ОТЗЫВ

официального оппонента диссертационной работы Филипповой Анны Андреевны «*Разработка метода мультиплексного определения транскриптов генов бета-лактамаз у мультирезистентных бактерий Enterobacteriaceae*», представленной на соискание ученой степени кандидата химических наук по специальности 1.5.6 – Биотехнология

Проблема устойчивости микроорганизмов к антибиотикам является одной из глобальных проблем, с которой столкнулось человечество. По мнению Всемирной организации здравоохранения начиная с 2000-х годов «антибиотикорезистентность одной из самых серьезных угроз для здоровья животных и человека». Устойчивость микроорганизмов к действию антибактериальных соединений возникла эволюционно, обеспечивая механизмы их выживаемости в окружающей среде. Широкое использование антибактериальных препаратов в клинической медицине, животноводстве и ветеринарии вызвало ускоренное развитие механизмов резистентности и привело к глобальному распространению патогенных возбудителей с множественной лекарственной устойчивостью, в первую очередь вызывающих внутрибольничные инфекции. В последние десятилетия устойчивость к антибиотикам обнаружена также у возбудителей внебольничных инфекций, а также у микроорганизмов в объектах окружающей среды. Локализация детерминант резистентности на мобильных генетических элементах, легко передающихся между бактериями посредством конъюгации, служит источником распространения резистентных бактерий и развития у них мульти- и пан-резистентности. В связи с этим исследование механизмов возникновения и распространения мультирезистентных микроорганизмов, а также механизмов влияния различных соединений на экспрессию генов резистентности является чрезвычайно актуальным. Среди огромного количества разнообразных научных исследований в этой области, относящихся к разным областям молекулярной биологии, микробиологии, медицины и т.д. можно выделить и задачи для направления «Биотехнология», связанные с разработкой новых методов исследования мультирезистентных к антибиотикам бактерий. В связи с этим представленная диссертационная работа А.А. Филипповой, посвященная разработке нового метода анализа транскриптов генов бета-лактамаз грамотрицательных бактерий *Enterobacteriaceae*, является, безусловно, актуальной.

В качестве объектов исследования диссертационной работы выбраны гены бактериальных ферментов бета-лактамаз, обуславливающих устойчивость грамотрицательных бактерий к наиболее часто применяемому классу антибиотиков - бета-лактамам. Формирование устойчивости к данному классу антибактериальных препаратов

также широко распространено среди патогенных бактерий. Многообразие бактериальных ферментов семейства бета-лактамаз обусловлено их различающейся субстратной специфичностью, направленной на различные группы бета-лактамов.

Научная новизна диссертационной работы заключается в разработке метода одновременного определения концентраций мРНК генов четырех клинически значимых бета-лактамаз с использованием технологии колориметрических биочипов. В рамках диссертационной работы автором проведено усовершенствование данной технологии, основанное на совмещении оптимальных пробоподготовки препаратов общей РНК, выделенной из бактериальных клеток, получении из общей РНК первой цепи кДНК, затем амплификации генов бета-лактамаз в мультиплексной ПЦР и проведении гибридизационного анализа на биочипах с иммобилизованными специфичными олигонуклеотидными зондами. Принципиальным отличием данного метода от разработанных ранее является количественное определение специфичных мРНК с использованием стандартных образцов мРНК соответствующих генов бета-лактамаз. Параллельный анализ стандартных и исследуемых образцов позволяет контролировать процедуру проведения анализа на каждом из этапов. Принципиальным результатом также является демонстрация применимости разработанного метода для анализа реальных клинических штаммов Enterobacteriaceae, культивированных в присутствии различных концентраций антибактериальных препаратов группы бета-лактамов в широком диапазоне концентраций. В экспериментальных исследованиях автор использовала концентрации антибактериальных препаратов, которые соответствуют концентрации антибиотиков в крови человека при лечении бактериальных инфекций. Автором установлены индуцируемые антибиотиками разнонаправленные эффекты изменения экспрессии генов бета-лактамаз, что является важным результатом для клинической медицины.

Практическая значимость диссертационной работы Филипповой А.А. заключается в разработке нового количественного метода анализа антибиотикорезистентности, а именно биочипов для определения транскриптов генов четырех типов клинически значимых бета-лактамаз, которые могут применяться в научных и клинических микробиологических лабораториях в сочетании с другими методами лабораторной микробиологической и молекулярно-генетической диагностики для изучения и характеристики резистентных к антибиотикам бактерий. Полученные в работе данные показали возможность применения метода для анализа клинических штаммов.

Структура диссертации является классической, включает введение, обзор литературы, материалы и методы, результаты исследований и их обсуждение, заключение, выводы, список цитируемой литературы. Материал диссертации изложен на 134 страницах, автор ссылается на 229 литературных источников, работа иллюстрирована 36 рисунками и содержит 18 таблиц.

Во введении диссертационной работы диссертант обосновывает актуальность выбранной темы, формулирует цель и задачи исследования, характеризует научную новизну, теоретическую и практическую значимость, приводит положения, выносимые на защиту. Литературный обзор, содержит информацию о известных механизмах устойчивости к бета-лактамам, а также классификацию бета-лактамаз на основе их генетических и структурных особенностей. В отдельном разделе обзора рассмотрены известные механизмы индукции генов бета-лактамаз и применяемые методы для их изучения, отдельно описаны известные данные об индукции экспрессии генов бета-лактамаз под действием бета-лактамных антибиотиков. Литературный обзор подкреплен ссылками на большое количество актуальных научных статей.

Среди основных результатов, полученных в диссертационной работе Филипповой А.А., можно выделить следующие:

- разработана технология количественного определения специфичных мРНК генов бета-лактамаз TEM-, CTX-M-1-, NDM-, OXA-48-типов на основе биочипов, расположенных в лунках 96-луночных полистироловых планшетов;

- выбор условий стадий пробоподготовки и гибридационного анализа позволил проводить селективное определение мРНК четырех бета-лактамаз в мультиплексном анализе;

- проведена апробация метода на клинических образцах штаммов бактерий семейства Enterobacteriaceae с разной устойчивостью к бета-лактамам.

С использованием разработанного метода определены эффекты разнонаправленной экспрессии генов бета-лактамаз, индуцированные различными концентрациями бета-лактамов. Определено, что меропенем индуцирует транскрипцию мРНК всех генов бета-лактамаз плазмидной локализации, и он может быть использован как активатор транскрипции специфичных мРНК для изучения экспрессии генов бета-лактамаз у мультирезистентных штаммов.

В целом работа написана хорошим языком и хорошо иллюстрирована, однако, к диссертации имеются следующие **замечания**:

1. Не хватило информации по более широкому анализу к существующим подходам разработки биочипов, почему был выбран именно калориметрический тип низкой плотности, а в сравнении использовали цифровую детекцию с использованием конъюгата стрептавидина с наночастицами золота;

2. Нет детального описания как именно проводили подбор ген специфических праймеров, почему сравнивали с рандомным праймером в 10 н.о. с поли (А)-хвостом. Выбор именно последовательности поли(Т) при иммобилизации и при производстве биочипа не обоснован.

3. Нет оценки специфичности узнавания системы с использованными праймерами в комплексе, после проведения реакции обратной транскрипции, сопряженной с ПЦР. Какой уровень не специфического сигнала?

4. Основной упор в работе на уровень сигнала созданного биочипа, определяющий чувствительность, показана применимость биочипа для научных исследований, однако для дальнейшей разработки клинически значимого метода критична оценка именно пары: аналитической чувствительности и специфичности метода. Какая все-таки специфичность получаемого сигнала?

Несмотря на сделанные замечания, диссертационная работа Филипповой А.А. оставляет хорошее впечатление и представляет завершённое исследование, выполненное на высоком научном и методическом уровне. Полученные данные и сделанные выводы важны как с фундаментальной, так и с прикладной точки зрения.

По материалам диссертации Филипповой А.А. опубликовано 5 научных статей в рецензируемых научных изданиях, индексируемых в Web of Science / Scopus / РИНЦ, 1 статья в сборнике и 7 тезисов докладов на международных и российских научных конференциях.

Таким образом, по критериям актуальности, научной новизны и практической значимости представленная к защите диссертация «Разработка метода мультиплексного определения транскриптов генов бета-лактамаз у мультирезистентных бактерий *Enterobacteriaceae*» соответствует специальности 1.5.6 – «Биотехнология», а также удовлетворяет всем критериям, определенным пп. 2.1-2.5 Положения о присуждении ученых степеней в Московском государственном университете имени М.В. Ломоносова и оформлена согласно приложениям №5, 6 Положения о диссертационном совете Московского государственного университета имени М.В. Ломоносова.

Филиппова Анна Андреевна заслуживает присуждения ей ученой степени кандидата химических наук по специальности 1.5.6 – «Биотехнология».

Официальный оппонент:

доктор химических наук,

профессор кафедры химии природных соединений Федерального государственного бюджетного образовательного учреждения высшего образования

МГУ имени М.В. Ломоносова

Зверева Мария Эмильевна

Контактные данные:

Тел.: +7(495)939-15-98

Адрес места работы: 119991 г. Москва, ГСП-1, ул. Ленинские горы, д.1, стр. 3

E-mail: mzvereva@chem.msu.ru

01.12.22