

ОТЗЫВ

официального оппонента, доктора медицинских наук, профессора, заведующего отделом микробиологии и антимикробной терапии Федерального государственного бюджетного учреждения «Национальный медицинский исследовательский центр гематологии» Министерства здравоохранения Российской Федерации Клясовой Галины Александровны на диссертационную работу Рябинина Игоря Андреевича на тему «Микробиологическая и масс-спектрометрическая характеристика основных возбудителей аспергиллеза», представленную на соискание ученой степени кандидата медицинских наук по специальности 1.5.11. – Микробиология (медицинские науки)

Актуальность темы исследования

Микромицеты рода *Aspergillus* являются ведущими возбудителями инвазивных микозов у пациентов с выраженной иммуносупрессией. Однако кроме больных с гематологическими заболеваниями эти микроорганизмы имеют весомое значение в этиологии инфекций среди больных после трансплантации солидных органов, тяжелых больных отделений реанимации с новой коронавирусной инфекцией и другими респираторными вирусами, а также у больных туберкулёзом, хронической обструктивной болезнью лёгких, муковисцидозом, бронхиальной астмой. Если ограничится поражением лёгких, то аспергиллы причастны к трём различным по патогенезу и течению заболеваниям: инвазивный аспергиллез, хронический аспергиллез лёгких, аллергический бронхолегочный аспергиллез. Несмотря на принципиальное различие этих заболеваний с позиции клинициста, перед лабораторным работником - микробиологом стоят во всех случаях сходные задачи: индикация патогена в биоматериале, его выделение и идентификация, исследование практически значимых свойств, включая чувствительность к противогрибковым лекарственным препаратам. В достижении этих

проблемных задач имеются как решенные, так и нерешенные вопросы. В числе таких обстоятельств, которые требуют углубленного разбора, безусловно - изменчивость и полиморфизм *Aspergillus* spp. *in vitro*, необходимость адаптации приемов и средств физико-химической идентификации микроорганизмов для данных патогенов, поиск дополнительных возможностей анализа первичной структуры белка-мишени триазольных противогрибковых препаратов.

Данные проблемные направления затронуты в работе Рябина И.А., которая посвящена исследованию фенотипических и масс-спектрометрических свойства возбудителей аспергиллеза, в том числе с различной чувствительностью к противогрибковым лекарственным средствам, для оптимизации лабораторной диагностики аспергиллеза и реализации адекватной противогрибковой терапии. В этой связи представленная диссертационная работа Рябина И.А. является актуальной и своевременной

Диссертант определил цель работы, для ее достижения указаны 4 задачи, в числе которых: исследование макро- и микроморфологической изменчивости *Aspergillus* spp. на различных питательных средах; получение и аннотирование MALDI-масс-спектров белково-пептидных фракций клеток возбудителей аспергиллеза, разработка на их основе базы (библиотеки) типовых масс-спектро-профилей для совершенствования видовой идентификации; исследование масс-спектрометрических особенностей возбудителей аспергиллеза с различной чувствительностью к противогрибковым препаратам; сравнительный анализ первичной структуры ланостерол-14- α -деметилазы – мишени действия терапевтических производных триазола у различных представителей рода *Aspergillus*.

Новизна исследования, полученных результатов, выводов и рекомендаций, сформулированных в диссертации

К числу достижений в работе Рябина И.А., обладающих научной новизной, следует отнести результаты культурально-морфологического, физико-химического и биоинформационного разделов исследования. В частности, соискателем установлены характеристики роста *Aspergillus* spp. на плотных питательных средах, выделенные из образцов от пациентов аспергиллезом и из объектов окружающей среды, представлены новые данные о полиморфизме основных возбудителей аспергиллеза, которые ранее не входили в справочную литературу. Выявлен ряд атипичных макро- и микроскопических свойств аспергиллов в культуре, которые необходимо учитывать при видовой идентификации этих грибов, составлены оригинальные идентификационные ключи — дихотомический и синоптический, — позволяющие определить вид клинически значимых *Aspergillus* spp..

На модели *Aspergillus* spp. впервые предложен алгоритм биоинформационного анализа MALDI – масс спектра неразделенного белкового экстракта, который позволяет определить полипептиды, образующие масс-спектр- маркеры видовой принадлежности. Соискателем усовершенствованы различные приемы применения MALDI-TOF-масс-спектрометрии при работе с *Aspergillus* spp. – это способ субкультивирования мицелиальных грибов, который является оптимальным для последующей экстракции из мицелия белков и пептидов, создание оригинальной базы (библиотека) типовых масс-спектро-профилей для повышения точности видовой идентификации; представлены новые разработки по алгоритму аннотирования MALDI-масс-спектра, способ иерархической кластеризации MALDI-масс-спектров, согласующийся с результатами кластеризации таксономически значимых локусов генома. В отношении ряда видов клинически значимых *Aspergillus* spp. автором показана ассоциация свойств MALDI-масс-спектра с лекарственной чувствительностью к антимикотикам (к триазолам и полиенам), что впоследствии может быть существенным

подспорьем для клиники по ускоренному выявлению резистентных штаммов. Автором показано, что данный феномен наиболее отчетливо определяется при построении групповых матриц коэффициента корреляции.

Степень достоверности и обоснованности научных положений, выводов и рекомендаций, сформулированных в диссертации

Достоверность результатов диссертации Рябинина И.А. обеспечена репрезентативной численностью выборок объектов исследования, выбором адекватных поставленным задачам и современных методов экспериментальной микробиологии, физико-химического исследования, биоинформатики и биомедицинской статистики.

Положения, выносимые на защиту, логично аргументированы, выводы автора обоснованы, базируются на тщательном анализе полученных данных, сформулированы в соответствии с содержанием предоставленной работы.

Теоретическая и практическая значимость диссертационной работы

Соискатель ученой степени предложил типологию роста дымчатого аспергилла (*Aspergillus fumigatus*) на среде Чапека с дрожжевым экстрактом, охватывающую основные культуральные варианты этого ведущего по своей встречаемости возбудителя инвазивного аспергиллеза. В работе установили, что замена сахарозы (углевода, не свойственного тканям человека) на лактозу в составе среде Чапека с дрожжевым экстрактом не ухудшает рост *Aspergillus* spp., а также позволяет дифференцировать условно-патогенных аспергиллов между собой по культурально-морфологическим признакам.

Получены новые, удобные для практической работы ключи для видовой идентификации *Aspergillus* spp., выделенных из биоматериала человека, в культуре.

Автор обосновал с практической и гигиенической точки зрения удобство получения пленчатых поверхностных колоний аспергиллов на жидкой питательной среде на этапе подготовки к MALDI-TOF-масс-спектрометрии. С учетом недостаточной эффективности исходной базы масс-

спектрометра-микробного анализатора VactoSCREEN в идентификации *Aspergillus* spp., особенно *A. flavus* и *A. terreus*, среди которых встречаются штаммы с высокими минимальными подавляющими концентрациями триазолов и полиенов, автором разработана оригинальная база типовых масс-спектро-профилей «AMPSL», показавшая свою диагностическую эффективность.

Соискатель предложил комплекс приемов биоинформационного анализа MALDI-масс-спектра материала из микробной культуры, «аннотирования», который позволяет установить соответствие пиков и белков из протеома анализируемого микроорганизма. Также автор предусмотрел в алгоритме и необходимость исследования свойств так называемых «спектрообразующих» белков и пептидов *in silico*. Получены аннотации MALDI-масс-спектров важнейших видов условно-патогенных аспергиллов (*A. fumigatus*, *A. terreus*, *A. oryzae*, *A. clavatus*, *A. nidulans*).

Установлено, что в MALDI-масс-спектрах аспергиллов секций *Flavi* и *Nigri* имеются особенности, которые согласуются с результатами определения чувствительности к противогрибковым препаратам. Эти свойства масс-спектров проявляются в отсутствии действия противогрибкового препарата.

Автором впервые с использованием средств биоинформатики воссоздана вторичная и третичная структура ланостерол-14 α -деметилазы изоформы А у желтого аспергилла (*Aspergillus flavus* Link), а также ее сайты связывания с кофактором-гемом, естественным субстратом — ланостеролом, а также конкурентными ингибиторами — противогрибковыми препаратами. Данные об этих сайтах значимы для разработки новых противогрибковых препаратов группы производных триазола.

Показано, в аминокислотных последовательностях ланостерол-деметилаз имеются сочетания остатков, специфичных для *Aspergillus* spp. определенной группы или вида. Таким образом, аминокислотное

секвенирование ланостерол-деметилаз аспергиллов или ДНК-секвенирование кодирующих структурных генов можно в дальнейшем будет использовать для решения двух задач: выявление детерминант резистентности к лечебным триазолам и видовой идентификации.

Апробация результатов исследования, в том числе публикации в рецензируемых изданиях

Результаты исследования, основные положения диссертации автором представлены на 37 конференциях, конгрессах и других научных мероприятиях, в числе которых такие значимые форумы, как Всероссийский конгресс по медицинской микробиологии, эпидемиологии, клинической микологии и иммунологии «Кашкинские чтения», Санкт-Петербургская Ассамблея молодых ученых и специалистов, Российский конгресс лабораторной медицины, Общероссийское научно-практическое мероприятие «Эстафета вузовской науки», международном конгрессе «Тенденции в медицинской микологии».

Результаты работы внедрены в учебный процесс кафедры медицинской микробиологии в форме разработанных автором лекций, занятий, презентаций, электронных образовательных модулей, видео- и аудиоматериалов, учебных микропрепаратов; диагностическую работу микробиологической лаборатории микологической клиники в форме идентификационных ключей и приема пробоподготовки мицелиальных грибов к MALDI-TOF-масс-спектрометрии; научно-исследовательскую работу Российской коллекции патогенных грибов НИИ медицинской микологии им. П.Н. Кашкина путем участия в паспортизации коллекционных штаммов *Aspergillus* spp. (указаны подразделения Северо-Западного государственного медицинского университета им. И.И. Мечникова).

Созданная соискателем база «AMPSL» внедрена в процесс производственных разработок ООО НПФ «Литех» в качестве части

«библиотеки» типовых масс-спектро-профилей программного пакета VastoSCREEN для масс-спектрометрической идентификации.

По теме диссертации соискатель лично и в соавторстве опубликовал 27 работ, среди которых 13 статей в рецензируемых изданиях, 5 статей в изданиях другого типа, 5 статей в сборниках конференций, методические рекомендации, два учебно-методических пособия, тезисы доклада в материалах конференции.

Оценка содержания, завершенности и оформления диссертации

Том представленной диссертации отличается классической компоновкой, включает введение, обзор литературы, главы с описанием результатов собственных исследований (в количестве четырех), заключение, выводы, практические рекомендации, перспективы дальнейшей разработки темы, список сокращений, список литературы, благодарности. Список литературы содержит ссылки на 365 источников, из них отечественных — 34, иностранных — 331. Текст диссертации адекватно иллюстрирован таблицами и рисунками.

В разделе «**Введение**» представлены данные об актуальности исследования по данной тематике и указана степень разработанности темы. Соискателем определена цель работы, которая соответствует требованиям Высшей аттестационной комиссии при Минобрнауки России, предъявляемым к научным исследованиям. Для достижения цели исследования сформулированы четыре задачи. В раздел помещены основные положения диссертационной работы. Приведены сведения, относящиеся к научной новизне, теоретической и практической значимости исследования. Описана методология и методы проведенной работы. Указано внедрение результатов в учебный процесс, научную работу, производственные разработки двух учреждений. Приведена информация о личном вкладе автора.

В **первой главе** «Обзор литературы» соискатель описал достигнутые микробиологами успехи в изучении практически важных свойств возбудителей аспергиллеза. В многообразии свойств *Aspergillus* spp. автором уделено особое внимание морфогенезу аспергиллов, химической композиции клеточных стенок этих микромицетов, особенностям их физиологии. Изложены современные представления о распространении аспергиллов в объектах окружающей среды, указана их роль в заболеваемости животных. Автором подробно дискутируется роль различных аспергиллов в патологиях человека, детально приведены данные по связи с заболеваниями редких и криптоических видов. Кратко описаны молекулярные основы современной противогрибковой терапии инвазивного аспергиллеза и особенности определения чувствительности аспергиллов к противогрибковым препаратам. Глава подробно иллюстрирована схемами, таблицами, рисунками, что позволяет легко воспринимать непростой и объемный материал. Обзор литературы свидетельствует о важности и необходимости проводимого диссертационного исследования.

Во **второй главе** (результатов собственных исследований) автором детально представлены характеристики роста условно-патогенных аспергиллов на плотных питательных средах, полученные на макро- и микро-уровне. Приведены данные об изменчивости и полиморфизме аспергиллов, различных вариантах микроскопической организации этих грибов, включая атипичные. Глава снабжена рисунками и фотографиями. Помещены разработанные ключи морфологической идентификации *Aspergillus* spp. в культуре.

В **третьей главе** приведены результаты, полученные с использованием MALDI-TOF-масс-спектрометрии. Дана краткая характеристика MALDI-масс-спектра экстракта из мицелия *Aspergillus* spp., описаны различия в масс-спектрометрической идентификации при различных режимах управления лазером и работе с различными видами и группами видов аспергиллов. В

критическом ракурсе проведено сравнение эффективности трех методов видовой идентификации *Aspergillus* spp. на основе культурально-морфологического исследования, MALDI-TOF-масс-спектрометрии и таргетного ДНК-секвенирования. Приведены результаты аннотации масс-спектров по оригинальному алгоритму, детально проанализирован состав «спектрообразующих» белков по функциональному, таксономическому, биохимическому принципу. Приведены сведения о создании и определении параметров диагностической эффективности базы типовых масс-спектро профилей AMPSL. Представлены выявленные в ходе исследования возможности масс-спектрометрии для определения детерминант устойчивости аспергиллов к противогрибковым препаратам.

В четвертой главе представлен сравнительный и структурный анализ ланостерол-14 α -деметилаз аспергиллов. Автор обосновал наличие видоспецифических сайтов в структуре ферментов данного типа, реконструировал ланостерол-деметилазу *A. flavus* с использованием различных биоинформационных редакторов, воссоздал ее активный центр с сайтами связывания естественного кофактора и лиганда, а также — терапевтических триазолов.

В пятой главе автор, в дополнение к использованным стандартным методам исследования, поместил описание новых методических приемов, которые были разработаны в ходе диссертационного исследования для решения поставленных задач.

Представленные выводы логично обоснованы и подтверждены полученными в ходе исследования результатами. Сформулированы практические рекомендации, ценные для микробиологической диагностики аспергиллеза и работ в области фундаментальной биологии аспергиллов.

Автореферат отражает основное содержание работы, достаточно для понимания читателя снабжен таблицами и иллюстрирован рисунками.

Соответствие специальности

По тематике диссертации Рябинина И.А., объектам, материалам и методам исследования, основным положениям, выносимым на защиту, и выводам автора, представленная диссертационная работа соответствует научной специальности 1.5.11. – Микробиология (медицинские науки).

Принципиальных замечаний по работе нет. Представленная научная работа интересная, масштабная, актуальная, представляет большое значение как для практического здравоохранения, так и для проведения дальнейших научных исследований.

В процессе ознакомления с диссертацией возникли вопросы.

1. Можете ли сказать об отличиях одного вида *Aspergillus* в зависимости от выделения их в том или ином исследуемом образце (например, легкие, околоносовые пазухи, слуховой проход, ногтевая пластинка и пр).?
2. В какой секции *Aspergillus* (Nigri? Flavi? Usti?) были выявлены наибольшие расхождения между морфологией и секвенированием, и по каким параметрам?

Заключение

Диссертационная работа Рябинина Игоря Андреевича на тему: «Микробиологическая и масс-спектрометрическая характеристика основных возбудителей аспергиллеза», представленная на соискание ученой степени кандидата медицинских наук по специальности 1.5.11. – Микробиология, выполненная под руководством заслуженного деятеля науки Российской Федерации, доктора биологических наук, профессора Васильевой Натальи Всеволодовны, является завершенной научно-квалификационной работой, и содержит новое решение актуальной научной задачи охарактеризовать фенотипические и масс-спектрометрические свойства клинически значимых возбудителей аспергиллеза, в том числе с различной чувствительностью к противогрибковым лекарственным средствам, для оптимизации лабораторной диагностики и лечения аспергиллеза. По актуальности, новизне и практической значимости диссертационная работа Рябинина Игоря

Андреевича отвечает требованиям п. 9 «Положения о присуждении ученых степеней», утвержденного Постановлением Правительства Российской Федерации № 842 от 24 сентября 2013 года (с изменениями в соответствии с Постановлениями Правительства Российской Федерации от 21.04.2016 № 335, от 02.08.2016 № 748, от 29.05.2017 № 650, от 28.08.2017 № 1024, от 01.10.2018 № 1168, от 26.05.2020 № 751, от 20.03.2021 № 426 «О внесении изменений в Положение о присуждении ученых степеней»), предъявляемым к диссертациям на соискание ученой степени кандидата медицинских наук, а ее автор, Рябинин Игорь Андреевич, заслуживает присуждения ученой степени кандидата медицинских наук по специальности 1.5.11. – Микробиология.

Официальный оппонент:

Заведующий отделом микробиологии и антимикробной терапии Федерального государственного бюджетного учреждения «Национальный медицинский исследовательский центр гематологии» Министерства здравоохранения Российской Федерации (ФГБУ «НМИЦ гематологии» Минздрава России, 125167, Москва, Новый Зыковский проезд, д. 4; сайт <https://blood.ru/>; тел. +7 (495) 612-51-81, e-mail: klyasova.g@blood.ru)

доктор медицинских наук, профессор  Клясова Галина Александровна

«30» марта 2023 г.

Подпись Клясовой Галины Александровны заверяю:

Ученый секретарь Федерального государственного бюджетного учреждения «Национальный медицинский исследовательский центр гематологии» Министерства здравоохранения Российской Федерации (ФГБУ «НМИЦ гематологии» Минздрава России, 125167, Москва, Новый Зыковский проезд, д. 4; сайт <https://blood.ru/>; тел. +7 (495) 612-64-63, e-mail: nauka@blood.ru)

кандидат медицинских наук

Джулакян Унан Левонович




М.П.