

ОТЗЫВ

официального оппонента доктора биологических наук Васина Андрея Владимировича 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 специальностям 1.5.3. Молекулярная биология и 1.5.10. Вирусология.

АКТУАЛЬНОСТЬ ДИССЕРТАЦИОННОЙ РАБОТЫ

Пандемия COVID-19 стимулировала разработку генетических вакцин на основе ДНК и матричной РНК (мРНК). мРНК-вакцины, в кратчайшие сроки разработанные компаниями Moderna и BioNTech, стали одними из первых в мире зарегистрированных вакцин против этого заболевания. В 2021 г. для профилактики COVID-19 была также одобрена первая ДНК-вакцина ZyCoV-D, разработанная индийской компанией Zydrus Lifesciences Ltd, однако она не нашла широкого применения. мРНК- и ДНК-вакцины способны эффективно стимулировать формирование как гуморального, так и Т-клеточного иммунитета. Производство мРНК- и ДНК-вакцин является универсальным и позволяет нарабатывать вакцины существенно быстрее и безопаснее по сравнению с традиционными типами вакцин, а возможность варьирования антигенной части без необходимости перестройки производственного процесса позволяет оперативно адаптировать препараты к новым патогенам. Кроме того, платформы на основе нуклеиновых кислот (НК) открывают новые возможности для создания универсальных вакцин на основе полиэпитопных и мозаичных антигенных конструкций.

Одним из основных факторов, долгое время ограничивающих создание и вывод в гражданский оборот вакцин на основе НК, была их низкая иммуногенность, вызванная, в первую очередь, низкой эффективностью проникновения НК в клетку без использования специальных систем доставки. В качестве носителей для доставки НК могут быть использованы различные надмолекулярные комплексы с поликатионами, катионными липидами, синтетическими носителями или вирусными векторами. В вакцинах против COVID-19 были успешно использованы липидные наночастицы, показавшие свою эффективность для доставки НК *in vivo*. Однако инъекция липидных наночастиц с НК имеет ряд недостатков, связанных с необходимостью формирования и хранения таких комплексов при низких температурах, а также реакцией организма на липидные компоненты вакцин. По этой причине поиск новых систем доставки НК-вакцин, повышающих их эффективность и снижающих реактогенность, остается актуальной задачей современной биомедицины. Поскольку молекулы ДНК и мРНК плохо проникают через отрицательно заряженную клеточную мембрану, для доставки таких полианионов можно использовать не только носители, но и физические методы дестабилизации мембран, такие как электропорация, ультразвуковое и гидравлическое ударное воздействия. К последнему можно отнести использование высокоскоростной инъекции наночастиц с НК и струйную инъекцию.

Таким образом, диссертационная работа Кисакова Дениса Николаевича, посвященная применению методов электропорации и струйной инъекции для доставки вакцинных ДНК и мРНК, безусловно, является современной и актуальной.

НАУЧНАЯ И ПРАКТИЧЕСКАЯ ЗНАЧИМОСТЬ, ОБОСНОВАННОСТЬ И ДОСТОВЕРНОСТЬ ВЫНОСИМЫХ НА ЗАЩИТУ ПОЛОЖЕНИЙ, НОВИЗНА ИССЛЕДОВАНИЯ.

В работе Кисакова Дениса Николаевича проведено изучение возможности применения физических методов для доставки ДНК- и мРНК-вакцин *in vivo*. Несмотря на то, что данные методы известны и ранее были описаны в литературе, их практическое использование для создания вакцин на основе НК мало изучено, что определяет значимость и новизну исследования. Следует особо отметить научную новизну и практическую значимость полученных результатов по струйной инъекции вакцинных мРНК. В силу актуальности на момент начала исследования основным объектом был выбран коронавирус SARS-CoV-2, на основе рецептор-связывающего домена (RBD) S белка которого были созданы экспериментальные вакцинные препараты на основе ДНК и мРНК.

Кисаковым Денисом Николаевичем был разработан протокол электропорации (ЭП) области четырёхглавой мышцы мышцей линии BALB/c. Этот протокол был использован для оценки иммуногенности экспериментальной ДНК-вакцины pVAXrbd, кодирующей RBD S белка SARS-CoV-2. Полученные результаты продемонстрировали значимое повышение уровня формирования специфического гуморального иммунного ответа, которое проявлялось в увеличении среднего титра RBD-специфических и вирус-нейтрализующих антител по сравнению со стандартным внутримышечным введением ДНК-вакцины. Аналогичные результаты были также выявлены в отношении Т-клеточного ответа. При этом используемый метод ЭП оказался неэффективным для мРНК вакцины.

Вторым используемым для доставки НК подходом был метод безыгольной струйной инъекции (СИ). Как и в случае ЭП экспериментально были определены оптимальные параметры СИ в область четырёхглавой мышцы мышцей линии BALB/c. Разработанный протокол СИ был применен для иммунизации животных экспериментальным препаратом pVAXrbd с последующей оценкой иммунного ответа, а также защитного эффекта вакцинации на животной модели инфекции COVID-19, который выражался в снижении вирусной нагрузки в тканях лёгких иммунизированных мышцей по сравнению с контрольными животными. Метод СИ показал свою эффективность и в случае мРНК вакцины. Уровни гуморального и Т-клеточного иммунного ответа у мышцей, иммунизированных мРНК с помощью СИ, были сопоставимы с таковыми у животных, которым вводили мРНК-RBD, инкапсулированную в липидные наночастицы. Полученные результаты свидетельствуют о том, что струйная инъекция может быть безопасной и эффективной альтернативой липидным наночастицам для доставки мРНК-вакцин.

Достоверность представленных в работе результатов не вызывает сомнений, что определяется адекватным выбором современных молекулярно-биологических и вирусологических методов, а также примененных статистических критериев оценки. Результаты, полученные автором, были представлены на российских и международных конференциях. Публикации по теме исследования опубликованы в 5 журналах списка ВАК, в том числе в международных рецензируемых журналах первого квартала.

СТРУКТУРА И ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА ДИССЕРТАЦИОННОЙ РАБОТЫ

Диссертационная работа оформлена на 163 страницах машинописного текста и состоит из следующих разделов: «Список используемых сокращений», «Введение», «Обзора литературы», «Материалы и методы», «Результаты и обсуждение», «Заключение», «Выводы» и «Список цитированной литературы». В тексте работы содержится 34 рисунка и 6 таблиц. Список литературы состоит из 288 библиографических источников.

Введение написано в соответствии с требованием ВАК. В нем приводится актуальность проводимого исследования, где обосновывается важность изучения физических методов доставки ДНК- и мРНК-вакцин. Во введении также представлены данные о научной новизне работы, теоретической и практической значимости исследования. Сформулированы положения, выносимые на защиту, а также представлены список конференций, на которых были апробированы результаты работы, и информация о личном вкладе автора.

В главе «Обзор литературы» представлена краткая информация о структуре генома и жизненном цикле SARS-CoV-2 и типах вакцин на основе НК, а также подробно описаны различные системы доставки НК. Обзор литературы хорошо иллюстрирован схемами и рисунками и дает полное представление о теме исследования.

В главе «Материалы и методы» автор детально описывает все используемые в работе вирусные и бактериальные штаммы, культуры клеток, плазмиды, молекулы мРНК. Далее приводятся методы получения генно-инженерных конструкций, методы трансформации бактериальных и эукариотических клеток, методы получения мРНК, вирусологические методы, а также методы оценки иммуногенности и протективности мРНК и ДНК препаратов *in vivo*. Все методы, в том числе статистические, являются современными и адекватными поставленным задачам.

В главе «Результаты и обсуждение» представлены экспериментальные результаты исследования и проведено обсуждение их новизны и перспектив использования по известным литературным данным.

В разделе 3.1 подробно описаны схемы получения используемых молекул ДНК и мРНК, кодирующих GFP и RBD S-белка SARS-CoV-2, а также проведена их характеристика.

В разделах 3.2. и 3.4 описаны процедуры разработки и оптимизации протоколов, соответственно, электропорации и струйной инъекции ДНК и мРНК на лабораторных животных.

В разделе 3.3 представлены результаты экспериментальной проверки метода электропорации для введения плазмиды pVAXrbd на мышах, показана его большая эффективность по сравнению с традиционным внутримышечным введением.

Аналогичные данные были получены и для доставки плазмиды pVAXrbd методом струйной инъекции, что описано в разделе 3.5.

Наконец, в разделе 3.6 представлены результаты испытания протокола струйной инъекции для введения мРНК-RBD, показано, что используемый метод по эффективности не уступает методу доставки вакцинной мРНК на основе липидных наночастиц.

В разделе «Заключение» автором обобщены полученные результаты и кратко обсуждаются перспективы дальнейшего развития физических методов доставки вакцин на основе мРНК и ДНК. Переход к выводам логически обоснован. Полученные в диссертационном исследовании результаты подтверждают принципиальную возможность использования выбранных подходов для введения препаратов вакцинных мРНК и ДНК.

Положения, выносимые на защиту, и выводы полностью соответствуют поставленным задачам и полученным данным. Автореферат соответствует содержанию и выводам диссертации, оформлен в традиционном стиле и соответствует установленным требованиям Диссертационного совета.

ЗАМЕЧАНИЯ

Принципиальных вопросов к работе нет. Все полученные научные результаты представляются оригинальными, достоверными и актуальными. Однако при ознакомлении с текстом диссертации возникло несколько замечаний:

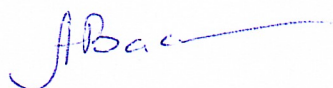
1. Основная цель работы заключалась в исследовании потенциала физических методов доставки экспериментальных ДНК- и мРНК-вакцин методами электропорации и струйной инъекции в организм лабораторных животных. Однако, в работе исследовали только вакцинные мРНК и ДНК против SARS-CoV-2. Насколько корректно говорить о ДНК- и мРНК-вакцинах в целом? Можно ли полученные данные экстраполировать и на другие инфекции?
2. В тексте диссертации для изучаемых молекул плазмидной ДНК и мРНК часто используется термин «вакцина». Насколько корректно использовать такой термин, так как фармацевтической разработки ДНК и мРНК вакцин не проводилось?
3. На рис. 14С нет оценки статистической значимости различий между столбцами. Почему на этом рисунке методом ИФА со специфическими антителами к RBD выявляется GFP в культуральной среде (столбец 4)?
4. Почему при испытании протокола электропорации для введения pVAXrbd, использовали внутримышечное введение при первой вакцинации в обеих группах экспериментальных групп?
5. Использовались ли в работе мРНК с модифицированными нуклеотидами или без них? Если да, то с какими?
6. Используемая животная модель не является общепринятой для оценки протективности вакцин против COVID-19. Автор об этом упоминает в тексте, однако считаю необходимым этот вопрос четко сформулировать и описать все ограничения данной модели.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Диссертационная работа Кисакова Дениса Николаевича «Доставка экспериментальных ДНК- и мРНК-вакцин против COVID-19 с помощью электропорации и струйной инъекции» соответствует паспорту специальности 1.5.3 – молекулярная биология и 1.5.10 - вирусология. Диссертация, представленная на соискание ученой степени кандидата биологических наук, является научно-квалификационной работой, обладающей научной новизной, и, несомненно, имеет перспективы практического использования полученных результатов. Работа соответствует требованиям «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), предъявляемым к диссертациям на соискание ученой степени кандидата наук, а ее автор – Денис Николаевич Кисаков – может претендовать на присуждение ученой степени кандидата биологических наук по специальности 1.5.3 – молекулярная биология и 1.5.10 – вирусология.

Официальный оппонент:

Доктор биологических наук, доцент, профессор РАН, директор Института биомедицинских систем и биотехнологий Федерального государственного автономного образовательного учреждения высшего образования «Санкт-Петербургский политехнический университет Петра Великого»



Васин Андрей Владимирович

Дата: 08 сентября 2025 г

Контактные данные:

vasin_av@spbstu.ru, +7 (962) 715-95-15

Адрес места работы:

195251, Россия, г. Санкт-Петербург, Политехническая улица, 29

Федеральное государственное автономное образовательное учреждение высшего образования «Санкт-Петербургский политехнический университет Петра Великого», Институт биомедицинских систем и биотехнологий.

Тел.: +7(812)290-95-00; e-mail: ibsib@spbstu.ru

Подпись сотрудника Института биомедицинских систем и биотехнологий ФГАОУ ВО «Санкт-Петербургского политехнического университета Петра Великого» доктора биологических наук, доцента, профессора РАН Васина Андрея Владимировича удостоверяю:

