

**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 работы обуславливается выбором темы и применяемыми методами исследования. Бактериальная резистентность к β -лактамным антибиотикам является серьезной проблемой здравоохранения, так как на β -лактамные антибиотики приходится большая часть назначений в медицинской практике. Для многих инфекций при наличии устойчивости цефалоспорины заменяются карбапенемами. В данной работе разобран механизм устойчивости к антибиотику карбапенемового ряда β -лактамазами. Знания о механизме действия рассматриваемых β -лактамаз позволило построить уравнения для прогнозирования новых антибактериальных соединений, антибиотиков и ингибиторов для данных ферментов. В работе разобран пример второго по распространенности механизма устойчивости – модификации пенициллин-связывающих белков. Был показан немаловажный факт, что мутации, возникающие в пенициллин-связывающих белках 2 затрагивают не только сродство фермента к антибиотику, но и непосредственно реакцию в активном центре. Данное наблюдение может быть полезно при конструировании потенциальных молекул против гонореи. Тем более, что на данный момент цефтриаксон является монотерапией во многих странах, а в Китае уже известно о устойчивой ко всем видам лечения гонореи. Отдельно стоит отметить задачу о выборе подходящего метода расчета. Подбор адекватного метода описания таких сложных и заряженных систем как рассматриваемые это важный этап работы, так как зачастую не все рекомендуемые в литературе методы действительно подходят. В диссертации Кривицкая А.В. проводит исследования самыми современными и точными с точки зрения вычислений методами применимыми для

биомакромолекул. В каждой задаче проведена отдельно динамика фермент-субстратного комплекса и после чего выбиралась точка расчета профиля. Данный подход не только дает понимание устройства активного центра фермента, но и позволяет избежать излишне завышенных энергетических профилей, что повсеместно встречается в расчетных работах.

Структура и объем диссертации

Диссертация содержит разделы «Введение», «Обзор литературы», «Материалы и методы», «Результаты и их обсуждения», «Заключение» и «Выводы». 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.

Глава «Обзор литературы» состоит из пяти подразделов. Первые два подраздела посвящены β -лактамам антибиотикам: истории их создания, классификации, механизму действия на разные виды бактерий и современному положению по использованию. Вторые два подраздела освещают вопросы резистентности, ее возникновения и роста, известных механизмов резистентности к β -лактамам антибиотикам, классификации β -лактамаз. Пятый подраздел посвящен методам борьбы с резистентностью, преимущественно обзору ингибиторов β -лактамаз.

Вторая глава «Материалы и методы» состоит из девяти подразделов, в которых дана исчерпывающая информация о применяемых методах исследования, представлено обоснование выбора используемых подходов с детализацией выбранных параметров расчетов.

Третья глава посвящена результатам и их обсуждению и состоит из пяти подразделов в соответствии поставленным задачам. В первом подразделе представлены результаты выбора метода расчета на примере расчета реакции гидролиза нитроцефина металло- β -лактамазой L1. Представлен анализ динамики фермент-субстратного комплекса и профилей элементарных стадий реакции тремя

методами. Наиболее согласие между результатами расчетов и известными экспериментальными данными достигнуто при расчете методом РВЕ0-D3. Во втором подразделе установлен механизм инактивации антибиотика карбанемового ряда - имипенема двумя металло- β -лактамазами L1 и NDM-1. Показана разница протекания реакции в активных центрах данных ферментов. Для L1 и NDM-1 в четвертом и пятом подразделах построены уравнения по типу QSAR. В третьем подразделе исследовано изменение механизма ингибирования пенициллин-связывающих белков 2 из *Neisseria Gonorrhoeae* цефтриаксоном при появлении ряда мутаций. Показано влияние мутация на реакцию в активном центре фермента.

В «Заключении» даны основные выводы по всем каждому этапу работы. Выводы диссертации четко сформулированы, соответствуют поставленным задачам, обозначают теоретическую значимость и научную новизну исследования.

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

Представленные научные положения и выводы полностью соответствуют материалам диссертации. Задачи работы грамотно составлены и полностью решены, для их решения выбраны корректные методы. Обоснованность научных положений и выводов диссертации Кривицкой А.В. не вызывает сомнений.

Новизна и научная значимость

В диссертации исследуются актуальные задачи: установление механизма инактивации имипенема, оценивается роль мутаций на реакцию в активном центре пенициллин-связывающих белков, представлены два уравнения для поиска негидролизующихся антибиотиков для L1 и ингибиторов для NDM-1. Для построения уравнений используются дескрипторы электронной плотности, которые позволяют оценить особенности формирования фермент-субстратных комплексов и выделить факторы, влияющие на эффективность рассмотренных соединений. Уравнения построены альтернативным и перспективным методов, основанном на наиболее точных оценках взаимодействий, доступных для биомакромолекул.

Достоверность научных положений, выводов и рекомендаций

В работе применены самые современные методы описания реакции в активном центре ферментов, что указывает на достоверность полученных

результатов. Положения, 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.

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

Диссертационная работа Кривицкой А.В. выполнена на высоком методологическом уровне. Все результаты достоверны и не вызывают сомнений, научные положения и выводы логически вытекают из материала диссертации. Работа посвящена такому актуальному направлению как изучение механизмов резистентности к β -лактамным антибиотикам. Продукция β -лактамаз и модификации пенициллин-связывающих белков являются двумя основными механизмами устойчивости. Проведено исследование примеров этих механизмов: гидролиз имипенема металло- β -лактамазами L1 и NDM-1 и реакция ингибирования ряда пенициллин-связывающих белков 2 цефтриаксоном. При исследовании данных механизмов выявлены важные факторы, которые расширяют область знания в целом, а также могут иметь приложение при поиске потенциальных антибактериальных соединений. Также в работе предложены уравнения, определяющие взаимосвязь рассчитываемых характеристик электронной плотности и экспериментально наблюдаемых параметров, для прогнозирования новых соединений. Все результаты получены с использованием современных подходов по изучению биомакромолекул расчетными методами.

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

1. Сравнение результатов, полученных с использованием функционалов VNHLYP-D3, V3LYP-D3 и PBE0-D3, на данном этапе проводится косвенно. Для повышения точности и обоснованности выводов хорошо было бы провести более детальное и прямое сравнение с результатами других теоретических исследований и экспериментальных данных. Это позволит более надежно оценить применимость и точность используемых методик в дискриминации активированных и неактивированных состояний фермент-субстратного

- комплекса. Также в работе сравниваются гибридные функционалы с разным вкладом хартри-фоковского обмена, однако есть и другая группа функционалов с разными вкладами для разных расстояний, такие как wB97x или CAM-B3LYP.
2. «Согласно спектроскопическому исследованию, в ходе реакции накапливается второй интермеднат, следовательно он должен быть стабилизирован относительно ES и II. Энергетический барьер, вычисленный из экспериментальных данных, составляет 14,3 ккал/моль» «Данные расчётов согласуются с результатами экспериментальных исследований по время-разрешенной УФ-видимой и ЯМР спектроскопии, доступными из литературных источников.» Так как экспериментальные исследования не проводились в рамках данной работы, то необходимо указать ссылку на исследования, с результатами которых проводится сравнение.
 3. На рисунке 3.3.3.1 представлен энергетический профиль связывания RBP2 с цефтриаксоном, согласно которому реакция идет безбарьерно. Возможно, следовало бы провести расчеты связывания RBP2 с цефтриаксоном, используя другие функционалы, чтобы проверить надежность полученных результатов и исключить возможные артефакты выбранного метода.
 4. Автор строит зависимость для IC50 борных ингибиторов по силе координационных связей ингибитора с катионами цинка. Возможно, стоит ввести дополнительные критерии, относящиеся к взаимодействию остальной части ингибитора с остатками каталитического кармана?

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:

Кандидат физико-математических наук,
научный сотрудник отдела материаловедения ООО "Кинтех Лаб"

Полынская Юлия Геннадьевна

3 июня 2024 года

Контактные данные:

Тел.: 8 () e-mail: yupol@kintechlab.com

Специальность, по которой официальным оппонентом защищена диссертация:
02.00.04 – Физическая химия, 02.00.17 – Математическая и квантовая химия
(физико-математические науки).

Адрес места работы:

123298, Россия, г. Москва, ул. 3-я Хорошевская, д. 12.

ООО "Кинтех Лаб", отдел материаловедения

Тел.: () -mail: yupol@kintechlab.com

Подпись научного сотрудника отдела материаловедения ООО "Кинтех Лаб"

Полынской Ю.Г. удостоверяя

