

ОТЗЫВ

**официального оппонента
на диссертацию на соискание ученой степени
кандидата физико-математических наук
Кривицкой Александры Вячеславовны
на тему: «Молекулярное моделирование механизмов ферментативных
реакций, связанных с бактериальной резистентностью к β -лактамным
антибиотикам»
по специальности 1.5.8. Математическая биология, биоинформатика
(физико-математические науки)**

Актуальность темы

Актуальность исследования обусловлена ростом антимикробной резистентности к β -лактамным антибиотикам, являющимися на сегодня наиболее широко используемыми антибактериальными препаратами в медицинской практике. Изучение молекулярных механизмов ферментативных процессов инактивации β -лактамов β -лактамазами методами молекулярного моделирования дает детальное понимание протекающих реакций в активном центре фермента, которое зачастую недоступно экспериментальными исследованиями. В первую очередь эти знания имеют фундаментальный характер, однако они находят и прикладное применение для направленной разработки новых лекарственных средств. В диссертационной работе Кривицкой А.В. проведено изучение механизма инактивации антибиотика имипенема металло- β -лактамазами L1 и NDM-1 и механизма ингибирования ряда пенициллин-связывающих белков (PBP) антибиотиком цефтриаксоном. Помимо установления детальных механизмов процессов, протекающих в активном центре ферментов, на основе полученных знаний автором предложены новые направления создания антибактериальных препаратов. Данный подход является альтернативным методом поиска соединений по типу «следующий в классе» и в перспективе позволяет проводить рациональное конструирование новых лекарственных средств.

Структура и объем диссертации

Диссертация выполнена в традиционном научном стиле и включает все необходимые разделы. Во введении обоснована актуальность исследования, проанализирована степень изученности темы, сформулированы цель и задачи, определены объекты и предмет исследования. Также указаны научная новизна, теоретическая и практическая значимость работы, методы исследования, представлены достоверность и данные об апробации результатов, личном вкладе автора, структуре и объеме диссертации. Работа изложена на 135 страницах, включает 39 рисунков, 4 таблицы и 225 наименований источников литературы.

Первая глава «Обзор литературы» посвящена β -лактамам антибиотикам, бактериальным механизмам резистентности, классификации β -лактамаз с описанием современных представлений о механизмах инактивации β -лактамных антибиотиков каждым классом β -лактамаз. Освещены вопросы поиска ингибиторов β -лактамаз, представлены основные классы известных ингибиторов.

Во второй главе «Материалы и методы» описаны применяемые в работе подходы и методы исследования, включая их фундаментальные основы. Также указаны подробные параметры проведенных расчетов, с обоснованием выбранных условий.

Третья глава «Результаты и их обсуждения» состоит из пяти разделов, соответствующих пяти поставленным задачам. В первом разделе представлены расчеты уже известного механизма реакции гидролиза субстрата нитроцефина металло- β -лактамазой L1, проведенные различными методами и с целью выбора наиболее подходящего подхода на основании сравнения результатов с экспериментальными данными. Во втором разделе проводится сравнение механизмов гидролиза антибиотика имипенема металло- β -лактамазами L1 и NDM-1, установлены конечные продукты реакции и модификации продукта после диффузии из активного центра. В третьем разделе проведено сравнение механизмов ацилирования ряда пенициллин-связывающих белков

антибиотиком цефтриаксоном, в результате которых было показано, что мутации связанные с ростом резистентности в данном ряду ферментов влияют на скорость ацилирования. В четвертом разделе представлено уравнение, связывающее расчетные характеристики и экспериментальные каталитические константы гидролиза антибиотиков, для прогнозирования скорости гидролиза новых β -лактамных антибиотиков металло- β -лактамазой L1. В пятом разделе разработано аналогичное уравнение, связывающее расчетные характеристики и экспериментальные концентрации полумаксимального ингибирования для прогноза более эффективных ингибиторов металло- β -лактамазы NDM-1 на основе бензо[b]тиофен-2-бороновых кислот.

Заключение диссертационной работы Кривицкой А.В. отражает выполнение поставленных задач, новизну исследования и его теоретическую значимость. Материал изложен ясно и доступно для понимания.

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

Обоснованность научных положений и выводов, сформулированных в диссертационной работе Кривицкой А.В., обеспечивается актуальностью исследования, четко сформулированными задачами и применением самых современных методов расчетов. Научные положения и выводы соответствуют содержанию работы и аргументированы представленными результатами исследования.

Новизна и научная значимость

В диссертационной работе Кривицкой А.В. описаны элементарные стадии механизма гидролиза антибиотика имипенема металло- β -лактамазами L1 и NDM-1. NDM-1 является клинически значимым ферментом, обуславливающим рост резистентности грамотрицательных патогенов к карбапенемам. Опубликованные ранее данные о механизме инактивации карбапенемов NDM-1 противоречивы, поэтому детальное исследование реакционного пути для этого фермента является актуальной задачей. Также в работе исследован механизм ингибирования β -лактамами пенициллин-

связывающих белков, являющихся ключевыми ферментами в формировании бактериальной стенки. В рамках развития этого направления разработан альтернативный метод поиска потенциальных лекарственных препаратов, основанный на анализе электронной структуры и пути протекания ферментативных реакций. Представленные уравнения могут быть использованы для рационального синтеза при поиске потенциальных молекул.

Достоверность научных положений, выводов и рекомендаций

Основные положения диссертации, выносимые на защиту достоверны, результаты согласуются и дополняют известную информацию из литературных источников. По результатам диссертационной работы опубликовано 6 научных статей в рецензируемых научных изданиях, входящих в перечень индексируемых в международных системах цитирования Web of Science и Scopus. Также автором был сделан 21 доклад на конференциях по материалам диссертационной работы. Автореферат полностью отражает основное содержание текста диссертации. Достоверность и новизна выдвинутых научных положений, выводов и рекомендаций не вызывают сомнений.

Оценка содержания диссертации в целом, замечания и вопросы по содержанию диссертации

Результаты получены на высоком научно-методологическом уровне, а выводы обоснованы и подтверждены теоретическими положениями и расчетами с использованием современных методов. Выявлены общие особенности и различия в молекулярном механизме инактивации имипенема металло- β -лактамазами L1 и NDM-1. В работе продемонстрировано, что увеличение резистентности в ряду пенициллин-связывающих белков связано не только с понижением сродства этих ферментов к цефтриаксону, но и с увеличением скорости ацилирования. В работе предложены уравнения, которые определяют взаимосвязь между рассчитанными параметрами электронной структуры и экспериментально наблюдаемыми свойствами системы, что позволяет прогнозировать структуру новых соединений с повышенной устойчивостью к действию β -лактамаз или аффинностью к РВР.

Эти уравнения можно использовать для разработки новых антибактериальных препаратов: не гидролизующихся β -лактамных антибиотиков для металло- β -лактамаз и их ингибиторов на основе бензо[b]тиофен-2-бороновых кислот.

Работа лишена серьезных недостатков. Тем не менее, можно сделать ряд критических замечаний по тексту диссертации и задать автору ряд вопросов, не носящих принципиального характера.

1. В работе исследованы механизмы гидролиза β -лактамов металло- β -лактамазами L1 и NDM-1. Лактамаза NDM-1 сегодня широко распространена у клинически значимых патогенов и выбор этого фермента, как ключевого объекта исследования, понятен. Однако выбор лактамазы L1, которая не имеет какого-либо клинического значения, не обоснован. Логичнее было бы провести сравнительное исследование NDM-1 с другими металло- β -лактамазами, широко распространёнными у грамотрицательных патогенов, например IMP и VIM.
2. При поиске потенциальных молекул в работе предлагается использовать уравнения, связывающие расчетные характеристики и экспериментальные параметры. Однако не всегда результаты моделирования подтверждены соответствующими экспериментальными данными. Так, для подтверждения вывода о том, что аминокислотные замены в «PBP2 мутантных штаммов ухудшает связывание цефтриаксона, увеличивая константу диссоциации K_S , и ослабляет активацию субстрата, понижая константу скорости ацилирования k_2 , что объясняет наблюдаемое уменьшение эффективного каталитического параметра k_2/K_S », целесообразно было бы сравнить величины соответствующих констант для исходного фермента и мутантных вариантов. Валидацию предложенных моделей и структур ингибиторов хотелось бы подтвердить синтезом соответствующих соединений и оценкой их действия на целевые мишени.
3. На с. 25 автор пишет, что «Низкая концентрация антибиотика при лечении является одной из главных причин развития бактериальной устойчивости», однако это утверждение некорректно, поскольку хорошо известно, что

селекция резистентных штаммов бактерий происходит при концентрациях антибиотика выше МПК.

4. В обсуждении результатов автор широко использует данные литературы или ссылается на известные результаты, однако не указывает первоисточники. Например, на с. 92 автор утверждает, что «Данные расчётов согласуются с результатами экспериментальных исследований по время-разрешенной УФ-видимой и ЯМР спектроскопии, доступными из литературных источников» без соответствующих ссылок.
5. На рисунке 3.2.1.2 в легенде, по-видимому, допущена ошибка, поскольку в ней указано, что на рис. (Б) приведена величина «координационная связь между катионом цинка и атомом кислорода карбонильной группы субстрата, $d(\text{Zn}^{2+} \dots \text{O})$ », однако, судя по представленным на рисунке данным, для лактамазы L1 эта величина близка к 0 или даже достигает отрицательной величины, что представляется маловероятным.
6. Вывод о том, что «наблюдаемый в экспериментальных исследованиях продукт гидролиза имипенема (R)-имин образуется не в активных центрах ферментов, а в результате таутомеризации из енамина в растворе», сделанный на основании конформационных исследований, следовало бы подкрепить анализом стабильности имин-енаминных форм продукта и энергетического профиля таутомерного перехода между этими изомерами.
7. В разделе материалы и методы не указано какими версиями программного обеспечения и на каких вычислительных мощностях проводились расчёты.
8. Ряд фраз труден для восприятия, например «Распределение водородной связи между NH группой основной цепи Ser310, $d(\text{O} \dots \text{H}_\text{S})$, и карбонильным кислородом смещается в сторону больших значений с ростом резистентности» (с. 94); «Анализ эффекта активации цефтриаксона РВР2 лапласианом электронной плотности показал, что с ростом резистентности данных РВР2 доля реакционных структур снижается» (с. 95).
9. В тексте диссертации допущен ряд ошибок и опечаток, а также использован ряд не совсем корректных или жаргонных выражений, например:

- «...более сильными грамотрицательными антимикробными свойствами» (с.19);
- «...химическую реактивность карбапенема» (с.21);
- «... в положении R1 здесь гидроксипропиловая группа в стереоположении (S)» (с.21);
- «Азтреонам... не обладает практически никакой активностью против грамположительных бактерий» (с.241);
- «с грамотрицательным РВР2» (с 44);
- «Общая схема ингибиторов» (с.45);
- «молекулярного моделирования молекулярные системы» (с.46);
- «катионы цинка координируют только аминокислотные остатки гистидина (остатки 116, 118, 196, 121, 263) и каталитическую аспарагиновую кислоты» (с. 79);
- «Протон воды» (с. 88);
- «Для открытых конформаций характерны обе резонансные формы (рисунок 3.2.2.8)» (с. 91);
- «Устойчивые бензо[b]тиофен-2-боронаты формируются безбарьерно в активном центре» (вывод 5);
- имеются ошибки в названиях штаммов микроорганизмов (*Bacillus coli*; *Neisseria Gonorrhoeae* - видовой эпитет пишется всегда с маленькой буквы).

Заключение

Указанные замечания не снижают значимости диссертационного исследования и обоснованность выводов. Работа Кривицкой А.В. представляет интерес для исследователей, работающих в области ферментативного катализа и создания новых антибактериальных средств. Диссертация отвечает требованиям, установленным Московским государственным университетом имени М.В. Ломоносова к работам подобного рода. Содержание диссертации соответствует специальности 1.5.8. Математическая биология, биоинформатика (по физико-математическим наукам), а также критериям, определенным пп. 2.1-2.5 Положения о присуждении ученых степеней в Московском государственном университете имени М.В. Ломоносова, а также оформлена согласно требованиям Положения о совете по защите диссертаций на соискание ученой степени кандидата наук, на соискание ученой степени доктора наук Московского государственного университета имени М.В. Ломоносова.

Таким образом, соискатель Кривицкая Александра Вячеславовна заслуживает присуждения ученой степени кандидата физико-математических наук по специальности 1.5.8. Математическая биология, биоинформатика (физико-математические науки).

Официальный оппонент:

Доктор химических наук, профессор РАН, профессор
директор
ФГБНУ "Научно-исследовательский институт по изысканию новых
антибиотиков имени Г.Ф. Гаузе",

Щекотихин Андрей Егорович

02 июня 2024 года

Контактные данные:

Тел.: +7 499 246-99-80, e-mail:

Специальность, по которой официальным оппонентом
защищена диссертация: 02.00.03 – Органическая химия (химические науки)

Адрес места работы:

119021, г. Москва, ул. Большая Пироговская, д. 11, стр. 1.

ФГБНУ "Научно-исследовательский институт по изысканию новых
антибиотиков имени Г.Ф. Гаузе"

Тел.: +7 499 246-99-80, e-mail:

Подпись д.х.н., директора ФГБНУ "Научно-исследовательский институт по
изысканию новых антибиотиков имени Г.Ф. Гаузе" Щекотихина А.Е.
удостоверяю:

Ученый секретарь
ФГБНУ "Научно-ис
изысканию новых а
к.х.н.

по
аузе",

О.В. Кисиль