

ОТЗЫВ

официального оппонента к. б. н. Куликовой Нины Георгиевны на диссертацию Калинина Егора Валерьевича «Биомедицинский потенциал фактора патогенности *Listeria monocytogenes* InlB», представленную на соискание степени кандидата биологических наук по специальностям 1.5.11. микробиология (биологические науки), 1.5.6. биотехнология (биологические науки)

Актуальность темы исследования

Пищевой патоген *Listeria monocytogenes* представляет значительный риск для общественного здравоохранения, так как вызываемое этой бактерией заболевание листериоз характеризуется высокой степенью смертности (до 30%) для людей из групп риска (иммунокомпрессивные, пожилые люди и беременные женщины). В этой связи выявление *L. monocytogenes* в продуктах питания является важной задачей контроля качества пищевых продуктов. Золотым стандартом для детекции *L. monocytogenes* в образцах пищевых продуктов и окружающей среды является использование селективных питательных сред. Однако стандартная процедура выявления листерий, включающая использование сред предобогащения, селективных сред и последующей идентификации выросших колоний, является время- и трудозатратной. Современные методы обнаружения, например, ПЦР и MALDI-TOF, которые обеспечивают наилучшие результаты для дифференциации *Listeria* spp., являются дорогостоящими и требуют специализированного оборудования и специальных технических знаний.

К роду *Listeria* помимо *L. monocytogenes* относится еще 19 сапрофитических видов и один патогенный для животных вид *L. ivanovii*, мало опасный для человека. Сапрофитические виды листерий, такие как *L. innocua*, *L. seeligeri* и *L. welshimeri*, являются частыми контаминантами пищевых производств. При этом в процессе анализа пищевых продуктов

дифференциация бактерий рода *Listeria* spp. от патогенного вида *L. monocytogenes* требует дополнительных усилий в связи с одинаковыми требованиями к росту на искусственных питательных средах и морфологической схожестью. Для дифференциации *L. monocytogenes* от других видов листерий с помощью иммунологических методов можно использовать факторы патогенности, которые специфичны для этого вида.

Одним из таких факторов патогенности является поверхностный белок интерналин В (InlB), представляющий собой медиатор интернализации *L. monocytogenes* в различные клеточные линии непрофессиональных фагоцитов. Гомологичные белки отсутствуют у родственных видов и других известных видов бактерий. В связи с этим использование антител против InlB позволяет применять их в диагностических целях и исключает кросс-реакции с непатогенными листериями и представителями других бактериальных родов.

С другой стороны, известно, что, InlB взаимодействует с несколькими эукариотическими рецепторами. Наиболее важным для активной инвазии листерий в клетки является рецептор тирозиновой киназы с-Met – физиологический рецептор для фактора роста гепатоцитов (HGF). До настоящего времени процессы активации с-Met изучались преимущественно с точки зрения роли этого события в активной инвазии листерий в непрофессиональные фагоциты с участием связанной с бактериальной поверхностью формой. Вместе с тем, ранее было показано, что растворимая, не связанная с бактерией форма InlB ведет себя как фактор роста, а не как инвазин. При этом потенциал InlB как возможного средства терапии печени ранее не был исследован.

Таким образом, InlB в диссертационной работе рассматривается с двух сторон: с одной – как маркер дифференциации *L. monocytogenes*, с другой – как агонист рецептора с-Met на поверхности эпителиальных клеток.

В связи с этим диссертационная работа Калинина Егора Валерьевича посвящена актуальной теме, связанной с применением фактора патогенности

InlB для диагностики *L. monocytogenes* в пищевой продукции и медицинского применения с целью гепатопротекции.

Степень обоснованности и достоверности научных положений, выводов и рекомендаций, сформулированных в диссертации

Автором вынесены на защиту научные положения, которые касаются использования антител к фактору патогенности InlB *L. monocytogenes* в методе дот-блоттинга для идентификации данной бактерий; различий во взаимодействиях вариантов InlB с таргентными рецепторами c-Met и gC1q-R и приводящие также к отличающемуся внутриклеточному сигналингу; использования одного из вариантов InlB в качестве средства регенерации печени на фоне частичной гепатэктомии и химического повреждения.

Справедливость всех положений полностью доказана с использованием адекватных экспериментальных подходов и количественных данных, которые были статистически обработаны с использованием значимых критериев достоверности. Объем проведенных исследований соответствует критериям, предъявляемым к кандидатским диссертациям. Выводы основаны на полученных результатах, соответствуют задачам и положениям диссертации. Практические рекомендации сформулированы на основе полученных в работе результатах.

Научная новизна исследования определяется, в первую очередь, разработкой метода дот-иммуноанализа для идентификации *L. monocytogenes* с использованием полученных антител к фактору патогенности InlB *L. monocytogenes*. С другой стороны, используя разные варианты InlB было показано, что между ними существуют различия во взаимодействии с целевыми рецепторами c-Met и gC1q-R. Помимо этого эти варианты приводят к различному развитию внутриклеточных процессов. Впервые показана возможность использования бактериального белка в качестве средства для регенерации печени. Ранее об использовании белков бактериального происхождения в таких целях не сообщалось. Автор работы

продемонстрировал, что белок InlB, имеющий бактериальное происхождение, оказывал гепатопротекторное действие на мышинной модели острого повреждения печени CCl₄.

Теоретическая и практическая значимость исследования

Перспективность и практическая значимость полученных результатов несомненна. В ходе работы автором получены высокоочищенные препараты InlB, что подтверждено патентом РФ на изобретение 2688422 С1 «Рекомбинантный интерналин В 321, полученный с помощью штамма *Escherichia coli*» (дата регистрации 21.05.2019). Рекомбинантные белки, с одной стороны, были использованы для иммунизации кроликов и последующего получения поликлональных моноспецифических антител из сывороток крови, с другой стороны для оценки возможности использования бактериального белка в регенеративной медицине. В результате первого направления работы на основе антител был разработан способ дифференциации *L. monocytogenes* от других бактерий рода *Listeria* и нелистеральных видов методом дот-иммуноанализа. В качестве важной особенности работы следует отметить использование рекомбинантного InlB для наработки поликлональных антител. Данный подход позволил дифференцированно выявлять *L. monocytogenes* и не получать ложноположительных результатов, если в пробе присутствуют листерии других видов. На способ идентификации получен патент РФ на изобретение 2812147 С1 «Способ дифференциации *Listeria monocytogenes* от других видов *Listeria spp.* методом дот-блоттинга с использованием конъюгированных антител против фактора патогенности InlB» (дата регистрации 23.01.2024).

Одним из интересных результатов второго направления работы является доказательство гепатопротективного и регенеративного действия бактериального белка *L. monocytogenes* InlB, при этом автором показано, что

гепатопротективная и пролиферативная активность этого белка сравнима с активностью физиологического лиганда с-Met HGF.

Соответствие диссертации паспортам научных специальностей

Диссертация, выполненная Калининым Е. В., соответствует пунктам 6 и 12 паспорта научной специальности 1.5.11 «Микробиология» (6. Продукция биологически активных веществ микроорганизмами; 12. Патогенные микроорганизмы, факторы вирулентности и патогенности) и пункту 9 паспорта научной специальности 1.5.6. «Биотехнология» (9. Медицинские биотехнологии. Создание лекарственных форм, комбинированных препаратов и биологически активных препаратов. Технологии производства вакцин. Средства диагностики вирусных, бактериальных и грибных болезней.)

Полнота изложения материалов диссертации в работах, опубликованных соискателем

Материалы диссертации полно представлены в печати. По материалам диссертационной работы опубликовано 5 статей в научных журналах напечатанных в рецензируемых журналах Scopus/WoS и рекомендованных ВАК для публикации к защите, в том числе, 3 статьи в журналах 1 квартиля, а также 4 тезиса в сборнике трудов конференций, из них 2 в международных. По результатам исследования получены 2 патента на изобретение.

Структура и содержание диссертации

Диссертационная работа построена по классическому принципу и включает разделы введение, обзор литературы, материалы и методы исследований, результаты собственных исследований и обсуждение полученных результатов, а также выводы. Список литературы включает из 166 источников, подавляющее большинство которых являются англоязычными. Работа включает 133 страницы, 38 рисунков и 7 таблиц.

Во введении автор обосновывает актуальность диссертационной работы, ссылаясь на ранее проведенные исследования и значимость проблемы. Формулировка цели и задач логично вытекают из введения. В соответствии с

требованиями ВАК введение включает научную новизну, теоретическую и практическую значимость работы, а также выделил основные положения, выносимые на защиту, свидетельства достоверности результатов, информацию об апробации полученных результатов и личном вкладе автора.

Раздел «Обзор литературы», посвящен характеристике *L. monocytogenes* как пищевого патогена и возбудителя пищевой инфекции, современным методам детекции и идентификации с учетом их положительных сторон и недостатков. При этом большое внимание уделено серологическим методам, таким как иммуноферментный и иммунофлуоресцентный анализы. Описаны факторы патогенности *L. monocytogenes*. В том числе, представлено каким образом InlB взаимодействует с рецептором с-Met и описаны сигнальные пути, которые активируются при этом.

В главе 2 отражены материалы и методы исследования, используемые в процессе выполнения диссертационной работы. Они включают бактериологические, иммунологические, молекулярно-биологические методы, методы работы с лабораторными животными и методы выделения белков, в том числе InlB из клеточного лизата *E. coli* и антител из сывороток иммунизированных кроликов. Из-за большого разнообразия методов часть экспериментальной работы была подготовлена совместно с сотрудниками других учреждений. В целом, уровень методических подходов, использованных в работе, считаю очень высоким.

В главе 3 «Результаты собственных исследований» представлены схемы экспериментов и полученные данные. Автором с использованием аффинной хроматографии были получены высокоочищенные препараты трех вариантов белка *L. monocytogenes* InlB. Вариант белка, принадлежащий к типовому штамму EGDe был использован для иммунизации кроликов, в ходе которой была получена антисыворотка. Далее из нее были выделены IgG против InlB с применением нескольких стадий очистки, включая осаждение глобулиновой фракции, ионообменную и аффинную хроматографию. Полученные таким

образом антитела были использованы для оценки концентрации InlB на поверхности *L. monocytogenes*, относящихся к различным филогенетическим линиям. Было показано, что большая часть штаммов экспрессирует InlB на высоком уровне (больше 300 нг/мл) при добавлении сорбента. Антитела в дальнейшем были применены в методе дот-иммуноанализа для дифференциации колоний *L. monocytogenes*. Для оценки специфичности автор на чистых культурах бактерий показал, что антитела специфически реагируют с *L. monocytogenes*, но не с другими видами бактерий.

Изучая второй аспект использования InlB, три вариант этого белка были охарактеризованы по нескольким показателям, в том числе по способностью образовывать димеры, активировать сигнальные пути в клетках эукариот. Оценены константы диссоциации с целевыми рецепторами c-Met и gC1q-r. Из трех белков для оценки потенциала в качестве средства регенерации был выбран вариант idInlB_{CC1}, так как именно эта форма характеризовалась большим сродством к рецептору c-Met и лучше активировал PI3/Akt-киназный путь, который является основным сигнальным путем, ведущий к пролиферации клеток.

Диссертационную работу завершает глава 4 «Обсуждение результатов», в рамках которых автор подводит итоги выполненного экспериментального исследования. Обсуждение результатов написано хорошим языком, читается легко, излагаемые автором заключения понятны.

Выводы, сделанные автором и сформулированные в соответствующем разделе, в полной мере отражают полученные результаты собственных исследований.

Соответствие диссертации паспорту научной специальности

Диссертация Калинина Е. В. является законченной научно-квалификационной работой, которая по цели, задачам, методологическому подходу и полученным результатам соответствует пунктам 6 и 12 паспорта

научной специальности 1.5.11 «Микробиология» (6. Продукция биологически активных веществ микроорганизмами; 12. Патогенные микроорганизмы, факторы вирулентности и патогенности) и пункту 9 паспорта научной специальности 1.5.6. «Биотехнология» (9. Медицинские биотехнологии. Создание лекарственных форм, комбинированных препаратов и биологически активных препаратов. Технологии производства вакцин. Средства диагностики вирусных, бактериальных и грибных болезней.)

Соответствие автореферата основным положениям диссертации

Автореферат полностью отражает основные результаты и содержание диссертации.

Основные замечания и вопросы по рассматриваемой работе

Принципиальных замечаний по диссертации нет. Есть несколько неточностей:

1. Автор использует не совсем точное словосочетание «изоформы белка», необходимо использовать «варианты белка».
2. В тексте диссертации встречается некорректная формулировка «очищенные фракции белка»
3. На некоторых рисунках, представляющих результат электрофореза не показаны маркеры молекулярных весов.
4. Как в любой комплексной работе встречаются также стилистические недостатки, опечатки и орфографические ошибки.

Также имеются вопросы уточняющего характера:

- 1) Насколько экономически целесообразно использовать данный способ идентификации листерий?

2) Если антитела были разработаны против одного варианта белка, то можно ли их использовать для идентификации листерий, у которых на поверхности присутствуют другие варианты белка?

В целом диссертация Калинина Е. В. написана ясно, логично и последовательно, хорошо иллюстрирована, имеющиеся отдельные замечания не оказывают существенного влияния на общую положительную оценку данного диссертационного исследования.

Заключение

Диссертационная работа Калинина Егора Валерьевича, представленная на соискание ученой степени кандидата биологических наук по специальностям 1.5.11. – Микробиология, 1.5.6. – Биотехнология, является законченной научно-квалификационной работой, которая содержит новый ранее не описанный в литературе подход для использования бактериального белка, а именно для регенеративной медицины, и в которой также разработан способ дифференциации колоний *L. monocytogenes* от других видов бактерий с использованием антител против фактора патогенности InlB *Listeria monocytogenes* методом дот-иммуноанализа. Таким образом, диссертационная работа Калинина Е. В. «Биомедицинский потенциал фактора патогенности *Listeria monocytogenes* InlB» по своей актуальности, новизне и практической значимости соответствует требованиям, предъявляемым к диссертациям на соискание ученой степени кандидата наук, установленным Положением о присуждении ученых степеней, утвержденным Постановлением Правительства РФ № 842 от 24.09.2013 и последующих редакций Постановлений Правительства РФ (№335 от 21.04.2016; №748 от 02.08.2016; №1024 от 28.08.2016; 1168 от 01.10.2018; №426 от 20.03.2021; 1539 от 11.09.2021; №1690 от 26.09.2022), предъявляемым к кандидатским диссертациям, а ее автор Калинин Егор Валерьевич заслуживает присуждения

искомой степени кандидата биологических наук по специальностям 1.5.11. – Микробиология, 1.5.6. – Биотехнология.

руководитель научной группы Антибиотикорезистентности пищевых патогенов Федерального бюджетного учреждения науки «Центральный научно-исследовательский институт эпидемиологии» Федеральной службы по надзору в сфере защиты прав потребителей и благополучия человека, кандидат биологических наук

Куликова Нина Георгиевна



« 11 » _____ 2024 г.

Подпись к. б. н. Куликовой Нины Георгиевны заверяю

Ученый секретарь ФБУН ЦНИИ Эпидемиологии Роспотребнадзора

Никитина Татьяна Станиславовна

Федеральное бюджетное учреждение науки «Центральный научно-исследовательский институт эпидемиологии» Федеральной службы по надзору в сфере защиты прав потребителей и благополучия человека (ФБУН ЦНИИ Эпидемиологии Роспотребнадзора)

111123, Россия, г. Москва, ул. Новогиреевская, дом 3А

Тел. +7 (495) 232-15-03

Эл. почта: crie@psr.ru