

ОТЗЫВ

официального оппонента доктора биологических наук, доцента, профессора кафедры эпидемиологии, микробиологии и доказательной медицины федерального государственного бюджетного образовательного учреждения высшего образования «Приволжский исследовательский медицинский университет» Министерства здравоохранения Российской Федерации Заславской Майи Исааковны на диссертационную работу Воропаева Александра Дмитриевича на тему «Особенности грибов рода *Candida*, выделенных от ВИЧ инфицированных пациентов», представленной на соискание ученой степени кандидата биологических наук по специальности 1.5.11 – микробиология (биологические науки).

Актуальность темы исследования

По данным ВОЗ, опубликованным в докладе 2022 г, грибковые патогены остаются серьезной угрозой для общественного здравоохранения. В связи с этим, всем странам было рекомендовано «сосредоточить и стимулировать дальнейшие исследования и мероприятия для усиления глобальных ответных мер на грибковые инфекции и устойчивость к антимикотикам».

Известно, что представители рода *Candida* являются наиболее значимыми возбудителями микозов у иммунокомпрометированных пациентов. В особенности, важно выявление и исследование развития орального кандидоза, который представляет собой ВИЧ-ассоциированную инфекцию.

До сих пор остаются не полностью изученными молекулярно-генетические свойства *Candida spp.*, определяющие их распространение, вирулентность и резистентность к противогрибковым препаратам. Кроме того, механизмы приобретенной устойчивости к противогрибковым препаратам чаще всего изучены на отдельных штаммах, выделенных от различных групп пациентов, что диктует необходимость проводить дальнейшее расширенное изучение резистентности кандид.

Известно, что одним из ключевых молекулярных механизма приобретения устойчивости к препаратам азолового ряда *Candida albicans* является гиперэкспрессия гена *ERG11*, а также возникновение в нем точечных мутаций, ассоцииро-

ванных с изменением аминокислотной последовательности белка и способных в определенной степени модифицировать чувствительность штаммов к азолам. Особый интерес представляют данные о клональной структуре популяции кандид, в частности, *C. albicans*, полученные при помощи мультилокусного-сиквенс типирования.

Информация о распространении, структуре популяции и механизмах устойчивости к антимикотикам штаммов *Candida spp.* позволит планировать лечебные и профилактические мероприятия в отношении инфекций, обусловленных микромицетами, в том числе, у лиц с иммунодефицитными состояниями.

В связи с этим, диссертационная работа Воропаева Александра Дмитриевича, в которой детально проанализированы структура популяции и биологические свойства штаммов грибов рода *Candida*, выделенных у ВИЧ-инфицированных пациентов с орофарингиальным кандидозом в г. Москва, является, безусловно, актуальной и значимой для практического здравоохранения.

Новизна исследований, научных положений, выводов и рекомендаций, сформулированных в диссертации

Проведенное А.Д. Воропаевым микробиологическое исследования штаммов микроорганизмов, выделенных от ВИЧ-инфицированных пациентов с орофарингеальным кандидозом в г. Москва, позволило охарактеризовать состав условно-патогенной микрофлоры ротовой полости и структуру популяции штаммов *Candida spp.* Выявлено преобладание в структуре возбудителей грибов рода *Candida spp.* (53%). Установлено преобладание гетерогенных по видовому составу ассоциаций штаммов грибов рода *Candida*, представленных, преимущественно, не-*albicans* видами (42%). Большинство выделенных в ходе исследования штаммов *C. albicans* (72,7%) и все штаммы *C. krusei* входили в состав гетерогенных ассоциаций, что свидетельствует об этиологической значимости не-*albicans* видов грибов рода *Candida* в развитии кандидозов слизистых.

Автором впервые проведено мультилокусное сиквенс-типирование устой-

чивых к азолам штаммов *C. albicans* с определением механизмов приобретенной устойчивости к противогрибковым препаратам. Подтверждена неоднородность популяции данного вида в исследованной выборке. Исследованные штаммы относились к 18 различным сиквенс-типам: 3923, 3349, 363, 255, 624, 1469, 3299, 573, 3090, 747, 2724, 1411, 767, 3185, 2014, 4016, 1561, 1322.

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

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. 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.

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 ($p < 0,05$). У штаммов *C. albicans* впервые выявлена мутация в гене *ERG11* (S16V), находящаяся вне активного центра фермента, не приводящая к повышению устойчивости к противогрибковым препаратам. Представленные в работе данные свидетельствуют о высоком потенциале и практической ценности полученных результатов для практического здравоохранения.

Теоретическая и практическая значимость работы

Проведенный в диссертационном исследовании Воропаева А.Д. анализ фенотипических и генетических характеристик штаммов *Candida spp.* дополняет современные представления об этиологической и патогенетической роли микромицетов в развитии микозов у ВИЧ-инфицированных лиц с учетом региональных особенностей циркулирующих штаммов. Полученные данные о значительной доле *Candida non-albicans* могут быть использованы для актуализации современных клинических рекомендаций по терапии кандидозов у данной группы пациентов.

При сравнении методов обнаружения и идентификации грибов рода *Candida* был отмечен значительный процент мультивидовых ассоциаций грибов в клиническом материале. Это послужило основанием рекомендовать хромогенные питательные среды как оптимальный метод для выделения чистых культур и предварительной идентификации видов штаммов *Candida spp.* до применения таких методов как MALDI-TOF масс-спектрометрия и ПЦР.

Результаты исследования по фенотипической и генотипической характеристике штаммов могут служить 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).

Автором определены перспективы дальнейшей разработки темы как расширение исследований в отношении видового состава кандид, так и в отношении различных патологических состояний. Также обосновывается внедрение в лабораторно-диагностическую практику протоколов молекулярно-генетических исследований для выявления устойчивости к противогрибковым препаратам.

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

Достоверность полученных результатов диссертационной работы Воропаева А.Д. не вызывает сомнения и определяется методологически верифицированными исследованиями, выполненными с применением современных бактериологических, биохимических, молекулярно-генетических и биоинформационных методов. Объем выборок объектов исследования достаточен. Примененные методы статистической обработки полученных результатов являются общепринятыми и позволяют оценить достоверную значимость полученных данных. Таким образом, положения, выносимые на защиту, аргументированы, выводы подтверждены экспериментальными данными и научно обоснованы, соответствуют содержанию представленной работы.

Апробация результатов исследования, в том числе публикации в рецензируемых изданиях

Основные материалы диссертации были доложены на международных и

Всероссийских конференциях, посвященных вопросам диагностики и профилактики микозов.

Материалы диссертации достаточно полно отражены в 9 печатных работах, включающих 3 статьи в рецензируемых изданиях и 6 тезисов в материалах конференций.

Личный вклад автора в разработку научной проблемы

Личное участие автора в выполнении диссертационной работы заключалось в сборе и анализе научной литературы, планировании и выполнении эксперимента, проведении биоинформатического и статистического анализа полученных результатов. Неоспоримым достоинством диссертации является самостоятельное выполнение всей экспериментальной части работы, а именно: бактериологических и молекулярно-генетических исследований, определения экспрессии генов, ассоциированных с антибиотикорезистентностью и их мутаций, а также мультилокусное сиквенс-типирование штаммов *C. albicans*.

Оценка структуры, содержания, завершенности и оформления диссертации

Диссертационная работа подготовлена в традиционном стиле, материал изложен на 151 странице машинописного текста, состоит из введения, обзора литературы, 4 глав собственных исследований, заключения, выводов, практических рекомендаций, перспектив дальнейшей разработки темы, списка сокращений, списка литературы. Диссертация содержит 16 рисунков и 17 таблиц. В работе использованы 263 источника литературы: 37 отечественных и 226 иностранных.

Введение включает в себя актуальность темы исследования, степень ее разработанности, цель и задачи работы, научную новизну, теоретическую и практическую значимость, методологию и методы исследования, основные положения, выносимые на защиту, а также сведения об апробации результатов.

Обзор литературы (глава 1) диссертационной работы Воропаева А.Д. «Особенности грибов рода *Candida*, выделенных от ВИЧ инфицированных паци-

ентов» основан на детальном анализе публикаций отечественных и зарубежных авторов по данной тематике. Приведены данные об эпидемической значимости грибов рода *Candida*, их видового разнообразия. Подробно описано современное состояние проблемы инфекций, вызванных грибами рода *Candida* у лиц с иммунодефицитом. Рассматриваются современные данные о механизмах резистентности штаммов грибов рода *Candida*.

В главе 2 «Анализ эффективности различных методов идентификации грибов рода *Candida*» проведен детальный анализ эффективности различных методов идентификации грибов рода *Candida*. Подробно разобраны методы микробиологической диагностики, представлен состав субстратов хромогенных сред, особенности биохимической идентификации, применение ПЦР и масс-спектрометрии. Показано, что применение хромогенных сред оправдано для первичной идентификации *Candida spp.* из гетерогенных ассоциаций.

В главе 3 «Особенности оппортунистической микрофлоры ротоглотки у ВИЧ-инфицированных пациентов» представлены данные по видовому составу и маркерам антибиотикорезистентности оппортунистической микрофлоры ВИЧ-инфицированных пациентов с орофарингиальным кандидозом и контрольной группы ВИЧ-инфицированных без признаков грибковой инфекции. Показано, что грибы рода *Candida* доминируют в ротоглотке ВИЧ-инфицированных пациентов с орофарингиальным кандидозом.

Глава 4 «Фенотипическая характеристика штаммов грибов рода *Candida*, выделенных из ротоглотки ВИЧ-инфицированных пациентов» содержит два подраздела: Структура популяции грибов рода *Candida* в ротоглотке ВИЧ-инфицированных пациентов» и «Чувствительность грибов рода *Candida*, выделенных из ротоглотки ВИЧ-инфицированных пациентов к противогрибковым препаратам».

При изучении структуры популяции грибов рода *Candida*, выделенных из ротоглотки ВИЧ-инфицированных пациентов с орофарингиальным кандидозом, было обнаружено значительное разнообразие и неоднородность микробного пейзажа.

зажа. Показано, что *Candida spp.* присутствуют в микрофлоре ротоглотки пациентов в виде монокультуры или ассоциаций: гомогенных или гетерогенных. Было установлено, что среди штаммов кандид, выделенных из гетерогенных ассоциаций, резистентность к антимикотикам встречалась чаще, по сравнению с монокультурами.

Глава 5 «Генотипическая характеристика штаммов *C. albicans*» состоит из трех подразделов: «Мультилокусное сиквенс-типирование штаммов *C. albicans*», «Экспрессия генов *CDR1*, *CDR2*, *MDR1* и *ERG11* у штаммов *C. albicans*, выделенных из ротоглотки ВИЧ-инфицированных пациентов» и «Мутации в гене *ERG11* у штаммов *C. albicans*, выделенных из ротоглотки ВИЧ-инфицированных пациентов».

Представленные автором результаты МЛС-типирования 18 штаммов *C. albicans* выявили широкое разнообразие сиквенс-типов. Проанализирована их принадлежность к разным кластерам, ассоциациям, биохимической активности, и устойчивости к противогрибковым препаратам. В результате исследования уровней экспрессии РНК генов эффлюксных переносчиков у 100% исследованных резистентных штаммов *C. albicans* был выявлен повышенный уровень экспрессии по крайней мере одного из изучаемых генов. Было исследовано наличие мутаций в гене *ERG11* и их связь с экспрессией ряда генов.

В разделе «**Заключение**» достаточно подробно проанализированы полученные в диссертационной работе результаты, проводится оценка и сопоставление полученных данных с имеющимися в мировой научной литературе сведениями, касающимися вопросов эпидемиологии, биологических особенностей и механизмов резистентности к антимикотикам грибов рода *Candida*.

Выводы диссертации обоснованы, соответствуют задачам исследования и полученным результатам.

Диссертация завершается тремя рекомендациями для внедрения в практическое здравоохранение и перспективами дальнейшей разработки темы.

Таким образом, диссертационная работа Воропаева А.Д. «Особенности гри-

бов рода *Candida*, выделенных от ВИЧ инфицированных пациентов» является самостоятельно выполненным, завершенным исследованием, обладающим научной новизной и практической значимостью.

Безусловным достижением автора является детальный анализ структуры популяции грибов рода *Candida*, выделенных при орофарингиальном кандидозе у лиц с ВИЧ-инфекцией, а также определение клональной структуры и молекулярно-генетических механизмов резистентности *C. albicans* к противогрибковым препаратам.

Автореферат соответствует ГОСТ 7.0.11-2011, полностью отражает содержание диссертационной работы, положения, выносимые на защиту, и выводы диссертации.

Соответствие специальности

По тематике, объектам исследования, методам исследования, основным положениям и выводам, сформулированных автором, диссертационная работа соответствуют специальности 1.5.11 – Микробиология.

В процессе ознакомления с диссертационной работой возник ряд вопросов и замечаний:

1. Чем обусловлен выбор генов, использованных в мультилокусном сиквенстировании штаммов, на основании чего они исследовались, является ли это стандартной схемой МЛСТ-типирования *C. albicans*?
2. Возможно ли выбрать для лабораторного исследования определенные гены (или их комбинацию), изменение экспрессии которых позволит дифференцировать устойчивость кандид к флуконазолу от устойчивости к интраконазолу?
3. На стр. 73 имеется не вполне понятная фраза « ... не было выявлено каких-либо взаимосвязей между принадлежностью штамма к тому или иному кластеру и.... устойчивости к противогрибковым препаратам». Из данного текста не ясно, отличались ли по чувствительности к антифунгальным препаратам различные сиквенс-типы *C. albicans*, выделенные из определённого локуса одного пациента?

4. Имеет ли практический смысл определять чувствительность к флуконазолу у всех видов кандид, входящих в гетерогенную ассоциацию с *C. krusei*, учитывая тот факт, что данный вид имеет врожденную устойчивость к флуконазолу?
5. Каков предполагаемый механизм, приводящий к более высокому уровню антибиотикорезистентности у штаммов кандид, выделенных из гетерогенных ассоциаций по сравнению со штаммами, полученными из монокультур?

Стоит также отметить, что с 2022 г. изменены (доклад ВОЗ) названия некоторых приоритетных патогенов, в частности, двух клинически-значимых микроорганизмов. В настоящее время для *Candida glabrata* рекомендовано новое название вида – *Nakaseomyces glabrata (glabratus)*, а для *Candida krusei* – *Pichia kudriavzevii*. В докладах допускается использовать старые названия, в то же время, в публикациях рекомендуется приводить новое название вида, в скобках указывая старое.

Тем не менее, вышеуказанные замечания и поставленные вопросы не снижают общей высокой оценки научной и практической ценности рецензируемой работы.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

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 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 – исследования структуры популяции грибов рода *Candida* в ротоглотке ВИЧ-инфицированных пациентов, а также механизмов устойчивости к противогрибковым препаратам.

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 1.5.11 – микробиология, по своей актуальности, научной новизне, объему проведенных исследований, практической значимости соответствует требованиям пунктов 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 ее автор, Воропаев Александр Дмитриевич, заслуживает присуждения ученой степени кандидата биологических наук по специальности 1.5.11 – микробиология.

Профессор кафедры эпидемиологии, микробиологии и доказательной медицины федерального государственного бюджетного образовательного учреждения высшего образования «Приволжский исследовательский медицинский университет» Министерства здравоохранения Российской Федерации (ФГБОУ ВО «ПИМУ» Минздрава России); 603000, г. Нижний Новгород, пл. Минина и Пожарского, 10/1; тел. +7(920) 012-56-67, e-mail: maya.zaslav@gmail.com

доктор биологических наук, доцент  Заславская Майя Исааковна
«11» сентября 2023 г.

Подпись Заславской Майи Исааковны заверяю:

Ученый секретарь
федерального государственного бюджетного образовательного учреждения высшего образования «Приволжский исследовательский медицинский университет» Министерства здравоохранения Российской Федерации (ФГБОУ ВО «ПИМУ» Минздрава России); 603005, г. Нижний Новгород, пл. Минина и Пожарского, д.10/1; тел: +7-831-439-09-43; факс: +7-831-439-01-84; официальный интернет-сайт: <https://pimunn.ru> или pimu.rf; e-mail: rector@pimunn.net;

доктор биологических наук



Андреева Наталья Николаевна