

«УТВЕРЖДАЮ»

Проректор по научной работе Федерального государственного бюджетного образовательного учреждения высшего образования «Первый Санкт-Петербургский государственный медицинский университет имени академика И.П. Павлова»

Министерства здравоохранения Российской Федерации Минздрава Российской Федерации академик РАН, д.м.н., профессор

Ю.С. Полушин

17.03 2023 года



ОТЗЫВ ВЕДУЩЕЙ ОРГАНИЗАЦИИ

о научно-практической ценности диссертационной работы Рябниина Игоря Андреевича на тему: «Микробиологическая и масс-спектрометрическая характеристика основных возбудителей аспергиллеза», представленной на соискание ученой степени кандидата медицинских наук по специальности: 1.5.11.- Микробиология (медицинские науки).

Актуальность темы выполненной работы

Текущая пандемия COVID-19, сопровождающаяся увеличением частоты госпитализации, более интенсивным вовлечением в лечебный процесс отделений реанимации и интенсивной терапии, резко обострила проблему оппортунистических инфекций, как в клиническом, так и в лабораторное-

диагностическом аспектах. Среди микотических осложнений новой коронавирусной инфекции особое место занимает инвазивный аспергиллез лёгких. Одновременно сохраняются и традиционные факторы риска инвазивного аспергиллеза, среди них – различные иммуносупрессии, связанные прежде всего со злокачественными новообразованиями, состояниями после трансплантации, цитостатической и глюкокортикоидной терапией аутоиммунных заболеваний и некоторых декомпенсированных эндокринопатий.

Лабораторная диагностика инвазивного аспергиллеза на сегодня включает все основные приемы микробиологического исследования. Используются методы микроскопия биоматериала, прямого обнаружения антигенов и генов возбудителя, культурально-микологическое исследование. Несмотря на разнообразие диагностических приемов, до сих пор в диагностике имеется ряд проблем, связанных с недостаточной изученностью свойств самого возбудителя. Именно с этим связана недостаточная эффективность имеющихся средств генетической диагностики в форме мультиплексных тест-систем, основанных на полимеразной цепной реакции, предназначенные для обнаружения основных возбудителей аспергиллеза и определения у них важнейших мутаций, ассоциированных с устойчивостью к триазолам.

В сложившейся ситуации культуральное микологическое исследование остаётся крайне важным подходом при изучении свойств условно-патогенных *Aspergillus* spp. Очевидно, что в такой ситуации очень важным является разработка методических приемов, для дальнейшего изучения биологических свойств возбудителей. К числу таких практически значимых проблем относятся полиморфизм *Aspergillus* spp, не позволяющий в полной мере использовать информацию, получаемую при исследовании протеома грибов, и наличие «белых пятен» в современных представлениях о механизмах устойчивости аспергилл к противогрибковым препаратам.

Изучению этих проблем посвящена диссертационная работа Рябинина И.А., которую с учётом вышеизложенных фактов, можно считать актуальной.

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

Научная новизна исследования Рябина И.А. обусловлена комплексом установленных фактов, включая следующие:

- 1) Получены данные о морфологических свойствах культур *Aspergillus* spp. выращенных на различных питательных средах, используемых для посева биоматериала и материала из объектов окружающей среды, которые ранее не были помещены в справочную литературу по этим микромицетам;
- 2) Выявлены и описаны атипичные варианты строения *Aspergillus* spp.;
- 3) Определены белки и пептиды, ионы которых образуют MALDI-масс-спектр экстракта из мицелия *Aspergillus* spp.;
- 4) В первичной структуре ланостерол-14-альфа-деметилазы аспергиллов обнаружены аминокислотные сайты, специфичные для отдельных видов и групп видов;
- 5) Автором выполнена структурная реконструкция ланостерол-14-альфа-деметилазы.

Также автором разработаны новые методические приемы и средства для работы с *Aspergillus* spp., включая:

- 1) оригинальные ключи для морфологической идентификации аспергиллов в культуре;
- 2) рецептура альтернативной питательной среды для культивирования аспергилл (агар Чапека с дрожжевым экстрактом и лактозой);
- 3) способ субкультивирования *Aspergillus* spp. на этапе подготовки к масс-спектрометрическому исследованию;
- 4) алгоритм биоинформационного аннотирования результатов протеомного анализа клеточной биомассы или клеточного экстракта микроорганизма (на примере грибов рода *Aspergillus*);

- 5) база (библиотеку) типовых масс-спектро-профилей «AMPSL» для совершенствования видовой идентификации *Aspergillus* spp. с использованием MALDI-TOF-масс-спектрометрии.

Таким образом, представленное диссертационное исследование отвечает критерию научной новизны.

Связь новизны исследования с планами соответствующих отраслей науки

Одним из результатов работы отечественных исследовательских учреждений в рамках реализации научной платформы «Микробиология» должен быть: «Совершенствование и развитие диагностических тест-систем и методов экспресс-диагностики». В том числе данное направление должно быть реализовано согласно планам работы по платформе в виде «диагностических тест-систем, основанных на новых физических принципах...». Использование алгоритма аннотирования MALDI-масс-спектров *Aspergillus* spp. позволило Рябичину И.А. выявить в числе «спектрообразующих» белков соединения с уникальной первичной структурой, отсутствующие в протеомах других микромицетов, и, таким образом, являющиеся новыми перспективными биомаркерами для создания тестов экспресс-идентификации культур и индикации аспергилл в биоматериале тела человека.

В диссертационной работе (главы 3, 4, 5 результатов собственных исследований) для решения поставленных задач применены и усовершенствованы подходы, соответствующие критическим технологиям Российской Федерации «Геномные, протеомные и постгеномные технологии» (№5) и «Нано-, био-, информационные, когнитивные технологии» (№8), предусмотренные Указом Президента Российской Федерации от 07.07.2011 №899 «Об утверждении приоритетных направлений развития науки, технологий и техники в Российской Федерации и перечня критических технологий Российской Федерации» в редакции в редакции Указа Президента

Российской Федерации от 16.12.2015 №623.

При достижении результатов диссертационной работы (главы 3, 4, 5 результатов собственных исследований) соискателем были применены научные критические технологии «Атомно-адсорбционная спектрометрия, масс-спектрометрия и хромато-масс-спектрометрия, ближняя инфракрасная спектроскопия» (№1) и «Биоинформатика и компьютерное (*in silico*) моделирование, молекулярный докинг» (№2) согласно «Списку критических научных техно-логий» (Приложение 1), одобренному Научным Советом Минздрава России («Информация Научного Совета Минздрава России» от 16.04.13).

Совершенствование мер лабораторной диагностики тяжелых инвазивных грибковых инфекций, включая инвазивный аспергиллез, повышение диагностической эффективности и информативности, связанное с отечественными разработками, в том числе представленной диссертационной работой, следует рассматривать, как ответ на один из «больших вызовов» в рамках Стратегии научно-технологического развития Российской Федерации: «демографический переход, обусловленный увеличением продолжительности жизни людей, изменением их образа жизни, и связанное с этим старение населения, что в совокупности приводит к новым социальным и медицинским проблемам, в том числе к росту угроз глобальных пандемий, увеличению риска появления новых и возврата исчезнувших инфекций» (п. 15.6 Указа Президента Российской Федерации от 01.12.2016 г. №642 «Стратегии научно-технологического развития Российской Федерации»).

Представленная диссертационная работа выполнена в соответствии с темами Государственных заданий Минздрава России «Изучение молекулярной эпидемиологии, микробиологический мониторинг внутрибольничных грибковых инфекций, актуальных госпитальных штаммов возбудителей внутрибольничных инфекций. Изучение генома и протеома возбудителей микозов» (2011 - 2015 гг.); «Изучение молекулярных маркеров риска развития микозов и резистентности микромицетов к прогиворибковым

препаратам на уровне генома и протеома» (2016 - 2018 гг.); «Молекулярные предикторы развития микозов и микоаллергозов различного генеза на основе иммунопатогенеза» (2016 - 2018 гг.); «Разработка быстрых методов диагностики микозов и молекулярных маркеров резистентности клинически значимых микромицетов к противогрибковым препаратам» (2018 -2020 гг.).

Таким образом, тема, поставленная цель и задачи, а также полученные результаты по диссертационной работе Рябинина И.А., в том числе составляющие научную новизну работы, соответствуют планам развития отечественной медицинской микробиологии.

Значимость для науки и практики данных, полученных автором диссертации

Полученные автором данные об изменчивости *Aspergillus* spp. в культуре, а также ключи для видовой идентификации представляют ценность для микробиологов — работников лабораторий медицинских организаций, центров гигиены и эпидемиологии, коллекций культур, разработчиков питательных сред.

Факт наличия в MALDI-масс-спектрах *Aspergillus* spp. признаков, относящихся к устойчивости к триазолам и полиенам, в дальнейшем позволит создать программные инструменты (на базе обработки данных MALDI-TOF-масс-спектрометрии) для экспресс-обнаружения резистентных штаммов возбудителей аспергиллеза.

При реконструкции третичной структуры ланостерол-14-альфа-деметилазы *Aspergillus flavus* автором использован прием агрегации данных о сайтах связывания лигандов из нескольких кристаллографических моделей белков (после предварительного выравнивания), что позволяет сформировать наиболее полную информацию о строении активного центра фермента. Указанный прием превосходит по информативности стандартные возможности биоинформационных ресурсов для реконструкции и

перспективен для «цифрового молекулярного дизайна» при разработке новых лекарственных средств, в том числе противомикробных.

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

Достоверность результатов работы обеспечена репрезентативными объемами выборок объектов исследования, организованной регистрацией данных объектов и методами математической и статистической обработки, выбранными адекватно поставленным задачам.

Результаты диссертации Рябинина И.А. в форме устных докладов, стендовых докладов, мастер-классов представлены на 37 научных и научно-практических мероприятиях различного уровня. Диссертантом по теме исследования опубликовано 27 работ, включая статьи в рецензируемых изданиях 13; статьи в других изданиях — 5; статьи в сборниках конференций — 5; методические рекомендации, два учебно-методических пособия, тезисы в материалах конференции.

Рекомендации по использованию результатов и выводов диссертационной работы

Разработанные в ходе диссертационного исследования ключи (дихотомический и синоптический) и база масс-спектропрофилей для видовой идентификации *Aspergillus* spp. будут полезны для работы микробиологических лабораторий медицинских организаций.

Практические рекомендации автора по культивированию отдельных видов и групп видов *Aspergillus* spp. представляют ценность для оснащения учебного процесса на этапе дополнительного профессионального образования специалистов в области медицинской микробиологии. Данное утверждение также справедливо и в отношении созданных в ходе реализации работы аудио-

, видео- и иллюстративных обучающих материалов.

Методические подходы, которые использованы автором при составлении алгоритма аннотирования MALDI-масс-спектров, целесообразно применять при конструировании отечественных биоинформационных ресурсов и баз данных в соответствии с Постановлением Правительства Российской Федерации от 22.04.2019 г. №479 «Об утверждении Федеральной научно-технической программы развития генетических технологий на 2019 - 2027 годы».

Соответствие специальностям

Диссертационное исследование Рябинина И. А. соответствует специальности 1.5.11. – Микробиология (медицинские науки).

Оценка содержания и оформления диссертации

Диссертация изложена на 226 страницах, обладает классической структурой: введение, обзор литературы (глава 1), результаты собственных исследований (главы 2-5), заключение, выводы, практические рекомендации, перспективы дальнейшей разработки темы, список сокращений, список литературы, благодарности. Список литературы включает ссылки на 34 работы российских исследователей, 331 – авторов из других стран. Работа снабжена 30 таблицами, иллюстрирована 40 рисунками. Том диссертации оформлен в соответствии с требованиями ГОСТ 7.0.11-2011.

Раздел «Введение» включает актуальность темы и степень ее разработанности, цель работы, задачи исследования в количестве четырех, основные положения диссертации, научную новизну, теоретическую и практическую значимость исследования; методологию и методы проведенной работы; внедрение результатов исследования; сведения о личном вкладе автора.

В главе 1 «Обзор литературы» на основании анализа актуальных

литературных источников автор дал характеристику объектам исследования, включая морфологические свойства и биохимическую организацию аспергилл, а также данные по физиологии и экологии возбудителей аспергиллеза, разнообразие их действия на организмы человека, домашних и диких животных.

Особенно детально в главе 1 проанализировано видовое разнообразие условно-патогенных представителей рода *Aspergillus* и системы их классификации. Дано понятие «криптических» видов и указано их значение в этиологии инвазивного аспергиллеза и других инфекций, обусловленных *Aspergillus* spp. Приведен обзор методов видовой идентификации аспергилл, их внутривидового типирования. В рамках темы исследования завершающие разделы первой главы касаются особенностей патогенеза инвазивного аспергиллеза, его связи с иммунопатологией, факторов вирулентности и аллергенности аспергилл, лабораторным и молекулярно-биологическим аспектам этиотропной терапии и устойчивости к противогрибковым препаратам.

Результаты собственных исследований изложены в 4-х главах.

Вторая глава содержит сведения о культуральных свойствах изученных *Aspergillus* spp., их спонтанном и индуцированном полиморфизме (в зависимости от состава питательной среды), атипичных вариантах морфологии колоний и микро-морфологии. Также автором приведены ключи (дихотомический и синоптический) для видовой идентификации условно-патогенных аспергиллов.

В третьей главе представлены различные возможности применения результатов MALDI-TOF-масс-спектрометрии *Aspergillus* spp. в решении задач лабораторной диагностики и экспериментальной микологии. Изложены варианты применения этой техники для видовой идентификации, в том числе в сравнении с другими методами идентификации культур аспергилл, выявления устойчивости к противогрибковым препаратам, исследования композиции низкомолекулярной фракции протеома.

В четвертой главе описано исследование особого объекта – ланостерол-

14a-демегилазы, как фермента, определяющего действие на *Aspergillus* spp. терапевтических препаратов – производных триазола.

Пятая глава включает описание разработанных в ходе данного исследования модификаций методических приемов экспериментальной работы с аспергиллами.

В разделе «Заключение» проведено обстоятельное сопоставление полученных результатов с данными других авторов и учреждений по затронутой теме.

Содержание работы, представленные результаты соответствуют поставленной цели. Выводы соответствуют задачам исследования.

Автореферат соответствует структуре и содержанию диссертации, оформлен согласно существующим требованиям.

Вопросы по диссертационной работе

В ходе анализа представленной диссертации возникли следующие вопросы:

- 1) С чем связаны макро- и микроморфологический полиморфизм в культуре аспергилл?
- 2) Какими способами Вы рекомендуете осуществлять долгосрочное хранение штаммов *Aspergillus* spp.?
- 2) Имеет ли созданная в работе база типовых масс-спектропрофилей «AMPSL» какие-либо принципиальные отличия от аналогичных стандартных баз, поставляемых в программных пакетах масс-спектрометров?
- 3) Какими явлениями можно объяснить факт избирательного участия сравнительно небольшой группы белков и пептидов в формировании

MALDI- масс-спектра у *Aspergillus* spp.?

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Диссертационная работа Рябина 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 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.

Таким образом, по своей актуальности, научной новизне, практической значимости и достоверности полученных результатов, а также объему и уровню проведенного исследования диссертационная работа Рябина Игоря Андреевича отвечает требованиям пунктов 9-14 «Положения о присуждении ученых степеней», утвержденного Постановлением Правительства Российской Федерации № 842 от 24 сентября 2013 года (с изменениями в редакции Постановлений 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 20.03.2021 № 426, от 11.09.2021 № 1539, с изменениями, внесенными Постановлением Правительства РФ № 751 от 26.05.2020, от 26.09.2022 № 1690 «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 (медицинские науки).

Отзыв обсужден и одобрен на заседании кафедры микробиологии и вирусологии Федерального государственного бюджетного образовательного учреждения высшего образования «Первый Санкт-Петербургский государственный медицинский университет имени академика И.П. Павлова» Министерства здравоохранения Российской Федерации Минздрава России, протокол № 55 от «16» февраля 2023 года.

Заведующий кафедрой микробиологии и вирусологии Федерального государственного бюджетного образовательного учреждения высшего образования «Первый Санкт-Петербургский государственный медицинский университет имени академика И.П. Павлова» Министерства здравоохранения Российской Федерации (ФГБОУ ВО «ПСПбГМУ им. акад. И.П. Павлова» Минздрава России). Адрес: 197022, г. Санкт-Петербург, ул. Льва Толстого, д. 6-8; тел.: 8 (812) 338-78-95; e-mail: info@1spbgnu.ru.

Доктор медицинских наук, профессор
академик РАЕН



Виктор Вениаминович Тец

Подпись Виктора Вениаминовича Теца заверяю.

Проректор по научной работе Федерального государственного бюджетного образовательного учреждения высшего образования «Первый Санкт-Петербургский государственный медицинский университет имени академика И.П. Павлова» Министерства здравоохранения Российской Федерации (ФГБОУ ВО «ПСПбГМУ им. акад. И.П. Павлова» Минздрава России). Адрес: 197022, г. Санкт-Петербург, ул. Льва Толстого, д. 6-8; тел.: 8 (812) 338-78-95; e-mail: info@1spbgnu.ru.:

Доктор медицинских наук, профессор
академик РАН



Юрий Сергеевич Полушин

