

ВІДГУК ОФІЦІЙНОГО ОПОНЕНТА
про науково-практичну цінність дисертаційної роботи
ПОХОЛЕНКО ЯНІНИ ОЛЕКСАНДРІВНИ
« Конструювання модельної ДНК-вакцини та шляхи посилення її
імуногенних властивостей»,
представлену на здобуття вченого ступеня кандидата біологічних наук за
спеціальністю 03.00.22 – молекулярна генетика

Актуальність проведених досліджень

Створення нових типів вакцин проти збудників хвороб людини і тварин є важливим практичним завданням сучасної біології, яке набуло особливого значення за умов пандемії Ковід-19. Розробка ДНК-вакцин є одним із сучасних напрямків таких досліджень, який надає певні переваги порівняно із класичними білковими, рекомбінантними та векторними вакцинами. Обрана мішень – вірус класичної чуми свиней (ВКЧС) – є, з одного боку, вдалою моделлю, а з іншого – збудником захворювання, яке завдає значної шкоди в сільському господарстві і потребує засобів ефективного імунного захисту. Тому напрямок досліджень Я.О.Похоленко є вкрай актуальним.

Наукова новизна отриманих результатів, їх теоретичне та практичне значення

В процесі виконання роботи автором було одержано ряд нових даних стосовно складу, імуногенності та застосування ДНК-вакцини проти ВКЧС. Дослідження включало потужну молекулярно-генетичну компоненту - створення векторів експресії, які містять химерний ген E2 глікопротеїну вірусу класичної чуми свиней під контролем різних регуляторних послідовностей, та конструкції з генами інтерлейкіну-2 та інтерлейкіну-12 миші у складі еукаріотичних експресійних векторів; дослідження експресійних можливостей створених рекомбінантних конструкцій в системі

in vitro та *in vivo*; та імунологічну компоненту - дослідження гуморальної імунної відповіді, яка індукується внаслідок імунізації мишей створеними рекомбінантними конструкціями. Вперше запропоновано використати SacI-EcoRI фрагмент гену E2 глікопротеїну ВКЧС для розробки модельної маркованої ДНК-вакцини та створено відповідні рекомбінантні конструкції-прототипи. Вперше у транзиторній системі експресії показано, що введення до складу рекомбінатного вектору послідовностей інвертованих термінальних повторів (ITR) адено-асоційованого вірусу-2 людини (AAV-2) призводить до збільшення накопичення химерного антигену в трансфікованих клітинах лінії HEK293 і, відповідно, до збільшення інтенсивності і тривалості гуморальної імунної відповіді на цей антиген. Встановлено, що як бустерна імунізація рекомбінантним фрагментом E2 ВКЧС так і комбіноване введення модельної ДНК-вакцини та генів інтерлейкіну-2 та інтерлейкіну-12 миші у складі створених рекомбінантних конструкцій посилює гуморальну імунну відповідь. Результати цих досліджень розширюють уявлення щодо ефективності ДНК-вакцин і є основою для створення реальної вакцини проти класичної чуми свиней.

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

Дисертація виконана в рамках наукових проектів відділу регуляторних механізмів клітини Інституту молекулярної біології і генетики НАН України: «Вивчення на модельних об'єктах очікуваних терапевтичних ефектів, обумовлених введенням рекомбінантних молекул», (реєстраційний номер 0103V000075, 2002-2007 рр); «Перетворювальний потенціал нативних та модифікованих стовбурових клітин і його реалізація *in vitro* і *in vivo*» (реєстраційний номер 0112U007302, 2008-2012 рр.) та «Вивчення сигнальних міжклітинних взаємодій в культурі та організмі мишей»

(реєстраційний номер 0112U004218, 2013-2017 рр.).

Структура та обсяг дисертації, оцінка її завершеності та відповідності встановленим вимогам.

Дисертаційна робота Похолєнко Я.О. оформлена за загальноприйнятою формою у відповідності до вимог МОН України. Вона складається із вступу, огляду літератури, розділів про 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.

Огляд літератури складається із двох підрозділів, що містять сучасні дані про ДНК-вакцини та характеризують вірус класичної чуми свиней, обраний в якості мішені для створення вакцини. Таким чином, огляд літератури надає теоретичне підґрунтя для експериментальної частини.

Роботу виконано на достойному методичному рівні з використанням методів молекулярної біології (створення рекомбінантних плазмідних конструкцій, експресія їх в еукаріотичних клітинах і бактеріях, очищення рекомбінантних білків, трансфекції клітин *in vitro*, ПЦР), біохімії та клітинної біології (вестерн-блотинг, сорбційний імуноферментний аналіз, імуногістохімія), імунології (імунізації, оцінка рівнів антитіл).

В результаті проведеної роботи створено рекомбінантні конструкції, які містять химерний ген E2 глікопротеїну вірусу класичної чуми свиней у складі еукаріотичної експресійної касети. Показано, що створені рекомбінантні конструкції здатні індукувати продукцію специфічних до химерного антигену антитіл у мишей. Встановлено, що цей ефект може бути посилено завдяки введенню генів інтерлейкіну-2 та інтерлейкіну-12

миші у складі рекомбінантних конструкцій, а також завдяки бустерній імунізації фрагментом рекомбінантного білка E2.

В обговоренні проведено ретельний аналіз отриманих результатів у порівнянні з відомими літературними даними, що демонструє ґрунтовну обізнаність автора із визначеною проблемою.

Основні положення роботи опубліковані у 11 наукових працях, з них 5 статей у наукових фахових виданнях України та 6 тез доповідей у матеріалах наукових конференцій.

Запитання і зауваження.

Головне запитання: Як автор уявляє собі механізм розвитку імунної відповіді на введену ДНК вакцину? Для індукції гуморальної імунної відповіді антиген має бути представлений спеціалізованими антиген-презентувальними клітинами. ДНК, введена внутрішньом'язово, індукує синтез відповідного антигену в міоцитах, які можуть представити антиген тільки у комплексі з МНСІ, тобто стати мішенню для цитотоксичних Т-лімфоцитів. Можна уявити, що синтезований в міоцитах антиген секретується або потрапляє в позаклітинне середовище в результаті руйнування міоциту і захоплюється, наприклад, клітинами Лангерганса шкіри, які транспортують його до лімфовузла, де, власне, і відбувається активація Т- і В-лімфоцитів для продукції антитіл. Тоді незрозуміло, як синтезовані в міоцитах же ІЛ-2 і ІЛ-12 впливають на Т-лімфоцити, яких там немає. Мені видається найбільш вірогідним, що введена внутрішньом'язово ДНК якимось чином (з током крові?) транспортується до лімфатичного вузла і експресується там в достатній кількості для індукції імунної відповіді. Було б доцільно перевірити наявність відповідної РНК або білка в найближчих до місця введення ДНК лімфовузлах. Чи є у автора власні або літературні дані щодо того, чи розноситься введена ДНК в інші органи чи тканини?

Окремі запитання

1. Які, з точки зору автора, переваги ДНК-вакцин порівняно з РНК-вакцинами?
2. Яким чином інвертовані термінальні повтори адено-асоційованого вірусу можуть посилювати експресію введеного гену?
3. Чим керувались автори, використовуючи 14-денний інтервал між імунізаціями?
4. Чи плануєте Ви «доклінічні» випробування Вашої ДНК вакцини на свинях?

Головне зауваження: слабкий рівень публікацій. Хороша робота мала бути представлена хоча б в одному міжнародному журналі.

Окремі зауваження

1. Порівняння місць введення ДНК-вакцини: м'язи гомілки і стегна не дуже відрізняються; треба було б порівняти хоча б гомілку і спину.
2. В тексті дисертаційної роботи присутні синтаксичні помилки.
3. На деяких рисунках відсутні «зірочки» статистичної достовірності.
4. В тексті багато скорочень (не завжди розшифрованих, наприклад, ПЕІ), що ускладнює сприйняття.

Висновок

Не зважаючи на вказані зауваження, вважаю, що отримані дисертанткою дані мають суттєву **наукову новизну, фундаментальне і практичне значення. Висновки** відповідають отриманим результатам.

Робота Я.О.Похоленко є завершеною працею, в якій отримані нові науково обґрунтовані результати, що в сукупності вирішують конкретну наукову задачу суттєвого значення для молекулярної генетики і імунології.

За актуальністю проблеми, методичним рівнем, якістю досліджень та публікацій і новизною отриманих результатів робота відповідає вимогам Постанови Кабінету Міністрів України від 24.07.2013 р. № 567 (п. 11) «Порядок присудження наукових ступенів і присвоєння вченого звання старшого наукового співробітника», а її автор заслуговує присудження наукового ступеня кандидата біологічних наук за спеціальністю 03.00.22 молекулярна генетика.

Марина Володимирівна Скок, д.б.н., професор,
академік НАН України,
завідувач лабораторії імунології клітинних рецепторів
Інституту біохімії ім. О.В.Палладіна НАН України

8.12.2021

