

Отзыв

официального оппонента член-корреспондента РАН, доктора химических наук Смирнова Ивана Витальевича 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

За последние десятилетия произошел значительный рывок в нашем понимании механизмов взаимодействия между патогеном и организмом человека. В первую очередь этот рывок касается раскрытия молекулярных основ воздействия бактериальных факторов патогенности на процессы в клетках и тканях организма хозяина, обеспечивающие выживание и/или размножение возбудителя. Один из самых интересов классов таких факторов патогенности – бактериальные белки, являющиеся агонистами тирозинкиназных рецепторов факторов роста клеток млекопитающих и человека. Фактор инвазии патогенной бактерии *Listeria monocytogenes* белок InlB относится к числу первых описанных бактериальных белков с функцией активации тирозинкиназных рецепторов и является одним из наиболее изученных. Однако, несмотря на то, что еще в начале 2000-х годов было показано, что рекомбинантный очищенный InlB ведет себя как фактор роста, биотехнологический потенциал этого белка как продукта, имеющего в перспективе возможность заменить его функциональный аналог - рекомбинантный фактор роста гепатоцитов, - до сих пор не был раскрыт. Очевидно, что с одной стороны, производство бактериальных белков является более простым и дешевым процессом по сравнению с получением рекомбинантных белков человека, поскольку первые могут легко производиться в бактериальных системах, в то время как человеческие белки в большинстве случаев требуют клеточных систем и специфических посттрансляционных модификаций которые влияют как на стоимость так и на эффективность процессов их получения и использования. С

другой стороны, как первый шаг для будущих исследований применимости бактериальных белков в регенеративной медицине в качестве недорогих замен рекомбинантных факторов роста, необходимо проведение интенсивных исследований для оценки активности бактериального белка *in vivo* и *in vitro* и экспериментальное сравнение его активности с соответствующим фактором роста. Именно эти соображения определяют актуальность части работы, посвященной изучению активности белка InlB *in vitro* и *in vivo* как функционального аналога фактора роста гепатоцитов, взаимодействующего с тирозин-киназным рецептором c-Met. Необходимо подчеркнуть, что, фактически, это одна из первых работ, исследующих потенциал биотехнологического использования бактериальных токсинов в регенеративной медицине.

С другой стороны, тот же белок InlB, будучи уникальным маркером для пищевого патогена *L. monocytogenes*, может быть полноценно использован для разработки экспресс-тест систем для идентификации данного возбудителя. Известно, что среди пищевых возбудителей *L. monocytogenes* занимает особое место, т.к. вызывает генерализованную тяжелую инфекцию, приводящую в некоторых случаях к смерти пациента, что определяет необходимость ее мониторинга в пищевых продуктах. Бактериологическое исследование по-прежнему остается золотым стандартом выявления патогенных бактерий в продуктах питания, поэтому методы, позволяющие ускорить и усовершенствовать процедуру бактериологического исследования, являются востребованными и на сегодняшний день, что определяет актуальность части диссертации, посвященной разработке системы дот-блотинга для выявления живых листерий в молоке.

Таким образом, оба аспекта биотехнологического потенциала InlB, исследованные в диссертации Калинина Е.В., представляются современными и актуальными.

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

Сформулированные Калининым Е.В. научные положения, выводы и рекомендации основаны на экспериментальных данных, демонстрирующих

потенциал использования InlB как маркера для выявления *L. monocytogenes* методом дот-блота, а также как функционального аналога рекомбинантного фактора роста гепатоцитов, сравнимого с фактором роста по эффекту на пролиферацию клеток *in vitro* и на репарацию печени лабораторных животных *in vivo*. Полнота представления экспериментальных данных, их статистическая достоверность, методология работы в целом не вызывают сомнений и обосновывают достоверность научных положений, выводов и рекомендаций. 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 результатов.

Научная новизна исследования.

Научная новизна исследования определяется в первую очередь демонстрацией на моделях частичной гепатэктомии и химического повреждения печени возможности использования белка InlB, фактора патогенности *L. monocytogenes*, для ускорения процессов регенерации. Эти ключевые результаты основаны на ряде других находок автора, которые также можно охарактеризовать как впервые установленные. К таким находкам относится демонстрация различий в константах связывания рецепторов c-Met и gC1qR между вариантами InlB, полученными из различных штаммов *L. monocytogenes*, демонстрация активности InlB *in vitro* на культурах клеток; установленные различия в динамике сигнальных внутриклеточных процессов, вызываемых разными вариантами InlB, что помогло автору сделать правильный выбор варианта InlB с максимальной активирующей активностью. Несомненной новизной обладает разработка метода выявления *L. monocytogenes* в молоке, включающая не только использование InlB как специфического маркера, но и использование среды культивирования, обеспечивающей максимальную продукцию этого белка листериями.

Теоретическая и практическая значимость исследования

Основной теоретической находкой исследования является экспериментальное доказательство возможности использования бактериального белка для ускорения процессов регенерации. Другой находкой, имеющей теоретическое значение, является демонстрация того, что природные варианты фактора патогенности InlB отличаются по своим функциональным характеристикам, в том числе, по эффективности взаимодействия с таргетными рецепторами и динамике вызываемых этими взаимодействиями внутриклеточных сигнальных процессов – это наблюдение указывает на возможность рационального выбора используемого варианта белка в зависимости от поставленных биотехнологических задач.

Практическая значимость работы определяется получением двух патентов. В ходе работы автором получены высокоочищенные препараты белка InlB, что подтверждено патентом РФ на изобретение 2688422 С1 «Рекомбинантный интерналин В 321, полученный с помощью штамма *Escherichia coli*» (дата регистрации 21.05.2019). С помощью этих препаратов автором были решены задачи диссертации, кроме того разработанный метод получения может быть использован в будущем, если использование InlB получит практическое применение. На основе полученных к очищенным р-препаратам InlB антител, автором был разработан способ идентификации *L. monocytogenes*, на который автором также 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).

Соответствие диссертации паспортам научных специальностей

Диссертация 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

Результаты, полученные в диссертации, полностью 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 согласно рейтингу WoS, 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 Калинина Егора Валерьевича изложена на 133 страницах, включает разделы: введение, обзор литературы, материалов и методов исследований, результаты собственных исследований и обсуждения полученных результатов, выводов и списка литературы, состоящего из 166 источников. Работа оформлена в соответствии с требованиями ВАК, иллюстрирована 38 рисунками и 7 таблицами. Диссертационная работа написаны грамотным языком с использованием общепринятой терминологии.

Во введении автор обосновал актуальность диссертационной работы, представил цели и задачи исследования, показал научную новизну, теоретическую и практическую значимость работы, а также выделил основные положения, выносимые на защиту, отмечена достоверность результатов, представлена информация об апробации результатов и отражен личный вклад автора диссертации.

Раздел «Обзор литературы» структурирован правильно и написан последовательно. В данном разделе автор приводит обобщенные данные

многочисленных исследований. Этот раздел состоит из нескольких частей. Первая часть посвящена характеристике *L. monocytogenes* как пищевого патогена, распространению, и роли в развитии заболеваний. Вторая часть касается методов детекции и идентификации этой бактерии. Описаны все имеющиеся на сегодняшний день способы детекции. Показаны положительные стороны каждого из методов, а также сложности и проблемы, которые остаются на сегодняшний день. Отдельная глава посвящена методам, в которых используются антитела. Биология бактерии и факторы патогенности описаны в четвертой части литобзора. В том числе, представлено каким образом InlB взаимодействует с рецептором c-Met и описаны сигнальные пути, которые активируются при этом.

В главе 2 изложены материалы и методы исследования, используемые в процессе выполнения диссертационной работы. В данной главе описаны бактериологические методы, иммунологические, молекулярно-биологические, методы работы с лабораторными животными. Использование разнообразных методов показывает высокий уровень выполнения диссертационной работы. Некоторые работы были проведены 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 были получены высокоочищенные препараты трех изоформ белка *L. monocytogenes* InlB. В ходе нескольких циклов иммунизации кроликов была получена антисыворотка против InlB. В несколько стадий, включая ионообменную и аффинную хроматографию, были очищены IgG против InlB. На основе полученных антител был разработан способ идентификации *L. monocytogenes* в методе дот-иммуноанализа. Данный метод дифференциации был запатентован.

Три изоформы InlB были охарактеризованы по нескольким показателям, в том числе по способности образовывать димеры, активировать сигнальные пути в клетках эукариот. Оценены константы диссоциации с целевыми рецепторами c-Met и gC1q-r. Из трех изоформ для оценки потенциала в качестве средства регенерации

была выбрана изоформа idInlB_{CC1}. Этот белок отличался большим сродством к рецептору c-Met и лучше активировал PI3/Akt-киназный путь.

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 автореферата основным положениям диссертации

Автореферат полностью отражает основные результаты и содержание диссертации.

Рекомендации по использованию результатов диссертации

Результаты диссертации Калинина Е.В. могут быть использованы в биотехнологической промышленности для разработки и внедрения методов идентификации *L. monocytogenes*, а также в перспективе, для получения препаратов, ускоряющих регенеративные процессы. Кроме того, результаты диссертации могут быть использованы в дальнейших научных исследованиях активности бактериальных токсинов в отношении модулирования внутриклеточных процессов.

Основные замечания и вопросы по рассматриваемой работе

Принципиальных замечаний по диссертации нет. Есть несколько неточностей: 1. Автор использует не совсем точное словосочетание «изоформы белка», более подходящим представляется использование выражения «варианты белка».

2. На некоторых рисунках, не хватает обозначений осей, на рисунках, представляющих результат электрофореза не показаны маркеры молекулярных весов.

3. Встречаются стилистические недостатки, опечатки и орфографические ошибки.

4. Некорректно выбрана размерность значений и их ошибок в соответствии со значащими цифрами, например, на стр. 90 – значение 58.7 ± 18.5 записано некорректно. Также на этой странице имеется различный формат отделения десятичных значений, в одних случаях это «запятая», в других «точка» («запятых» больше).

Также имеются вопросы уточняющего характера:

- 1) Насколько вероятно развитие иммунного ответа на очищенный рекомбинантный InlB при его внутривенном введении, как было сделано в экспериментах по изучению регенерации печени? Насколько возможен анафилактический шок при повторном введении?
- 2) Не могут ли другие бактериальные фрагменты, например ЛПС, остающиеся в образце после очистки, оказывать эффект на регенеративные процессы, помимо InlB?

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, содержащей новое решение ряда научных задач, связанных с рациональным использованием бактериальных токсинов в биотехнологии, что служит для развития как медицинской микробиологии, открывая новое направление для изучения факторов патогенности за рамками инфекционных болезней, так и биотехнологии, предлагая новый класс биологически активных молекул – бактериальных токсинов, - для получения и использования вместо рекомбинантных белков человека: такой подход ранее не был описан в литературе, и может быть использован в будущем. 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.

Заместитель директора по науке Федерального государственного бюджетного учреждения науки Институт биоорганической химии им. академиков М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова Российской академии наук

член-корреспондент РАН, доктор химических наук

Смирнов Иван Витальевич



«21» мая 2024 г.

Федеральное государственное бюджетное учреждение науки Институт биоорганической химии им. академиков М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова Российской академии наук (ИБХ РАН)

117997, город Москва, улица Миклухо-Маклая, дом 16/10,

Тел. +7 (495) 335-01-00

Факс: +7 (495) 335-08-12

Эл. почта: office@ibch.ru