

ОТЗЫВ

официального оппонента на диссертационную работу Поболеловой Юлии Илдаровны на тему «Колориметрические микрочипы для мультианализа генов карбапенемаз, обуславливающих устойчивость бактерий к бета-лактамным антибиотикам», представленную на соискание ученой степени кандидата химических наук по специальностям 03.01.06 – биотехнология (в том числе бионанотехнологии) и 03.01.04 - биохимия

В настоящее время проблема выявления и сдерживания резистентных штаммов микроорганизмов признана одной из наиболее важных глобальных проблем человечества. Возникновение и распространение мультирезистентных микроорганизмов, так называемых «супербактерий» (от англ. superbugs) возвращает нас в допенициллиновую эпоху, поскольку эффективных и малотоксичных средств для элиминации таких возбудителей не остается. Согласно представлению Центра по контролю за заболеваниями (CDC) к супербактериям в том числе относят граммотрицательные бактерии продуценты бета-лактамаз расширенного спектра действия, мультирезистентные штаммы *A. baumannii* и устойчивые к карбапенемам *K. pneumoniae*. Проявление перечисленных фенотипов как правило обусловлено приобретением бактериями соответствующих генов резистентности, для идентификации которых предназначен колориметрический микрочип, разработанный Юлией Илдаровной в ходе выполнения диссертационной работы. Таким образом, поставленная в диссертационной работе цель – разработка принципа и технологии гибридационного анализа ДНК на колориметрических микрочипах для идентификации генов карбапенемаз, является, безусловно, актуальной.

Практическая значимость такой работы очевидна. Внедрение созданного диагностического инструмента позволит с высокой специфичностью и чувствительностью обнаруживать бактериальные штаммы, несущие детерминанты резистентности, что в свою очередь позволит предпринять своевременные меры по предотвращению их распространения в популяции. Новым аспектом данного исследования является очень тщательная проработка и оптимизация каждого этапа создания гибридационной системы, что позволило автору выработать методические рекомендации по молекулярному дизайну зондов, предназначенных для идентификации ДНК-мишени в «сэндвич»-варианте анализа.

Диссертация Поболеловой Ю.И. построена традиционно и состоит из введения, обзора литературы, описания материалов и методов исследования, изложения результатов работы и их обсуждения, выводов, списка литературы и приложения. Работа изложена на 157 страницах, содержит 22 таблицы и 68 рисунков. Список цитируемой литературы содержит 244 библиографических источника. Материалы диссертации представлены в 16 печатных работах.

Во введении автор подчеркивает актуальность своего исследования, формулирует цель и задачи диссертационной работы.

Доброотно написанный литературный обзор в первых двух главах излагает современные представления о механизмах формирования резистентности бактерий к карбапенемам и способах обнаружения резистентности, включая фенотипические и

генетические подходы. В третьей главе автор уделяет особое внимание гибридизационному анализу ДНК на микрочипах, рассматривая разные варианты реализации этой технологии. Достаточно большой объем приведенной информации позволяет составить полноценное представление о мировом уровне исследований в области тематики диссертационной работы Поболеловой Ю.И.

Традиционная глава «Материалы и методы исследования» содержит описание использованных в работе реагентов, оборудования и методов анализа.

Раздел «Результаты и обсуждение» последовательно излагает весь накопленный диссертанткой экспериментальный материал. Стоит отметить, что Поболеловой Ю.И. проделана огромная скрупулезная проработка каждого шага, каждого этапа в создании запланированных ДНК-микрочипов. В частности, в сравнении оценены эффективность прямой и «сэндвич»-гибридизации, экспериментально подобраны оптимальные параметры взаимного расположения «улавливающего» и «детектирующего» зондов по отношению к последовательности детектируемой ДНК, отработан молекулярный дизайн зондов для их иммобилизации на подложку ДНК-микрочипа. Отдельно хочу отметить успешную реализацию диссертанткой мультипраймерной ПЦР, позволяющей проводить одномоментную амплификацию различных генетических вариантов генов карбапенемаз восьми типов. Проведенная аналитическая, методическая и экспериментальная работа позволили Поболеловой Ю.А. успешно решить поставленную цель диссертационного исследования и разработать интегрированный ДНК-микрочип, предназначенный для идентификации генов карбапенемаз и бета-лактамаз расширенного спектра действия. Эффективность работы конечного изделия, в том числе для обнаружения присутствия различных комбинаций тестируемых генов, была продемонстрирована в ходе анализа образцов тотальной ДНК, изолированной от коллекционных штаммов грамотрицательных микроорганизмов.

Наряду с общей положительной оценкой исследования, к работе имеется несколько конкретных вопросов. В первую очередь, хотелось бы уточнить, в каких экспериментах автор подтверждает работоспособность праймеров и зондов, предназначенных для выявления генов карбапенемаз GIM и SIM? Исходя из прочтения материала диссертации для меня вообще не очевидна цель включения их в дизайн конечного продукта. Про эти карбапенемазы нет персональной информации в литературном обзоре, необходимость их детекции никак не обсуждается в последующих главах.

При подборе условий амплификации для последующей гибридизационной детекции Поболеловой Ю.А. не испробован метод ассиметричной или линейной ПЦР, который, согласно методическим рекомендациям компании Affimetrics, позволяет существенно повысить эффективность детекции. С чем связано решение проводить наработку матрицы только в условиях классической амплификации?

Последнее замечание касается стиля подачи материала. Поскольку речь идет о разработке диагностического инструмента, обычно приводятся значения диагностической чувствительности и специфичности метода. Каковы эти параметры для разработанного ДНК-микрочипа?

Выводы диссертации в целом корректны, содержание автореферата отражает основные положения диссертации и позволяет объективно судить о проделанном объеме работ.

Заключение

Представленная к рассмотрению диссертационная работа Поболеловой Юлии Илдаровны «Колориметрические микрочипы для мультианализа генов карбапенемаз, обуславливающих устойчивость бактерий к бета-лактамным антибиотикам» является законченной научно-квалификационной работой, решающей важную научно-техническую задачу.

Диссертационная работа Поболеловой Юлии Илдаровны «Колориметрические микрочипы для мультианализа генов карбапенемаз, обуславливающих устойчивость бактерий к бета-лактамным антибиотикам» полностью соответствует требованиям пп. 9-14 Постановления о порядке присуждения ученых степеней (от 24 сентября 2013 г. N 842). Работа является законченным исследованием, и ее содержание соответствует специальностям 03.01.06 – биотехнология (в том числе бионанотехнологии) и 03.01.04 - биохимия.

заместитель генерального директора по научной работе
ФГБУ «Федеральный научно-клинический центр
физико-химической медицины федерального
медико-биологического агентства»
доктор биологических наук, профессор РАН

Е.Н. Ильина

Подпись д.б.н Ильиной Е.Н. заверяю

Учёный секретарь ФГБУ ФНКЦ ФХМ ФМБА России
кандидат биологических наук



Л.Л.Васильева

« 16 » мая 2017 г.

Почтовый адрес: 119435, г. Москва, ул. Малая Пироговская, д. 1а, Федеральное государственное бюджетное учреждение «Федеральный научно-клинический центр физико-химической медицины федерального медико-биологического агентства» (ФГБУ ФНКЦ ФХМ ФМБА России)

Телефон +7 (499) 245-04-71

Адрес электронной почты: ilinaen@gmail.com