

ЗАКЛЮЧЕНИЕ ДИССЕРТАЦИОННОГО СОВЕТА 64.1.004.01 НА БАЗЕ ФЕДЕРАЛЬНОГО 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 ДИССЕРТАЦИИ НА СОИСКАНИЕ УЧЕНОЙ СТЕПЕНИ КАНДИДАТА НАУК

аттестационное дело № _____
решение диссертационного совета от 18 мая 2023 г. №4.

О присуждении Рябинину Игорю Андреевичу, гражданину Российской Федерации, ученой степени кандидата медицинских наук.

Диссертация «Микробиологическая и масс-спектрометрическая характеристика основных возбудителей аспергиллеза» по специальности 1.5.11. – Микробиология принята к защите 02.02.2023г. протокол № 2 диссертационным советом 64.1.004.01 на базе Федерального 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 (125212, г. Москва, ул. Адмирала Макарова, д. 10). Диссертационный совет утвержден Приказом Министерства образования и науки РФ № 714/нк «О советах по защите докторских и кандидатских диссертаций» от 2 ноября 2012 г., приказ № 791/нк от 09.12.2020 г. част. изм., приказ № 1040/нк от 13.10.2021 г. част. изм.

Соискатель Рябинин Игорь Андреевич, 1986 года рождения. В 2010 году окончил Государственное образовательное учреждение высшего профессионального образования «Санкт-Петербургская государственная медицинская академия им. И.И. Мечникова Федерального агентства по здравоохранению и социальному развитию» (ГОУ ВПО СПбГМА им. И.И. Мечникова Росздрава), медико-профилактический факультет, присуждена квалификация «врач». В 2012 году Рябинин И.А. окончил ординатуру на кафедре медицинской микробиологии ГБОУ ВПО СЗГМУ им. И.И. Мечникова Минздравсоцразвития России по специальности «Бактериология». В 2012 - 2015 гг. проходил обучение в очной аспирантуре на кафедре медицинской микробиологии Государственного бюджетного образовательного учреждения высшего профессионального образования «Северо-Западный государственный медицинский университет им. И.И. Мечникова» Министерства здравоохранения Российской Федерации по специальности 03.02.03 Микробиология (приказ об отчислении № 129-2015/асп от 30.09.2015 г.). Справка об обучении № 4979 от 13.01.2022 выдана Федеральным государственным бюджетным образовательным учреждением высшего образования «Северо-Западный государственный медицинский университет имени И.И. Мечникова» Министерства здравоохранения Российской Федерации. Прикреплен к Федеральному государственному бюджетному образовательному учреждению высшего образования «Северо-Западный государственный медицинский университет имени И.И. Мечникова» Министерства здравоохранения Российской Федерации для подготовки диссертации на соискание ученой степени кандидата наук по специальности 03.02.03 – микробиология (Приказ № 121-2019/асп от 14.11.2019 г.).

В период подготовки диссертации Рябинин Игорь Андреевич работал младшим научным сотрудником, затем научным сотрудником НИИ медицинской микологии им. П.Н. Кашкина, ассистентом кафедры медицинской микробиологии ФГБОУ ВО СЗГМУ им. И.И. Мечникова Минздрава России.

Диссертация выполнена в научно-исследовательской лаборатории молекулярно-генетической микробиологии научно-исследовательского института 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: Васильева Наталья Всеволодовна – доктор биологических наук, профессор, заслуженный деятель науки Российской Федерации; Федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение высшего образования «Северо-Западный государственный медицинский университет имени И.И. Мечникова» Министерства здравоохранения Российской Федерации (ФБОУ ВО СЗГМУ им. И.И. Мечникова Минздрава России); НИИ медицинской микологии им. П.Н. Кашкина, директор; кафедра медицинской микробиологии, заведующий.

Официальные оппоненты: Багирова Наталия Сергеевна, доктор медицинских наук (14.00.14 — Онкология, 03.00.07 — Микробиология), Федеральное государственное бюджетное учреждение «Национальный медицинский исследовательский центр онкологии имени Н.Н. Блохина» Министерства здравоохранения Российской Федерации (ФГБУ «НМИЦ онкологии им. Н.Н. Блохина» Минздрава России), научно-исследовательский институт клинической онкологии имени академика РАН и РАМН Н.Н. Трапезникова, отдел клинико-лабораторной диагностики, лаборатория микробиологическая, старший научный сотрудник; **Клясова Галина Александровна**, доктор медицинских наук (14.00.29 — Гематология и переливание крови), профессор, Федеральное государственное бюджетное учреждение «Национальный медицинский исследовательский центр гематологии» Министерства здравоохранения Российской Федерации (ФГБУ «НМИЦ гематологии» Минздрава России), отдел микробиологии и антимикробной терапии, заведующий, – дали положительные отзывы на диссертацию.

Ведущая организация: Федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение высшего образования «Первый Санкт-Петербургский государственный медицинский университет имени академика И.П. Павлова» Министерства здравоохранения Российской Федерации в своем положительном заключении, подписанном доктором медицинских наук, профессором, академиком РАЕН Тецем Виктором Вениаминовичем, кафедра микробиологии и вирусологии, заведующий, указала, что диссертация является законченным научным исследованием, содержащим важные вопросы и решения, касающиеся составления характеристики фенотипических и масс-спектрометрических свойств возбудителей аспергиллеза, в том числе с различной чувствительностью к противогрибковым лекарственным средствам, для оптимизации лабораторной диагностики аспергиллеза.

Соискатель имеет 27 печатных работ по теме диссертации, 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; общий объем работ составляет 509 страниц с авторским вкладом – 248 страниц.

Наиболее значимые работы: (1) 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; (2) 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; (3) 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.

На диссертацию и автореферат поступило 3 положительных отзыва без замечаний от: (1) д.м.н., профессора Потатуркиной-Нестеровой Н.И., заведующего курсом микробиологии кафедры общей и клинической фармакологии с курсом микробиологии ФГБОУ ВО «Ульяновский государственный университет»; (2) к.б.н. Половец Н.В., старшего научного сотрудника лаборатории особо опасных микозов ФКУЗ «Волгоградский научно-исследовательский противочумный институт» Роспотребнадзора, и заслуженного деятеля науки Российской Федерации, д.м.н., профессора Липницкого А.В., главного научного сотрудника лаборатории особо опасных микозов ФКУЗ «Волгоградский научно-исследовательский противочумный институт» Роспотребнадзора; (3) к.б.н., доцента Лисовской С.А., ведущего научного сотрудника лаборатории микологии ФБУН «Казанский научно-исследовательский институт эпидемиологии и микробиологии» Роспотребнадзора.

В отзывах отмечено, что в ходе диссертационного исследования представлены новые данные о полиморфизме медицински значимых *Aspergillus* spp. в культуре, их физико-химических свойствах, выявляемых посредством MALDI-TOF-масс-спектрометрии, особенностях чувствительности к противогрибковым лекарственным средствам, структурной организации ланостерол-14-альфа-деметилазы грибов рода *Aspergillus*. Разработан способ субкультивирования аспергиллов для подготовки к MALDI-TOF-масс-спектрометрии, алгоритм биоинформационного аннотирования MALDI-масс-спектра, база («библиотека») типовых масс-спектро-профилей для физико-химической идентификации аспергиллов, модификация питательной среды для культивирования аспергиллов.

Выбор официальных оппонентов и ведущей организации обосновывается тематикой научных исследований, компетентностью в вопросах, рассмотренных в диссертации, большим опытом работы в изучении этиологии, лабораторной диагностики и прикладных аспектов биологии возбудителей оппортунистических инфекций (в том числе грибковых) у пациентов онкологического, онкогематологического, трансплантологического профиля.

Диссертационный совет отмечает, что на основании выполненных исследований соискатель **разработал** «морфологические ключи» для идентификации аспергиллов – возбудителей инфекций человека, учитывающие видовое разнообразие условно-патогенных *Aspergillus* spp., характерных для Северо-Западного федерального округа России. **Предложен** способ субкультивирования аспергиллов для выделения белкового экстракта на этапе подготовки к масс-спектрометрическому

исследованию. **Разработана** база (библиотека) масс-спектро-профилей для совершенствования видовой идентификации *Aspergillus* spp. методом линейной MALDI-TOF-масс-спектрометрии клеточного экстракта. Соискателем **доказано**, 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. **Доказана** равноценность сахарозы и лактозы в качестве энергетических источников для *Aspergillus* spp., что значимо при разработке новых питательных сред для аспергиллов. В практику лабораторной диагностики инфекций, обусловленных *Aspergillus* spp. **введены** актуализированные «ключи» для видовой идентификации (дихотомический и синоптический).

Теоретическая значимость исследования обоснована тем, что в результате исследования **доказан** состав композиции «спектрообразующих» белков *Aspergillus* spp., выявляемых при анализе MALDI-масс-спектров, включающий среди представителей разных видов закономерно повторяющиеся белки — субъединицы Tim-Tom комплекса (митохондриальная транслоказа), легкую цепь динеина, глутаредоксин, субъединицу АТФ-синтазы, гистон H2B, Zn-связывающие белки митохондрий, белки с доменом DUF543, эукариотический фактор инициации и различные протеинкиназы. Применительно к проблематике диссертации **результативно использована** структурная реконструкция фермента CYP51A у *Aspergillus flavus* – одного из трех ведущих по частоте выделения возбудителей инвазивного аспергиллеза, который превосходит виды доминирующей «триады» по величинам минимальных ингибирующих концентраций триазоловых препаратов. В ходе исполнения работы **изложены** подробные аннотации MALDI-масс-спектров пула пептидов и низкомолекулярных белков для *A. fumigatus*, *A. terreus*, *A. oryzae*, *A. clavatus*, *A. nidulans*. **Раскрыто** наличие масс-спектрометрических маркеров аспергиллов из секций *Flavi* и *Nigri*, наличие которых сочетается с определенными значениями минимальных подавляющих концентраций противогрибковых лекарственных средств. **Доказано**, что в первичной структуре ланостерол-14 α -деметилаз изоформы А *Aspergillus* spp. присутствуют не только аминокислотные замены, ассоциированные с противогрибковой устойчивостью, но и сочетания аминокислотных остатков, специфичные для представителей конкретных видов. На основе реализованного в исследовании опыта работы с биоинформационными редакторами и базами **раскрыт** комплекс необходимых функций, инструментов, программных возможностей, необходимых для аннотирования MALDI-масс-спектров клеток и клеточных экстрактов, а также создания характеристик отдельных спектрообразующих белков. **Изучен** полиморфизм возбудителей аспергиллеза в культуре, а также проведен анализ расчетного химического состава белков и пептидов, формирующих MALDI-масс-спектр клеточного экстракта у *Aspergillus* spp. **Проведена модернизация** классификации типов роста *Aspergillus fumigatus* – ведущего по частоте возбудителя инвазивного аспергиллеза.

Значение полученных соискателем результатов исследования для практики подтверждается тем, что: **разработаны** видео-, аудио- и иллюстративные обучающие материалы, которые **внедрены** в учебный процесс кафедры медицинской микробиологии ФГБОУ ВО СЗГМУ им. И.И. Мечникова Минздрава России (акт внедрения от 28.04.2022); **разработан** способ

субкультивирования аспергиллов для подготовки к MALDI-TOF-масс-спектрометрии, **созданы** идентификационные ключи, которые **внедрены** в работу микробиологической лаборатории микологической клиники ФГБОУ ВО СЗГМУ им. И.И. Мечникова Минздрава России (акт внедрения от 28.04.2022) и работу Российской коллекции патогенных грибов НИИ медицинской микологии им. П.Н. Кашкина ФГБОУ ВО СЗГМУ им. И.И. Мечникова Минздрава России (акт внедрения от 06.06.2022). 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 ресурсы электронной образовательной среды «Русский Moodle 3KL». **Определены** особенности культуральных свойств и микроморфологии условно-патогенных *Aspergillus* spp. на серии питательных сред, рецептуры которых фигурируют в нормативных и методических документах по микробиологическим исследованиям. **Создана** база (библиотека) типовых масс-спектро-профилей для программного обеспечения VactoSCREEN-ID, которая внедрена в процесс производственных разработок ООО НПФ «Литех» (акт внедрения от 14.04.2022). **Представлены** практические рекомендации по применению полученных в ходе исследования результатов: о выборе питательных сред для получения культур *Aspergillus* spp. с морфологическими характеристиками, оптимально отражающими видовые особенности; об использовании лактозы в качестве основного энергетического ресурса в составе модифицированной среды Чапека с дрожжевым экстрактом; о разработанном способе субкультивирования *Aspergillus* spp. для подготовки к MALDI-TOF-масс-спектрометрии и оптимальном режиме MALDI-ионизации образца; о необходимости продления серий разведений вориконазола на 2 позиции в меньшую сторону при определении чувствительности *Aspergillus* spp.

Оценка достоверности результатов исследования выявила, что для **экспериментальных работ** объем фактического материала является достаточным, методы статистической обработки подобраны адекватно, эксперименты проведены на высоком научно-методическом уровне с применением современных методов и сертифицированного оборудования. **Теория исследования построена** на известных научно-теоретических данных и согласуется с опубликованными экспериментальными данными, посвященными изучению фенотипических свойств представителей рода *Aspergillus*, имеющих медицинское значение, и разработке подходов к их видовой идентификации, определению чувствительности к противогрибковым препаратам. В ходе подготовки диссертационной работы исследован значительный объем материала: изучены морфологические и физико-химические свойства 244 штаммов грибов рода *Aspergillus*; в ходе культурально-морфологического исследования выполнено 445 пассажей исследуемых штаммов на 14 плотных питательных средах; в ходе физико-химического исследования произведено свыше 700 масс-спектрометрических съемок. Для испытания разработанной базы типовых масс-спектро-профилей получено и использовано 199 масс-спектров из штаммов 37 видов микроскопических грибов и 117 масс-спектров из штаммов 85 видов бактерий. В биоинформационное исследование включена 51 последовательность ланостерол-14-альфа-деметилаз *Aspergillus* spp. **Идея исследования базируется** на известных теоретических и практических материалах; согласуется с

опубликованными экспериментальными данными, посвящёнными спонтанной и индуцированной изменчивости микроскопических грибов рода *Aspergillus*, анализу композиции низкомолекулярной фракции протеома этих грибов, структурной реконструкции белков-«мишеней» противогрибковых лекарственных средств. **Использовано** сравнение полученных автором результатов с существующими литературными данными и разработками других авторов, в том числе и зарубежных. **Установлено**, что большинство результатов проведенных автором исследований согласуется с результатами других авторов, представленных в независимых источниках, и дополняет их. **Использованы** классические и современные методы исследования: микробиологические, физико-химические, молекулярно-генетические, биоинформационные, аналитические и статистические.

Личное участие соискателя заключалось в планировании исследования, разработке дизайна, формулировке и обосновании цели, задач, методов исследования, наборе экспериментального материала. Соискатель ученой степени самостоятельно выполнил морфологическую и физико-химическую идентификацию штаммов представителей рода *Aspergillus*; изучил особенности их морфологии на различных питательных средах; определил чувствительность штаммов к противогрибковым лекарственным препаратам; провел MALDI-TOF-масс-спектрометрию белкового экстракта из культур с целью видовой идентификации; составил базу типовых масс-спектро-профилей, получил математическое распределение масс-спектров протеомов *Aspergillus* spp. и выполнил его интерпретацию; провел анализ биоинформационных данных. На этапах проведения исследования автор самостоятельно поддерживал живые культуры исследуемых штаммов. Соискателем произведен анализ отечественной и зарубежной литературы и обработка полученных результатов. Штаммы *Aspergillus* spp. для исследования предоставлены сотрудниками кафедры медицинской микробиологии ФГБОУ ВО СЗГМУ им. И.И. Мечникова Минздрава России (доцент к.м.н. Богомоловой Т.С., ассистент Пинегиной О.Н.), сотрудниками отделения лабораторной диагностики микологической клиники ФГБОУ ВО СЗГМУ им. И.И. Мечникова Минздрава России (зав. отделением Шурпицкая О.А., врач-бактериолог к.м.н. Суханова Ю.А.), сотрудниками научно-исследовательской лаборатории «Российская коллекция патогенных грибов» (зав. лабораторией Чилина Г.А.). Штаммы бактерий, использованные при апробации «библиотеки» масс-спектро-профилей, предоставили сотрудники отделения лабораторной диагностики микологической клиники ФГБОУ ВО СЗГМУ им. И.И. Мечникова Минздрава России (врач-бактериолог Ремнева Н.П., фельдшеры-лаборанты Кашуба В.М. и Цветкова Г.В.). Клиническую характеристику групп пациентов предоставили доцент кафедры клинической микологии, аллергологии и иммунологии ФГБОУ ВО СЗГМУ им. И.И. Мечникова Минздрава России к.м.н. Шадривова О.В. и сотрудники микологической клиники ФГБОУ ВО СЗГМУ им. И.И. Мечникова Минздрава России (зав. клиникой, к.м.н. доцент Борзова Ю.В., врач-аллерголог Десятик Е.А.). Данные о результатах молекулярно-генетической идентификация *Aspergillus* spp. предоставили сотрудники научно-исследовательской лаборатории молекулярно-генетической микробиологии НИИ медицинской микологии им. П.Н. Кашкина ФГБОУ ВО СЗГМУ им. И.И. Мечникова Минздрава России (научный сотрудник к.б.н. Михайловой Ю.В., научный сотрудник Рудневой М.В.).

На заседании 18 мая 2023 года диссертационный совет принял решение присудить Рябинину Игорю Андреевичу ученую степень кандидата медицинских наук по специальности: 1.5.11. – Микробиология.

При проведении тайного голосования диссертационный совет в количестве 16 человек, из них 10 докторов наук по специальности 1.5.11 – Микробиология, участвовавших в заседании, из 24 человек, входящих в состав совета, проголосовал: за – 16, против – 0, недействительных бюллетеней – 0.

Председатель диссертационного совета,
доктор биологических наук, профессор

Алёшкин Владимир Андрианович

Ученый секретарь диссертационного совета,
доктор медицинских наук, профессор

Борисова Ольга Юрьевна

19.05.2023 г.

