

Отзыв

официального оппонента доктора биологических наук Зенковой Марины Аркадьевны на диссертационную работу **Кисакова Дениса Николаевича** «Доставка экспериментальных ДНК- и мРНК-вакцин против COVID-19 с помощью электропорации и струйной инъекции», представленную на соискание ученой степени кандидата биологических наук по специальности 1.5.3. Молекулярная биология и 1.5.10. Вирусология.

Актуальность диссертационной работы

Пандемия COVID-19 выявила острую необходимость разработки вакцин нового поколения, легко адаптируемых к появлению новых или серьезным мутациям у уже известных патогенов. В этом плане ДНК- и мРНК-вакцины, впервые лицензированные и широко апробированные в процессе пандемии COVID-19, представляют собой платформенное решение проблемы получения эффективных вакцин, так как при смене патогена требуется изменение последовательности, кодирующей собственно сам антиген, а факторы, определяющие эффективный процессинг (в случае ДНК-вакцин) или эффективную трансляцию (в случае мРНК – вакцин) не меняются. Именно поэтому платформы на основе нуклеиновых кислот в плане производства быстрее и безопаснее по сравнению с традиционными типами вакцин и более того, перспективны для создания универсальных вакцин, включая полиэпитопные и мозаичные конструкции.

Однако, основным фактором, существенно осложняющим широкое использование ДНК- и мРНК-вакцин, как, впрочем, и любых препаратов на основе нуклеиновых кислот, является создание средств их доставки в организм, которые обеспечили бы их правильную локализацию в организме и биологическую активность (в случае ДНК- и мРНК-вакцин это иммуногенность и отсутствие побочных эффектов). Современные методы доставки нуклеиновых кислот в организм включают надмолекулярные комплексы с поликатионами, катионными липидами, синтетическими носителями или вирусными векторами. Среди них липидные наночастицы уже успешно применяются для *in vivo* введения ДНК- и РНК-вакцин. Тем не менее, поиск новых систем доставки НК-вакцин и путей повышения их эффективности, т.е. экспрессии доставляемых антигенов и индукции иммунного ответа несомненно является актуальными задачами современной науки. Ввиду выказанного актуальность диссертационной работы Кисакова Дениса Николаевича, основной целью которой является выяснение потенциала и оптимизация физических методов доставки ДНК- и мРНК- вакцин не вызывает сомнений.

Научная значимость и новизна работы не вызывает сомнения. В работе проведено изучение возможности практического применения физических методов для доставки ДНК- и мРНК-вакцин, а именно электропорации и безыгольной струйной инъекции. Кисаков оптимизировал протоколы с учетом минимальных повреждений тканей при введении и апробировал их применение на экспериментальных НК-вакцинах. Полученные автором диссертационной работы результаты однозначно свидетельствуют о перспективности использования обоих методов для многократного усиления иммуногенности экспериментальной плазмидной ДНК-вакцины pVAXrbd и метода струйной инъекции для доставки экспериментальной мРНК вакцины мРНК-RBD. **Несомненна и практическая значимость работы.** Уровни гуморального и Т-клеточного

иммунного ответа у животных, получивших мРНК вакцину с помощью струйной инъекции, были сопоставимы с таковыми у животных, которым вводили мРНК-RBD, инкапсулированную в липидные наночастицы. Полученные автором результаты свидетельствуют о том, что струйная инъекция может быть альтернативой ЛНЧ для доставки мРНК-вакцин.

Достоверность представленных в работе результатов не вызывает сомнений, что является следствием использования широкого набора современных молекулярно-биологических и биоинформатических методов исследования, использованием адекватных *in vivo* моделей и тщательной статистической обработкой полученных результатов. Результаты, полученные автором, прошли апробацию на многих российских и международных конференциях, и были опубликованы в ведущих российских и международных журналах, индексируемых в международных базах данных, в том числе и в журналах первого квартиля.

Характеристика диссертации

Диссертационная работа оформлена на 163 странице машинописного текста и состоит из Введения, Обзора литературы, Материалов и методов, Resultados и обсуждений, Выводов, Списка литературы. В тексте работы содержится 37 рисунков и 6 таблиц. Список литературы состоит из 288 библиографических ссылки.

Введение написано в соответствии с требованием ВАК. В нем приводится актуальность проводимого исследования, где обосновывается важность исследования физических методов доставки ДНК- и мРНК-вакцин, сформулирована научная новизна работы, а также теоретическая и практическая значимость исследования. Во введении приведены положения, выносимые на защиту, список конференций, на которых были представлены результаты работы и информация о личном вкладе автора.

Глава 1 представляет собой обзор литературы, состоящий из нескольких разделов. В обзоре рассмотрены кратко вирус SARS-CoV-2 и его жизненный цикл, и вакцины на основе нуклеиновых кислот. Основная часть обзора посвящена системам доставки ДНК- и мРНК-вакцин, причем вирусные и химические методы доставки только упомянуты, а основное внимание автор уделяет рассмотрению физических методов доставки и возможности их оптимизации. Обзор хорошо написан и проиллюстрирован.

В главе 2 «Материалы и методы» автор достаточно детально описывает все используемые штаммы бактерий, вирусов, линий клеток, плазмид, мРНК и др. расходных материалов. Далее описываются методы исследования, при описании которых автор несколько отступает от общепринятых норм и часто вместо четкого лабораторного протокола приводит либо ссылку на инструкцию производителя, либо фактически результаты (см. разделы 2.2.8. или 2.2.14, 2.2 15.).

Глава 3 «Результаты и обсуждение» описывает полученные результаты и включает фактически три основных блока: 1) это разделы посвященные оптимизации протокола электропорации *in vivo* и испытанию полученного протокола для введения ДНК-вакцины pVAXrbd; 2) создание протокола струйной инъекции и 3) испытание протокола струйной инъекции для доставки ДНК-вакцины pVAXrbd и мРНК вакцины мРНК-RBD. Раздел содержит все данные, иллюстрирующие выводы, большинство рисунков и таблиц хорошего качества, результаты статистически обработаны, приведены обсуждение

полученных результатов и сопоставление полученных данных с известными литературными результатами и оценена их новизна.

Замечания

Несмотря на общее положительное впечатление от диссертационной работы Кисакова Д.Н, к работе имеется ряд вопросов, комментариев и замечаний.

1. Представленные результаты по действию ДНК- и мРНК-вакцин, доставленных с помощью струйной инъекции, показывают, что ДНК-вакцины вызывают активацию и гуморального и клеточного иммунитета, тогда как мРНК-вакцины в большей степени активируют клеточный иммунитет. С какими факторами это может быть связано?

2. Вопрос нагрузки/дозы вводимой вакцины является очень важным и часто определяет безопасность и переносимость вакцины. Автор показывает, что в интервале от 50 до 200 мкг ДНК-вакцины на мышь активация иммунной системы происходит примерно на одном уровне. Пытался ли автор диссертационной работы снизить вводимую дозу вакцины? Можно ли соотнести вводимые дозы ДНК- и мРНК-вакцин, использованные в работе с дозами, используемыми при вакцинации пациентов.

3. Доставка мРНК –вакцины методом струйной инъекции показала сравнимые с доставкой с помощью липидных наночастиц (или несколько более низкие) уровни активации гуморального иммунитета. Не проводилось ли сравнение эффективности активации иммунитета при доставке мРНК/ЛНЧ комплексов методом струйной инъекции с обычной инъекцией? Возможна ли доставка мРНК/ЛНЧ комплексов методом струйной инъекции?

4. В таблице 6 приведены данные, показывающие протоколы струйной инъекции. Мне не понятно, почему при увеличении давления и скорости потока возрастает время инъекции одно и того же объема жидкости: с 0,22 до 0,44 сек при давлении в 3 и 10 бар, соответственно.

5. В обзоре литературы автор часто утверждает, что доставка и ДНК, и мРНК – вакцин с помощью различных липосомальных систем не отличается эффективностью. Это не является верным, так как большинство разработанных препаратов и вакцин, и препаратов на основе нуклеиновых кислот доставляют в организм в виде комплексов с ЛНЧ. Это комментарий.

6. К работе есть целый ряд замечаний редакционного и технического характера:

6.1. Микрофотографии гистологических срезов, кроме представленных на рис. 15, имеют очень низкое качество/разрешение, что не позволяет судить о правильности сделанных выводов.

5.2. На рис. 11 очень мелкие подписи, которые не позволяют ничего понять. У ряда рисунков низкое качество, как будто они были вставлены из pdf файлов.

5.3. Большое количество опечаток, несогласованных окончаний, пропущенных слов, как в текст диссертации, так и в автореферате. Примером может служить количество публикаций по теме диссертации: и в автореферате, и в диссертации указано, что их 6, но список включает 5 опубликованных работ.

Заключение

Диссертационная работа Кисакова Дениса Николаевича «Доставка

экспериментальных ДНК- и мРНК-вакцин против COVID-19 с помощью электропорации и струйной инъекции», представленная на соискание ученой степени кандидата биологических наук по специальности 1.5.3. Молекулярная биология и 1.5.10. Вирусология, по поставленным задачам, методам их решения и полученным результатам соответствует паспортам специальностей 1.5.3 – Молекулярная биология и 1.5.10 – Вирусология. Диссертация Кисакова Д.И., представленная на соискание ученой степени кандидата биологических наук, является законченной научно-квалификационной работой, в которой исследован потенциал физических методов доставки экспериментальных ДНК- и РНК-вакцин и доказана перспективность использования электропорации и струйной инъекции для доставки в организм ДНК вакцин и только струйной инъекции в случае доставки мРНК-вакцин. По актуальности, новизне, научной и практической значимости, диссертационная работа Кисакова Д.И. соответствует критериям и требованиям ВАК РФ, предъявляемым к диссертационным работам на соискание ученой степени кандидата наук, согласно п.9 «Положения о присуждении ученых степеней», утвержденного Постановлением Правительства РФ от 24.09.2013 N 842 (ред. от 01.10.2018, с изм. от 26.05.2020) "О порядке присуждения ученых степеней" (в редакции постановлений Правительства Российской Федерации от 30.07.2014 г. N 723; от 21.04.2016 г. N 335; от 02.08.2016 г. N 748; от 29.05.2017 г. N 650; от 28.08.2017 г. N 1024; от 01.10.2018 г. N 1168), а ее автор – Денис Николаевич Кисаков заслуживает присуждения ученой степени кандидата биологических наук по специальности 1.5.3 – молекулярная биология и 1.5.10 – вирусология.

Официальный оппонент:

Доктор биологических наук, профессор, член-корреспондент РАН, д.б.н., профессор, главный научный сотрудник, руководитель лаборатории биохимии нуклеиновых кислот ФГБУН Институт химической биологии и фундаментальной медицины Сибирского отделения РАН



Зенкова Марина Аркадьевна

8 сентября 2025 г.

Подпись д.б.н., член-корр. РАН Зенковой Марины Аркадьевна

Заверяю:

Ученый секретарь ИХБФМ СО РАН

к.б.н.



Е.Б. Логашенко

8 сентября 2025 г.

Федеральное государственное бюджетное учреждение науки Институт химической биологии и фундаментальной медицины Сибирского отделения РАН. 630090, Россия, Новосибирская обл., г. Новосибирск, проспект им. академика Лаврентьева, 8. Телефон +7-383-3635177, E-mail koval@1bio.ru Сайт www.niboch.nsc.ru

Печать