



Министерство здравоохранения
Российской Федерации
федеральное государственное бюджетное
образовательное учреждение высшего об-
разования

«Тверской государственный
медицинский университет»
Министерства здравоохранения
Российской Федерации
(ФГБОУ ВО Тверской ГМУ
Минздрава России)

Советская ул., д. 4, г. Тверь, 170100
тел.: 8-4822-32-17-79,
факс: 8-4822-34-43-09,
ОКПО 01964591

E-mail: info@tvghmu.ru

05.09.2023 № 2080
на № _____



«Утверждаю»

Ректор Федерального государственного
бюджетного образовательного учреждения

высшего образования Минздрава РФ

доктор медицинских наук, профессор

Чичановская Леся Васильевна

«29» августа 2023 г.

ОТЗЫВ ВЕДУЩЕЙ ОРГАНИЗАЦИИ

О научно-практической значимости диссертационной работы Воропаева Александра Дмитриевича на тему «Особенности грибов рода *Candida*, выделенных от ВИЧ-инфицированных пациентов», представленной на соискание ученой степени кандидата биологических наук по научной специальности: 1.5.11 – Микробиология.

Актуальность темы выполненной работы

Заболевания, вызываемые оппортунистическими микроорганизмами у пациентов, инфицированных вирусом иммунодефицита человека (ВИЧ), число которых в последние годы значительно увеличивается, представляют серьезную проблему для современного здравоохранения. *Candida* spp. – ubiquitous условно-патогенные микроорганизмы, способные вызывать инфекции различной локализации, а также состояния угрожающие жизни иммунокомпрометированных пациентов. Рецидивирующий орофарингеальный кандидоз значительно ухудшает качество жизни иммунокомпрометированных пациентов. У 90% ВИЧ-инфицированных лиц наблюдается как минимум

один эпизод орофарингеального кандидоза. В структуре оппортунистических инфекций у ВИЧ-инфицированных пациентов кандидозы занимают значимую долю наравне с туберкулезом.

В настоящий момент доступны три основные группы противогрибковых препаратов: азолы, полиены, эхинокандины. Новые препараты появляются достаточно медленно, поэтому распространение устойчивости к противогрибковым препаратам среди грибов рода *Candida* становится серьезной проблемой. Растущее применение и распространение противогрибковых препаратов с целью профилактики и лечения, в том числе длительного лечения хронических рецидивирующих кандидозов слизистых, ведет не только к распространению устойчивых штаммов *C. albicans*, но и к повышению доли не-*albicans* видов грибов рода *Candida*. Распространение не-*albicans* видов у ВИЧ-инфицированных способствует развитию рефрактерного кандидоза слизистых оболочек. В случае *C. albicans* имеет место приобретенная устойчивость, что создает проблему как для каждого отдельно взятого пациента, так и для эпидемиологии кандидозов при потенциальном распространении подобных штаммов. На сегодняшний день в России ограничено представлены данные о клональной структуре популяции *Candida* spp., в частности *C. albicans*, полученные при помощи мультилокусного-сиквенс типирования.

Таким образом, проведение исследований по изучению видового разнообразия и состава ассоциаций штаммов грибов рода *Candida* в полости рта ВИЧ-инфицированных, а также клональной структуры популяций *C. albicans*, спектра и молекулярных механизмов устойчивости грибов рода *Candida* к противогрибковым препаратам, является крайне необходимым.

В связи с вышеизложенным, тема диссертационного исследования Воропаева А.Д. является актуальной, так как посвящена изучению структуры популяции и биологическим свойствам, в частности чувствительности к противогрибковым препаратам, *Candida* spp. у ВИЧ-инфицированных пациентов с орофарингеальным кандидозом.

Научная новизна исследования, полученных результатов, выводов и рекомендаций, сформулированных в диссертации

Научная новизна исследования заключается в следующем: автором впервые, с применением мультилокусного сиквенс-типирования охарактеризован состав условно-патогенной микробиоты ротовой полости и структура популяции штаммов *Candida* spp., выделенных от ВИЧ-инфицированных пациентов с орофарингеальным кандидозом в г. Москва. В результате выявлено преобладание в структуре возбудителей грибов рода *Candida* spp (53%), среди которых 42% были представлены *C. non-albicans*. Большинство выделенных в ходе исследования штаммов *C. albicans* (72,7%) и все штаммы *C. krusei* входили в состав 9 гетерогенных ассоциаций, что свидетельствует об этиологической значимости *non-albicans* видов грибов рода *Candida* в развитии кандидозов слизистых.

Автором 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 также подтверждает неоднородность популяции данного вида в исследованной выборке.

Автором впервые выявлен повышенный уровень устойчивости штаммов грибов рода *Candida*, выделенных в исследованной группе пациентов, флуконазолу (76,9%). У штаммов *C. albicans*, выделенных из гетерогенных ассоциаций, значительно чаще наблюдалась устойчивость к имидазолам и к итраконазолу ($p < 0,05$).

Автором впервые доказано, 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 под-

тверждает множественность вовлеченных в формирование устойчивости механизмов с возможным наличием региональных особенностей распространения штаммов с приобретенной устойчивостью.

Автором впервые выявлена у штаммов *C. albicans* мутация в гене ERG11 (S16V), находящаяся вне активного центра фермента, не приводящая к повышению устойчивости к противогрибковым препаратам. Среди изученных штаммов *C. albicans* отмечено одновременное повышение экспрессии ERG11 и как минимум одного из исследуемых генов (72%, $p < 0,05$), а также сочетанная экспрессия CDR1 и CDR2 (59%, $p < 0,01$), что может говорить о возможности одномоментной активации исследуемых генов.

Связь новизны исследования с планами соответствующих отраслей науки

Новизна результатов проведенного научного исследования укладывается в программу фундаментальных научных исследований в Российской Федерации на период (2021-2030 гг.), утвержденной распоряжением Правительства Российской Федерации от 31 декабря 2020 г. № 3684-р по направлению 3.4.3 Микробиология, так как проделанная работа позволяет с помощью мультилокусного сиквенс-типирования охарактеризовать состав условно-патогенной микробиоты ротовой полости и структуру популяции штаммов *Candida spp.*, выделенных от ВИЧ-инфицированных пациентов с орофарингеальным кандидозом в г. Москва, а также охарактеризовать механизмы приобретенной устойчивости микроорганизмов к противогрибковым препаратам.

Тема диссертации соответствует пункту 20(в) приоритетных направлений Стратегии научно-технологического развития Российской Федерации, утвержденной Указом Президента Российской Федерации от 1 декабря 2016 г. № 642 «переход к персонализированной медицине, высокотехнологичному здравоохранению и технологиям здоровьесбережения, в том числе за счет рационального применения лекарственных препаратов (прежде всего антибактериальных)».

Значимость для науки и практики результатов, полученных автором диссертационной работы

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

Проведено сравнение методов видовой идентификации культур грибов рода *Candida*, и обоснованы методологические подходы к лабораторной диагностике кандидозов на основе применения комплекса микробиологических методов. Отмечено, что хромогенные питательные среды могут служить оптимальным методом для выделения чистых культур и предварительной идентификации видов штаммов *Candida* spp. до применения таких методов как MALDI-TOF масс-спектрометрия и ПЦР.

Полученные данные о выявленной доле *C. non-albicans*, а также данные об устойчивости к противогрибковым препаратам возбудителей орофарингеального кандидоза, выделенных у ВИЧ-инфицированных пациентов 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.

Результаты исследования по фенотипической и генотипической характеристике изученных штаммов могут послужить основой для разработки методологических подходов по микробиологическому мониторингу популяции возбудителей кандидозов.

Собранная в результате исследования рабочая коллекция чувствительных и резистентных к противогрибковым препаратам штаммов *Candida* spp. депонирована в Государственную коллекцию патогенных микроорганизмов и клеточных культур «ГКПМ – Оболенск», с

регистрационными номерами F-2010 – F-2032, F2084-F2101. Данная коллекция может быть использована для научных исследований и дальнейшей разработки протоколов молекулярно-генетических исследований для выявления механизмов устойчивости к противогрибковым препаратам *Candida* spp.

Материалы диссертации используются в педагогическом процессе на кафедре микробиологии, вирусологии и иммунологии имени академика А.А. Воробьева ИОЗ имени Ф.Ф. Эрисмана Сеченовского Университета при изучении дисциплин «Микробиология», «Микробиология полости рта», читаемых студентам и аспирантам по направлениям подготовки (специальностям): 31.05.01 Лечебное дело, 32.05.01 Медико-профилактическое дело, 31.05.03 Стоматология, 33.05.01 Фармация, 31.05.02 Педиатрия, 06.06.01 Биологические науки, 32.06.01 Медико профилактическое дело (Акт внедрения № 104 от 17.06.2022г). 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).

Достоверность и апробация результатов исследования, в том числе публикаций в рецензируемых изданиях

Степень достоверности результатов, полученных при проведении исследования, подтверждается адекватным объемом исследований объектов наблюдения: 98 штаммов микроорганизмов, выделенных из ротоглотки ВИЧ-инфицированных пациентов с клиническими проявлениями ОФК в г. Москва, в том числе 52 штамма *Candida* spp., а также использованием оптимально подобранных методов статистической обработки данных.

Для получения результатов использовались современные микробиологические и молекулярно-генетические методы исследований, анализ результатов проводился при помощи современного программного обеспечения для математической и статистической обработки данных.

Исследования проводились в рамках темы НИР «Экология условно патогенных микробов и их роль в патологии человека» кафедры микробиологии, вирусологии и иммунологии имени академика А.А. Воробьева Института общественного здоровья имени Ф.Ф. Эрисмана ФГАО ВО Первый МГМУ имени И.М. Сеченова Минздрава РФ (Сеченовский университет) и НИОКТР «Молекулярно-генетическая и фенотипическая характеристика возбудителей оппортунистических инфекций; мониторинг их устойчивости к антибактериальным препаратам.» (2021–2025 гг.), Рег. № 121021000287–0 ФБУН МНИИЭМ им. Г.Н. Габричевского Роспотребнадзора.

Диссертация апробирована на заседании научной конференции кафедры микробиологии, вирусологии и иммунологии имени академика А.А. Воробьева Института общественного здоровья имени Ф.Ф. Эрисмана ФГАО ВО Первый МГМУ имени И.М. Сеченова Минздрава РФ (Сеченовский университет) (протокол №5 от 20 марта 2023 г.).

Материалы диссертационного исследования представлены на конференциях и конгрессах: Четвертом Съезде Микологов России (Москва, 12–14 апреля 2017 г.); Конференции по медицинской микологии "Социально-значимые микозы" (Москва, 11–12 апреля 2019 г.); Российско-китайском конгрессе по медицинской микробиологии, эпидемиологии, клинической микологии и иммунологии (XXII Кашкинские чтения) (Санкт-Петербург, 12–15 июня 2019 г.); Четвертом международном микологическом форуме (Москва, 14–15 апреля 2020 г.); Всероссийском конгрессе по медицинской микробиологии, эпидемиологии, клинической микологии и иммунологии (XXIII Кашкинские чтения) (Санкт-Петербург, 9–11 ноября 2020 г.); Всероссийском конгрессе по медицинской микробиологии, клинической микологии и иммунологии (XXIV Кашкинские чтения) (Санкт-Петербург, 9–11 июня 2021 г.). Публикации. По результатам исследования опубликовано 9 работ, в том числе 3 статьи в рецензируемых изданиях, 6 тезисов в материалах конференций

Рекомендации по использованию результатов и выводов диссертационной работы

Для использования в учебном процессе, а также в практическом здравоохранении, могут быть рекомендованы следующие результаты диссертационной работы:

1. Грибы рода *Candida* доминируют в составе микробиоты ротоглотки ВИЧ-инфицированных пациентов с орофарингеальным кандидозом (53%). Среди выделенных микроорганизмов на долю *C. albicans* приходится только 30,7%.

2. Структура популяции *Candida* spp. в микробиоте ротоглотки ВИЧ-инфицированных пациентов с орофарингеальным кандидозом представлена монокультурами либо гомогенными/гетерогенными ассоциациями. Наиболее часто встречаются в виде ассоциаций штаммы *C. albicans* (73,3%) и *C. krusei* (100,0%, $p < 0,001$).

3. По данным МЛСТ установлена принадлежность 18 штаммов *C. albicans* к сиквенс типам 3923, 3349, 363, 255, 624, 1469, 3299, 573, 3090, 747, 2724, 1411, 767, 3185, 2014, 4016, 1561, 1322, которые различались минимум по двум аллелям исследованных генов. Не выявлено генетически родственных штаммов и взаимосвязей полученных кластеров с фенотипом и генотипом.

4. *Candida* spp., выделенные из ротоглотки ВИЧ-инфицированных пациентов с орофарингеальным кандидозом, в подавляющем большинстве устойчивы к азолам, в частности к флуконазолу (76,9%). Среди штаммов *C. albicans*, выделенных из гетерогенных ассоциаций, по сравнению с монокультурными, резистентность к имидазолам встречалась более чем в 2,5 раза чаще ($p < 0,05$), а среди *C. non-albicans* из гетерогенных ассоциаций, по сравнению с *C. albicans*, в 4 раза чаще встречалась чувствительность к итраконазолу ($p < 0,05$).

5. Устойчивость к азолам *C. albicans*, выделенных от ВИЧ-инфицированных пациентов с орофарингеальным кандидозом в г. Москва,

связана с несколькими вариантами повышенной экспрессии генов ERG11, CDR1, CDR2 и MDR1 (100%), в том числе одновременным повышением экспрессии CDR1 и CDR2 (59%, $p < 0,05$), а также с мутациями в гене ERG11 (38,9%).

6. Хромогенные питательные среды представляют собой эффективный метод в лабораторной диагностике для выделения чистых культур и предварительной идентификации видов *Candida spp.* до использования MALDI-TOF MS и ПЦР с видоспецифическими праймерами.

7. При проведении микробиологической диагностики орофарингеального кандидоза у ВИЧ-инфицированных пациентов необходимо определение чувствительности к противогрибковым препаратам, учитывая высокую распространенность приобретенной устойчивости *Candida spp.*, в особенности к препаратам азолового ряда.

Соответствие специальности

Тема диссертации, цели, задачи, основные положения и выводы, сформированные автором, полностью соответствуют научной специальности 1.5.11 – Микробиология

Оценка содержания и оформления диссертации

Диссертационная работа изложена на 151 странице машинописного текста, состоит из введения, обзора литературы, описания методов и материалов исследования, результатов работы, заключения, выводов, практических рекомендаций, перспектив дальнейшей разработки темы. Диссертация содержит 16 рисунков и 17 таблиц. В работе использованы 263 источника литературы: 37 отечественных и 226 иностранных.

Личный вклад автора в проведенное исследование

Личное участие автора заключается в постановке цели, определению путей решения задач в рамках диссертационной работы. Автор лично провел анализ научной литературы по теме диссертации; разработал дизайн исследования. Диссертантом выполнены микробиологические культуральные исследования микрофлоры, в том числе *Candida spp.*, выделенной из

ротоглотки ВИЧ-инфицированных пациентов с признаками ОФК в г. Москва, молекулярно-генетические исследования полученных штаммов, в том числе МЛСТ, определение экспрессии генов ERG11, CDR1, CDR2, MDR1 и выявление мутаций в гене ERG11 с помощью секвенирования по Сэнгеру у штаммов *C. albicans*. Обработку и анализ данных микробиологических исследований проводили в соавторстве с главным научным сотрудником, заведующей лабораторией микробиологии и профилактики кишечных инфекций, к.б.н. Е.И. Лиханской. Обработку и анализ данных молекулярно-генетических исследований, биоинформационный анализ, проводили в соавторстве со старшим научным сотрудником лаборатории клинической микробиологии и биотехнологии ФБУН МНИИЭМ им. Г.Н. Габричевского Роспотребнадзора, к.б.н. Ю.Н. Урбан.

По результатам диссертационной работы Воропаев Александр Дмитриевич подготовил к публикации статьи, участвовал с докладами на научных конференциях, лично участвовал в оформлении апробации результатов исследования.

Достоинства и недостатки по содержанию, оформлению, общая оценка диссертации

Представленный в диссертационной работе материал изложен последовательно, логично и аргументировано. Обзор литературы отражает осведомленность автора об изучаемой проблеме. Каждая глава заканчивается грамотно сформулированным заключением.

Сильной стороной работы является большая обработка полученных данных, полученных в результате молекулярно – генетических исследований и биоинформационного анализа эффективности различных методов видовой идентификации грибов рода *Candida*. В результате показано, что при проведении микробиологической диагностики орофарингеального кандидоза необходима видовая идентификация *Candida* spp. и определение чувствительности к противогрибковым препаратам, так как значительная доля случаев вызывается не-*albicans* видами *Candida*, обладающими широким

спектром природной устойчивости к противогрибковым препаратам. В качестве дискуссионных вопросов к диссертанту предлагаю следующие: **как Вы думаете почему с помощью ПЦР тест-системы (АмплиСенс) не удалось установить *C. albicans* в исследуемых образцах? Связывались ли Вы с производителями тест систем, чтобы детально выяснить этот вопрос?**

К диссертационной работе имеется ряд замечаний, не влияющих на понимание сути полученных результатов. Хотелось бы видеть во всей работе правильное и в настоящее время современное слово «микробиота», а не «микрофлора» или «микробная флора». Заключение по данной работе написано очень профессионально и может быть представлено в виде обзорной статьи, интересной для многих специалистов.

В целом диссертационная работа Воропаева А.Д. имеет законченный характер и заслуживает высокой оценки.


Заключение

Таким образом, диссертационная работа Воропаева Александра Дмитриевича на тему «Особенности грибов рода *Candida*, выделенных от ВИЧ-инфицированных пациентов», представленная на соискание ученой степени кандидата биологических наук по научной специальности: 1.5.11 – Микробиология, выполненная под руководством доктора медицинских наук, профессора, Несвижского Юрия Владимировича, является законченной научно-квалификационной работой, содержащей новое решение актуальной научной задачи – дополнение современных представлений об этиологической и патогенетической роли грибов рода *Candida* в развитии микозов у иммунокомпromетированных лиц с учетом региональных особенностей циркулирующих штаммов. Диссертационная работа Воропаева Александра Дмитриевича на тему «Особенности грибов рода *Candida*, выделенных от ВИЧ-инфицированных пациентов», представленная на соискание ученой степени кандидата биологических наук по специальности шифр – 1.5.11 Микробиология, по актуальности, научной новизне и практической значимости результа-

тов, объему проведенных исследований соответствует требованиям п. 9-14 Положения «О порядке присуждения ученых степеней», утвержденного Постановлением Правительства Российской Федерации № 842 от 24 сентября 2013 года (с изменениями в редакции Постановлений Правительства РФ от 30.07.2014 N 723, от 21.04.2016 N 335, от 02.08.2016 N 748, от 29.05.2017 N 650, от 28.08.2017 N 1024, от 01.10.2018 N 1168, от 26.05.2020 N 751, от 20.03.2021 N 426, от 11.09.2021 N 1539, от 26.09.2022 N 1690, от 26.01.2023 N101, от 18.03.2023 N415), предъявляемым к диссертациям на соискание ученой степени кандидата биологических наук, а его автор, Воропаев Александр Дмитриевич, заслуживает присуждения ученой степени кандидата биологических наук по специальности шифр – 1.5.11 Микробиология.

Отзыв заслушан и одобрен на Ученом совете ФГБОУ ВО Тверской ГМУ МЗ РФ (протокол заседания № 7 от 29.08.2023 г.).

Заведующий кафедрой микробиологии и вирусологии с курсом иммунологии Федерального государственного бюджетного образовательного учреждения высшего образования «Тверской государственный медицинский университет» Министерства здравоохранения Российской Федерации (ФГБОУ ВО Тверской ГМУ Минздрава России). Адрес: 170100, Российская Федерация, Тверская область, г. Тверь, улица Советская, дом 4; тел.: +7 (4822)32-17-79, e-mail: info@tvgmu.ru

Доктор медицинских наук, профессор  Червинец Юлия Вячеславовна
«29» августа 2023 г.

Подпись Червинец Юлии Вячеславовны заверяю:
Ученый секретарь Федерального государственного бюджетного образовательного учреждения высшего образования «Тверской государственный медицинский университет» Министерства здравоохранения Российской Федерации (ФГБОУ ВО Тверской ГМУ Минздрава России). Адрес: 170100, Российская Федерация, Тверская область, г. Тверь, улица Советская, дом 4; тел.: +7 (4822)32-17-79, e-mail: info@tvgmu.ru

Доктор медицинских наук

 Шестакова Валерия Геннадьевна

«29» августа 2023 г.

