

ВІДГУК

офіційного опонента на дисертаційну роботу Варяниці Вікторії Валеріївни «Збереженість промислових штамів вірусу сказу при низьких температурах», представлену на здобуття наукового ступеня кандидата біологічних наук до спеціалізованої вченої ради Д 64.242.01 при Інституті проблем кріобіології і кріомедицини за спеціальністю 03.00.19 – кріобіологія

1. Актуальність обраної теми.

Вирішення питань стабільності вірусних суспензій у ході їх зберігання для безперебійного забезпечення виробництва посівним матеріалом, проведення контролю якості антирабічних вакцин та імуноглобулінів є вельми актуальною проблемою як в Україні, так і в усьому світі. Оскільки сказ є актуальною проблемою для більш, ніж 150-ти країн світу. Україна посідає третє місце в Європі з поширення сказу серед диких та домашніх тварин. Кожного року в Україні реєструють випадки підозри на інфікування та захворювання людей на сказ. Тому набула актуальності проблема розробки ефективних методів довгострокового зберігання суспензій і ліофілізатів промислових штамів вірусу сказу в умовах виробництва імунобіологічних антирабічних препаратів.

На сьогодні дослідження щодо зберігання за різних низьких температур та із ліофілізації вірусу сказу (ВС) мають фрагментарний характер. Більшість із них присвячена короткостроковому зберіганню вірусу. Відсутні порівняльні дані щодо впливу температурних режимів, складу середовищ консервування та термінів зберігання на вірусу сказу у процесі довгострокового зберігання. Тому дослідження збереженості промислових штамів вірусу сказу при низьких температурах актуальне та необхідне.

Матеріали, які лягли в основу дисертаційної роботи, одержані в результаті виконання наукових досліджень 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).

2. Оцінка обґрунтованості та достовірності наукових положень, висновків та рекомендацій, сформульованих у дисертації

Дисертаційна робота Варяниці В.В. базується на результатах експериментальних досліджень, при проведенні яких використовувалися адекватні поставленим меті і завданням методи дослідження з використанням сучасного устаткування. Дисертантом було використано такі інформативні методи дослідження, як 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.

Для отримання даних було проведено достатню кількість експериментів, дані були проаналізовані з використанням адекватних статистичних методів. Отримані висновки дисертації конкретні і повністю відповідають зазначеним задачам дослідження.

3. Наукова новизна одержаних результатів

Результати, які представлені в дисертації Варяниці В.В. безумовно мають наукову новизну. Вперше показано, що на відміну від механізмів кріопошкоджень 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 ліофілізованого 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 ліофілізованого 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. Отримано патент на спосіб кількісного визначення антирабічного антигену *in vitro* в інактивованих антирабічних вакцинах.

4. Повнота викладу результатів в опублікованих працях

Основні положення дисертації повною мірою відображено в наукових публікаціях. За матеріалами дисертаційної роботи опубліковано 22 наукових роботи: 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.

5. Оцінка змісту дисертації, її завершеності в цілому та ідентичність змісту автореферату й основних положень дисертації

Значущість дисертаційної роботи Варяниці В.В. для науки й практики сумнівів не викликає. 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 «БІОЛПК» (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)».

Дисертація 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.

У вступі подано загальну характеристику дисертації, послідовність викладеного матеріалу повністю відповідає вимогам ДАК України.

У розділі 1 представлено огляд і аналіз літератури. Цей розділ пропорційний загальному об'єму дисертації і складається з 8 підрозділів, де проведено 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.

Розділ побудовано логічно, матеріал викладено послідовно.

У розділі 2 – матеріали і методи дослідження подано всю необхідну інформацію для розуміння методичної і методологічної бази дисертаційної роботи.

Розділ 3 - вплив речовин із різними механізмами кріозахисної дії на збереженість промислових штамів вірусу сказу протягом року за температур -20 та -80°C - складається з трьох підрозділів.

Метою цього розділу досліджень було вивчення вираженості захисної дії кріопротекторних домішок для вибору складу середовищ консервування промислових штамів ВС.

В першому підрозділі автором показано відсутність інактивууючої дії на штами вірусу сказу кріопротекторних речовин, з якими проводили дослідження.

У другому підрозділі представлено результати експериментів, в яких вивчали захисну дію різних кріопротекторних речовин після заморожування штаму вірусу CVS до температури -20 , -80°C та зберігання за цих температур протягом року.

У третьому підрозділі власних досліджень надано інформацію про захисну дію різних кріопротекторних речовин після заморожування штаму вірусу L. Pasteur до -20 , -80°C та зберігання за цих температур продовж року, наведено та проаналізовано динаміку зміни інфекційної активності обох штамів після зберігання за вказаних температур протягом 1-го, 3-х, 6-ти, 12-ти місяців.

Розділ 4 - вплив температурних режимів зберігання, складу захисних середовищ і термінів зберігання на збереженість промислових штамів вірусу сказу CVS та L. Pasteur після довгострокового зберігання викладений на 20

сторінках, складається із двох підрозділів

У першому підрозділі представлено та проаналізовано динаміку зміни інфекційної активності штаму вірусу CVS після зберігання за температур 37; 5; -20; -80; -196°C. У другому підрозділі наведено результати аналогічних досліджень із штамом вірусу L. Pasteur.

Розділ 5 - ліофілізація штаму вірусу L. Pasteur та його подальше зберігання за різних температур викладено на 12 сторінках, складається з чотирьох підрозділів де наведено результати досліджень збереженості інфекційної активності штаму вірусу L. Pasteur та технологічних характеристик його ліофілізатів після ліофілізації у різних захисних середовищах з наступним зберіганням впродовж 2-х років за температур 5; -20; -80°C.

Розділ - узагальнення та обговорення результатів де проаналізовано найбільш вірогідні механізми кріопошкоджень вірусу сказу під час заморожування, ліофілізації і зберігання за різних температур та механізми захисної дії різних кріопротекторів відносно вірусу сказу з посиланнями на результати, що отримані іншими дослідниками, а саме проведено аналіз захисної дії середовищ консервування із додаванням кріопротекторних домішок, свідчить про те, що при заморожуванні та низькотемпературному зберіганні ВС захисну дію кріопротекторних речовин пов'язано, з одного боку, із їхніми гідратаційними властивостями, з іншого – здатністю запобігати структурним перебудовам білкових макромолекул шляхом стабілізації системи водневих зв'язків або за рахунок сорбції на поверхні віріонів зі стабілізацією суперкапсиду. Відмічено, що пептон проявив інактивуючу дію на ВС як на етапах заморожування, так і в процесі зберігання за низьких температур. Найбільш вірогідно це викликано агрегацією віріонів під дією пептону та низьких температур. Обговорено, що найвищий захисний ефект у процесі ліофілізації та наступного зберігання протягом 24-х місяців за температур 5, -20, -80°C проявило захисне середовище на основі РС із додаванням 1% желатину та 5% сахарози. Висловлено припущення, що, що захисна дія цього середовища пов'язана з наявністю саме цих компонентів.

Роботу завершують 5 висновків, які в повній мірі відповідають поставленим меті і задачам роботи та впливають з проведених досліджень.

Список використаних джерел літератури розміщений на 26 сторінках тексту та складається з 249 найменувань сучасних та класичних літературних джерел вітчизняних та іноземних авторів (з них 35 викладено кирилицею і 214 – латиницею).

Три додатки містять наукові праці, в яких опубліковані основні наукові

результати дисертації та наукові праці, які засвідчують про апробацію матеріалів дисертації; акт впровадження результатів дисертаційного дослідження та патент України на корисну модель.

Автореферат у достатньому обсязі відображає зміст та результати дисертаційної роботи, та оформлений згідно існуючих вимог МОН України.

В цілому дисертаційна робота Варяниці В.В. справляє позитивне враження, проте необхідно вказати на деякі недоліки.

6. Зауваження по дисертаційній роботі

1. В роботі мають місце поодинокі граматичні, стилістичні та технічні помилки на сторінках: 22; 30; 83; 141, які необхідно виправити.
2. Висловлення відносно нелетальних і сублетальних кріопошкодженнях у віріонах (сторінка 142) недоцільні по відношенню до вірусів. Це неклітинні форми життя.
3. Висновки 3; 4; 5 є дуже громіздкими. Бажано було зробити 7 менш громіздких висновків замість 5 за результатами досліджень.

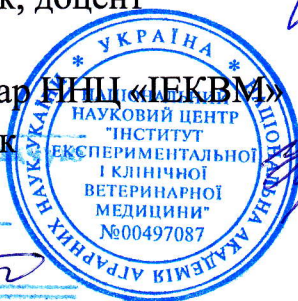
Вище зазначені недоліки не є принциповими та не впливають на загальну значимість роботи.

7. Висновок про відповідність дисертації встановленим вимогам

Вважаю, що за актуальністю, методичним рівнем, обсягом досліджень, науковою новизною, теоретичним та практичним значенням отриманих результатів, обґрунтованістю висновків і основних наукових положень, дисертаційна робота Варяниці В.В. «Збереженість промислових штамів вірусу сказу при низьких температурах», що представлена до офіційного захисту на здобуття наукового ступеня кандидата біологічних наук, в повний мірі відповідає вимогам п. 11 про «Порядок присудження наукових ступенів» Департаменту атестації кадрів вищої кваліфікації МОН України, затвердженого постановою Кабінету Міністрів України від 24 липня 2013 р. № 567 (зі змінами), а її автор Варяниця В.В. заслуговує на присудження їй наукового ступеня кандидата біологічних наук за спеціальністю 03.00.19 – кріобіологія.

Офіційний опонент
Завідувач лабораторії біотехнології
Національного наукового центру
«Інститут експериментальної і клінічної
ветеринарної медицини»,
кандидат біологічних наук, доцент
Підпис М.Ю. Стегній

засвідчую; вчений секретар
кандидат біологічних наук



Стегній М.Ю.

Л.В. Коваленко

Exid. № 4
05.04.2021