

## **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  $\beta$ -лактамным  
антибиотикам»  
по специальности 1.5.8. Математическая биология, биоинформатика  
(физико-математические науки)**

### **Актуальность темы**

Диссертационная работа Кривицкой Александры Вячеславовны на тему: «Молекулярное моделирование механизмов ферментативных реакций, связанных с бактериальной резистентностью к  $\beta$ -лактамным антибиотикам» посвящена исследованию актуальной области знаний.  $\beta$ -лактамные антибиотики являются одними из наиболее часто используемых классов антибиотиков в клинической практике. Они эффективны против широкого спектра бактерий и используются для лечения различных инфекций. Однако резистентность к этим антибиотикам представляет серьезную угрозу для здоровья населения. Рост резистентности к  $\beta$ -лактамным антибиотикам ведет к увеличению заболеваемости и смертности. В работе проведено исследование двух основных молекулярных механизмов, определяющих резистентность к  $\beta$ -лактамным антибиотикам: инактивация  $\beta$ -лактамных антибиотиков ферментами  $\beta$ -лактамазами и ингибирование модифицированных пенициллин-связывающих белков  $\beta$ -лактамным антибиотиком. Механизмы рассмотрены на примере инактивации антибиотика имипенема металло- $\beta$ -лактамазами L1 и NDM-1 и ингибировании ряда пенициллин-связывающих белков 2 из *Neisseria Gonorrhoeae*  $\beta$ -лактамным антибиотиком цефтриаксоном. Обе задачи касаются актуальных направлений исследования: данные по механизму инактивации карбапенемов противоречивы, в то время как карбапенемы являются заменой цефалоспоринам III-IV поколения для многих устойчивых

штаммов грамотрицательных бактерий, а цефтриаксон является единственным действующим против гонореи препаратом во многих странах. Также в работе применяется альтернативный метод поиска новых антибактериальных препаратов, основанный на анализе электронной плотности активного центра фермента. Данный подход решает проблему низкого уровня точности классических потенциалов для описания препарата и мишени, однако взамен количество исследуемых соединений сильно ограничено.

### **Структура и объем диссертации**

Диссертация написана в классическом стиле и содержит все необходимые разделы. Во введении обоснована актуальность работы, степень разработанность темы, сформулированы цель и задачи, выделены объекты и предмет исследования, указаны научная новизна, теоретическая и практическая значимость работы, методология и методы исследования, степень достоверности и апробация результатов, обозначен личный вклад автора и структура и объем диссертации. Объем диссертации составил 135 страниц, имеет 39 рисунков, 4 таблицы и сопровождается 225 источниками литературы.

Первая глава посвящена обширному литературному обзору  $\beta$ -лактамных антибиотиков, истории их разработки и использования. В том числе освещены вопросы появления и роста резистентности к  $\beta$ -лактамным антибиотикам и современных методов борьбы с ней. Дан обзор исследований механизмов инактивации карбапенемов  $\beta$ -лактамазами, исследований, посвященных изучению роста резистентности пенициллин-связывающих белков к цефтриаксону. Последний раздел главы посвящен обзору ингибиторов  $\beta$ -лактамаз, сделан акцент на ингибиторах на основе борной кислоты.

Во второй главе представлены все используемые методы исследования с детализацией параметров проведенных в работе расчетов. Приведена

обоснованность выбранных методов. Применяемые методы описаны подробно, что позволяет оценить достоверность полученных автором результатов и отвечает задачам диссертационной работы.

Третья глава состоит из пяти подразделов, в которых описаны результаты всех поставленных задач. Первый подраздел посвящен результатам подбора наиболее оптимального метода расчета реакции гидролиза субстрата нитроцефина металло- $\beta$ -лактамазой L1. Наиболее согласующимся с экспериментальными данными методом оказался РВЕ0-D3. Второй подраздел посвящен исследованию механизмов реакции гидролиза имипенема металло- $\beta$ -лактамазами L1 и NDM-1. Показаны механизмы реакции и разрешен вопрос продукта реакции для данных ферментов. В третьем подразделе исследовано изменение механизма ингибирования пенициллин-связывающих белков 2 из *Neisseria Gonorrhoeae* цефтриаксоном при появлении ряда мутаций. Четвертый и пятый подразделы посвящены построению уравнения, связывающего микро- и макропараметры системы, для прогнозирования новых соединений: не гидролизующихся  $\beta$ -лактамных антибиотиков в четвертом подразделе и более эффективных ингибиторов металло- $\beta$ -лактамазы NDM-1 в пятом подразделе.

Выводы диссертации Кривицкой А.В. соответствуют поставленным задачам, формулируют новизну исследования и теоретическую значимость работы. Изложение материала внятное и легко воспринимается.

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

Степень обоснованности научных положений и сформулированных в диссертации выводов Кривицкой А.В. определяется грамотно сформулированными задачами, корректно выбранными методами расчетов, проведением советующих контрольных расчетов и статистической обработкой результатов. Поставленные задачи решены полностью. Научные положения и выводы, сформулированные в диссертации, обоснованы и

логически вытекают из представленного материала. Они соответствуют содержанию работы, аргументированно доказываются соответствующими исследованиями.

### **Новизна и научная значимость**

В данной работе методом молекулярной динамики с комбинированными потенциалами квантовой механики/молекулярной механики установлены молекулярные механизмы антибиотикорезистентности ферментов, критически важных для формирования бактериальной стенки. Определены механизмы инактивации антибиотиков ферментами, действие которых является превалирующим механизмом бактериальной резистентности. Дескрипторы электронной плотности позволили оценить особенности формирования фермент-субстратных комплексов и выделить факторы, влияющие на эффективность рассмотренных лекарственных препаратов. Уравнения, связывающие экспериментальные макросвойства системы и микросвойства системы из расчета можно использовать для поиска новых антбактериальных препаратов.

### **Достоверность научных положений, выводов и рекомендаций**

Положения, выносимые на защиту достоверны, результаты согласуются и дополняют известную информацию из литературных источников. Работа выполнена на высоком научно-методическом уровне с применением современных методов описания электронной структуры и молекулярного моделирования. 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. Основные результаты работы представлены автором в форме 21 устного доклада и стенда на российских и международных конференциях.

## **Оценка содержания диссертации в целом, замечания и вопросы по содержанию диссертации.**

Работа выполнена на высоком научно-методологическом уровне. Полученные автором результаты не вызывают сомнений, выводы обоснованы и подкреплены теоретическими расчетами самыми современными методами.

В работе установлен молекулярный механизм инактивации имипенема металло- $\beta$ -лактамазами L1 и NDM-1, показано, что рост резистентности в ряду пенициллин-связывающих белков 2 связан не только с изменением в сродстве данных ферментов к цефтриаксону, но и с изменением непосредственно механизма ацилирования. Данные результаты можно получить только с применением высокоуровневого молекулярного моделирования. В работе предложены уравнения, определяющие взаимосвязь рассчитываемых микроскопических параметров и экспериментально наблюдаемых свойств системы, для прогнозирования новых соединений. Полученные уравнения можно использовать для поиска новых антибактериальных препаратов.

**Диссертационная работа выполнена на высококачественном уровне, из замечаний можно отметить следующее:**

1. В целом хотелось бы, чтобы больше внимания было уделено рациональному обоснованию выбора функционалов для проведения расчетов методом теории функционала плотности. Остаются вопросы почему один из трех рассмотренных в работе функционалов дал результаты согласующиеся с экспериментом, а другие нет? Существуют ли другие функционалы, которые могут дать лучшее согласие с экспериментом? Насколько ограничена область применения выбранного функционала – можно ли его применять для анализа ферментативных реакций подобного класса, других классов? Аналогичные вопросы возникают относительно выбора силовых полей молекулярной механики.

2. На стр. 107 представлена таблица 3.4.2.1, содержащая расчетные значения  $k_{cat}$  для модифицированного цефокситина. Дважды фторированному цефокситину соответствует значение  $-0.3 \pm 3.9 \text{ c}^{-1}$ . Данная запись некорректна, обычно в литературе принято в таком случае писать  $\leq 3.6 \text{ c}^{-1}$ .
3. В задаче об исследовании роста резистентности в ряду пенициллин-связывающих белков в реакции с цефтриаксоном не оценены константы диссоциации для мутантных форм. Автор пробовал оценить количественно данный параметр, применяя метод направленной молекулярной динамики с последующим анализом свободной энергии Гиббса процесса выхода субстрата из каталитического кармана. Результаты таких расчетов сильно зависят от выбранной координаты реакции. Возможно, следовало использовать метод алхимических преобразований.
4. Текст диссертации логичен и легко читаем, однако имеются опечатки и некоторые несоответствия. Например, несоответствие подписи таблицы 3.4.2.1 и ее содержания.

#### **Заключение:**

Вместе с тем, указанные замечания не умаляют значимости диссертационного исследования. 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 физико-математических наук,  
член-корреспондент РАН, профессор кафедры биоинженерии биологического факультета МГУ имени М.В. Ломоносова.  
Федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение высшего образования «Московский государственный университет имени М.В. Ломоносова»

Шайтан Алексей Константинович

Контактные данные:

Тел.: +7(495)-939-57-38, e-mail: shaytan\_ak@mail.bio.msu.ru  
Специальность, по которой официальным оппонентом  
защищена диссертация: 03.01.09 - Математическая биология, биоинформатика  
(физико-математические науки)  
Адрес места работы: 119234, Россия, г. Москва, Ленинские горы, д. 1, стр. 12.  
Федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение высшего  
образования «Московский государственный университет имени М.В.  
Ломоносова», биологический факультет, кафедра биоинженерии  
Тел.: +7(495)-939-57-38, e-mail: shaytan\_ak@mail.bio.msu.ru

Подпись сотрудника профессора кафедры биоинженерии биологического факультета  
ФГБОУ ВО «Московский государственный университет имени М.В. Ломоносова»  
Шайтан А.К. удостоверяю:

Ученый секретарь биологического факультета  
МГУ имени М.В. Ломоносова

Е.В. Петрова

