

## **ВІДГУК ОФІЦІЙНОГО ОПОНЕНТА**

**на дисертаційну роботу Похоленко Яніни Олександрівни за темою «КОНСТРУЮВАННЯ МОДЕЛЬНОЇ ДНК-ВАКЦИНИ ТА ШЛЯХИ ПОСИЛЕННЯ ЇЇ ІМУНОГЕННИХ ВЛАСТИВОСТЕЙ», подану на здобуття наукового ступеня кандидата біологічних наук за спеціальністю 03.00.22- молекулярна генетика**

### **Актуальність теми.**

Відомо, що інфекційні захворювання посідають одне з провідних місць у структурі смертності в світі. Особливо їх вклад зріс останнім часом з виникненням нових, та поверненням чи зміною географічного ареалу поширення вже відомих інфекційних захворювань. Так поява у 2019 році нового коронавірусу SARS-Cov-2 призвела до пандемії гострого респіраторного захворювання, названого Covid-19. За даними Всесвітньої організації охорони здоров'я (ВООЗ) станом на 15 жовтня 2021 року у світі на Covid-19 захворіло вже більше 239 мільйонів людей, та було зареєстровано 4,8 мільйонів смертей. На сьогоднішній день вакцинація є одним з найбільш дієвих засобів профілактики інфекційних захворювань. Зважаючи на важкі соціальні та економічні наслідки появи нових інфекційних захворювань надзвичайно актуально постала проблема розробки підходів, які б дозволяли у короткий термін створювати ефективні та безпечні вакцинні препарати.

Одним з перспективних напрямків у сучасній вакцинології є створення вакцин на базі нуклеїнових кислот, а саме ДНК- та РНК-вакцин. Не дивлячись на те, що принципова можливість індукції імунної відповіді шляхом введення в організм плазмідного вектору, що містить ген протективного антигену у складі евкаріотичної експресійної касети, була продемонстрована ще у 1993 році, нині зареєстровано тільки один вакцинний препарат для застосування у людей, та декілька- для застосування у ветеринарії. Це пов'язано насамперед з тим, що ефективність експериментальних ДНК-вакцин при введенні великим тваринам і людині була нижчою, ніж очікувалось. Саме тому вкрай актуальним є пошук шляхів посилення імуногенності кандидатних ДНК-вакцин, чому й присвячене виконане дисертантом дослідження.

**Зв'язок теми дисертації з державними чи галузевими науковими програмами.** Роботу виконано в рамках бюджетних науково-дослідних проектів відділу регуляторних механізмів клітини Інституту молекулярної біології та генетики НАН України.

**Структура та обсяг дисертації.** Дисертація побудована за загальноприйнятою схемою, складається із вступу, 4 розділів, у яких викладено огляд літератури, матеріали та методи, результати експериментальних досліджень, аналіз та узагальнення результатів, висновків, списку використаних джерел та додатків. Дисертацію викладено на 158

сторінках машинописного тексту. Робота містить 31 рисунок, 3 таблиці та 5 додатків. Список використаних джерел охоплює 204 найменувань, серед них англомовних- 195.

**Повнота викладу матеріалів дисертації в опублікованих працях та авторефераті.** Основні положення і висновки дисертаційної роботи повністю викладено в опублікованих працях здобувача, що налічують 11 наукових праць, з них 5 статей у фахових журналах та 6 тез доповідей. Автореферат адекватно і в повній мірі передає зміст роботи.

Представлений у Розділі 1 літературний огляд демонструє належний рівень теоретичної підготовки автора та відображає сучасні досягнення в галузі розробки ДНК-вакцин і наявні відомості про механізми генерації імунної відповіді та шляхи посилення імуногенності цих препаратів. Крім того, автором висвітлено сучасний розробок зі створення маркованої вакцини проти класичної чуми свиней- інфекційного захворювання, внесеного до переліку особливо небезпечних захворювань Всесвітньою організацією охорони здоров'я тварин, яке було обрано як модельне захворювання в рамках виконаного дисертантом дослідження.

У Розділі 2 «Матеріали та методи» дисертант наводить вичерпний опис усіх методів, застосованих при проведенні дослідження. Для проведення дослідження автором використано широкий спектр класичних та сучасних методів: методи генетичної інженерії (виділення та аналіз плазмідної ДНК, конструювання рекомбінантних плазмідних ДНК, гель-електрофорез ДНК, полімеразна ланцюгова реакція), генетичні (генетична трансформація клітин *E.coli* та трансфекція культивованих клітин ссавців), мікробіологічні (культивування штамів *E.coli*), молекулярно-біологічні (експресія та очищення рекомбінантних білків, гель-електрофорез білків, проточна цитофлуориметрія, лазерна конфокальна скануюча мікроскопія), імунохімічні (імуноцито- та імуногістохімічний аналіз, Вестерн-блот аналіз, непрямий твердофазний імуноферментний аналіз).

Робота Похоленко Я.О. мала на меті створення плазмідних конструкцій, які містять химерний ген E2 глікопротеїну вірусу класичної чуми свиней, дослідження їх імуногенності та впливу на показники гуморальної імунної відповіді конструкцій з генами інтерлейкіну-2 та інтерлейкіну-12 або рекомбінантного фрагменту E2 вірусу класичної чуми свиней (ВКЧС) при їх введенні до складу створеної модельної ДНК-вакцини. Отримані в ході роботи результати викладені у Розділі 3. У результаті проведених автором досліджень було створено рекомбінантні конструкції pTR-ВКneo<sup>+</sup>, pBS-ВК, які містять химерний ген E2 глікопротеїну вірусу класичної чуми свиней у складі евкаріотичної експресійної касети. Автором було досліджено вплив введення до складу рекомбінантного плазмідного вектору послідовностей інвертованих термінальних повторів адено-асоційованого вірусу-2 (ITR AAV-2) на особливості експресії химерного антигену на основі E2 глікопротеїну

ВКЧС. Отримані результати дозволили зробити висновок про те, що в транзиторній системі експресії ця модифікація плазмідного вектору призводить до збільшення накопичення химерного антигену на основі E2 глікопротеїну ВКЧС в трансфікованих клітинах лінії НЕК293. Отримані автором дані корелюють із раніше опублікованими відомостями про вплив ITR AAV-2 на експресію генів інших цільових антигенів, проте векторні молекули у цих роботах мали значні структурні відмінності, зокрема містили сайти внутрішньої посадки рибосом, тощо.

Наступна частина роботи була присвячена вивченню здатності створених плазмідних векторів індукувати синтез специфічних до модельного антигену антитіл у мишей. Автором було встановлено, що введення послідовностей інвертованих термінальних повторів адено-асоційованого вірусу-2 призводить до збільшення як інтенсивності, так і тривалості гуморальної імунної відповіді на імунізацію. А отже ці послідовності можна розглядати як перспективні конструкційні елементи, які здатні сприяти посиленню імуногенності рекомбінантних векторних молекул, які використовуються для створення ДНК-вакцин. Також автором було встановлено, що імуногенність модельної ДНК-вакцини може бути посилена завдяки введенню генів інтерлейкіну-2 та інтерлейкіну-12 миші у складі рекомбінантних конструкцій, а також завдяки бустерній імунізації фрагментом рекомбінантного білка E2.

Розділі 4 «Аналіз та узагальнення результатів» автором обговорено і систематизовано великий обсяг отриманого фактичного матеріалу, узагальнено наведену інформацію, проаналізовано переваги підходів, застосованих до посилення імуногенності створених рекомбінантних конструкцій. Варто зазначити, що автор розглядає гетерологічну бустерну вакцинацію рекомбінантним білком, як найбільш перспективний підхід для посилення імуногенності модельної ДНК-вакцини проти КЧС.

#### **Наукова новизна та теоретичне значення дослідження.**

Підсумовуючи сказане вище можна стверджувати, що наукова і теоретична цінність роботи Похолоenko Я.О. полягає в отриманні низки фундаментальних даних щодо шляхів посилення імуногенності модельної ДНК-вакцини, яка містить SacI-EcoRI фрагмент гену E2 глікопротеїну вірусу класичної чуми свиней. Автором було показано, що введення до складу рекомбінантного вектору послідовностей інвертованих термінальних повторів адено-асоційованого вірусу-2 людини призводить до збільшення накопичення химерного антигену на основі E2 ВКЧС в трансфікованих клітинах лінії НЕК293. Отримані автором дані свідчать про те, що введення до складу векторної конструкції модельної маркованої ДНК-вакцини проти КЧС послідовностей ITR AAV-2 призводить до збільшення як інтенсивності, так і тривалості гуморальної імунної відповіді на імунізацію. Крім того, автором було вперше встановлено, що бустерна імунізація рекомбінантним

фрагментом E2 білка ВКЧС посилює синтез специфічних до химерного антигену антитіл, індукований імунізацією створеною модельною ДНК-вакциною.

### **Практичне значення одержаних результатів.**

Отримані здобувачем дані можуть стати підґрунтям як для створення маркованої ДНК-вакцини проти класичної чуми свиней, так і стати платформою для розробки вакцинних препаратів для профілактики інших інфекційних захворювань. Таким чином, наведені у дисертації результати і висновки знайдуть застосування не тільки в наукових дослідженнях спрямованих на пошук шляхів посилення імуногенних властивостей ДНК-вакцин, а й у практичних розробках зі створення нових вакцин.

**Ступінь обґрунтованості та достовірності положень, висновків та рекомендацій, сформульованих у дисертації.** Результати, отримані автором опрацьовані та обговорені з урахуванням даних сучасної літератури. **Бібліографічний список складається з 204 літературних джерел, більшість з яких опубліковано в останні десять років.** На достовірність отриманих результатів вказує використання **сучасних методів дослідження.** Виклад матеріалу відповідає поставленій меті та завданням дисертаційної роботи. Висновки, зроблені здобувачем, аргументовані та логічно узагальнити отримані результати. Тому **достовірність положень та висновків, сформульованих у дисертації, не викликає сумніву.**

Загалом, дисертаційна робота Похоленко Я.О. імпонує опоненту, але текст дисертації містить деякі технічні помилки, досить часто зустрічається сленг та прямий переклад термінів з англійської мови. Однак, технічні помилки та невдалі вирази не зменшують наукової цінності та актуальності роботи Похоленко Я.О.. Крім того, в ході аналізу представленої дисертаційної роботи виникло наступне запитання:

1. Яким на вашу думку є механізм посилення експресії трансгену, яке ви спостерігаєте при введенні послідовностей інвертованих термінальних повторів адено-асоційованого вірусу-2 у рекомбінантний плазмідний вектор?

Незважаючи на наведені зауваження, загальна оцінка роботи є позитивною: в цілому дисертація демонструє належний рівень кваліфікації автора- володіння сучасними молекулярно-генетичними, молекулярно-біологічними та імунохімічними методами, здатності аналізувати свої результати та узагальнювати їх.

**Висновок про відповідність дисертації встановленим вимогам, які висуваються для отримання наукового ступеня кандидата біологічних наук.** На основі проведеного аналізу дисертаційної роботи Похоленко Я.О. «Конструювання модельної ДНК-вакцини та шляхи посилення її імуногенних

властивостей», опублікованих праць, із урахуванням актуальності, новизни, наукової та практичної цінності розв'язуваної проблеми, обґрунтування сформульованих наукових висновків та достовірності отриманих результатів, вважаю, що рецензована дисертаційна робота цілком відповідає вимогам п.п. 9, 11, 12, 12 «Порядку присудження наукових ступенів», затвердженого постановою Кабінету Міністрів України №567 від 24.07.2013 р. (зі змінами, внесеними згідно з Постановами Кабінету Міністрів України №656 від 19.08.2015 р., №1159 від 30.12.2015 р. , № 567 від 27.07.2016 р., №943 від 20.11.2019 р.), що висуваються до кандидатських дисертацій, а її автор-Похоленко Яніна Олександрівна- заслуговує на присудження наукового ступеня кандидата біологічних наук за спеціальністю 03.00.22- молекулярна генетика.

**Офіційний опонент,**

головний науковий співробітник  
відділу генетичної діагностики  
ДУ «Інститут генетичної та  
регенеративної медицини НАМН  
України»,  
доктор біологічних наук

Н.В. Ольхович

