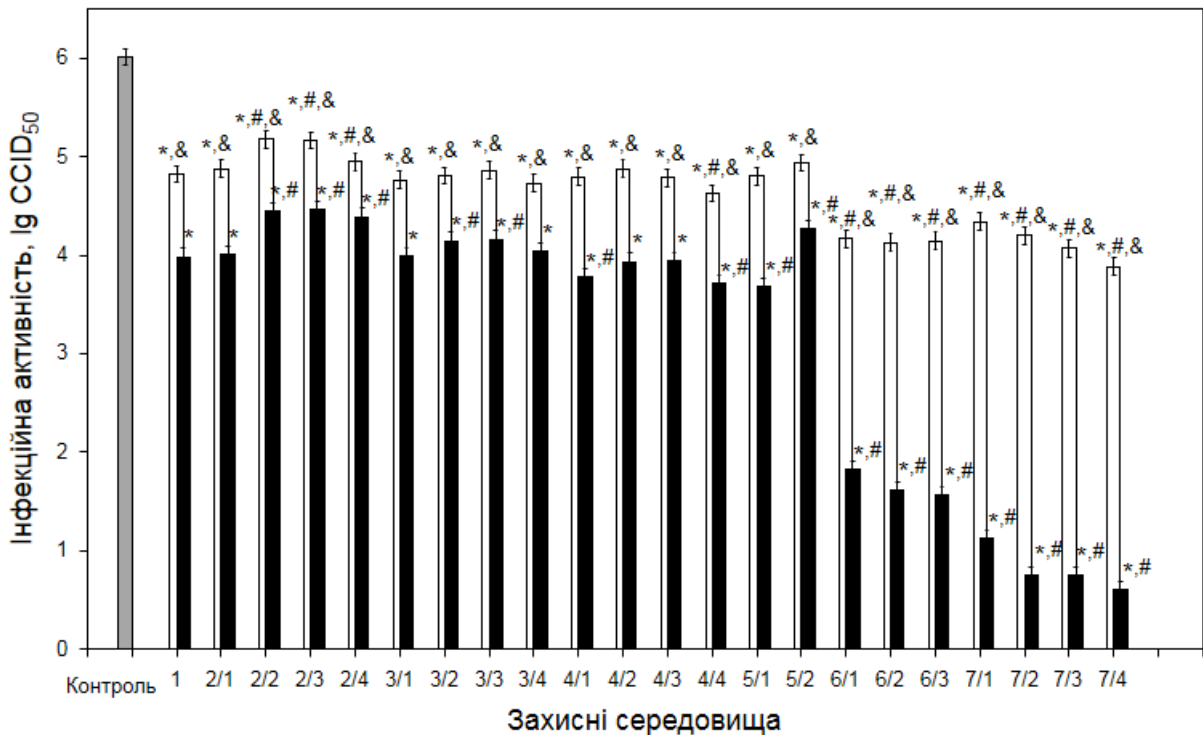


Рис. 2. Інфекційна активність штаму CVS через 12 місяців зберігання у захисних середовищах за різних температур: контроль (□); -80°C (□); -20°C (■)

Примітка: відмінності статистично значущі порівняно з контролем (*), середовищем 1 за кожної з температур (#) та температурою -20°C (&), $p < 0,05$; $n = 5$.

В експериментах зі штамом L. Pasteur вихідна інфекційна активність вірусу становила $(7,23 \pm 0,10)$ Ig CCID₅₀. Після заморожування до -20°C максимальний показник збереженості вірусу (94% від вихідної активності) був у середовищі 1 (РС без домішок), а також в середовищах 2/4, 4/2, 5/1 (РС із додаванням 10% сахарози, 5% ДМСО, 1% желатину). Після зберігання протягом 12-ти місяців за температури -20°C максимальна збереженість вірусу (67–71%) була в середовищах 2/2–2/4 (РС із додаванням 5–10% сахарози) та в середовищі 3/2 (РС із додаванням 5% гліцерину) (рис. 3). У середовищі 1 збереглося 58% активності вірусу. Після заморожування штаму L. Pasteur до -80°C у середовищі 6/2 (РС із додаванням 1 та 2% альгінату натрію) інфекційна активність вірусу не змінювалася. У середовищах 1, 2/4, 3/4, 4/2–4/4, 5/1, 5/2, 6/1, 6/3 збереженість вірусу складала 96–99%. Після зберігання протягом 12-ти місяців максимальні показники збереженості вірусу (80–82%) були в середовищах 2/2–2/4 і 5/2 (РС із додаванням 5–10% сахарози та 3% желатину).

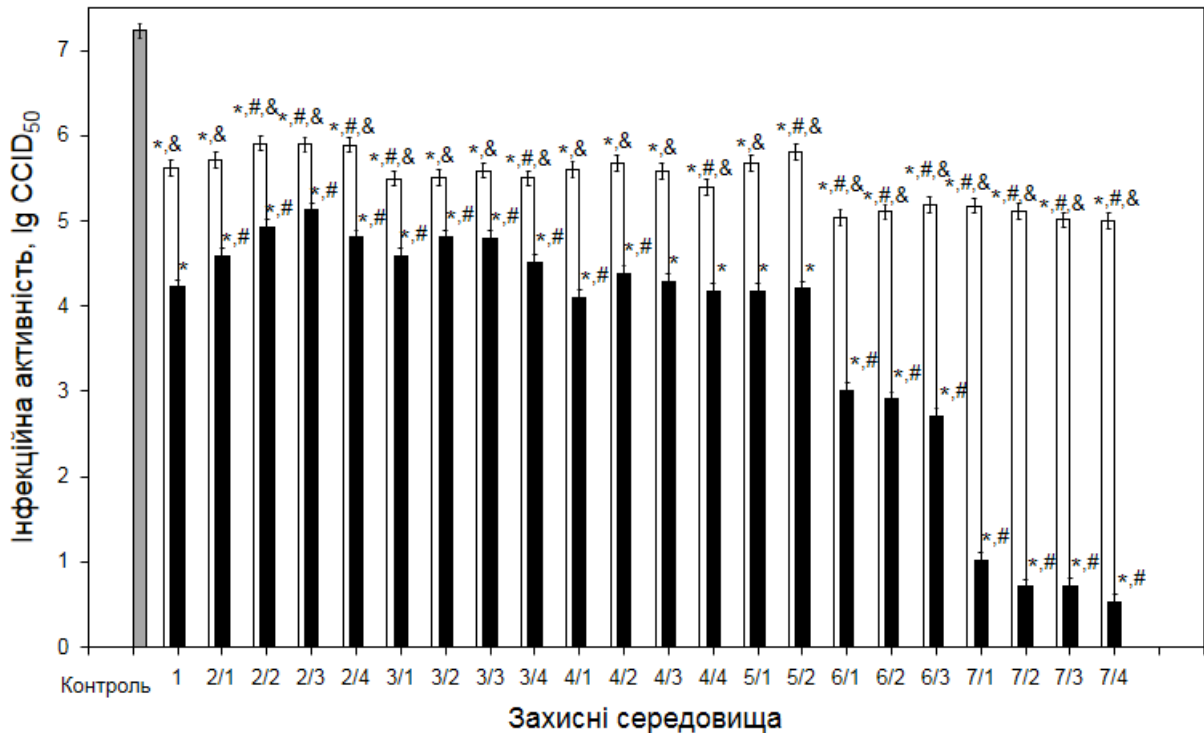


Рис. 3. Інфекційна активність штаму *L. Pasteur* через 12 місяців зберігання у захисних середовищах за різних температур: контроль (□); -80°C (□); -20°C (■)

Примітка: відмінності статистично значущі порівняно з контролем (*), середовищем 1 за кожної з температур (#) та температурою -20°C (&), $p < 0,05$; $n = 5$.

Мінімальні показники збереженості обох штамів ВС після зберігання протягом 12-ти місяців за температур -20 , -80°C були в середовищах 7/1–7/4 (РС із додаванням 2,5–10% пептону). Інфекційна активність штаму CVS після зберігання за температур -20 і -80°C становила 19–10% (від вихідного контролю) та 72–65% відповідно. Інфекційна активність штаму *L. Pasteur* складала 14–7% за температури -20°C та 72–69% за температури -80°C .

Результати вивчення динаміки інфекційної активності штамів CVS та *L. Pasteur* у процесі зберігання за температур -20 , -80°C протягом 12-ти місяців показали, що на збереженість ВС за цих температур найбільш значуще впливає температура зберігання, а потім – термін зберігання і склад захисних середовищ.

Вплив складу захисних середовищ і температурних режимів зберігання на інфекційну активність ВС після зберігання протягом 24-х місяців. Метою проведених досліджень було експериментальне обґрунтування протоколів довгострокового зберігання промислових штамів ВС. З урахуванням наведених вище результатів експериментів та вимог технічних умов і технологічних регламентів виробництва антирабічних препаратів було досліджено захисну дію середовищ, склад яких відображено у розділі «Матеріали й методи дослідження».

Зразки зберігали за температур 37, 5, -20 , -80 та -196°C протягом 24-х місяців. Вихідна інфекційна активність штаму CVS становила $(4,68 \pm 0,19)$, штаму *L. Pasteur* – $(5,45 \pm 0,19)$ lg CCID_{50} .

За температури 37°C штам CVS інактивувався в усіх середовищах протягом 3-х місяців, штам *L. Pasteur* – протягом місяця. За температури 5°C штам CVS

інактивувався протягом 6-ти місяців, штам L. Pasteur – протягом 6–12-ти місяців залежно від складу середовищ.

За температури -20°C через 6 місяців у середовищі 1 збереглося 70% активності штаму CVS. У середовищах 2–5 збереглося 82, 74, 79, 62% вихідної активності вірусу відповідно. Через 24 місяці за температури -20°C у середовищах 1–5 збереглося 53, 37, 62, 63, 8% активності вірусу відповідно (рис. 4). За температури -80°C через 24 місяці збереглося 76, 83, 80, 80, 73% активності вірусу, за температури -196°C – 82, 94, 94, 94, 73%.

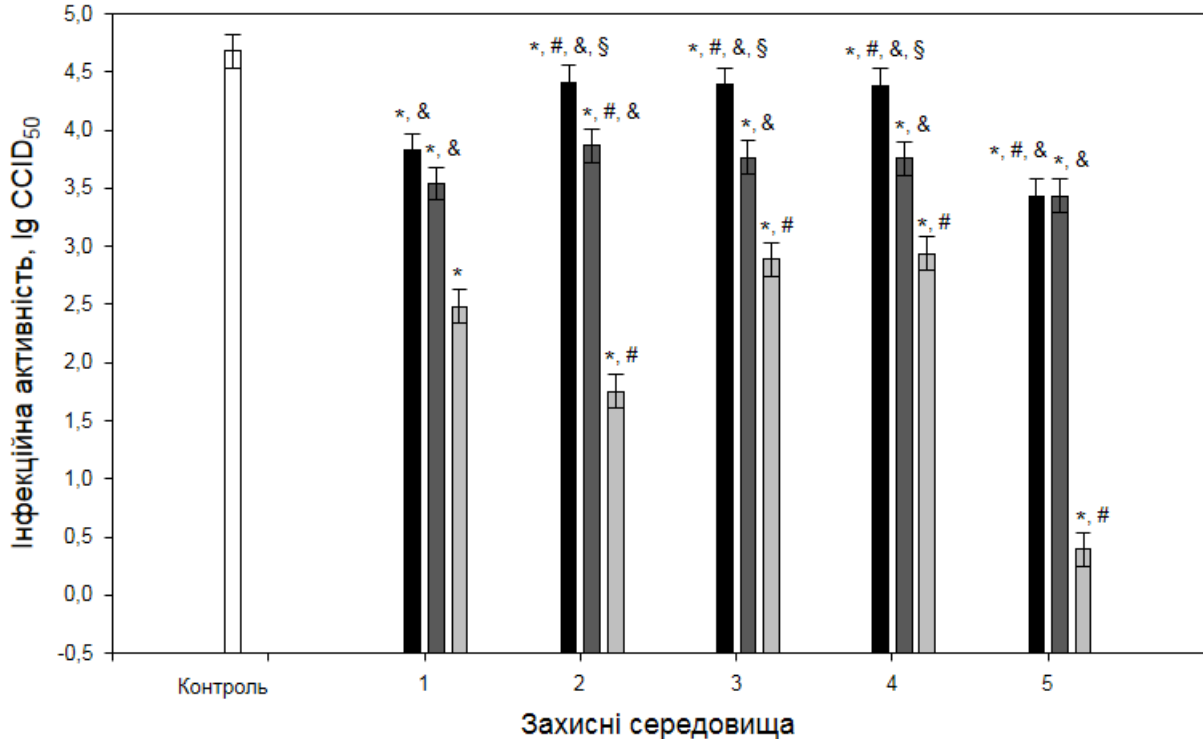


Рис. 4. Інфекційна активність штаму CVS через 24 місяці зберігання у захисних середовищах за різних температур: контроль (□); -196°C (■); -80°C (■); -20°C (□)

Примітка: відмінності статистично значущі порівняно з контролем (*), середовищем 1 за кожної з температур (#); інфекційна активність статистично значуще вища, ніж за температури -20°C (&) та -80°C (§), $p < 0,05$; $n = 5$.

Показники збереженості штаму L. Pasteur через 6 місяців зберігання за температури -20°C у середовищах 1–5 склали 72, 74, 73, 80, 66% від вихідної активності вірусу відповідно, через 24 місяці – 53, 37, 55, 56, 7% відповідно (рис. 5). За температури -80°C через 24 місяці збереглося 67, 73, 71, 74, 61% активності, за температури -196°C – 79, 83, 83, 87, 77% відповідно. Під час зберігання ВС за температур -20 , -80°C протягом усього терміну спостереження, як і в попередніх експериментах, виявили зниження інфекційної активності (рис. 6). На динаміку активності ВС між 12- та 24-м місяцями найбільш значуще впливала температура зберігання і меншою мірою склад захисних середовищ. Під час зберігання за температури -196°C загибель віріонів відбувалася на етапах заморожування-відтавання. На цих етапах на збереженість ВС впливав склад захисних середовищ.

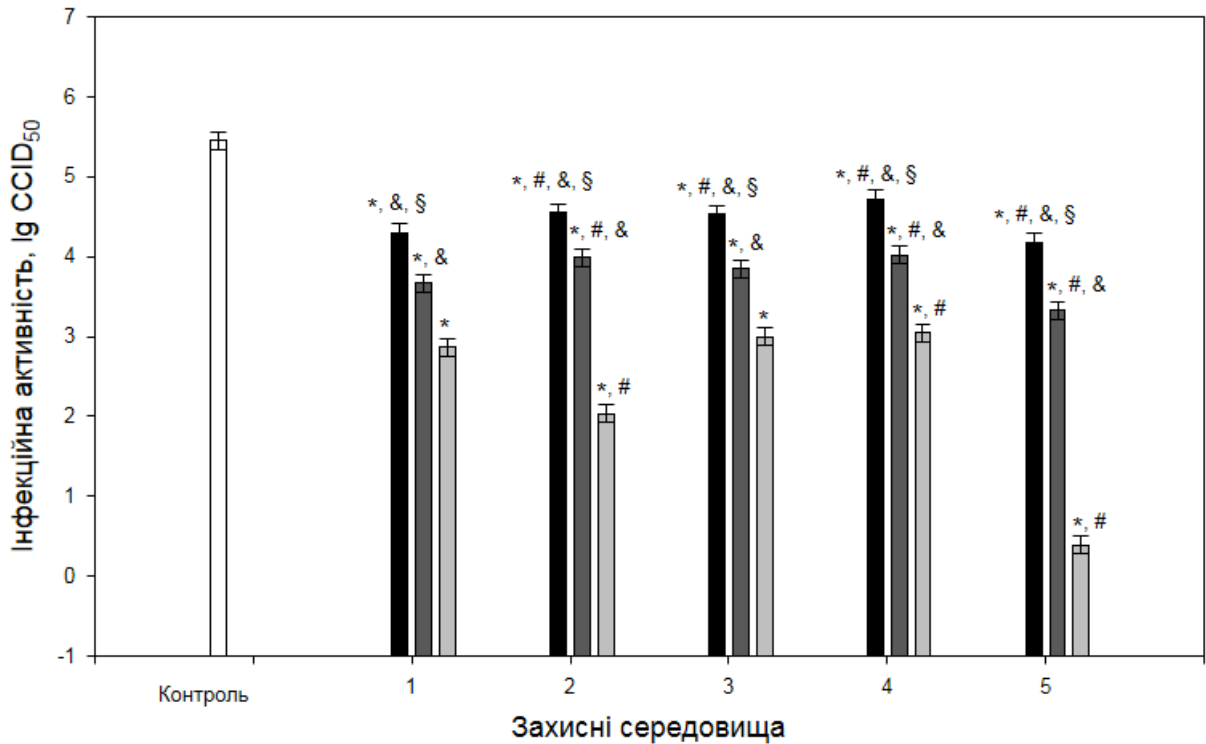


Рис. 5. Інфекційна активність штаму *L. Pasteur* через 24 місяці зберігання в захисних середовищах за різних температур: контроль (□); -196°C (■); -80°C (■); -20°C (■)

Примітка: відмінності статистично значущі порівняно з контролем (*), середовищем 1 за кожної з температур (#); інфекційна активність статистично значуще вища, ніж за температури -20°C (&) та -80°C (§), $p < 0,05$; $n = 5$.

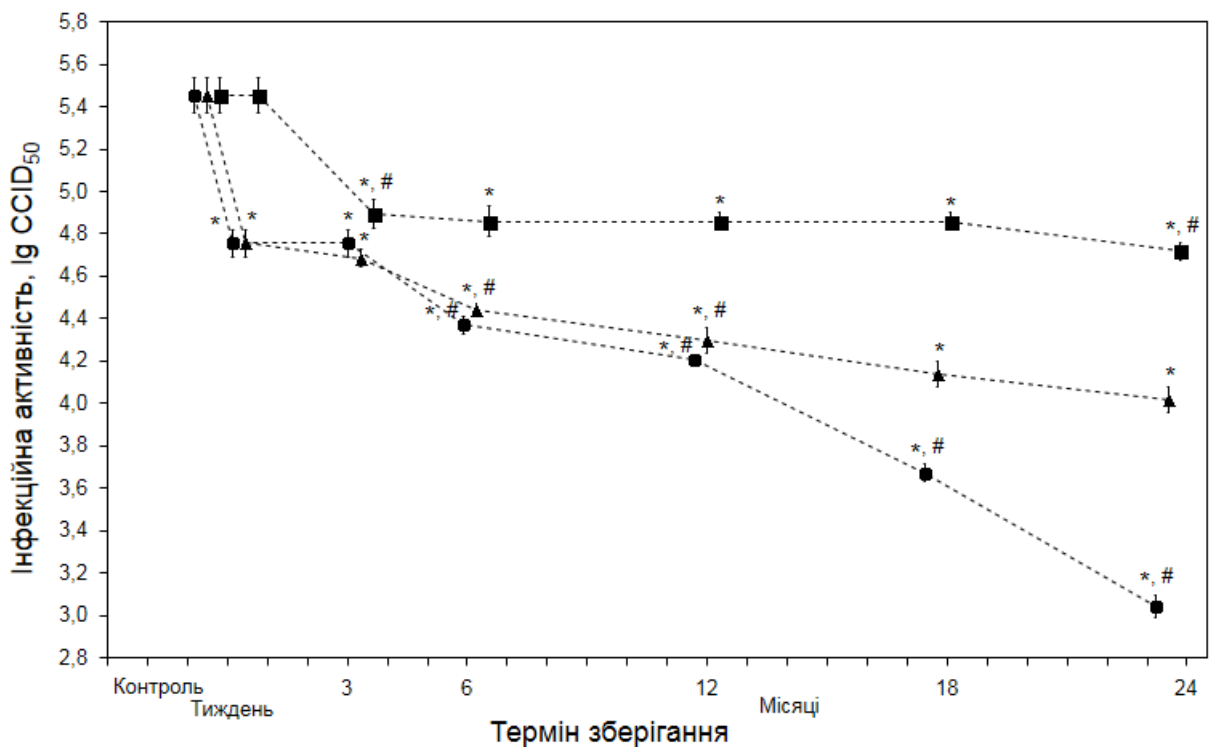


Рис. 6. Інфекційна активність штаму *L. Pasteur* під час зберігання у РС з 5% сахарози та 5% гліцерину за різних температур: -20°C (●); -80°C (▲); -196°C (■)

Примітка: відмінності статистично значущі порівняно з контролем (*) і попереднім терміном зберігання (#), $p < 0,05$; $n = 5$.

Вплив складу захисних середовищ на збереженість штаму вірусу сказу L. Pasteur під час ліофілізації та подальшого зберігання за температур 5, -20, -80°C. Вихідна інфекційна активність ВС до ліофілізації становила $(5,38 \pm 0,15) \lg \text{CCID}_{50}$. Після ліофілізації найвищий показник збереженості (91% від вихідної активності) спостерігався у зразках із середовищем 3 (РС із додаванням 1% желатину та 5% сахарози). Збереженість активності вірусу, ліофілізованого у середовищах 1, 2, 4, була значуще нижчою, ніж в середовищі 3 – 86, 81, 84% від вихідного контролю відповідно. Протягом усього терміну зберігання після ліофілізації мінімальні показники збереженості вірусу в усіх середовищах спостерігалися за температури 5°C, а максимальні – за температури -80°C. За всіх температур найвища збереженість вірусу була у середовищі 3. Через 24 місяці за температур 5, -20, -80°C у середовищі 3 збереглося 68, 80, 87% інфекційної активності ВС, середовищі 1 – 64, 75, 77%, середовищі 2 – 61, 74, 77%, середовищі 4 – 64, 71, 75% відповідно (рис. 7). Показано, що під час зберігання за температур 5, -20, -80°C ступінь їх впливу та складу захисних середовищ на інфекційну активність ВС змінювався залежно від термінів зберігання. Через 6 місяців спостерігався більший вплив складу захисних середовищ. Через 12 місяців температура зберігання та склад середовищ впливали однаково, а через 18–24 місяці визначальним чинником була температура.

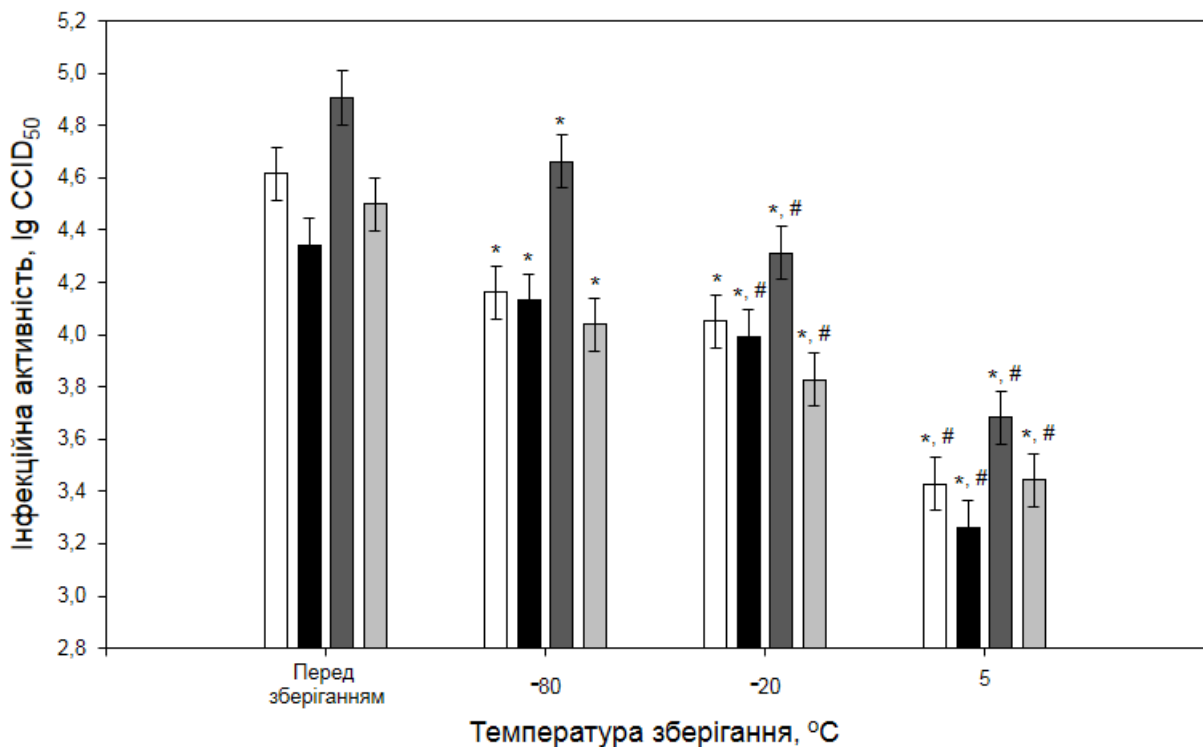


Рис. 7. Інфекційна активність штаму L. Pasteur, ліофілізованого у різних середовищах, після зберігання за температур 5, -20 та -80°C протягом 24-х місяців: □ – середовище 1; ■ – середовище 2; ■ – середовище 3; □ – середовище 4

Примітка: відмінності статистично значущі порівняно з активністю перед зберіганням (*) та попереднім терміном зберігання (#), $p < 0,05$; $n = 5$.

Склад захисних середовищ впливав і на технологічні показники ліофілізатів ВС. В середовищі 3 зразки ліофілізатів мали однорідну структуру, рівні краї та блискучу поверхню. У середовищах 1, 2, 4 ліофілізати мали пористу структуру, нерівні краї та матову поверхню. Час відновлення зразків, ліофілізованих у середовищі 2, після ліофілізації та наступного зберігання за всіх температур був більшим за час промислового регламенту (не більше хвилини). Час відновлення зразків, ліофілізованих у середовищах 1, 3, 4, відповідав вимогам регламенту.

Отримані результати свідчать про те, що інактивація ВС під час зберігання за температури -196°C відбувалася за рахунок дії пошкоджувальних факторів, пов'язаних із процесами кристалізації та рекристалізації в оточуючому віріони середовищі на етапах заморожування-відтавання. За температур -20 , -80°C вірус інактивувався як в процесі заморожування-відтавання, так і зберігання під дією холодного фактора й «ефекту розчинів». За температури -80°C віріони пошкоджувалися також за рахунок зміни структури зразків внаслідок термодинамічної нестабільності (Mazur P., 1970; Гордиенко Е.А., Пушкарь Н.С., 1994; Белоус А.М., Грищенко В.И., 1994; Фулер Б. и др., 2003). Під час ліофілізації за умов фазового переходу «лід-пар» порушувалася взаємодія різних ділянок біополімерів нуклеокапсидів і дестабілізувалася вірусна РНК-залежна РНК-полімераза та транскриптаза (Нардид О.А., 2014; Сао Е. et al., 2003).

Захисний ефект кріопротекторних домішок до середовищ консервування під час зберігання за низьких температур і ліофілізації пов'язаний із їхніми гідратаційними властивостями й стабілізацією суперкапсиду (Johnson F.V., 1990; Gould E.A., 1999; Tanaka T. et al., 1991; Malenovská H., 2014).

ВИСНОВКИ

У дисертаційній роботі представлено теоретичне узагальнення і нове вирішення наукової задачі, яка спрямована на визначення ефективних умов довгострокового зберігання промислових штамів вірусу сказу в технологічних процесах виробництва антирабічних препаратів.

Отримані результати порівняльного дослідження впливу складу захисних середовищ, температурних режимів і термінів зберігання на збереженість вірусу сказу дозволяють зробити наступні висновки:

1. На відміну від концепцій щодо механізмів кріопошкоджень клітин пошкоджувальними факторами вірусу сказу переважно є «ефекти розчинів», агрегація та контакт віріонів із кристалами льоду. З цими особливостями механізмів кріопошкоджень пов'язана й вираженість захисної дії різних кріопротекторних речовин під час довгострокового зберігання вірусу сказу за низьких температур і після ліофілізації. Виявлено також відмінності у чутливості штамів CVS та L. Pasteur, які мають спільне походження, до умов зберігання за низьких температур.

2. Речовини з кріопротекторними властивостями, які використовуються під час низькотемпературного консервування різних мікроорганізмів (сахароза, гліцерин, ДМСО, пептон у концентраціях до 10%, мальтоза в концентрації 5%, желатин, альгінат натрію в концентраціях до 3%) не впливають на інфекційну активність вірусу сказу. З урахуванням технологічних умов виробництва антирабічних препаратів для експериментального обґрунтування складу захисних

середовищ було вибрано ростове середовище на основі DMEM із додаванням вказаних речовин.

3. Вираженість захисної дії кріопротекторних домішок у середовищах консервування відносно штамів CVS та L. Pasteur була різною на етапах заморожування до -20 , -80°C і змінювалася у процесі зберігання за цих температур. Так, після заморожування до -20°C максимальні показники збереженості штаму CVS були в середовищах із додаванням 2,5–7,5% сахарози, 2,5–5% гліцерину, 2,5–10% ДМСО, 1–3% желатину та 1–3% альгілату натрію, після наступного зберігання протягом 12-ти місяців – у середовищах із додаванням 5–10% сахарози, 5–7,5% гліцерину, 3% желатину. Максимальні показники збереженості штаму L. Pasteur після заморожування до -20°C були у середовищі з додаванням 7,5–10% сахарози, 2,5–10% гліцерину, 5–7,5% ДМСО, 1–3% желатину та у ростовому середовищі без домішок, після наступного зберігання протягом 12-ти місяців – у середовищах із додаванням 5–10% сахарози, 5–7,5% гліцерину, 5% ДМСО. Після заморожування до -80°C максимальні показники збереженості штаму CVS були у середовищах із додаванням 2,5% сахарози, 2,5% гліцерину, 10% ДМСО та 1–3% желатину, після зберігання протягом 12-ти місяців – у середовищах із додаванням 2,5–10% сахарози, 7,5% гліцерину, 5% ДМСО та 3% желатину. Максимальні показники збереженості штаму L. Pasteur після заморожування до -80°C були у середовищах із додаванням 10% сахарози, 10% гліцерину, 5–10% ДМСО, 1–3% желатину, 1–3% альгілату натрію та у ростовому середовищі без домішок, після зберігання протягом 12-ти місяців – у середовищах із додаванням 2,5–10% сахарози, 7,5% гліцерину, 2,5–7,5% ДМСО, 1–3% желатину та у ростовому середовищі без домішок.

4. На основі результатів досліджень збереженості інфекційної активності вірусу сказу за різних температур та результатів проведеного скринінгу складу захисних середовищ, які відповідають технічним умовам виробництва антирабічних препаратів, розроблено протоколи довгострокового зберігання виробничих штамів вірусу сказу за температур -80 , -196°C та короткострокового (до 6-ти місяців) за температури -20°C . Для довгострокового зберігання рекомендовано захисне середовище на основі ростового середовища DMEM із додаванням 5% сахарози, 5% гліцерину або їх суміші. Ці захисні середовища через 24 місяці (термін спостереження) забезпечують наступну збереженість інфекційної активності штамів CVS та L. Pasteur: 80–83 і 71–74% відповідно (-80°C) та 94 і 83–87% відповідно (-196°C). Для короткострокового зберігання рекомендовано ростове середовище на основі DMEM із додаванням 2,5–10% сахарози або гліцерину. Через 6 місяців за температури -20°C у цьому середовищі зберігається 80–84% інфекційної активності штаму CVS та 80–88% – штаму L. Pasteur.

5. Ступінь впливу температур зберігання та складу захисних середовищ на інфекційну активність ліофілізованого за технологічним регламентом вірусу сказу змінюється залежно від термінів зберігання. У процесі зберігання протягом 24-х місяців (термін спостереження) через 6 місяців визначальним чинником був вплив складу захисних середовищ, через 12 місяців спостерігався однаковий вплив обох чинників, через 18–24 місяці більшим був вплив температури зберігання. Експериментально визначено склад захисного середовища для ліофілізації вірусу сказу та подальшого зберігання ліофілізованих зразків за температур 5, -20 та

–80°C: ростове середовище на основі DMEM із додаванням суміші 1% желатину та 5% сахарози. Використання цього середовища дозволило зберегти після процесу ліофілізації 91% вихідної інфекційної активності штаму L. Pasteur. Після наступного зберігання протягом 24-х місяців за температур 5, –20 та –80°C збереглося 68, 80 та 87% вихідної інфекційної активності вірусу відповідно.

ПЕРЕЛІК НАУКОВИХ ПРАЦЬ, ОПУБЛІКОВАНИХ ЗА ТЕМОЮ ДИСЕРТАЦІЇ

Статті у фахових виданнях України

1. **Varianytsia V. V., Vysekantsev I. P.** Infectious activity of L. Pasteur rabies virus vaccine strain frozen-dried in various protective media and then stored at various temperatures. *Probl Cryobiol Cryomed.* 2018. Vol. 28, № 4. P. 333–42. DOI: <https://doi.org/10.15407/cryo28.04.333> (*Scopus*) (Внесок здобувача: планування та постановка експериментів; визначення інфекційної активності вірусу; статистичний аналіз; обговорення та узагальнення отриманих результатів; формулювання висновків; підготовка матеріалів до друку).

2. **Варяниця В. В., Высеканцев И. П.** Защитные среды для хранения стандартного штамма вируса бешенства CVS при температурах –20, –80°C. Вестник проблем биологии и медицины. 2019. Т. 4, № 1. С. 205–11. DOI: <https://doi.org/10.29254/2077-4214-2019-4-1-153-205-211> (Внесок здобувача: планування та постановка експериментів; визначення інфекційної активності вірусу; статистичний аналіз; обговорення та узагальнення отриманих результатів; формулювання висновків; підготовка матеріалів до друку).

3. **Varianytsia V. V., Vysekantsev I. P.** Impact of storage temperature regimens and protective media composition on rabies virus CVS strain preservation. *Probl Cryobiol Cryomed.* 2020. Vol. 30, № 2. P. 148–57. DOI: <https://doi.org/10.15407/cryo30.02.148> (*Scopus*) (Внесок здобувача: планування та постановка експериментів; визначення інфекційної активності вірусу; статистичний аналіз; обговорення та узагальнення отриманих результатів; формулювання висновків; підготовка матеріалів до друку).

Статті в наукових періодичних виданнях інших країн

4. **Burkova V. V., Vysekantsev I. P., Lavrik A. A.** Preservation of infectious activity of rabies virus industrial strains stored at various temperatures. *Electronic periodical publication of SFU «Live and bioconcent systems».* 2014. № 9. P. 1–11. (Внесок здобувача: постановка експериментів; визначення інфекційної активності вірусу; статистичний аналіз; обговорення та узагальнення отриманих результатів; підготовка матеріалів до друку).

5. **Varianytsia V. V., Vysekantsev I. P.** Protective media for storage of L. Pasteur rabies virus strain at different temperatures *IOSR Journal Of Pharmacy.* 2019. Vol. 9, № 1. P. 9–18. (Внесок здобувача: планування та постановка експериментів; визначення інфекційної активності вірусу; статистичний аналіз; обговорення та узагальнення отриманих результатів; формулювання висновків; підготовка матеріалів до друку).

6. **Varianytsia V. V., Vysekantsev I. P.** Influence of protective media composition and storage temperatures on preservation of rabies virus vaccine strain L. Pasteur. *IOSR Journal Of Pharmacy And Biological Sciences.* 2020. Vol. 15, № 3. P. 20–9.

DOI: <https://doi.org/10.9790/3008-1503012029> (Внесок здобувача: планування та постановка експериментів; визначення інфекційної активності вірусу; статистичний аналіз; обговорення та узагальнення отриманих результатів; формулювання висновків; підготовка матеріалів до друку).

Оглядові статті в журналах, які входять до міжнародних наукометричних баз

7. **Varianytsia V. V.**, Vysekantsev I. P. Storage methods of complex RNA. *Probl Cryobiol Cryomed.* 2017. Vol. 27, №4. P. 287–95. DOI: <https://doi.org/10.15407/cryo27.04.287> (Scopus) (Внесок здобувача: узагальнення наукової літератури щодо методів зберігання різних вірусів; підготовка матеріалів до друку).

Тези наукових доповідей конференцій

8. **Буркова В. В.**, Лаврик О. А. Інфекційна активність промислових штамів вірусу сказу після зберігання при різних низьких температурах. *Молодь і поступ біології: збірник тез VIII Міжнародної наукової конференції студентів і аспірантів, приуроченої до 150-річчя від дня народження академіка В. Вернадського (м. Львів, 16–19 квіт. 2013 р.).* Львів: Львівський національний університет імені Івана Франка, 2013. С. 279–80.

9. **Буркова В. В.**, Пишко О. В. Инфекционная активность промышленных штаммов вируса бешенства после хранения при температурах $-20, -80^{\circ}\text{C}$. *Холод в биологии и медицине – 2014: Актуальные проблемы криобиологии, трансплантологии и биотехнологии: тезисы 38-й ежегодн. конф. молодых ученых (г. Харьков, 21–22 мая 2014 г.).* Проблемы криобиологии и криомедицины. 2014. Т. 24, № 2. С. 175.

10. **Буркова В. В.**, Лаврик А. А., Мороз О. Е., Великий И. С. Вирулентность контрольного штамма вируса бешенства CVS (20%-мозговая суспензия) в зависимости от температуры хранения. *Биология – наука XXI века: тезисы 19-ой Международной Пущинской школы-конференции молодых ученых (г. Пущино, 20–24 апр. 2015 г.).* Пущино: Межфакультетский научно-образовательный центр Московского государственного университета им. М.В. Ломоносова, 2015. С. 164–5.

11. **Буркова В. В.**, Лаврик А. А. Активность штамма вируса бешенства CVS (20%-я мозговая суспензия) после хранения при разных температурах. *Холод в биологии и медицине – 2015: Актуальные проблемы криобиологии, трансплантологии и биотехнологии: материалы 39-й ежегодн. конф. молодых ученых, посвящ. 70-летию ЮНЕСКО (г. Харьков, 20–21 мая 2015 г.).* Проблемы криобиологии и криомедицины. 2015. Т. 25, № 2. С. 170.

12. **Burkova V. V.**, Lavrik A. A., Vysekantsev I. P. Infectious activity of attenuated rabies virus strains L. Pasteur and CVS after low temperature storage. *CYS-2015: abstract book of the 1st International conference of young scientists (Kyiv, 21–25 Sep., 2015).* Lutsk: Vezha-Print, 2015. P. 113.

13. **Буркова В. В.** Хранение штаммов вируса бешенства L. Pasteur и CVS при низких температурах под защитой криопротекторов. *Холод в биологии и медицине – 2016: Актуальные проблемы криобиологии, трансплантологии и биотехнологии: материалы 40-й ежегодн. конф. молодых ученых (г. Харьков, 23–24 мая 2016 г.).* Проблемы криобиологии и криомедицины. 2016. Т. 26, № 2. С. 162.

14. Yermolenko N. A., Savonova M. S., **Varianytsia V. V.**, Kalyuzhnaya O. S. Method of producing a suspension of rabies virus strain L. Pasteur for the production of the rabies vaccine. *Topical issues of new drugs development: abstract book of the XXIV International scientific and practical conference of young scientists and students* (Kharkiv, 20 Apr., 2017). Kharkiv: NUPh, 2017. P. 349–50.

15. **Варяница В. В.**, Высеканцев И. П. Лиофилизация и последующее хранение штамма фиксированного вируса бешенства L. Pasteur. *Холод в біології та медицині – 2017: Актуальні питання кріобіології, трансплантології та біотехнології*: матеріали 41-ї щорічн. конф. молодих учених (м. Харків, 24–25 трав. 2017 р.). Проблемы кріобіології и криомедицины. 2017. Т. 27, № 2. С. 162.

16. **Varianytsia V. V.**, Vysekantsev I. P. Preservation of lyophilized rabies virus strain L. Pasteur after storage at temperatures of 5, –20 and –80°C. *Smart Bio: abstract book of 2nd International conference* (Kaunas, 03–05 May, 2018). Kaunas: Vytautas Magnus University, 2018. P. 352.

17. **Варяница В. В.**, Высеканцев И. П. Долгосрочное хранение фиксированных штаммов вируса бешенства L. Pasteur и CVS при температурах –20 и –80°C с применением защитных сред. *Холод в біології та медицині – 2018: Актуальні питання кріобіології, трансплантології та біотехнології*: матеріали 42-ї щорічн. конф. молодих учених (м. Харків, 23–24 трав. 2018 р.). Проблемы кріобіології и криомедицины. 2018. Т. 28, № 2. С. 169.

18. Стрилец О. П., Щетинина М. В., **Варяница В. В.** Время инактивации вируса бешенства при получении антирабических вакцин. *Сучасні досягнення фармацевтичної технології та біотехнології*: збірник наукових праць VII науково-практичної дистанційної конференції з міжнародною участю (м. Харків, 23 листоп. 2018 р.). Харків: Вид-во НФаУ, 2018. С. 368–70.

19. **Варяница В. В.**, Высеканцев И. П. Хранение в течение года стандартного фиксированного штамма вируса бешенства CVS в защитных средах с сахарозой, глицерином и мальтозой при разных температурах. *Холод в біології та медицині – 2019: Актуальні питання кріобіології, трансплантології та біотехнології*: матеріали 43-ї щорічн. конф. молодих учених (м. Харків, 27–29 трав. 2019 р.). Проблемы кріобіології и криомедицины. 2019. Т. 29, № 2. С. 153.

20. **Варяница В. В.**, Новікова О. Ю. Порівняння методів RFFIT та MNT при контролі титрів антирабічних антитіл в препараті антирабічного імуноглобуліну. *Proceedings of the 6th Ukrainian Congress for Cell Biology with international representation* (Yaremche, 18–21 June, 2019). Lviv. P. 58.

21. **Варяница В. В.**, Высеканцев И. П. Применение защитных сред для долгосрочного хранения фиксированного штамма вируса бешенства L. Pasteur при низких температурах. *Медицина наука та практика: виклики і сьогодення*: збірник тез наукових робіт учасників міжнародної науково-практичної конференції (м. Львів, 23–24 серп. 2019 р.). Львів: ГО «Львівська медична спільнота»; 2019. С. 87–90.

22. **Варяница В. В.**, Высеканцев И. П. Эффективность застосування захисних середовищ для довгострокового зберігання штаму вірусу сказу L. Pasteur за різних низьких температур. *Холод в біології та медицині – 2020: Актуальні питання кріобіології, трансплантології та біотехнології*: матеріали 44-ї щорічн. конф.

молодих учених (м. Харків, 19–21 трав. 2020 р.). Проблеми кріобіології і кріомедицини. 2020. Т. 30, № 3. С. 283.

Патенти України на корисну модель

23. Спосіб кількісного визначення антирабічного антигену *in vitro* в інактивованих антирабічних вакцинах: пат. 118343 Україна. № u201612220; заявл. 01.12.2016; опубл. 10.08.2017, Бюл. № 15. 6 с.

АНОТАЦІЯ

Варяниця В.В. Збереженість промислових штамів вірусу сказу при низьких температурах. – Кваліфікаційна наукова праця на правах рукопису.

Дисертація на здобуття наукового ступеня кандидата біологічних наук за спеціальністю 03.00.19 – кріобіологія. – Інститут проблем кріобіології і кріомедицини НАН України, Харків, 2021.

Дисертаційна робота присвячена дослідженню впливу зберігання за низьких температур і ліофілізації в різних захисних середовищах на інфекційну активність промислових штамів вірусу сказу (ВС).

У дисертаційній роботі вперше показано, що, на відміну від механізмів кріопшкоджень клітин, пошкоджувальними факторами для ВС за низьких температур є «ефект розчинів», агрегація, контакт віріонів з кристалами льоду. Експериментально обґрунтовано склад середовищ для довгострокового зберігання штамів ВС CVS та L. Pasteur при -80 та -196°C (термін спостереження – 24 місяці): ростове середовище з додаванням 5% сахарози, 5% гліцерину та їх суміші. Для зберігання цих штамів протягом 6-ти місяців при -20°C рекомендовано середовище з додаванням 2,5–10% сахарози або гліцерину.

Встановлено, що максимальну збереженість ВС після ліофілізації та наступного зберігання протягом 24-х місяців при 5, -20 , -80°C забезпечувало ростове середовище з додаванням суміші 1% желатину та 5% сахарози.

Ключові слова: вірус сказу, культура клітин, ліофілізація, довгострокове зберігання, збереженість вірусу, інфекційна активність вірусу, антирабічні препарати, захисні середовища.

АННОТАЦИЯ

Варяница В.В. Сохранность промышленных штаммов вируса бешенства при низких температурах. – Квалификационная научная работа на правах рукописи.

Диссертация на соискание ученой степени кандидата биологических наук по специальности 03.00.19 – кріобіологія. – Інститут проблем кріобіології і кріомедицини НАН України, Харків, 2021.

Диссертационная работа посвящена исследованию влияния хранения при низких температурах и лиофилизации в различных защитных средах на инфекционную активность промышленных штаммов вируса бешенства (ВБ).

В диссертационной работе впервые показано, что, в отличие от механизмов криповреждений клеток, повреждающими факторами для ВБ при низких температурах является «эффект растворов», агрегация, контакт вирионов с кристаллами льда. Экспериментально обоснован состав сред для долгосрочного

хранения штаммов ВБ CVS и L. Pasteur при -80 и -196°C (срок наблюдения – 24 месяца): ростовая среда с добавлением 5% сахарозы, 5% глицерина и их смеси. Для хранения этих штаммов сроком до 6-ти месяцев при -20°C рекомендована среда с добавлением 2,5–10% сахарозы или глицерина.

Установлено, что максимальную сохранность ВБ при лиофилизации и последующем хранении в течение 24-х месяцев при 5, -20 , -80°C обеспечивала ростовая среда с добавлением смеси 1% желатина и 5% сахарозы.

Ключевые слова: вирус бешенства, культура клеток, лиофилизация, долгосрочное хранение, сохранность вируса, инфекционная активность вируса, антирабические препараты, защитные среды.

ANNOTATION

Varianytsia V.V. Preservation of rabies virus industrial strains at low temperatures. – The qualifying scientific paper as a manuscript.

Thesis for the degree of Candidate of Biological Sciences in specialty of 03.00.19 – cryobiology. – Institute for Problems of Cryobiology and Cryomedicine of the National Academy of Sciences of Ukraine, Kharkiv, 2021.

Rabies is a zoonotic infectious disease, which is caused by the rabies virus (RV). Ukraine ranks the 3rd in Europe in rabies spread among wild and domestic animals. Cases of suspected rabies infection or disease are annually reported in humans. For the prevention and control of rabies, oral immunization of wild and parenteral ones of domestic animals is performed. In individuals with suspected infection post-exposure prophylaxis by rabies specific immunoglobulins and rabies vaccines is conducted. People with a high risk of infection during professional activity are also vaccinated.

Modern serial manufacturing of rabies products requires a long-term storage of large volumes of purified and standardized industrial RV strains suspensions and to lesser extent it necessitates a storage of frozen-dried samples. In this regard, the problem of developing effective methods for a long-term storage of RV has become relevant. The study examined the the influence of storage at low temperatures and freeze-drying in different protective media on the infectious activity of RV industrial strains.

In the thesis for the first time it has been shown that in contrast to the mechanisms of cells cryodamage, damaging factors for the RV are the “effect of solutions”, aggregation, contact of virions with ice crystals. For the first time there have been discovered differences in susceptibility of CVS and L. Pasteur strains, which have a common origin, to the damaging effects of the freezing process and storage conditions at low temperatures. The protective effect of various cryoprotective substances (sucrose, glycerol, DMSO, gelatin) was shown at the stages of freezing to -20 , -80°C and storage at these temperatures. It was established that the level of the protective action of these cryoprotective substances against RV was different at freezing stages and changes during storage at temperatures of -20 , -80 and -196°C . The composition of protective media for long-term storage of RV CVS and L. Pasteur strains at temperatures of -80 and -196°C and for storage of these strains for up to 6 months at -20°C was experimentally substantiated. For long-term storage at temperatures of -80 and -196°C it is advisable to use a growth medium based on DMEM when supplemented with 5% sucrose, 5% glycerol and mixtures thereof. These protective media after 24 months of storage (observation

period) at -80°C provide preservation of 80–83% of the CVS strain infectious activity and 71–74% of the L. Pasteur strain infectious activity and at -196°C this was 94% of the CVS strain and 83–87% of the L. Pasteur strain activity. For short-term storage at -20°C , it is recommended to use a growth medium with the addition of 2.5–10% sucrose or glycerol. After 6 months at -20°C , 80–84% of the infectious activity of the CVS strain and 80–88% of the L. Pasteur strain were preserved.

For the first time it has been established that the degree of storage temperatures and protective media composition influence on the infectious activity of frozen-dried RV changes depending on the storage period. During storage of frozen-dried virus within 24 months (observation period) at temperatures of 5, -20 , -80°C after 6 months, the influence of protective medium composition was higher, 12 months later the influence of both factors was the same, after 18–24 months the storage temperature was the determining factor. The composition of protective media for freeze-drying and subsequent storage of RV at temperatures of 5, -20 , -80°C was experimentally substantiated: DMEM-based growth medium with addition of a mixture of 1% gelatin and 5% sucrose. The use of this medium allowed the preservation of 91% of the L. Pasteur strain original infectious activity after freeze-drying. After subsequent storage for 24 months at temperatures of 5, -20 , -80°C , 68, 80 and 87% of the virus original infectious activity was preserved, respectively.

Using the results presented in the thesis, the system of the main and working banks of industrial RV strains has been created and supported in JSC "BIOLIK" (Kharkiv, Ukraine), methods of RV storage before inactivation were introduced in the technological processes of rabies vaccines production, developed veterinary product "Rabies virus antigen for horse immunization", method of specific activity determination of the "Rabies Immunoglobulin (equine)" product was validated and introduced into the control system.

Key words: rabies virus, cell culture, freeze-drying, long-term storage, virus preservation, virus infectious activity, rabies products, protective media.

ПЕРЕЛІК УМОВНИХ ПОЗНАЧЕНЬ

ВС – вірус сказу; **ДМСО** – диметилсульфоксид; **МО** – міжнародні одиниці; **РНК** – рибонуклеїнова кислота; **ССІД** – інфекційна доза для культури клітин (cell culture infective dose); **DMEM** – середовище Ігла, модифіковане Дульбекко (Dulbecco's modified Eagle's medium).

Відповідальний за випуск – д.б.н. Г.О. Бабійчук