

ОТЗЫВ

официального оппонента, доктора медицинских наук, Багировой Наталии Сергеевны на диссертационную работу Воропаева Александра Дмитриевича на тему «Особенности грибов рода *Candida*, выделенных от ВИЧ-инфицированных пациентов», представленную на соискание ученой степени кандидата биологических наук по специальности 1.5.11. – Микробиология

Актуальность темы исследования

Кандидоз является наиболее распространенной грибковой инфекцией полости рта. Недавние молекулярно-генетические исследования показывают, что *Candida spp.* обнаруживаются у всех людей как часть нормальной микробиоты полости рта. Наиболее распространенный вид в инфицированной и здоровой полости рта - это *Candida albicans*, и, по оценкам, он обнаруживается более чем в 80% случаев. Виды *Candida*, не относящиеся к *C. albicans*, в полости рта представлены различными видами в зависимости от региона, профиля стационара и прочих причин. Наиболее часто регистрируются *C. glabrata*, *C. dubliniensis*, *C. parapsilosis*, *C. krusei*, *C. tropicalis*. Различные системные, местные, наследственные и экологические факторы приводят к нарушениям орального гомеостаза, и возможен переход представителей нормальной микробиоты в возбудителей оппортунистических инфекций. ВИЧ-инфицированные больные являются одной из групп пациентов с риском развития грибковых инфекций. При ВИЧ-инфекции/СПИДе кандидоз является ранним признаком иммунодефицита и может указывать на иммунный статус и прогрессирование заболевания у таких пациентов [Talapko J, Juzbašić M, Matijević T, Pustijanac E, Bekić S, Kotris I, Škrlec I. *Candida albicans*-The Virulence Factors and Clinical Manifestations of Infection. J Fungi (Basel). 2021 Jan 22;7(2):79. doi: 10.3390/jof7020079. PMID: 33499276; PMCID: PMC7912069].

При неблагоприятном течении заболевания кандидоз полости рта может трансформироваться в инвазивный кандидоз, а это уже угроза жизни пациента, и в такой ситуации крайне важно своевременно назначить адекватную терапию, которая, как правило, первоначально является эмпирической. Создание на основе молекулярно-генетических исследований базы данных по таксономической структуре *Candida spp.*, по наиболее эффективным *in vitro* антифунгальным препаратам именно у ВИЧ-инфицированных больных – это крайне важная и актуальная задача, и ее значение усиливается тем, что уровень резистентности к антифунгальным препаратам изучен у штаммов конкретного региона России, который, принимая во внимание крупные зарубежные исследования, разительно отличается от полученных Воропаевым А.Д. результатам. Так, в Rajadurai, S.G. с соавторами оценили сравнительную эффективность и безопасность различных противогрибковых препаратов, используемых для лечения орофарингеального кандидоза (ОФК) у взрослых пациентов с ВИЧ. Был проведен систематический поиск в четырех основных базах данных (Medline, Embase, CENTRAL и Scopus) для выявления рандомизированных контролируемых испытаний. Всего в количественный анализ было включено 15 испытаний, включающих данные от 2883 участников. Флуконазол был признан наиболее эффективным противогрибковым препаратом для достижения клинического излечения, за ним следуют позаконазол и итраконазол. [Rajadurai, S.G.; Maharajan, M.K.; Veettil, S.K.; Gopinath, D. Comparative Efficacy of Antifungal Agents Used in the Treatment of Oropharyngeal Candidiasis among HIV-Infected Adults: A Systematic Review and Network Meta-Analysis. *J. Fungi* 2021, 7, 637. <https://doi.org/10.3390/jof7080637>].

Сообщества комменсальных грибов, как правило, адаптированы к определенным тканевым нишам человека. В полости рта/носа могут быть выявлены следующие микромицеты: *Candida spp.*, *Aspergillus spp.*, *Cladosporium spp.*, *Saccharomyces spp.*, *Fusarium spp.*, *Penicillium spp.*, *Pichia*

spp., *Rhodotorula spp.* Крупным прорывом в области грибковой иммунологии стало открытие того, что передача сигналов рецептора IL-17 (IL-17R) является важным путем защиты от кандидоза кожи и слизистых, в том числе кандидоза полости рта. Глубокое и устойчивое ингибирование передачи сигналов рецептора IL-17 связывают с развитием орофарингеального кандидоза [Lionakis MS, Drummond RA, Hohl TM. Immune responses to human fungal pathogens and therapeutic prospects. Nat Rev Immunol. 2023 Jul;23(7):433-452. doi: 10.1038/s41577-022-00826-w. Epub 2023 Jan 4. PMID: 36600071; PMCID: PMC9812358].

Дифференциальный диагноз между колонизацией и кандидозом в определенных ситуациях вызывает сложности. Но необходимо всегда помнить, что стойкая колонизация *Candida spp.*, даже бессимптомная, может увеличить частоту клеток Th17 и связанных с ними цитокинов и, таким образом, может впоследствии увеличить риск заражения ВИЧ, хотя причинно-следственная связь требует подтверждения [Happel AU, Gasper M, Balle C, Konstantinus I, Gamielien H, Dabee S, Gill K, Bekker LG, Passmore JS, Jaspan HB. Persistent, Asymptomatic Colonization with *Candida* is Associated with Elevated Frequencies of Highly Activated Cervical Th17-Like Cells and Related Cytokines in the Reproductive Tract of South African Adolescents. Microbiol Spectr. 2022 Apr 27;10(2):e0162621. doi: 10.1128/spectrum.01626-21. Epub 2022 Mar 29. PMID: 35348351; PMCID: PMC9045181].

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

Впервые в ходе изучения штаммов, выделенных от ВИЧ-инфицированных пациентов с орофарингеальным кандидозом в г. Москва, охарактеризован состав микробиоты ротовой полости и структура популяции штаммов *Candida spp.* с применением мультилокусного сиквенс-типирования, выявлено преобладание в структуре возбудителей грибов рода

Candida, среди которых 42% составила группа *non-albicans Candida*, представители которой обычно связаны со значительными проблемами при выборе терапии.

Впервые проведено мультилокусное сиквенс-типирование устойчивых к азолам штаммов *C. albicans* с охарактеризованными механизмами приобретенной устойчивости к противогрибковым препаратам и установлено, что исследованные штаммы относятся к следующим сиквенс-типам: 3923, 3349, 363, 255, 624, 1469, 3299, 573, 3090, 747, 2724, 1411, 767, 3185, 2014, 4016, 1561, 1322, что подтверждает неоднородность популяции данного вида в исследованной выборке.

Установлено, что устойчивость к препаратам азолового ряда у исследованных штаммов *C. albicans* связана с несколькими вариантами повышенной экспрессии генов ERG11, CDR1, CDR2 и MDR1, а также ранее описанными несинонимичными мутациями в гене ERG11, приводящим к аминокислотным заменам E266D, G464S, I471L, D116E и V488I, что подтверждает множественность вовлеченных в формирование устойчивости механизмов с возможным наличием региональных особенностей распространения штаммов с приобретенной устойчивостью.

Впервые в ходе изучения штаммов *C. albicans* отмечено одновременное повышение экспрессии ERG11 и, как минимум, одного из исследуемых генов, а также сочетанная экспрессия CDR1 и CDR2, что может говорить о возможности одномоментной активации исследуемых генов. Наиболее часто встречаемая в исследованной выборке *C. albicans* мутация в гене ERG11 (E266D), ранее ассоциированная с повышением МПК флуконазола, в настоящем исследовании ассоциировалась с более низкой МПК итраконазола и позаконазола. У штаммов *C. albicans* впервые выявлена мутация в гене ERG11 (S16V), находящаяся вне активного центра фермента, не приводящая к повышению устойчивости к противогрибковым препаратам.

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

Достоверность результатов, изложенных в диссертации Воропаева А.Д. подтверждается достаточным объемом выборки объектов исследования, а также применением современных методов исследования. Анализ полученных результатов проведен при помощи современного программного обеспечения для математической и статистической обработки данных, что также подтверждает достоверность полученных данных и обоснованность научных положений, выводов и рекомендаций

Теоретическая и практическая значимость диссертационной работы

Анализ фенотипических и генетических характеристик штаммов *Candida spp.*, выделенных от ВИЧ-инфицированных пациентов с кандидозом орофарингеальной области в г. Москва, дополняет современные представления об этиологической и патогенетической роли грибов рода *Candida* в развитии микозов у ВИЧ-инфицированных пациентов с учетом региональных особенностей циркулирующих штаммов.

Полученные данные о частоте распространения группы *non-albicans Candida* у ВИЧ-инфицированных пациентов с кандидозом орофарингеальной области, а также данные об устойчивости к противогрибковым препаратам в г. Москва свидетельствуют о распространении природной и приобретенной устойчивости и могут быть использованы для актуализации современных клинических рекомендаций по терапии кандидозов в данной группе пациентов.

Исследования, проведенные в рамках данной диссертационной работы, способствуют лучшему пониманию механизмов резистентности к противогрибковым препаратам, обнаружению резистентных изолятов, определению новых мишеней для воздействия на микромицеты и подавлению роста лекарственной устойчивости.

Коллекция чувствительных и резистентных к противогрибковым препаратам штаммов *Candida spp.* депонирована в Государственную коллекцию патогенных микроорганизмов и клеточных культур «ГКПМ – Оболенск». Данная коллекция может быть использована для научных исследований и дальнейшей разработки протоколов молекулярно-генетических исследований. Материалы диссертации используются в педагогическом процессе на кафедре микробиологии, вирусологии и иммунологии имени академика А.А. Воробьева ИОЗ имени Ф.Ф. Эрисмана Сеченовского Университета.

Предложения по совершенствованию лабораторной диагностики кандидозов внедрены в работу клинико-диагностической лаборатории Консультативно-диагностического центра ФБУН МНИИЭМ им. Г.Н. Габричевского Роспотребнадзора (Акт внедрения от 10.06.2022).

Апробация результатов исследования, в том числе публикации в рецензируемых изданиях

Диссертация апробирована на заседании научной конференции кафедры микробиологии, вирусологии и иммунологии имени академика А.А. Воробьева Института общественного здоровья имени Ф.Ф. Эрисмана Федерального государственного автономного образовательного учреждения высшего образования Первый Московский государственный медицинский университет имени И. М. Сеченова Министерства здравоохранения Российской Федерации (Сеченовский Университет) (протокол №5 от 20 марта 2023 г.).

Результаты работы, основные положения диссертационной работы представлены на 6 научных конференциях и конгрессах.

По материалам диссертации опубликовано 9 печатных работ, в том числе 3 статьи и 6 тезисов в рецензируемых научных изданиях.

Оценка содержания, завершенности и оформления диссертации

Автор качественно оформил и проиллюстрировал свою диссертацию с учетом современных требований, работа содержит все необходимые разделы.

Диссертация Воропаева Александра Дмитриевича изложена на 151, включает 263 ссылки (37 работ отечественных авторов и 226 – зарубежных), 15 рисунков и 17 таблиц. Использованная литература проработана в достаточном временном интервале.

В разделе «**Введение**» автором обоснована актуальность исследования и степень разработанности темы, сформулированы цель и задачи исследования, изложена научная новизна, теоретическая и практическая значимость работы, представлены положения, выносимые на защиту, описан личный вклад автора в выполнение исследования, обоснована достоверность результатов. В подразделе «Методология и методы исследования» описаны использованные в работе методики проведенных исследований. Изложено внедрение результатов в учебный процесс, научную работу, производственные разработки. Представлены сведения о личном вкладе автора.

Глава 1. В обзоре литературы представлено современное состояние ключевых вопросов по заявленной теме диссертации, проведен анализ отечественных и иностранных научных публикаций. Автор акцентирует внимание на наиболее актуальных вопросах в каждом разделе, которым посвящена диссертационная работа. В разделах, где рассматриваются вопросы, тесно связанные с задачами диссертации, автор обосновывает выбор применяемых методов исследования, что является важным элементом работы.

РЕЗУЛЬТАТЫ СОБСТВЕННЫХ ИССЛЕДОВАНИЙ
представлены 4 главами.

Глава 2 Посвящена анализу эффективности различных методов видовой идентификации грибов рода *Candida*. Проведен сравнительный анализ всех использованных методов идентификации с учетом расчета показателей точности видовой идентификации и их практической целесообразности.

Глава 3 «Особенности оппортунистической микрофлоры ротоглотки у ВИЧ-инфицированных пациентов» содержит данные по анализу особенностей микробиоты (микобиома и бактериома) полости рта исследуемой группы пациентов с ВИЧ-инфекцией и пациентов контрольной группы с ВИЧ-инфекцией без клинических проявлений орофарингеального кандидоза. Полученные данные свидетельствуют о том, что *Candida spp.* доминируют в ротоглотке ВИЧ-инфицированных пациентов с орофарингеальным кандидозом (53%), тогда как в контрольной группе их доля только 2,3%. При этом группа *Candida non-albicans* составила 42% от всех выделенных штаммов *Candida spp.*

Глава 4 «Фенотипическая характеристика штаммов грибов рода *Candida*, выделенных из ротоглотки ВИЧ-инфицированных пациентов».

В подглаве 4.1. показано, что *Candida spp.* присутствуют в микробиоте ротоглотки пациентов с ВИЧ-инфекцией и орофарингеальным кандидозом в виде монокультуры или ассоциаций: гомогенных или гетерогенных. Ассоциации наиболее часто образуют *C. albicans* (73,3%) и *C. krusei* (100,0%), при этом *C. albicans* формирует ассоциации гомогенного типа в 72,7% случаев.

В подразделе 4.2. выделенные штаммы *Candida spp.* исследовались на чувствительность к основным группам противогрибковых препаратов. Установлено, что основная доля штаммов грибов рода *Candida*, выделенных из ротоглотки ВИЧ-инфицированных пациентов с клиническими проявлениями орофарингеального кандидоза, устойчивы к флуконазолу

(76,9%). Кроме того, на чувствительность к противогрибковым препаратам влияет структура популяции (ассоциации/монокультура, гетерогенный/гомогенный состав ассоциации).

ГЛАВА 5 «Генопипическая характеристика штаммов *Candida spp.*» состоит из трех подразделов и является наиболее интересной и до настоящего времени мало изученной в Российской Федерации проблемой.

В подразделе 5.1. «МУЛЬТИЛОКУСНОЕ СИКВЕНС-ТИПИРОВАНИЕ ШТАММОВ *C. ALBICANS*» описаны и проанализированы результаты мультилокусного сиквенс-типирования штаммов *C. albicans*. Были выявлены различные сиквенс-типы *C. albicans*. Анализ показал отсутствие кластеров идентичных сиквенс-типов с заменами в одном локусе, что подтверждает наличие гомогенных ассоциаций различных штаммов. Не были выявлены связи между кластерами и другими характеристиками, такими как ассоциации и устойчивость к противогрибковым

В подразделе 5.2. ЭКСПРЕССИЯ ГЕНОВ *CDR1*, *CDR2*, *MDR1* И *ERG11* У ШТАММОВ *C. ALBICANS*, ВЫДЕЛЕННЫХ ИЗ РОТОГЛОТКИ ВИЧ-ИНФИЦИРОВАННЫХ ПАЦИЕНТОВ излагаются результаты исследования генетических механизмов устойчивости штаммов *C. albicans* к противогрибковым препаратам производным триазола. Обнаружено, что у устойчивых штаммов *C. albicans* наблюдается повышенный уровень экспрессии генов *CDR1*, *CDR2*, *MDR1* и *ERG11*.

В подразделе 5.3. исследованы мутации в гене *ERG11* и обнаружены несинонимичные мутации, такие как S16V, D116E, E266D, G464S, I471T и V488I. Эти результаты указывают на приобретенную устойчивость *C. albicans* к препаратам азолового ряда и на необходимость более эффективных методов лечения кандидоза у пациентов с ВИЧ-инфекцией.

В разделе «**Заключение**» Воропаев Александр Дмитриевич продемонстрировал способность к вдумчивому, критичному и глубокому сравнительному анализу собственных результатов исследования и данных

литературных источников. Структура и логика изложения материалов диссертации выглядят достаточно обоснованными в контексте раскрытия поставленной цели и задач исследования. Цели и задачи исследования, сформулированные автором, были вполне достигнуты. Работа написана логично, доказательно, ясным и строгим научным языком. Выводы диссертационного исследования Воропаева А.Д. логично вытекают из результатов проведенного исследования и полностью соответствуют поставленным цели и задачам.

Диссертация представляет определенный интерес не только для научного сообщества, но и для врачей-микробиологов.

В разделе **«Практические рекомендации»** дано 3 предложения в рамках заявленной темы диссертации и имеющие значение для практической работы.

Определены перспективы дальнейшей разработки темы.

Таким образом, диссертационная работа Воропаева Александра Дмитриевича является завершенным научным исследованием, обладающим научной новизной, теоретической и практической значимостью.

Соответствие специальности

По тематике, объектам исследования, методам исследования, основным положениям и выводам, сформулированным автором, представленная диссертационная работа соответствует специальности 1.5.11. – Микробиология.

В процессе ознакомления с диссертационной работой возникли следующие вопросы и замечания:

1. Диссертация посвящена изучению орофарингеального кандидоза, что логично было бы отразить в заявленной теме диссертации «Особенности грибов рода *Candida*, выделенных от ВИЧ инфицированных пациентов».
2. Литературный обзор содержит большую часть информации, освещающей инвазивные грибковые инфекции, которую можно было сократить, тогда в главе 2 (СОБСТВЕННЫЕ ИССЛЕДОВАНИЯ) литературный обзор не занимал бы 2 страницы (стр. 53-54).
3. Нет информации о том, пациенты с какими формами орофарингеального кандидоза были исследованы, какой вид биоматериала был исследован (мазок, смывы, слюна...).
4. Первичный посев биоматериала производили только на 5% кровяной и молочно-солевой агары. Агар Сабуро и хромагар при первичном посеве не производился? Каким образом тогда были выявлены различные виды *Candida*? Хромагар наиболее целесообразно использовать для определенных биоматериалов именно как среду для первичного посева, что дает возможность не пропускать случаи смешанных культур *Candida spp.*
5. На стр. 17 указано, что Вы использовали диско-диффузионный метод определения чувствительности, и что «Также проведена оценка чувствительности методом серийных микроразведений с помощью планшетов Sensititre YeastOne10. Когда и в каких случаях применялся тот или иной метод?»
6. В главе 4 на стр. 67 в таблице 8 есть опечатки в графе ИТОГО: абсолютное число KCZ не 8, а 28, KLOT – не 1, а 31, ITR – не 1, а 21.
7. В главе 4 на стр. 67 в абзаце под таблицей 8 есть фраза «С другой стороны, триазолы, включая флуконазол, проявили наименьшую эффективность с показателем 23,1%». Согласно таблице, чувствительность итраконазола и флуконазола составила 31 из 52 (59,6%). Почему в тексте 23,1%?

8. В тексте обозначены статистически значимые различия сравниваемых величин только таким образом: $p < 0,05$, например. Но проверить эту достоверность не представляется возможным ввиду того, что абсолютные числа не указываются.

9. Встречались ли ранее исследования (отечественные и зарубежные), объединяющие данные по механизмам устойчивости и генотипированию *Candida spp.*?

Замечания не снижают положительную оценку диссертационной работы. При знакомстве с диссертацией сформировалось убеждение, что автор, Воропаев Александр Дмитриевич, квалифицированный специалист, детально и глубоко изучивший проблему, которой посвящена работа, поэтому проведенные исследования отличаются высоким качеством.

Заключение

Диссертационная работа Воропаева Александра Дмитриевича на тему «Особенности грибов рода *Candida*, выделенных от ВИЧ-инфицированных пациентов» является самостоятельной научно-квалификационной работой, в которой решен ряд актуальных задач по определению значения *Candida spp.* в составе условно-патогенной микрофлоры ротовой полости ВИЧ-инфицированных пациентов с орофарингеальным кандидозом, имеющих практическое значение для развития медицины.

Диссертация по актуальности, новизне и практической значимости отвечает требованиям п. 9-14 «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 биологических наук, а ее автор, Воропаев Александр Дмитриевич, заслуживает присуждения ученой степени кандидата биологических наук по специальности 1.5.11. – Микробиология.

Официальный оппонент:

Старший научный сотрудник бактериологической лаборатории централизованного научно-клинического лабораторного отдела научно-исследовательского института клинической онкологии имени академика РАН и РАМН Н.Н. Трапезникова федерального государственного бюджетного учреждения «Национальный медицинский исследовательский центр онкологии имени Н.Н. Блохина» Министерства здравоохранения Российской Федерации (ФГБУ «НМИЦ онкологии им. Н.Н. Блохина» Минздрава России)

Адрес: 115522, г. Москва, Каширское шоссе, 24

Тел. +7 (499) 324-24-24

e-mail: info@ronc.ru

доктор медицинских наук

Багирова Наталия Сергеевна

Подпись Наталии Сергеевны Багировой заверяю:

Ученый секретарь федерального государственного бюджетного учреждения «Национальный медицинский исследовательский центр онкологии имени Н.Н. Блохина» Министерства здравоохранения Российской Федерации (ФГБУ «НМИЦ онкологии им. Н.Н. Блохина» Минздрава России)

Адрес: 115522, г. Москва, Каширское шоссе, 24

Тел. +7 (499) 324-24-24

e-mail: info@ronc.ru

кандидат медицинских наук



Кубасова Ирина Юрьевна

08.09.2023

М.П.