

ОТЗЫВ

официального оппонента, доктора медицинских наук, Багировой Наталии Сергеевны на диссертационную работу Рябина 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

Инвазивные грибковые инфекции (ИГИ) — существенная проблема у определенной группы иммунокомпрометированных больных. Инвазивный аспергиллез (ИА) занимает в структуре ИГИ одно из ведущих мест и характеризуется сложностью таксономической структуры, полиморфизмом клинических проявлений, возможностью генерализации инфекции, трудностью клинической и лабораторной диагностики. ИА отличается высокой заболеваемостью и летальностью (60 - 90 %), чаще всего отмечается в онкогематологии (33%-69%), при аллотрансплантации стволовых гемопоэтических клеток (43%). Ранняя диагностика, своевременная и адекватная терапия необходимы для снижения заболеваемости и летальности при ИА. Несмотря на некоторые достижения в области диагностики и терапии микозов, в течение последних двух десятилетий тенденции к снижению летальности от ИА не наблюдается.

Исследование Рябина И.А. посвящено оптимизации лабораторной диагностики аспергиллеза: характеристике фенотипических и масс-спектрометрических свойств возбудителей аспергиллеза, изучению штаммов с различной чувствительностью к противогрибковым лекарственным средствам. Актуальность избранной диссертантом темы не вызывает сомнений.

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

Автором выявлены новые (атипичные) свойства возбудителей аспергиллеза в отношении их морфологического полиморфизма. Данные, полученные в ходе экспериментальной части исследования, подтвердили и дополнили представление об изменчивости *Aspergillus spp.* в культуре на плотных питательных средах, используемых для выделения аспергиллов из биоматериалов, полученных от человека и с объектов окружающей среды.

Культурально-морфологическое исследование, проведенное автором с особой тщательностью, позволило ему разработать идентификационные ключи (дихотомический и синоптический) для условно-патогенных штаммов *Aspergillus spp.*, которые циркулируют в Северо-Западном федеральном округе России.

Автор разработал оригинальный биоинформационный алгоритм аннотирования MALDI-масс-спектра неразделенного белкового экстракта с использованием штаммов *Aspergillus spp.* Алгоритм позволяет определить полипептиды, образующие масс-спектр. Часть выявляемых молекул является комплексом маркеров видовой принадлежности. Результаты этого исследования позволяют выявить белки и пептиды, критичные для адаптации молодой культуры *Aspergillus spp.* (а также и других культивируемых микроорганизмов).

Рябинин И.А. изучил 56 возможных способов иерархической кластеризации и определил оптимальный способ, который позволяет группировать MALDI-масс-спектры клеточного экстракта из мицелия *Aspergillus spp.* в согласовании с филогенией этих грибов (отдельных видов, секций рода). Оптимальный способ перспективен как вспомогательный при масс-спектрометрической идентификации таких видов аспергиллов, типовые

масс-спектры которых еще не внесены в идентификационные базы («библиотеки»).

Рябинин И.А. впервые установил, что параметры MALDI-масс-спектра клеточного экстракта у некоторых аспергиллов (секций *Flavi* и *Nigri*) ассоциированы с устойчивостью к противогрибковым препаратам (производные триазола и полиены). Данная ассоциация определяется в отсутствие действия противогрибкового препарата, обусловлена конститутивными биохимическими (физико-химическими) особенностями микромицета. Такие ассоциации позволяет выявлять построение групповых матриц коэффициента корреляции.

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

Достоверность результатов диссертационной работы Рябинина И.А. не вызывает сомнений и обеспечивается достаточным объемом выборки объектов исследования. Исследовательские работы проводились с использованием новейших методологических подходов, базирующихся на анализе современной научной литературы, с использованием широкого спектра современных микробиологических и молекулярных методов исследования, биоинформационных алгоритмов и международных веб-платформ, объемом и репрезентативностью исследований, полнотой охвата изученной популяции возбудителя. Фактический материал проанализирован с использованием адекватных методов статистической обработки количественных показателей, что подтверждает значимость и достоверность полученных результатов.

Автором были в полной мере решены поставленные задачи, соответствующие означенной цели, что отражено в обоснованных выводах исследования. Полученные результаты согласуются с современной научной

литературой в данной области, что также свидетельствует о достоверности полученных результатов.

Представленные в диссертационной работе научные положения, выносимые на защиту, аргументированы. Выводы и практические рекомендации четко и ясно сформулированы, логически вытекают из результатов исследований, проведенных автором.

Теоретическая и практическая значимость диссертационной работы

Автор предложил оригинальную классификацию типов роста *Aspergillus fumigatus* (основного возбудителя инвазивного аспергиллеза) на среде Чапека с дрожжевым экстрактом, данные типы можно рассматривать в дальнейшем в качестве культуральных форм или вариантов *A. fumigatus*. Показаны положительные ростовые и дифференциальные качества картофельно-глюкозно-дрожжевого агара и агара Чапека с дрожжевым экстрактом и лактозой (вместо сахарозы) для условно-патогенных *Aspergillus* spp. В результате культурально-морфологической части исследования автор разработал ключи для видовой идентификации *Aspergillus* spp. в культуре.

Весьма важное значение имеет та часть работы Рябинина И.А., которая посвящена совершенствованию приёмов работы с техникой MALDI-TOF-масс-спектрометрии для исследования *Aspergillus* spp. для различных задач: улучшения видовой идентификации этих микромицетов, а также филогенетического и мини-протеомного анализа. Предложен и экспериментально обоснован способ субкультивирования аспергиллов, оптимальный для экстракции белков и пептидов из мицелия. Создана база масс-спектро-профилей «AMPSL» для повышения эффективности масс-спектрометрической идентификации аспергиллов. Разработан алгоритм биоинформационного анализа MALDI-масс-спектра клеточного экстракта, позволяющий установить, какие именно белки или кодируемые пептиды

формируют пики масс-спектра, а также выполнить структурную реконструкцию этих белков, определить их функциональные особенности. Определены функции, необходимые для реализации составленного алгоритма. Благодаря данному алгоритму автором работы созданы аннотации MALDI-масс-спектров *A. fumigatus*, *A. terreus*, *A. oryzae*, *A. clavatus*, *A. nidulans*. Выявлены физико-химические различия штаммов некоторых видов аспергиллов с различающейся чувствительностью к противогрибковым лекарственным средствам.

Автор впервые реконструировал ланостерол-14 α -деметилазу *Aspergillus flavus* (второй по частоте вид возбудителя аспергиллеза после *A. fumigatus*) со сниженной чувствительностью к препаратам группы триазолов. Установлено, что в первичной структуре ланостерол-14 α -деметилаз аспергиллов имеются аминокислотные сайты, специфичные для видов данного рода, следовательно, ДНК-секвенирование структурного гена *cyp51A* можно использовать для видовой идентификации *Aspergillus* spp., а не только для выявления мутаций, связанных с устойчивостью к препаратам группы триазолов.

Автором получены оригинальные видео-, аудио- и иллюстративные обучающие материалы для специалистов различного уровня знаний, что крайне важно.

Апробация результатов исследования, в том числе публикации в рецензируемых изданиях

Результаты работы, основные положения диссертационной работы представлены на 37 различных научных и научно-практических мероприятиях регионального, Всероссийского и международного уровней.

Результаты исследования Рябинина И.А. внедрены в учебный процесс кафедры медицинской микробиологии, диагностическую работу

микробиологической лаборатории микологической клиники, научно-исследовательскую работу Российской коллекции патогенных грибов НИИ медицинской микологии им. П.Н. Кашкина Северо-Западного государственного медицинского университета им. И.И. Мечникова Минздрава России, в программное обеспечение VastoSCREEN (ООО НПФ «Литех», Россия) MALDI-TOF-масс-спектрометра LaserToF LT2Plus.

По теме диссертации И.А. Рябина опубликовано 27 работ (из которых в 14 Рябинин И.А. является первым автором). Из 27 работ 13 статей в рецензируемых изданиях, 5 статей в других изданиях, 5 статей в сборниках конференций, 2 учебно-методических пособия, 1 методические рекомендации, 1 тезисы доклада в материалах конференции.

Оценка содержания, завершенности и оформления диссертации

Автор качественно оформил и проиллюстрировал свою диссертацию с учетом современных требований, работа содержит все необходимые разделы. Диссертационная работа изложена по традиционному плану, состоит из введения, обзора литературы, 4-х глав с изложением результатов собственных исследований, заключения, выводов, практических рекомендаций, перспектив дальнейшей разработки темы, списка сокращений, списка литературы и благодарностей. Список использованной литературы включает 365 источников, 34 отечественных работы, 331 – иностранных. 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» подробно 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 «Обзор литературы» включает анализ отечественных и иностранных научных публикаций, посвященных теме исследования. Представлено современное состояние ключевых вопросов прикладной биологии возбудителей аспергиллеза, включая морфологическую и химическую организацию клеток *Aspergillus spp.*, особенности физиологии и экологии этих грибов, а также роль аспергиллов в различных патологиях человека и животных. В связи с особенностями затронутой темы автором подробно описано видовое разнообразие аспергиллов, связанных с различными формами микотических инфекций и микоаллергозов, особое внимание уделено редким и «криптическим» видам. Указано развитие классификаций видов аспергиллов, критически изложены подходы к их видовой идентификации и внутривидовому типированию, факторы вирулентности и аллергенности. В связи с одной из задач исследования автор также представляет в обзоре современное состояние вопроса об определении чувствительности *Aspergillus spp.* к противогрибковым лекарственным средствам.

РЕЗУЛЬТАТЫ СОБСТВЕННЫХ ИССЛЕДОВАНИЙ представлены 4 главами.

Глава 2. посвящена вопросам культуральных свойств, микроморфологии и изменчивости аспергиллов *in vitro*. Автором представлена синтетическая морфологическая характеристика видов-возбудителей аспергиллезной инфекции, характерных для Северо-Запада России, данные об атипичных вариантах строения, а также изложены

составленные им ключи для видовой идентификации условно-патогенных аспергиллов в культуре.

Глава 3 включает описание результатов масс-спектрометрического исследования. Автор представил особенности масс-спектрометрической идентификации различных видов и групп видов аспергиллов, сравнил этот подход к идентификации с другими подходами на основе морфологического исследования и таргетного ДНК-секвенирования. Представлены результаты аннотирования MALDI-масс-спектров *Aspergillus* spp. (наиболее подробно — на примере *A. fumigatus*) по алгоритму, предложенному автором, а также расчетная химическая характеристика так называемых «спектрообразующих» белков и пептидов. Разделы главы содержат также описание составленной в рамках исследования масс-спектрометрической базы для совершенствования идентификации *Aspergillus* spp. и данные о возможности внедрения MALDI-TOF-масс-спектрометрии в определение чувствительности аспергиллов к противогрибковым лекарственным средствам.

Глава 4 посвящена биоинформационному анализу ланостерол-14 α -деметираз *Aspergillus* spp., как мишеней действия противогрибковых препаратов группы производных триазола. Исследованы сравнительные особенности первичных структур ланостерол-14 α -деметираз условно-патогенных и непатогенных видов аспергиллов, а также приведены результаты структурной реконструкции данного фермента у *Aspergillus flavus*.

Глава 5 содержит описание разработанных в ходе данного исследования модификаций методических приемов экспериментальной работы с аспергиллами.

В разделе «**Заключение**» Рябинин Игорь Андреевич 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 Рябина И. А. 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 8 предложений в рамках заявленной темы диссертации и имеющие значение для экспериментальной работы с *Aspergillus spp.*, а также и для диагностики аспергиллеза.

Определены перспективы дальнейшей разработки темы.

Таким образом, диссертационная работа Рябина Игоря Андреевича является завершенным научным исследованием, обладающим научной новизной, теоретической и практической значимостью.

Соответствие специальности

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

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

1. На стр. 71, стр. 75 и 78 размещены рисунки 10-12 (фотографии). Это интересные и полезные фото культур *Aspergillus spp.*, но качество демонстрации оставляет желать лучшего – очень мелкие изображения. Также неудачно сделан рисунок 39 на стр. 155 в Главе 5: фотографии очень мелкие и в черно-белом исполнении, трудно считываются .

2. Термин «экссудат», употребляемый автором на стр. 73, 77, 81 и др., в медицине принято применять в ином смысле (как жидкость, образующаяся и выделяемая в ткани или полости органов из мелких кровеносных сосудов при воспалении).

3. В подразделе 2.4 на стр. 95-98 размещена таблица 12 «Краткий дихотомический ключ для идентификации возбудителей аспергиллеза». Таблица, безусловно, содержит ценные сведения, но информация трудно воспринимается и являет собой не совсем удачный вариант демонстрации. Было бы очень удобно для практической работы создать электронный алгоритм пошаговой видовой идентификации аспергиллов на основании информации, изложенной Рябининым Игорем Андреевичем в таблицах 12-14.

Замечания ни в коей мере не снижают положительную оценку диссертационной работы. При знакомстве с диссертацией сформировалось убеждение, что автор, Рябинин Игорь Андреевич, высокопрофессиональный специалист, детально и глубоко изучивший проблему, которой посвящена работа, поэтому проведенные исследования отличаются высоким качеством.

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 возбудителей аспергиллеза, в том числе с различной чувствительностью к противогрибковым лекарственным средствам, для оптимизации лабораторной диагностики аспергиллеза.

Диссертационная работа Рябинина Игоря Андреевича по актуальности, новизне и практической значимости 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:

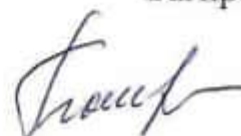
Старший научный сотрудник лаборатории микробиологической отдела клинико-лабораторной диагностики научно-исследовательского института клинической онкологии имени академика РАН и РАМН Н.Н. Трапезникова федерального государственного бюджетного учреждения «Национальный медицинский исследовательский центр онкологии имени Н.Н. Блохина» Министерства здравоохранения Российской Федерации (ФГБУ «НМИЦ онкологии им. Н.Н. Блохина» Минздрава России, 115522, г. Москва, Каширское шоссе 23; сайт <https://www.ronc.ru/>; тел. +7 (499) 324-24-24, e-mail: info@ronc.ru)

доктор медицинских наук

«20» февраля 2023 г.

Подпись Багировой Натальи Сергеевны заверяю:

Багирова Наталья
Сергеевна



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, 115522, г. Москва, Каширское шоссе, 23; сайт <https://www.ronc.ru/>; тел. +7 (499) 324-24-24, e-mail: info@ronc.ru)

кандидат медицинских наук

Кубасова Ирина
Юрьевна

