

## ОТЗЫВ

официального оппонента диссертационной работы

Филипповой Анны Андреевны на тему «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 антибиотико-резистентных патогенов за последние годы стала одной из наиболее значимых в защите здоровья населения. Избыточное использование антибиотиков, не оправданное терапевтическими рекомендациями, широкое применение многих антибиотиков в животноводстве с их последующей циркуляцией по трофическим цепям, рост уровня антибиотиков в окружающей среде приводят к существенному возрастанию доли антибиотико-резистентных микроорганизмов – возбудителей распространенных заболеваний. Международное сообщество «GBD 2019 Antimicrobial Resistance Collaborators» на основании анализа глобальных данных в недавней публикации в журнале *Lancet* (DOI: 10.1016/S0140-6736(22)02185-7) отмечает, что бактериальные инфекции вышли на второе место как причины смертности – 13.6% - и прогнозирует дальнейший рост этой величины при продолжении плохо контролируемого применения антибиотиков.

На сегодняшний день установлены основные механизмы антибиотико-резистентности и гены, обеспечивающие синтез защитных белков у резистентных микроорганизмов. К наиболее значимым способам защиты, используемым бактериями, следует отнести ферментативное расщепление бета-лактамных антибиотиков. Бета-лактамазы, выявленные у резистентных штаммов патогенных микроорганизмов, крайне вариабельны, описано около трех тысяч разновидностей фермента, объединяемых на основании структурной близости в четыре класса.

С учетом имеющихся знаний при индивидуальном выборе терапевтических мероприятий для пациента важно не только оценить резистентность патогена к тем или иным лекарствам, но и охарактеризовать уровень защиты – интенсивность синтеза бета-лактамаз или иных протекторных веществ. Принципиальное значение имеет оперативное получение такой информации, так как при оценке схем терапии *in vivo* и их последующей коррекции эффективная терапия может начаться слишком поздно с серьезными негативными последствиями для пациента. В связи с этим активно развиваются аналитические технологии для выявления и оценки содержания биомаркеров, характеризующих антибиотикорезистентность выделяемых у пациента патогенных

микроорганизмов. Однако получаемая при использовании таких тест-систем информация в подавляющем большинстве случаев не является количественной, что снижает ее информативность. В диссертационном исследовании А.А. Филипповой представлена разработка метода мультиплексного количественного определения мРНК бета-лактамаз разных классов, что, с учетом вышеизложенного, соответствует крайне **актуальной** задаче.

Решение этой задачи представлено в диссертационной работе А.А. Филипповой. Диссертация имеет традиционную структуру, включая введение, обзор литературы (3 главы), материалы и методы, результаты и обсуждение (5 глав), выводы и список литературы (229 ссылок). Работа изложена на 134 страницах, содержит 18 таблиц и 36 рисунков.

Подготовленная диссертация и публикации А.А. Филипповой отражают успешное достижение цели исследования. Диссертантом опубликовано пять статей в рецензируемых научных изданиях, включая статью в журнале *Biosensors* (импакт-фактор WoS = 5,743), одна статья в сборнике и семь тезисов докладов на международных и российских научных конференциях. Работы строго соответствуют тематике диссертационного исследования и биотехнологической научной области, представляя разработку и характеристику колориметрических биочипов низкой плотности с ферментативной детекцией.

Успешно развивая исследования по этому направлению, проводящиеся на кафедре химической энзимологии Химического факультета МГУ им. М.В. Ломоносова и направленные на создание аналитических систем для выявления различных патогенов, А.А. Филиппова реализует ряд новых подходов, расширяющих возможности биочиповой технологии. Важно отметить методическое разнообразие проведенных исследований, включавших конструирование плазмид, наработку и очистку препаратов мРНК, необходимых для калибровки количественных аналитических методов, разработку дизайна биочипов, изучение взаимодействий в предложенной системе, характеристику ее параметров и широкую апробацию с использованием панели клинических штаммов *Enterobacteriaceae*, а также изучение концентрационных зависимостей индукторного действия антибиотиков на синтез мРНК. Разнообразие освоенных методов подтверждает приобретение А.А. Филипповой высокой квалификации в области биотехнологии. Обоснованный выбор используемых наиболее информативных методов, детальность и корректность их изложения в диссертации, а также проведение всех необходимых контрольных экспериментов и статистическая достоверность измерений обеспечивают однозначную интерпретацию результатов исследования.

**Научная новизна** проведенного исследования определяется получением следующих основных результатов.

- разработка метода колориметрического мультиплексного определения концентраций специфичных мРНК бета-лактамаз на биочипах низкой плотности;
- предложены и обоснованы критерии выбора последовательностей специфичных олигонуклеотидных зондов для одновременного мультиплексного определения концентраций мРНК разных генов на биочипах;
- установлены требования к структуре (дизайну) биочипа, обеспечивающие достоверное определение концентраций нескольких мРНК с высокой точностью;
- описаны концентрационные зависимости влияния бета-лактамов разных групп на транскрипцию генов бета-лактамаз плазмидной локализации у мультирезистентных бактерий семейства *Enterobacteriaceae*;
- обнаружено увеличение транскрипции всех плазмидно-кодируемых генов бета-лактамаз, культивируемых в присутствии меропенема.

Результаты разработки обеспечивают возможность эффективной характеристики механизмов устойчивости бактерий к антибактериальным препаратам и поиска новых способов подавления экспрессии бета-лактамаз у антибиотико-резистентных патогенных микроорганизмов. Технология колориметрических биочипов низкой плотности с ферментативной детекцией в сочетании с пробоподготовкой ДНК-мишени из фракции общей РНК бактериальных культур обеспечивает мультиплексное количественное определение мРНК бета-лактамаз разных классов с высокой чувствительностью, воспроизводимостью и производительностью.

Нельзя не отметить также значительную **практическую значимость** результатов, полученных А.А. Филипповой. Разработанный аналитический метод характеризуется высокой чувствительностью и позволяет количественно определять концентрации мРНК четырех клинически значимых типов бета-лактамаз: TEM, CTX-M-1, NDM и OXA-48. Показана высокая селективность определения, отсутствие перекрестных реакций при мультиплексных измерениях. Возможность проводить тестирование в лунках 96-луночного планшета обеспечивает высокую производительность измерений по сравнению с альтернативными вариантами реализации биочипов. Результаты апробации, проведенной в рамках исследования, подтверждают применимость разработанной аналитической системы для характеристики клинических штаммов *Enterobacteriaceae*, культивированных в присутствии бета-лактамных антибиотиков, в том числе для мультирезистентных патогенов.

Изложение материала в диссертации хорошо структурировано, полностью отражая результаты исследований и их интерпретацию. Диссертация представляет собой законченную работу, обозначенные во введении научная проблема и экспериментальные научные задачи успешно решены диссертантом. Автореферат информативно отражает основные результаты исследований и их интерпретацию.

При ознакомлении с диссертацией возникли некоторые **замечания и вопросы**.

1. Авторы используют для количественной оценки содержания мРНК в пробах сравнение с градуировочной кривой, построенной для синтезированного препарата мРНК. На чем основана уверенность, что в обоих случаях селективное связывание и последующая генерация сигнала идут с той же скоростью и эффективностью?

2. Утверждение о том, что ОХА-48 длиной 959 нуклеотидов не содержит элементов структурирования, неожиданно. Вторичные и третичные структуры весьма часто встречаются в природных РНК. Рассматривались ли при прогнозировании структуры РНК только канонические пары нуклеотидов? Какое программное обеспечение использовалось при решении этой задачи?

3. В диссертации соотношение A260/A280 рассматривается как основа для выводов о чистоте мРНК, полученных для использования в градуировочных кривых, то есть об отсутствии белковых примесей (стр. 59). При этом в таблице 6 соотношение A260/A280 существенно варьирует – от 2.13 до 2.51. В принципе, это изменение коррелирует с процентом ГЦ-пар, что объясняет такие отличия. Однако тогда способ оценки чистоты препаратов остается непроясненным.

4. На рис. 23 отличия между сигналами для спейсеров длиной 10, 13 и 24 нуклеотида статистически не достоверны. Это не отвергает выбора варианта 13 нуклеотидов, но требует более корректного обсуждения на стр. 72.

Вышеизложенные соображения носят частный и дискуссионный характер, не влияют на обоснованность положений, выносимых на защиту, и не снижают общую положительную оценку диссертационной работы. Диссертантом решена важная научная и практическая задача в области биотехнологии – на основании изученных закономерностей взаимодействий в мультиплексных биочипах низкой плотности разработаны эффективные системы для количественного определения уровней мРНК бета-лактамаз у патогенных микроорганизмов.

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,  
руководитель отдела лиганд-рецепторных взаимодействий и биосенсорики;  
заведующий лабораторией иммунобиохимии  
Федерального исследовательского центра  
«Фундаментальные основы биотехнологии»  
Российской академии наук (ФИЦ Биотехнологии РАН)

Дзантиев Борис Борисович

« 01 » 12 2022 г.

Контактные данные:  
Тел.: 8-495-954-31-42  
E-mail: dzantiev@inbi.ras.ru  
Адрес места работы:  
119071 Москва, Ленинский проспект, д. 33, стр. 2.

*Подпись сотрудника ФИЦ Биотехнологии РАН  
Дзантиева Бориса Борисовича удостоверяю*

Ученый секретарь  
ФИЦ Биотехнологии РАН, кб.н.

Орловский Александр Федорович

« 01 » 12 2022 г.