

ОТЗЫВ ОФИЦИАЛЬНОГО ОППОНЕНТА

**о диссертационной работе Поболеловой Юлии Илдаровны
на тему «Колориметрические микрочипы для мультианализа генов
карбапенемаз, обуславливающих устойчивость бактерий к бета-
лактамным антибиотикам», представленной на соискание учёной
степени кандидата химических наук по специальностям 03.01.06 –
биотехнология (в том числе бионанотехнологии), 03.01.04 – биохимия**

Антибиотикорезистентность патогенных микроорганизмов стала одной из основных проблем медицинской практики последних десятилетий. Сложность разработки новых терапевтических стратегий обусловлена тем, что защита от антибиотиков одного и того же класса реализуется различными резистентными штаммами с использованием разных молекулярно-генетических механизмов. Поэтому необходимо создание и подтверждение эффективности функционирования диагностических систем, позволяющих одновременно сопоставлять генетический материал микроорганизма-возбудителя с большим числом уникальных нуклеотидных последовательностей, характерных для каждого из описанных вариантов антибиотикорезистентности. Показано, что проведение гибридизации на поверхности чипов с массивом нанесенных на нее зон связывания разной специфичности обеспечивает достоверную и производительную диагностику. Однако с учетом расширения знаний о разнообразии вариантов антибиотикорезистентности достоверный мультипараметрический анализ должен основываться на специальном выборе наиболее эффективных зондов, обеспечивающих не только взаимодействие с уникальными последовательностями, но и минимизацию неспецифических взаимодействий для всего массива используемых в мультиплексном анализе зондов. Для решения этой задачи необходимо не простое объединение методик, выбранных для индивидуальных зондов, а комплексное исследование, учитывающие все особенности межмолекулярных биохимических взаимодействий, происходящих на поверхности чипа. Только в этом случае

станет возможным эффективным, востребованный практикой мультипараметрический контроль антибиотикорезистентности.

Вышеизложенные соображения определяют актуальность диссертационной работы, выполненной Ю.И. Поболеловой и направленной на разработку методик гибридизационного анализа ДНК на колориметрических микрочипах для идентификации генов карбапенемаз. Среди генетических маркеров антибиотикорезистентности гены карбапенемаз занимают особое место, определяемое широкой распространенностью такого способа защиты бактерий, его исключительной вариабельностью, а также влиянием на возможность терапевтического применения одного из самых массовых средств антибиотикотерапии – бета-лактамовых препаратов.

Достижение поставленной в работе цели потребовало от диссертанта решения мультидисциплинарного комплекса взаимосвязанных исследовательских задач: выбор структуры олигонуклеотидных зондов, разработку методик амплификации, изучение гибридизационных взаимодействий зондов различной структуры, располагающихся на поверхности микрочипа, конструирование колориметрических биоаналитических систем и их апробацию.

Представленная к защите диссертационная работа Ю.И. Поболеловой свидетельствует об успешном решении всех этих задач и достижении поставленной цели исследования. Апробация микрочипов с использованием коллекции из 68 клинических препаратов показала 100%-ную корреляцию результатов, получаемых с использованием разработанного нового и традиционных молекулярно-генетических подходов.

Ход выполнения исследования в полной мере отражен в подготовленной диссертации. Построенная по традиционной схеме, диссертационная работа Ю.И. Поболеловой включает введение, обзор литературы (3 главы), экспериментальную часть, изложение результатов и их обсуждение (7 глав), заключение, выводы и список литературы (244 источника). Работа изложена на 157 страницах машинописного текста, содержит 68 рисунков и 22 таблицы.

Во вводной части диссертации дается обоснование актуальности исследования, формулируется его цель и решаемые задачи.

Три главы литературного обзора посвящены рассмотрению разнообразия карбапенемов и карбапенемаз, существующих средств оценки резистентности бактерий к карбапенемам и общих принципов ДНК-гибридизации на микрочипах. Данная совокупность рассмотренных вопросов обеспечивает основу для обоснованного выбора тематики новой разработки, оценки оригинальности и конкурентного потенциала предлагаемых в рамках исследования подходов, корректной интерпретации получаемых результатов. Ю.И. Поболеловой проведен систематический анализ современной научной литературы по тематике исследования, логично охарактеризованы выполненные работы, оценены наиболее значимые практические требования к новым разработкам. В целом литературный обзор отражает глубину проработки материала, хорошее знакомство с современными биохимическими и молекулярно-генетическими концепциями и подходами.

Раздел «Экспериментальная часть» содержит полную характеристику методов, использованных в ходе исследования. Ю.И. Поболеловой освоены и успешно применены методы синтеза межмолекулярных конъюгатов и иммобилизации биомолекул на носителях, компьютерного анализа генетических последовательностей, проведения ПЦР-амплификации, изготовления колориметрических микрочипов и их применения, алгоритмы и программные средства для обработки и количественного анализа получаемых данных. В диссертации представлено детальное и корректное описание использованного инструментария, обеспечивающее возможность воспроизведения и однозначной интерпретации получаемых результатов. Выбор методов произведен в полном соответствии с постановкой задач исследования. Не вызывает сомнения приобретение Ю.И. Поболеловой в ходе выполнения диссертационной работы высокой экспериментальной квалификации в области биотехнологии и биохимии, а также в тематически смежных областях.

Раздел «Результаты и обсуждение» отражает последовательное успешное решение задач исследования. Диссертантом проведен биоинформационный анализ генов, кодирующих карбапенемазы, обоснован выбор оптимальных ДНК-зондов. Разработан комплекс методик амплификации генов карбапенемаз, основанных на применении полимеразной цепной реакции. Проведена сравнительная оценка используемых в анализе олигонуклеотидных зондов и выбран их оптимальный дизайн. Разработана микрочиповая технология молекулярно-генетической диагностики карбапенемаз, выявления бета-лактамаз расширенного спектра, в том числе ингибитор-резистентных бета-лактамаз. Проведена апробация изготовленных колориметрических микрочиповых аналитических систем на клиническом материале. Полученная совокупность результатов отражает успешное решение всех поставленных в работе задач.

Фундаментальное значение полученных результатов определяется проведенным анализом общих подходов к конструированию зондов для ДНК-диагностики.

Научно-практическая значимость разработки определяется возможностями применения разработанных микрочипов как средств медицинской диагностики, обеспечивающих выбор оптимальных терапевтических стратегий при борьбе с антибиотикорезистентными инфекциями.

Представленные в диссертации эксперименты полностью оригинальны, корректно спланированы и реализованы. Выводы логично вытекают из экспериментальных данных, обеспечивая обоснованность и достоверность сформулированных в диссертации положений.

При ознакомлении с диссертацией возникли некоторые вопросы и замечания.

1. При рассмотрении предложенных праймеров (Таблица 7, стр. 73 диссертации) было бы уместно прокомментировать, на сколько выбранные в рамках данного исследования праймеры отличаются от праймеров, использовавшихся в работах предшественников.

2. Выбор в качестве критерия приемлемости выбираемых ДНК-зондов соотношения сигнал:фон, большего восьми, имело бы смысл прокомментировать, сопоставив с другими разработками ДНК-чипов.

3. При оценке предела обнаружения гена карбапенемазы VIM-2 (рис. 55 диссертации и рис. 12 автореферата) следовало бы пояснить, какой статистический аппарат использовался для решения этой задачи.

Вышеизложенные соображения носят частный характер, не снижают общую положительную оценку работы и не влияют на обоснованность положений диссертации, выносимых на защиту.

Основные положения и выводы диссертационной работы опубликованы в 16 работах, включая 3 статьи в журналах, рекомендованных ВАК РФ. Результаты работы представлены в виде 13 сообщений на российских и международных научных конференциях. Автореферат полностью отражает выполненную соискателем исследовательскую работу, проведенные эксперименты, полученные результаты и выводы из них. Методическое разнообразие исследования позволяют классифицировать его как мультидисциплинарное, охватывающее две научные специальности: 03.01.06 – биотехнология (в том числе бионанотехнологии) и 03.01.04 – биохимия.

Диссертация Ю.И. Поболеловой является законченной работой высокого теоретического и экспериментального уровня, в полной степени удовлетворяющей требованиям, предъявляемым к кандидатским диссертациям по актуальности темы, объему проведенных исследований, научной новизне и практической значимости полученных результатов. Соискателем выполнена научно-квалификационная работа, в которой содержится решение задачи, имеющей существенное значение для развития биотехнологии и биохимии, – разработан принцип конструирования молекулярно-генетических диагностических систем, предназначенных для одновременного выявления ряда разнородных и близкородственных генов и реализующих одновременно происходящие на поверхности микрочипа гибридизационные процессы.

Диссертационная работа Поболеловой Юлии Илдаровны «Колориметрические микрочипы для мультианализа генов карбапенемаз, обуславливающих устойчивость бактерий к бета-лактамным антибиотикам» соответствует критериям, установленным "Положением о присуждении учёных степеней" (утверждено Постановлением Правительства РФ от 24.09.2013 г. № 842 с изменениями Постановления Правительства РФ от 21.04.2016 г. № 335, в редакции Постановления Правительства РФ от 02.08.2016 г. № 748), а сам диссертант, несомненно, заслуживает присвоения искомой степени кандидата химических наук по специальностям 03.01.06 – биотехнология (в том числе бионанотехнологии), 03.01.04 – биохимия.

Доктор химических наук, профессор

Б.Б. Дзантиев

Заместитель директора по науке ФИЦ Биотехнологии РАН,
заведующий лабораторией иммунобиохимии
Института биохимии им. А.Н. Баха ФИЦ Биотехнологии РАН,

Федеральное государственное учреждение «Федеральный исследовательский центр «Фундаментальные основы биотехнологии» Российской академии наук» (ФИЦ Биотехнологии РАН), Институт биохимии им. А.Н. Баха ФИЦ Биотехнологии РАН, лаборатория иммунобиохимии.

Почтовый адрес: ФИЦ Биотехнологии РАН, Ленинский проспект, д. 33, стр. 2, 119071, Москва, Россия. Телефон: (495)954-31-42. Адрес электронной почты: dzantiev@inbi.ras.ru

Подпись руки Б.Б. Дзантиева заверяю

Ученый секретарь ФИЦ Биотехнологии РАН,
канд. биол. наук

А.Ф. Орловский



« 18 » мая 2017 г.