

## 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

Множественно устойчивые бактерии, резистентные к действию нескольких классов антибактериальных препаратов, представляют серьезную угрозу современному здравоохранению. Особо опасно распространение патогенных бактерий - возбудителей внутрибольничных инфекций, многие из которых характеризуются мульти- и пан-резистентность к антибиотикам. Резистентность таких бактерий к антибактериальным препаратам обусловлена наличием в их геноме множества генетических детерминант резистентности, в том числе кодирующих различные бактериальные ферменты. Основными механизмами распространения резистентности считается распространение устойчивых клонов, а также внутри- и межвидовое распространение мобильных генетических элементов. Важное значение для поиска новых стратегий борьбы с антибиотикорезистентностью и изучения ее механизмов является разработка технологий молекулярно-генетического анализа. Несмотря на внедрение в клиническую практику методов, направленных на идентификацию детерминант резистентности, нерешенным остается вопрос об определении экспрессирующихся генов. Этот вопрос является актуальным в связи с участвовавшими случаями несовпадения результатов фенотипических и молекулярно-генетических методов. Существующие технологии, описанные в литературных источниках диссертационной работы, имеют ряд недостатков в мультиплексности, сложности получения результатов и анализа низко экспрессирующихся генов. В связи с этим диссертационная работа Филипповой А.А. посвящена актуальной теме - разработке нового метода количественного метода определения экспрессии генов резистентности с использованием технологии биочипов низкой плотности. В качестве объектов исследования выбраны клинически значимые бета-лактамазы, обуславливающие устойчивость бактерий к бета-лактамам антибиотикам - наиболее часто используемому классу антибактериальных препаратов для лечения бактериальных инфекций.

Диссертационная работа А.А. Филипповой состоит из введения, обзора литературы, описания материалов и методов, результатов и их обсуждения, выводов и списка цитируемой литературы. Работа изложена на 134 страницах машинописного текста, содержит 18 таблиц и 36 рисунков. Список литературы включает 229 ссылок. Во введении обоснована актуальность выбранной темы диссертационной работы и объектов

исследования, сформулированы цель и задачи работы, научная новизна и практическая значимость и положения, выносимые на защиту.

Литературный обзор диссертационной работы Филипповой А.А. направлен на обоснование актуальности проблемы антибиотикорезистентности. В одном из разделов рассмотрена проблема распространенности возбудителей инфекционных заболеваний среди грамотрицательных бактерий. В следующем разделе описаны клинически значимые бета-лактамазы, их структурные особенности и субстратная специфичность. Автором проведен анализ частоты встречаемости бета-лактамаз разных молекулярных классов и типов у клинических штаммов, на основании которого выбраны объекты исследования. В заключительном разделе литературного обзора рассмотрены известные механизмы развития антибиотикорезистентности и описанные в литературе экспериментальные данные об индукции генов антибиотикорезистентности под действием антибактериальных препаратов. Также в этой главе описаны современные методы, используемые для анализа экспрессии генов. Критически охарактеризованы недостатки существующих технологий, что обосновывает необходимость разработки нового метода, что и являлось целью диссертационной работы.

Достижение поставленной в диссертационной работе цели решается последовательным решением четко сформулированных задач. Для анализа транскриптов генов бета-лактамаз в диссертационной работе было предложено использовать технологию биочипов низкой плотности, применяемую для идентификации генов, дополнив ее этапом пробоподготовки. Для количественного анализа предложено использовать стандартные образцы мРНК клинически значимых бета-лактамаз, проходящие все этапы анализа параллельно с исследуемыми образцами. Это решение является нестандартным и существенно отличается от существующих технологий, используемых для анализа экспрессии генов. В диссертационной работе были получены синтетические стандартные образцы четырех клинически значимых бета-лактамаз: TEM-, CTX-M-1-, NDM-, OXA-48-типов. Стандартные образцы, последовательности которых содержали полноразмерный ген бета-лактамазы соответствующего типа, были получены в реакции транскрипции *in vitro* из образцов ДНК штаммов *E. coli* – продуцентов рекомбинантных бета-лактамаз данных типов.

В работе Филипповой А.А. оптимизированы условия пробоподготовки бактериальных культур для проведения гибридационного анализа, что позволило разработать чувствительный и воспроизводимый метод анализа транскриптов генов бета-лактамаз. Основное достижение метода, разработанного Филипповой А.А. – возможность его проведения в мультиплексном режиме на каждом из этапов. Высокая селективность

метода обусловлена тщательным выбором условий проведения реакций обратной транскрипции, ПЦР и гибридизационного анализа, структур специфичных праймеров и олигонуклеотидных зондов. Мультиплексность метода является важным параметром для анализа мультирезистентных бактерий, содержащих несколько генов резистентности одновременно.

В следующей части диссертационной работы получены градуировочные кривые с использованием стандартных мРНК и определены аналитические характеристики метода в отношении определения мРНК четырех генов бета-лактамаз:  $7 \pm 1$  пМ (TEM-1),  $5 \pm 0,7$  пМ (CTX-M-116),  $6 \pm 0,9$  пМ (NDM-1),  $7 \pm 1$  пМ (OXA-48). Также показана применимость метода при анализе смеси стандартных образцов мРНК генов бета-лактамаз в различных сочетаниях концентраций.

В заключительной части диссертационной работы Филиппова А.А. провела апробацию разработанного метода на клинических штаммах, устойчивых к действию бета-лактаменных антибиотиков и содержащих от 1 до 3 генов бета-лактамаз плазмидной локализации. В работе автор определила изменения транскрипции мРНК генов бета-лактамаз у бактериальных штаммов при культивировании в присутствии различных концентраций бета-лактаменных антибиотиков четырех типов (ампициллин, цефтазидим, меропенем, азтреонам) в широком диапазоне концентраций. С использованием разработанного метода удалось выявить разнонаправленные эффекты увеличения, снижения и сохранения транскрипции мРНК генов бета-лактамаз, что указывает на хорошую чувствительность метода, применимую для анализа клинических бактериальных штаммов.

Диссертационная работа Филипповой А.А. является комплексным научным исследованием, проведенным с использованием современных методов молекулярной биологии и аналитической биотехнологии, и направленным на решение задач актуальных задач клинической медицины. Автором выполнен большой объем экспериментальной работы, полученные результаты достаточно подробно описаны, а сделанные выводы логично сформулированы. Результаты, полученные в работе, несомненно, представляют научную и практическую значимость.

Научная новизна диссертационной работы состоит в осуществлении принципа количественного определения генов методом гибридизационного анализа с использованием стандартных образцов. Реализация такого подхода, в котором стандартные образцы проходят все этапы многостадийного анализа вместе с исследуемыми образцами, позволяет стандартизовать метод и получить более воспроизводимые результаты. К практически важным результатам нужно отнести

использование 96-луночных планшетов для размещения биочипов в их лунках. Использование данной технологии позволяет существенно увеличить производительность метода и повысить точность определения. С использованием разработанного метода автор показала, что технология колориметрических биочипов в лунках планшетов применима для анализа транскриптов генов бета-лактамаз клинических штаммов *Enterobacteriaceae*, культивированных в различных условиях. Разработанный метод количественного определения специфичных мРНК может быть использован для изучения механизмов формирования устойчивости бактерий к АБП и поиска новых способов подавления экспрессии БЛ. В частности, он может быть использован для подробной характеристики экспрессии генов бета-лактамаз у бактерий с множественной устойчивостью к антибиотикам в сочетании с другими микробиологическими и молекулярно-биологическими методами.

Принципиальных возражений и замечаний по диссертации нет, в то же время хотелось бы остановиться на некоторых вопросах, требующих пояснений и дополнительного обсуждения.

1. Описанная автором методика получения периплазматических фракций бактерий скорее позволяет получить тотальный лизат бактериальных клеток, а не периплазматическую фракцию.

2. Следует отметить, что выявленное авторами расхождение данных о количестве клеток, выросших в жидкой питательной среде в присутствии АБП за 4 часа, со значениями МПК, скорее всего, связано с недостаточной стандартизацией использованных авторами методических подходов.

3. При анализе результатов оценки влияния бета-лактамных антибиотиков на уровень транскрипции генов бета-лактамаз следует обсудить методические особенности постановки экспериментов. Так, при оценке экспрессии потенциально индуцибельных генов принято сравнивать экспрессию исследуемого гена и референтного гена с конститутивным уровнем экспрессии. Использованный автором подход отличается от указанного.

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:

член-корреспондент РАН, доктор медицинских наук, профессор,  
заведующий научно-исследовательским отделом медицинской микробиологии и молекулярной эпидемиологии Федерального государственного бюджетного учреждения «Детский научно-клинический центр инфекционных болезней федерального медико-биологического агентства»

Сидоренко Сергей Владимирович

Контактные данные:

Тел.: +7(812)347-49-13

Адрес места работы: 197022. Санкт-Петербург, ул. Профессора Попова, д.9

E-mail: sidorserg@niidi.ru

