

## ВІДГУК

офіційного опонента на дисертаційну роботу **Варяниці В. В.** на тему

**«Збереженість промислових штамів вірусу сказу при низьких температурах»,**

подану на здобуття наукового ступеня кандидата біологічних наук за

спеціальністю 03.00.19 – кріобіологія

до спеціалізованої вченої ради Д 64.242.01 в Інституті проблем кріобіології

і кріомедицини НАН України

**Актуальність обраної теми.** Сказ – зоонозне емерджентне захворювання, яке спричиняється вірусом сказу. Перебіг хвороби характеризується розвитком енцефаліту із стрімким пошкодженням центральної нервової системи. Сказ має найбільш високу смертність серед класичних інфекційних хвороб. Методи діагностики сказу до появи клінічних ознак на сьогодні відсутні. А після прояву клінічних ознак це захворювання є невиліковним. Україна посідає 3-тє місце у Європі за поширенням сказу серед диких і домашніх тварин. Серед населення України також кожного року реєструють випадки підозри на інфікування або захворювання на сказ. Джерелом інфекції для людини та тварин є тварини – носії інфекції.

Для профілактики та контролю сказу в країні проводять пероральну імунізацію диких і парентеральну імунізацію домашніх тварин, що передбачено Планом протиепізоотичних заходів з профілактики основних інфекційних і паразитарних хвороб в Україні та інших протиепідемічних заходів, які здійснює Державна надзвичайна протиепізоотична комісія при Кабінеті міністрів України. Проводять також профілактичну імунізацію людей, професійна діяльність яких пов'язана із ризиком інфікування. У людей з підозрою на інфікування проводять профілактику за допомогою антирабічних вакцин і специфічних імуноглобулінів.

У зв'язку із сказаним медичні заклади, заклади ветеринарної медицини та Держпродспоживслужба України мають велику потребу у антирабічних

препаратах і засобах, до яких відносяться антирабічні вакцин, специфічні імуноглобуліни, діагностикуми. До останнього часу в Україні використовували лише імпортовані антирабічні препарати і засоби. І лише в АТ «БІОЛК» (м. Харків, Україна) проводять роботу по створенню технологій виробництва ряду антирабічних препаратів. В технологічні схеми сучасного серійного виробництва антирабічних препаратів входять системи головного та робочого банків промислових штамів вірусу сказу, в яких повинні зберігатися достатньо великі об'єми очищених і стандартизованих суспензій промислових штамів вірусу та їх ліофілізати. Це потрібно для безперервного забезпечення виробництва посівним матеріалом, надійного контролю за якістю антирабічних вакцин і імуноглобулінів, гарантії надійності серологічних діагностикумів, депонування промислових та референтних штамів.

Найбільш ефективними і вживаними методами зберігання більшості вірусів є зберігання за різних температур та ліофілізація. Дослідження, присвячені зберіганню за низьких температур та ліофілізації вірусу сказу, нечисленні та носять фрагментарний характер. Відсутні дані щодо впливу температурних режимів, складу середовищ консервування та термінів зберігання за різних температур на вірус сказу. Вплив цих чинників на вірус сказу доповнює також загальні кріобіологічні концепції даними про особливості механізмів кріопшкоджень і кріозахисту біологічних об'єктів доклітинної організації, а саме – складних віріонів.

Вищезазначене свідчить про актуальність теми дисертаційної роботи.

**Зв'язок роботи з науковими програмами, планами, темами.** Робота була виконана в рамках відомчих науково-дослідних робіт відділу кріомікробіології Інституту проблем кріобіології і кріомедицини НАН України: «Дослідження механізмів кріошкоджень 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 кріопшкоджень



мікроорганізмів, іммобілізованих в гелевих носіях з різними фізико-хімічними властивостями, під час низькотемпературного зберігання та ліофілізації» (№ державної реєстрації 0118U001187).

**Ступінь обґрунтованості наукових положень, висновків і рекомендацій, сформульованих у дисертації, їх достовірність.** Обґрунтованість наукових положень, висновків і рекомендацій, сформульованих у дисертаційній роботі, забезпечена достатньою для статистичного аналізу кількістю експериментів і досліджуваних зразків та використанням сучасних кріобіологічних, вірусологічних, культуральних методів досліджень, які рекомендовані МЕБ та ВООЗ. Авторкою були використані заморожування, ліофілізація та зберігання зразків за різних температур, культивування вірусу сказу у клітинних культурах, метод титрації вірусу у клітинних культурах, метод визначення його інфекційної активності за допомогою люмінесцентної мікроскопії з математичною обробкою результатів методом Спірмена-Кербера, статистичний аналіз отриманих результатів за допомогою методів математичної статистики. Методи дослідження повністю відповідають меті та завданням роботи. Отримані результати переконливі та достовірні. Наукові положення та висновки викладені чітко, коректно та повністю узагальнюють суть отриманих результатів і відповідають завданням дослідження.

**Наукова новизна отриманих результатів.** У дисертаційній роботі 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  $-20$ ,  $-80^{\circ}\text{C}$  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  $-196^{\circ}\text{C}$ .

Експериментально обґрунтовано склад захисних середовищ для довгострокового зберігання штамів вірусу сказу CVS та L. Pasteur за температур  $-80$  та  $-196^{\circ}\text{C}$  і для зберігання цих штамів до 6-ти місяців за температури  $-20^{\circ}\text{C}$ . Для довгострокового зберігання за температур  $-80$  та  $-196^{\circ}\text{C}$  доцільно використовувати ростове середовище на основі DMEM із додаванням 5% сахарози, 5% гліцерину та їх суміші, для короткострокового зберігання при  $-20^{\circ}\text{C}$  – 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 вірусу сказу за температур 5,  $-20$ ,  $-80^{\circ}\text{C}$ : 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,  $-20$ ,  $-80^{\circ}\text{C}$  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 результатів дослідження.** Отримані В. В. Варяницею результати, які показують вираженість захисної дії на вірус сказу різних кріопротекторних речовин під час зберігання за різних низьких температур та експериментально обґрунтований склад захисного середовища для ліофілізації, можуть бути використані для розробки протоколів довгострокового зберігання інших складних вірусів.

Розроблені протоколи довго- та короткострокового зберігання суспензій і ліофілізатів промислових штамів вірусу сказу 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 вірусу сказу; у технологічні процеси виробництва антирабічних вакцин впроваджено методи зберігання



вірусу сказу 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)».

**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 Пушчинській 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).

### **Оцінка змісту дисертації**

**Структура та обсяг 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.

**«Вступ».** У вступі дисертації обґрунтовано вибір дослідження, показані його актуальність та зв'язок із науковою тематикою ІПКіК НАН України. Представлено мету і завдання дослідження, об'єкт, предмет та методи дослідження, викладено наукову новизну одержаних результатів та практичне значення проведених досліджень, надано інформацію щодо впровадження результатів дослідження, особистого внеску здобувача, апробації результатів дисертаційного дослідження, публікацій, об'єму й структури дисертації. Актуальність роботи обґрунтована автором переконливо. Мета дослідження чітко сформульована та відповідає рівню кандидатських дисертацій. Відповідно до мети поставлено 5 завдань для її виконання.

Усі складові вступу сформульовано доступно і зрозуміло.

Зауважень до «Вступу» немає.

**Розділ 1 (Огляд літератури).** Розділ викладений на 38 сторінках, що не перевищує 20% основного обсягу роботи. Розділ складається із 8-ми підрозділів. У підрозділах 1.1–1.5 наведено інформацію про будову та репродукцію вірусу сказу, епідеміологію, патогенез, діагностику, та профілактику сказу. У підрозділах 1.6, 1.7 описано історію розробки антирабічних вакцин, зроблено огляд сучасних антирабічних вакцин і імуноглобулінів, описано сучасні технології виготовлення антирабічних вакцин. У підрозділі 1.8 проаналізовано дані із наукових джерел про зберігання різних вірусів за позитивних та різних низьких температур, ліофілізацію вірусів, склад захисних середовищ, які використовують для зберігання за низьких температур і для ліофілізації вірусів, у т.ч. і вірусу сказу.

Огляд літератури інформативний, логічно побудований. Його матеріали показують актуальність обраного напрямку досліджень та володіння авторкою обширною інформацією за темою дисертації та здатністю до її аналізу.



### Зауваження до розділу:

Підрозділи 1.1, 1.3, 1.4 занадто завантажені і деталізовані інформацією про епізоотичну ситуацію щодо сказу у світі, про патогенез та діагностику сказу. Їх можна було скоротити.

**Розділ 2 «Матеріал та методи дослідження».** Розділ викладено на 10 сторінках. Він складається із 9-ти підрозділів. В ньому представлено інформацію про промислові штами вірусу сказу та клітинні культури, з якими проводили дослідження, заходи безпеки під час роботи з вірусом, технології отримання вірусних суспензій, методику визначення інфекційної активності вірусу за допомогою імуофлуоресцентної мікроскопії та її розрахунки методом Спірмена-Кербера (метод, рекомендований ВООЗ), метод титрації вірусу в культурі клітин, методи заморожування та ліофілізації вірусу, методику статистичного аналізу результатів досліджень.

Усі штами вірусу та клітинні культури отримані із міжнародних колекцій. Штами вірусу відповідно до законодавства задепоновано у депозитарії Державного науково-контрольного інституту біотехнології і штамів мікроорганізмів (м. Київ, Україна).

Використані методи досліджень сучасні, інформативні, повністю відповідають меті та завданням дослідження.

### Зауважень до розділу немає.

**Розділ 3 «Вплив речовин із різними механізмами кріозахисної дії на збереженість промислових штамів вірусу сказу протягом року за температур  $-20$  та  $-80^{\circ}\text{C}$ ».** Розділ викладений на 29 сторінках та складається із 3-х підрозділів. У підрозділі 3.1 показано відсутність інактивуючої дії на штами вірусу сказу кріопротекторних речовин, з якими проводили дослідження. У підрозділі 3.2 представлено результати експериментів, в яких вивчали захисну дію різних кріопротекторних речовин після заморожування штаму вірусу CVS до температури  $-20$ ,  $-80^{\circ}\text{C}$  та зберігання за цих температур протягом року. У

підрозділі 3.3 надано інформацію про захисну дію різних кріопротекторних речовин після заморожування штаму вірусу L. Pasteur до  $-20$ ,  $-80^{\circ}\text{C}$  та зберігання за цих температур протягом року. У підрозділах 3.2, 3.3 наведено та проаналізовано динаміку зміни інфекційної активності обох штамів після зберігання за вказаних температур протягом 1-го, 3-х, 6-ти, 12-ти місяців.

Зауважень до розділу немає.

**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».** Розділ викладено на 20 сторінках та складається із двох підрозділів. У цьому розділі представлено результати порівняльного дослідження впливу складу захисних середовищ, температурних режимів та термінів зберігання на збереженість штамів вірусу сказу після довгострокового зберігання (термін спостереження 2 роки). Кріопротекторні речовини, які увійшли до складу захисних середовищ, було підібрано на основі результатів, представлених у розділі 3. У підрозділі 4.1 представлено та проаналізовано динаміку зміни інфекційної активності штаму вірусу CVS після зберігання за температур  $37$ ,  $5$ ,  $-20$ ,  $-80$ ,  $-196^{\circ}\text{C}$ . У підрозділі 4.2 наведено результати аналогічних досліджень із штамом вірусу L. Pasteur.

Зауважень до розділу немає.

**Розділ 5 «Ліофілізація штаму вірусу L. Pasteur та його подальше зберігання за різних температур».** Розділ викладено на 12 сторінках. У розділі наведено результати дослідження збереженості інфекційної активності штаму вірусу L. Pasteur та технологічних характеристик його ліофілізатів після ліофілізації у різних захисних середовищах та зберігання протягом 2-х років за температур  $5$ ,  $-20$ ,  $-80^{\circ}\text{C}$ .

Зауважень до розділу немає.



**Розділ «Узагальнення та обговорення результатів».** Розділ викладено на 8 сторінках. В розділі авторкою стисло наведені результати, отримані під час виконання роботи, та проаналізовано найбільш вірогідні механізми кріопшкоджень вірусу сказу під час заморожування і зберігання за різних температур та механізми захисної дії різних кріопротекторів відносно вірусу сказу. Такий же аналіз проведено і з результатами, отриманими під час ліофілізації вірусу. Розділ написано логічно. Аналіз власних результатів дослідження співставляється з даними інших дослідників та концепціями кріопшкоджень та кріозахисту клітин.

Зауваження до розділу:

Початок розділу містить інформацію, зайву для розділу, фрагменти вступу та підрозділів 1.1, 1.5, 1.7.

**Висновків** п'ять. Усі висновки відповідають завданням дослідження та відображають основний зміст дисертації.

Зауважень немає.

**Список використаних джерел літератури** складається з 249 найменувань сучасних та класичних літературних джерел вітчизняних та іноземних авторів (з них 35 – кирилицею і 214 – латиницею).

Згідно існуючих вимог у додатках дисертації розміщено список опублікованих праць, у яких викладено основні результати дисертації та які засвідчують апробацію її матеріалів (додатки А та Б), та акти впровадження результатів дисертаційної роботи (додаток В).

**Повнота викладу результатів в опублікованих працях і авторефераті.**

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. В опублікованих роботах представлено всі результати, отримані дисертантом в процесі дослідження.

Автореферат у достатньому обсязі відображає зміст та результати дисертаційної роботи, є ідентичним до основних положень дисертації та оформлений згідно існуючих вимог МОН України.

Дисертаційна робота В. В. Варяниці має незначні стилістичні й технічні похибки, надмірну деталізацію у розділі 1 «Огляд літератури», але ці недоліки не знижують наукову цінність і практичне значення дисертації.

Отримані Вікторією Валеріївною Варяницею результати мають як теоретичну, так і практичну значимість. Положення дисертаційної роботи мають елементи світової новизни і розширюють існуючі концепції про механізми кріопошкоджень і кріозахисту біологічних об'єктів відносно вірусів із складною будовою віріонів.

Представлена дисертаційна робота вирішує сучасну наукову проблему, яка спрямована на визначення ефективних умов довгострокового зберігання промислових штамів вірусу сказу в технологічних процесах виробництва антирабічних препаратів.

*У порядку дискусії прошу Вас відповісти на наступні запитання:*

1. Які елементи ультраструктури віріонів вірусу сказу Ви вважаєте «мішенями» для пошкоджувальних факторів під час заморожування-відтавання?
2. Із чим Ви пов'язуєте інактивуючу дію на вірус сказу пептону під час заморожування і зберігання за температур  $-20, -80^{\circ}\text{C}$ ?
3. Мальтоза не входила у перелік кріозахисних речовин, захисну дію яких вивчали у третьому розділі досліджень. Чому Ви включили її у склад середовищ консервування, представлених у четвертому розділі досліджень?
4. Чим Ви можете пояснити різницю в кріорезистентності штамів вірусу сказу CVS та L. Pasteur?



## Висновок

Дисертаційна робота Варяниці Вікторії Валеріївни «Збереженість промислових штамів вірусу сказу при низьких температурах» є завершеним науковим дослідженням і за актуальністю, науковою новизною отриманих результатів та практичним значенням відповідає вимогам п. 11 «Порядку присудження наукових ступенів», затвердженого постановою Кабінету Міністрів України від 24.07.2013 № 567 (зі змінами, внесеними згідно з постановами Кабінету Міністрів України № 656 від 19.08.2015, № 1159 від 30.12.2015, № 567 від 27.07.2016 р.) та наказу МОН України № 40 від 12.01.2017 р. «Про затвердження Вимог до оформлення дисертацій» щодо дисертацій на здобуття наукового ступеня кандидата біологічних наук, а її авторка заслуговує наукового ступеня кандидата біологічних наук за спеціальністю 03.00.19 – кріобіологія.

Офіційний опонент:

завідувач кафедри хімії та біохімії  
імені професора О.В. Чечоткіна  
Харківської державної  
зооветеринарної академії МОН України  
доктор біологічних наук, професор



Жегунов Г.Ф.

*Лірикс Мешкова Г.Ф.*  
*завідувач:*  
*Качальник*  
*відділу кадрів*



Вхід. № 3  
05.04.2021 р.