

на правах рукописи

Рябинин
Игорь Андреевич

**МИКРОБИОЛОГИЧЕСКАЯ И МАСС-СПЕКТРОМЕТРИЧЕСКАЯ
ХАРАКТЕРИСТИКА ОСНОВНЫХ ВОЗБУДИТЕЛЕЙ АСПЕРГИЛЛЕЗА**

1.5.11. – Микробиология

АВТОРЕФЕРАТ
диссертации на соискание ученой степени
кандидата медицинских наук

Санкт-Петербург – 2023

Работа выполнена в научно-исследовательском институте медицинской микологии имени П.Н. Кашкина Федерального государственного бюджетного образовательного учреждения высшего образования «Северо-Западный государственный медицинский университет имени И.И. Мечникова» Министерства здравоохранения Российской Федерации

Научный руководитель:

заслуженный деятель науки Российской Федерации, доктор биологических наук, профессор

Васильева Наталья Всеволодовна

Официальные оппоненты:

Клясова Галина Александровна – доктор медицинских наук, профессор, Федеральное государственное бюджетное учреждение «Национальный медицинский исследовательский центр гематологии» Министерства здравоохранения Российской Федерации, отдел микробиологии и антимикробной терапии, заведующий

Багирова Наталия Сергеевна – доктор медицинских наук, Федеральное государственное бюджетное учреждение «Национальный медицинский исследовательский центр онкологии имени Н.Н. Блохина» Министерства здравоохранения Российской Федерации, научно-исследовательский институт клинической онкологии имени академика РАН и РАМН Н.Н. Трапезникова, отдел клиничко-лабораторной диагностики, лаборатория микробиологическая, старший научный сотрудник

Ведущая организация: Федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение высшего образования «Первый Санкт-Петербургский государственный медицинский университет имени академика И.П. Павлова» Министерства здравоохранения Российской Федерации

Защита диссертации состоится «___» _____ 2023 года в _____ часов на заседании диссертационного совета 64.1.004.01 при Федеральном бюджетном учреждении науки «Московский научно-исследовательский институт эпидемиологии и микробиологии им. Г.Н. Габричевского» Федеральной службы по надзору в сфере защиты прав потребителей и благополучия человека по адресу: 125212, г. Москва, ул. Адмирала Макарова, д.10

С диссертацией можно ознакомиться в библиотеке и на сайте Федерального государственного бюджетного учреждения науки «Московский научно-исследовательский институт эпидемиологии и микробиологии им. Г.Н. Габричевского» Федеральной службы по надзору в сфере защиты прав потребителей и благополучия человека по адресу: 125212, г. Москва, ул. Адмирала Макарова, д.10, <http://www.gabrich.ru>

Автореферат разослан «___» _____ 2023 года

Ученый секретарь
диссертационного совета,
доктор медицинских наук, профессор

Борисова Ольга Юрьевна

ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

Актуальность проблемы

Грибковые инфекции являются глобальной проблемой здравоохранения. Свыше 1 миллиарда человек страдают поверхностными и инвазивными микозами по данным международного проекта «Leading International Fungal Education». Ежегодно регистрируют более 300 000 новых случаев инвазивного аспергиллеза, свыше 30 млн. человек находятся в группе риска этого заболевания. Различные формы аспергиллеза ассоциированы с социально значимыми инфекционными патологиями: туберкулезом (Bongomin F., 2020), гриппом (Waldeck F., 2020), COVID-19 (Koehler P., 2020). Летальность при леченом инвазивном аспергиллезе составляет 15-50% в зависимости от фоновой патологии (Sun K.S., 2017), но в случаях COVID-19 повышается на 16-25% (Mitaka H., 2021). Проблема аспергиллеза усугубляется нарастанием устойчивости возбудителей к противогрибковым лекарственным средствам группы триазолов – препаратов выбора для лечения этой патологии (Nywening A.V., 2020; Duong T.M.N., 2020), а также появлением мультирезистентных штаммов (Beer K.D., 2018).

Внедрение методов геносистематики в изучение микромицетов привело к увеличению численности видов аспергиллов от 150 до >330, а возбудителей аспергиллеза с 20 до почти 100 (Gautier M., 2016; Tsang C.-C., 2018; Abdel-Azeem A.M., 2019). Появилась проблема «криптических видов» возбудителей, обладающих резистентностью к противогрибковым препаратам и мало различимых с «классическими» видами на культурально-морфологическом уровне (Lackner M., 2018; Bongomin F., 2018; Vidal-Acuna M.R., 2019; Tsang C.-C., 2020).

Степень разработанности темы исследования

Для идентификации аспергиллов культурально-морфологический метод наиболее доступен в лабораториях, однако описание макро- и микроскопического строения *Aspergillus* spp. имеется на ограниченном количестве питательных сред (Samson R.A. et al., 2014; Nyongesa B.W., 2015; de Hoog G.S., 2021). В определителях отсутствуют указания на особенности макро- и микроморфологии на широком спектре сред для исследования биоматериала и объектов окружающей среды. Практически не систематизированы сведения о полиморфизме аспергиллов.

В современной микробиологии MALDI-TOF-масс-спектрометрию с успехом используют для идентификации бактерий и дрожжей (Patel R., 2019; Peng Y., 2019; Becker P., 2019; Arumugam K., 2020), однако, для мицелиальных грибов этот метод недостаточно оптимизирован. До сих пор для анализа полипептидов микроорганизмов, формирующих масс-спектр при MALDI-TOF-MS, не разработана достаточная методологическая база.

Перспективным является обнаружение детерминант резистентности к противомикробным средствам с помощью MALDI-TOF-MS (De Carolis E, et al., 2012), которое уже сформировалось в бактериологии (Burckhardt I., et al., 2018). Вместе с тем масс-спектрометрические свойства аспергиллов изучены недостаточно, включая параметры тех интересующих субстанций, которые используют (или планируют к использованию) в качестве «мишеней» в молекулярно-генетических и физико-химических методах лабораторной диагностики. Следовательно, внедрение физико-химических методов в диагностику грибковых инфекций имеет значительный потенциал для расширения возможности идентификации возбудителей и определения их чувствительности к противогрибковым препаратам.

Цель исследования – охарактеризовать фенотипические и масс-

спектрометрические свойства возбудителей аспергиллеза, в том числе с различной чувствительностью к противогрибковым лекарственным средствам, для оптимизации лабораторной диагностики аспергиллеза.

Задачи исследования:

1. Исследовать макро- и микроморфологическую изменчивость условно-патогенных *Aspergillus* spp. на различных питательных средах;
2. Получить и аннотировать MALDI-масс-спектры белково-пептидных фракций клеток возбудителей аспергиллеза и разработать на их основе библиотеку типовых масс-спектро-профилей для совершенствования видовой идентификации этих грибов;
3. Исследовать масс-спектрометрические особенности возбудителей аспергиллеза с различной чувствительностью к противогрибковым лекарственным средствам;
4. Провести сравнительный анализ первичной структуры ланостерол-14- α -деметилазы (CYP51A) – мишени действия триазольных противогрибковых средств у различных представителей рода *Aspergillus*.

Научная новизна

Получены новые данные о полиморфизме штаммов основных возбудителей аспергиллеза, включая характеристики роста на питательных средах для выделения *Aspergillus* spp. из биоматериалов человека и объектов внешней среды, а также атипичные варианты макро- и микроморфологии аспергиллов *in vitro*.

Разработаны оригинальные ключи (дихотомический и синоптический) для морфологической идентификации возбудителей аспергиллеза, выделенных из биоматериала и объектов внешней среды на питательных средах различного состава.

На модели мицелиальных грибов рода *Aspergillus* впервые предложен алгоритм биоинформационного анализа MALDI-масс-спектра неразделенного белкового экстракта, который позволяет определить полипептиды, образующие масс-спектр – маркеры видовой принадлежности. Поскольку такие белки и пептиды находятся в культуре в количествах, достаточных для масс-спектрометрической детекции и конкурентно превосходят по показателю интенсивности ионного тока другие белки и пептиды близких молекулярных масс, они связаны с процессами, критически значимыми для адаптации молодых культур *Aspergillus* spp. *in vitro*, возможно и *in vivo*.

Предложен оптимальный способ иерархической кластеризации масс-спектров клеточного экстракта, позволяющий получать распределение, согласующееся с особенностями филогенетических связей *Aspergillus* spp. для расширения возможностей MALDI-TOF-масс-спектрометрии при идентификации видов, которые еще не внесены в типовые базы масс-спектро-профилей.

Впервые для *A. niger*, *A. awamori*, *A. flavus*, *A. oryzae* показано, что данные MALDI-масс-спектров ассоциированы с фенотипом лекарственной чувствительности, и эта ассоциация прослеживается вне действия противогрибкового лекарственного препарата. То есть ряд механизмов резистентности к антимикотикам полиенового и триазольного ряда у *Aspergillus* spp. сопряжены с конститутивными изменениями в протеомах этих микромицетов. Определено, что построение групповых матриц коэффициента корреляции позволяет выявлять различия MALDI-масс-спектров аспергиллов секций *Flavi* и *Nigri* с различной противогрибковой чувствительностью.

Теоретическая и практическая значимость

В результате культурально-морфологической части исследования разработана классификация типов роста *Aspergillus fumigatus* – ведущего по частоте возбудителя инвазивного аспергиллеза – на среде Чапека с дрожжевым экстрактом. Данную классификацию в дальнейшем целесообразно использовать при паспортизации

коллекционных штаммов *A. fumigatus*, а также ввести формы этого микромицета (как таксон рангом ниже вида, используемый в микологии). Установлено, что картофельно-глюкозно-дрожжевой агар является питательной средой, эквивалентной по своим ростовым и дифференциальным качествам для условно-патогенных *Aspergillus* spp. классической питательной среде – агару Чапека с дрожжевым экстрактом. В опыте с модификацией состава агара Чапека с дрожжевым экстрактом также доказана равноценность сахарозы и лактозы в качестве энергетических источников для *Aspergillus* spp., данное обстоятельство значимо при разработке новых питательных сред для аспергиллов.

С учетом видового разнообразия условно-патогенных *Aspergillus* spp., характерных для Северо-Западного федерального округа России, разработаны морфологические ключи для идентификации аспергиллов – возбудителей инфекций человека.

Предложен способ субкультивирования аспергиллов для выделения белкового экстракта на этапе подготовки к масс-спектрометрическому исследованию, который отличается получением «пленчатой» колонии на поверхности жидкой питательной среды и проведением субкультивирования и экстракции в одной микропробирке.

На основе реализованного в исследовании опыта работы с биоинформационными редакторами и базами определен комплекс необходимых функций, инструментов, программных возможностей, необходимых для аннотирования MALDI-масс-спектров клеток и клеточных экстрактов, а также создания характеристик отдельных спектрообразующих белков. Данный комплекс решений позволит аннотировать не только MALDI-масс-спектры *Aspergillus* spp., но и других культивируемых микроорганизмов, таким образом, расширит возможности экспериментальной микробиологии.

Созданы подробные аннотации MALDI-масс-спектров пула пептидов и низкомолекулярных белков для *A. fumigatus*, *A. terreus*, *A. oryzae*, *A. clavatus*, *A. nidulans*. Установлено, что в композиции «спектрообразующих» белков *Aspergillus* spp., выявляемых при анализе MALDI-масс-спектров, среди представителей разных видов повторяются субъединицы Tim-Tom комплекса (митохондриальная транслоказа), легкая цепь динеина, глутаредоксин, субъединицы АТФ-синтазы, гистон H2B, Zn-связывающие белки митохондрий, белки с доменом DUF543, эукариотический фактор инициации и различные протеинкиназы. Следовательно, данные белки непосредственно, либо группы белков, взаимодействующие с ними, являются перспективными мишенями для разработки новых противогрибковых препаратов в отношении возбудителей инвазивного аспергиллеза, поскольку таким образом будет возможно заблокировать метаболические процессы, критически важные на инициальной стадии роста колонии. Выполненные аннотации масс-спектров являются иллюстрациями применения метода MALDI-TOF-масс-спектрометрии экстракта мицелия не только, как приема видовой идентификации, но и в качестве самостоятельного протеомного исследования.

Установлено наличие масс-спектрометрических маркеров аспергиллов из секций *Flavi* и *Nigri*, наличие которых сочетается с определенными значениями минимальных подавляющих концентраций (МПК) противогрибковых лекарственных средств. Этот феномен позволит в дальнейшем разработать алгоритмы для быстрого определения чувствительности к ПГЛС с использованием MALDI-TOF-масс-спектрометрии.

Создана база (библиотека) масс-спектро-профилей «AMPSL» (*Aspergillo*sis Main Pathogens Spectral Library) для совершенствования видовой идентификации *Aspergillus* spp. методом линейной MALDI-TOF-масс-спектрометрии клеточного экстракта.

Доказано, что в первичной структуре ланостерол-14 α -деметилаз изоформы А (CYP51A) *Aspergillus* spp. отображаются не только аминокислотные замены, ассоциированные с противогрибковой устойчивостью, но и сочетания аминокислотных остатков, специфичные для представителей конкретных видов.

Выполнена структурная реконструкция фермента CYP51A у *Aspergillus flavus* – одного из трех (наряду с *A. fumigatus* и *A. niger*) ведущих по частоте выделения возбудителей инвазивного аспергиллеза, который превосходит виды доминирующей «триады» по величинам минимальных ингибирующих концентраций триазоловых препаратов.

На основании проведенного расширенного фенотипического и биоинформационного исследования *Aspergillus* spp. получены видео-, аудио- и иллюстративные обучающие материалы: электронное пособие «Определение противогрибковой чувствительности нитчатых микромицетов: чем и как» (<https://sdo.szgmu.ru/mod/book/view.php?id=107508&chapterid=2651>); презентация «Лабораторная диагностика инфекций, вызываемых *Aspergillus* spp.» (<https://sdo.szgmu.ru/mod/resource/view.php?id=107517>); видеозанятия «Аспергиллез и аспергиллы. Часть 1», «Аспергиллез и аспергиллы. Часть 2» (<https://sdo.szgmu.ru/mod/url/view.php?id=137056>) и (<https://sdo.szgmu.ru/mod/url/view.php?id=137057>); видеозанятие «Противогрибковые препараты» (<https://sdo.szgmu.ru/mod/url/view.php?id=137059>); электронный образовательный модуль «Масс-спектрометрия в видовой идентификации возбудителей бактериальных и грибковых инфекций» (<https://www.rosmedlib.ru/book/1MECH-0006.html>); электронный образовательный модуль «MALDI-TOF-масс-спектрометрия в бактериологии и микологии: практические аспекты» (<https://www.rosmedlib.ru/book/1MECH-0007.html>).

Результаты работы внедрены в учебный процесс кафедры медицинской микробиологии (акт внедрения от 28.04.2022), диагностическую работу микробиологической лаборатории микологической клиники (акт внедрения от 28.04.2022), научно-исследовательскую работу Российской коллекции патогенных грибов НИИ медицинской микологии им. П.Н. Кашкина (акт внедрения от 06.06.2022) Северо-Западного государственного медицинского университета им. И.И. Мечникова Минздрава России. Материалы диссертационного исследования включены в электронные учебные модули «Масс-спектрометрия в видовой идентификации возбудителей бактериальных и грибковых инфекций» и «MALDI-TOF-масс-спектрометрия в бактериологии и микологии: практические аспекты», аккредитованные в системе Непрерывного Медицинского Образования, а также в различные обучающие инструменты электронной образовательной среды «Русский Moodle 3KL». Созданная база (библиотека) типовых масс-спектро-профилей «AMPSL» внедрена в программное обеспечение VactoSCREEN (ООО НПФ «Литех», Россия) MALDI-TOF-масс-спектрометра LaserToF LT2Plus (акт внедрения от 14.04.2022).

Полученные в ходе реализации работы результаты послужили основой для написания методических рекомендаций «Микологические культуральные исследования», учебно-методических пособий «Основы видовой идентификации микроорганизмов с помощью MALDI-TOF-масс-спектрометрии» и «Организационная модель справочника возбудителей инфекций для формирования обучающих модулей с использованием информационно-симуляционных технологий».

Методология и методы исследования

Методология, использованная в работе, спланирована исходя из поставленной

цели и задач исследования. Предметом исследования явились штаммы *Aspergillus* spp. и аминокислотные последовательности фермента ланостерол-14 α -деметилаза изоформы А (СУР51). В работе использованы традиционные микробиологические методы (экспериментальное культивирование, световая микроскопия); фотосъемка и цифровая обработка фотографий; масс-спектрометрия; биоинформационное исследование; математические и статистические методы обработки данных. Исследование одобрено локальным этическим комитетом ФГБОУ ВО СЗГМУ им. И.И. Мечникова Минздрава России (протокол №4 от 06.04.22).

Штаммы *Aspergillus* spp. Исследовали 244 штамма 12 видов *Aspergillus* spp. (в исходной трактовке видового состава), из них 236 клинического происхождения (96,7%), 8 из объектов внешней среды (3,3%). Штаммы предоставлены Российской коллекцией патогенных грибов и другими подразделениями НИИ медицинской микологии им. П.Н. Кашкина (СЗГМУ им. И.И. Мечникова). Штаммы выделены от пациентов с доказанным инвазивным аспергиллезом легких (40,0%), вероятным инвазивным аспергиллезом легких (12,5%); хроническим подострым аспергиллезом легких (1,25%); диффузным неспецифическим пневмосклерозом (3,75%); муковисцидозом (2,5%); инвазивным аспергиллезом верхнечелюстного синуса (3,75%); отомикозом (27,5%); онихомикозом (2,5%); другими патологиями (6,25%).

Культурально-морфологическое исследование. Суспензии спор засеивали методом одноточечного и трехточечного посева. Режимы инкубации: 30°C 7-10 суток; 30°C 3-5 суток; 30°C 14 суток; 37°C 7 суток; 50°C 4 суток; 25°C 25 суток. Питательные среды: агар Чапека (классический; с дрожжевым экстрактом; с дрожжевым экстрактом и лактозой; с дрожжевым экстрактом и 20% сахарозы); агар Чапека-Докса; *Aspergillus flavus/parasiticus*-агар; агар Сабуро; агар Киммига; агар YPD; солодовый агар; агар с бенгальским розовым; сусло-агар; КМА; КГДА. Использовали микроскоп Leica DM LB2 с камерой DFC320 (Leica) и стереомикроскоп Stemi 2000-C (Carl Zeiss Jena).

Определение чувствительности *Aspergillus* spp. к противогрибковым препаратам (амфотерицину В, итраконазолу, вориконазолу) провели согласно EUCAST E.DEF 9.2.

Масс-спектрометрическое исследование выполнили на Autoflex speed TOF/TOF (Bruker Daltonik) и LaserToF LT2Plus (SAI). Споры быстрорастущих видов (1 бактериологическая петля) засеивали в 0,5 мл бульона Сабуро с 2% глюкозы в пробирках «Эппендорф», инкубировали 24 ч при 37°C. Штаммы медленно растущих видов инкубировали в 2 мл бульона Сабуро при 30°C с ежедневным просмотром до получения тонкой пленчатой колонии. Колонии отмывали на центрифуге-вортексе. Проводили пробоподготовку и масс-спектрометрию (Рауш Е.Р. и др., 2013). При идентификации использовали базу «Fungi Library», оценивали показатель достоверности идентификации «Score Value» (SV). Штаммы подвергали данной процедуре повторно.

Для изучения различий между таксономическими группами по показателю SV выборку масс-спектров разделили следующим образом: *A. fumigatus*, *Nigri*, *Flavi*, другие секции. Различия оценивали путем расчета критерия Краскелла-Уоллиса, χ^2 ($f=1$, $p<0,05$, критическое табличное значение 3,841) и V-критерия Крамера. Алгоритм анализа различий в результативности идентификации между видами *Aspergillus* spp. включил: (I) разделение полученного банка масс-спектров на группы (как выше); (II) разделение масс-спектров внутри выделенных групп по успешности идентификации на основании значения SV 1,700; (III) построение таблицы сопряженности и расчет критерия χ^2 ($f=3$, $p<0,01$, критическое значение 11,345). Аннотацию масс-спектров *A. fumigatus*, *A. nidulans*, *A. terreus*, *A. oryzae*, *A. clavatus* провели в 4 этапа: генерация масс-листов в flexAnalysis; аннотирование масс-листов с помощью ресурса TagIdent по величинам m/z

пиков; (3) из масс-листов выбирали пики с отношением интенсивности сигнал/шум ($S/N \geq 3$); (4) если функцию полипептида не удалось определить прямо, выполняли поиск гомологов с помощью ресурса BLAST.

Уточнение видового состава штаммов *Aspergillus* spp. провели путем морфологического и масс-спектрометрического исследования, а также (выборочно) с помощью таргетного ДНК-секвенирования локусов внутреннего транскрибируемого спейсера (ITS) и β -тубулина по протоколу CLSI MM18-A (результаты секвенирования ДНК предоставлены сотрудниками НИЛ молекулярно-генетической микробиологии НИИ медицинской микологии им. П.Н. Кашкина). Сравнение трех методов видовой идентификации выполнили на модельной выборке из 47 изолятов аспергиллов с использованием критериев Фридмана и Уилкоксона.

Для иерархической кластеризации масс-спектров использовали 8 способов расчета дистанции и 7 способов объединения МСП. Из генеральной совокупности МСП извлекли модельную выборку ($N=52$), получили 56 дендрограмм. Распределения МСП в дендрограммах оценивали по: (1) группировке МСП одного вида *Aspergillus* spp. в одной кладе; (2) сходству распределения с подразделением рода *Aspergillus* на группы (подроды, секции) в соответствии с данными геноситематики. Создание распределений выполнили в MALDI Biotyper ОС 3.1. Выявление масс-спектрометрических отличий в группах штаммов *Aspergillus* spp. с различной чувствительностью к антимикотикам выполнили благодаря матрицам сложного коэффициента корреляции (СКК). Масс-спектры анализировали по сегменту m/z (M_r) 3000-12000 Da.

Биоинформационное исследование структуры CYP51A *Aspergillus* spp. Поиск последовательностей выполнили в ресурсе Protein BLAST среди аспергиллов и неосарторий, используя структуру CYP51A *A. fumigatus* Af293 из базы KEGG (Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes (Nierman W.C. et al., 2005)). В последующую обработку включили гомологи, с перекрытием $\geq 98\%$ (*A. fumigatus*) и $\geq 77\%$ («*Aspergillus non-fumigatus*»). Распределение структур CYP51 выполнили в Blast Tree View (Saitou N., Nei M., 1987; Geischin N.V., 1995). Выравнивание последовательностей провели с помощью программного алгоритма COBALT. Свойства CYP51A штамма *A. flavus* NRRL 3357 (№ XP_002375123.1 (Nierman W.C., 2007)) изучены с помощью биоинформационных ресурсов Protein Calculator 3.4, RaptorX, Phyre2 и Swiss-Model.

Личное участие автора в получении результатов

Автор запланировал настоящее исследование, разработав его дизайн. Личный вклад автора был осуществлен на всех этапах проведения исследования, сформированы и обоснованы цели, задачи, методы исследования, произведен набор экспериментального материала.

Автор настоящей работы самостоятельно выполнил морфологическую и физико-химическую идентификацию штаммов *Aspergillus* spp.; изучил особенности морфологии аспергиллов на различных питательных средах; определил чувствительность штаммов *Aspergillus* spp. к противогрибковым препаратам (антимикотикам); провел MALDI-TOF-масс-спектрометрию белкового экстракта из культур исследуемых штаммов с целью видовой идентификации; составил базу типовых масс-спектро-профилей, выполнил математическое распределение масс-спектров протеомов *Aspergillus* spp. и дал его интерпретацию; провел анализ биоинформационных данных. На этапах проведения исследования автор самостоятельно поддерживал живые культуры *Aspergillus* spp.

Анализ отечественной и зарубежной литературы произведен лично автором, как и обработка полученных результатов.

Штаммы *Aspergillus* spp. для исследования любезно предоставлены сотрудниками

кафедры медицинской микробиологии СЗГМУ им. И.И. Мечникова доц. к.м.н. Богомоловой Т.С. и асс. Пинегиной О.Н., сотрудниками отделения лабораторной диагностики микологической клиники СЗГМУ им. И.И. Мечникова Шурпицкой О.А. и к.м.н. Сухановой Ю.А., заведующей Российской коллекцией патогенных грибов Чилиной Г.А. Штаммы бактерий, использованные при апробации «библиотеки» масс-спектро-профилей «AMPSL», предоставили сотрудники отделения лабораторной диагностики микологической клиники СЗГМУ им. И.И. Мечникова Ремнева Н.П., Кашуба В.М. и Цветкова Г.В.

Клиническую характеристику групп пациентов предоставили доцент кафедры клинической микологии, аллергологии и иммунологии СЗГМУ им. И.И. Мечникова к.м.н. Шадринова О.В. и сотрудники микологической клиники СЗГМУ им. И.И. Мечникова к.м.н. Борзова Ю.В. (зав. клиникой) и Десятник Е.А. (врач-аллерголог).

Данные о результатах молекулярно-генетической идентификация *Aspergillus* spp. предоставлены сотрудниками НИЛ молекулярно-генетической микробиологии НИИ медицинской микологии им. П.Н. Кашкина к.б.н. Михайловой Ю.В. и Рудневой М.В.

Основные положения диссертации, выносимые на защиту

1. Основные возбудители аспергиллезной инфекции (*A. fumigatus*, *A. flavus*, *A. terreus*, *A. niger*) проявляют выраженный морфологический штаммовый полиморфизм *in vitro*;
2. Маркеры видовой принадлежности в MALDI-масс-спектрах *Aspergillus* spp. представлены уникальными комплексами белков и пептидов, отличающихся политопной клеточной локализацией и различной функциональной принадлежностью;
3. Возбудители аспергиллеза из секций *Flavi* (*A. flavus*, *A. oryzae*, *A. tamaris*) и *Nigri* (*A. niger*, *A. awamori* и *A. niger/awamori*) с различной чувствительностью к итраконазолу и амфотерицину В отличаются по масс-спектрометрическим свойствам культур;
4. Определение нуклеотидной последовательности генов типа *cup51A* у *Aspergillus* spp. позволяет устанавливать видовую принадлежность этих грибов, а также детерминанты резистентности к триазольным препаратам.

Степень достоверности и апробация результатов исследования

Достоверность полученных результатов обеспечивается адекватным объемом наблюдений над объектами исследования (244 штаммов *Aspergillus* spp.; 445 культуральных исследований; >700 масс-спектрометрических съемок) и оптимально подобранными методами статистической обработки полученных данных. В работе использованы современные микробиологические, физико-химические, молекулярно-генетические и биоинформационные методы, а также стационарное и сетевое программное обеспечение для математического и статистического анализа, цифровой обработки изображений.

Работа выполнена в соответствии с темами НИР Государственных заданий Минздрава России «Изучение молекулярной эпидемиологии, микробиологический мониторинг внутрибольничных грибковых инфекций, актуальных госпитальных штаммов возбудителей внутрибольничных инфекций. Изучение генома и протеома возбудителей микозов» (2011 – 2015 гг.); «Изучение молекулярных маркеров риска развития микозов и резистентности микромицетов к противогрибковым препаратам на уровне генома и протеома» (2016 – 2018 гг.); «Молекулярные предикторы развития микозов и микоаллергозов различного генеза на основе иммунопатогенеза» (2016 – 2018 гг.); «Разработка быстрых методов диагностики микозов и молекулярных маркеров резистентности клинически значимых микромицетов к противогрибковым препаратам» (2018 – 2020 гг.), исполняемых НИИ медицинской микологии им. П.Н. Кашкина ФГБОУ ВО СЗГМУ им. И.И. Мечникова.

Диссертация апробирована на заседании заседания научной проблемной комиссии ФГБОУ ВО СЗГМУ им. И.И. Мечникова Минздрава России №10 «Эпидемиология, профилактика, диагностика и лечение инфекционных (бактериальных, вирусных, микотических, паразитарных и связанных с оказанием медицинской помощи) и некоторых неинфекционных заболеваний» (протокол №2 от «20» апреля 2022 г.).

Результаты работы по диссертации доложены и представлены на 37 научных мероприятиях: Научно-практическая конференция молодых ученых и специалистов «Трансляционная медицина: от теории к практике» (Санкт-Петербург, 2013, 2014, 2017, 2018, 2021, 2022 гг.); Всероссийский (и Российско-Китайский) конгресс по медицинской микробиологии, эпидемиологии, клинической микологии и иммунологии «Кашкинские чтения» (Санкт-Петербург, 2013-2022 гг.); Научно-практической конференции «Профилактическая медицина — 2013» и конкурсе научно-исследовательских проектов молодых ученых (Санкт-Петербург, 2013); 6-ом, 8-ом и 9-ом международных Конгрессах «Успехи в борьбе с аспергиллезом» (Advances Against Aspergillosis, Испания, Мадрид, 2014; Португалия, Лиссабон, 2018; Лугано, Швейцария, 2020); Отчетных сессиях научных подразделений СЗГМУ им. И.И. Мечникова «Фундаментальные исследования в современной медицине: достижения и перспективы» (Санкт-Петербург, 2014-2016, 2018, 2019 гг.); 25-ом и 29-ом Европейских конгрессах по клинической микробиологии и инфекционным заболеваниям («ЕССМID», Дания, Копенгаген, 2015; Нидерланды, Амстердам, 2019); 7-ом и 8-ом Конгрессе «Тенденции в медицинской микологии» («ТИММ», Португалия, Лиссабон, 2015; Сербия, Белград, 2017); 19-ом Конгрессе международного общества по микологии человека и животных (ISHAM, Австралия, Мельбурн, 2015); XX Санкт-Петербургской Ассамблее молодых ученых и специалистов (Санкт-Петербург, 2015); 3-ей Китайско-Российской международной конференции по микробиологии, иммунологии и связанным с ними заболеваниями (Wu Lien-Teh Forum, CRICMID, Китай, Харбин, Пекин, 2016); Практико-ориентированный семинар: «Актуальные вопросы микробиологической диагностики» (Санкт-Петербург, 2016); IV Всероссийской с международным участием заочной научно-практической конференции «Здоровье населения и качество жизни» (Санкт-Петербург, 2017); Научно-практической конференции «Биоразрушение строительных конструкций» (Санкт-Петербург, 2017); 5-й Юбилейный Российский конгресс лабораторной медицины (Россия, Москва, 2019); Международный форум «Вузовская наука. Инновации» (2021).

Различные фрагменты работы выполнены при поддержке премии имени профессора В.М. Лещенко (Национальная академия микологии, оргкомитет 6-го Конгресса «Успехи в борьбе с аспергиллезом» {6th Advances Against Aspergillosis}), гранта имени профессора Э.Э. Эйхвальда (ФГБОУ ВО СЗГМУ им. И.И. Мечникова), гранта «УМНИК» Фонда содействия развитию малых форм предприятий в научно-технической сфере (договор №4161ГУ1/2014), гранта Правительства Санкт-Петербурга для аспирантов ВУЗов. Работа отмечена дипломом 1-ой степени конкурса «Эстафета вузовской науки – 2021» в номинации «Клинические исследования в микробиологии», юбилейной медалью к двадцатилетию основания Национальной Академии Микологии.

Публикации

По теме диссертации опубликовано 27 работ, из них 13 статей в рецензируемых изданиях, 5 – в других изданиях, 5 статей в сборниках конференций, 2 учебно-методических пособия, 1 методические рекомендации, 1 тезисы в материалах конференции.

Объем и структура диссертации

Диссертация изложена на 226 страницах машинописного текста, состоит из введения, обзора литературы, 4 глав собственных исследований, заключения, выводов, практических рекомендаций, перспектив дальнейшей разработки темы, списка сокращений, списка литературы, благодарностей. Работа иллюстрирована 30 таблицами и 40 рисунками. Список литературы включает 365 источников, 34 из которых – отечественные, 331 – зарубежные.

ОСНОВНОЕ СОДЕРЖАНИЕ РАБОТЫ

Культурально-морфологические свойства *Aspergillus spp.*

Выполнено 445 пассажей *Aspergillus spp.* на плотных средах, из них в 50% наблюдений (224) использовали параллельные посеы одних и тех же штаммов на серии сред для оценки адаптивной изменчивости. Установили типы рельефа колоний: равномерный (54,3%); со множественными радиальными складками (22,1%); с немногочисленными радиальными складками (15,2%); мишеневидный (8,4%). Тип рельефа не оказался видоспецифичным, но мишеневидные колонии с радиальными и кольцевыми складками чаще наблюдали у *A. niger*. Текстура колонии обычно была бархатистой (81%), реже пушисто-войлочной (6,6%), гранулярной (4,3%, у видов с крупными конидиальными головками: *A. niger*, *A. awamori*, *A. ochraceus*, *A. oryzae*), смешанного характера (6,6%), редко видели пленчатые колонии (1,5%, дегенеративные варианты *A. ustus*, *A. calidouustus*). Край колонии чаще ровный (90,5%), иногда нерегулярно-фестончатый (9,5%). У некоторых штаммов наблюдали образование плеоморфного мицелия (8,6%) и секторальную изменчивость колоний (5,2%).

Выявили необычные пигменты у *Aspergillus spp.*: *A. fumigatus* - коричневый реверзум на АФРА, чернильно-синий диффундирующий пигмент на КМА (в пробирке); *A. niger*, *A. awamori* - зеленый на среде с бенгальским розовым, черный экссудат на агаре Сабуро в присутствии других микромицетов; *A. nidulans* - коричневый на YPD, белый на агаре с бенгальским розовым; *A. calidouustus* - белый на агаре Сабуро, тускло-зеленый на КМА, тускло-желтый на КГДА; *A. versicolor* - кремово-коричневый на YPD; *E. amstelodami* - коричнево-желто-белый на YPD; *A. terreus* - желто-оранжевый на различных средах; *A. ochraceus* - темно-красный диффундирующий пигмент; *A. candidus* - кремово-коричневый на КГДА при длительной инкубации.

Обнаружили необычные признаки микроскопической организации, в том числе (в скобках – питательная среда): карликовые конидиальные головки *A. fumigatus*, атипичные карликовые конидиеносцы *A. flavus* (КГДА); конидиальные головки *A. terreus* с фиалидами, метулами и дополнительными клетками (КМА); конидиальные головки *A. oryzae* с гипертрофией отдельных стеригм (агар Чапека); переплетающийся воздушный мицелий *A. flavus* (АФРА); радиальные головки *A. flavus* с различной площадью охвата стеригмами терминального расширения; свободно-столбчатые конидиальные головки *A. flavus* (КГДА); конидиеносцы *A. terreus* с гипертрофированным спорообразованием (сусло-агар); редуцированные конидиальные головки *A. terreus* (среда Чапека); переплетающиеся конидиеносцы *A. ochraceus* (среда YPD); структуры типа хламидоспор у *A. flavus* (КГДА); атипичные конидиальные головки *A. flavus* с редуцированными и видоизмененными стеригмами (АФРА); мицелий *A. terreus* со светопреломляющими гранулами внутри клеток (КМА); извитые конидиеносцы *A. flavus* (КГДА); высвобождение гранул пигмента из гиф *A. flavus* (АФРА). В качестве примера результатов культурально-морфологического исследования приведены данные о полиморфизме *A. fumigatus* (Рисунок 1; I-VI – типы роста).

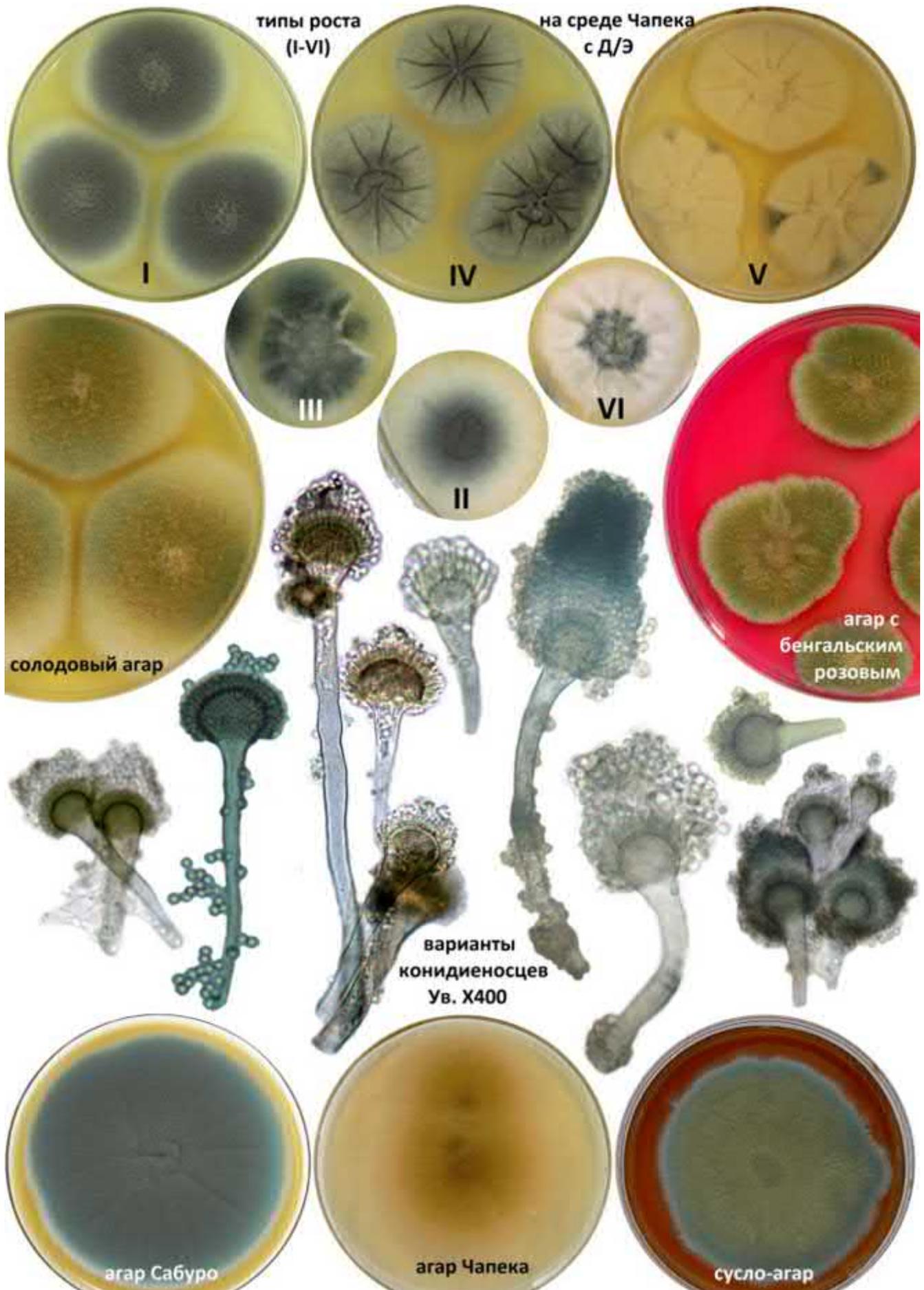


Рисунок 1 – Культуральный и микроморфологический полиморфизм *Aspergillus fumigatus*

Проведенное морфологическое исследование позволило выявить атипичные варианты развития возбудителей аспергиллеза с учетом рецептов питательных сред. Наиболее вариабельными признаками у *Aspergillus* spp. в культуре является пигментация и рельеф колоний, которые определяются особенностями процесса спороношения у конкретного штамма: его интенсивностью в целом и пространственным распределением конидиеносцев. Проведенное исследование позволило установить, что культуральные свойства и микроморфология *Aspergillus* spp. на различных питательных средах, применяемых в исследовании биоматериалов и объектов окружающей среды, не одинаковы. Данное обстоятельство необходимо учитывать при проведении микологических исследований, а также при использовании штаммов *Aspergillus* spp. для контроля питательных сред. При составлении культурально-морфологического описания штаммов аспергиллов в качестве основных целесообразно использовать среду первичного выделения (Сабуро или другую, в зависимости от протокола исследования), а также агар Чапека с дрожжевым экстрактом, в том числе в классической прописи и в варианте с 20% сахарозой для осмофильных видов.

MALDI-TOF-масс-спектрометрия клеточного экстракта *Aspergillus* spp. для видовой идентификации и протеомного исследования

Штаммы подвергли масс-спектрометрическому исследованию с повторностью: 66 штаммов (27,7%) 1 съемка масс-спектра; 99 шт. (41,6%) 2 съемки; 35 шт. (14,7%) 3 съемки; 38 шт. (16,0%) >3 съемок. Выполнили 658 съемок, из которых 295 в автоматическом режиме (из них 263 результативно ($\approx 89,2\%$) и 32 не успешно ($\approx 10,8\%$)), а также 393 в «ручном» режиме (все успешны). Связь использования ручного режима с результативностью съемки статистически значима ($\chi^2_{\text{эмп}}(44,710) > \chi^2_{\text{крит}}(6,635)$ при $f=1$ ($p < 0,01$)); связь признаков средней силы по шкале Реа-Паркера (критерий Крамера $V=0,255$). Распределение случаев, когда из экстрактов получили масс-спектры без детектируемых пиков, следующее: *A. niger* (50%), *A. fumigatus* (25%), прочие виды 25%. Ручной режим съемки предпочтителен для идентификации аспергиллов.

Предпринятый в данном исследовании прием получения пленчатой колонии позволил эффективно использовать базу типовых МСП, несмотря на то, что последние были получены из «взвешенных» микроколоний на ротаторе. Метод пленчатых колоний оказался удобнее по причине большей простоты работы и снижения образования микробного аэрозоля и аэрозоля аллергенов аспергиллов в лабораторном помещении.

Выявили, что по результативности видовой идентификации с помощью MALDI-TOF-MS, выраженной качественно (факт определения принадлежности к определенному виду) и количественно (по показателю достоверности идентификации), различные группы аспергиллов (представителей разных видов и секций рода) различаются между собой. Анализ качественных результатов идентификации аспергиллов (Таблица 1) установил, что связь принадлежности изолята к определенной секции рода с результативностью идентификации статистически значима ($\chi^2_{\text{эмп}}(29,993) > \chi^2_{\text{крит}}(11,345)$ при $f=3$ ($p < 0,01$)). Исследование выборки 595 масс-спектров (234 – *A. fumigatus*; 160 – секция *Nigri*; 123 – секция *Flavi*; 78 – других видов) выявило, что медианные значения этих признаков в выборках не равны (критерий Краскелла-Уоллиса: $H=15,432$; $\chi^2_{\text{эмп}}(15,432) > \chi^2_{\text{крит}}(5,991)$ при $f=2$ ($p < 0,01$), уровень значимости $\alpha=0,05$, Таблица 2).

Результативность идентификации успешно полученного масс-спектра различается для представителей различных секций рода *Aspergillus*. Причина обусловлена, по-видимому, особенностями клеточной стенки гиф, влияющими на результативность экстракции белков, и составом библиотек МСП для видовой идентификации.

Таблица 1 – Сравнение результатов идентификации масс-спектров *Aspergillus* spp.

Секции	Результат идентификации (количество масс-спектров)		Всего
	SV \geq 1,700	SV \leq 1,699	
<i>Fumigati</i>	181 (77,4%)	53 (22,6%)	234
<i>Nigri</i>	115 (71,9%)	45 (28,1%)	160
<i>Flavi</i>	76 (61,8%)	47 (38,2%)	123
Другие секции	36 (46,2%)	42 (53,8%)	78
Итого	408 (68,6%)	187 (31,4%)	595

Таблица 2 – Выявление различий между *Aspergillus* spp. по показателю «Score Value»

Сравниваемые пары групп	$\chi^2_{\text{эмп}}$	соотношение $\chi^2_{\text{эмп}}$ и $\chi^2_{\text{крит}}$	V-критерий Крамера	сила связи признаков
<i>Fumigati</i> и <i>Aspergillus</i> spp.	26,884	$\chi^2_{\text{эмп}} > \chi^2_{\text{крит}}$	0,294	связь средняя
<i>Fumigati</i> и <i>Flavi</i>	9,682	$\chi^2_{\text{эмп}} > \chi^2_{\text{крит}}$	0,165	связь слабая
<i>Aspergillus</i> spp. и <i>Flavi</i>	4,729	$\chi^2_{\text{эмп}} > \chi^2_{\text{крит}}$	0,153	связь слабая
<i>Aspergillus</i> spp. и <i>Nigri</i>	14,958	$\chi^2_{\text{эмп}} > \chi^2_{\text{крит}}$	0,251	связь средняя
<i>Fumigati</i> и <i>Nigri</i>	1,525	$\chi^2_{\text{эмп}} < \chi^2_{\text{крит}}$	0,062	связь несущественная
<i>Nigri</i> и <i>Flavi</i>	3,224	$\chi^2_{\text{эмп}} < \chi^2_{\text{крит}}$	0,107	связь слабая

Примечания: *Aspergillus* spp. — представители других секций, помимо перечисленных; $\chi^2_{\text{крит}}=3,841$ при $f=1$, $P=0,05$.

При масс-спектрометрическом исследовании экстрактов из мицелия удается регистрировать пики ионов с Mw до 18 kDa, но наиболее отчетливые до 12 kDa. Выявили 2 особенности, консервативные для рода *Aspergillus*: высокоинтенсивный пик в низкомолекулярном диапазоне (у *A. fumigatus* РКПГ F-1437 Mr=3368,966 Da) и комплекс из 4 интенсивных пиков и пиков-сателлитов в диапазоне Mr=5,7-6,9 kDa (у *A. fumigatus* РКПГ F-1437: 6004,439; 6153,937; 6648,848 и 6791,803 Da). В низкомолекулярном диапазоне сходные пики встречаются у многих микромицетов. Композиция пиков диапазона «средних» масс более специфична, но нами замечены сходства с масс-спектрами *Penicillium* spp. Аспергиллы и пенициллы отличаются сегментами масс-спектров 3,5–5,5 и 7–9 kDa. Полученные по этому разделу маркерные признаки будут полезны операторам MALDI-TOF-масс-спектрометров в случае работы с видами аспергиллов, по которым еще нет типовых МСП в базах для видовой идентификации.

При сравнении результатов идентификации аспергиллов различными методами на выборке из 238 штаммов руководствовались положением о ДНК-секвенировании избранных генов, как о «золотом стандарте» видовой идентификации мицелиальных грибов. Альтернативные методы отличались следующими долями ошибочных результатов: MALDI-TOF-MS 10,64% («сходимость» 89,36%); морфологическое исследование 20,5% («сходимость» 82,98%). Расхождение MALDI-TOF-MS и культурально-морфологического исследования составило 3,78% (в основном при

различии *A. flavus*, *A. oryzae* и *A. tamaritii* между собой).

Расчёт критерия Фрийдмана по результатам балльных оценок показал, что между тремя предпринятыми подходами к видовой идентификации аспергиллов имеются статистически значимые различия (эмпирическое значение $\chi^2_{r=9,125}$; критическое табличное значение $\chi^2_{r=9,125}$ (Neave H.R., 1978); уровень значимости $p < 0,00001$). Парные сравнения трех методов идентификации с помощью критерия Уилкоксона позволили установить следующие особенности. Таргетное ДНК-секвенирование по точности превосходит MALDI-TOF-масс-спектрометрию клеточного экстракта, хотя данное положение при полученном значении «ненулевых» сдвигов статистически находится «на границе области значимости» ($W_{\text{эмп.}} = W_{\text{крит.}} = 0$ при $p < 0,05$). По итогам изучения модельной выборки метод идентификации аспергиллов на основе MALDI-TOF-масс-спектрометрии приближается по точности к методу на основе ДНК-секвенирования, но его возможности пока ограничены физико-химическим сходством близкородственных видов *Aspergillus* spp., проявляющимся при заданных режимах подготовки образцов и съемки масс-спектров. Морфологическая идентификация значимо уступает по точности как подходу на основе ДНК-секвенирования ($W_{\text{эмп.}} < W_{\text{крит.}}$; $W_{\text{эмп.}} = 0$, $N_{\text{«ненулевых» сдвигов}} = 48$, $W_{\text{крит.}} = 274$ при $\alpha = 0,001$), так и MALDI-TOF-масс-спектрометрии ($W_{\text{эмп.}} < W_{\text{крит.}}$; $W_{\text{эмп.}} = 200$, $N_{\text{«ненулевых» сдвигов}} = 47$, $W_{\text{крит.}} = 260$ при $\alpha = 0,001$).

На основании комплексного исследования штаммов возбудителей аспергиллеза (углубленного морфологического исследования, MALDI-TOF-масс-спектрометрии и таргетного ДНК-секвенирования) был уточнен видовой состав выборки относительно исходных данных, полученных только на основании культурально-микологического исследования (Рисунок 2).

Примененный комбинированный подход позволил дополнительно выявить ряд видов возбудителей инфекций в Северо-Западном Федеральном округе России, которых ранее не выявляли: *A. tamaritii*, *A. reptans**, *A. ruber*, *A. calidoustus**, *Neosartorya hiratsukae** («*» отмечены криптические виды). При рассмотрении дендрограмм, полученных в результате иерархической кластеризации масс-спектров, оказалось, что наиболее приближено к филогенетическому распределению (Varga J. и Samson R.A., 2008) древо, построенное с помощью метода измерения дистанции по Минковскому и алгоритма связывания по Дж. Уорду.

Получена аннотация масс-спектры штаммов (в скобках краткое обозначение) *A. fumigatus* (AF), *A. terreus* (AT), *A. clavatus* (AC), *A. nidulans* (AN), *A. oryzae* (AO). Всего для отдельных видов удалось определить следующее количество «спектрообразующих» полипептидов: *A. fumigatus* 42, *A. terreus* 16, *A. clavatus* 36, *A. nidulans* 66, *A. oryzae* 17. Комплексная аннотация масс-спектра клеточного экстракта *Aspergillus* spp. включает 24 основных наиболее отчетливо идентифицируемых компонента: зрелый митохондриальный цинк-связывающий пептид 1 (AT); фрагменты белка типа Tom5 (AF); арилалкогольдегидрогеназа (AF); субъединица Tom7 из ТОМ-комплекса (АО, AN) или субъединица F1F2 АТФ-синтазы (AF); геранилгеранил-пирофосфат-синтаза; X-белок с трансмембранным доменом; фибриллярин-подобная рРНК-метилтрансфераза типа NOP1 (AN); фрагмент ацил-КоА-лигазы синтазы длинноцепочных жирных кислот (AF); фактор транскрипции, специфичный для грибов (AF); субъединица транслоказы SecE (AF) или рибосомальный белок L31 (AT); белок, сходный с ингибитором протеазы В (AF); гидррофобин НурС (АО); дезоксиуридиндифосфатаза (AT); белок семейства Maf-Ham1 (AN) или белок устойчивости к меди типа Crd2 (AF); ингибитор пептидаз из семейства I78 (AF); токсин RtxA (АО) или субъединица Sem1 протеасомы 26S (AN); трансмембранный белок с доменом DUF543 (AN); митохондриальный цинк-несущий

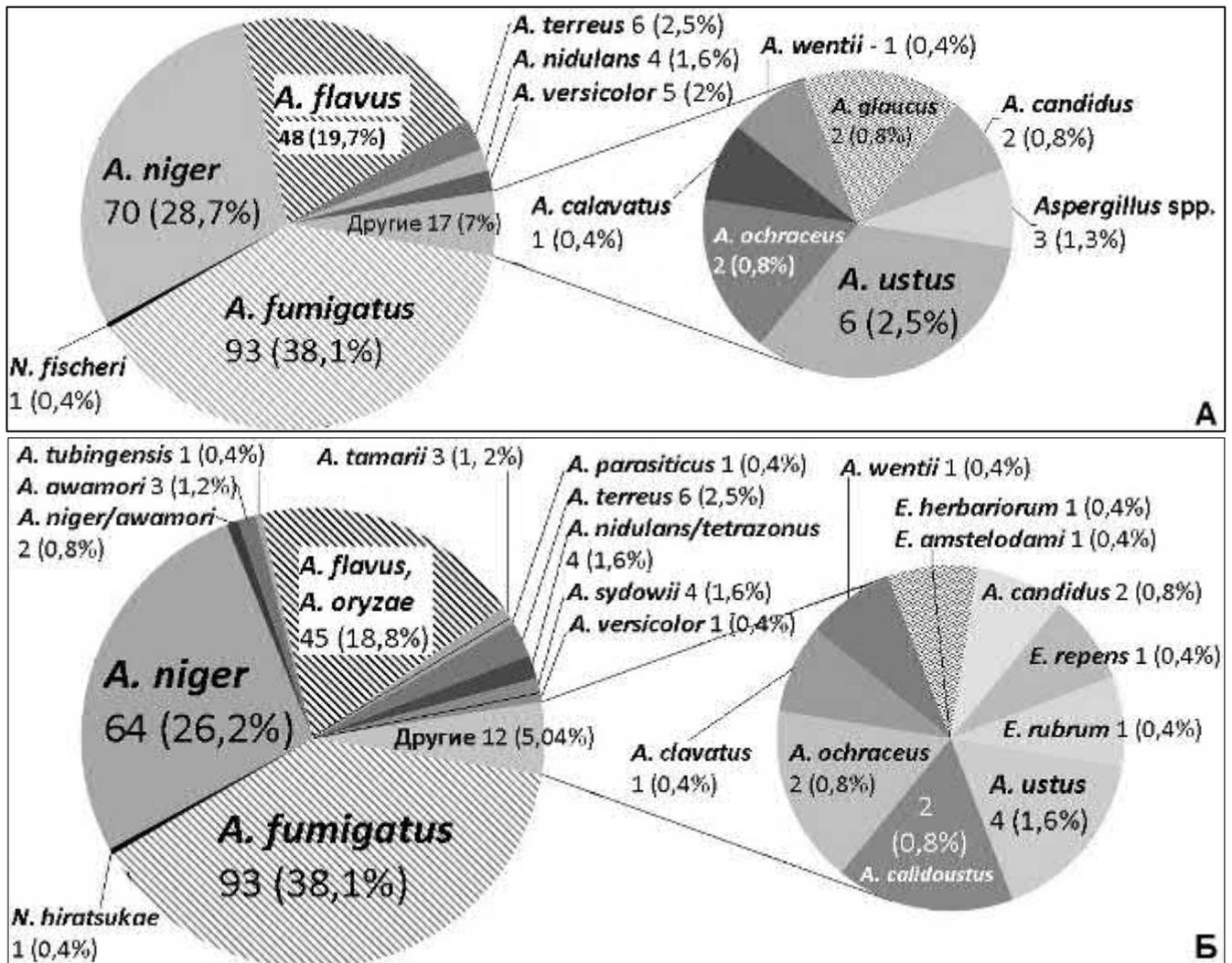


Рисунок 2 – Уточнение видового состава изученной выборки штаммов *Aspergillus* spp. *Примечание:* А – Исходный видовой состав изученной коллекции штаммов (на основании культурально-морфологическом исследовании); Б – Актуализованный видовой состав изученной рабочей коллекции штаммов, пересмотренный с помощью таргетного ДНК-секвенирования, MALDI-TOF-масс-спектрометрии и расширенного морфологического исследования

белок (АО); субъединица Tim13 транслоказы внутренней мембраны митохондрий (АН); H2A.Z-специфичный шаперон Chz1 (АО); субъединица ДНК-зависимой РНК-полимеразы (АН); конидиальный гидрофобин (АО); асоризин А (АО); фрагмент птерин-4-альфа-карбиноламин-дегидратазы (АО) или рибосомальный белок типа L32p (АН).

Полипептиды, образующие масс-спектр у аспергиллов, имеют различное происхождение: цитоплазматическое, мембранное, митохондриальное и ядерное. У бактерий, как показали на моделях *E. coli*, *Neisseria meningitidis* и *N. gonorrhoeae*, масс-спектр формируют, в основном рибосомальные белки и их фрагменты (Ильина Е.Н. и др., 2009; Suarez S. et al., 2013).

Установлено, что в составе спектрообразующих полипептидов (по расчетным данным) преобладают аланин, лейцин, серин и глицин; наименьшие доли в структуре характерны для триптофана. Для белков *A. oryzae* характерно высокое содержание цистеина и аспарагина, но доли изолейцина, лизина, триптофана и тирозина низкие. В полипептидах *A. fumigatus* высокое содержание аланина (в сравнении с белками других

видов), метионина, лизина и пролина, но при этом они бедны глутамином; *A. terreus* отличается наивысшим содержанием валина и тирозина; у *A. clavatus* выявили наивысшее содержание глутаминовой кислоты и триптофана, но наименьшую долю аспарагина. Полипептидам *A. nidulans* присуще высокое содержание серина и глутамин. Наибольшей вариабельностью по содержанию в первичной структуре отличались глутамат, аспарагин и аланин; наименьшей - триптофан и пролин.

Таким образом, в результате данного раздела исследования с использованием средств *in silico*-анализа определили характеристики спектрообразующих белков и пептидов возбудителей аспергиллеза, которые, во-первых, являются видовыми маркерами при масс-спектрометрической идентификации, во-вторых, в силу наличия уникальной первичной структуры они перспективны, как молекулярные «мишени» для разработки альтернативных тест-систем индикации *Aspergillus* spp. в биоматериале.

Чувствительность *Aspergillus* spp. к противогрибковым лекарственным средствам

Результаты определения минимальных ингибирующих концентраций к вориконазолу, итраконазолу и амфотерицину В на модельной выборке из 51 штамма показаны на рисунке 3.

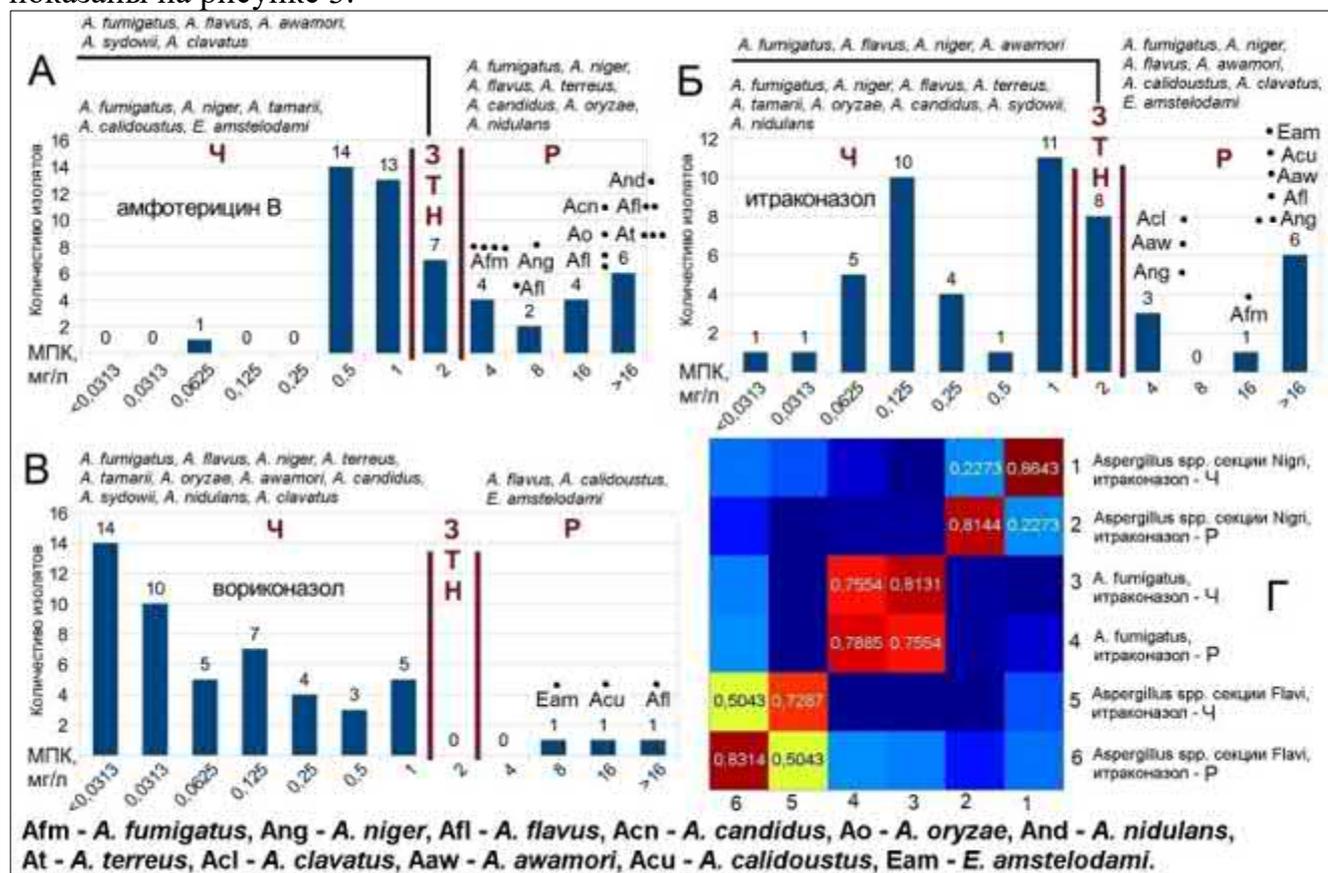


Рисунок 3 — Распределение МПК ПГЛС для изученных штаммов *Aspergillus* spp. (А, Б, В) и матрица сложного коэффициента корреляции, отображающая сравнения масс-спектров *Aspergillus* spp. с различной чувствительностью к итраконазолу (Г)

Примечание: «Ч» – чувствительный, «Р» – резистентный, «ЗТН» – зона технической неопределенности, «●» – 1 штамм

Из полученных данных следует, что штаммы возбудителей аспергиллезных инфекций, выделенные в Северо-Западном федеральном округе, гетерогенны по чувствительности к ПГЛС. Позитивным признаком является сохранение сравнительно

высокой активности *in vitro* вориконазола – препарата выбора в этиотропной терапии инвазивного аспергиллеза. Препарат вориконазол оказался наиболее эффективным (*in vitro*) в опыте в сравнении с двумя другими ПГЛС, однако, нами обнаружены единичные резистентные к вориконазолу штаммы из биоматериалов от пациентов, погибших от аспергиллеза. У штаммов *A. flavus* и *E. amstelodami* чувствительность определили однократно в силу однократного выделения от пациентов, в то же время *A. calidoustus* удалось выделить от больного повторно с интервалом 15 суток, притом первый изолят имел МИК вориконазола 4 мкг/мл, а при повторном выделении МИК составила 16 мкг/мл. Особого внимания заслуживает панрезистентный штамм *A. flavus*, выделенный из материала подкожного абсцесса в случае диссеминированного аспергиллеза.

При исследовании чувствительности к двум другим ПГЛС оказалось, что сила подавления роста аспергиллов ими в модельной выборке выражена гораздо более гетерогенно, чем у вориконазола. Разделение устойчивых и чувствительных штаммов по отношению к вориконазолу выражено более отчетливо, чем у итраконазола и амфотерицина В. В опыте амфотерицин В оказался наименее эффективным против штаммов модельной выборки, однако, для полиенов корреляцию между антифунгальным эффектом *in vitro* и *in vivo* подвергают сомнению.

С другой стороны, данный аспект действия итраконазола и амфотерицина В косвенно указывает на возможность использования молекулярных маркеров устойчивости к этим ПГЛС для изучения эпидемиологии аспергиллеза в регионе.

В результате построения СКК-матрицы, отражающей сравнение масс-спектров, для 6 условных групп *Aspergillus* spp., выделенных на основании таксономической принадлежности и величинам МПК (Рисунок 3Г), оказалось, что скомплектованные группы аспергиллов относительно однородны (СКК 0,7287–0,8643); а масс-спектры штаммов *A. fumigatus* с различной чувствительностью к итраконазолу и амфотерицину В сходны между собой (СКК 0,7554 и 0,7349 соответственно). У представителей секции *Flavi* отличия штаммов с различными МИК итраконазола выражены умеренно (СКК 0,5043), а амфотерицина В — отчетливо (СКК 0,1426). *Aspergillus* spp. секции *Nigri* в сравнении с предыдущей группой обладают яркими масс-спектрометрическими особенностями, отличающими штаммы с различной чувствительностью к итраконазолу (СКК 0,2273) и амфотерицину В (СКК 0,2213), что может быть связано не только с мутациями в генах-гомологах *cup51*, но и в молекулярном строении клеточной стенки, которая влияет на результат экстракции полипептидов для масс-спектрометрии. На основании проведенных исследований можно заключить, что установленные феномены и масс-спектры коллекционных штаммов *Aspergillus* spp. с различной лекарственной чувствительностью позволят в дальнейшем усовершенствовать и ускорить определение чувствительности к ПГЛС этих грибов в диагностической практике.

Для изучения филогенетических связей изолятов *Aspergillus* spp. на основе первичной структуры ланостерол-14- α -деметилазы удалось выкопировать 27 последовательностей для штаммов *A. fumigatus* и 24 последовательности других видов *Aspergillus* spp. Установили, что длина последовательности фермента варьирует от 507 (*A. flavus*) до 515 остатков (аспергиллы секции *Fumigati*). Кластеризация собранных структур по типу «ближайших соседей» с расчетом дистанции по Гришину Н.В. позволила создать дендрограмму, где отдельные клады соответствуют секциям рода *Aspergillus* (Рисунок 4, А).

Внутри клады, охватывающей СУР51А штаммов *A. fumigatus*, обнаружили 3 группы ветвей, которые соответствуют трем доминирующим фенотипам чувствительности к триазолам.

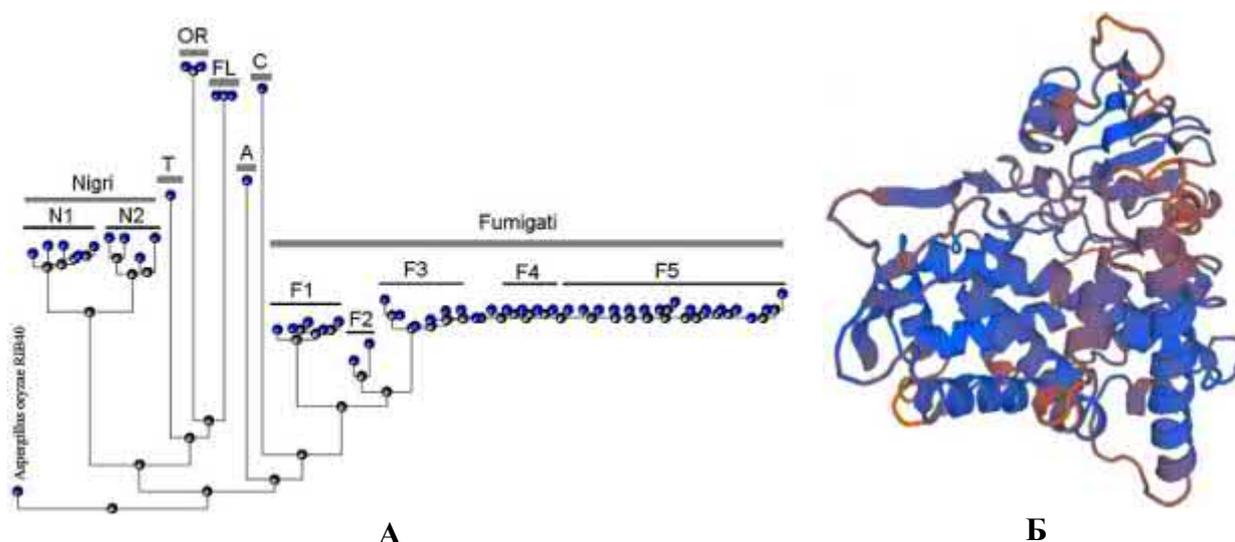


Рисунок 4 — Результаты биоинформационного исследования CYP51A

Примечания: **А** – филограмма, полученная на основе кластеризации последовательностей CYP51A грибов рода *Aspergillus* (дистанция ветвей сокращена); ветвь N1 – *A. niger* и *A. awamori*; ветвь N2 – *A. tubingensis* и *A. acidus*; T – секция *Terrei* (*A. terreus*); OR – с. *Ochraceorosei* (*A. ochraceoroseus*, *A. rambellii*); FL – с. *Flavi* (*A. flavus*); A – с. *Aspergillus* (*A. ruber*); C – с. *Clavati* (*A. clavatus*); ветвь F1 – *A. lentulus*; ветвь F2 – *A. oerlinghausenensis* и *Neosartorya fischeri*; ветвь F3 – *A. fumigatus*, чувствительные к вориконазолу и итраконазолу; ветвь F4 – *A. fumigatus*, устойчивые к итраконазолу, чувствительные к вориконазолу; ветвь F5 – *A. fumigatus*, устойчивые к итраконазолу и вориконазолу; **Б** – третичная структура ланостерол-14- α -деметилазы типа A из протеома *A. flavus* NRRL 3357, реконструированная с помощью Swiss-Model

Выявили структурные особенности CYP51(A), специфичные для представителей отдельных секций рода. Только у аспергиллов секции *Fumigati* в положениях 2-8 есть мотив VPMLWLT, также у этой секции в положении 193 находится Q (у других видов E), в положении 249 также Q (у других E, D). У аспергиллов секции *Ochraceorosei* в положении 12 находится остаток C, а в положении 261 – M (у других S, очень редко – L). У представителей секции *Nigri* в положении 164 находится остаток N. CYP51 у *A. terreus* имеет вставку VEAG между положениями 258 и 259 (у других ее нет).

В первичной структуре CYP51A обнаружили 102 консервативных и 104 переменных локуса, которые чередуются. Последние на 57,7% представлены заменами 1 аминокислоты, наименее часто встречаются делеции или вставки нескольких аминокислот (9,6%), в остальных случаях были вариации по группам аминокислот (32,7%). Выравнивание последовательностей CYP51A у *A. fumigatus* позволило выявить 12 сайтов, в которых у ряда штаммов имеются вариации. Из них 10 ранее описаны, доказана их роль в развитии резистентности (Snelders E. et al., 2010; Pelaez T. et al., 2012; Araujo R. et al., 2015; Warrilow A. et al., 2015; Liu M. et al., 2015; Wiederhold N.P. et al., 2016). В данной работе выявили исчезновение фрагмента в положении 505, а также вставку фрагмента ASLKI между 67K и 68Y (относительно CYP51A *A. fumigatus* Af293), влияние этих изменений на структуру CYP51A представляет интерес для проведения биоинформационного и рентгеноструктурного исследования. Выявленные феномены позволяют утверждать, что таргетное ДНК-секвенирование *sup51A* или аминокислотное секвенирование CYP51A возможно использовать не только для выявления резистентность-ассоциированных аминокислотных замен, но и для видовой

идентификации аспергиллов.

Благодаря биоинформационному анализу первичной последовательности СУР51А у *A. flavus* воссоздали вторичную и третичную структуру данного фермента, определили сайты связывания лигандов (гема, ланостерола, вориконазола и позаконазола, а также экспериментального антимикотика «ТУ1»), определили соответствие каждого аминокислотного остатка определенному элементу третичной структуры, сольватацию остатков, выявили некоторые физико-химические свойства фермента.

Фермент можно описать брутто-формулой $C_{2636}N_{699}O_{741}S_{24}H_{4113}$; он обладает $M_w=58222,1680$ Da, $pI=8,31$; по этим параметрам исследуемый белок сходен с представителем семейства р450, белком семейства ацилтрансфераз, монооксигеназой и оксидоредуктазой неутонченных функций, а также транспортными белками, ассоциированными со множественной лекарственной устойчивостью (протеом *A. flavus*). Одна из картин воссозданной третичной структуры исследуемого белка показана на рисунке 4, Б. Ориентировочные размеры смоделированной молекулы 93,013 x 60,605 x 55,281 Å. По результатам обработки последовательности в трех биоинформационных ресурсах выявлено, что полученная третичная структура воссоздана с высокими показателями достоверности (указаны ресурсы и значения предусмотренных показателей). **RaptorX:** Score=466 (индикатор выравнивания искомой последовательности и последовательности-шаблона третичной структуры); r -уровень=6.25e-11; uGDT=415 (ненормализованный общий тест дистанции); GDT=80 (ненормализованный общий тест дистанции); uSeqID=295 (число идентичных остатков); SeqID=58. **Swiss Model:** GMQE = 0,78; QMEAN4 = -1,72. Идентичность с анализируемой последовательностью 64,09%; перекрытие 0,91. **Phyre2:** достоверность 100,0; идентичность 62%. Воссоздание активного центра фермента позволило установить аминокислотные сайты связывания кофактора (гема) и лигандов:

- Гем: Y₁₂₅, L₁₃₂, K₁₃₆, L₂₉₂, G₂₉₆, S₂₉₉, I₃₀₃, L₃₅₈, P₄₄₅, F₄₄₆, H₄₅₁, C₄₅₃, I₄₅₄, G₄₅₅, F₄₅₈, A₄₅₉.
- Ланостерол: L₁₁₄, T₁₁₅, F₂₁₈, F₂₂₃, L₂₉₂ (?), I₃₆₄, S₃₆₆, S₄₉₁, S₄₉₂, M₄₉₃.
- Вориконазол: Y₁₁₁, F₁₁₉, Y₁₂₅, A₂₉₅, I₃₆₄, S₃₆₆, M₄₉₃, F₄₉₄.
- Позаконазол: Y₁₁₁, T₁₁₅, F₁₁₉, Y₁₂₅, F₂₁₈, F₂₂₃, M₂₉₄, A₂₉₅, S₂₉₉, I₃₆₄, S₃₆₆, M₃₆₈, M₄₉₃, F₄₉₄.

На основании результатов проведенного исследования можно заключить, что с учетом высоких минимальных ингибирующих концентраций терапевтических производных триазола у *A. flavus* полученная оригинальная характеристика фермента СУР51А из протеома коллекционного штамма позволит разрабатывать новые более эффективные препараты этой группы по принципу «таргетного» синтеза.

Заключение. Таким образом, в результате комплексного исследования *Aspergillus* spp. получены новые сведения о культурально-морфологических, физико-химических (масс-спектрометрических) свойствах и чувствительности к противогрибковым лекарственным средствам аспергиллов, позволяющие усовершенствовать лабораторную диагностику аспергиллеза, а также внести вклад в создание новых лабораторных диагностических тестов.

ВЫВОДЫ

1. Штаммовый полиморфизм возбудителей аспергиллеза проявляется в пространственном распределении зон спороношения в колониях, а также в интенсивности образования конидий, наличии карликовых (атипичных) вариантов конидиеносцев.
2. Пленчатые поверхностные колонии с жидкой питательной среды являются оптимальной формой культур *Aspergillus* spp. для масс-спектрометрического

исследования, что позволило создать базу из 530 MALDI-масс-спектров, «библиотеку» для видовой идентификации из 47 типовых масс-спектро-профилей, аннотации MALDI-масс-спектров 5 видов возбудителей аспергиллеза.

3. Аспергиллы секций *Flavi* (*A. flavus*, *A. oryzae*, *A. tamarii*) и *Nigri* (*A. niger*, *A. awamori*, *A. niger/awamori*) с различной чувствительностью к вориконазолу и амфотерицину В отличаются по масс-спектрометрическим свойствам клеточных экстрактов. Штаммы *A. fumigatus* (секция *Fumigati*) с различной чувствительностью к итраконазолу и амфотерицину В по масс-спектрометрическим свойствам однородны.

4. Первичная структура ланостерол-14- α -деметиلاзы изоформы А у *Aspergillus* spp. включает аминокислотные сайты, константные для рода, и варианты сайты – маркеры видовой принадлежности и резистентности к триазольным антимикотикам.

5. Филогенетические связи медицински значимых *Aspergillus* spp. при работе с выборками последовательностей CYP51A удается оптимально реконструировать благодаря кластеризации по принципу «ближнего соседа» с расчетом дистанции по методу Гришина Н.В., а при работе с масс-спектрами клеточных экстрактов – благодаря иерархической кластеризации с расчетом дистанции по Минковскому и объединением по методу Уорда.

ПРАКТИЧЕСКИЕ РЕКОМЕНДАЦИИ

1. Данные о полиморфизме аспергиллов *in vitro* необходимо учитывать при культуральной (микологической) диагностике аспергиллезной инфекции.

2. Отличительные особенности колоний *Aspergillus* spp. на среде с бенгальским розовым, не тождественные с картинками роста на других питательных средах, необходимо учитывать при проведении санитарно-микологических исследований.

3. Для приготовления среды Чапека с дрожжевым экстрактом при необходимости (при отсутствии) сахарозу можно заменять на лактозу.

4. В целях получения демонстрационных культур *Aspergillus* spp., кроме *A. terreus* и группы *A. glaucus*, следует использовать среду Чапека с дрожжевым экстрактом, солодовый агар (для типовой морфологии), картофельно-глюкозно-дрожжевой агар (демонстрация изменчивости). Демонстрационные культуры *A. fumigatus*, представителей секции *Flavi* и *A. terreus* возможно получать на среде Сабуро, а представителей группы *A. glaucus* предпочтительно пассировать на среде Чапека с дрожжевым экстрактом и 20% сахарозы, либо на среде YPD. Накопление экссудата у видов аспергиллов, способных к этому, более выгодно осуществлять при пассаже штаммов в колбах. *A. wentii*, *A. clavatus*, *A. ochraceus*, *A. repens* и *A. ruber* следует выращивать при 25°C, культуры прочих видов - при 30°C.

5. При получении субкультуры аспергиллов, пригодной к экстракции белков для MALDI-TOF-масс-спектрометрии, целесообразно выращивать инокулом спор на жидкой среде Сабуро в модификации Ч. Эммонса при 37° (для термофильных видов) или 30° (для мезофильных видов) до появления пленчатой колонии без отчетливых признаков спороношения.

6. Для идентификации аспергиллов методом MALDI-TOF-MS предпочтительно использовать «ручной» режим ионизации образца.

7. Для аннотирования масс-спектров культур и культуральных экстрактов микроорганизмов, полученных методом MALDI-TOF-MS, оптимально применение комбинации функций, представленной в биоинформационных ресурсах TagIdent, BLAST и Protein Data Bank.

8. При определении чувствительности *Aspergillus* spp. к вориконазолу с учетом

особенностей изолятов, выделенных в России, необходимо продлевать серию разведений этого препарата на 2 позиции в меньшую сторону.

ПЕРСПЕКТИВЫ ДАЛЬНЕЙШЕЙ РАЗРАБОТКИ ТЕМЫ

В развитии данного направления целесообразна разработка следующих экспериментальных разделов:

1. Создание расширенной базы масс-спектро-профилей *Aspergillus* spp. для видовой идентификации этих грибов с помощью MALDI-TOF-масс-спектрометрии;
2. Изучение ланостерол-14- α -деметилазы *A. flavus* и других медицински значимых *Aspergillus* spp. с помощью рентгеноструктурного анализа;
3. Разделение и идентификация пептидов и белков из кислотного экстракта клеток *Aspergillus* spp.; сопоставление результатов протеомного профилирования с результатами биоинформационных аннотаций масс-спектров, полученных в данном исследовании;
4. В дальнейшем также представляет интерес сравнительное масс-спектрометрическое исследование аспергиллов с различной чувствительностью к эхинокандинам, поскольку их мишень (β -глюкан-синтаза) и эффект действия прямо связаны с клеточной стенкой.

СПИСОК РАБОТ, ОПУБЛИКОВАННЫХ ПО ТЕМЕ ДИССЕРТАЦИИ

- 1) **Рябинин, И.А.** Чувствительность возбудителей аспергиллеза к амфотерицину В / **И.А. Рябинин** // «Трансляционная медицина: от теории к практике»: сборник материалов научно-практической конференции молодых ученых и специалистов. 24 апреля 2013 года / под ред. А.В. Силина. – СПб.: Изд-во СЗГМУ им. И.И. Мечникова. – 2013. – С. 96-98.
- 2) Методические рекомендации «Микологические культуральные исследования» / Н.В. Васильева, Н.П. Елинов, Т.С. Богомолова, Г.А. Чилина, И.А. Босак, Т.В. Богданова, О.Н. Пинегина, Е.Р. Рауш, **И.А. Рябинин**, А.Н. Мамошин. – СПб.: СЗГМУ им. И.И. Мечникова. 2013. – 50 С.
- 3) **Рябинин, И.А.** Выявление родственных связей у клинических изолятов *Aspergillus fumigatus* Fres. и *A. niger* v. Tiegh. посредством анализа масс-спектров их протеомов / **И.А. Рябинин**, Н.В. Васильева, Т.С. Богомолова, Г.А. Чилина, Ю.В. Михайлова // Проблемы медицинской микологии. – 2014. – Т. 16, №1. – С. 50-56.
- 4) **Рябинин, И.А.** Видовая идентификация возбудителей аспергиллеза из рода *Neosartorya* Malloch & Cain (обзор литературы) / **И.А. Рябинин** // Проблемы медицинской микологии. – 2014. – Т. 16, №2. – С. 9-14.
- 5) **Рябинин, И.А.** Клинические случаи аспергиллеза, вызванные *Neosartorya* spp., и некоторые биологические свойства этих микромицетов (обзор) / **И.А. Рябинин** // Проблемы медицинской микологии. – 2014. – Т.16, №3. – С. 20-25.
- 6) **Рябинин, И.А.** Необычные варианты *Aspergillus* spp. в культуре / **И.А. Рябинин**, Г.А. Чилина, Т.С. Богомолова, Ю.В. Михайлова // Проблемы медицинской микологии. – 2014. – Т. 16, №4. – С. 26-31.
- 7) **Рябинин, И.А.** Полиморфизм возбудителя внутрибольничного аспергиллеза — *Aspergillus fumigatus* / **И.А. Рябинин**, Г.А. Чилина, Т.С. Богомолова, О.Д. Васильев // «Профилактическая медицина — 2014». Материалы Всероссийской конференции с международным участием, 26 ноября 2014 г. / под ред. д.м.н. А.В. Силина, д.м.н. А.В. Мельцера. – СПб.: Изд-во СЗГМУ им. И.И. Мечникова, 2014. – С. 125-128.

- 8) **Рябинин, И.А.** Анализ процессов идентификации и группировки масс-спектров, получаемых при MALDI-TOF-масс-спектрометрии белковых экстрактов из культур *Aspergillus fumigatus* Fres. / И.А. Рябинин, А.И. Ершова, К.Д. Батаева // **Проблемы медицинской микологии.** – 2015. – Т. 17, №1. – С. 52-57.
- 9) **Рябинин, И.А.** Глиотоксин (краткий обзор) / И.А. Рябинин, О.Д. Васильев, К.Д. Батаева, А.И. Ершова // **Проблемы медицинской микологии.** – 2015. – Т. 17, №2. – С. 8-11.
- 10) Организационная модель справочника возбудителей инфекций для формирования обучающих модулей с использованием информационно-симуляционных технологий: учебно-методическое пособие / О.Г. Хурцилава, Н.В. Васильева, Е.А. Оришак, А.С. Степанов, А.А. Порин, Л.Ю. Нилова, Т.С. Богомоллова, **И.А. Рябинин**, М.В. Шульгина, Е.Р. Рауш, Г.И. Беспалова; под ред. д-ра мед. наук, проф. О.Г. Хурцилава. – СПб.: Изд-во СЗГМУ им. И.И. Мечникова, 2015. – 216 С.
- 11) Основы видовой идентификации микроорганизмов с помощью MALDI-TOF-масс-спектрометрии: учебно-методическое пособие / **И.А. Рябинин**, Н.В. Васильева; под ред. д-ра мед. наук, проф. О.Г. Хурцилава. – СПб.: Изд-во СЗГМУ им. И.И. Мечникова, 2015. – 100 С.
- 12) **Елинов, Н.П.** «Аспергиллы в секции *Circumdati*» – новые продуценты оригинального охратоксина А / Н.П. Елинов, **И.А. Рябинин** // **Проблемы медицинской микологии.** – 2016. – Т. 18, №3. – С. 63-66.
- 13) **Рябинин, И.А.** Система рода *Aspergillus Micheli* в свете исследований научной школы *Centraalbureau voor Schimmelcultures* (обзор) / **И.А. Рябинин**// **Проблемы медицинской микологии.** – 2016. – Т. 18, №4. – С. 7-12.
- 14) **Рябинин, И.А.** Структурные особенности СУР51 – маркера эпидемической опасности штаммов возбудителей микозов / **И.А. Рябинин** // **Здоровье населения и качество жизни: электронный сборник материалов IV Всероссийской с международным участием заочной с научно-практической конференции / под ред. з.д.н. РФ, проф. В.С. Лучкевича.** – СПб., 2017. – С. 269-277.
- 15) **Рябинин, И.А.** Разработка ключа для видовой идентификации *Aspergillus* spp. - возбудителей заболеваний человека, циркулирующих в Северо-Западном округе России / **И.А. Рябинин**, С.С. Расулова // «Профилактическая медицина — 2017». Материалы Всероссийской конференции с международным участием, 6-7 декабря 2017 г. Часть II. / под ред. д.м.н. А.В. Мельцера, д.м.н. И.Ш. Якубовой. – СПб.: Изд-во СЗГМУ им. И.И. Мечникова, 2017. – С. 306-312.
- 16) **Расулова, С.С.** Низкомолекулярные биологически активные метаболиты *Aspergillus wentii* (краткий обзор) / С.С. Расулова, **И.А. Рябинин** // **Проблемы медицинской микологии.** – 2017. – Т. 19, №4. – С. 3-9.
- 17) **Рябинин, И.А.** Разработка синоптического ключа для идентификации медицински значимых *Aspergillus* spp. [Электронный ресурс] / **И.А. Рябинин**, С.С. Расулова // **Синергия наук.** – 2018. – №21. – Режим доступа: <http://synergy-journal.ru/archive/article1939>
- 18) **Носенко, Т.Н.** Особенности организации колоний *Aspergillus* spp. при росте в присутствии поливинилхлорида / Т.Н. Носенко, **И.А. Рябинин**, М.И. Фокина, Н.В. Васильева, И.Ю. Денисюк // **Проблемы медицинской микологии.** – 2018. – Т. 20, №1. – С. 25-32.
- 19) Vasilyeva, N.V. Mass-spectrometric differences of *Aspergillus* spp. with different sensitivity to itraconazole and amphotericin B [Electronic resource] / N.V. Vasilyeva, **I.A. Riabinin**, T.S. Bogomolova, J.V. Borzova // *Aspergillus & Aspergillosis Website.* – 2018. –

Mode of access: https://www.aspergillus.org.uk/conference_abstracts/mass-spectrometric-differences-aspergillus-spp-different-sensitivity

20) **Рябинин, И.А.** Аннотация MALDI-масс-спектра белково-пептидной фракции клеточного экстракта *Aspergillus sydowii* в кратком виде / **И.А. Рябинин**, Е.Н. Чернец, Н.В. Васильева // Проблемы медицинской микологии. – 2019. – Т. 21, №2. – С. 27-29.

21) **Рябинин, И.А.** Культурально-морфологическая характеристика редких штаммов возбудителей аспергиллеза, устойчивых к вориконазолу / **И.А. Рябинин**, В.А. Спиридонова, Т.С. Богомолова, И.В. Выборнова, Ю.В. Борзова, Е.В. Фролова, О.В. Шадривова, Г.А. Чилина, Л.В. Филиппова, А.Е. Учеваткина, С.М. Игнатьева, А.Е. Тараскина, Н.В. Васильева // Проблемы медицинской микологии. – 2019. – Т. 21, №3. – С. 49-56.

22) **Vasilyeva, N. Revision of special microscopic techniques for visualization of aspergilli structural elements / N. Vasilyeva, I. Riabinin, Y. Mihaylova, Y. Borzova, L. Alieva // Journal of Fungi. – 2019. – Vol. 5, Is. 4. – P. 186-188.**

23) **Kozlov, G. Indication of opportunistic micromycetes in mycobiota of municipal solid waste compost by metagenomic approach / G. Kozlov, N. Vasilyeva, I. Riabinin // Journal of Fungi. – 2019. – Vol. 5, Is. 4. – P. 241-242.**

24) Жоля, Я.С. Строение микрокультур некоторых *Aspergillus* spp. при периодическом наблюдении / Я.С. Жоля, А.М. Волонцевича, **И.А. Рябинин** // Проблемы медицинской микологии. – 2020. Т. 22, №4. – С. 38-45.

25) **Рябинин, И.А.** Белки *Penicillium chrysogenum*, выявляемые при MALDI-TOF-масс-спектрометрии клеточного экстракта / **И.А. Рябинин**, Н.В. Васильева, Т.В. Богданова // Микология и фитопатология. – 2020. – Т. 54, №6. – С. 436-445.

26) **Рябинин, И.А.** Особенности белков – адгезинов *Mucor lusitanicus* и *Aspergillus clavatus* в сравнении с адгезинами некоторых микромицетов и бактерий / **И.А. Рябинин**, С.В. Ковыршин, А.Л. Бузмакова, Н.В. Васильева // Проблемы медицинской микологии. – 2021. – Т. 23, №1. – С. 46-52.

27) **Рябинин, И.А.** Влияние некоторых особенностей штаммов *Aspergillus* spp. секции *Nigri* на композицию их MALDI-масс-спектров / **И.А. Рябинин** // Современная микология в России. – Т. 9. Материалы 5 Съезда микологов России. – М.: Национальная академия микологии, 2022. – С. 15-16: <http://www.mycology.ru/congress/5crm/cmr9el.pdf>

СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ

КГДА – картофельно-глюкозно-дрожжевой агар; **КМА** – картофельно-морковный агар; **МПК** — минимальная подавляющая концентрация; **МСП** — масс-спектро-профиль; **ПГЛС** – противогрибковые лекарственные средства; **РКПГ** – Российская коллекция патогенных грибов; **AFPA** – *Aspergillus flavus/parasiticus*-агар; **BLAST** (Basic Local Alignment Search Tool) – биоинформационный ресурс для поиска и сравнительного анализа нуклеотидных и аминокислотных последовательностей; **CLSI** – Институт клинических и лабораторных стандартов; **COBALT** (Constraint-based Multiple Alignment Tool) – программный алгоритм сопоставления аминокислотных последовательностей; **CYP51** – краткое обозначение фермента ланостерол-14- α -деметилазы; **EUCAST** – Европейский комитет по определению чувствительности к антимикробным препаратам; **KEGG** – Киотская энциклопедия генов и геномов, биоинформационная база данных; **MALDI-TOF-MS** – матрично-активированная лазерная десорбционно / ионизационная времяпролетная масс-спектрометрия; **SV** – Score Value, показатель достоверности масс-спектрометрической идентификации; **YPD** – глюкозо-пептонно-дрожжевой агар.