

119121, гор. Москва, ул. Погодинская, 10, стр.8

тел.: (+7/499) 246-69-80, (+7/499) 246-34-66, факс: (+7/499) 245-08-57, эл. почта: inst@ibmc.msk.ru, http://www.ibmc.msk.ru
ОКПО 01897373, ОГРН 1027739053792, ИНН/КПП 7704084419 / 770401001, ОКАТО 45286590000

№ 286

«10» Июль 2017 г.

“УТВЕРЖДАЮ”

Директор ФГБНУ «Научно-исследовательский институт биомедицинской химии имени В.Н. Ореховича»,
академик РАН

Лисица А.В.

«10» Июль 2017 г.

ОТЗЫВ ВЕДУЩЕЙ ОРГАНИЗАЦИИ

на диссертацию **Поболеловой Юлии Илдаровны**

«Колориметрические микрочипы для мультианализа генов карбапенемаз, обуславливающих устойчивость бактерий к бета-лактамам антибиотикам», представленную на соискание ученой степени кандидата химических наук по специальностям 03.01.06 – биотехнология (в том числе бионанотехнологии) и 03.01.04 – биохимия

Диссертационная работа Поболеловой Ю.И. посвящена разработке метода гибридизационного анализа на микрочипах для идентификации генов бактериальных ферментов - карбапенемаз. В настоящее время устойчивость микроорганизмов к бета-лактамам антибиотикам представляет собой серьезную проблему. Поскольку один из основных механизмов резистентности к данной группе антибиотиков базируется на возможности этих микроорганизмов осуществлять ферментативный гидролиз бета-лактамазами, то выявление и мониторинг активности этих ферментов важен для целей инфекционного контроля и выбора правильной тактики лечения пациентов. Карбапенемазы представляют собой бета-лактамазы с самым широким профилем субстратной

специфичности, включающем практически все виды бета-лактамных антибиотиков. Учитывая актуальность проблем, связанных с диагностикой инфекционных заболеваний, особенно их форм, вызываемых микроорганизмами, резистентными к антибиотикам, поставленная в диссертационной задаче цель разработать метод идентификации всех карбапенемаз является значимой и актуальной. Эффективной технологией с точки зрения многопараметрического анализа и идентификации большого количества генов в одном анализе является технология на базе олигонуклеотидных микрочипов. Данная технология является достаточно быстродействующей за счет мультиплексности и информативности; имеет значительные преимущества перед традиционными молекулярно-биологическими методами.

Диссертация построена по традиционному плану и состоит из введения, обзора литературы (3 главы), описания материалов и методов исследования (1 глава), изложения результатов работы и их обсуждения (7 глав), выводов, списка литературы и приложения. Диссертация изложена на 157 страницах, включает 22 таблицы, 68 рисунков. Список цитируемой литературы содержит 244 библиографических источников. Большинство публикаций датировано 2013-2016 годами.

Во введении автор обосновывает актуальность исследуемой проблемы идентификации бактериальных ферментов карбапенемаз у возбудителей инфекционных заболеваний, показывает, что в основе механизма развития резистентности бактерий к бета-лактамным антибиотикам лежит продукция ферментов бета-лактамаз и карбапенемаз.

В литературном обзоре диссертационной работы подробно изложены механизмы устойчивости микроорганизмов к антибиотикам, основы современной классификации бета-лактамаз, а также данные по строению, субстратной специфичности и распространённости основных типов карбапенемаз. Проводится подробный анализ методов определения карбапенемаз, обсуждаются их преимущества и недостатки. Отдельная глава посвящена технологии олигонуклеотидных микрочипов. В ней рассматриваются различные способы проведения гибридизационного анализа на микрочипах, описаны существующие методы идентификации карбапенемаз на микрочипах.

В разделе «Материалы и методы» приводится перечень использованных химических и биологических реагентов, современных приборов и оборудования, использование которых обеспечило достоверность полученных результатов. Подробно описаны использованные в работе методы, условия проведения всех стадий гибридационного анализа на микрочипах с колориметрической детекцией на основе пероксидазы хрена, принципы обработки результатов анализа для проведения идентификации генов на олигонуклеотидных микрочипах.

Раздел «Результаты и обсуждение» состоит из нескольких глав. В главе 5 описаны процедуры сбора и дальнейшей работы с олигонуклеотидными последовательностями генов карбапенемаз, деление их на подгруппы, указана основная сложность определения карбапенемаз, связанная с их сильной разнородностью. В главе 6 приводятся результаты оптимизации условий полимеразной цепной реакции (ПЦР), в том числе в формате мультиплексной реакции для одновременной амплификации генов карбапенемаз восьми типов. Также в этой главе описана разработка мультиплексной ПЦР для совместной амплификации генов карбапенемаз и бета-лактамаз молекулярного класса А типов TEM, SHV и CTX-M. В главе 7 описано проведение молекулярного дизайна зондов для идентификации карбапенемаз с использованием меченой биотином ДНК-мишени или немеченой ДНК-мишени и зондов двух типов – «улавливающих», иммобилизованных на поверхности микрочипа и «детектирующих», содержащих биотиновую метку. В этой главе наиболее существенным результатом работы является анализ влияния расположения зондов на цепи ДНК-мишени на процесс гибридизации. В главе 8 приведены результаты оптимизации условий гибридизации (температуры, солевого состава буфера, времени анализа) в двух форматах – с использованием меченой и немеченой ДНК-мишени. В данной главе также проведено сравнение чувствительности и специфичности гибридационного анализа с использованием этих двух схем гибридизации, для проведения дальнейшего анализа на микрочипах выбрана «сэндвич» схема гибридизации как наиболее эффективная. В главе 9 автор приводит результаты идентификации генов карбапенемаз на колориметрических микрочипах с использованием немеченой ДНК-мишени и

«сэндвич» схемы гибридизации. В главе 10 описаны результаты разработки интегрированного микрочипа для одновременной идентификации восьми типов карбапенемаз и трех типов бета-лактамаз, относящихся к молекулярному классу А. В главе 11 приведены результаты тестирования клинических образцов грамотрицательных микроорганизмов на разработанных микрочипах для идентификации карбапенемаз и интегрированных микрочипах для одновременной идентификации карбапенемаз и бета-лактамаз молекулярного класса А. Полученные в работе данные хорошо и последовательно изложены, сопровождаются наглядными иллюстрациями.

В научном плане полученные автором результаты обладают несомненной новизной. В диссертации разработан принцип одновременной идентификации разнородных и близкородственных генов на примере определения генов карбапенемаз 8 типов (с низкой степенью гомологии ферментов внутри типа) с дополнительным типированием по высокогомологичным подгруппам. Впервые разработана методика совместной амплификации генов карбапенемаз 8 типов (KPC, VIM, IMP, SPM, NDM, SIM, GIM, OXA) и полноразмерных генов бета-лактамаз TEM, SHV и CTX-M типов в процессе мультиплексной ПЦР с одновременным включением метки. На основе выявленных в работе закономерностей поведения олигонуклеотидов, имеющих различное расположение на цепи ДНК-мишени, в гибридизационном анализе на микрочипах сформулированы рекомендации по молекулярному дизайну зондов для идентификации разнородных и близкородственных генов. В работе проведено сравнение двух основных схем проведения гибридизации на микрочипах. Автором показано, что специфичность и чувствительность выявления генов методом гибридизационного анализа на микрочипах с использованием «сэндвич» схемы гибридизации выше, чем для метода гибридизационного анализа с использованием меченой биотином ДНК-мишени.

Полученные результаты имеют большую практическую значимость. В процессе работы были созданы два типа микрочипов – микрочипы для идентификации карбапенемаз 8 типов с дополнительным типированием ферментов по подгруппам и интегрированные микрочипы для одновременного определения карбапенемаз и бета-лактамаз молекулярного класса А. Эти

разработки в перспективе могут иметь большое значение и служить основой для создания диагностических тест-систем нового поколения и улучшения качества диагностики и выбора правильной тактики лечения широкого диапазона социально-значимых инфекционных заболеваний.

Результаты работы могут быть использованы в ФГБНУ «Научно-исследовательский институт биомедицинской химии имени В.Н. Ореховича» (ИБМХ), ФГБУ «Федеральный научно-клинический центр физико-химической медицины федерального медико-биологического агентства» (ФГБУ ФНКЦ ФХМ ФМБА России), ФГБУН Институт биоорганической химии имени академиков М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова Российской академии наук, ФГБУН Институт молекулярной биологии имени В. А. Энгельгардта Российской академии наук (ИМБ РАН), ФГБУН Институт химической биологии и фундаментальной медицины Сибирского отделения Российской академии наук.

Достоверность выводов и результатов, представленных в диссертации, не вызывает сомнений, поскольку исследование проведено методами с использованием современной приборной базы; при этом полученные результаты контролировались независимыми методами и обрабатывались с привлечением методов математической статистики.

В целом, диссертационная работа Поболеловой Ю.И. является законченным комплексным мультидисциплинарным исследованием в области биохимии, молекулярной биологии и биотехнологии. В диссертации нет явных и серьезных недостатков. Однако к ней имеются некоторые замечания:

1. При выборе оптимальной концентрации NaCl в гибридизационном буфере не исследован буфер с концентрацией соли 0,1-0,15 М, соответствующий физиологической концентрации ионов натрия в клетке. Вероятно, такая концентрация была бы оптимальной для проведения анализа.

2. Взят слишком большой интервал значений длины спейсера при проведении подбора оптимальной длины спейсера олигонуклеотидных зондов (рассмотрены длины спейсера 0, 7, 13 и 24 остатка тимидина). Следовало бы проверить также зонды со спейсерами в 9-10 остатков тимидина.

Замечания по работе не являются существенными, не затрагивают результаты и не влияют на выводы.

Выводы диссертации полностью обоснованы и соответствуют полученным результатам. Автореферат полностью соответствует содержанию диссертации. Основные результаты диссертации опубликованы в отечественных и зарубежных научных журналах, результаты работы были представлены на различных российских и международных научных конференциях.

Таким образом, диссертация Поболеловой Ю.И. «Колориметрические микрочипы для мультианализа генов карбапенемаз, обуславливающих устойчивость бактерий к бета-лактамам антибиотикам» представляет собой законченную научную работу, которая по актуальности выбранной темы, объему, завершенности, новизне, научной и практической значимости полученных результатов полностью отвечает требованиям п. 9 Положения о порядке присуждения ученых степеней (утверждено постановлением Правительства РФ от 24 сентября 2013 г. N 842) с изменениями N 335 от 21 апреля 2016 г., а её автор **Поболелова Юлия Илдаровна** заслуживает присуждения ученой степени кандидата химических наук по специальностям 03.01.06 – биотехнология (в том числе бионанотехнологии) и 03.01.04 – биохимия.

Работа была заслушана, обсуждена, отзыв на диссертацию также был обсуждён и одобрен на научном межлабораторном семинаре отдела персонализированной медицины ФГБНУ «Научно-исследовательский институт биомедицинской химии имени В.Н. Ореховича» (протокол N 2 от 4 мая 2017 г.).

Отзыв составил
заведующий лабораторией нанобиотехнологии
ФГБНУ «Научно-исследовательский институт
биомедицинской химии имени В.Н. Ореховича»,
доктор биологических наук

Иванов Иванов Юрий Дмитриевич

119121 Москва, ул. Погодинская, д. 10, стр.8

Федеральное государственное бюджетное научное учреждение
«Научно-исследовательский институт биомедицинской химии
имени В.Н. Ореховича» (ИБМХ)

Телефон: +7 (499) 246-69-80, +7 (499) 246-34-66

Факс: +7 (499) 245-08-57

Электронная почта: inst@ibmc.msk.ru

Сайт: www.ibmc.msk.ru