

Заключение комиссии 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 кандидатской диссертации Рябинина Игоря Андреевича на тему: «Микробиологическая и масс-спектрометрическая характеристика основных возбудителей аспергиллеза» на соискание ученой степени кандидата медицинских наук по специальности: 1.5.11. – Микробиология

Научный руководитель:

Васильева Наталья Всеволодовна — заслуженный деятель науки Российской Федерации, доктор биологических наук (03.00.24 – микология), профессор, директор НИИ медицинской микологии им. П.Н. Кашкина, заведующий кафедрой медицинской микробиологии Федерального государственного бюджетного образовательного учреждения высшего образования «Северо-Западный государственный медицинский университет имени И.И. Мечникова» Министерства здравоохранения Российской Федерации (ФГБОУ ВО СЗГМУ им. И.И. Мечникова Минздрава России, Санкт-Петербург).

Диссертационная работа Рябинина И.А. соответствует специальности: 1.5.11. – Микробиология (медицинские науки).

Работа посвящена фенотипическим и масс-спектрометрическим свойствам возбудителей аспергиллеза, в том числе с различной чувствительностью к противогрибковым лекарственным средствам, и запланирована для оптимизации лабораторной диагностики аспергиллеза.

В ходе диссертационного исследования установлено, что основные возбудители различных форм аспергиллеза (*A. fumigatus*, *A. flavus*, *A. terreus*, *A. niger*) проявляют выраженный морфологический штаммовый полиморфизм *in vitro*. Диссертантом доказано, что этот полиморфизм проявляется, главным образом, в пространственном распределении зон спороношения в колониях, а также в интенсивности образования конидий, наличии карликовых (атипичных) вариантов конидиеносцев.

В разделе работы, посвященном физико-химическому исследованию *Aspergillus* spp., доказано, что плесчатые поверхностные колонии с жидкой питательной среды являются оптимальной формой культур для масс-спектрометрической съемки, 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. Благодаря разработанному диссертантом оригинальному протоколу аннотирования MALDI-масс-спектров установлено, что маркеры видовой принадлежности (в MALDI-масс-спектрах) *Aspergillus* spp. представлены уникальными комплексами белков и пептидов, отличающихся политопной клеточной локализацией и различной функциональной принадлежностью.

Доказано, что аспергиллы секций *Flavi* (*A. flavus*, *A. oryzae*, *A. tamaris*) и *Nigri* (*A. niger*, *A. awamori*, *A. niger/awamori*) с различной чувствительностью к вориконазолу и амфотерицину В отличаются по масс-спектрометрическим свойствам клеточных экстрактов. В то же время штаммы *A. fumigatus* с различной чувствительностью к итраконазолу и амфотерицину В по масс-спектрометрическим свойствам однородны.

Доказано, что филогенетические связи внутри рода *Aspergillus* возможно выявить при работе с масс-спектрами клеточных экстрактов благодаря иерархической кластеризации с расчетом дистанции по Минковскому и объединением по методу Уорда.

На основании сравнительного анализа первичных структур лапостерол-14 $\alpha$ -деметилаз (CYP51A) *Aspergillus* spp. автором работы установлено, что первичная структура CYP51A включает аминокислотные сайты, константные для рода, и варианты сайты – маркеры видовой принадлежности и резистентности к триазольным антимикотикам. Отсюда следует, что определение нуклеотидной последовательности генов типа *cyp51A* у *Aspergillus* spp.

позволит устанавливать видовую принадлежность этих грибов, а также детерминанты резистентности к триазольным препаратам. Филогенетические связи медицински значимых *Aspergillus* spp. при работе с выборками последовательностей CYP51A удастся оптимально реконструировать благодаря кластеризации по принципу «ближнего соседа» с расчетом дистанции по методу Гришина Н.В.

В результате работы 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*.

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

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 значимость работы состоит в том, что 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.

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.

Практическая значимость работы состоит в том, что с учетом видовой разнообразия условно-патогенных *Aspergillus* spp., характерных для Северо-Западного федерального округа России, разработаны морфологические ключи для идентификации аспергиллов – возбудителей инфекций человека. Создана база (библиотека) масс-спектро-профилей «AMPSL» (*Aspergillosis Main Pathogens Spectral Library*) для совершенствования видовой идентификации *Aspergillus* spp. методом линейной MALDI-TOF-масс-спектрометрии клеточного экстракта.

Впервые 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.

Результаты работы Рябинина И.А. 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. 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).

Диссертационная работа выполнена с использованием совокупности современных методов исследований. Достоверность результатов обеспечена достаточным массивом фактических данных, адекватно сформулированными целями и задачами, корректно проведенным статистическим анализом результатов, обоснованными выводами, положениями, рекомендациями. Научные положения и выводы, сформулированные, Рябининым И.А. логически вытекают из результатов, полученных в ходе диссертационной работы.

По объему проведенных исследований, их новизне и практической значимости работа соответствует всем требованиям, предъявляемым к диссертациям на соискание ученой степени кандидата медицинских наук по специальности: 1.5.11 – Микробиология.

Комиссия не установила в диссертации и автореферате фактов некорректного заимствования материалов без ссылок на первоисточники. Отчет о проверке на заимствования с помощью системы «Антиплагиат» на сайте [www.antiplagiat.ru](http://www.antiplagiat.ru) показал, что оригинальность текста составляет 97,56%, самоцитирование – 0,39%, цитирование – 0,47%, заимствование – 1,58%.

Материалы исследования и основные положения диссертационной работы обсуждались на 37 конференциях различного уровня, в том числе с международным участием.

Диссертация содержит достоверные сведения об опубликованных соискателем ученой степени работах, в которых изложены основные научные результаты диссертации. По материалам диссертации опубликовано 27 печатных работ, в том числе 13 статей в рецензируемых изданиях.

Диссертация соответствует профилю Диссертационного совета 64.1.004.01.

В качестве **ведущей организации** предлагается утвердить Федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение высшего образования «Первый Санкт-Петербургский государственный медицинский университет имени академика И.П. Павлова» Министерства здравоохранения Российской Федерации.

В качестве **официальных оппонентов** предлагаются:

**Клясова Галина Александровна** – доктор медицинских наук, профессор, заведующий отделом микробиологии и антимикробной терапии Федерального государственного бюджетного учреждения «Национальный медицинский исследовательский центр гематологии» Министерства здравоохранения Российской Федерации.

**Багирова Наталия Сергеевна** – доктора медицинских наук, старший научный сотрудник Федерального государственного бюджетного учреждения «Национальный медицинский исследовательский центр онкологии имени Н.Н. Блохина» Министерства здравоохранения Российской Федерации.

Согласия оппонентов получены.

**Заключение: комиссия Диссертационного совета 64.1.004.01. рекомендует диссертацию Рябинина Игоря Андреевича «Микробиологическая и масс-спектрометрическая характеристика основных возбудителей аспергиллеза» по специальности: 1.5.11. – Микробиология (медицинские науки) к приему к защите.**

Заключение подготовили члены комиссии Диссертационного совета 64.1.004.01:

**Председатель:**

руководитель лаборатории диагностики дифтерийной и коклюшной инфекций ФБУН МНИИЭМ им. Г.Н. Габричевского Роспотребнадзора, доктор медицинских наук, профессор



О.Ю. Борисова

**Члены комиссии:**

Главный научный сотрудник лаборатории клинической микробиологии и биотехнологии ФБУН МНИИЭМ им. Г.Н. Габричевского Роспотребнадзора, доктор медицинских наук, профессор, заслуженный деятель науки РФ



С.С. Афанасьев

руководитель отдела медицинской биотехнологии ФБУН МНИИЭМ им. Г.Н. Габричевского Роспотребнадзора, доктор биологических наук, доцент



Е.А. Воропаева

руководитель клинического отдела ФБУН МНИИЭМ им. Г.Н. Габричевского Роспотребнадзора, доктор медицинских наук



Н.И. Леонтьева